

TEMEROSIDAD EN RATAS HETEROGÉNEAS (N/NIH-HS) Y ROMANAS (RHA/RLA): ESTUDIOS HORMONALES Y DE EXPRESIÓN GÉNICA DIFERENCIAL



Reproducción del cuadro: "Reloj blando en el momento de la primera explosión" (Salvador Dalí. 1954).

Tesis Doctoral presentada por Sira Díaz Morán para obtener el grado de Doctor

Institut de Neurociències. Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, 2012

TEMEROSIDAD EN RATAS HETEROGÉNEAS (N/NIH-HS) Y ROMANAS (RHA/RLA): ESTUDIOS HORMONALES Y DE EXPRESIÓN GÉNICA DIFERENCIAL

Tesis Doctoral presentada por

Sira Díaz Morán

para obtener el Grado de Doctor

Director: Dr. Alberto Fernández-Teruel



Universitat Autònoma de Barcelona

Unidad de Psicología Médica, Instituto de Neurociencias, Departamento de Psiquiatría y de
Medicina Legal

Barcelona, 2012

TEMEROSIDAD EN RATAS HETEROGÉNEAS (N/NIH-HS) Y ROMANAS (RHA/RLA): ESTUDIOS HORMONALES Y DE EXPRESIÓN GÉNICA DIFERENCIAL

Tesis Doctoral presentada por **Sira Díaz Morán**
para obtener el Grado de Doctor

Director: **Dr. Alberto Fernández-Teruel (Universidad Autónoma de Barcelona)**



Programa de Doctorado en Psiquiatria (2010-2012)
Unidad de Psicología Médica, Instituto de Neurociencias, Departamento de Psiquiatria y de
Medicina Legal

Firma,

Dr. Albert Fernández-Teruel

Sira Díaz Morán

Barcelona, 2012



Agradecimientos

Todos los que me conocen saben que la palabra que mejor me define es “emocional”. Por ello, este apartado es para mí esencial en la presentación de un trabajo de este tipo, en el que a parte de mi esfuerzo y tesón, han participado directa o indirectamente muchas personas que sin su apoyo nunca lo hubiera conseguido. A todos MUCHAS GRACIAS.

Mamá y Papá, sois mi talón de Aquiles, escuchándome en los momentos difíciles, valorando mi esfuerzo y dándome consejos para sobrellevar situaciones en las que no sabía cómo comportarme. Aarón, estoy orgullosa del hombre en el que te has convertido. Siempre estaré contigo. Gracias al resto de mi familia, por demostrarme una vez más que sois un apoyo incondicional: Tito y Tita, aunque en la distancia, nunca me habéis dejado de estar en mi corazón y pensamiento. Sonia, Aurora y los Josés, sois las mejores tíos del mundo!! Gracias por escucharme y darme ánimos cuando los días se hacían eternos. Estoy segura que juntos podremos con todo.

Carmen S., Juan, Enric, Núria A., Marta, Gerard, Montse, Jordi, Núria, Carmen, Mari, Pablo, Ana y Alicia, gracias por abrirme las puertas de vuestra casa y permitirme ser uno más, estoy muy orgullosa de formar parte de vuestra familia.

Joan, eres mi compañero, mi amor y mi mejor amigo; gracias por querer compartir tu vida conmigo, por mostrarme que con esfuerzo y tenacidad se pueden conseguir cosas que parecían muy difíciles. Gracias por no dejarme desfallecer.

Íngrid y Patri, somos amigas desde siempre y os considero como parte de mi familia. Gracias por hacerme reír y olvidarme de los problemas. Lucía, gracias por darme cariño y un abrazo siempre que lo he necesitado. Seguro que fuimos hermanas en otra época. Montse, parece mentira que hayan pasado once años desde que nos conocimos en primero de carrera; gracias por ser mi amiga durante todos estos años y espero que lo sigamos siendo siempre.

Gracias a mis compañeras de secretaría (Sandra, Magda, Beth, Elisabeth y Anna), me acogisteis las primeras cuando aparecí en el departamento y me enseñasteis a ser mejor persona. Gracias por alegrar días un poco grises.

Gracias a mis compañeras de la Unidad de Drogodependencias del Hospital Universitario Vall d’Hebron (Laia R., Marina, Constanza, Susana, C. Roncero, Lara, Laia M. y Begoña). Con vosotros tuve la suerte de trabajar en mis primeros años de doctorado, aprendí lo que es el trabajo clínico de verdad, que no hay personas/pacientes de primera o de segunda y que la humanidad está por encima de todo. Gracias por vuestra amistad, que espero conservar siempre.

Dr. Tobeña, gracias por su confianza en mi esfuerzo y en darme la oportunidad de trabajar con vosotros. Durante estos años ha sido para mí un guía y mentor.

Albert, esta tesis no existiría sin tu apoyo y orientación minuciosa. Gracias por el gran esfuerzo que has hecho para que esta tesis estuviera acabada a tiempo, a pesar de batallar contra mi impulsividad e impaciencia. Me has enseñado que el esfuerzo merece la pena y el valor del trabajo en grupo.

Marta, gracias por escucharme en momentos complicados y hacerme reír en las horas eternas de vídeos en el laboratorio (ya sabes... Manolo y Benito...). Toni, gracias por ayudarme desde el principio, y aconsejarme en momentos complicados de convivencia en el laboratorio. Fina, gracias por tus conversaciones, me hubiera encantado haber trabajado más tiempo juntas. Regina, Gloria, Carme y Esther, gracias por vuestra ayuda sobre todo al principio cuando llegué hace más de dos años y, aterricé en un mundo totalmente nuevo para mí; me hubiera gustado haber tenido una relación más cercana dentro y fuera del laboratorio, pero supongo que no siempre puede ser. Jaume, gracias por tu lealtad y recordarme el sentido del compañerismo. Nunca te podré agradecer lo suficiente, el apoyo que me has dado desinteresadamente. Celio, gracias por ayudarme en la etapa final de la tesis. En los meses que hemos trabajado juntos, me has demostrado que eres un buen compañero y mejor persona. Andrea, eres una persona estupenda, gracias por dejarme conocerte. Irene, gracias por tu ilusión y complicidad. Gracias a mis compañeros de la Unidad (Beatriz, David, Rosa María, Rafael y Raquel) por todos los momentos de risas que hemos pasado juntos. Gracias a la gente de Jaén! Sin vosotros no estaría hoy escribiendo esto. Carmen, gracias por tu apoyo y que me acogieras cada vez que he ido a Jaén. Rocío y Marta, gracias por hacerme sentir como en casa. Ignacio, gracias por enseñarnos tu maestría con el bisturí además de tu calidad humana. Francisco J. Esteban, gracias por recibirme y enseñarme tantas cosas de genética y estadística, sin tu ayuda no hubiera podido hacer nada de esto. Leticia, gracias por tu simpatía y calidez. J.A. Conejero, gracias por ayudarme a entender los entresijos del microarray y a hacer que parecieran hasta fáciles, conceptos muy complejos.

Por último, gracias a las ratas, que sin ellas la ciencia no podría avanzar en innumerables campos; y gracias a Rocco, mi compañero, por recibirme cada día con alegría y acompañarme cuando me he sentido sola.

A todos muchas gracias por ser cómplices de que esta tesis sea una realidad, y a todo lo que personalmente he aprendido de vosotros.

Un abrazo,

Sira

Este trabajo se ha realizado gracias al apoyo del Ministerio de Ciencia e Innovación (MICINN, PSI2009-10532), de la “Fundació La Marató TV3” (ref. 092630), de 2009SGR-0051 y de los proyectos europeos “EURATOOLS” (no. LSHG-CT-2005-019015) y “EURATRANS” (HEALTH-F4- 2010-241504).

Prólogo

Esta tesis tiene el objetivo de realizar la caracterización hormonal y genética de las ratas N/Nih-HS, y con ello, contribuir al conocimiento y comprensión de las bases genéticas de la ansiedad y el miedo aprendido. El propósito inicial era presentar la tesis doctoral por compendio de publicaciones, pero debido a la necesidad de depositar la tesis en un momento determinado por cuestiones profesionales, finalmente se optó por presentar la tesis con el formato tradicional. Por esta razón se adjuntan en el anexo y no en el apartado de resultados, los dos artículos publicados que son fruto de los resultados que se describirán a continuación. La referencia de los artículos se lista a continuación.

Artículos anexos publicados:

- Díaz-Morán, S.; Palencia, M.; Mont, C.; Cañete, T.; Blázquez, G.; Martínez-Membrives E.; López-Aumatell R.; Tobeña A. y Fernández-Teruel, A. (2011). Coping style and stress hormone responses in genetically heterogeneous rats: comparison with the Roman rat strains. *Behavioral Brain Research*, 228: 203-210.

- Díaz-Morán, S.; Palència, M.; Cañete, T.; Blázquez, G.; Morón, I.; Sabariego, M.; Donaire, R.; Torres, C.; Mont-Cardona, C.; Martínez-Membrives, E.; López-Aumatell, R.; Tobeña, A. y Fernández-Teruel, A. (2011). Aplicabilidad del análisis de microarray en la detección de patrones de expresión genética diferencial en procesos psicológicos: expresión genética amigdalár en ratas N/Nih-HS extremas en ansiedad. *Iniciación a la Investigación*, 6: r2: 1-8.

Listado de abreviaturas

ACI/N: agouti rat strain;	CRH o CRF: hormona liberadora de corticotropina;
ACTH: adrenocorticotrop hormone;	cRNA: complementary RNA;
ADN: ácido desoxirribonucleico;	CS: conditioned stimulus;
ADNc: ADN complementario;	D ₂ R: receptor D2 de la dopamina;
AMPc: Adenosín monofosfato cíclico;	DAVID: Functional Annotation Bioinformatics Microarray Analysis;
AMY: amígdala;	DEPC: dietilpirocarbonato;
ANOVA: análisis de la varianza;	DNA: deoxyribonucleic acid;
ARC: actividad reguladora del citoesqueleto;	EC: estímulo condicionado;
ARN: ácido ribonucleic;	EI: estímulo incondicionado;
AVP: arginina-vasopresina;	EIA: enzyme immunoassays;
BAS: behavioural Approach System;	ELISA: enzyme linked inmuno sorbent assay;
BAS-C: basal corticosterone;	F344/H: Fischer 344 rat strain;
BAS-PR: basal prolactin;	FC: fold change;
BIS: behavioural Inhibition System;	FDR: false discovery rates;
BN/SsN: brown Norway rat strain;	FFFS: fight/freezing/flight;
BUF/N: Buffalo rat strain;	GABA: ácido gamma-aminobutírico;
CamKII: complejo actina-atinina;	GnRH: hormona liberadora de gonadotropina;
CBN: caja blanca-negra;	HAB: high Anxious Behavior;
cDNA: complementary DNA;	HIPP: hipotálamo;
CET: number of the change in exploration time;	HPA: hypothalamic-pituitary-adrenal axis;
CGH: comparative Genome Hybridization;	HPT: hipotalámico-pituitario-tiroideo;
CNQX: receptor antagonista AMPA;	IPA: Ingenuity Pathways Analysis platform;
CPF: corteza prefrontal;	ITC: inter-trial crossings;
CPLP: proteolipid protein;	ITC: number of inter-trial crossings;
CRFR1: receptor de tipo 1 del receptor CRF;	LAB: low anxious behavior;
CRFR2: receptor de tipo 2 del receptor CRF;	

LC: locus coeruleus;

MANOVA: análisis multivariante de la varianza;

MAP: proteína microtubular asociada;

MAPK: vía MAP quinasas;

MEK-ERK1/2: proteína quinasa que activa el factor de transcripción nuclear –ERK-;

MHC: complejo mayor de histocompatibilidad o “major histocompatibility complex”;

MLPA: multiple ligation-dependent probe amplification;

MMLV: moloney-murine leukaemia virus;

MOBP: myelin-associated oligodendrocytic basic protein;

MR/N: Maudsley reactive rat strain; N/Nih-HS: heterogeneous rat stock;

NA: noradrenalina;

NACT: automated novel-cage activity;

NK3: Neuroquinina-3;

NKR: receptor de neuroquinina;

OSP: oligodendrocytic-specific protein;

OXT: oxitocina;

PLP: proteolipid protein;

POST-C: post-stress corticosterone;

POST-PR: post-stress prolactin;

PP2A: proteína fosfatasa 2A;

PRL: prolactina;

PrRP: péptido liberador de prolactina;

PSL: prednisolona;

qRT-PCR: Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa ó quantitative polymerase chain reaction;

QTL: quantitative Trait Loci;

QTL's: quantitative trait loci;

RGD: Rat Genome Database;

RH ó CRF: hormona/factor liberadora de corticotropina;

RHA-I: Roman high-avoidance Inbred;

RLA-I: Roman low-avoidance Inbred;

RNA: ribonucleic acid;

SAM: sistema simpático-adreno-medular;

SAP: number of stretched attend postures;

SHA/Bru: Syracuse High-Avoidance;

SHAV: shuttle-box avoidance;

SHS: sistema septohipocámpico;

SLA/Bru: Syracuse Low-Avoidance;

SNC: sistema Nervioso Central;

SP: Sprague-Dawley;

TEPT: trastorno por estrés post-traumático;

TG: tiroglobulina;

TI: inter-trial interval;

TIDA: sistema dopaminérgico tuberoinfundibular;

TRH: hormona liberadora de tirotropina;

TSH: hormona estimulante de la glándula tiroides;

US: unconditioned stimulus;

WKY: Wistar Kyoto rat strain;

WR/N: Wistar Nettlehip rat strain;

5HT: serotonina;

Índice

Resumen

<u>1. INTRODUCCIÓN</u>	15
1.1 Temerosidad, ansiedad y respuestas defensivas , 16	
1.1.1 Ansiedad normal y sus trastornos, 16	
1.1.2 Ansiedad, miedo y respuestas defensivas, 17	
1.1.2.1 Modelos animales de temerosidad, ansiedad y miedo, 22	
1.1.3 La respuesta de estrés, 24	
1.2 Líneas/stocks de ratas empleadas en el estudio de las respuestas de ansiedad y estrés , 27	
1.2.1 Caracterización de las ratas <i>Roman</i> (y ejemplos de otras cepas Inbred), 28	
1.2.2 Estudios sobre ansiedad en ratas genéticamente heterogéneas: caracterización de las ratas N/Nih-Hs, 33	
1.3 Aplicabilidad de los análisis genéticos en el estudio de la ansiedad , 35	
1.3.1 Diferentes técnicas de análisis genético: los Locus para Rasgos Cuantitativos o “Quantitative Trait Locus”, 35	
1.3.2 Expresión genética diferencial a partir del análisis de microarray: genes candidatos implicados en los trastornos de ansiedad, 37	
<u>2. OBJETIVOS E HIPÓTESIS</u>	43
<u>3. MATERIALES Y MÉTODOS</u>	49
3.1 Metodología general, 50	
3.2 Estudio 1, 50	
3.3 Estudio 2, 60	
3.4 Estudio 3, 63	

4. <u>RESULTADOS</u>	70
4.1 PARTE I: Perfiles conductuales ansioso-depresivos y neuroendocrinos	70
4.1.1 Caracterización conductual y hormonal de las ratas N/Nih-HS (Estudio 1),	70
4.1.2 Caracterización de las ratas N/Nih-HS en el test de Campo Abierto (Estudio 2),	81
4.1.2.1 Análisis comparativo del comportamiento en el Laberinto Circular	
Elevado entre las rats N/Nih-HS y las ratas Roman,	88
4.2 PARTE II: Expresión génica diferencial en amígdala e hipocampo en función de los niveles de ansiedad y miedo (Estudio 3)	92
4.2.1 Expresión génica diferencial en amígdala de ratas N/Nih-HS extremas en ansiedad,	92
4.2.1.1 Genes validados con qRT-PCR,	98
4.2.1.2 Otros genes con función en el SNC,	103
4.2.2 Expresión génica diferencial en hipocampo de ratas N/Nih-HS extremas en ansiedad,	121
4.2.2.1 Genes validados con qRT-PCR,	127
4.2.2.2 Otros genes con función en el SNC,	134
5. <u>DISCUSIÓN</u>	137
5.1 PARTE I: Perfiles conductuales ansioso-depresivos y neuroendocrinos	138
5.1.1 Caracterización conductual y hormonal de las ratas N/Nih-HS en situaciones de conflicto y estrés (Estudio 1 y 2),	138
5.2 PARTE II: Expresión génica diferencial en amígdala e hipocampo en función de los niveles de ansiedad y miedo (Estudio 3)	143
5.2.1 Expresión génica diferencial en amígdala de ratas N/Nih-HS extremas	
Enansieda,	143
5.2.1.1 Genes relacionados con la respuesta hormonal,	147
5.2.1.2 Genes relacionados con el comportamiento locomotor,	151
5.2.1.3 Genes relacionados con la neurotransmisión sináptica y el sistema inmune,	152

5.2.1.4	Genes relacionados con la percepción sensorial, 155
5.2.1.5	Otros genes de posible relevancia, 157
5.2.2	Expresión génica diferencial en hipocampo de ratas N/Nih-HS extremas en ansiedad, 166
5.2.3	Recapitulación: miedo y ansiedad condicionada, expresión genética diferencial y relación funcional entre amígdala e hipocampo, 172
6.	<u>CONCLUSIONES</u>181
7.	<u>REFERENCIAS</u>185
8.	<u>ANEXOS</u>207

Resumen

La presente Tesis tuvo como objetivos, estudiar la diferencia en ansiedad y otros rasgos conductuales relacionados (p. ej. miedo, susceptibilidad al estrés), a través de una batería de tests conductuales, en tres cepas o stocks de ratas diferentes (RHA-I -poco ansiosas-, RLA-I -muy ansiosas- y N/Nih-HS -ratas genéticamente heterogéneas-), y relacionar dichos perfiles conductuales/psicológicos con la expresión diferencial de genes en estructuras/circuitos cerebrales de conocida importancia en tales fenotipos (p. ej. amígdala e hipocampo).

Para alcanzar tales objetivos, se realizaron dos estudios (Estudio 1, con 128 ratas macho de los tres stocks/cepas mencionados; Estudio 2, con 114 ratas macho), que incluyeron las siguientes pruebas conductuales: Laberinto Circular Elevado (ansiedad incondicionada), test de actividad en situación de novedad (“timidez” y habituación en una “Caja nueva”), test de Campo Abierto, miedo condicionado a un contexto (respuesta de petrificación condicionada), adquisición de evitación activa en dos sentidos en la “*Shuttle-box*” (ansiedad debida a un conflicto de doble evitación -pasiva y activa- condicionada) y test de natación forzada (como modelo de síntomas relacionados con la depresión y los efectos de los antidepresivos). En el Estudio 1 se obtuvieron también medidas hormonales (ACTH, corticosterona y prolactina) en respuesta al estrés de exponer los animales a una ambiente nuevo y desconocido durante 20 minutos. Tras el análisis conductual y hormonal de estos dos estudios, en el Estudio 3 se llevó a cabo un análisis de expresión génica en amígdala e hipocampo (análisis de microarray y qRT-PCR) de subgrupos de ratas N/Nih-HS seleccionadas (a partir del Estudio 1) por presentar valores extremos en ansiedad (subgrupos de “Baja ansiedad” o “Alta ansiedad”). A partir de este análisis se pudo concluir que: a) las ratas N/Nih-HS presentan un perfil de comportamiento defensivo y hormonal cercano al estilo de afrontamiento pasivo característico de las ratas RLA-I; b) la heterogeneidad genética de las ratas N/Nih-HS y los resultados obtenidos en el análisis de microarray, permiten que sea un modelo animal útil para el estudio de las bases genéticas de la ansiedad y el miedo; c) los análisis de microarray han detectado expresión diferencial (entre dichos subgrupos de ratas extremas en ansiedad) de genes implicados en la regulación de funciones neuroendocrinas, como la prolactina, arginina-vasopresina y la oxitocina, que podrían modular las respuestas de ansiedad y miedo condicionado en amígdala e hipocampo. d) También se ha observado expresión diferencial (entre ambos subgrupos de ratas extremas en ansiedad) de genes reguladores de receptores sensoriales (sobre todo olfativos), genes de receptores opioides (como Oprd1 y Oprl1), genes que participan en funciones inmunológicas (como el gen H2-M9) y genes relacionados con la función tiroidea, como el gen TRH, Tg en hipocampo o el gen Duox2 en amígdala.

Abstract

The main aim of the present Thesis was to study differences in anxiety and related behavioral dimensions (e.g. fear, susceptibility to stress) in three different rat strains/stocks (i.e. the RHA-I –low anxious-, RLA-I –high anxious- and the N/Nih-HS –genetically heterogeneous- rat stock), as well as to study the associations among these behavioural profiles and differential gene expression in anxiety/fear/stress-related brain areas (i.e. amygdala and hippocampus).

We conducted two studies (Study 1, using 128 male rats from those three strains/stocks; Study 2, using 114 male rats) to achieve those objectives, using a behavioural test battery which included: Elevated zero-maze test (unconditioned anxiety), novelty-induced exploratory activity (unconditioned fearfulness or “timidity” in a “Novel cage”), Open field test, context-conditioned fear (freezing), acquisition of two-way active avoidance in a shuttle box (instrumental aversive learning mediated by conditioned anxiety/fear, due to the double “passive avoidance/active avoidance” conflict) and forced swimming test (“depressive-related” symptoms: a model for the screening of antidepressant drugs). Baseline and post-stress (i.e. 20-min exposure to a novel cage) hormone measurements (ACTH, corticosterone and prolactin) were also obtained in Study 1. Following the behavioural and hormonal analyses of both studies a gene expression study (Study 3) was carried out. Thus, in Study 3, differential gene expression was assessed (through microarray analysis and qRT-PCR) in amygdala and hippocampus from subgroups of N/Nih-HS rats selected (from Study 1) according to their “low anxiety” or “high anxiety” behavioural profiles. From the analyses of the different studies we can conclude that: a) regarding their anxiety/fearfulness, passive coping style, “depressive-like” and stress-induced hormonal responses, the N/Nih-HS rats resemble the phenotype profiles of the relatively high-anxious and stress-prone RLA-I rat strain; b) the characteristic genetic heterogeneity of the N/Nih-HS rat stock, and the microarray gene expression results, point to that rat stock as an useful animal model to study the genetic basis of anxiety and fear; c) microarray analysis detected differential expression (between the above mentioned subgroups of N/Nih-HS rats with extreme low or high anxiety) of genes involved in the regulation of neuroendocrine functions, such as prolactin, arginine-vasopressin and oxytocin, which could participate in the modulation on anxiety and fear responses. d) Microarray analysis also detected differential expression of sensory receptor genes, opioid receptor genes (i.e. Oprd1 and Oprl1), immunity-related genes (like H2-M9) and thyroid regulatory genes, like TRH and Tg (hippocampus) and Duox 2 (amygdala).

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Temerosidad, ansiedad y respuestas defensivas

1.1.1 Ansiedad normal y sus trastornos

La ansiedad es una emoción adaptativa, que por sí sola no constituye un estado patológico, sino que aparece en situaciones de conflicto (entre varias tendencias de respuesta) o incerteza, previene de amenazas potenciales y prepara para llevar a cabo un determinado estilo de afrontamiento (p. ej. Gray y McNaughton, 2000; McNaughton y Corr 2004; Kent y cols., 2000; Casada y Amdur, 1998). El funcionamiento de las estructuras cerebrales que median y regulan la ansiedad (ver abajo), interviene y/o interfiere significativamente en la percepción y respuesta que da el organismo ante cualquier estímulo. Hasta el punto de emitir respuestas exageradas de defensa, frente a estímulos potencialmente amenazadores para unos e insignificantes para otros (p. ej. (Becerra-García y cols. ,2007)).

La ansiedad se considera patológica cuando los episodios son repetitivos con intensidad elevada y la duración prolongada, la reacción es desproporcionada y el grado de interferencia con la vida cotidiana es profundo. Además de presentarse como síntoma en multitud de cuadros clínicos, actualmente los trastornos de ansiedad se agrupan en los siguientes tipos (DSM-IV-TR, 2002): trastornos de angustia sin/con agorafobia, agorafobia sin historia de trastorno de angustia, fobia específica, fobia social, trastorno obsesivo-compulsivo, trastorno por estrés postraumático, trastorno por estrés agudo, trastorno de ansiedad generalizada, trastorno de ansiedad debido a enfermedad médica, trastorno de ansiedad inducido por sustancias y trastorno de ansiedad no especificado.

Actualmente, las causas de los trastornos de ansiedad no son totalmente conocidas, aunque los resultados obtenidos hasta ahora apuntan a la interacción de varios tipos de determinantes, biológicos (alteraciones en los sistemas serotoninérgicos y gabaérgicos), genéticos y ambientales o psicosociales (p. ej. experiencias traumáticas o preocupaciones excesivas por temas cotidianos; Battaglia y Ogliari, 2005).

1.1.2 Ansiedad, miedo y respuestas defensivas

Mientras que la ansiedad se activa ante estímulos amenazadores potenciales y/o evitables (McNaughton y Corr, 2004), el miedo está provocado sobre todo por estímulos amenazadores reales, ante los cuáles es posible la conducta de huida y/o de evitación (Blanchard y cols., 1990). De hecho, algunos estudios han descrito diferencias a nivel funcional y farmacológico entre el miedo y la ansiedad (Blanchard y cols. 1990, 1993; Gray y McNaughton, 2000; McNaughton, 1999). A partir de experimentos con ansiolíticos se descubrió la implicación de alteraciones en el sistema septo-hipocampal y sobre todo, en la actividad theta sobre los cambios en la ansiedad normal y patológica (Gray, 1982; Gray y McNaughton, 2000).

Los estímulos de castigo, refuerzos positivos y/o relacionados con las situaciones de novedad (innata o condicionada), se procesan por medio de la integración de tres sistemas que darán como resultado los diferentes tipos de respuesta del organismo (Gray y McNaughton, 2000; McNaughton y Corr, 2004, Tabla 1):

(1) *El Sistema de Aproximación Conductual* (BAS, “*Behavioural Approach System*”), que regula las conductas de aproximación a los estímulos y el reforzamiento positivo, implica al sistema límbico (neurotransmisión dopaminérgica) y está asociado a los efectos farmacológicos de los opiáceos endógenos (Tabla 1).

(2) *El Sistema de Lucha/petrificación/huida* (FFFS, “*Fight/Freezing/Flight System*”), que está relacionado con los estímulos aversivos (castigos) y la toma de decisiones sobre la aproximación/huida de estos, e implica a la amígdala y también al hipocampo (Tabla 1).

Y, (3) el *Sistema de Inhibición Conductual* (BIS, “*Behavioural Inhibition System*”), que se activa ante estímulos condicionados aversivos y situaciones de frustración, implica al hipocampo (actividad theta) como estructura “comparadora” y está relacionado con el componente cognitivo de la ansiedad (procesamiento/interpretación de la situación). Este sistema actúa como comparador en la resolución de conflictos, siendo responsable de realizar la evaluación de los riesgos de cada situación (Tabla 1).

Tabla 1.-Sistemas neurales del procesamiento de estímulos (adaptado de Gray y MacNaughton, 2000; MacNaughton y Corr, 2004)

Sistema	Tipo de amenaza	Efectos conductuales	Repertorio conductual	Estructuras neurales suyacentes	Farmacología asociada
<i>Fight/Freezing/Flight (FFFS)</i>	Peligro explícito evitable o del que se puede escapar	Castigos o no-refuerzos incondicionados	Huída, agresión defensiva, petrificación y actividad autonómica asociada	Amígdala e hipotálamo	Sensibilidad a los opiáceos
<i>Behavioural Approach System (BAS)</i>	No interpretación de presencia de estímulos amenazantes	Arousal apetitivo, facilitación de procesos de reforzamiento	Reforzamiento positivo, aproximación a señales de seguridad, secuencias de respuestas flexibles	Sistema mesolímbico (dopaminérgico)	Opióides endógenos
<i>Behavioural Inhibition System (BIS)</i>	Estímulos de castigo secundario (estímulos condicionados aversivos) y frustración condicionada	Aspectos cognitivos y procesamiento de la información de la ansiedad. Control de la actividad hipocampal theta	Supresión de la aproximación, de la evitación y elicitación de la conducta de evaluación de riesgos	Formación hipocampal, área septal y estructuras cortico-límbicas relacionadas, es decir: Sistema septohipocámpico (SHS)	Ansiolíticos (benzodicepinas)

Ante una amenaza real (como un depredador) se han descrito cuatro tipos de respuesta defensiva: huida, petrificación, amenaza defensiva y ataque defensivo (Blanchard y cols., 1993; 2001). La “distancia defensiva” (Blanchard y cols., 1990; 1993; Griegel y cols., 1996, Figura 1) y la “dirección defensiva” (Gray y McNaughton, 2000), determinarán el tipo de respuesta. En función del tipo de interpretación que se realice de la situación, se tomará una dirección defensiva u otra

(aproximación/evitación) y se activarán estructuras cerebrales diferentes. Así, por ejemplo, la amígdala está implicada en las respuestas de evitación activa, mientras que el hipocampo está más relacionado con la evitación pasiva (Figura 2). En la Figura 2 se describen las diferentes respuestas que emiten los animales (típicamente ratas, o ratones) ante una situación de conflicto, de forma que el miedo se corresponde más con la evitación activa regulada por la amígdala, mientras que



los componentes cognitivos de la ansiedad están más relacionados con la evaluación del riesgo, que está regulada por el eje septo-hipocámpico (Gray y McNaughton, 2000).



Figura 2. -Sistema neural bidimensional de Gray y McNaughton: interacciones entre la dirección defensiva y el sistema neural implicado (adaptado de Gray y McNaughton, 2000; McNaughton y Corr, 2004).

En las situaciones que implican la elección de una respuesta con dirección incierta (situación de conflicto), como en el paradigma de adquisición de la evitación activa en dos sentidos en la “*Shuttle-box*” (procedimiento del que trataremos extensamente a lo largo de la presente Tesis), el sujeto tiene que adaptar su respuesta al entorno y a la situación de forma que realizará continuas rectificaciones (evaluaciones reiteradas de la amenaza), hasta conseguir una sensación de seguridad. Para que esta adaptación se realice adecuadamente, es necesaria la acción del Sistema septohipocámpico (McNaughton y Corr, 2004), como “comparador”/mediador entre las respuestas de miedo (alejamiento) y de ansiedad (aproximación). Los fármacos ansiolíticos, facilitan esta mediación agilizando la elección entre la evitación activa y pasiva, de forma que sea más clara la dirección defensiva que debe escoger el sujeto, de manera que dichos fármacos aceleran la adquisición de la evitación activa en dos sentidos (Boix y cols., 1988; Fernández-Teruel y cols., 1991; Gray y cols., 1982; Gray y McNaughton, 2000; Prunell y cols., 1994). De hecho, confirmando lo anterior, ratas que son buenas “evitadoras” en la tarea de evitación activa en la *shuttle-box*, como las RHA (“*Roman High-Avoidance*”; Driscoll y cols. 1998), las SHA/Bru (“*Syracusa High-Avoidance*”; Brush 2003) o las LAB (“*Low Anxious Behavior*”; Landgraf 2003; ver revisión de Driscoll y cols. 2009) son ratas “poco ansiosas” (respecto a sus respectivas cepas “contrarias”, las RLA –“*Roman Low-Avoidance*”-, SLA/Bru –“*Syracusa Low-Avoidance*”- y HAB –“*High Anxious Behavior*”-). En coherencia con todo lo anterior, estudios neuroanatómicos y funcionales del hipocampo han demostrado que, comparadas con las RLA (muy ansiosas), las ratas “muy evitadoras” y “poco ansiosas” RHA presentan menor número de terminales de las fibras infra-piramidales (Driscoll y Bättig, 1982; Lipp y cols., 1989) y menor densidad neuronal en el hipocampo (García-Falgueras y cols., 2012), así como menor funcionalidad de la fosfolipasa C (ligada a receptores colinérgicos hipocámpico; Sallés y cols., 2001) y menor respuesta hipocámpica del c-fos ante diversas situaciones de novedad o conflicto (Meyza y cols., 2009). Por tanto, un hipocampo menos funcional se relaciona con menor ansiedad (a modo del efecto de la inyección sistémica o local –en el mismo hipocampo- de fármacos ansiolíticos) y mejor adquisición de la evitación activa en dos sentidos, por reducción del conflicto inicial y la tendencia a la “petrificación” en esa fase (Gray y McNaughton, 2000).

Los tipos de respuesta defensiva, que realizan los roedores ante un estímulo estresante, estarán en función del tipo de amenaza que represente (Becerra-García y cols., 2007) y de las estructuras cerebrales implicadas. En experimentos de condicionamiento de miedo se ha mostrado que lesiones en el tálamo auditivo y mesencéfalo influyen en los resultados conductuales (del condicionamiento), mientras que las lesiones producidas sobre la corteza auditiva no presentaron influencia alguna (LeDoux, J., 1996). Estos resultados sugieren que la información de los estímulos de entrada no necesariamente llega al córtex para realizar el aprendizaje, puesto que en varios estudios comprobaron que animales con la amígdala destruida no presentaron petrificación (“freezing”) ante la asociación de una señal luminosa y una descarga eléctrica contingente (Blanchard y Blanchard, 1972; Grandin y Deesing, 1988).

Estudios posteriores concluyeron que, en función del objetivo de la respuesta, existen dos vías neurales en la entrada de información: la vía rápida y la vía lenta. En la vía rápida, el tálamo comunica directamente con el complejo amigdalino (vía indiscriminada, predispuesta a producir respuestas inmediatas); mientras que en la vía lenta, el tálamo se comunica con la corteza sensorial, y ésta envía la información al complejo amigdalino (vía predispuesta a evitar una respuesta inadecuada, Kent y cols., 2000). Esto sugiere, que determinados tipos de aprendizaje emocional podrían producirse sin la participación de mecanismos cerebrales superiores de procesamiento (LeDoux, 1996).

1.1.2.1 Modelos animales de temerosidad, ansiedad y miedo

Debido a las similitudes neurobiológicas (la llamada “continuidad evolutiva”) entre los humanos y otras especies animales, ya desde 1895, con los estudios del “Enfoque comparativo” de Meyer, se han empleado modelos “análogos” animales (p. ej. Logan, 2005; Kent y cols., 2000; Fernández-Teruel, 2008, Tobeña y Fernández-Teruel 2009). Resulta obvio, también, que I. Pavlov fue pionero en el uso de animales para reproducir procesos “mentales” extrapolables a los humanos (el aprendizaje por condicionamiento clásico). Los modelos animales tienen como objetivo imitar los procesos psicológicos/conductuales normales y psicopatológicos humanos, para estudiar los

mecanismos neurobiológicos subyacentes (p. ej. Nestgley y Hyman, 2010; Fernández-Teruel, 2008; Overmier, 2007; Laborda, 2009; Gómez y cols., 2002; Tobeña y Fernández-Teruel, 2009).

Los modelos animales han desempeñado un papel importante en el estudio de la ansiedad, de sus mecanismos neurobiológicos y en la evaluación del efecto de nuevos ansiolíticos (Gray y McNaughton, 2000). Estos modelos se podrían clasificar en cuatro grandes grupos (Escorihuela y Fernández-Teruel, 1998; Fernández-Teruel, 2008; Gómez y cols., 2002; Gray y McNaughton, 2000):

1. *Los modelos de ansiedad incondicionada*, que se basan en la exposición a estímulos de novedad, en los que entre otros se incluye: el Laberinto elevado en cruz (“*Plus maze test*”), la Caja de luz/oscuridad (“*Dark-light box test*”), el test de Campo abierto (“*Open-field test*”), el Laberinto Circular Elevado (“*Elevated zero-maze test*”) y pruebas de interacción social.

2. *Los modelos de ansiedad condicionada*, que se basan en la exposición a situaciones en las que el animal se enfrenta a un conflicto condicionado (aprendido), como son, por ejemplo: las pruebas de conflicto (el test de Vogel y el test de Geller-Steiffer, Feldman y cols., 1997), el condicionamiento pavloviano de miedo (“*Fear conditioning*”), la tarea de evitación activa (“*Active avoidance*”) en dos sentidos (prueba de “*shuttle-box*”) y el reflejo de sobresalto (“*Fear potentiated startle*”).

3. *Los modelos basados en la frustración (o en la resistencia a ella)*, como, por ejemplo, el modelo del contraste instrumental sucesivo negativo (Flaherty, 1996), el modelo de extinción consumatoria (Mustaca y cols., 2009). y el “efecto del reforzamiento parcial sobre la extinción” (p. ej. Gray 1982; Gray y McNaughton, 2000).

4. *Los modelos basados en la exposición a depredadores*, como es el caso del modelo de respuestas defensivas ante depredadores/amenazas (“*Defensive response battery*”) y el “*Cat freezing test*” (respuesta de petrificación en ratas por exposición a olor de gato, Wang y cols., 2003; ver Blanchard y cols., 1990; 1993).

En la presente tesis se aplicaron las siguientes pruebas conductuales (para más detalle ver “Métodos”):

a. Pruebas de ansiedad incondicionada, como: el Laberinto Circular elevado (“*Elevated zero-maze test*”; Pähkla y cols., 2000; Shepherd y cols., 1994; López-Aumatell y cols., 2008), la actividad en situación de novedad automatizada o “Caja nueva” (tipo “*open-field*” cuadrado; test de temerosidad/emotividad y de habituación a un entorno nuevo, Aguilar y cols., 2002) y el Test de Campo Abierto u “*Open-field test*” (Fernández-Teruel y cols., 2002a).

b. Pruebas de ansiedad condicionada y de miedo condicionado, como: la adquisición de la respuesta de evitación activa en dos sentidos durante la tarea de “*Shuttle-box*” (ansiedad condicionada) y el miedo condicionado a un contexto (Fernández-Teruel y cols., 1991; Vicens-Costa y cols., 2011).

1.1.3 La respuesta de estrés

La respuesta de estrés es la respuesta fisiológica de todo organismo frente a una situación percibida como amenazante (Andrus y cols., 2010). Selye fue el primero en describir la respuesta de estrés en la primera mitad del siglo XX, y diferenció dos tipos de cambios: (a) los cambios adaptativos que se producen a corto plazo en el organismo, al responder ante un estímulo nocivo/aversivo o estresante (fase de alarma y resistencia del Síndrome General de Adaptación) y, (2) los cambios desadaptativos que se producen a largo plazo, relacionados con la fase de agotamiento del Síndrome General de Adaptación (Selye, 1950; 1976).

Selye basó la respuesta de estrés en la activación del sistema hipofisario-suprarrenal. Según este autor, los estímulos estresantes actuarían sobre los circuitos neurales estimulando la liberación de corticotropina (ACTH) desde la hipófisis anterior, lo que provocaría a su vez la liberación de glucocorticoides por la corteza adrenal (Pinel, 2007). Además, otros estudios posteriores mostraron que los estímulos estresantes también activan al sistema nervioso simpático, que dirige la liberación de catecolaminas desde el sistema adrenal simpático medular (Castanon, 1994b).

La activación neuroendocrina es una medida importante del estado emocional (Castanon, 1994b; Walker y cols., 1989). La magnitud de la activación del eje hipotalámico-hipofisario-adrenal (HPA; Figura 3) refleja la capacidad del organismo para enfrentarse a la situación aversiva o para tener algún tipo de control sobre ella (Walker y cols., 1992). De forma que, el estrés repetido durante la fase de agotamiento/relajamiento del Síndrome General de Adaptación (Selye, 1976) podría producir hipercortisolemia crónica y, incluso, estudios con animales han demostrado que podría llegar a ser neurotóxica en estructuras subcorticales como el hipocampo (p. ej. revisiones de Duval y cols., 2010; Sapolsky, 1992). Pero, ante la respuesta endocrina de estrés, el organismo también prepara tres tipos de respuesta desde el sistema límbico e hipocampo, como son:

(a) Feedback rápido que implica la presencia de receptores de membrana, como el complejo GABAa/benzodiazepinas-canales del cloro, y que dura entre unos segundos a 10 minutos.

(b) Feedback intermedio relacionado disminución de la secreción de la hormona liberadora de corticotropin (CRH) y arginina-vasopresina (AVP), con duración entre una a varias horas.

Y, (c) Feedback lento que implica la disminución de la secreción de la hormona adrenocorticotropa (ACTH) hipofisaria, CRH y la AVP hipotalámica, con duración entre horas y días (revisión de Duval y cols., 2010).

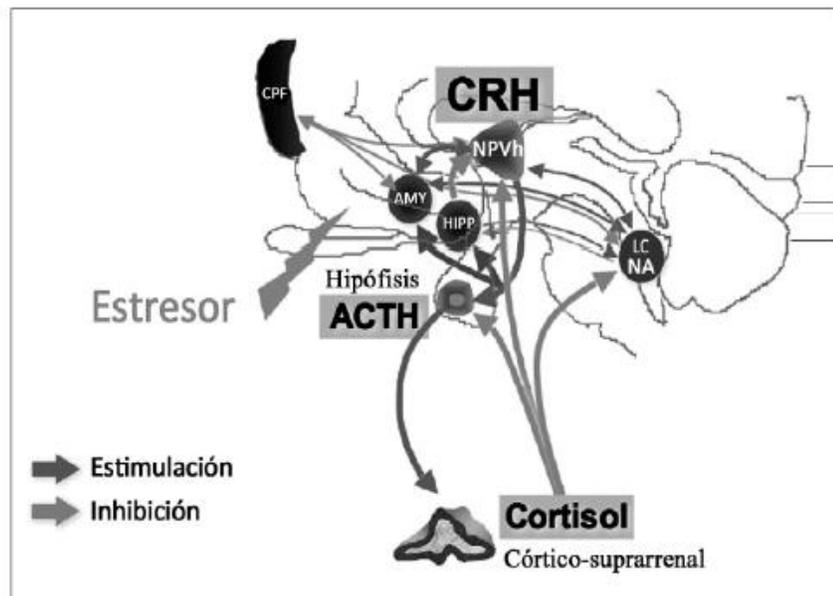
El hipocampo se ha implicado en la respuesta de estrés y ansiedad (uno de los correlatos psicológicos frecuentes del estrés), ya que posee gran cantidad de receptores para los glucocorticoides. Además según la teoría de McNaughton (1997) y Gray (1982; Gray y McNaughton, 2000), esta estructura estaría implicada en los aspectos cognitivos de la ansiedad, mientras que los cambios autonómicos como el miedo potenciado estarían controlados por la amígdala.

En situación de estrés, la síntesis de CRH en el hipotálamo provoca la liberación de ACTH en la adenohipófisis, y ésta provoca la síntesis y liberación de glucocorticoides en la corteza adrenal o glándulas suprarrenales. Estos productos, a través de un mecanismo de “*feedback*” negativo regularán la secreción de CRF y ACTH y, actuando en niveles

superiores (ej. hipocampo) permitirán el restablecimiento del equilibrio homeostático cuando la situación de emergencia (estresor) lo permita (p. ej. ver Armario, 2006; Koolhaas y cols., 2011; McEwen, 2000; Pácak y Palkovits, 2001; Sapolsky y cols., 2000). Existen como mínimo cuatro regiones del sistema nervioso central donde actúan los glucocorticoides, que son: hipocampo, hipófisis, la eminencia media e hipotálamo. Los glucocorticoides tienen una función inhibitoria a través de la interacción con dos tipos de receptores: los de tipo I (en hipocampo, con alta afinidad por la corticosterona) y los de tipo II (más afinidad por cortisol y corticoides sintéticos como la dexametasona, con una distribución más generalizada, que incluye al hipocampo, hipotálamo e hipófisis).

En el caso de la rata, los dos tipos de receptores contribuyen al feedback negativo del eje HPA, pero en situaciones de estrés actuarían más los de tipo II (Martí y Armario, 1996). El cortisol es el glucocorticoide mayoritario y activo secretado por las adrenales en casi todos los

mamíferos, excepto en el caso de los roedores, en el que éste es sustituido por la corticosterona (González, 1996). Por último en la respuesta de estrés, a parte de la intervención de la ACTH y la corticosterona (o el



cortisol, en humanos y primates) también se ha demostrado que está implicada la acción de

Figura 3.-Circuito neuroendocrino del eje HPA durante las respuestas de estrés. CPF: corteza prefrontal. AMY: amígdala. HIPP: hipocampo. LC: locus coeruleus. NA: noradrenalina. "Cortisol" (en humanos y primates) es equivalente a "corticosterona" en roedores. Figura extraída de Duval y cols., 2010.

otras hormonas, como es el caso de la prolactina (Turpen y cols., 1976; Van der Kar y cols., 2001, Figura 3).

En concreto, la prolactina (PRL) es una hormona que está presente en la pituitaria anterior, y de la que cada vez más estudios muestran su papel en la respuesta de estrés (Jaroenporn y cols., 2009). En este sentido, varios estudios han mostrado incrementos de prolactina durante la exposición a varios tipos de estresores (ejercicio, hipoglicemia, hemorragia, inmovilización y dolor por estrés), y han relacionado el incremento en la secreción de prolactina (previo estrés) con la mejoría de la función inmune (Pácak y Palkovits, 2001). También otros estudios, han relacionado el incremento de prolactina post-estrés con el decremento de la frecuencia y duración del comportamiento exploratorio en situaciones de novedad (Steimer y cols., 1997b) y con los déficits de adquisición de la evitación activa en dos sentidos (Castanon y cols., 1995).

1.2 Líneas/stocks de ratas empleadas en el estudio de las respuestas de ansiedad y estrés

Las características y el impacto de la respuesta de estrés dependen en parte de factores genéticos, motivo por el que uno de los enfoques en investigación más prometedores es la utilización de cepas de roedores seleccionados genéticamente con comportamientos divergentes ante situaciones que implican estrés (Meyza y cols., 2009). La selección genética de los animales se puede realizar a partir del cruce selectivo según, por ejemplo, sus respuestas comportamentales, neuroendocrinas o neurofarmacológicas divergentes (ver p. ej. Castanon y cols., 1994b; Driscoll y cols., 2009; Ferré y cols., 1995). La ventaja de las cepas (de roedores) divergentes, seleccionadas psicogenéticamente o farmacogenéticamente, es que sus respuestas diferenciales (por las que han sido seleccionadas, p. ej. respuestas de estrés, ansiedad, miedo) permanecen mayoritariamente estables a través de generaciones, si bien tales características “estables” son influenciadas (o a menudo se hallan en interacción con) factores como la edad de los sujetos (ontogenia), las variaciones inter-laboratorio y otros efectos ambientales, y factores epigenéticos en general (p. ej. Fernández-Teruel y cols., 1997 a; 2002; Meaney, 2010; Castanon y cols., 1994b; Steimer y cols., 1997a).

1.2.1 Caracterización de las ratas Romanas (y ejemplos de otras dos cepas Inbred)

Las subcepas suizas de ratas “*Roman high-avoidance* (RHA/Verh) y *Roman low-avoidance* (RLA/Verh)” han sido seleccionadas desde sus inicios por ser extremas en su capacidad de adquisición de la evitación activa en dos sentidos, siendo tal capacidad muy alta en las RHA/Verh y casi nula en las RLA/Verh (Driscoll y cols., 1998; Driscoll y Bättig, 1982; Broadhurst y Bignami, 1965). Estas cepas, originalmente *outbred* o “no consanguíneas”, evolucionaron hasta convertirse en las cepas “*inbred*” (consanguíneas) RHA-I y RLA-I a partir de 1993, y se han mantenido en el Laboratorio de Psicología Médica de la Universidad Autónoma de Barcelona desde 1997 (Driscoll y cols., 1998, 2009; Escorihuela, 1999; Morón y cols., 2010).

La diferencia extrema en la capacidad de adquisición de la evitación activa en dos sentidos en estas cepas de ratas, se relaciona principalmente con diferencias en los niveles de emocionabilidad/ansiedad/miedo entre ambas cepas. Así, las ratas RLA (tanto las no consanguíneas como las consanguíneas) se han mostrado más temerosas que las respectivas ratas RHA en todas las pruebas de ansiedad condicionada e incondicionada en las que han sido evaluadas (ver revisiones Driscoll y Bättig, 1982; Driscoll y cols., 2009; Fernández-Teruel y cols., 1991; 1992), y muestran un estilo de afrontamiento pasivo (“*freezing*”) ante situaciones de estrés (p. ej. Escorihuela y cols., 1999). Por ello, las ratas RLA son consideradas como buen modelo animal genético de temerosidad/ansiedad. De hecho, algunos estudios han mostrado como tratamientos con ansiolíticos son efectivos sobre las ratas RLA pero no sobre las ratas RHA-I (Driscoll y cols., 2009; Martin y cols., 1982; Torres y cols., 2007; Steimer y Driscoll, 2003), que parecen presentar mayor tono GABAérgico (Bentareha y cols. 1998; Driscoll y cols., 2009; Giorgi y cols., 1994). Curiosamente, hay evidencia de que otros aspectos del comportamiento, además de la ansiedad/temerosidad, han sido seleccionados de forma paralela a la evitación activa en dos sentidos, dado que las ratas RHA-I son más “buscadoras de sensaciones” nuevas, más impulsivas y muestran mayor preferencia por sustancias adictivas que las ratas RLA-I (Driscoll y cols., 2009; Moreno y cols., 2010).

En coherencia con lo anterior, las ratas (consanguíneas o no consanguíneas) RLA muestran mayores respuestas hormonales al estrés, tanto de la ACTH y la corticosterona

como de la prolactina, que las correspondientes RHA (p. ej. Carrasco y cols., 2008; Driscoll y cols., 2009; Steimer y Driscoll, 2003; 2005; ver Anexo I de la presente Tesis)

A continuación en la Tabla 2 y Tabla 3 se muestra un resumen de los perfiles conductuales, neuroendocrinos y neurobiológicos de las cepas “*Roman*” (consanguíneas y no consanguíneas).

Tabla 2.-Características conductuales de las ratas Roman (RHA y RLA).

Repertorio conductual	RLA	RHA
Nivel miedo en situación aversiva (Driscoll y Bättig, 1982; Driscoll y cols., 1998).	Mayor probabilidad	Menor probabilidad
Reactividad emocional (Escorihuela, y cols., 1995; Meyza y cols., 2009; Driscoll, 1979, 1982; Gentsch, 1981; 1982).	Hiperreactividad	Hiporeactividad
Afrontamiento pasivo ("freezing") (Aguilar y cols, 2004; Driscoll y cols., 1980; Ferre y cols., 1995; Steimer y Driscoll, 2003; 2005; Torres y cols., 2007; Meyza y cols., 2009; Driscoll y Bättig, 1982).	Mayor probabilidad	Menor probabilidad
Afrontamiento activo (huída, evitación condicionada) (Steimer y cols., 1997; Steimer y Driscoll, 2003; 2005 (en RHA y RLA/Verh); Meyza y cols., 2009).	Menor probabilidad	Mayor probabilidad
Eficacia ansiolíticos (Fernández-Teruel y cols., 1991; Steimer y Driscoll, 2003; Torres y cols., 2007).	Mayor	Menor
Búsqueda de novedad y susceptibilidad a sustancias de abuso (Corda y cols., 2005; Driscoll y cols., 1998; Escorihuela y cols., 1999; Giorgi y cols., 2005; 2007; Guitart-Masip y cols., 2006; 2008; Steimer y cols., 1997a).	Menor	Mayor
Inducción de depresión conductual (exposición prolongada de estrés - respuesta de ACTH incrementada con estrés agudo) (Castanon y Mormède, 1994).	Presente	Ausente
Tiempo y número de episodios de "grooming" en situación de novedad (Escorihuela y cols., 1999; Steimer y Driscoll 2003; 2005).	Mayor	Menor
Número y duración de episodios de exploración en "Homecage activity observation" (Meyza y cols., 2009).	No diferencias significativas	
"Fear-potentiated acoustic startle and basal startle" (Yilmazer-Hanke y cols., 2002).	Mayor reactividad basal y respuesta significativa de miedo	Menor reactividad basal y ausencia de respuesta de miedo potenciada
Flexibilidad asociativa (Gómez y cols., 2008; Flaherty, 1996)	Adquisición y extinción más lenta	Adquisición y extinción más rápida
Respuesta de estrés (Steimer y cols., 2005)	Más prolongada e intensa	Menos prolongada e intensa
Emocionabilidad (RHA-I y RLA-I/Verh)	Mayor	Menor
Reactividad (RHA-I y RLA-I/Verh)	Mayor	Menor
Coping activo (RHA-I y RLA-I/Verh)	Menor	Mayor
Tiempo de miedo condicionado "freezing" y número de defecaciones (Fernández-Teruel y cols., 1992; Escorihuela y cols., 1995)	Mayor	Menor
Comportamiento depresivo (Castanon y Mormède, 1994)	Mayor probabilidad	Menor probabilidad

Comportamiento
en la prueba
"Shuttle-box"
(Ferre y cols.,
1995)

Tabla 3.-Características neurobiológicas y hormonales de las ratas Roman (RHA y RLA).

Diferencias biológicas	RLA	RHA
Tono GABAérgico cerebral (Bentareha y cols., 1998; Giorgi y cols., 1994).	Menor	Mayor
Peso pineal	Menor (RLA/Verh)	Mayor (RHA/Verh)
Tamaño de la glándula pituitaria	Mayor (RLA/Verh)	Menor (RLA/Verh)
Estimulación con CRF (Walker y cols., 1989).	Mayor sensibilidad	Menor sensibilidad
Actividad estructuras: Córtex medial prefrontal, Núcleos basolateral, central y cortical (Amígdala), hipocampo (CA1, CA2 y CA3) e Hipotálamo (Núcleo paraventricular, Meyza y cols., 2009).	Mayor	Menor
Actividad monoaminérgica en Núcleo Accumbens, Striado en estado basal (Moreno y cols., 2010).	Menor actividad	Mayor actividad
Neurotransmisión de Dopamina y Serotonina (Moreno y cols., 2010).	Tono/función disminuído	Tono/función aumentado
Reactividad neuroendocrina ante estrés (Driscoll, 1982; Gentsch, 1981, 1982; Walker, 1989; Carrasco y cols., 2008; Castanon y cols., 1994; 2003. Reactividad del eje hipotálamo-pituitario-adrenal (HPA, Castanon, 1992; Walker, 1992.	Mayor	Menor
Liberación de prolactina y renina ante estrés y, concentración plasmática de prolactina ante exposición al test de Campo Abierto (Carrasco y cols., 2008; Castanon y cols., 1994a; Steimer y Driscoll, 2003; 2005).	Aumento substancial concentración	Aumento ausente
Aumento frecuencia cardíaca (D'Angio y cols., 1988).	Mayor duración y amplitud del aumento	Menor duración y amplitud del aumento

Fernández-Teniel y cols., 1997c

Otros ejemplos de cepas seleccionadas genéticamente son las ratas “*Syracuse High- and Low- Avoidance*” (SHA/Bru y RLA/Bru, respectivamente). Estas cepas provienen de ratas *Long-Evans*, seleccionadas en 1965 a partir del número de evitaciones durante una sesión de la tarea de evitación activa en dos sentidos en la “*shuttle-box*” (Brush, 2003), y se han mantenido en los laboratorios de *Huntingdon Farms* (“*W. Conshonhocken, PA.*” y en “*University of Oregon Medical School*”; Prof. R.F. Brush; p. ej. Brush, 2003). Experimentos conductuales realizados con estas cepas de ratas, sobre discriminación visual y tigmotaxis, pruebas de condicionamiento clásico y condicionamiento aversivo, han mostrado que las ratas SLA/Bru presentan mayor reactividad emocional/ansiedad que las ratas SHA/Bru (Brush, 2003). En pruebas con paradigmas de supresión conductual las ratas SLA/Bru obtuvieron mayor adquisición (más supresión de la conducta), mientras que en pruebas en las que se requería un estilo de afrontamiento activo, las ratas SHA/Bru obtuvieron mayores puntuaciones, pues el elevado nivel de miedo (excesivo comportamiento de petrificación o “*freezing*”) interfirió en la realización de la prueba en las ratas SLA/Bru (Brush, 2003).

Por otro lado, las ratas HAB/LAB (Landgraf, 2003), derivadas de las Wistar, fueron seleccionadas por sus puntuaciones extremas en ansiedad incondicionada en el “*laberinto en cruz elevado*” (siendo las más ansiosas las HAB). Estas cepas presentan, además otras diferencias contingentes a la selección conductual, tales como: i) las ratas HAB mostraron mayor inmunoreactividad en el núcleo medial de la amígdala (Fos) y estilo de afrontamiento pasivo, en comparación con las ratas LAB que mostraron un estilo de afrontamiento más activo y mayor actividad exploratoria. ii) A nivel hormonal también se observan diferencias, puesto que las ratas HAB muestran niveles más altos de prolactina y de corticosterona tras un estrés (p. ej. ver revisión Driscoll y cols., 2009; Landgraf y Wigger, 2003; Landgraf y cols., 1999, 2007; Wigger y cols., 2003).

Hemos expuesto tres tipos, o ejemplos, de selección psicogenética diferencial de ratas en función de diferentes respuestas conductuales. Existen muchos más, tanto en ratas como en ratones de laboratorio (y otras especies). Con esto sólo pretendemos ilustrar que estos procedimientos generan “instrumentos” -los pares de cepas de roedores seleccionadas bidireccionalmente- que son útiles para la investigación neurobiológica y neurogenética de

rasgos y respuestas diversas relacionadas con el estrés, la ansiedad o el miedo (u otras características o procesos complejos). Del trabajo con estas cepas de ratas –o ratones– “bidireccionales” han surgido propuestas de “*loci*” cromosómicos (QTL) o de genes candidatos a regular la ansiedad, el miedo o la predisposición al estrés y la depresión (p. ej. Fernández-Teruel y cols., 2002b; Flint, 2003; Flint y cols., 1995; Landgraf y cols., 2007; Ramos y Mormede, 1998; Zhang y cols., 2005), y han supuesto, como mínimo, los primeros pasos para la elaboración de hipótesis genéticas o de estudios (neuro) genéticos de mayor envergadura y refinamiento metodológico (p. ej. Johannesson y cols., 2008; Ramos y cols., 1999; Vendruscolo y cols., 2006; Yalcin y cols., 2004).

1.2.2 Estudios sobre ansiedad en ratas genéticamente heterogéneas: caracterización de las ratas N/Nih-HS

El stock de ratas genéticamente heterogéneas N/Nih-HS (“*National Institutes of Health Heterogeneous Rat Stock*”), se estableció en la década de los ochenta del siglo XX para servir de base a estudios de selección (López-Aumatell, 2008), y proviene del cruce de ocho cepas Inbred: ACI/N (cepa híbrida de August y Copenhage), BN/SsN (ratas salvajes del Instituto Wistar, mutantes en el color), BUF/N, F344/N y M520/N (ambas de ancestros desconocidos); y las cepas MR/N, WN/N y WKY/N que derivan de la cepa original de Wistar (Hansen y Spuhler, 1984; Figura 4). El stock de ratas N/Nih-HS (40 familias) proporcionadas por la Prof. Eva Redei del Centro de Medicina Comparativa (*Northwestern University, Chicago, USA*), se estableció en nuestro laboratorio desde 2004 y, en colaboración con el grupo de investigación del Dr. J. Flint (Oxford), nuestro grupo de investigación ha mantenido la colonia de ratas N/Nih-HS hasta la actualidad.

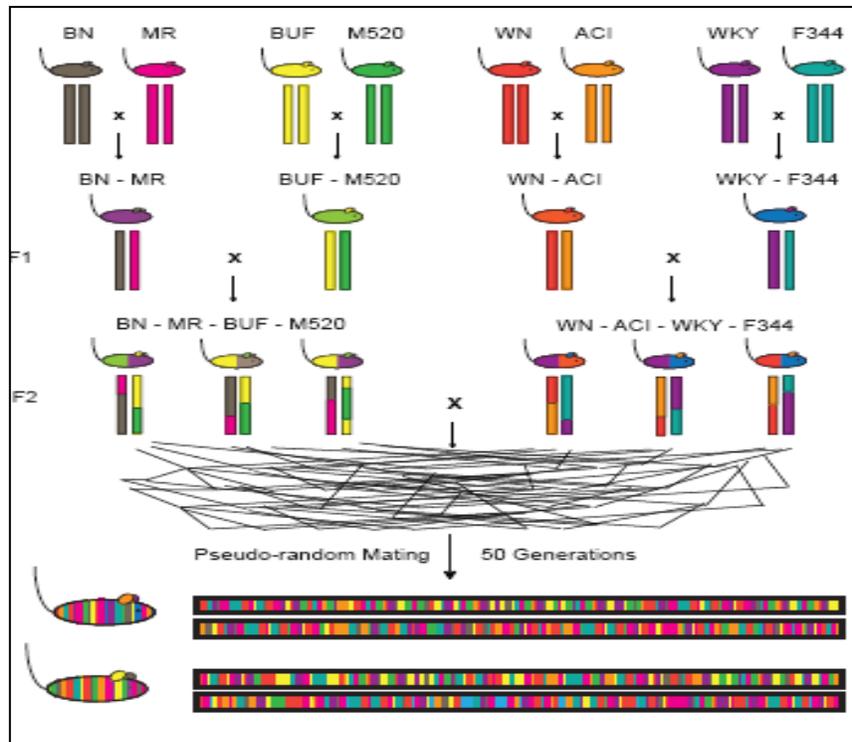


Figura 4.-Método de cruce genético de las cepas progenitoras de las ratas N/Nih-HS (imagen cedida amablemente a nuestro laboratorio por la Dra. Pernilla Stridh).

La alta recombinación genética, tras más de 50 generaciones de ratas N/Nih-HS, permite realizar estudios de genética cuantitativa de caracteres/rasgos complejos (estudios de QTLs, “*Quantitative Trait Loci*”) con niveles de resolución mucho más elevados que los clásicos estudios basados en generaciones híbridas F2 que parten de dos cepas consanguíneas divergentes en algún rasgo concreto (como los ejemplos aportados en la sección anterior). Así, las ratas heterogéneas N/Nih-HS han devenido un instrumento único para el mapeo fino y de alta resolución de QTLs, permitiendo la localización de intervalos o secciones cromosómicas (QTL) de incluso <1Mb y, por tanto, permitiendo la potencial identificación de genes cuantitativos para rasgos complejos (o “*Quantitative Trait Genes*”). Así lo confirman los indicios que proporcionan estudios genéticos -aún en desarrollo- sobre parámetros óseos (osteoporosis, Alam y cols., 2011), repuestas/rasgos de ansiedad/miedo (Johannesson y cols., 2009), alteraciones renales (Solberg y cols., 2010a) y sobre diabetes (Solberg y cols., 2010b).

Las ratas N/NiH-HS muestran un perfil de comportamiento “defensivo” (o de “respuestas defensivas”; ver revisión de Gray y McNaughton, 2000) caracterizado por respuestas de afrontamiento predominantemente pasivas, con rendimiento pobre en situaciones de conflicto como la evitación activa en la “*shuttle-box*”, elevados niveles de miedo condicionado (y de “petrificación”), estilo conductual ansioso-depresivo y elevadas respuestas hormonales al estrés (Díaz-Morán y cols., 2012 –Anexo I de esta Tesis-; López-Aumatell y cols., 2008; 2009b; 2011; Vicens-Costa y cols., 2011).

Debido a que las ratas N/NiH-HS son las que presentan mayor heterogeneidad genética entre las disponibles para la investigación de laboratorio, son fenotípica y genotípicamente adecuadas para estudios genéticos-cuantitativos y estudios de mapeo fino de QTLs (“Locus para Rasgos Cuantitativos” ó “*Quantitative Trait Loci*”) para rasgos de ansiedad, miedo y otros (Alam y cols., 2011; Johannesson y cols., 2009; López-Aumatell y cols., 2009b; Solberg y cols., 2010a-b).

1.3 Aplicabilidad de los análisis genéticos en el estudio de la ansiedad

1.3.1 Diferentes técnicas de análisis genético: los *Locus para Rasgos Cuantitativos* o “Quantitative Trait Loci”

A principios de 2001 se publicaron los dos primeros borradores de la secuencia del genoma humano (Lander, 2001; Venter, 2001), que permitieron dar a conocer las 3.200 millones de pares de bases que forman nuestro genoma nuclear. A partir de este descubrimiento, uno de los objetivos más importantes fue la identificación y localización de genes con expresión y funciones reguladoras de los mecanismos moleculares del comportamiento, de la emoción y de los procesos cognitivos en diferentes especies (Mei y cols., 2005; Wang y cols., 2003).

A partir de los avances del análisis multivariante, el mapeo genético también podría probar hipótesis sobre los procesos psicológicos que dan lugar a los cambios en el comportamiento (Flint, 2003). En este sentido la complejidad que supone la investigación de la susceptibilidad genética humana a los trastornos mentales, ha sugerido que los rasgos psicológicos podrían estar determinados por el efecto conjunto de genes con implicaciones

mayores (“*major genes*”) y, de multitud de genes con influencias menores para los que las estrategias óptimas de detección/identificación requerirían el análisis de QTL a alta resolución (Fernández-Teruel y cols., 2002b; Flint y Mott, 2001; Flint y cols., 1995). Además, varios estudios apuntan, que los genes asociados al estrés podrían actuar en diferentes niveles de los mecanismos de respuesta (p.e. sobre la conducta de respuesta, en la percepción de los estímulos o en la experiencia subjetiva de la situación, Ramos y Mormède, 1998). Experimentos realizados con ratones (F₂) seleccionados por presentar actividad extrema (alta/baja) en el test de Campo Abierto y en el laberinto en cruz elevado, confirmaron la implicación de tres locis (QTLs) en los cromosomas 1, 12 y 15 con influencias en la emociabilidad/ansiedad de estos ratones (Flint y cols., 1995), siendo estos los primeros resultados relacionados con la vulnerabilidad psiquiátrica vinculada al miedo en ratones (Flint y cols., 1995). Posteriores estudios identificaron QTL en cinco cromosomas con implicaciones en comportamientos relacionados con ansiedad incondicionada, los QTL de los cromosomas 4 y 8 estaban implicados en actividad locomotora, y los QTL de los cromosomas 1, 15 y 18 influyen significativamente sobre comportamientos relacionados con la ansiedad (y respuestas autonómicas; Henderson y cols., 2004).

Se han descrito varios QTLs, en los cromosomas 5 y 10 de rata (entre otros), implicados en el miedo condicionado y en el comportamiento de adquisición de la tarea de evitación activa en dos sentidos –ansiedad condicionada- (Fernández-Teruel y cols., 2002b) y, en concreto, se han identificado siete genes (mapeo fino del QTL en la posición 100 Mb del cromosoma 5) que podrían estar relacionados con el miedo y ansiedad condicionados en ratas, como son: el gen *Tyrp1* (“*tyrosinase-related protein 12*”), *Mpdz* (“*multiple PDZ domain protein*”), *Zdhhc21* (“*zinc finger, DHHC-type containing 21*”), RGD1561090, RGD1308059, RgD1565987 y *Bat2d* (“*proline-rich coiled-coil 2C*”) (Johannesson y cols., 2009, López-Aumatell, 2008).

Debido a la heterogeneidad de las respuestas/rasgos de ansiedad y miedo en diferentes cepas de ratas, un mismo comportamiento puede implicar –o puede estar asociado a- rutas génicas diferentes. Por ejemplo, las QTLs identificadas e implicadas en el comportamiento de adquisición de la tarea de evitación activa en dos sentidos (Fernández-Teruel y cols., 2002b), no fueron correspondidas con los resultados de otros estudios en los

que se aplicaba el análisis de microarray (Zhang y cols., 2005). Estos autores concluyen que las pequeñas diferencias observadas en los genes *Veli1* (“*lin-7 homolog a (C. elegans)*”) y *SLC6A4* (“*solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter, serotonin, member 4)*”), *Ptpro* (“*protein tyrosine phosphatase, receptor type, O*”), *Ykt6p* e *Id3a* (“*inhibitor of DNA binding 3, dominant negative helix-loop-helix protein*”) contribuirían de manera relevante en las diferencias del comportamiento ansioso. Sin embargo, estos genes no están contenidos en las QTLs halladas por Fernández-Teruel y cols. (2002b), lo que podría deberse, por ejemplo, a las diferentes tecnologías utilizadas o a los diferentes “*backgrounds*” genéticos de las ratas estudiadas en cada caso.

A pesar de la relativa juventud de estas metodologías, y de los resultados diferentes que a menudo se obtienen usando distintos procedimientos (o tipos de animales), los estudios genéticos basados en la tecnología del mapeo fino (de alta resolución) de QTLs en rata y ratón claramente indican la implicación de multitud de genes con funciones o influencia sobre los procesos psicológicos normales y los trastornos mentales (Flint y Shifman, 2008). Es de destacar, además, que el mapeo fino de QTL en ratones ya ha permitido la identificación de algún gen, como el *RGS2* (“*regulator of G-protein signaling 2, 24kDa*”), que ha sido validado también en estudios con humanos como un gen cuantitativo con influencia sobre la ansiedad e introversión (ver Yalcin y cols., 2004, y Smoller y cols., 2008, para la validación en humanos; Fullerton y cols., 2008; Willis-Owen y Flint, 2007).

1.3.2 Expresión genética diferencial a apartir del análisis de microarray: genes candidatos implicados en los trastornos de ansiedad

Otro tipo de abordaje genético es la aplicación del análisis de microarray, que a finales siglo XX inició el camino en la investigación de los procesos moleculares subyacentes al procesamiento y almacenamiento de la información en el cerebro (p. ej. Dopazo, 2006; Irwin, 2001). Actualmente se emplean diferentes tipos de análisis de microarray en función del objetivo del estudio genético, como los análisis de microarray de ADN, los de hibridación genómica comparada y los análisis de microarray de expresión (p.

ej. Esteban y cols., 2008; Martínez-Conejero y Horcajadas, 2008; Rosa de la Cruz y cols., 2009; Spisak y cols., 2007).

Los análisis de microarray de expresión, se basan en la extracción del ARNm de los tejidos que se van a analizar y se convierte en ADN complementario (ADNc) por la acción de la enzima transcriptasa inversa. Éstas moléculas quedarán marcadas con fluorescencia (tintes de cianina Cy3 y Cy5) y serán las que se hibriden con el microarray. A partir de este procedimiento, se obtiene un nivel de expresión para cada gen, es decir, un grado diferente de fluorescencia. En los niveles cuantificados de ARNm, presentes en los tejidos, se pueden obtener los niveles de expresión de un gen determinado, de forma que una función celular alterada será la consecuencia de una alteración en el perfil de expresión génica celular (p. ej. Rentarúa, 2007). Este tipo de análisis de microarray se aplica en genómica funcional, y en concreto, se emplea en la identificación de mecanismos fisiopatológicos o de los genes implicados en el origen de diferentes enfermedades, en la comparación de la expresión génica de tejidos concretos procedentes de diferentes individuos y en la obtención de multitud de valores de expresión genética para diferentes condiciones biológicas,

El “microarray de expresión génica” es la técnica de análisis que hemos empleado en nuestros experimentos, dado que es la más aplicada en genómica funcional (Blohm y Guiseppi-Elie, 2001; Wang y cols., 2003). Los primeros trabajos se centraron en la diferenciación de la expresión genética (análisis de “*clusters*”) de conjuntos de genes que podrían subyacer a cambios en alguna función macroscópica, y posteriormente la investigación se centró en el estudio de la expresión genética diferencial bajo diferentes condiciones experimentales (ej. Dopazo, 2006).

Este tipo de microarray permite la identificación de mecanismos fisiopatológicos a partir de la comparación de los patrones de expresión de miles de genes en paralelo, en varias muestras del mismo tipo de tejido, tanto a nivel basal como previamente sometidas a manipulaciones/condiciones experimentales diversas (Irwin, 2001; Martínez-Conejero y Horcajadas, 2008). Por este motivo ha mostrado ser un instrumento eficiente para el análisis, por ejemplo, de los mecanismos moleculares subyacentes (o consecuentes) a los estados de ansiedad/miedo y estados o rasgos relacionados (p. ej. Blohm y Guiseppi-Elie, 2001; Ressler y cols. 2002; Wang y cols., 2003).

Los rasgos complejos de comportamiento se diferencian de las singularidades fenotípicas dependientes de un solo gen, en que presentan manifestaciones fenotípicas con gradaciones distribuidas de manera continua (ver revisión de p. ej. Tobeña y Fernández-Teruel, 2009). A principios del siglo XXI se empezaron a esclarecer las funciones de genes relacionados con los mecanismos moleculares subyacentes a la ansiedad. Se descubrió, por ejemplo, la implicación de la proteína microtubular asociada -MAP-, la de genes relacionados con neurotransmisores (GABA, serotonina, norepinefrina y dopamina), así como vinculados a receptores de serotonina -5HT₃-, receptores de colecistoquinina y sistemas neuropéptidos (Wang y cols., 2003). En un modelo de ansiedad en que se inducen respuestas de petrificación en ratas por exposición a olor de gato (Wang y cols., 2003) se detectaron 54 genes con diferencias significativas entre las dos cepas de ratas estudiadas (16/sobre-expresados y 38/sub-expresados). Las ratas menos ansiosas, las *Sprague-Dawley* (SD), presentaron sobre-expresión del gen asociado a la actividad reguladora de citoesqueleto (ARC) y del factor trófico NGFI-A, así como sub-expresión del gen 5HT_{3R}, en comparación con las ratas más ansiosas (las de la cepa PVG; Wang y cols., 2003). Por otra parte, en un modelo animal de Trastorno por Estrés Postraumático (TEPT) se identificaron 31 genes expresados diferencialmente y en paralelo a los cambios observados en las ratas con síntomas de TEPT, observándose sobre-expresión del gen receptor 5-HT_{2C} y de la enzima “*angiotensin I-converting enzyme*” en dichas ratas (Harada y cols., 2008).

Estudios neuroanatómicos y de comportamiento han demostrado que el complejo amigdalino y estructuras como el hipocampo, son componentes esenciales en las vías neurales mediadoras de emociones como el miedo (en particular, el miedo condicionado) y la ansiedad, o de procesos cognitivos como el aprendizaje y la memoria (ver trabajos de p. ej. Gray y McNaughton, 2000; LeDoux, 1996; 2000; Davis, 1997; así como Blalock y cols., 2003; Dent y cols., 2001; Ressler y cols. 2002). Experimentos de miedo condicionado (o de respuestas relacionadas con el mismo) en los que se aplicó el análisis de microarray, hallaron diferencias de expresión genética en hipocampo y amígdala (D’Agata y Cavallaro, 2002; Mei y cols., 2005; Zhang y cols., 2005), siendo interesante el hecho de que algunos de dichos genes se hallan involucrados en la regulación de receptores ionotrópicos, como el receptor GABA_A (GABARAP), cuyo papel en la ansiedad es notorio. La regulación a la baja de este receptor en la amígdala, posterior a la inducción de miedo condicionado,

sugirió, según los autores, que el efecto inhibitorio del GABA decrecería para permitir un incremento en la excitabilidad sináptica (Mei y cols., 2005).

También se han encontrado asociados al miedo aprendido en ratas, por ejemplo, el complejo actina-actinina,-CaMKII-, que interactúa con el receptor antagonista AMPA – CNQX-, la proteína fosfatasa A2 –PP2A-, que los puede desfosforilar, y el gen relacionado con el “cromosoma X frágil” –FXR1- (Paradee y cols., 1999). Ratones mutantes “*knockout*” para este gen, muestran un déficit significativo en la formación de la memoria relacionada con el miedo condicionado.

Estudios sobre el condicionamiento clásico de miedo han aportado gran parte del conocimiento actual sobre la memoria emocional. Por ejemplo, en el estudio de Mei y cols. (2005) hallaron 222 genes, relacionados con el miedo condicionado y que presentaban expresión diferencial en amígdala (123/sobre-expresados y 99/sub-expresados). De ellos, el 22% presentó funciones relacionadas con la adhesión celular y la estructura proteínica (por ejemplo: α -actina, β -tubulina y proteínas microtubulares asociadas -MAP4-).

Otros genes, como el “*astrocyte-specific connexin-30*” –Cx30-, relacionado con funciones gliales, pueden cambiar su expresión en respuesta al miedo condicionado (Rash y cols., 2001). De modo parecido ocurre con genes implicados en la formación de mielina, como la “*myelin-associated oligodendrocytic basic protein*” –MOBP- (McCallion y cols., 1999), “*proteolipid protein*” –PLP- (Yool y cols., 2001) y “*oligodendrocyte-specific protein*” –OSP- (Bronstein y cols., 1996). Por último, el gen activador del transcrito Egr-1 en rata mostró incrementos en sus niveles de expresión tras el condicionamiento de miedo, y la administración de diazepam provocó el bloqueo de este incremento y la reducción de la ansiedad (Letwin y cols., 2006).

Por otra parte, en estudios sobre los mecanismos moleculares subyacentes a la respuesta de estrés se han identificado genes candidatos con funciones moduladoras relevantes, por ejemplo en algunos estudios mostraron que las exposiciones prolongadas a niveles elevados de glucocorticoides por administración exógena, por estrés crónico o como consecuencia de la depresión, provocaron daño neural y alteraciones en la expresión génica del hipocampo (Brown y cols., 2004; Kajiyama y cols., 2010; González-Pérez y cols., 2001). Es sabido que el factor liberador de corticotropina (CRF) es clave en la respuesta de

estrés y en la actividad del eje HPA. En este sentido, algunos estudios han mostrado como las exposiciones a estrés agudo incrementaron la expresión genética de CRFR1 (receptor del CRF) a través de la vía MEK-ERK1/2 (proteína quinasa que activa el factor de transcripción nuclear -ERK-) en el córtex prefrontal (Meng y cols., 2011).

En un estudio de estrés crónico (“inmovilización” durante 2-8 horas al día, 14 días), Kim y Han (2006) identificaron, en amígdala de ratones C57BL/6j, sub-expresión del gen relacionado con la hormona estimulante de la glándula tiroides (TSH) y con otros genes involucrados en factores de crecimiento, mientras que el gen de la hormona liberadora de la tirotrópina (TRH) se mostró sobre-expresado.

Por último, también se han identificado genes relevantes en el campo de investigación de la ansiedad en tareas aversivas (instrumentales) que implican un alto grado de conflicto condicionado y, por tanto, de ansiedad. Así por ejemplo en la comparación de la expresión génica hipocámpica entre las cepas de ratas “*Syracusa*” de alta vs baja (SHA y SLA, respectivamente) tasa de evitación activa en dos sentidos (tarea cuya velocidad de adquisición se relaciona inversamente con los niveles de ansiedad), se identificaron ocho genes con expresión diferencial (entre las ratas SHA y SLA) como los más sugerentes candidatos (SLC6A4, Veli1, SLC3a1, Ptpo, Id3a, Ykt6p, Aldh1a4 and CD74) a poseer implicación relevante en el comportamiento de miedo y/o ansioso-depresivo en ratas (Zhang y cols., 2005). Es particularmente interesante el caso del gen SLC6A4 (receptor transportador de la serotonina), implicado en la vulnerabilidad al estrés y la depresión en humanos y en animales, así como el hecho de que los genes *Synapogyrin1* y *Rab1b*, también expresados diferencialmente en el estudio de Zhang y cols (2005), presentaron cambios de expresión en hipocampo de ratas sometidas a un aprendizaje de evitación pasiva y a otro tipo de aprendizaje espacial (Cavallaro y cols., 2002; D’Agata y Cavallaro, 2003; Zhang y cols., 2005). Es preciso ser cautos en la interpretación de estos resultados y de dichas coincidencias, puesto que se han obtenido empleando ratas no entrenadas y seleccionadas genéticamente, en un caso, y en ratas entrenadas y no seleccionadas en los otros casos. Algunas diferencias encontradas entre estudios podrían deberse a estas diferencias metodológicas, entre otras. Por ejemplo, el estudio de Sabariego y cols. (2011) halló diferencias en la expresión (entre otros genes) cerebral de *CamkIIb* entre las ratas (seleccionadas genéticamente) RHA-I y RLA-I (poco y muy ansiosas, respectivamente), y

la expresión diferencial de dicho gen se observó también en la amígdala o el hipocampo en los estudios de miedo condicionado o “derrota social” de Mei y cols. (2005) y Kabbaj y cols. (2004), respectivamente. No obstante, en otros estudios en los que el nivel de miedo o ansiedad de los animales varía, sea por selección previa o por manipulación experimental, el gen *CamkIib* no apareció diferencialmente expresado en amígdala, hipocampo o corteza cerebral íntegra (p. ej. D’Agata y Cavallaro, 2003; Wang y cols., 2003; Zhang y cols., 2005).

Además, otra dificultad en la interpretación de los resultados de microarray viene dada por el hecho de que algunos genes, como es el caso de *Veli1* (Zhang y cols., 2005), tienen dos isoformas homólogas en el hipocampo, cada una con distribuciones diferentes (Misawa y cols., 2001; Peng y cols., 2003).

Puesto que la amígdala y el hipocampo son dos estructuras clave a nivel estructural y funcional en la circuitería de la ansiedad (p. ej. Gray y McNaughton, 2000; LeDoux, 1996; McNaughton, 1997), y los resultados obtenidos en cepas las RHA-I y RLA-I mostraron diferencias en expresión genética central relacionada con ansiedad/frustración (Sabariego y cols., 2011), la presente tesis pretendió ser la continuación lógica de dicho trabajo. Para ello se ha analizado la posible existencia de genes candidatos con elevada capacidad predictiva en comportamientos relacionados con la ansiedad in/condicionada. Se ha empleado el stock de ratas N/Nih-HS, genéticamente heterogéneas, dado que a diferencia del resto de líneas/cepas empleadas hasta ahora, las ratas N/Nih-HS constituyen un instrumento único para la obtención de marcadores genéticos relacionados con fenotipos complejos (Johannesson y cols., 2009). Esto se debe a que su heterogeneidad génica les confiere un nivel de recombinación genética excepcional en comparación con las líneas/stocks de ratas “*inbred*”, lo que aumenta de forma considerable la potencia y la generalización de los resultados que podamos obtener (Alam y cols., 2011; Flint, 2003; Johannesson y cols., 2009).

2. OBJETIVOS E **HIPÓTESIS**

Objetivos generales de la tesis:

- a) Estudiar el perfil conductual “ansioso-depresivo” en ratas genéticamente heterogéneas N/Nih-HS y compararlo con el de las cepas de ratas RLA-I (muy ansiosas) o RHA-I (poco ansiosas).

- b) Realización de la primera caracterización hormonal de las ratas N/Nih-HS en respuesta a un estrés. Estudio de las relaciones entre hormonas relacionadas con la respuesta de estrés y el estilo de afrontamiento pasivo en test de ansiedad, de miedo o comportamientos relacionados con síntomas depresivos.

- c) Realizar estudios de expresión génica diferencial, en ratas N/Nih-HS extremas (bajas o altas) en cuanto a sus niveles de ansiedad, en áreas cerebrales específicas relacionadas con la circuitería de la ansiedad/miedo y el estrés, como la amígdala y el hipocampo, con objeto de establecer algún posible “gen candidato” con influencia significativa sobre los perfiles conductuales o de “temperamento” en estudio.

ESTUDIO 1 (Octubre-Diciembre/2010):

Objetivos específicos:

- a) Continuar con la caracterización de las ratas N/Nih-HS, evaluando su nivel de ansiedad, miedo aprendido y estilo de afrontamiento en comparación con las cepas de ratas RHA-I y RLA-I.
- b) Estudiar la respuesta del eje HPA y los niveles de prolactina de las ratas N/Nih-HS ante una situación de estrés y compararlas con las respuestas hormonales de las cepas RHA-I y RLA-I.

Hipótesis:

- a) Los resultados de estudios previos, indicativos de un estilo de afrontamiento pasivo en los animales N/Nih-HS, permiten esperar que estas ratas mostrarán un perfil conductual más cercano a las ratas RLA-I (muy ansiosas, pasivas) que a las ratas RHA-I (poco ansiosas, proactivas), en la batería de pruebas conductuales registrada.
- b) También en función de estudios previos es esperable una mayor respuesta hormonal post-estrés (prolactina, corticosterona y ACTH) en las ratas RLA-I y N/Nih-HS que en las RHA-I.
- c) Si las respuestas hormonales (basales y en respuesta a una situación de novedad) están relacionadas con la ansiedad o el miedo condicionado, es esperable que esto se refleje en asociaciones factoriales significativas entre tales respuestas endocrinas y variables de ansiedad del Laberinto Circular Elevado, el test de la “Caja nueva” y la adquisición de la evitación activa en dos sentidos en la “*Shuttle-box*”.

ESTUDIO 2 (Julio-Diciembre/2011)

Objetivos específicos: evaluación de las ratas N/Nih-HS en el test de Campo Abierto, y comparación con las cepas RHA-I/RLA-I, con objeto de obtener una primera caracterización de la conducta exploratoria horizontal y vertical ante la novedad, así como de las respuestas de acicalamiento (“*self-grooming*”), en las ratas N/Nih-HS.

Hipótesis:

- a) En función de estudios previos es esperable que las ratas N/Nih-HS y RLA-I presenten menor conducta exploratoria ante la novedad (en el test de Campo Abierto) que las ratas RHA-I.
- b) Si como indica parte de la literatura previa, las respuestas de acicalamiento (“*self-grooming*”) en situación de novedad tienen relación con los niveles de ansiedad y estrés de las ratas, es esperable que las N/Nih-Hs muestren mayor nivel de respuestas de acicalamiento que las ratas RHA-I. A su vez, se espera que el perfil de respuesta de acicalamiento de las ratas N/Nih-HS sea similar al de la cepa RLA-I.
- c) Si la conducta exploratoria y las respuestas de acicalamiento (“*self-grooming*”) en el test de Campo Abierto están relacionadas con la ansiedad o la temerosidad (en respuesta a la novedad), es esperable que esto se refleje en asociaciones factoriales significativas entre dichas conductas y variables de ansiedad del Laberinto Circular Elevado.

ESTUDIO 3 (Enero/2011-Septiembre/2012)

Objetivos específicos:

Estudio de la expresión génica diferencial, en amígdala e hipocampo de ratas N/Nih-HS, en función de sus niveles altos o bajos de ansiedad.

Hipótesis:

Puesto que amígdala e hipocampo son estructuras implicadas en la regulación de la ansiedad y el miedo, es esperable hallar diferencias significativas en la expresión génica entre ratas N/Nih-HS con respuestas de ansiedad/miedo extremas.

3. MATERIALES Y **MÉTODOS**

3.1 Metodología general

En todos los experimentos que siguen se utilizaron ratas macho de las cepas o stock RHA-I/RLA-I y N/Nih-HS. Los animales se estabularon en grupos de dos y del mismo sexo, en jaulas estándar de macrolon (50 x 25 x 14 cm.). El cambio y limpieza de las jaulas se realizó una vez por semana. La temperatura se mantuvo constante a $22 \pm 2^\circ \text{C}$ y la humedad al 50-70%. Las ratas tuvieron acceso a comida y bebida “*ad libitum*”. El ciclo de luz/oscuridad fue de 12 horas, con inicio de la fase de luz a las 8:00 h.

El protocolo experimental que se describe a continuación fue aprobado por el comité ético de la Universidad Autónoma de Barcelona, Communities Council Directive (86/609/EEC), de acuerdo con la legislación española sobre “Protección de los animales para experimentación y otras aplicaciones científicas”.

A continuación se describen los procedimientos de los diferentes experimentos por separado y más pormenorizadamente.

3.2 Estudio 1 (Octubre-Diciembre/2010)

Características de la muestra

Se utilizaron un total de 128 ratas machos, de tres cepas diferentes mantenidas en nuestro laboratorio: dos cepas consanguíneas Roman High- (RHA-I, n= 14) y Low-Avoidance (RLA-I, n= 14), y una cepa genéticamente heterogénea “N/Nih-HS” (n= 100). A efectos de incluir animales “control/basal” para los análisis de expresión génica (microarray) se reservaron 6 ratas RHA-I, 6 ratas RLA-I y 12 ratas N/Nih-HS, de la misma edad y sexo, que no fueron sometidas a ningún tipo de test. Al inicio del experimento los animales tenían aproximadamente entre 100-120 días de vida y entre 320-375 g. de peso.

En un estudio independiente (Anexos - Artículo 1) se evaluó el “estilo de afrontamiento” de las tres cepas de ratas en el Test de Natación Forzada, utilizado como modelo animal para la selección de antidepresivos y en el que, presumiblemente, las conductas relativas de inmovilidad o “lucha/escape” son indicadoras de aspectos que podrían estar relacionados con alguna sintomatología depresiva.

Diseño experimental

Se utilizaron los tres grupos experimentales mencionados y, de forma contrabalanceada por día y hora, se administraron a todos los grupos las pruebas conductuales y hormonales (ver a continuación). Se incluyeron medidas repetidas (pre/post) de las extracciones de muestras hormonales.

Procedimiento

En primer lugar se realizó la caracterización conductual a todas las ratas experimentales (n = 128), con el siguiente orden de aplicación: el Laberinto Circular Elevado, el test de la “Caja nueva” y la tarea de la adquisición de la respuesta de evitación activa en dos sentidos. Durante el fenotipado conductual, se obtuvieron muestras de la respuesta hormonal antes y después de la realización del test de la “Caja nueva” (para más detalle ver “Análisis hormonal”). Una vez finalizó la fase de registro conductual, se sacrificaron y diseccionaron todas las ratas de la muestra, para realizar los análisis de microarray posterior descrito en el procedimiento del Estudio 3 (Figura 5).

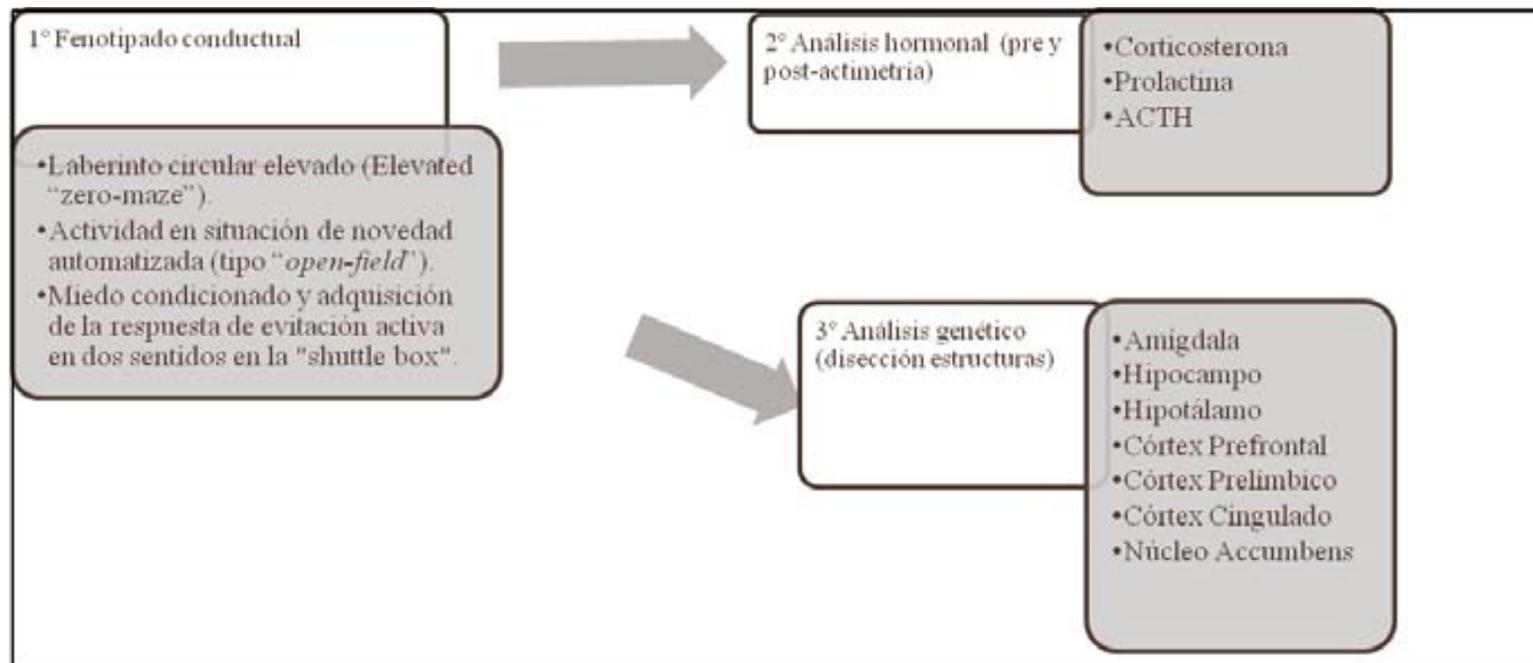


Figura 5.- Esquema general del estudio.

1°.- Fenotipado conductual

El experimento se realizó en la fase de luz del ciclo, de 9:30 a 18:00 (en el caso del test de la “Caja nueva”, se realizó entre las 9:30 y 13:00 a.m., para evitar interferencias en la extracción de la muestras en la respuesta hormonal). Se realizaron tres pruebas conductuales, espaciadas entre una y tres semanas entre ellas. En la Tabla 4 se muestra la representación esquemática del procedimiento conductual y hormonal llevado a cabo.

Tabla 4.- Planning temporal experimento: fase de fenotipado conductual y extracción de las muestras de sangre.

Días: 1° - 6°	Días: 7° - 9°	Días: 13° - 23°	Días: 34° - 51°
Laberinto Circular Elevado	Extracción de las muestras de sangre (estado basal)	Test de la “Caja nueva” Extracción de las muestras de sangre (post-stress)	Tarea de “Shuttle-box”

Batería y orden de pruebas conductuales*- Tests conductuales:*

a) *Laberinto Circular Elevado (Elevated “zero-maze”*; Pähkla Kask, y Rägo, 2000; Shepherd y cols., 1994; López-Aumatell y cols., 2008, Figura 6). Está compuesto por una plataforma circular de 10 cm. de ancho y 105 cm. de diámetro, con dos sectores abiertos y dos cerrados (con paredes de 40 cm. de altura). La prueba está situada en una habitación negra, iluminada con luz roja (50 lx).

Procedimiento: se debe colocar cada animal (uno de cada vez) sobre el laberinto, a la entrada de un espacio cerrado (de cara a él), momento a partir del cual se enciende el cronómetro que medirá la duración total de la sesión, y quedará grabado a partir de una cámara que está situada en el techo de la sala. Los investigadores deben colocarse en el exterior de la habitación, y realizar el registro de las siguientes conductas durante cinco minutos (Tabla 5).

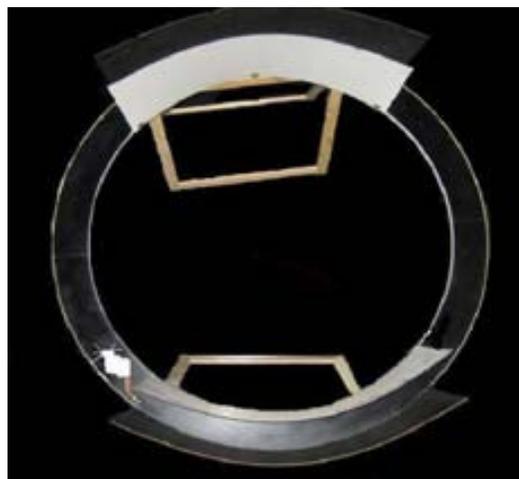


Figura 6.-Laberinto Circular Elevado.

Tabla 5.-Repertorio conductual registrado en el "Laberinto Circular Elevado"

1. Latencia de la primera entrada en los espacios abiertos.
2. Número de veces que entran en los espacios abiertos.
3. Tiempo total en los espacios abiertos.
4. Número de "*stretched attend postures*" (postura de aproximación al sector abierto: asomar la mayoría del cuerpo hasta las patas traseras, en el espacio abierto).
5. Número de cruces.
6. Número de "*head dips*" (asomar la cabeza hasta las orejas por el borde del laberinto, hacia el suelo).
7. Número de defecaciones.

b) *Actividad en situación de novedad automatizada o test de la "Caja nueva"* (tipo "*open-field*" cuadrado; test de ansiedad/emotividad/miedo y de habituación a un entorno nuevo, Aguilar y cols., 2002, Figura 7). Está compuesto de una jaula de plexiglás transparente (40 x 40 x 40 cm.), con una placa horizontal negra en su interior, dividida por dos cuadros con células fotoeléctricas, que detectan el movimiento y permiten medirlo automáticamente. La prueba está situada en una habitación blanca iluminada.

Procedimiento: se colocan los animales sobre la placa horizontal y se registra la actividad espontánea horizontal y vertical, durante 20 minutos. El registro y desarrollo de la prueba

se monitoriza a través del programa de ordenador creado para esta prueba, con el que se almacena la actividad registrada, para su análisis posterior en bloques de cinco minutos (Panlab).



Figura 7.-Test de la “Caja nueva”.

c) *Miedo condicionado y adquisición de la respuesta de evitación activa en dos sentidos durante la tarea de “Shuttle-box”* (Letica; Fernández-Teruel y cols., 1991, Figura 8-9). Está compuesto por una caja rectangular con dos compartimentos iguales (25 x 25 x 28 cm.), con una abertura en medio de 8 x 10 cm. La caja está aislada del exterior a partir de un extractor interno, y contiene una rejilla metálica en el suelo, a partir de la cual los animales reciben la descarga eléctrica. Está situada en una habitación blanca iluminada y el procedimiento se lleva a cabo, a partir del diseño de la sesión en el ordenador.

Procedimiento: el animal primero pasará por periodo de habituación (sin estimulación) de cuatro minutos, a partir del cual se iniciará el proceso de condicionamiento. Primero aparecerá un tono de 63 dB junto con una luz de 7 W durante 10 segundos (estímulos condicionados, EC), seguido de una descarga eléctrica de 0.7 mA durante 20 segundos (estímulo incondicionado, EI). El periodo entre ensayos será de 60 segundos, en los que no recibirá ningún estímulo. El animal puede evitar recibir la descarga eléctrica, si cambia de compartimento tanto durante del EC como del EI, aunque es

necesario para conseguir que asocie el EC al EI, que el animal como mínimo reciba en los primeros trials algo del EI (no es necesario todo el intervalo de tiempo); de forma que el animal con mayor nivel de aprendizaje realizaría un máximo de 49 evitaciones (ver Tabla 6, para definición operativa de conductas).



Figura 8.-Prueba de Shuttle-box.

A continuación en la Figura 9, se representa cada ensayo de la sesión.

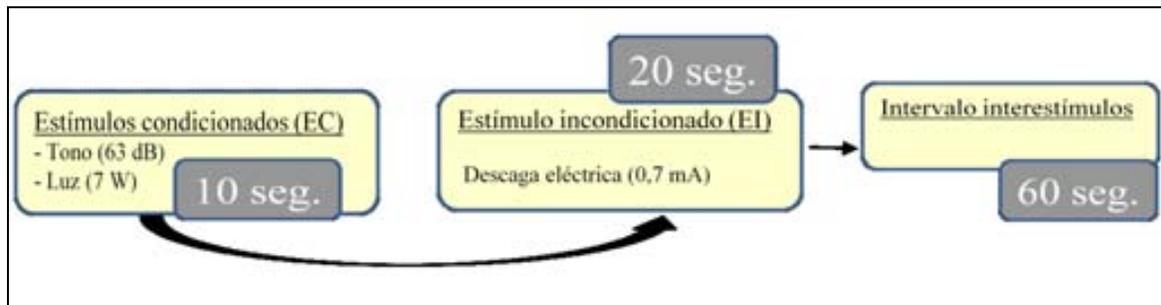


Figura 9.-Esquema conductual de cada ensayo en una sesión de la tarea de Shuttle-box.

Las sesiones se compusieron de 50 ensayos cada una, con una duración total oscilante entre 60 y 75 minutos, variable en función de la respuesta de cada animal (número de evitaciones/escapes). A continuación se muestra el repertorio conductual que se registró (Tabla 6).

Tabla 6.-Repertorio de conductas registrado en la tarea de "Shuttle-box"

1. Número de evitaciones (evitación: cruce al otro compartimento durante la presentación del EC, antes del inicio del EI).
2. Número de escapadas (escape: cruce al otro compartimento una vez se ha iniciado la presentación del EI).
3. Número de cruces de compartimento entre ensayos (durante el periodo inter-trial).
4. Número de cruces de compartimento durante el periodo de habituación.
5. Tiempo de petrificación o "freezing" en inter-trials (del 2° al 6°) (conducta de petrificación: ausencia de cualquier movimiento corporal salvo el movimiento vegetativo de la presión cardíaca y la respiración).
6. Número de defecaciones.
7. Latencia en el cambio de compartimento.
8. Número de "Freezing - none real" (número de ensayos con ausencia de cruces de compartimento durante el EI, es decir número total de fallos de escapada).

La batería conductual descrita se seleccionó para el registro conductual de este experimento por los siguientes motivos

- *Laberinto Circular Elevado*: se aplicó esta prueba incondicionada para poder comparar con resultados previos y por las correlaciones que tiene con otras pruebas de ansiedad incondicionada como la Caja Blanca-Negra (CBN), y con pruebas de ansiedad condicionada como la prueba de "shuttle-box" (López-Aumatell y cols., 2009 a, b).

- *Test de la "Caja nueva"*: se administró esta prueba de ansiedad incondicionada, porque permite: (a) recoger muestras hormonales post-estrés sin alterar la respuesta de estrés, ya que tiene 20 minutos de duración, (b) comparar con resultados previos de nuestro laboratorio (López-Aumatell y cols., 2008), y (c) registrar de forma automática la actividad horizontal y vertical que realiza la rata en ese tiempo.

- *Prueba de Shuttle-box*: esta prueba se seleccionó por varios motivos: (1) Robustez en el registro de comportamientos relacionados con la ansiedad y miedo condicionados. (2) las ratas Romanas fueron seleccionadas por el estilo de afrontamiento que desarrollan en esta prueba, con lo que sirve como referencia en la interpretación de los resultados de las ratas

N/Nih-HS (Fernández-Teruel y cols., 1991). Y (3) en este experimento, las ratas N/Nih-HS se seleccionaron en función del número de evitaciones que realizaron durante esta prueba.

2º Análisis hormonal

Se extrajeron en los tres grupos de ratas experimentales, muestras hormonales (basales y posteriores a una situación de novedad) de corticosterona, prolactina y ACTH. La obtención de muestras de sangre se obtuvo a partir de un corte en la cola de aproximadamente 2 mm. (200 µl), y posteriormente se guardaron las muestras en tubos de 2.0 ml. (Eppendorf, Hamburg, Germany). Una vez obtenido el sérum (diferenciado del plasma por centrifugación), se guardaron en el congelador de -80 °C.

La extracción de sangre se realizó de 9:30 a 13:00 de la mañana, y una semana más tarde todos los animales se expusieron durante 20 minutos a una situación de novedad por medio del test de la “Caja nueva” (Tabla 4) e inmediatamente posterior se les realizó la extracción de sangre post-estrés (tiempo máximo entre el fin de la prueba y la extracción de sangre de dos minutos por rata, Tabla 4).

Se empleó la técnica ELISA (“*enzyme linked inmuno sorbent assay*”), como procedimiento de ensayo inmunoenzimático. El lector utilizado para los análisis por ELISA fue *EMS Reader MF V.2.9-0* y los reactivos utilizados para cada hormona fueron los siguientes:

- Parámetro de la prolactina (ntotal = 184; basal, n = 107 y post-stress, n = 77), se empleó el “*Prolactin Rat ELISA*” (“*Demeditec Diagnostics GmbH*”; Alemania).
- Parámetro de la corticosterona (ntotal = 230; basal, n = 123 y post-stress, n = 107), se utilizó el reactivo “*Corticosterone EIA*” (“*Immunodiagnostic Systems Ltd*”, IDS Ltd; Boldon, Reino Unido).

- Parámetro del ACTH (ntotal = 33; basal, n = 16 y post-stress, n = 17), se aplicó el kit ACTH por *Immulite*® (Siemens). El aparato utilizado para obtener los resultados fue el *Immulite*® 1000 (Siemens).

3° Análisis estadístico de los resultados conductuales y hormonales

A partir del programa estadístico SPSS 17.0, se realizó un análisis descriptivo de los resultados de las tres cepas en cada prueba conductual y de los resultados hormonales. También se aplicó un MANOVA sobre los datos hormonales, analizando el tipo de cepa como factor inter-sujetos, el tiempo (diferencias pre y post stress) como factor intra-sujetos y la interacción posible entre ellos.

Se analizaron los datos conductuales, a partir de la aplicación del one-way ANOVA junto con la prueba post hoc de Duncan (diferencia significativa definida a partir de $p < 0.05$). Y se aplicaron pruebas t de Student, para la comparación de medias entre grupos independientes.

Posteriormente, se calculó la matriz de correlaciones (Pearson' correlation coefficient) con rotación oblicua (oblimin directo), en el que se comparaba el repertorio de conductas registradas de cada test aplicado y las variables hormonales (basal y post-stress de corticosterona, prolactina y ACTH). Y finalmente, se realizó un análisis factorial exploratorio a partir de un total de 14 variables, para los datos de la cepa N/Nih-HS. A partir del test de sedimentación de Cattle (Cattell's Scree Test), se realizó un segundo análisis factorial aplicando la reducción de dos factores.

3.3 ESTUDIO 2 (Julio-Diciembre/2011)

Características de la muestra

Se emplearon un total de 114 ratas machos, de tres cepas diferentes mantenidas en nuestro laboratorio: dos cepas consanguíneas Roman High- (RHA-I, n= 12) y Low-Avoidance (RLA-I, n= 12), y una cepa genéticamente heterogénea “N/Nih-HS” (n= 90). Al inicio del experimento los animales tenían aproximadamente entre 3.5 meses de edad y entre $291,24 \pm 4,6$ (media \pm ES) de peso.

Diseño

Se administró de forma contrabalanceada las pruebas conductuales a los tres grupos experimentales mencionados.

Procedimiento de evaluación conductual

1º Test de Campo Abierto o “Open-field test” (Gray y Lalljee, 1974; Broadhurst, 1957; 1958a; 1958b; 1975, Figura 10). Está compuesto por una plataforma circular de 82,5 cm. de diámetro, con paredes alrededor de todo el diámetro de 34 cm. de altura. La prueba está situada en una habitación negra, iluminada con luz blanca (65 lx). La plataforma horizontal está dividida en líneas negras de 2 mm, que forman 19 secciones cuadradas.



Procedimiento: se debe colocar cada animal (uno de cada vez) sobre el mismo lado del test cada vez, de forma que el animal debe quedar orientado de forma paralela a las paredes del

Figura 10_ Test de campo abierto.

test, momento a partir del cual se enciende el cronómetro que medirá la duración total de la

sesión (5 minutos), y quedará grabado a partir de una cámara que está situada en el techo de la sala. El registro de las conductas se realizó a partir de las grabaciones realizadas previamente. Se registraron las siguientes variables conductuales: número total de desplazamientos verticales (“*rearings*”), número total de cruces entre las secciones, tiempo de petrificación (“*freezing*”), número de SAP y duración total de la conducta de acicalamiento (“*grooming*”).

La conducta de SAP se ha definido como la postura que adopta el animal cuando extiende su cuerpo (pasando como mínimo las orejas y como máximo, tres patas) a través de una de las líneas de separación entre las secciones.

En este experimento se escogió el test de Campo Abierto debido a su amplia trayectoria en numerosos estudios de conducta (Gray y Lalljee, 1974; Broadhurst, 1975; 1958a; 1958b; 1975; Aguilar y cols., 2002) y en los resultados obtenidos en las ratas Romanas (Steimer y Driscoll, 2003; Fernández-Teruel y cols., 1992a).

2º *Laberinto Circular Elevado* (Elevated “zero-maze”; Pähkla y cols., 2000; Shepherd y cols., 1994; López-Aumatell y cols., 2008).

Análisis estadístico

Se realizó el análisis descriptivo de los resultados de los dos test conductuales en las tres cepas de ratas y se analizaron los datos conductuales, a partir de la aplicación del one-way ANOVA junto con la prueba post hoc de Duncan (diferencia significativa definida a partir de $p < 0.05$). Y se aplicaron pruebas t de Student, para la comparación de medias entre grupos independientes.

Se calculó la matriz de correlaciones y un análisis factorial con rotación oblicua (oblímin directo), aplicado a las 11 variables seleccionadas y sobre la muestra de ratas N/Nih-HS (SPSS Windows, 17.0, SPSS Inc., USA). De acuerdo con trabajos previos (López-Aumatell y cols., 2008; 2009a) el siguiente paso fue reducir la solución factorial inicial a una solución con el mínimo y significativo número de factores independientes

entre sí (método oblimin directo), a partir del resultado obtenido con el test de sedimentación de Catell (para más detalle del procedimiento factorial ver Aguilar y cols., 2002; López-Aumatell y cols., 2008). La muestra de ratas N/Nih-HS fue dividida por sus respuestas extremas en variables del Campo abierto como el tiempo de “*grooming*” y de “*freezing*” (media \pm 1 desviación estándar, respectivamente). Se aplicó la prueba t de Student para muestras independientes, debido a nuestra hipótesis previa sobre la extrema respuesta en el comportamiento exploratorio durante la prueba del Laberinto Circular Elevado. Se realizaron comparaciones entre los tres stocks de ratas en el Laberinto Circular Elevado a partir de los resultados de los experimentos acumulados durante los últimos dos años.

3.4 ESTUDIO 3 (Enero/2011-Septiembre/2012)

Disección y extracción de estructuras cerebrales

En el Estudio 3, se seleccionaron tres grupos de ratas N/Nih-HS (a partir de la muestra de ratas del Estudio 1) por su nivel de ansiedad/miedo condicionado, según el número de evitaciones (media total muestra, de 4,4 evitaciones y desviación típica de 6,6, n= 100) que presentaron durante una sesión en la tarea de shuttle-box (50 ensayos). Se dividieron las ratas seleccionadas en tres grupos: 1. *Extremo inferior (Grupo de Alta ansiedad)*: se escogieron al azar 4 ratas con una desviación típica por debajo de la media en el número de evitaciones, es decir que hubieran hecho 0 evitaciones durante la tarea de “Shuttle-box”. 2. *Grupo intermedio (Grupo de moderada ansiedad)*: se seleccionaron 3 ratas en función de sus valores en el número de evitaciones (durante la tarea de “Shuttle-box”) que fueran inmediatamente superior, inferior e igual a la media (es decir entre 4 y 6 evitaciones). Y 3. *Extremos inferior (Grupo de Baja ansiedad)*: se escogieron al azar 7 ratas que presentaran más de una desviación típica por encima de la media en el número de evitaciones (es decir, igual o mayor a 12 evitaciones).

Se empleó la guillotina como método de sacrificio, no utilizando ningún eutanásico químico para evitar cualquier daño en las estructuras diseccionadas. Una vez se sacrificó cada rata, se procedió a la extracción del cerebro entero y refrigeración durante cinco minutos en el congelador (-18 °C), a partir del cual se procedió a la disección de las siguientes estructuras: hipocampo, amígdala, núcleo accumbens, córtex prefrontal, córtex prefrontal medial (córtex prelímbico) y córtex cingulado. Las muestras se guardaron en tubos de 2.0 ml. (*Eppendorf, Hamburg, Germany*), en el congelador de -80 °C (en cajas de 9x9 ordenadas por estructura).

Procedimientos utilizados en el análisis de microarray y en qRT-PCR: muestras amígdalares e hipocampales (procedimiento realizado y descrito por el Dr. J.A. Conejero)

El total de ARN fue extraído empleando el método “TRIzol” según el protocolo recomendado por el fabricante (*Life Technologies, Inc., Gaithersburg, MD*). En resumen, se homogeneizaron las biopsias (1 ml reactivo TRIzol/75mg tejido), fueron incubadas en una habitación durante 5 min (0.2 volumen of TRIzol) y se les añadió cloroformo durante 2,5 minutos. Posteriormente las muestras fueron centrifugadas durante 15 min a 12,000 g (4°C). La fase acuosa fue precipitada con un volumen de 2-propanol, mantenida en hielo durante 5 min y disuelta en agua tratada con dietilpirocarbonato (DEPC). La integridad de las muestra de ARN (procedimiento de control de calidad del ARN) fue realizada a partir del empleo de bioanalyzer 2100 (*Agilent technologies, Madrid, Spain*), ejecutando una parte alícuota de las muestras de ARN en 6000 Nano LabChip (*Agilent technologies, Madrid, Spain*; RIN: número de la integridad del ARN para la asignación de los valores de integridad en las mediciones de ARN, Schroeder y cols., 2006).

Todas las muestras fueron hibridadas en el “*Whole Rat Genome Oligo Microarray*” (“*Agilent technologies*”, *Madrid, Spain*) que abarca más de 44.000 sondas del ADN humano. Los protocolos de la preparación e hibridación de las muestras fueron adaptados por el manual técnico de “*Agilent*”.

En primer lugar, el cADN se transcribe a partir de 1mg de ARN total utilizando el “T7-Oligo (dT) Promotor Primer”. Las muestras fueron transcritas “*in vitro*” y etiquetadas Cy-3 (todo con el kit de Quick-AMP (“*Agilent technologies*”, *Madrid, Spain*)). El cARN sintetizado típicamente produce entre 10 y 15 µg. Tras un mayor saneamiento de las muestras (QIAGEN, Barcelona, Spain), el cARN fue fragmentado en varias partes que fueron de 35 a 200 bases, las cuáles fueron utilizadas por *Agilent 2100 Bioanalyzer technology*. Las muestras fragmentadas de cARN (1.65 µg) fueron hibridadas a partir de chips con 17 h de incubación a 65°C de rotación constante, con lo que los microarrays se lavaron en dos etapas de 1 min en dos “buffers” de lavado (“*Agilent technologies*”, *Madrid, Spain*).

Los microarrays hibridados fueron escaneados en el escáner “Axon 4100A” (“Molecular Devices”, Sunnyvale, CA, USA) y los datos fueron extraídos a través del software “GenePix Pro 6.0” (“Molecular Devices”, Sunnyvale, CA, USA).

Se realizó la transcripción inversa del total de ARN (0.5 µg) a partir del kit “Advantage RT-for-PCR kit” (“Clontech”, Palo Alto, CA, USA). Cada muestra se diluyó hasta un volumen final de 12.5 ml en agua tratada con DEPC, y se añadió 1 µl oligo (18-dT), calentado a 70°C durante 2 min, y se mantuvo en hielo hasta 6,5 µl mastermix–4 µl 5X reaction buffer1, µl dNTP mix of 10 mmol each, 0.5 µl recombinant RNase Inhibitor, y se añadió la transcripción inversa de 1 µl MMLV (*Moloney-Murine Leukaemia Virus*). La reacción fue incubada a 42°C durante 1h, y calentada a 94°C durante 5 min para detener la síntesis de cADN y destruir la actividad de ADNasa. Los productos fueron diluidos hasta llegar a un volumen de 50 µl en agua tratada con DEPC.

Para verificar los resultados obtenidos del microarray de cADN, se realizó la validación de los genes seleccionados a partir de la aplicación de la técnica qRT-PCR (se empleó el gen beta-actina -ACTB- como control). El nivel de expresión relativo de cada gen en relación al total de ARN fue determinado por la técnica qRT-PCR, empleando pares de secuencias de primers (“forward” y “reverse”) para cada gen (5’–3’).

La técnica “Real-time qPCR” se llevó a cabo empleando el kit de “LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I kit” (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) según las instrucciones del fabricante en la plataforma “Roche LightCycler” (Roche, Göttingen, Germany). Se empleó el cADN para cada muestra analizada. Se incluyó una curva de calibración en cada experimento (cuatro diluciones en serie).

Los productos finales fueron analizados empleando el software subministrado (“Roche Molecular bioquímicos LightCycler Software v3.5”) y los datos se presentan como la relación entre las expresiones del gen vs. el gen beta-actina de la rata. Las curvas de fusión fueron analizadas para confirmar la especificidad de la amplificación.

Análisis estadísticos de los resultados genéticos de las muestras amigdalares y de hipocampo

Para realizar el análisis estadístico de los resultados de microarray, se emplearon los siguientes paquetes informáticos:

1. Pre-procesado y estandarización de los datos:
 - “*Babelomics 4.2*” (<http://babelomics.bioinfo.cipf.es/>).
 - “*The R project for statistical computing*” (R, <http://www.r-project.org/>), con paquetes de Bioconductor (<http://www.bioconductor.org/packages/release/bioc/>).
2. Análisis exploratorio de los datos (análisis de clusters y de componentes principales) a partir del empleo del programa “*TmV Microarray Software*” (<http://www.tm4.org/>).
3. Análisis funcional-ontogenéticos de los genes significativos (FDR <0.05): se realizó a partir de las tablas funcionales extraídas de las siguientes bases de datos:
 - “*Functional Annotation Bioinformatics Microarray Analysis*” (DAVID, <http://david.abcc.ncifcrf.gov/>).
 - “*Ingenuity Pathways Analysis platform*” (IPA, <http://www.ingenuity.com/>).
 - “*Ensemble Genome Browser*” (<http://www.ensembl.org/>).
 - “*Rat Genome Database*” (RGD, <http://rgd.mcw.edu/>).

A partir de la obtención de los listados de genes estadísticamente significativos (fold-change >|2|, FDR (“*false discovery rate*”) < 0.05) y con funciones relacionadas con el Sistema Nervioso Central, se procedió a la comparación de las listas de genes entre estructuras (amígdala versus hipocampo), y con respecto a otros trabajos publicados recientemente en los que aplicaran análisis de microarray en estas estructuras.

A partir de los resultados obtenidos en el análisis exploratorio (análisis de clústeres y de componentes principales en las muestras de amígdala e hipocampo), se analizaron de forma conjunta los datos genéticos de los grupos de alta y moderada ansiedad (el grupo de “Alta ansiedad”, Figura 11).

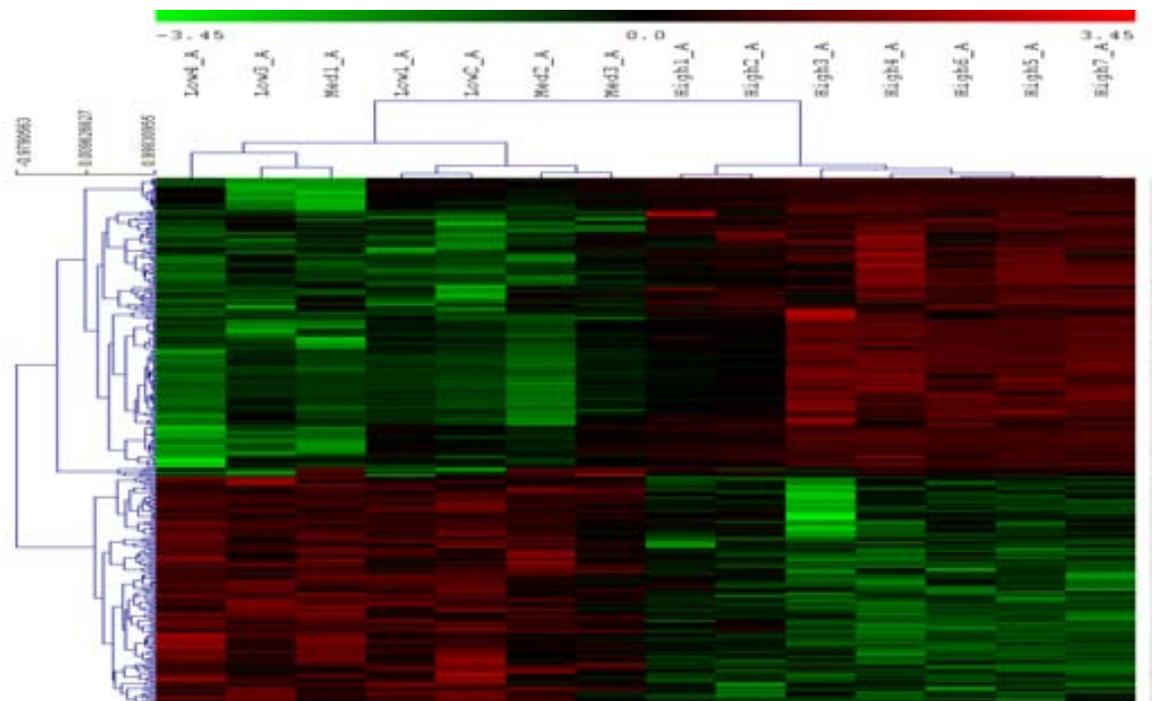


Figura 11_ Análisis de clusters de la expresión diferencial de genes en muestras de amígdala. Low: grupo de alta ansiedad, Med: grupo de moderada ansiedad, High: grupo de baja ansiedad.

En el caso de las muestras de hipocampo, el análisis exploratorio desveló un conjunto de genes con niveles de expresión significativamente diferentes entre los grupos de ratas de “Alta vs. Baja” ansiedad y entre “Baja+moderada vs. Alta” ansiedad, aunque debido a su falta de sentido biológico/conductual se descartó un posterior análisis genético.

4. RESULTADOS

4.1 PARTE I: Perfiles conductuales ansioso-depresivos y neuroendocrinos

4.1.1 Caracterización conductual y hormonal de la ratas N/Nih-HS (Estudio 1)

Se comparó el perfil conductual de las tres cepas/stocks de ratas en pruebas de ansiedad incondicionada (Laberinto Circular Elevado), comportamiento exploratorio en la prueba de la “Caja nueva” y la adquisición de la tarea de evitación activa en dos sentidos (en la “*Shuttle-box*”). En un experimento paralelo, las tres cepas de ratas fueron evaluadas respecto a su comportamiento de tipo “depresivo” o pasivo en el Test de Natación Forzada.

Las ratas N/Nih-HS presentaron un perfil de comportamiento más similar al de las ratas RLA-I que al de las RHA-I. En la Tabla 7 se muestran los resultados del análisis realizado a partir de la aplicación del ANOVA (con pruebas Duncan post hoc y pruebas t de Student para comprobar hipótesis dirigidas). La prueba de Levene para la homogeneidad de varianzas mostró que no había diferencias significativas entre las varianzas de los tres grupos experimentales en las variables conductuales de los dos experimentos.

El análisis de la varianza mostró diferencias significativas en:

(1) La latencia de primera entrada en las secciones abiertas del laberinto (“Latency to open”) y en el número de SAP ($F_s(2, 63) > 4,6$, con $p < 0,05$) en la prueba del Laberinto Circular Elevado.

(2) En las medidas de actividad exploratoria durante la prueba de la “Caja nueva” (distancia horizontal y número de “*rearings*”, con $F_s(2, 63) > 6,1$, $p < 0,05$).

Y, (3) en variables representativas de la prueba de evitación activa en dos sentidos ($F_s(2, 63) \geq 12,1$, $p < 0,001$).

Entre las cepas *Roman* se obtuvieron diferencias en las variables del Laberinto Circular Elevado. Por ejemplo, las ratas RLA-I presentaron latencias más prolongadas de primera entrada (en secciones abiertas del laberinto circular) y menor número total de entradas en las secciones abiertas, en comparación con las ratas RHA-I (todas las $t_s(19) = 2,1$, $p = 0,05$). En relación al resto de variables, las pruebas Duncan mostraron diferencias

significativas entre ambas cepas en variables relacionadas con la ansiedad incondicionada y condicionada. Por ejemplo, respecto a las RHA-I, las ratas RLA-I presentaron menor actividad exploratoria vertical (“*rearings*”, en la “Caja nueva”), así como menor número de cruces entre compartimentos, menor número de evitaciones y mayor tiempo de miedo condicionado (“*freezing*”) en la tarea de evitación activa en dos sentidos (Tabla 7).

En relación a las ratas N/Nih-HS, en la Tabla 7 se puede observar que muestran un perfil conductual cercano al observado en las ratas RLA-I, tanto en el comportamiento observado en las pruebas de ansiedad incondicionada (Laberinto Circular Elevado y la prueba de la “Caja nueva”) como en las diversas medidas de la tarea de evitación activa en la “*Shuttle-box*”.

Tabla 7.-Comparación de las respuestas conductuales entre las ratas de las cepas Romanas y las ratas del stock N/Nih-HS.

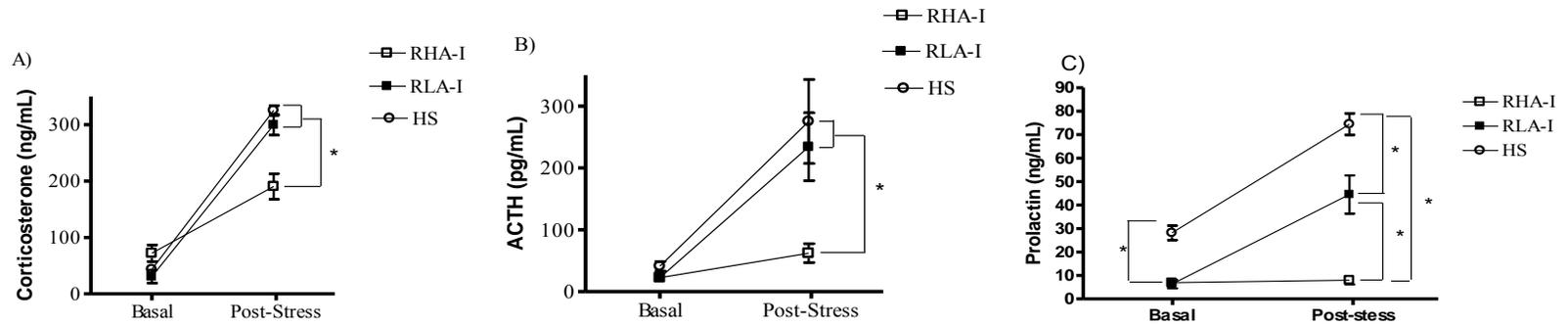
Paradigmas comportamentales		RHA-I	RLA-I	N/Nih-HS
Laberinto Circular Elevado	Latency to open (s)	63,9 ± 34,1	169,9 ± 36,1 (a, b)	93,8 ± 17,9
	Time (s)	44,4 ± 13,4	33,5 ± 11,9	41,2 ± 7,1
	Entries (n)	4,2 ± 1,2	1,7 ± 0,6 (a)	2,8 ± 0,4
	SAP* (n)	11,4 ± 1,5	11,5 ± 3,0	6,8 ± 0,5
Caja nueva	Distance (cm)	3824,9 ± 380,1	4161,8 ± 215,6	2741,3 ± 236,4 (c)
	Rearings (n)	103,4 ± 28,8	52,6 ± 4,7 (b)	64,9 ± 7,8
Shuttle-box	CET (n)	10,9 ± 1,1	5,3 ± 0,8 (b)	4,3 ± 0,4 (b)
	Freezing (s)	28,2 ± 10,2	169,0 ± 12,9 (b)	221,6 ± 5,8 (b, c)
	ITC (n)	71,8 ± 11,8	24,9 ± 4,4 (b)	22,0 ± 2,4 (b)
	Response latency (s)	6,1 ± 0,7	14,1 ± 1,0 (b)	12,4 ± 0,4 (b)
	SH Avoidances (n)	38,9 ± 2,8	3,2 ± 1,2 (b)	3,6 ± 0,7 (b)

Leyenda Tabla 7: Medias ± ES de las medidas conductuales de los tres grupos. RHA-I, n = 8; RLA-I, n = 13 y N/Nih-HS, n = 45. Latency to open: Latencia de la primera entrada en los espacios abiertos (s). Time: Tiempo total en los espacios abiertos (s). Entries: número total de entradas en las secciones abiertas (n). SAP: Número de "stretched attend postures" (postura de aproximación al sector abierto: asomar la mayoría del cuerpo hasta las patas traseras, en el espacio abierto). Distance: distancia horizontal recorrida (cm) durante 20 minutos del test de actividad en situación de novedad automatizada. Rearings: número total de actividad exploratoria vertical durante 20 minutos. CET: número total de cambios entre compartimentos durante el tiempo de habituación (4 minutos). Freezing: tiempo total de conducta de petrificación (s) durante cinco minutos. ITC: número total de cruces de compartimento entre ensayos (n). Response latency: media de la latencia de respuesta (s) durante los 50 ensayos de la prueba de Shuttle-box. SH Avoidances: número de evitaciones durante la sesión de 50 ensayos en la prueba de shuttle-box (n). (a), p<0,05 vs. el grupo de ratas RHA-I (test de t-Student para grupos independientes, (b), p< 0,05 vs. el grupo de ratas RHA-I (test de Duncan aplicado post hoc al ANOVA de un factor significativo); (c), p<0,05 vs. el grupo de ratas RLA-I (test de Duncan aplicado post hoc al ANOVA de un factor significativo); () ANOVA de un factor significativo sin test de Duncan post hoc no significativos.*

En relación a los resultados hormonales, las ratas N/Nih-HS presentaron un perfil de respuesta hormonal post-estrés similar al obtenido por las ratas RLA-I (Figura 12). A partir de la aplicación del ANOVA de medidas repetidas sobre los resultados hormonales (corticosterona, prolactina y ACTH) se obtuvieron diferencias significativas en relación al factor “Tiempo” (pre- y post- exposición al estresor, $F_s \geq 18,5$ con $p \leq 0,01$) y al factor “Cepa” ($F_s \geq 4,5$ con $p \leq 0,03$). El efecto de interacción entre “Tiempo x Cepa” fue significativo en las medidas de corticosterona y prolactina ($F_s \geq 5,9$ con $p \leq 0,004$, $gl = 63$ para corticosterona y $gl = 14$ para ACTH).

Los resultados de las pruebas Duncan mostraron que las ratas RLA-I manifestaron mayor respuesta hormonal post-estrés (en los niveles de prolactina, ACTH y corticosterona) que las ratas RHA-I (Figura 12). Las respuestas post-estrés de ACTH y corticosterona en las ratas N/Nih-HS fueron similares a las observadas en la cepa RLA-I. Fueron sobretodo relevantes los resultados obtenidos en prolactina post-estrés, en los que las ratas N/Nih-HS presentaron niveles significativamente superiores a los de las ratas RLA-I ($F(2, 63) = 143$, $p < 0,01$, ver pruebas Duncan en Figura 12).

Figura 12.-Comparaciones descriptivas: valores hormonales pre- y post-estrés, en las tres cepas de ratas.



*Figura 12_ se muestran los valores basales y post-stress (medias \pm ES) de Corticosterona (A), ACTH (B) y Prolactina (C), en los tres grupos de ratas (la muestra de ratas seleccionada fue de: $n= 8$ RHA-I, $n= 13$ RLA-I y $n= 49$ N/Nih-HS). $*p<0,05$ entre los grupos indicados (test de Duncan post hoc) en la aplicación del MANOVA (efectos de “tiempo x cepa” y “cepa”).*

Se realizó una matriz de correlaciones (Tabla 8) con las variables del grupo de ratas N/Nih-HS, en la que se obtuvieron los siguientes resultados:

(1) Correlaciones entre moderadas y altas entre las variables de la prueba del Laberinto Circular Elevado ($r = -0,48 - 0,91$).

(2) Correlaciones leves pero conceptualmente importantes entre medidas de la prueba de evitación activa en la “*Shuttle-box*”, incluyendo el miedo condicionado (“*freezing*”, $r = -0,41 - 0,13$).

(3) Correlaciones moderadas entre variables relacionadas con la ansiedad condicionada e incondicionada (p. ej. el número de cruces entre ensayos –ITC- en la tarea de evitación con el número de entradas en secciones abiertas, $r = 0,41$; los ITC con el tiempo en las secciones abiertas del test del Laberinto Circular Elevado, $r = 0,48$).

Y, (4) correlaciones leves entre los niveles plasmáticos de prolactina basal vs. el miedo condicionado ($r = 0,30$) y entre los niveles de prolactina post-estrés vs. el número de “*rearings*” ($r = -0,30$).

Tabla 8.- Matriz de correlaciones entre las principales variables conductuales y hormonales en las ratas N/NIH-HS.

	Latency to open	Entries	Time	SAP	CET	Freezing	ITC	Response latency	SH Avoidance	Distance	Rearings	BAS-C	POST-C	BAS-PR	POST-PR
Latency to open	1														
Entries	-,57***	1													
Time	-,54***	,91***	1												
SAP	-,48***	,71***	,61***	1											
CET	-,31*	,17	,31*	,18	1										
Freezing	-,04	-,14	-,28	,04	-,23	1									
ITC	-,21	,41**	,48***	,13	,27	-,49***	1								
Response latency	,12	-,04	-,13	,00	-,43**	,31*	-,35*	1							
SH Avoidance	-,12	-,01	-,08	-,16	,04	-,12	,19	-,22	1						
Distance	,04	,08	,06	-,05	-,01	,04	,11	,21	-,18	1					
Rearings	,20	,01	,04	-,17	-,16	-,17	,17	,04	-,01	-,29	1				
BAS-C	,04	-,07	-,15	-,05	-,23	,03	-,10	,06	,16	-,17	,19	1			
POST-C	,27	-,11	-,07	-,22	-,21	-,10	-,03	,00	,06	,19	-,12	,23	1		
BAS-PR	,04	-,10	-,22	-,07	-,05	,30*	-,16	-,17	,26	-,10	,12	,27	,09	1	
POST-PR	-,10	,10	,08	,27	-,04	-,15	-,04	-,12	,18	,07	-,30*	-,07	,19	,08	1

Leyenda Tabla 8: Correlaciones $\geq 0,25$ se muestran en **negrita**. Ver Tabla 7 para descripción de las variables conductuales. **BAS-C:** valores basales de corticosterona. **POST-C:** valores post-estrés de corticosterona. **BAS-PR:** valores basales de prolactina. **POST-PR:** valores post-estrés de prolactina. * $p \leq 0,05$ Coeficiente de correlación de Pearson. ** $p \leq 0,01$ Coeficiente de correlación de Pearson. *** $p \leq 0,001$ Coeficiente de correlación de Pearson; $n = 45$.

A partir de los resultados obtenidos por la matriz de correlaciones (Tabla 8) se aplicó un análisis factorial (rotación oblicua, “*direct oblimin*”; Tabla 9), incluyendo las medidas hormonales basales y post-estrés de corticosterona y prolactina (las medidas de ACTH fueron excluidas por el tamaño reducido de la muestra). Se incluyó el tiempo de latencia como variable de “bondad de ejecución” (“*performance*”) o adquisición de la prueba de evitación activa en la “*Shuttle-box*”, y se excluyó el número de evitaciones debido a que las ratas N/Nih-HS muestran de forma característica un número muy bajo de tales respuestas. En primer lugar se obtuvo una estructura factorial de cinco factores, que posteriormente se redujo a dos factores a partir de la aplicación del test de sedimentación de Cattell. Este segundo análisis factorial mostró:

(1) Por un lado un primer factor (llamado tentativamente *-Timidez/conflicto-*) con asociaciones entre las variables hormonales y conductuales, con pesos factoriales elevados (-0,69 – 0,88) de variables del Laberinto Circular Elevado, y saturaciones entre bajas y moderadas del “miedo condicionado” (“*freezing*”, -0,32), de la “Latencia de respuesta” en la tarea de la “*Shuttle-box*” (-0,28) y las variables hormonales (saturaciones entre -0,25 y -0,30).

Y, (2) un segundo factor (llamado tentativamente *-Miedo condicionado-*) que principalmente agrupó variables relacionadas con el miedo condicionado y con la adquisición de la tarea de evitación activa en dos sentidos (-0,54 – 0,69), junto con variables relacionadas con la conducta exploratoria en la “Caja nueva” y los niveles plasmáticos de prolactina post-estrés (-0,58 - 0,43; Tabla 9).

Tabla 9.-Análisis factorial de la muestra de ratas N/Nih-HS (solución de cinco y dos factores).

A) Primer análisis factorial (rotación oblicua)					
	Factor 1	Factor 2	Factor 3	Factor 4	Factor 5
<u>Laberinto Circular Elevado</u>					
Latency to open	-0,75	-	-	0,27	-
Entries	0,92	-0,27	-	-	-
Time	0,87	-0,44	-	-	-
SAP	0,84	-	-	-	-
<u>Prueba de Shuttlebox</u>					
CET	0,26	-	-	-0,62	-0,38
Freezing	-	0,83	-	-	-
ITC	0,37	-0,77	-	-0,25	-
Response latency	-	0,28	-	0,84	-
<u>Test de actividad de novedad automatizada</u>					
Distance	-	-	-0,62	0,30	0,33
Rearings	-	-0,31	0,74	-	-
<u>Valores hormonales</u>					
BAS-C	-	-	0,65	-	0,39
POST-C	-0,26	-	-	-	0,75
BAS-PR	-	0,44	0,41	-0,44	0,47
POST-PR	0,25	-	-0,43	-	0,52
<hr/>					
Eigenvalues	3,56	1,91	1,61	1,45	1,41
Varianza explicada: 71%					
<u>B) Segundo análisis factorial (rotación oblicua): solución de dos factores.</u>					
	Factor 1	Factor 2			
Nombres sugeridos	“Timidez/conflicto”	“Miedo condicionado”			
<u>Laberinto Circular Elevado</u>					
Latency to open	-0,69	-			
Entries	0,86	-			
Time	0,88	-			
SAP	0,72	0,38			
<u>Prueba de shuttle-box</u>					
CET	0,47	-0,28			
Freezing	-0,32	0,69			
ITC	0,59	-0,54			
Response latency	-0,28	0,47			
<u>Test de actividad de novedad automatizada</u>					
Distance	-	0,31			
Rearings	-	-0,58			
<u>Valores hormonales</u>					
BAS-C	-0,30	-			
POST-C	-0,29	-			
BAS-PR	-0,25	-			
POST-PR	-	0,43			
<hr/>					
Varianza explicada: 39%					
Correlación entre factores = -0,014					

Legenda Tabla 9: pesos mostrados $\geq 0,25$. A) Solución de cinco factores (oblimin directo) con 14 variables seleccionadas (factores con eigenvalues mayores que 1). B) Solución de dos factores y correlación entre factores (factores independientes); $n = 45$. Para definición de variables conductuales ver Tabla 7 y Tabla 8 para ver la definición de las variables hormonales.

Por último, en un experimento paralelo, las ratas N/Nih-HS mostraron un perfil de comportamiento de tipo depresivo durante las sesiones del Test de Natación Forzada. En la Tabla 10 se muestran los perfiles conductuales de las tres cepas/stocks de ratas y las comparaciones entre ellas, durante las dos sesiones del test (todas las $F_s \geq 6,19$ con $p \leq 0,008$; $gl = 37$).

Durante la primera sesión del test, las ratas N/Nih-HS y RLA-I presentaron mayor tiempo de inmovilidad y menor tiempo de natación activa dirigida a escapar (también llamada conducta de “lucha” o “escape”; o “*struggling*”; ANOVAs de las dos variables respectivamente; $F = 6,19$ con $p < 0,008$, y $F = 5,7$ con $p < 0,01$; $gl = 37$) en comparación a las ratas RHA-I. Además, las ratas N/Nih-HS mostraron tiempos más prolongados de inmovilidad y más cortos de natación activa que ambas cepas *Roman* ($p < 0,05$, pruebas Duncan post hoc; Tabla 10). En la segunda sesión, las ratas RLA-I y N/Nih-HS mostraron tiempos de inmovilidad más prolongados y tiempos de natación activa más cortos que las ratas RHA-I ($F = 10,9$ con $p < 0,001$, y $F = 26,7$ con $p < 0,001$; $gl = 37$, respectivamente; ver pruebas Duncan; Tabla 10).

Tabla 10.-Inmovilidad y nado forzado de los tres grupos de ratas durante las sesiones del Test de Natación Forzada.

	RHA-I	RLA-I	N/Nih-HS
Inmovilidad 15'	408,2 ± 69,6	413,0 ± 74,9	659,2 ± 48,5 *
Struggling 15'	134,4 ± 34,6	120,8 ± 22,13	47,4 ± 12,8 *
Inmovilidad5'	46,2 ± 11,7	115,9 ± 28,1 **	169,8 ± 15,5 **
Struggling 5'	157,8 ± 17,0	78,8 ± 18,4 **	33,5 ± 6,2 *

*En la tabla 10 se muestran las medias ± ES. Grupos: RHA-I (n = 10), RLA-I (n = 10) y N/Nih-HS (n = 20). *p<0,05 vs. ambos grupos de ratas RHA-I y RLA-I, ** p<0,05 vs. el grupo de ratas RHA-I (ANOVA de un factor). “Inmovilidad15” y “Struggling15”: medidas (s) de inmovilidad y struggling durante la primera sesión del Test de Natación Forzada (15 minutos). “Inmovilidad5” y “Struggling5”: medidas (s) de inmovilidad y “struggling” durante la segunda sesión del Test de Natación Forzada (5 minutos).*

4.1.2 Caracterización de las ratas N/Nih-HS en el test de Campo abierto (Estudio 2)

En la Tabla 11 se muestran los resultados de las tres cepas durante el test de Campo Abierto y el Laberinto Circular Elevado. El análisis de la varianza mostró diferencias significativas en:

(1) Tiempo total de “*grooming*” ($F_s(2, 111) = 7,71$ con $p < 0,001$), pues las ratas RLA-I y N/Nih-HS realizaron dicha conducta entre cuatro y cinco veces más que las RHA-I (Tabla 11);

(2) El número de SAP, en el que las ratas N/Nih-HS realizaron menos conducta de evaluación del riesgo (SAP) que ambos grupos de ratas *Roman*, tanto en el test de Campo Abierto ($F(2, 111) = 16,86$ con $p < 0,000$) como en el Laberinto Circular Elevado ($F(2, 111) = 11,83$ con $p = 0,000$, Tabla 11);

(3) El número de cruces entre las secciones del test ($F(2, 111) = 3,01$ con $p < 0,053$), en el que las ratas RLA-I se diferenciaron de las ratas N/Nih-HS y RHA-I (Tabla 11);

y, (4) el número de “*head-dips*” durante la prueba del Laberinto Circular Elevado, en el que se diferenciaron las ratas RHA-I con respecto a las ratas RLA-I y N/Nih-HS, pues estos dos grupos realizaron menor conducta de exploración o “*head dips*” ($F(2, 111) = 6,58$ con $p < 0,002$, Tabla 11).

Tabla 11.-Análisis comparativo de las respuestas conductuales entre las ratas Romanas y la cepa de ratas N/Nih-HS durante el test de Campo Abierto y el Laberinto Circular Elevado.

Paradigmas conductuales		N/Nih-HS (n = 90)	RHA-I (n = 12)	RLA-I (n = 12)
Laberinto Circular Elevado	Latency to open (s.)	104,62 ± 13,20	102,9 ± 37,8	144,8 ± 30,5
	SAP-ZM (#)	6,03 ± 0,37 (a)	10,2 ± 1,1	9,6 ± 0,7
	Entries (#)	2,79 ± 0,36	3,5 ± 0,7	2,5 ± 0,6
	Time (s.)	35,62 ± 4,61	53,3 ± 11,2	48,4 ± 15,7
	Head-dips (#)	3,37 ± 0,43	8,0 ± 1,3 (b)	4,3 ± 1,3
Test de Campo Abierto	Freezing (s)	14,93 ± 2,86	1,5 ± 0,9	1,2 ± 0,4
	Grooming (s.)	61,88 ± 4,98	11,3 ± 2,4 (b)	47,9 ± 5,9
	SAP-OF (#)	3,23 ± 0,29 (a)	8,0 ± 1,4	6,0 ± 0,7
	Rearings (#)	11,45 ± 2,13	14,3 ± 1,9	11,8 ± 0,7
	Crossings (#)	36,16 ± 2,30	38,8 ± 6,7	20,8 ± 2,9 (c)

Leyenda Tabla 11: para definición de variables del Laberinto Circular Elevado ver Tabla 8. Freezing: tiempo total de petrificación durante el registro de cinco minutos en el test del Campo Abierto (s). Grooming (s.): tiempo total que realizan la conducta de acicalamiento durante el test del Campo Abierto (s). SAP-OF: número de “stretched attend postures” durante la realización del test del Campo Abierto (#). Rearings: número total de actividad vertical durante el registro de cinco minutos en el test del Campo Abierto. Crossings (#): número total del cruce entre las secciones de la plataforma del test del Campo Abierto. (a) $p < 0,05$ ANOVA de un factor significativo con pruebas Duncan post hoc, (b) $p < 0,05$ vs. las ratas RLA-I y N/Nih-HS (ANOVA de un factor significativo con pruebas Duncan post hoc), (c) $p < 0,05$ vs. las ratas RHA-I y N/Nih-HS (ANOVA de un factor significativo con pruebas Duncan post hoc).

La matriz de correlaciones, realizada a partir de los resultados conductuales de las ratas N/Nih-HS, mostró (Tabla 12):

(1) Correlaciones predominantemente bajas entre las variables del test de Campo Abierto ($r = -0,46 - 0,21$), y de moderadas a altas entre las variables del Laberinto Circular Elevado ($r = -0,39 - 0,91$);

(2) Correlaciones moderadas entre “head-dips” y la conducta de “grooming” y “rearings” ($r = 0,22 - 0,41$);

y, (3) correlaciones leves pero significativas entre el número de entradas en las secciones abiertas y el tiempo total en las secciones abiertas del Laberinto Circular Elevado vs. el número de “rearings” y cruces entre secciones del test del Campo Abierto ($r = 0,23 - 0,26$).

Tabla 12.-Matriz de correlaciones entre las variables más representativas en el análisis conductual de las ratas N/NiH-HS rats.

	Freezing	Grooming	SAP-OF	Rearings	Crossings	Latency to open	SAP-ZM	Entries	Time	Head-dips
Freezing (s.)	1									
Grooming (s.)	-,25*	1								
SAP-OF (#)	-,09	-,26*	1							
Rearings (#)	-,19	,21*	-,22*	1						
Crossings (#)	-,46**	-,05	-,22*	,23*	1					
Latency to open (s.)	,06	,02	,04	-,09	-,07	1				
SAP-ZM (#)	,03	,13	,09	,01	-,14	-,19	1			
Entries (#)	-,18	,14	-,08	,23*	,25*	-,55**	,44**	1		
Time (s.)	-,17	,10	-,01	,26*	,16	-,55**	,48**	,91**	1	
Head-dips (#)	-,09	,22*	,00	,41**	,05	-,39**	,58**	,74**	,80**	1

*Leyenda Tabla 12: ver Tabla 7 para definición de variables del Laberinto Circular Elevado y Tabla 11 para la definición de las variables del test de Campo Abierto. * $p \leq 0,05$ Coeficiente de correlación de Pearson. ** $p \leq 0,001$ Coeficiente de correlación de Pearson; $n = 90$.*

Se aplicó el análisis factorial (rotación oblicua, oblimin directo) sobre las variables seleccionadas del Laberinto Circular Elevado y del test de Campo Abierto (Tabla 13). Con el objetivo de obtener el número mínimo y representativo de factores, en primer lugar se obtuvo una estructura de cinco factores que fue reducida a una solución de dos factores a partir de la aplicación del Test de sedimentación de Catell (ver “*Eigenvalues*”, Tabla 13).

Esta solución factorial (Oblimin directo) mostró dos factores independientes (correlación entre factores de -0,074). El primer factor agrupó las variables relacionadas con respuestas de ansiedad incondicionada, a través de los pesos factoriales obtenidos en variables seleccionadas del Laberinto Circular Elevado (pesos entre -0,59 y 0,92; se ha denominado tentativamente factor de “Inhibición conductual”; ver estudios previos de Aguilar y cols., 2002, López-Aumatell y cols., 2008; 2009b; Vicens-Costa y cols., 2011).

El segundo factor parecería representar el cambio comportamental de las ratas cuando inician el comportamiento de exploración y dejan de estar “petrificadas” (“*freezing*”), indicado por los pesos factoriales de las variables seleccionadas del test de Campo Abierto (pesos entre -0,25 a -0,74 del número de SAP-OF, del miedo o “*freezing*”, del número de “*rearings*” y número de cruces entre las secciones del test). Con pesos factoriales bajos también se agrupan en este factor variables representativas del Laberinto Circular Elevado, como son el número de entradas y el tiempo total en las secciones abiertas (pesos entre -0,25 a -0,32). A este factor se le ha dado el nombre provisional de “Desinhibición”.

RESULTADOS

Tabla 13.-Análisis factorial de las ratas N/NiH-HS (solución de cinco y dos factores).

A) Primer análisis factorial (oblimin directo)	Factor 1	Factor 2	Factor 3	Factor 4	Factor 5
<u>Laberinto Circular Elevado</u>					
Latency to open (s.)	-0,64	-	-	0,30	-
SAP-ZM (#)	0,61	0,27	-0,34	0,36	-
Entries (#)	0,92	-	-	-	-
Time (s.)	0,95	-	-	-	-
Head-dips (#)	0,88	-	-	0,32	-
<u>Test de Campo Abierto y conducta de “Grooming”</u>					
Freezing (s)	-	0,84	-	-0,28	-
Grooming (s.)	-	-	-	0,87	-
Defecations (#)	-	-	-	-	0,89
SAP-OF (#)	-	-	-0,91	-	-
Rearings (#)	0,32	-0,34	0,33	0,30	0,60
Crossings (#)	-	-0,84	0,35	-	-
Eigenvalues	3,55	1,71	1,28	1,07	1,04

Varianza explicada: 78,7%

B) Second obliquely-rotated factor analysis: two-fold solution

	Factor 1	Factor 2
Nombres sugeridos	Inhibición conductual	Desinhibición
<u>Laberinto Circular Elevado</u>		
Latency to open (s.)	-0,59	-
SAP-ZM (#)	0,68	-
Entries (#)	0,89	-0,32
Time (s.)	0,92	-0,25
Head-dips (#)	0,88	-
<u>Test de Campo Abierto y conducta de “Grooming”</u>		
Freezing (s)	-	0,65
Grooming (s.)	-	-0,39
Defecations (#)	-	-
SAP-OF (#)	-	0,47
Rearings (#)	-	-0,62
Crossings (#)	-	-0,74

Varianza explicada: 47,83%

Correlación entre factores = -0,074

Leyenda Tabla 13: se muestran los pesos factoriales $\geq 0,25$. A) Solución de cinco factores oblimin directo, con 11 variables seleccionadas (factores con eigenvalues superiores a 1). B) Solución de dos factores y correlación entre factores (se muestra independencia entre los factores). Ver Tablas 7 y 11 para definición de variables; n = 90.

Por último, se aplicó el test de t-Student para la comparación de los grupos de ratas N/Nih-HS con puntuaciones extremas en “*grooming*” y “*freezing*” en el test de Campo Abierto (Figura 13 y 14), esperándose, a la luz del resultado del análisis factorial anterior (Tabla 13), que las ratas que mostrasen más “*grooming*” mostrarían menor “*freezing*”, y viceversa. Los resultados, efectivamente, indican que:

(1) Las ratas N/Nih-HS seleccionadas por sus puntuaciones extremas en el tiempo de “*grooming*” (Figura 13) mostraron diferencias significativas también en el tiempo de petrificación (“*freezing*”) y en el número de SAP en el test de Campo Abierto ($t_s(88) \geq 1,99$ con $p \leq 0,029$, de una cola).

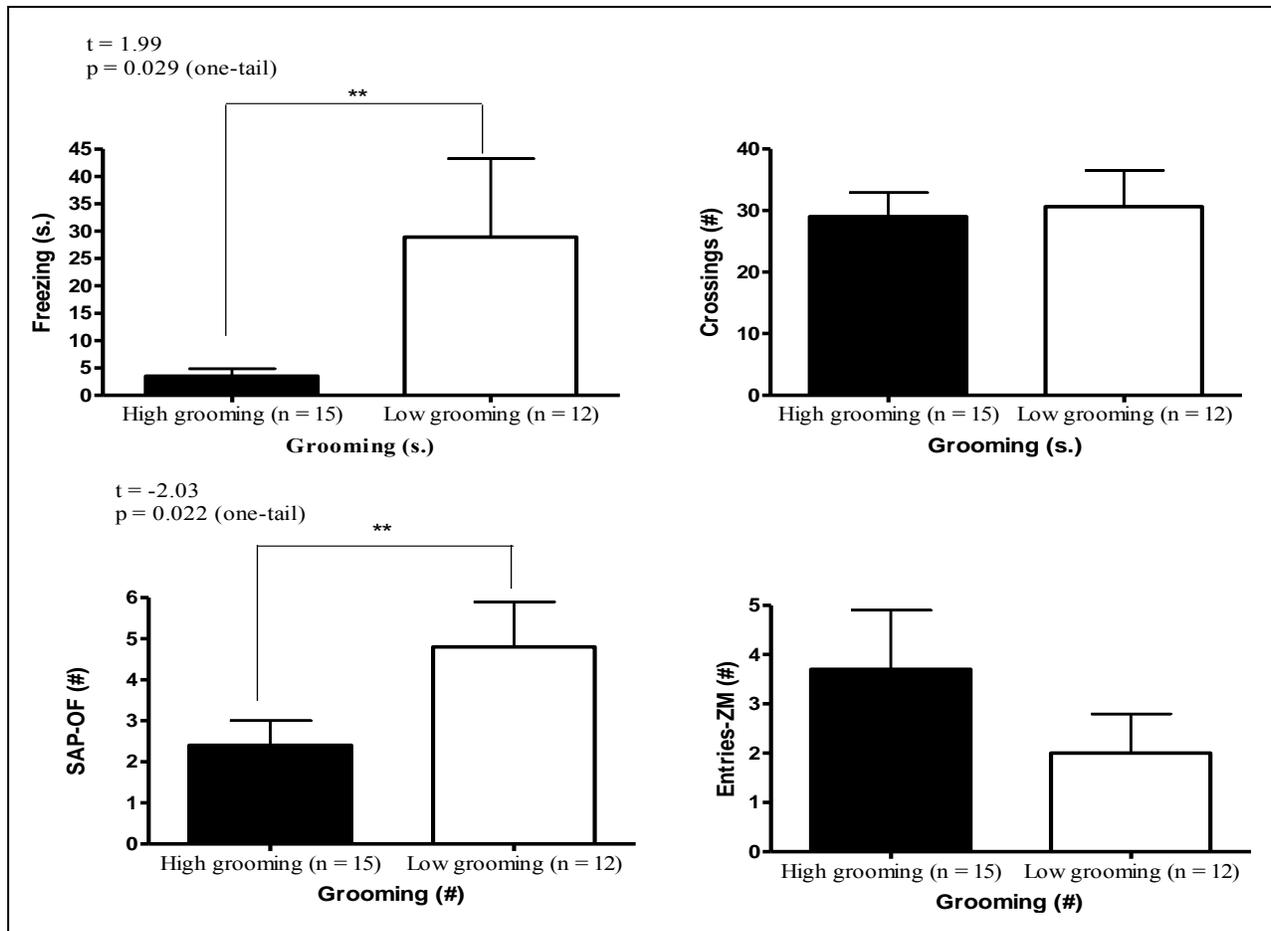


Figura 13.-Selección de ratas N/Nih-HS extremas en variables relevantes del test de Campo Abierto. High grooming: ratas N/Nih-HS que presentaron más tiempo de grooming. Low grooming: ratas N/Nih-HS que presentaron menor tiempo de grooming. Entries ZM: número de entradas en las secciones abiertas del Laberinto Circular Elevado. Freezing: miedo condicionado. Crossings: número de cruces entre las secciones del test del Campo Abierto. **p<0,030 test de t-Student de una cola entre los dos grupos de ratas extremas.

(2) Las ratas N/Nih-HS seleccionadas por sus puntuaciones extremas en el tiempo de conducta de petrificación (“freezing”, Figura 14) mostraron diferencias significativas también en el tiempo de “grooming”, el número de cruces entre las secciones del test, el tiempo total en las secciones abiertas y el número de entradas a las secciones abiertas de la prueba del Laberinto Circular Elevado ($t_{s(88)} > 2,11$ con $p < 0,05$).

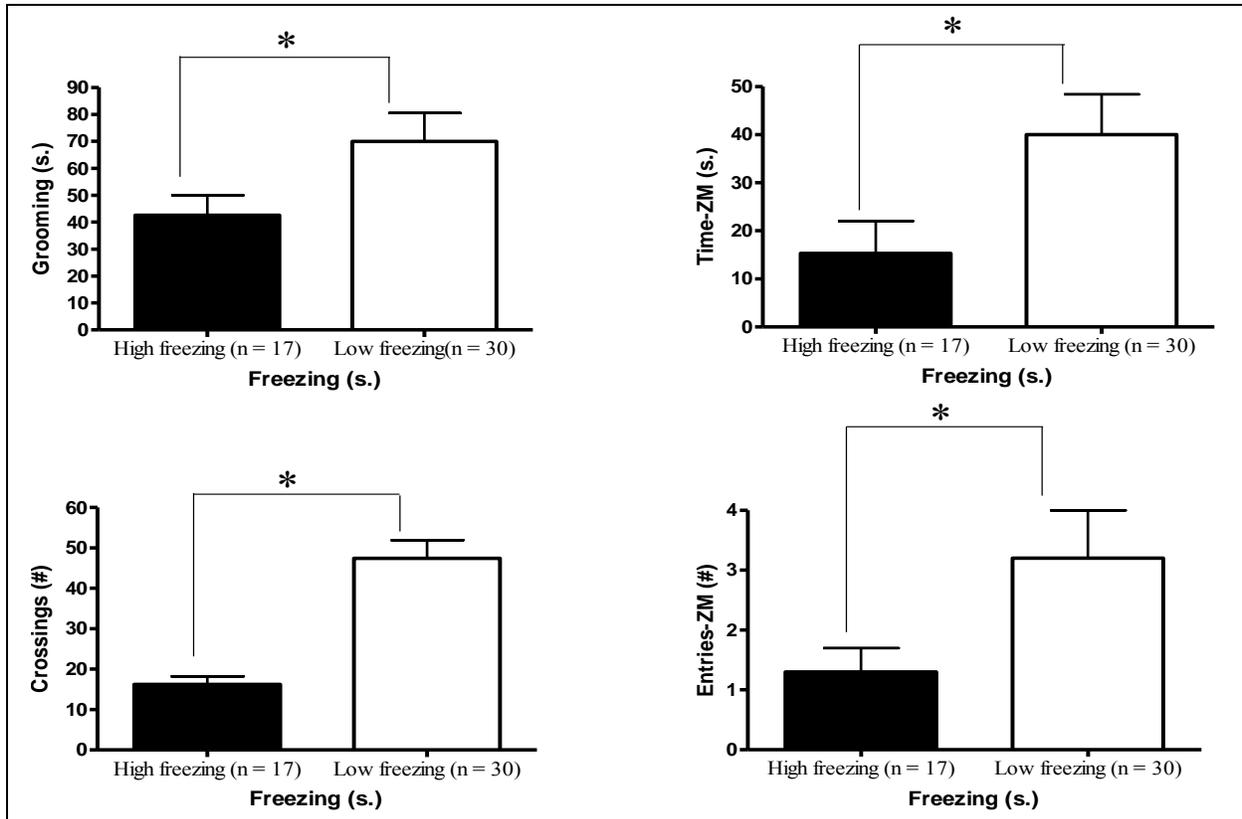


Figura 14.-Selección de ratas N/Nih-HS extremas en variables relevantes del test de Campo Abierto. High freezing: ratas N/Nih-HS que presentaron más tiempo de petrificación. Low freezing: ratas N/Nih-HS que presentaron menor tiempo de petrificación. Entries ZM: número de entradas en las secciones abiertas del Laberinto Circular Elevado. Time ZM: tiempo total en las secciones abiertas durante la prueba del Laberinto Circular Elevado. Crossings: número de cruces entre las secciones del test del Campo Abierto. * $p < 0,05$ test de *t*-Student entre los dos grupos de ratas extremas.

4.1.2.1 Análisis comparativo del comportamiento en el Laberinto Circular Elevado entre las ratas N/Nih-HS y las ratas Roman

Se analizaron los resultados de varios experimentos (realizados bajo las mismas condiciones que el presente) de forma conjunta, con el objetivo de corregir posibles sesgos metodológicos derivados del tamaño reducido de las muestras, con el fin de obtener conclusiones más firmes sobre las diferencias en la ansiedad incondicionada de estas cepas de ratas y replicar resultados anteriores obtenidos por nuestro grupo de investigación (López-Aumatell y cols., 2009b).

En la Tabla 14 se muestran las comparaciones del comportamiento exploratorio de las tres cepas durante la prueba del Laberinto Circular Elevado. Como en los anteriores experimentos las ratas N/Nih-HS mostraron conducta más similar a las ratas RLA-I en comparación a las ratas RHA-I, que fueron las que realizaron mayor comportamiento exploratorio. Asimismo, las ratas RHA-I salieron antes a los espacios abiertos, estuvieron más tiempo en las secciones abiertas, realizaron más entradas en las secciones abiertas ($F(2, 308) = 8,40$ con $p < 0,02$) y mayor número de “*head-dips*” ($F(2, 308) = 9,36$ con $p < 0,000$).

Tabla 14.- Comparación de las respuestas conductuales entre las ratas de las cepas Romanas y las ratas del stock N/Nih-HS en el Laberinto Circular Elevado (resultados de varios experimentos).

	RHA-I (n = 61)	RLA-I (n = 60)	N/Nih-HS (n = 190)
Latency to open (s)	64,5 ± 11,6	114,5 ± 14,5 (a)	96,7 ± 8,7 (c)
Time (s)	55,9 ± 5,4	40,9 ± 5,7*	40,4 ± 4 *
Entries (n)	5,1 ± 0,5	2,9 ± 0,4 (b)	3,5 ± 0,3 (d)
SAP (n)	11,2 ± 0,6	9,6 ± 0,4	6,8 ± 0,3 (e)
Head-dips (n)	9,4 ± 0,4	5,7 ± 0,8 (b)	4,6 ± 0,6 (d)
Line crossings (n)	20,5 ± 1,6	12,5 ± 0,5 (b)	16,7 ± 0,9 (e)

*Leyenda Tabla 14: medias ± ES de las medidas conductuales de los tres grupos. RHA-I, n =61; RLA-I, n = 60 y N/Nih-HS, n = 190. Ver en Tabla 8 la definición de las variables. (a) $p < 0,05$ vs. el grupo de ratas RHA-I (test de t-Student para grupos independientes); (b) $p < 0,001$ vs. el grupo de ratas RHA-I (test de t-Student para grupos independientes); * $p = 0,057$; (c) $p < 0,05$ vs. las cepas de ratas romanas (ANOVA de un factor significativo con pruebas Duncan post hoc); (d) $p < 0,05$ entre las ratas N/Nih-HS y RLA-I vs. las ratas RHA-I (ANOVA de un factor significativo con pruebas Duncan post hoc); e) $p < 0,05$ entre las tres cepas de ratas (ANOVA de un factor significativo con pruebas Duncan post hoc).*

Las ratas N/Nih-HS se diferenciaron de las ratas Romanas en la latencia de primera entrada en las secciones abiertas del laberinto ($F(2, 308) = 3,11$ con $p < 0,05$), en el número de conductas de evaluación del riesgo (SAP, $F(2, 308) = 26,67$ con $p < 0,001$) y en el número de veces que cruzaron las siete secciones del laberinto ($F(2, 308) = 7,14$ con $p < 0,001$, Tabla 14).

Si bien en todos los experimentos realizados se mantiene el sentido de las diferencias conductuales entre las tres cepas de ratas, con muestras mayores estas diferencias son más marcadas. Estos resultados replican y afianzan las conclusiones de estudios previos realizados por nuestro grupo de investigación, en los que se remarcaba el perfil de comportamiento inhibido de las ratas N/Nih-HS, similar al de las ratas RLA-I (López-Aumatell y cols., 2009b).

4.2 PARTE II: Expresión génica diferencial en amígdala e hipocampo en función de los niveles de ansiedad y miedo.

4.2.1 Expresión génica diferencial en amígdala de ratas N/Nih-HS extremas en ansiedad

A partir de los resultados obtenidos en el “Estudio 1” en las ratas N/Nih-HS (ver anexos Artículo 1), se aplicó el análisis de microarray para evaluar la expresión génica diferencial sobre una muestra de ratas N/Nih-HS seleccionadas por presentar puntuaciones extremas en ansiedad, en función de su capacidad (muy alta o muy baja) para la adquisición de la tarea de evitación activa en dos sentidos (en la prueba de “*Shuttle-box*”). A partir de las muestras de amígdala obtenidas de estas ratas, se realizó en primer lugar un análisis de microarray y después se aplicó la técnica qRT-PCR como método de validación de las diferencias de expresión genética obtenida.

Los resultados conductuales mostraron que las ratas N/Nih-HS extremas en ansiedad condicionada, según su nivel de adquisición de la evitación activa en dos sentidos, también se diferenciaron significativamente en otras variables relacionadas con miedo condicionado y ansiedad condicionada. Así, el tiempo de petrificación en un contexto condicionado (“*Freezing*” durante los 5 primeros intervalos entre ensayos, o miedo condicionado; Tabla 15) y la latencia media de respuesta en la sesión de evitación activa fueron superiores en el grupo de “Alta ansiedad” (todas las $t_s(12) \geq -2,9$ con $p < 0,05$, y todas las “U de Mann Whitney” $\geq -2,24$ $p < 0,026$; Tabla 15).

Tabla 15.- Comparaciones de la respuesta conductual entre los grupos extremos de ansiedad de las ratas N/Nih-HS.

	Muestra completa (n = 100)	Grupo con “Baja ansiedad” (n = 7)	Grupo con “Alta ansiedad” (n= 7)
Time (s)	44,9 ± 4,8	44,2 ± 21,7	46,7 ± 12,4
Entries (#)	3,5 ± 0,4	3,5 ± 1,6	3,6 ± 0,9
Head-dips (#)	5,8 ± 1,2	22,5 ± 17,6	6,3 ± 1,7
SAP (#)	7,5 ± 0,4	7,3 ± 1,8	9,0 ± 0,9
Line-crossings (#)	17,4 ± 1,2	19,3 ± 6,1	17,3 ± 2,5
Distance (cm)	2871,9 ± 145,1	3191,2 ± 495,4	2546,1 ± 510,8
Distance5' (cm)	1056,2 ± 58,9	1123,2 ± 211,4	952,8,4 ± 168,0
Rearings (#)	94,1 ± 11,2	63,4 ± 15,3	46,9 ± 15,0
Rearings5' (#)	25,7 ± 2,8	14,9 ± 2,5	18,4 ± 7,7
CET (#)	4,4 ± 0,3	6,1 ± 1,0	5,6 ± 0,8
Conditioned Freezing (s)	219,7 ± 4,7	183,7 ± 18,0	251,1 ± 10,7 (a, b)
ITC (#)	15,6 ± 1,1	27,0 ± 6,9	14,9 ± 2,4
Response latency (s)	14,4 ± 0,6	8,5 ± 1,0	13,5 ± 1,5 (a, b)
SH Avoidances (#)	4,4 ± 0,7	20,0 ± 3,5	1,9 ± 0,9 (a, b)

Leyenda Tabla 15: medias ± ES de las medidas conductuales de los dos grupos de ratas N/Nih-HS. Distance y Distance5': distancia horizontal recorrida (cm) durante 20 minutos y los primeros 5 minutos respectivamente, del test de actividad en situación de novedad automatizada. Rearing y Rearings5': número total de actividad exploratoria vertical durante 20 minutos y los 5 primeros minutos, respectivamente. Para el resto de definiciones de las variables ver Tabla 7. (a) $p < 0,05$ vs. el grupo de ratas con “Baja ansiedad” (“Student’s t-test”, para muestras independientes), (b) $p < 0,05$ vs. el grupo de ratas con “Baja ansiedad” (“Mann-Whitney U Test”, para muestras independientes).

A partir de la aplicación del análisis de microarray, se identificaron 414 genes en amígdala con diferente perfil de expresión entre los dos grupos de ratas (FDR <0,05). Del total de estos genes, el 82,3% (341) mostraron sobre-expresión en el subgrupo de “Baja ansiedad”, mientras que sólo 73 genes presentaron sub-expresión en dicho grupo respecto al subgrupo de “Alta ansiedad”.

En total, 36 genes (9%, con FC >|2|) mostraron funciones biológicas relacionadas con el Sistema Nervioso Central (SNC), sobre las siguientes áreas: neurotransmisión, sistema inmune y procesos hormonales, drogas de abuso y comportamiento. De esta selección de genes, 6 de ellos mostraron sub-expresión y 30 sobre-expresión en el grupo de ratas “Baja ansiedad”. En la Tabla 16 se muestra la descripción de estos genes con su

localización, y se indican los genes que se enviaron a validar mediante qRT-PCR (Avpr1b, Arr3, Prl4a1, Ucn3, Tacr3 y H2-M9).

En la Tabla 17 se muestran la funciones de los genes validados. Del total de genes validados, dos de ellos (Arr3 y H2-M9) presentaron sobre-expresión (el grupo de ratas de “Baja ansiedad” obtuvo mayor nivel de expresión que el otro grupo), mientras que otros dos genes validados (Tacr3 y Uc3) se mostraron sub-expresados en el grupo de “Baja ansiedad” (Tabla 17).

Tabla 16.-Sumario de genes con expresión diferencial a partir del análisis de Microarray: sobre/sub-expresión de los niveles genéticos en las ratas N/Nih-HS con “Baja-ansiedad” en relación al grupo de ratas con “Alta ansiedad” (con funciones relacionadas con el Sistema Nervioso Central).

Símbolo	localización	Descripción	RefSeq_RNA	FC	qRT-PCR
Genes sobre-expresados					
S100b	20:12791440-12824508	S100 calcium binding protein B	NM_013191	2,84	
Avpr1b	13:44536742-44547983	Arginine vasopressin receptor 1B	NM_017205	2,30	-1,04
Rdh8	8:19837679-19844719	Retinol dehydrogenase 8 (all-trans)	NM_001168593	2,35	
Vegp2	3:4862645-4867267	Von Ebners gland protein 1: von Ebners gland protein 2	NM_053574	2,35	
Hoxb8	10:85013711-85015221	Homeo box B8	NM_001191649	2,18	
Arr3	X:88602642-88614621	Arrestin 3, retinal (x-arrestin)	NM_001190993	2,17	2,25
CCK	8:126492636-126499220	cholecystokinin	NM_012829	2,77	
Cryaa	Marker: RH94619	Crystalin, alpha A	NM_012534	2,13	
Uchl1	14:44114392-44124947	Ubiquitin carboxyl-terminal esterase L1 (tubiquitin thiolesterase)	NM_017237	2,18	
Hba-a2	10:15584360-15585215	Homoglobin aplha, adult chain 2	NM_013096	2,10	
Omp	Ensembl protein family: ENSFM00250000004825	Olfactory marker protein	NM_012616	2,08	
RT1-DOb	20:4753940-4759648	Histocompatibility 2, O region beta locus	NM_001008846	2,78	
Oprd1	5:150979252-151014066	Opioid receptor, delta 1	NM_012617	2,30	
Oas1f	12:36833433-36842796	2'-5' oligoadenylate synthetase 1F	NM_001009490	2,26	
Olr312	1:200805140-200806078	Olfactory receptor	NM_001000764	2,17	
Oxt	3:118194219-118195056	Oxytocin, prepropeptide	M25649	2,66	
Bcan	2:180067867-180080947	Brevican	NM_001033665	2,37	
H2-M9	20:1945294-1947325	Histocompatibility 2, M region locus 9; similar to RT1 class I, M1, gene	NM_001168332	2,01	2,04
Acr	7:127885399-127891552	Acrosin	NM_012490	2,31	
Nnat	3:148269404-148271781	Neuronatin	NM_053601	2,26	
Pr15a2	17:42984939-42991275	Prolactin family 5, subfamily a, member 2	NM_001044702	2,44	
Duox2	3:109059360-109077106	Dual oxidase 2	NM_024141	2,05	
Cyp4a8	5:135546859-135578199	Cystatin F (leukocystatin)	NM_031605	2,15	
Ahsg	11:80327147-80354656	Alpha-2-HS-glycoprotein	NM_012898	2,16	
Igfbp7	14:33010198-33070052	Insulin-like growth factor binding protein 7	NM_001013048	2,04	
Acta2	3:99901022-99906558	Actin, alpha, cardiac muscle 1: smooth muscle alpha-actin	NM_031004	2,05	
Cx3cr1	8:125033630-125047335	Chemokine (C-X3-C motif) receptor 1	NM_133534	2,23	
Hoxb8	10:85013711-85015221	Homeo box B8	NM_001191649	2,18	
Cryaa	Marker: RH94619	Crystalin, alpha A	NM_012534	2,13	
Uchl1	14:44114392-44124947	Ubiquitin carboxyl-terminal esterase L1 (tubiquitin thiolesterase)	NM_017237	2,18	
Slc6a2	19:15098275-15139898	solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter, noradrenalin), member 2	NM_031343	2,50	
Cst3	3:137650918-137654776	Cystatin C	NM_012837	2,07	
Genes sub-expresados					
Slc6a14	X:12049011-12073581	Solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter), member 14	NM_001037544.1	-2,23	
Tacr3	2:232309015-232404964	Tachykinin receptor 3	NM_017053	-2,16	-1,65
Cd28	9:59342273-59367743	Cd28 molecule	NM_013121	-2,26	
Ucn3	17:77487977-77488471	Urocortin 3 (stresscopin)	NM_001080208.1	-2,41	-10,37
Pnliprp2	1:265267687-265285920	Pancreatic lipase-related protein 2	NM_057206.1	-2,45	
Pr14a1	17:43276214-43284152	Prolactin family 4, subfamily a, member 1	NM_017036	-2,27	1,25

FC (Fold change): diferencia del nivel de expresión genético entre el grupo de ratas con “Baja ansiedad/Alta ansiedad”; qRT-PCR: “real-time reverse transcription-ppolymerase chain reaction”. RefSeq_RNA (datos extraídos de Clone/Gene ID Converter: <http://idconverter.bioinfo.cnio.es/>).

Tabla 17.-Lista de genes validados por qRT-PRC con sobre/sub-regulación en amígdala entre grupos de ratas N/Nih-HS extremos en ansiedad: funciones relacionadas con el Sistema Nervioso Central.

Símbolo	Descripción	Funciones
Genes sobre-expresados (grupo de ratas con “Baja ansiedad” > grupo de ratas con “Alta ansiedad”)		
Arr3	Arrestin 3, retinal (x-arrestin)	Este gen está relacionado con la percepción sensorial (percepción visual), procesos neurológicos y cognición.
H2-M9	histocompatibility 2, M region locus 9; similar to RT1 class I, M1, gene	Este gen está involucrado en la respuesta inmune.
Avpr1b	arginine vasopressin receptor 1B	Este gen está implicado en la regulación de la presión sanguínea hormonal (vasopresina), la secreción de glutamato y participa en procesos endocrinos.
Oprd1	opioid receptor, delta 1	Este gen está implicado en la respuesta inmune, las vías de señalización de las proteínas G, el comportamiento locomotor, y media los procesos de señalización y metabolismo del AMPc.
Genes sub-expresados (grupo de ratas con “Baja ansiedad” < grupo de ratas con “Alta ansiedad”)		
Tacr3	Tachykinin receptor 3	Este gen está involucrado en la regulación del sistema circulatorio, de la conducta de beber, la respuesta de los estrógenos, el estradiol y las hormonas esteroideas, así como también, de la cocaína y morfina, y también participa en la regulación del metabolismo de la dopamina y las vías de señalización de las proteínas G.
Ucn3	Urocortin 3 (stresscopin)	Este gen está involucrado en la regulación y actividad del cAMP, regulación de la secreción hormonal, la respuesta esteroidea, de los glucocorticoides, mineralcorticoides, corticosterona e insulina. Y también participa en procesos en los que están involucradas las proteínas G.

Tabla 18.-Capacidad predictiva, de los genes diferencialmente expresados en amígdala de las ratas N/Nih-HS, sobre diferentes variables conductuales (modelos de regresión lineal de pasos sucesivos hacia adelante, step 1, n = 14).

Variables predictoras	Variables dependientes	Coefficiente de Pearsons	R cuadrada	p
Acr	Conditioned Freezing	-0,55	0,31	0,04
	Distance	0,68	0,46	0,01
Ahsg	Conditioned Freezing	-0,65	0,42	0,01
	SH Avoidances	0,61	0,37	0,02
	Response latency	-0,77	0,59	0,00
Arr3	Conditioned Freezing	-0,53	0,28	0,05
	SH Avoidances	0,59	0,37	0,02
	Response latency	-0,68	0,44	0,01
Avpr1b	ZM Head-dips	0,62	0,38	0,03
Bcan	Conditioned Freezing	-0,57	0,33	0,03
	SH Avoidances	0,63	0,40	0,02
	Response latency	-0,57	0,33	0,03
CCK	SH Avoidances	0,58	0,34	0,03
	Rearings5'	-0,64	0,41	0,01
Cd28	ZM Latency to open	-0,65	0,43	0,01
Cx3cr1	Conditioned Freezing	-0,76	0,57	0,00
	SH Avoidances	0,56	0,31	0,04
	Response latency	-0,64	0,41	0,01
Cyp4a8	SH Avoidances	0,57	0,32	0,04
	Response latency	-0,74	0,54	0,00
Duox2	Rearings	0,63	0,39	0,02
H2-M9	ZM Latency to open	0,57	0,32	0,04
	ZM SAP	-0,59	0,35	0,03
Oasf1	Conditioned Freezing	-0,58	0,33	0,03
	SH Avoidances	0,65	0,42	0,01
	Distance	0,59	0,35	0,03
Olr312	Conditioned Freezing	-0,75	0,56	0,00
	SH Avoidances	0,67	0,44	0,00
	Response latency	-0,64	0,40	0,02
	CET	0,58	0,33	0,03
	ITC	0,77	0,59	0,00
Olr689	Response latency	-0,60	0,37	0,02
Olr862	Response latency	-0,57	0,33	0,03
Pik3r5	SH Avoidances	0,55	0,30	0,04
	Response latency	-0,59	0,35	0,03
Oxt	ZM Head-dips	0,76	0,58	0,00
Pnliprp2	Conditioned Freezing	0,55	0,30	0,04
	SH Avoidances	-0,61	0,38	0,02
	Rearings	-0,62	0,39	0,02
Prl5a2	Conditioned Freezing	-0,82	0,65	0,00
	SH Avoidances	0,86	0,74	0,00
	Response latency	-0,61	0,37	0,02
	ITC	0,85	0,72	0,00
Prl4a1	Conditioned Freezing	0,67	0,45	0,01
	SH Avoidances	-0,70	0,50	0,01
	Response latency	0,67	0,44	0,01
	ITC	-0,85	0,34	0,03
RT1-Dob	Conditioned Freezing	-0,71	0,51	0,00
	SH Avoidances	0,75	0,56	0,00
	Response latency	-0,63	0,39	0,02
	ITC	0,72	0,52	0,00
Sit1	Conditioned Freezing	-0,60	0,36	0,02
	SH Avoidances	0,64	0,41	0,01
	Response latency	-0,54	0,29	0,05
	ITC	0,79	0,62	0,00
	Distance	0,63	0,40	0,02
Slc6a2	Conditioned Freezing	-0,62	0,38	0,02
	SH Avoidances	0,69	0,47	0,00
	Response latency	-0,70	0,49	0,00
	ITC	0,70	0,49	0,00
Tacr3	Conditioned Freezing	0,59	0,34	0,03
	SH Avoidances	-0,57	0,33	0,03

4.2.1.1 Genes validados con qRT-PCR

Se aplicó el análisis de regresión lineal (modelo de pasos sucesivos hacia adelante), para poder analizar el poder predictivo de estos genes sobre diversos fenotipos conductuales (Tabla 18). En relación a los genes validados con qRT-PCR se obtuvieron los siguientes resultados:

(a) Dos genes validados presentaron capacidad predictora significativa sobre variables relacionadas con la ansiedad incondicionada (prueba del Laberinto Circular Elevado): el gen *Avpr1b* y el gen H2-M9.

En la Tabla 18 se muestra como el gen *Avpr1b* fue predictor del número de “*head-dips*” ($r= 0,62$; $R^2 = 0,38$ con $p = 0,025$). A partir del análisis de regresión se puede ver como las ratas que presentaron mayores niveles de expresión en este gen (el grupo de ratas con “Baja ansiedad”) también fueron las que mostraron mayor número de “*head-dips*” durante la prueba conductual.

En la Figura 15 se muestra la capacidad predictora del gen H2-M9 sobre dos variables relacionadas con la ansiedad incondicionada en el Laberinto Circular Elevado, como son el número de SAP y el tiempo de latencia hasta la primera entrada en las secciones abiertas. En cuanto el número de SAP ($r= -0,59$; $R^2=0,32$ con $p<0,003$), el análisis de regresión muestra una relación inversa con la expresión del gen, es decir, a mayor expresión génica menor número de SAPs realizan las ratas en el laberinto circular. Congruentemente, el análisis de regresión muestra una relación directa entre expresión de H2-M9 y el tiempo de latencia de entrada a las secciones abiertas en el Laberinto Circular Elevado ($r= 0,57$; $R^2=0,35$ con $p<0,004$).

Es decir, a mayor nivel de expresión de este gen corresponde mayor tiempo de latencia (Tabla 18), lo que sugiere que la sobre-expresión del gen H2-M9 sería predictora de un perfil conductual inhibido (menos conducta SAP y mayor latencia de entrada –por primera vez- en las secciones abiertas del laberinto), mientras que la sobre-expresión del gen *Avpr1b* estaría asociada a mayor exploración del laberinto.

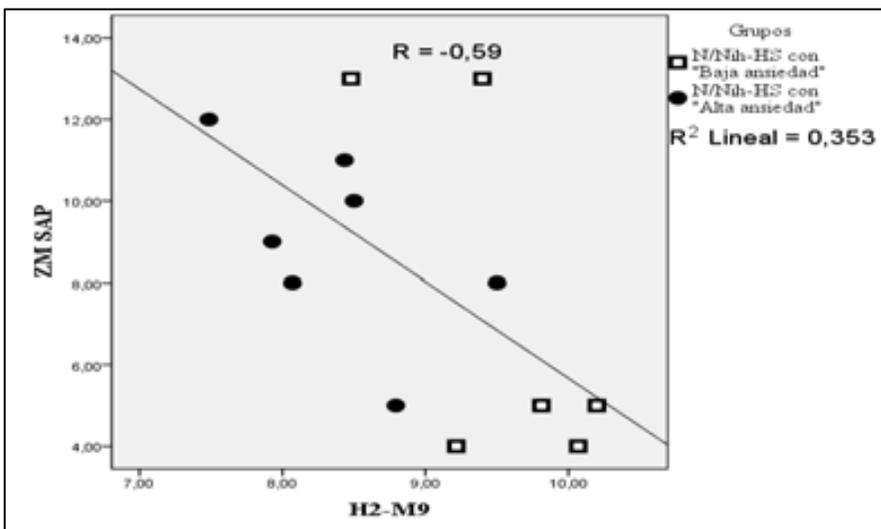


Figura 15_Capacidad predictora del gen H2-M9 validado por qRT-PCR en variables relacionadas con la ansiedad incondicionada (Laberinto Circular Elevado, $n = 14$).

(b) Los genes Tacr3 y Arr3 fueron predictores de variables relacionadas con la ansiedad condicionada:

En la Figura 16 se muestra por un lado la relación directa entre los niveles de expresión del gen Tacr3 y el tiempo de miedo condicionado (“Freezing”), de forma que los animales con mayor nivel de expresión para este gen (las ratas con “Alta ansiedad”) también presentaron tiempos de miedo condicionado más largos ($r = 0,59$; $R^2 = 0,34$ con $p < 0,03$), mientras que el análisis de regresión mostró relación inversa entre los niveles de expresión de este gen y el número de evitaciones durante la sesión de la prueba de “Shuttle-box” ($r = -0,57$; $R^2 = 0,33$ con $p < 0,03$; Figura 16).

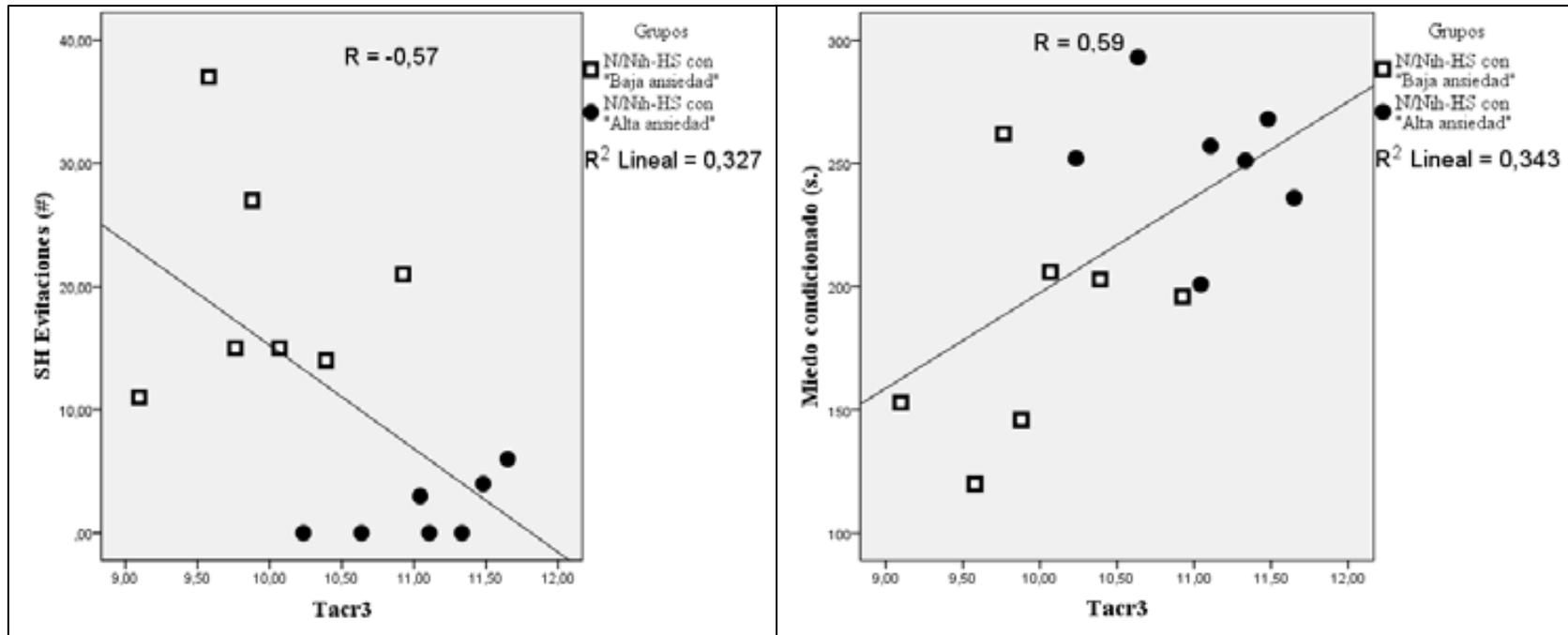


Figura 16.-Capacidad predictora del gen Tacr3 *validado por qRT-PCR* en variables relacionadas con la ansiedad condicionada (prueba de “Shuttle-box”, n = 14).

El gen Arr3 mostró capacidad predictiva sobre el tiempo de miedo condicionado, el número de evitaciones y la latencia media de respuesta durante la tarea de evitación en la “Shuttle-box” (todas las $R^2 \geq 0,28$, $p < 0,050$, Tabla 18 y Figura 17). Los análisis de regresión mostraron que existía relación directa en los niveles de expresión de este gen y el número de evitaciones (a mayor nivel de expresión, mayor número de evitaciones: $r = 0,59$; $R^2 = 0,35$ con $p < 0,02$), y relación inversa entre el nivel de expresión génica y el tiempo de miedo condicionado y de latencia de respuesta ($r = -0,53$; $R^2 = 0,28$ con $p < 0,05$, y $r = -0,68$; $R^2 = 0,46$ con $p < 0,05$, respectivamente; ver Figura 18).

Estos resultados sugieren que niveles altos de expresión del gen Arr3 podrían ser predictivos de un perfil de afrontamiento más activo en tareas condicionadas como la tarea de evitación activa en dos sentidos. Al contrario de lo que ocurre con el gen Tacr3, ya que niveles altos de expresión de este gen predecirían estilos de afrontamiento más pasivos (al menos ante un condicionamiento aversivo), característicos de las ratas con “Alta ansiedad”.

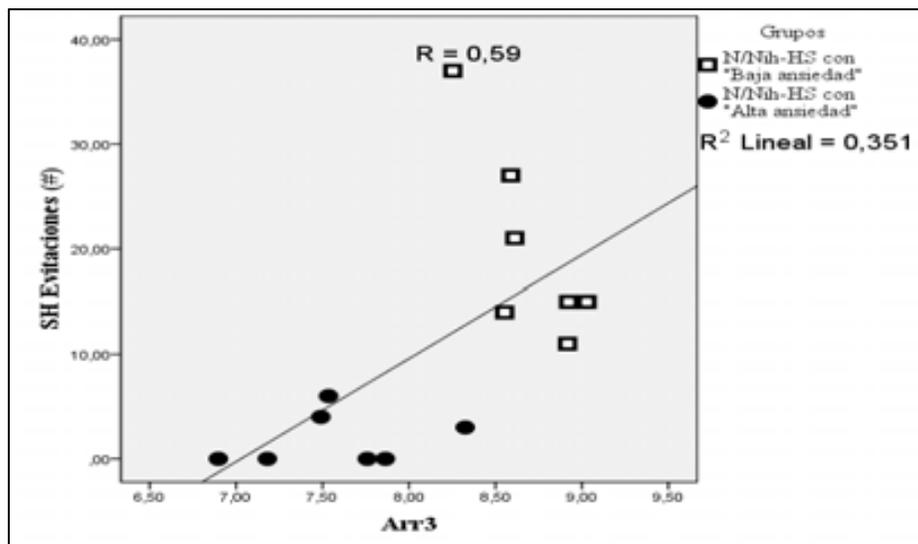


Figura 17.-Capacidad predictiva del gen Arr3 validado por qRT-PCR en variables relacionadas con la ansiedad condicionada (prueba de “Shuttle-box”, n = 14).

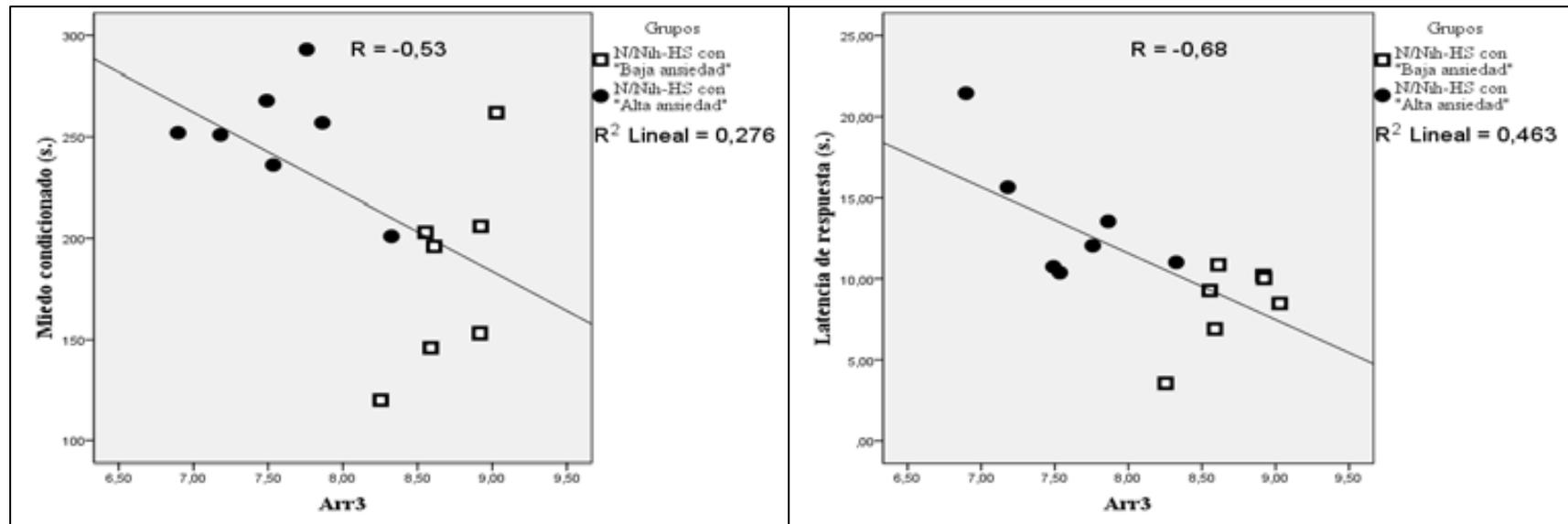


Figura 18.-Capacidad predictiva del gen *Arr3* validado por qRT-PCR en variables relacionadas con la ansiedad condicionada (prueba de "Shuttle-box", n = 14).

4.2.1.2 Otros genes con función en el SNC

Además de los genes directamente validados por qRT-PCR, se han identificado otros genes con funciones relacionadas con el Sistema Nervioso Central y que podrían ser buenos predictores de comportamientos relacionados con respuestas de ansiedad y/o de miedo (Tabla 18). Genes relacionados con la prolactina como los genes *Prl4a1* y *Prl5a2*, mostraron capacidad predictiva para comportamientos relacionados con la ansiedad condicionada como en el tiempo del miedo condicionado, en la respuesta de latencia, en el número de evitaciones y en el número de cruces de compartimento entre ensayos (Tabla 18 y Figura 19).

Los genes *Prl4a1* y *Prl5a2* podrían tener funciones moleculares diferentes ya que mostraron perfiles de expresión opuesta así como de la conducta que predijeron. El gen *Prl4a1* presentó niveles de expresión menores en las ratas con “Baja ansiedad” y los análisis de regresión sugirieron que podría predecir un perfil de afrontamiento de tipo más activo durante la prueba de “*Shuttle-box*”, ya que los resultados del análisis de regresión mostraron que las ratas con menor nivel de expresión en este gen (es decir las ratas con “Baja ansiedad”) fueron las que presentaron menor tiempo de miedo condicionado ($r = 0,67$; $R^2 = 0,45$ con $p < 0,01$ y de latencia de respuesta ($r = 0,67$; $R^2 = 0,44$ con $p < 0,01$, Figura 19), así como mayor número de evitaciones ($r = -0,70$; $R^2 = 0,50$ con $p < 0,05$) y de cruces entre compartimentos durante la sesión ($r = -0,85$; $R^2 = 0,34$ con $p < 0,05$, Figura 20).

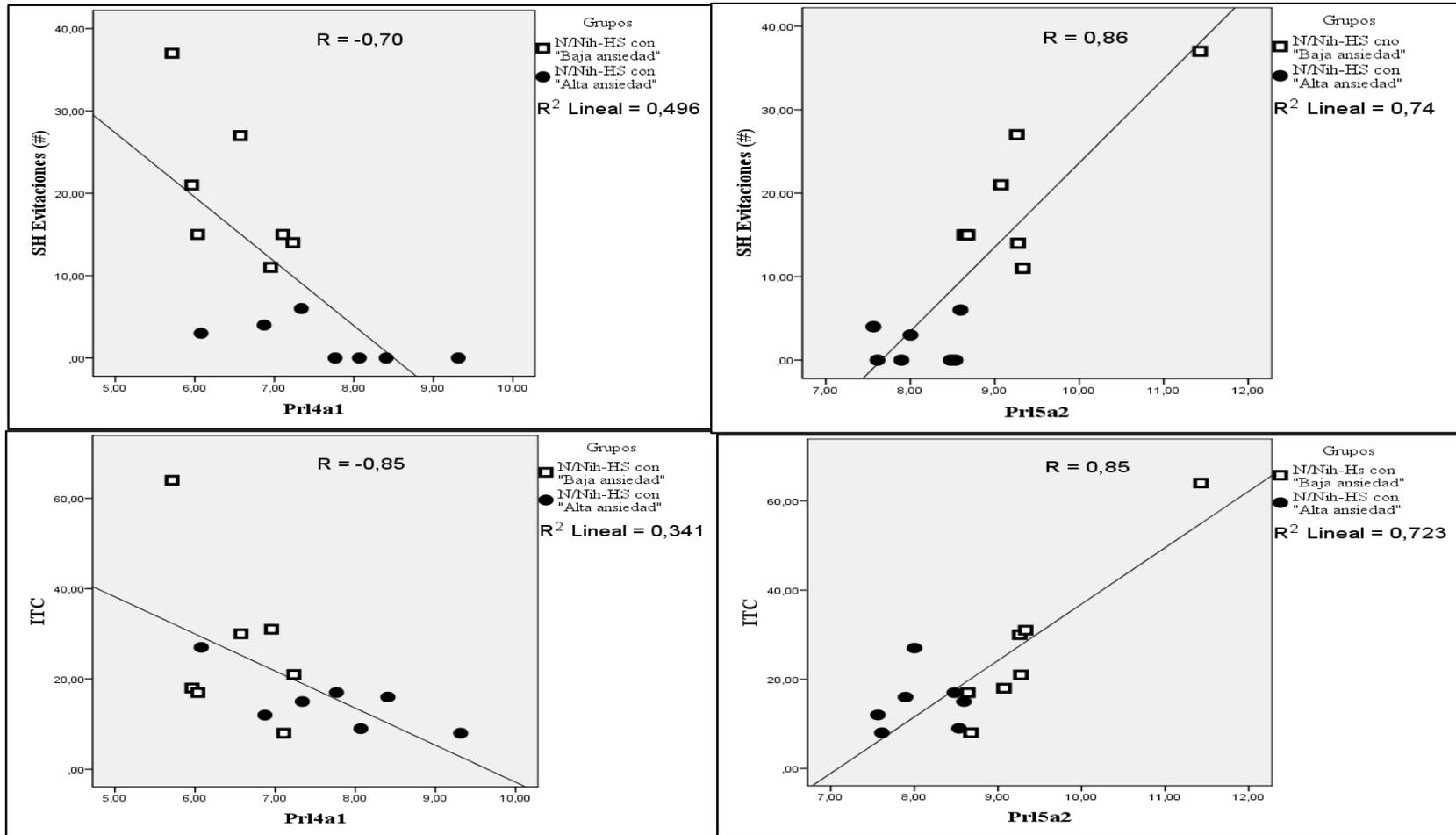


Figura 19.-Capacidad predictiva de los genes *Pr14a1* (relación inversa) y *Pr15a2* (relación directa) en variables relacionadas con la ansiedad condicionada como el miedo condicionado y la latencia de respuesta (prueba de "Shuttle-box", n = 14).

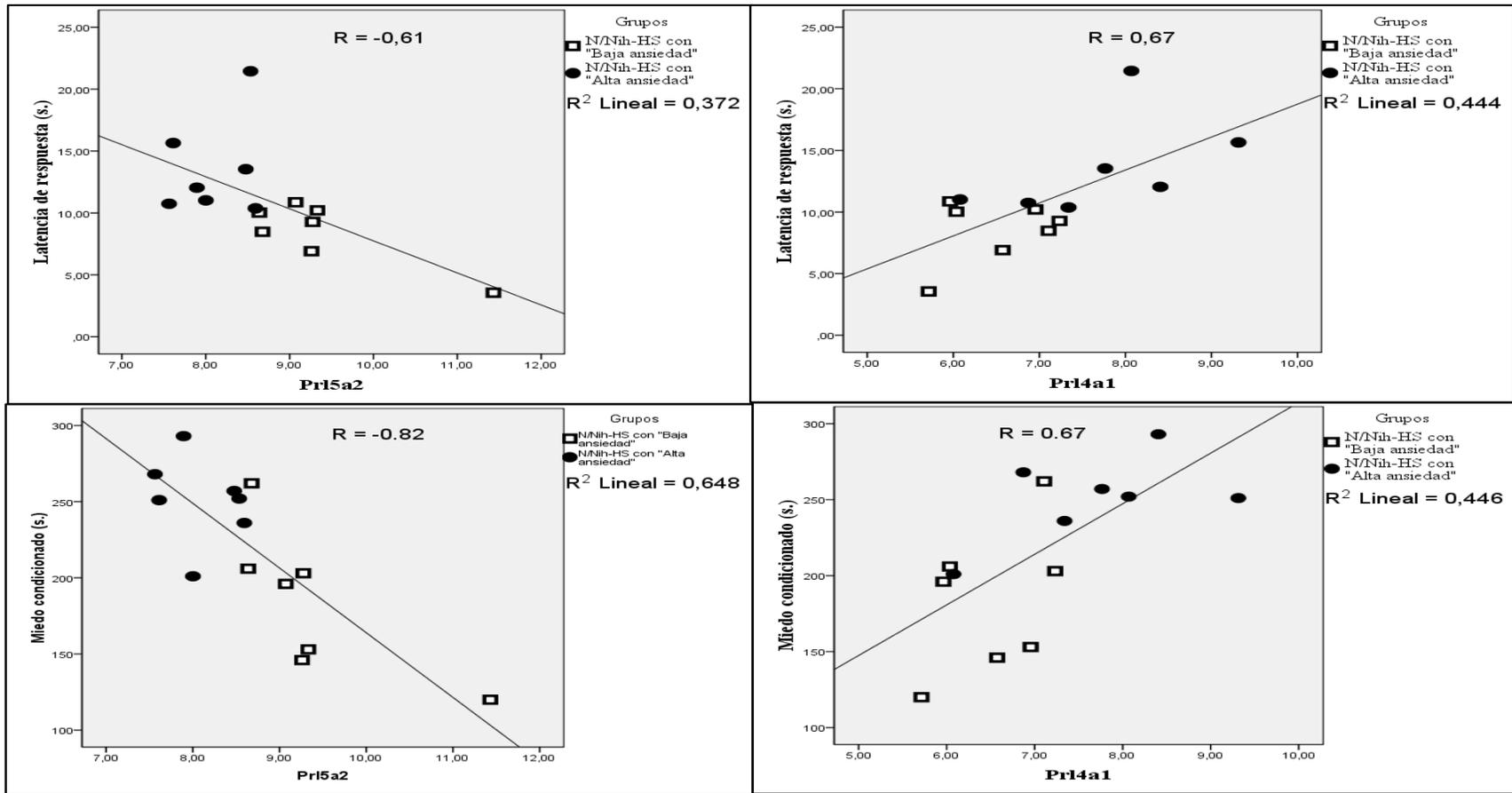


Figura 20.-Capacidad predictiva de los genes Prl4a1 (relación directa) y Prl5a2 (relación inversa) en variables relacionadas con la ansiedad condicionada como el miedo condicionado y la latencia de respuesta (prueba de "Shuttle-box", $n = 14$).

En el caso del gen *Prl5a2*, las ratas con más nivel de expresión de este gen (las ratas con “Baja ansiedad”) fueron las que presentaron tiempos más prolongados de miedo condicionado ($r = -0,82$; $R^2 = 0,65$ con $p < 0,001$) y de latencia de respuesta ($r = -0,61$; $R^2 = 0,37$ con $p < 0,02$, Figura 19), así como menor número de evitaciones ($r = 0,86$; $R^2 = 0,74$ con $p < 0,00$ y de cruces entre compartimentos ($r = 0,85$; $R^2 = 0,72$ con $p < 0,001$, Figura 20). Estos resultados sugieren que la sub-expresión del gen *Prl4a1* podrían subyacer al estilo de afrontamiento pasivo durante la realización de la prueba de “*Shuttle-box*”, mientras que la sobre-expresión del gen *Prl5a2* sobre las ratas con “Baja ansiedad” predeciría un estilo de afrontamiento más activo durante la misma prueba.

Otros genes en los que hemos encontrado resultados interesantes entre sus niveles de expresión y la capacidad predictiva sobre comportamientos relacionados con la ansiedad in/condicionada, fueron por un lado genes con funciones hormonales como el gen “*Oxytocin, prepropeptide*” (o también llamado *Oxt*) que se relacionó positivamente con el número de “*head-dips*”, es decir, las ratas que presentaron mayores niveles de expresión en este gen (subgrupo de “Baja ansiedad”) también presentaron mayor número de “*head-dips*” durante la prueba del Laberinto Circular Elevado ($r = 0,76$; $R^2 = 0,58$ con $p < 0,003$, Tabla 18) y el gen “*cholecystokinin*” (o *CCK*) que se relacionó negativamente con el número de rearings (exploración vertical durante el test de la “Caja nueva”, ($r = 0,-0,64$; $R^2 = 0,41$ con $p < 0,014$, Tabla 18). Y los genes “*Alpha2-HS-glycoprotein*”, también llamado *Ahsg* ($R_s^2 \geq 0,37$ con $p < 0,05$, Tabla 18, Figura 21), y “*Cystatin F (leukocystatin)*” o *Cyp4a8* ($R_s^2 \geq 0,32$ con $p < 0,05$, Tabla 18, Figura 22), que se mostraron como predictores de las respuestas de ansiedad condicionada, como el miedo condicionado y la latencia de respuesta, y de conductas relacionadas con el nivel de exploración, como la distancia recorrida.

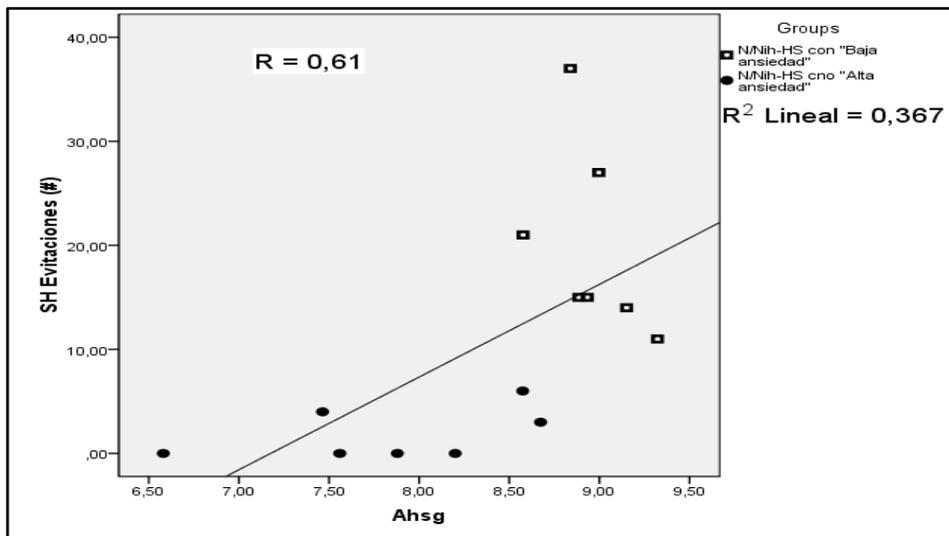


Figura 21.1.-Capacidad predictiva del gen Ahsg en variables relacionadas con la ansiedad condicionada (n =14).

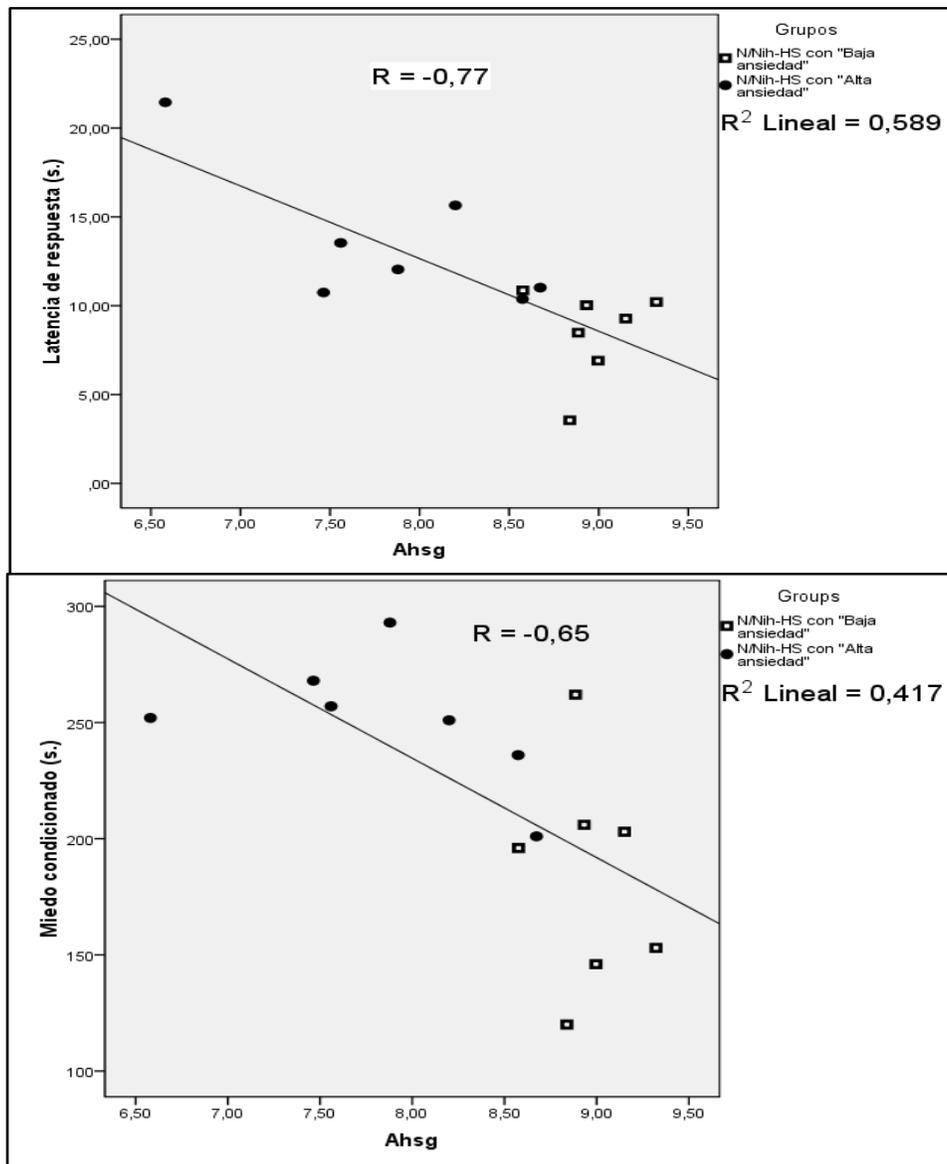


Figura 21.2.- Capacidad predictiva del gen Ahsg sobre la latencia de respuesta y el miedo condicionado (n = 14).

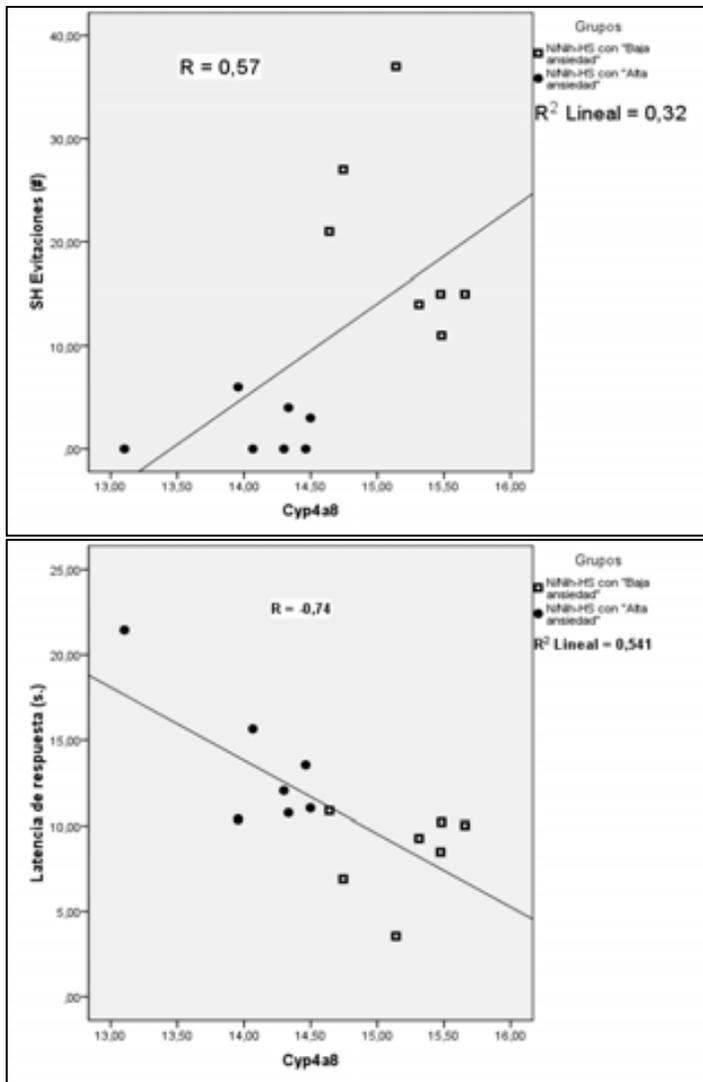


Figura 22.-Capacidad predictiva del gen Cyp4a8 sobre la latencia de respuesta (n = 14).

El gen “Dual oxidase 2” (Duox2) presentó capacidad predictora sobre el comportamiento de exploración vertical (“*rearings*”) en la “Caja nueva” ($r = 0,63$; $R^2 = 0,39$ con $p < 0,05$, Tabla 18 y Figura 23), mientras que el gen “*Chemokine (C-X3-C motif) receptor 1*” (Cx3cr1) fue predictor de comportamientos implicados en la respuesta de ansiedad condicionada como el número de evitaciones, el tiempo de miedo condicionado y la respuesta de latencia durante la tarea de evitación activa en la “*Shuttle-box*” ($R_s^2 \geq 0,31$ con $p < 0,05$, Tabla 18 y Figura 23). El gen “*Acrosin*” (Acr) se mostró como predictor del miedo condicionado ($r = -0,55$; $R^2 = 0,31$ con $p < 0,04$, Tabla 18) y de la distancia recorrida durante la prueba de la “Caja nueva” ($r = 0,68$; $R^2 = 0,46$ con $p < 0,01$, Tabla 18).

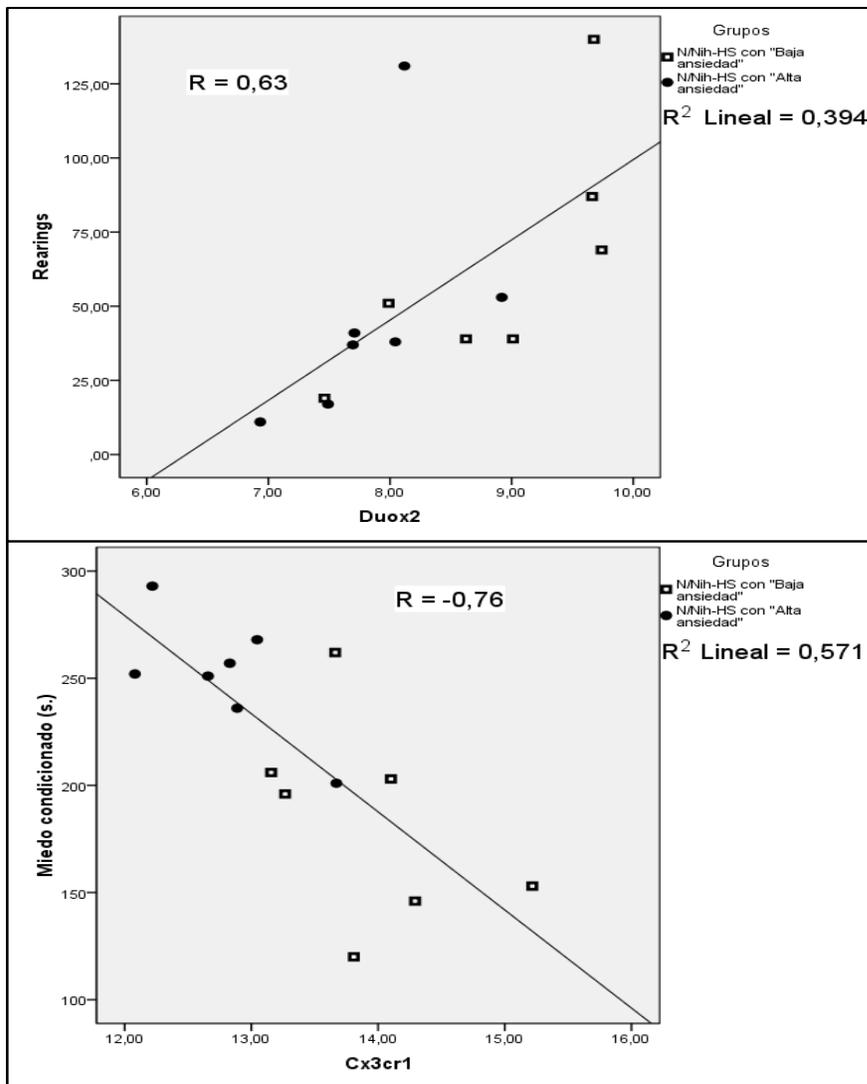


Figura 23.-Perfil de expresión de los genes *Cx3cr1* y *Duox2*, y su capacidad predictiva de los resultados conductuales en las ratas N/Nih-HS, n = 14.

A partir del análisis microarray también se obtuvieron diferencias significativas, entre los grupos de ratas N/Nih-HS extremas en ansiedad, en los niveles de expresión de 21 genes subyacentes a funciones de receptores olfatorios. De ellos sólo tres mostraron capacidad predictiva de comportamientos relacionados con la ansiedad, los genes Olr312, Olr689 y Orl872 (Figura 24). Los tres genes mostraron sobre-regulación de sus niveles de expresión en las ratas con “Baja ansiedad” y fueron predictivos de un mismo perfil de afrontamiento durante la realización de la prueba de “*Shuttle-box*”. Las ratas con sobre-expresión en estos genes presentarían:

- (1) Mayor número de evitaciones, más número de cambios entre compartimentos durante la sesión y en el periodo de habituación ($R^2 \geq 0,33$ con $p < 0,03$, Figura 24);
- (2) Menor tiempo de miedo condicionado y de latencia de respuesta ($R^2 \geq 0,33$ con $p < 0,05$, Figura 24).

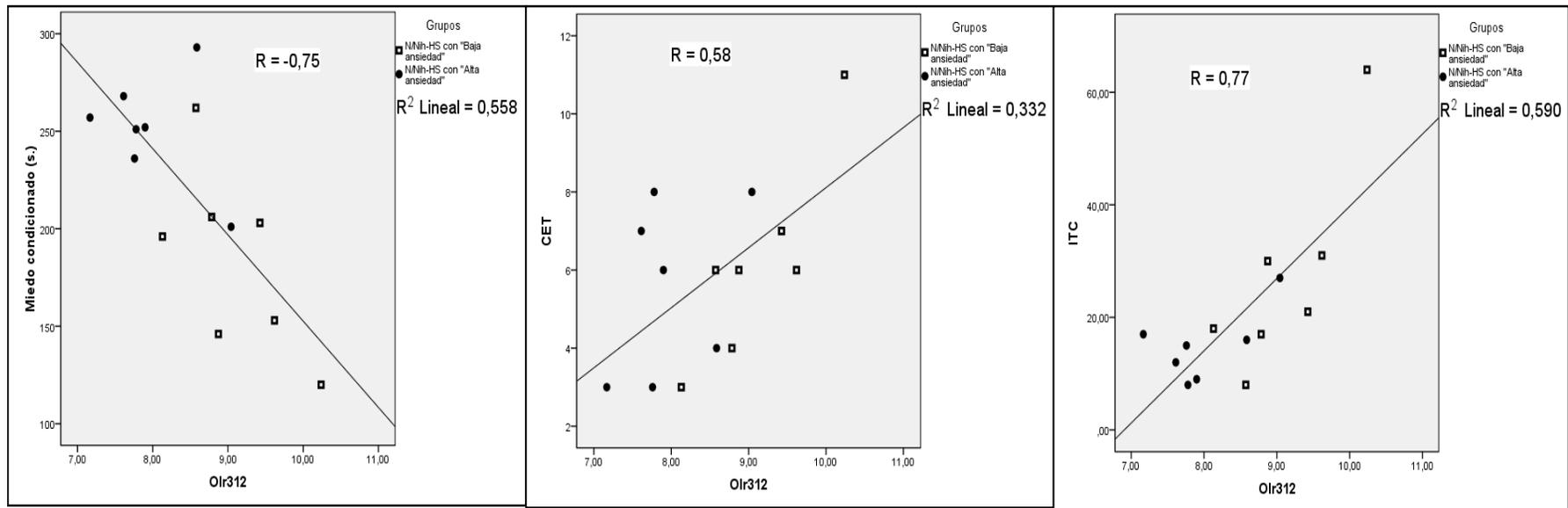


Figura 24.1.-Perfil de expresión de los genes olfatorios y su capacidad predictiva de los resultados conductuales en las ratas N/Nih-HS, n = 14.

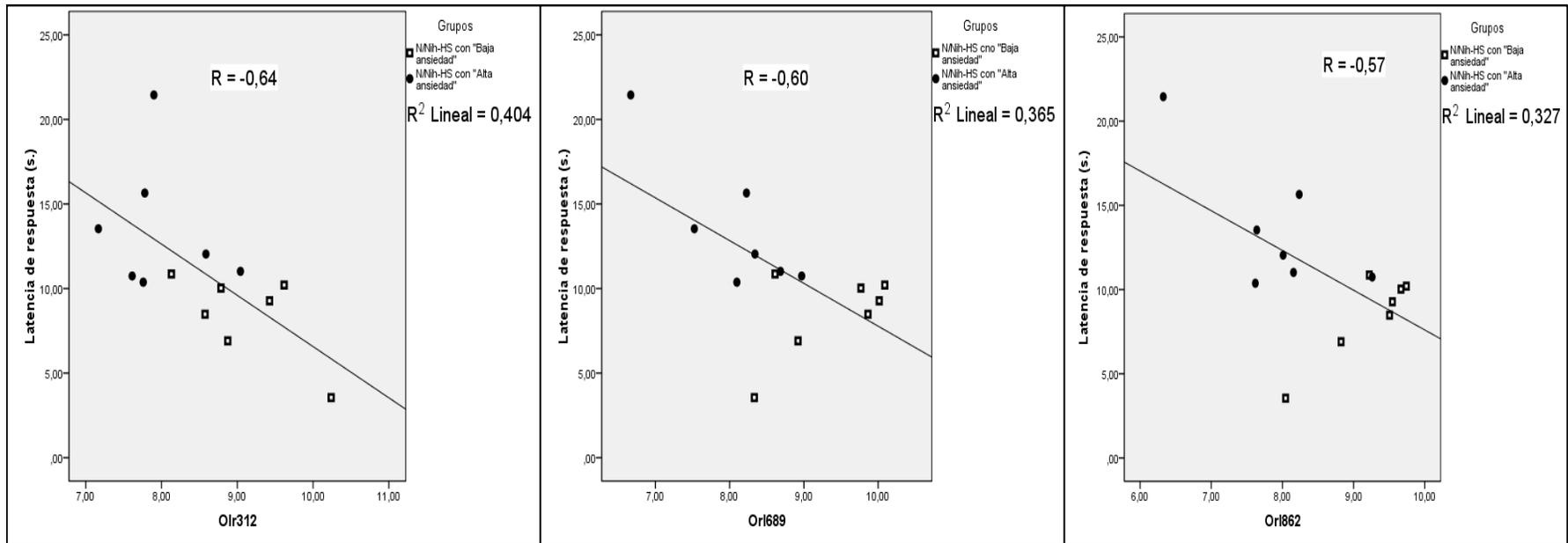


Figura 24.2.-Perfil de expresión de los genes olfatorios y su capacidad predictiva de los resultados conductuales en las ratas N/Nih-HS, n = 14.

También el grupo de ratas de “Baja ansiedad” mostró sobre-regulación de los niveles de expresión de los genes *Bcan* (“*Brevican*”), *Oasf1* (“*2'-5' oligoadenylate synthetase 1F*”), *Pik3r5* (“*phosphoinositide-3-kinase, regulatory subunit 5*”), *RT1-Dob* (“*histocompatibility 2, O region beta locus*”) y *Sit1* (“*signaling threshold regulating transmembrane adaptor 1-2*”). Así, los niveles de expresión del gen *Bcan* predicen negativamente el miedo (“*Freezing*”) condicionado y la latencia media de respuesta en la sesión de evitación activa en dos sentidos (Tabla 18), la expresión del gen *Oasf1* se relaciona negativamente con el miedo condicionado y positivamente con la distancia recorrida en el test de la “Caja nueva” (Tabla 18), y la expresión del gen *Pik3r5* predice negativamente la latencia media de respuesta en la sesión de “*Shuttle-box*” (Tabla 18). Por otra parte, los niveles de expresión de los genes *RT1-Dob* y *Sit1* predicen negativamente el miedo condicionado y la latencia media de respuesta en la sesión de “*Shuttle-box*”, al tiempo que muestran una relación positiva con los cruces entre ensayos en la “*Shuttle-box*” (ITC) y con la distancia recorrida en el test de la “Caja nueva” (caso, este último, del gen *Sit1*; ver Tabla 18, Figuras 25 y 26).

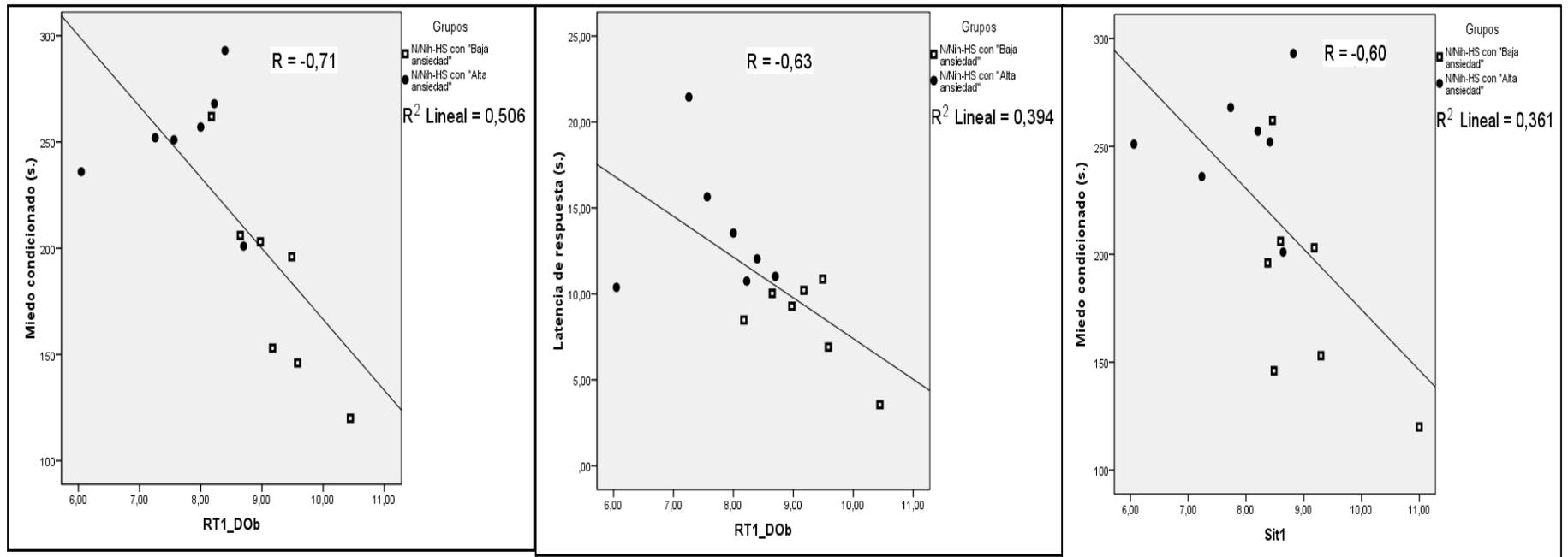


Figura 25.-Perfil de expresión de los genes *RT1-Dob* y *Sit1* y su capacidad predictiva sobre los resultados conductuales de las ratas *N/Nih-HS* extremas en ansiedad, $n = 14$.

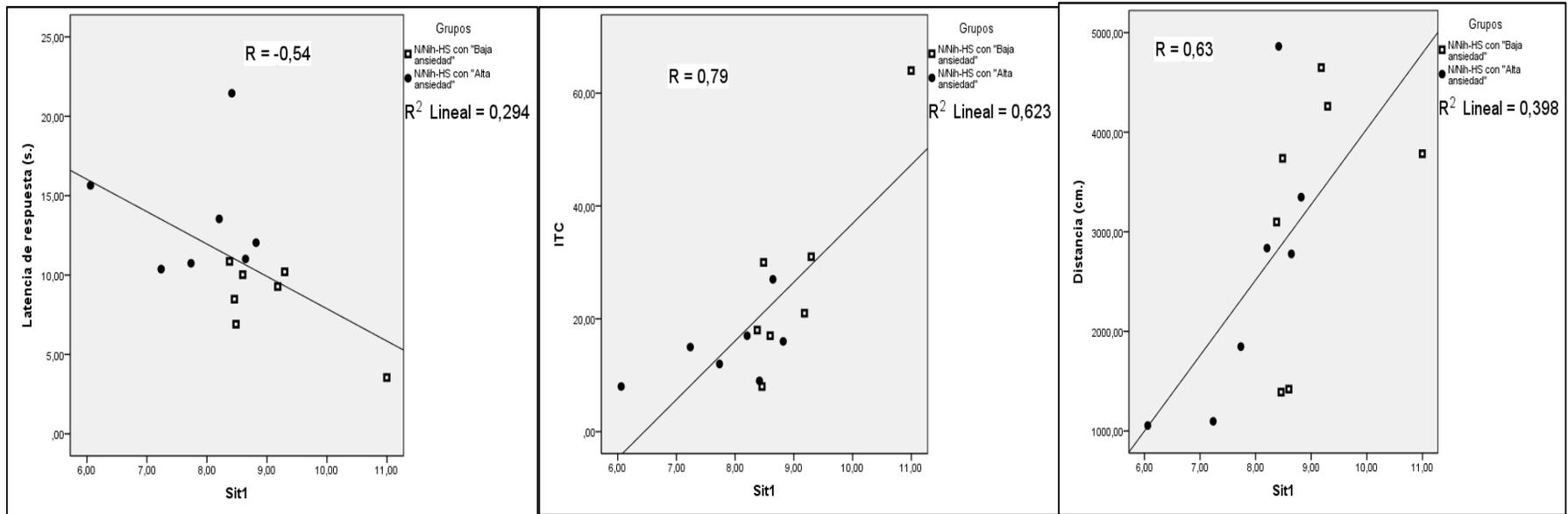


Figura 26.-Perfil de expresión del gen *Sit1* y su capacidad predictiva sobre los resultados conductuales de las ratas N/Nih-HS extremas en ansiedad, n = 14.

Se han identificado varios genes con implicaciones funcionales sobre la neurotransmisión, en concreto, el gen “*solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter, noradrenalin), member 2*” (Slc6a2) que está involucrado en el transporte de norepinefrina. Los análisis de regresión sugirieron que este gen podría predecir un perfil de afrontamiento de tipo más activo durante la prueba de “*Shuttle-box*”, ya que los resultados de dicho análisis mostraron que las ratas con mayor nivel de expresión en este gen (es decir las ratas con “Baja ansiedad”) fueron las que presentaron menor tiempo de miedo condicionado ($r = -0,62$; $R^2 = 0,38$ con $p < 0,02$) y de latencia de respuesta ($r = -0,70$; $R^2 = 0,49$ con $p < 0,005$, Figura 27), así como mayor número de evitaciones ($r = 0,70$; $R^2 = 0,47$ con $p < 0,006$) y de cruces entre compartimentos durante la sesión de evitación activa ($r = 0,85$; $R^2 = 0,34$ con $p < 0,05$, Tabla 18).

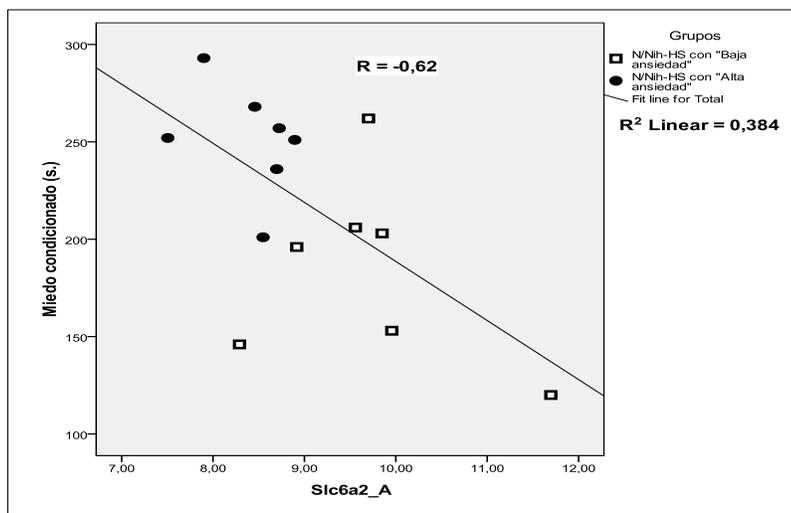


Figura 27.-Perfil de expresión del gen *Sit1* y su capacidad predictiva sobre los resultados conductuales de las ratas N/Nih-HS extremas en ansiedad, n = 14.

Por último, el grupo de ratas con “Baja ansiedad” mostró algunos genes con sub-regulación en sus niveles de expresión, como el gen “*solute carrier family 6 (neurotransmisor) member 14*” (Slc6a14), relacionado con la neurotransmisión aminérgica (transporte de aminas, entre otros), el gen “*Pancreatic lipase-related protein 2 gene*” (Pnliprp2) que está relacionado con algunas respuestas de estrés y con estímulos

hormonales relacionados con ellas (glucocorticoides y estímulos esteroideos), y el gen regulador de la molécula C 28 (Cd28) que está relacionado con la respuesta inmune (diferenciación/regulación leucocitaria y linfocitaria).

Las ratas que presentaron mayor nivel de expresión del gen Cd28 (es decir, las ratas con “Alta ansiedad”) también mostraron mayor inhibición exploratoria indicada por las latencias más largas en entrar por primera vez en las secciones abiertas del Laberinto Circular Elevado ($r = -0,65$; $R^2 = 0,43$ con $p < 0,01$). Este grupo de ratas también presentó sobre-regulación del gen *Pnliprp2*, que fue predictivo de un estilo de comportamiento inhibido, ya que los análisis de regresión mostraron:

- (1) Relación directa entre la sobre-regulación de este gen y periodos más largos de miedo condicionado ($r = 0,55$; $R^2 = 0,30$ con $p = 0,04$, Figura 28).

- (2) Relación inversa entre la expresión de este gen y el número de evitaciones y de actividad exploratoria vertical (“*rearings*” en el test de la “Caja nueva”; $r \geq -0,61$; $R^2 \geq 0,38$ con $p = 0,02$; Tabla 18 y Figura 28).

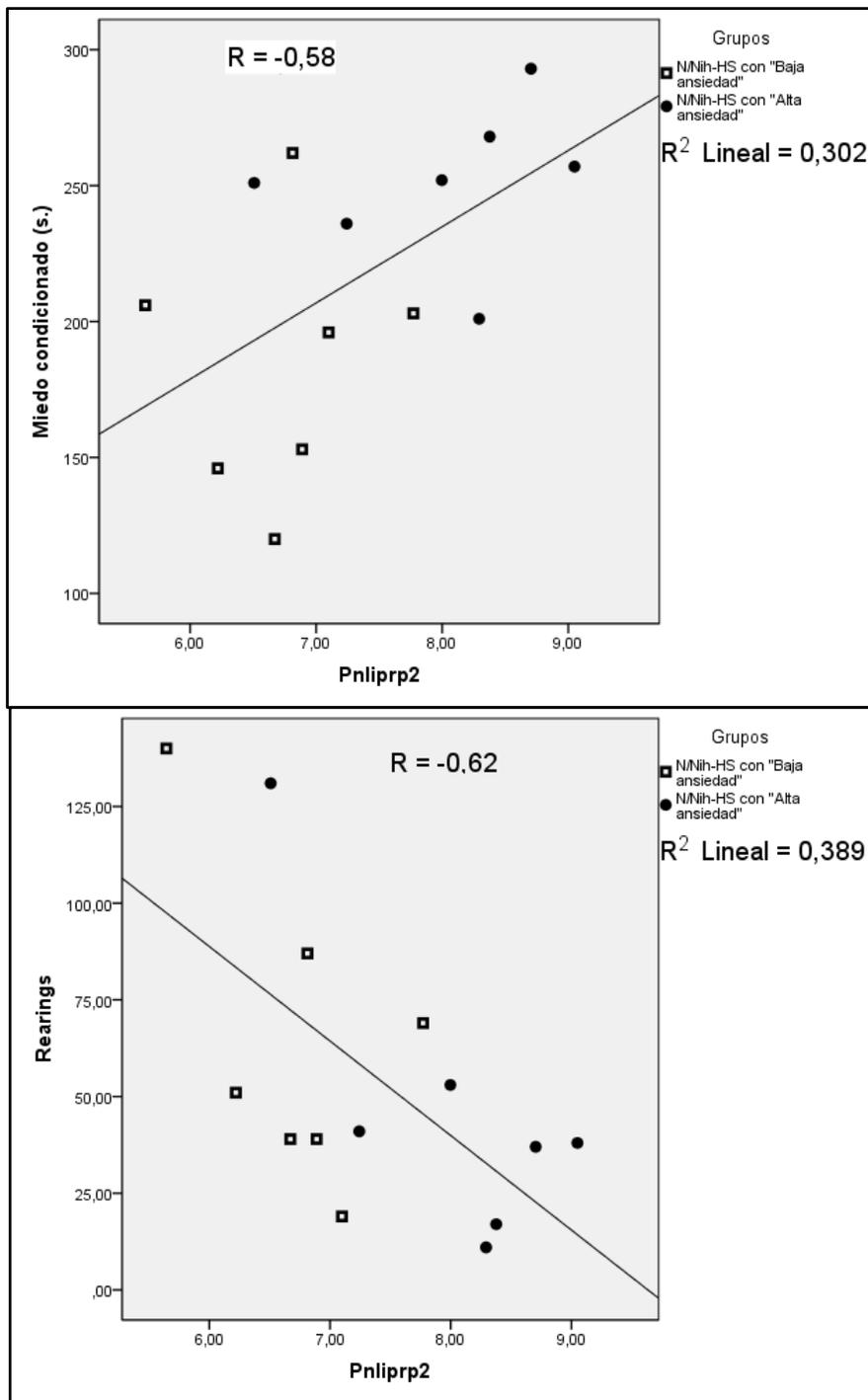


Figura 28.-Perfil de expresión del gen *Pnlipr2* y su capacidad predictiva sobre los resultados conductuales de las ratas *N/Nih-HS* extremas en ansiedad, $n = 14$.

4.2.2 Expresión genética diferencial en hipocampo de ratas N/Nih-HS extremas en ansiedad

Siguiendo el mismo procedimiento que para el microarray de las amígdalas se seleccionaron hipocampos de ratas N/Nih-HS (de la muestra original de $n = 100$ del “Estudio 1”) que mostraban valores extremos en ansiedad, esto es, en adquisición de la evitación activa en dos sentidos. La Tabla 19 muestra los valores de los subgrupos de “Baja ansiedad” y “Alta ansiedad” en las diferentes variables conductuales. Se realizó análisis de expresión génica mediante microarray, y se halla en curso la validación por qRT-PCR de una selección de genes (como hicimos con las muestras de amígdala).

Las ratas N/Nih-HS con “Alta ansiedad” presentaron tiempos más prolongados de miedo condicionado, de latencia de respuesta y menor número de cruces entre compartimentos, en comparación con las ratas con “Baja ansiedad” ($t_s(10) \geq -2,74$ con $p < 0,013$ y $z_s \geq -2,38$ con $p < 0,016$, Tabla 19). Este grupo de ratas, con elevados niveles de ansiedad, mostraron estilo de afrontamiento pasivo durante la realización de la tarea de evitación en la “*Shuttle-box*”, mientras que el grupo de ratas de “Baja ansiedad” mostró un estilo de afrontamiento más activo durante esta tarea y una tendencia a presentar mayores niveles de comportamiento exploratorio (por ejemplo, en las secciones abiertas del Laberinto Circular Elevado; aunque las diferencias entre los dos grupos de ratas no fueron significativas; Tabla 19), cercana a la significación estadística en la variable “*distance5*” (distancia recorrida durante los primeros 5 minutos de exposición al test de la “Caja nueva”, $p = 0,063$; Tabla 19).

Tabla 19.-Comparaciones de las respuestas conductuales entre grupos de ratas N/Nih-HS extremos en ansiedad.

	Muestra completa (n = 100)	Grupo de “Baja ansiedad” (n = 4)	Grupo de “Alta ansiedad” (n= 8)
Time (s)	44,9 ± 4,8	68,3 ± 23,7	40,8 ± 12,2
Entries (#)	3,5 ± 0,4	6,3 ± 2,6	3,1 ± 0,9
Head-dips (#)	5,8 ± 1,2	42,0 ± 34,0	5,6 ± 1,6
SAP (#)	7,5 ± 0,4	13,0 ± 4,6	8,3 ± 1,1
Line-crossings (#)	17,4 ± 1,2	29,3 ± 9,8	16,1 ± 2,4
Distance (cm)	2871,9 ± 145,1	3606,6 ± 170,1	2476,5 ± 447,8
Distance5' (cm)	1056,2 ± 58,9	1365,4 ± 106,6	884,0 ± 157,8 (c)
Rearings (#)	94,1 ± 11,2	36,5 ± 6,6	80,8 ± 36,4
Rearings5' (#)	25,7 ± 2,8	13,3 ± 1,5	23,4 ± 8,3
CET (#)	4,4 ± 0,3	8,3 ± 2,3	4,9 ± 1,0
Conditioned freezing (s)	219,7 ± 4,7	183,8 ± 33,7	255,8 ± 10,4 (a)
ITC (#)	15,6 ± 1,1	35,0 ± 10,0	14,6 ± 2,1 (b)
Response latency (s)	14,4 ± 0,6	7,5 ± 1,5	14,5 ± 1,6 (a, b)
SH avoidances (#)	4,4 ± 0,7	25,3 ± 4,5	2,2 ± 0,9 (a, b)

Leyenda Tabla 19: Medias ± ES de las medidas conductuales de los dos grupos de ratas N/Nih-HS. Ver Tabla 7 y 15 para definición de variables. (a) $p < 0,05$ vs. el grupo de ratas con “Leve ansiedad” (“Student’s t-test”, para muestras independientes), (b) $p < 0,05$ vs. el grupo de ratas con “Leve ansiedad” (“Mann-Whitney U Test”, para muestras independientes), (c) $p = 0,063$ vs. el grupo de ratas con “Leve ansiedad” (“Student’s t-test”, para muestras independientes).

A partir de la aplicación del análisis de Microarray, se seleccionaron 208 genes con diferente nivel de expresión en el hipocampo de los dos grupos de ratas (FDR <0,05). Del total, 120 genes presentaron sobre-expresión (el grupo de ratas de “Baja ansiedad” obtuvo mayor nivel de expresión que el otro grupo).

EL 31,73 % de estos genes (66 genes con FC >|2,19|; Tablas 20 y 21.1-3) mostraron funciones biológicas relacionadas con el SNC y, en concreto, 28 genes presentaron funciones relacionadas con neurotransmisión, sistema inmunitario, procesos hormonales, sustancias de abuso y comportamiento. De éstos, 19 se presentaron sobre-regulados y 9 sub-regulados. En la Tabla 22 se muestra el listado de genes con diferencias significativas entre los dos grupos de ratas, con funciones relacionadas con el SNC y capacidad predictiva para comportamientos relacionados con la ansiedad in/condicionada.

Tabla 20.1.-Listado de genes con sobre-expresión significativa en hipocampo de ratas N/Nih-HS y con funciones relacionadas con el SNC.

Genes	Localización (Mb)	Nombre
Accn3	4:6125614-6129660	amiloride-sensitive cation channel 3
Alx1	7:41090488-41110281	ALX homebox 1
Arhgef6	X:141946362-142068629	Rac/Cdc 42 guanine nucleotide exchange factor (GEF) 6
Calca	1:172686170-172691061	calcitonin/calcitonin-related polypeptide, alpha
Ccng1	10:25776380-25782754	cyclin G1
Cdkn3	15:22617464-22628745	cyclin-dependent kinase inhibitor 3
Crybb2	45165513-45175496 (pubmed no encontrado en ensemble)	crystallin, beta 2
Cyp11b1	7:112978156-112984086	cytochrome P450, subfamily 11B, polypeptide 1
Defa10	16:75304740-75305516	defensin alpha 10
Doxl2	4:77083806-77087592	similar to diamine oxidase-like protein 3: diamine oxidase-like protein 2
Drp2	X:121881801-121929386	dystrophin related protein 2
Galr3	117014148..117017058 (pubmed, no encontrado en ensemble)	galanin receptor 3
Gli1	7:67288462-67297461	GLI-Kruppel family member GLI1
Gna13	10:98933230-98965795	guanine nucleotide binding protein, alpha 13
H2-M9	20:1945294-1947325	histocompatibility 2, M region locus 9; similar to RT1 class I, M1, gene 2
Igfals	10:14128636-14130444	insulin-like growth factor binding protein, acid labile subunit
Lamc2	13:68152254-68210665	laminin, gamma 2
LOC681740	19477226..19657980 (pubmed, no encontrado en ensemble)	similar to jumonji protein
Lpar2	16:20081180-20085307	lysophosphatidic acid receptor 2
Mab21l1	2:145006131-145008520:1	mab-21-like 1 (C. elegans)

Datos extraídos de las bases de datos: Ensemble Genome Browser y Pubmed.

Tabla 20.2.-Listado de genes con sobre-expresión significativa en hipocampo de ratas N/Nih-HS y con funciones relacionadas con el SNC.

Genes	Localización (Mb)	Nombre
Olr220	1:164152120-164153043	olfactory receptor 220
Oprl1	3:170869291-170874913	opiate receptor-like 1
Olr594	3:71616656-71617591	olfactory receptor 594
Pah	7:24175898-24243586	phenylalanine hydroxylase
Pcdh15	20:14505890-14990127	protocadherin 15: similar to protocadherin 15
Pdgfb	7:118244386-118262021	platelet-derived growth factor beta polypeptide (simian sarcoma viral (v-sis) oncogene homolog)
Plaur	1:79708645-79712881	plasminogen activator, urokinase receptor
Pvrl1	8:46785431-46798633	poliovirus receptor-related 1
RT1-A2	20:5021800-5025330	RT1 class, CE14: RT1 class I, CE16: RT1 class Ia, locus A2: RT1 class Ib, locus CI: RT1 class Ia, locus A1: RT1 class I, A3
RT1-CE12	20:3594968-3598027	chain: class I MHC heavy chain RT1.A (n) antigen, chain: MHC class I protein, chain: MHC class I RT1.Ac heavy chain, signal peptide, RT1 class I. CE1: RT1 class I. CE12: similar to RT1 class I. CE1
RT1-T24-1	20:2907237-2922971	RT1 class I, locus T24, gene 1 (pubmed)
Rtp3	8:115388094-115392602	receptor (chemosensory) transporter protein 3
Shank2	1:204430166-204855453	SH3 and multiple ankyrin repeat domains 2
Slc22a13	8:124159275-124174462	solute carrier family 22 (organic anion cotransporter family), member 13: similar to solute carrier family 22 (organic cation transporter), member 13
Tg	7:104035776-104220754	thyroglobulin
Uncx	12:15576546-15581062	UNC homeobox
Wt1	3:90529515-90577270	Wilms tumor 1
Datos extraídos de las bases de datos: Ensemble Genome Browser y Pubmed.		

Tabla 20.3.-Listado de genes con sub-expresión significativa en hipocampo de ratas N/Nih-HS y con funciones relacionadas con el SNC.

Genes	Localización (Mb)	Nombre
Avpr1b	13:44536742-44547983	arginine vasopressin receptor 1B
Cd3e	8:47947257-47958419	CD3 molecule, epsilon polypeptide
Cd74	18:56756511-56765707	Cd74 molecule, major histocompatibility complex, class II invariant chain
Col8a1	11:43604994-43733870	collagen, type VI, alpha 1
Csad	7:140917828-140960361	cysteine sulfinic acid decarboxylase
Cyp2b12	1:81780088-81853249	cytochrome P450, family 2, subfamily b, polypeptide 2: cytochrome P450, family 2, subfamily b, polypeptide 12
Epgn	14:18573036-18579934	epithelial mitogen
G6pc	10:90343493-90403485	glucose-6-phosphatase, catalytic subunit
Gpr112l	141451375..141597555 (pubmed, no encontrado en ensemble) como GPR112 se encuentra en X:141451777-141597495 en el Ensemble Genome Browser	G protein-coupled receptor 112: G protein-coupled receptor 112 like
Kif12	5:80146349-80152996	kinesin family member 12
LOC685152	2:182161919-182181777	similar to Probable phospholipid-transproting ATPase ID (ATPase class I type 8B member 2): Atpase, class I, type 8B, member 2
LOC687426	29186757..29299098 (pubmed, no encontrado en ensemble)	similar to G protein-coupled receptor 133
Ltb	20:3666525-3668369	lymphotoxin beta (TNF superfamily, member 3)
Ltbp1	6:19942626-20354758	latent transforming groth factor beta binding protein 1
Npr3	2:61278264-61341460	natriuretic peptide receptor C/guanylate cyclase C (atrionatriuretic peptide receptor C)
Nrg2	18:28650123-28828772	neuregulin 2
P2ry1	2:150460361-150465862	purinergic receptor P2Y, G-protein coupled, 1 (pubmed)
Pdilt	1:177750349-177782699	protein disulfide isomerase-like protein of the testis
RT1-Da	20:2907237-2922971	RT1 class II, locus Da (pubmed)
Serpina5	6:128156901-128161329	serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade A, member 5
Slc10a4	14:37602855-37608704	solute carrier family 10 (sodium/bile acid cotransporter family), member 4
Slc5a7	9:133838-165939	solute carrier family 5 (choline transporter), member 7
Sneg	16:10025979-10030516	synuclein, gamma (breast cancer-specific protein 1)
Sostdc1	6:55066277-55070453	sclerostin domain containing 1 (pudmed)
Spata3	9:84726151-84738071	spermatogenesis associated 3 (pubmed)
Spp1	6:98308042-98327175	secreted phosphoprotein 1 (pubmed)
Trh	4:126425185-126427651	thyrotropin releasing hormone
Vom2r45	2:153931980-153958228	vomeronasal 2 receptor 45
Vom2r8	1:49591810-49631453	vomeronasal 2 receptor 8

Datos extraídos de las bases de datos: Ensemble Genome Browser y Pubmed.

Tabla 21.-Lista de genes sobre/sub-expresados en hipocampo entre grupos de ratas N/Nih-HS extremos en ansiedad: funciones relacionadas con el Sistema Nervioso Central y capacidad predictiva de comportamientos implicados en la ansiedad in/condicionada.

Símbolo	Descripción	Funciones
Genes con sobre-expresión		
Mab2111	Mab-21-like 1 (C. elegans)	Este gen está relacionado con la formación de los órganos sensoriales (desarrollo del ojo).
Calca	Calcitonin/calcitonin-related polypeptide, alpha	Este gen participa en la regulación de la producción de citoquinas y está relacionado con la detección de estímulos (de temperatura y dolor); también está relacionado con la respuesta de defensa, cognición, percepción sensorial y conducta de ingesta.
Drp2	Dystrophin related protein 2	Este gen está relacionado con la proyección neural.
Gli1	GLI-Kruppel family member GLI1	Este gen está involucrado en la gametogénesis, reproducción sexual, desarrollo de estructuras del Sistema Nervioso Central, como: diencéfalo, cerebelo, glándula pituitaria.
H2-M9	Histocompatibility 2, M region locus 9; similar to RT1 class I, M1, gene	Este gen está involucrado en la respuesta inmune.
Wt1	Wilms tumor 1	Este gen está involucrado en la gametogénesis, en el desarrollo del sistema urogenital y órganos sensoriales (ojos), características sexuales primarias y participa en la regulación de la transcripción de RNA.
RT1-EC12	Chain: class I MHC heavy chain RT1.A (n) antigen, chain: MHC class I protein, chain: MHC class I RT1.Ac	Este gen está involucrado en la respuesta inmune, en el trastorno tiroideo y en la Diabetes Mellitus tipo II.
RT1-T24-1	RT1 class I, locus T24, gene 1 (pubmed)	Este gen está involucrado en la respuesta inmune.
Rtp3	Receptor (chemosensory) transporter protein 3	Este gen está involucrado en la percepción sensorial, procesos neurológicos y detección de estímulos sensoriales.
Olr594	Olfactory receptor 594	Este gen está relacionado con la percepción sensorial (percepción del olor), procesos neurológicos, cognición; y participa en las vías de señalización de las proteínas G.
Genes con sub-expresión		
Ltb	Lymphotoxin beta (TNF superfamily, member 3)	Este gen está involucrado en la producción de citoquinas y en el desarrollo de la respuesta inmune.
Serpina5	Serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade A, member 5	Este gen está involucrado en la gametogénesis, reproducción sexual y en la regulación de la respuesta hacia estímulos externos.
Slc5a7	Solute carrier family 5 (choline transporter), member 7	Este gen está involucrado en la regulación de neurotransmisión y transmisión neuromuscular, procesos metabólicos y biosintéticos de la acetilcolina; y participa en el transporte de alcohol, procesos neurológicos, impulso nervioso y procesos metabólicos derivados.
Avpr1b	Arginine vasopressin receptor 1B	Este gen está involucrado en la regulación de la presión sanguínea por acción hormonal (vasopresina), regulación de la secreción de glutamato y procesos endocrinos.
Sncg	Synuclein, gamma (breast cancer-specific protein 1)	Este gen está involucrado en el comportamiento locomotor, en la regulación de la dopamina y en la secreción de catecolaminas y aminos.

4.2.2.1 Genes validados con qRT-PCR

Catorce genes con diferente perfil de expresión fueron seleccionados como candidatos a validar por medio de qRT-PCR (Avpr1b, H2-M9, Ltb, Gna13, Slc5a7, Slc10a4, Trh, Cd74, RT1-EC12, Drp2, Accn3, Galr3, Oprl1 y Nrg2).

De igual forma que se hizo con los resultados de expresión génica en amígdala también se realizaron análisis de regresión entre los niveles de expresión de algunos genes en el hipocampo (con funciones en el SNC) y diferentes variables conductuales. Se presentan tales análisis de regresión en la Tabla 22.

Tabla 22.-Capacidad predictiva de los genes diferencialmente expresados de las ratas N/Nih-HS sobre su conducta (modelo de pasos sucesivos hacia adelante, step 1, n = 12).

Variabes predictivas	Variabes dependientes	Coefficiente de Pearsons	R cuadrado	p
Mab2111	SH Evitaciones	0,59	0,34	0,05
	CET	0,67	0,45	0,02
Calca	Line-crossing	0,61	0,37	0,05
Drp2	ITC	0,67	0,44	0,02
	Distancia	0,61	0,37	0,04
Gli1	Distancia	0,66	0,44	0,03
H2-M9	SH Evitaciones	0,85	0,71	0,00
	Entradas	0,65	0,42	0,03
Wt1	Line-crossing	0,76	0,57	0,01
	SAP	0,79	0,62	0,00
	CET	0,86	0,74	0,00
RT1-EC12	SH Evitaciones	0,83	0,68	0,00
	Latencia de respuesta	-0,70	0,49	0,02
RT1-T24-1	SH Evitaciones	0,70	0,49	0,01
Rtp3	Rearings	-0,70	0,49	0,02
Olr594	Head-dips	0,79	0,62	0,00
	Head-dips	-0,61	0,38	0,05
Ltb	Miedo condicionado	0,61	0,37	0,04
	SH Evitaciones	-0,86	0,74	0,00
Serpina5	Distancia	-0,64	0,42	0,02
	Entradas	-0,67	0,44	0,04
Slc5a7	Line-crossing	-0,81	0,65	0,01
	SAP	-0,83	0,69	0,00
	CET	-0,63	0,40	0,04
	Miedo condicionado	0,75	0,56	0,01
Avpr1b	SH Evitaciones	-0,68	0,46	0,02
	ITC	-0,74	0,55	0,01
	Distancia	-0,65	0,42	0,03

Los análisis de regresión realizados sobre los genes candidatos a validar mostraron que (Tabla 22):

(1) Los genes *Avpr1b* (“*Arginine vasopressin receptor 1B*”), *Ltb* (“*Lymphotoxin beta (TNF superfamily, member 3)*”) y *Slc5a7* (“*Solute carrier family 5 (choline transporter), member 7*”) fueron predictores de variables representativas de la ansiedad incondicionada (Figura 29). Así, los niveles de expresión del gen *Avpr1b* predicen negativamente la distancia total recorrida durante la sesión del test “Caja nueva” ($r = -0,65$; $R^2 = 0,42$ con $p = 0,03$), la expresión del gen *Ltb* se relaciona negativamente con el número de “*head-dips*” ($r = -0,61$; $R^2 = 0,38$ con $p = 0,05$; Tabla 22) y el gen *Slc5a7* predice negativamente el número de SAP, de “*line-crossings*” y del número de entradas en las secciones abiertas del test del Laberinto Circular Elevado ($r \geq -0,67$; $R^2 \geq 0,44$ con $p < 0,04$; Figura 29).

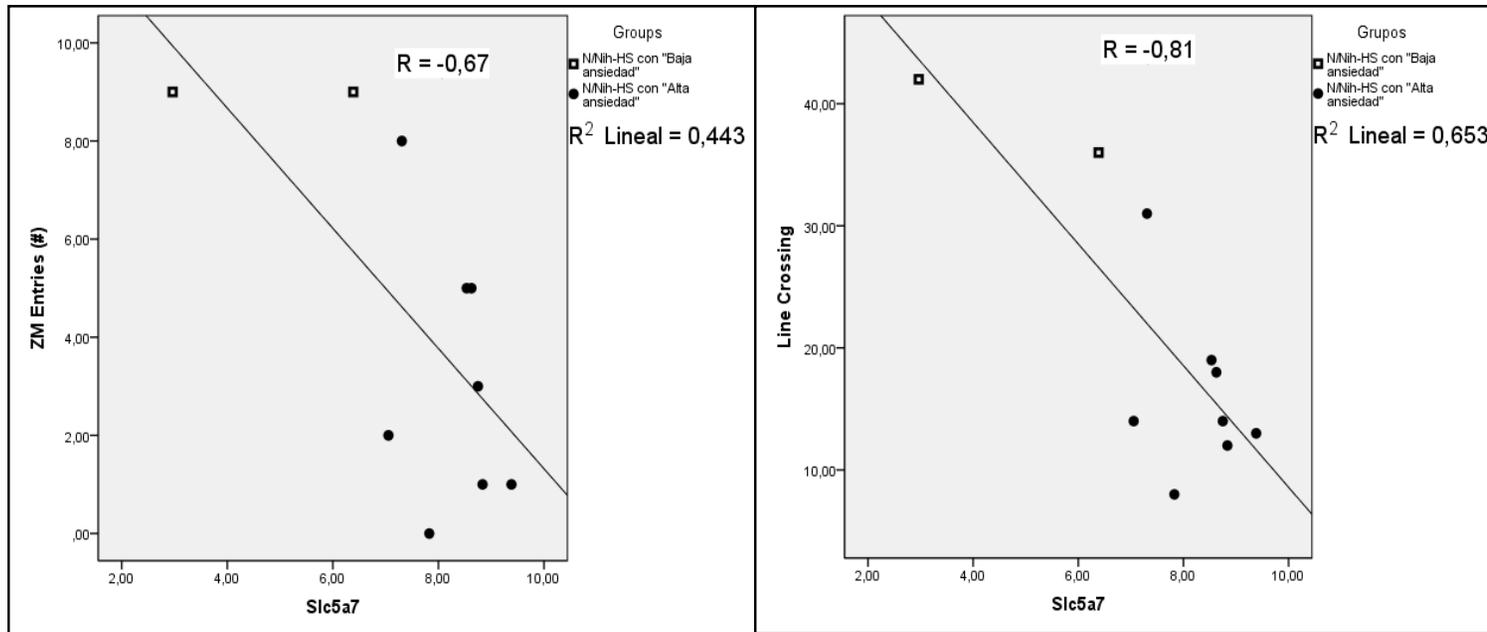


Figura 29.-Capacidad predictiva de los genes *Slc5a7* en variables relacionadas con la ansiedad incondicionada (Laberinto Circular Elevado, $n = 10$).

(2) Cinco de los genes candidatos a validar por qRT-PCR mostraron capacidad predictiva en variables relacionadas con la ansiedad condicionada (Figura 30):

- El gen H2-M9 (sobre-expresado en el subgrupo de “Baja ansiedad”), fue predictor positivo del número de evitaciones ($r = 0,85$; $R^2 = 0,71$ con $p = 0,001$).
- El gen Ltb (sub-expresado en el subgrupo de “Baja ansiedad”), presentó capacidad predictiva sobre el miedo condicionado y el número de evitaciones ($R^2 \geq 0,37$ con $p = 0,04$).
- Y el gen Avpr1b (sub-expresado en el subgrupo de “Baja ansiedad”) mostró capacidad predictiva para comportamientos relacionados con la ansiedad condicionada, como el miedo condicionado, el número de evitaciones y el número de cruces de compartimento entre ensayos ($R^2 \geq 0,46$ con $p < 0,02$) (ver Figura 30).

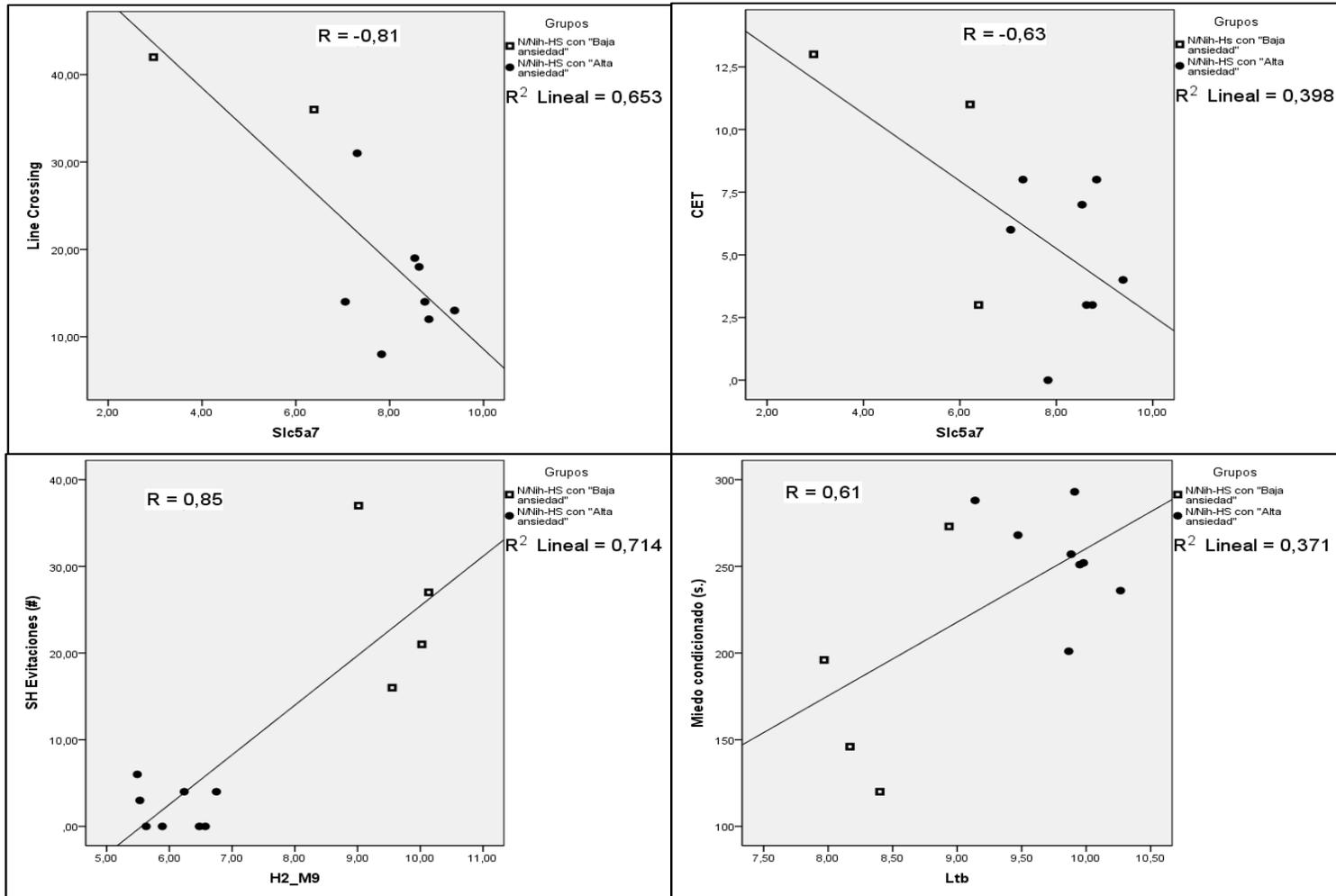


Figura 30.-Capacidad predictiva de los genes *Slc5a7*, *Ltb*, *H2-M9* y *Avpr1b* en variables relacionadas con la ansiedad condicionada (prueba de "Shuttle-box", n = 10-12).

Los únicos genes que sólo presentaron capacidad predictiva sobre variables relacionadas con la ansiedad condicionada (y no con la ansiedad incondicionada) fueron Mab21I1 y RT1-CE12. Su sobre-expresión predijo mayor número de evitaciones y más cambios de compartimento –CET- durante el periodo de habituación ($r = 0,67$; $R^2 = 0,45$ con $p < 0,02$; Tabla 22 y Figura 31), en el caso del gen Mab21I1, y menor latencia de respuesta en el caso del gen RT1-EC12 ($r = -0,70$; $R^2 = 0,49$ con $p < 0,02$; ver Figura 31).

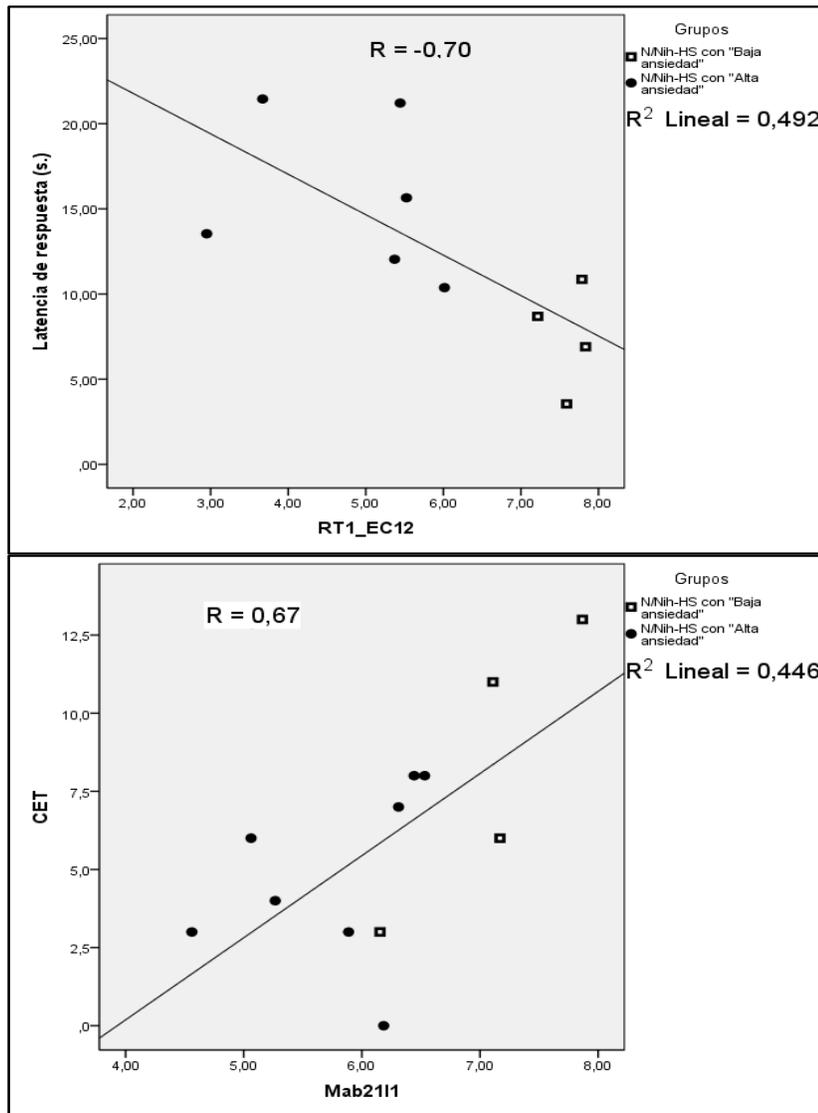


Figura 31.-Capacidad predictiva de los genes Mab21I1 y RT1-Ec12 en variables relacionadas con la ansiedad condicionada (prueba de "Shuttle-box", $n = 12$).

4.2.2.2 Otros genes con función en el SNC

Otros genes identificados con funciones relacionadas con el SNC y que mostraron capacidad predictora en relación a las respuestas de ansiedad y miedo (Tabla 22) fueron, por ejemplo:

- El gen Calca (“*Calcitonina/calcitonina-relacionado con el polipéptido, alpha*”) y el gen olfativo Olr594, que fueron predictivos de comportamientos relacionados con la ansiedad incondicionada. En concreto, las ratas que presentaron mayores niveles de expresión en el gen Calca (subgrupo de “Baja ansiedad”) también fueron las que mostraron mayor número de “*line-crossings*” ($r = 0,61$; $R^2 = 0,37$ con $p < 0,05$; Figura 32) y más número de “*head-dips*” ($r = 0,79$; $R^2 = 0,62$ con $p < 0,00$, caso, este último, del gen Olr594; ver Tabla 22).

- Los genes Gli1 (“*GLI-Kruppel family member GLI 1 gene*”) y Wt1 (“*Wilms tumor 1*”) también mostraron ser predictivos de comportamientos relacionados con la ansiedad incondicionada. Así, los niveles de expresión de los genes Wt1 y Gli1 se relacionan positivamente con el número de SAP, el número de entradas en las secciones abiertas, el número de cruces entre las secciones durante la prueba del Laberinto Circular Elevado ($r \geq 0,65$; $R^2 \geq 0,42$ con $p = 0,03$, Figura 32) y con mayor comportamiento exploratorio en el test de la “Caja nueva” ($r = 0,66$; $R^2 = 0,44$ con $p = 0,03$, caso Figura 32).

- Por último, el gen Serpina 5 (relacionado con la reproducción sexual) se relacionó negativamente con la distancia horizontal recorrida durante el test de la “Caja nueva” ($r = -0,64$; $R^2 = 0,42$ con $p = 0,02$). Los animales que presentaron menores niveles de expresión en este gen (subgrupo de “Baja ansiedad”) fueron los que mayor distancia recorrieron durante el test de “Caja nueva” (Figura 32).

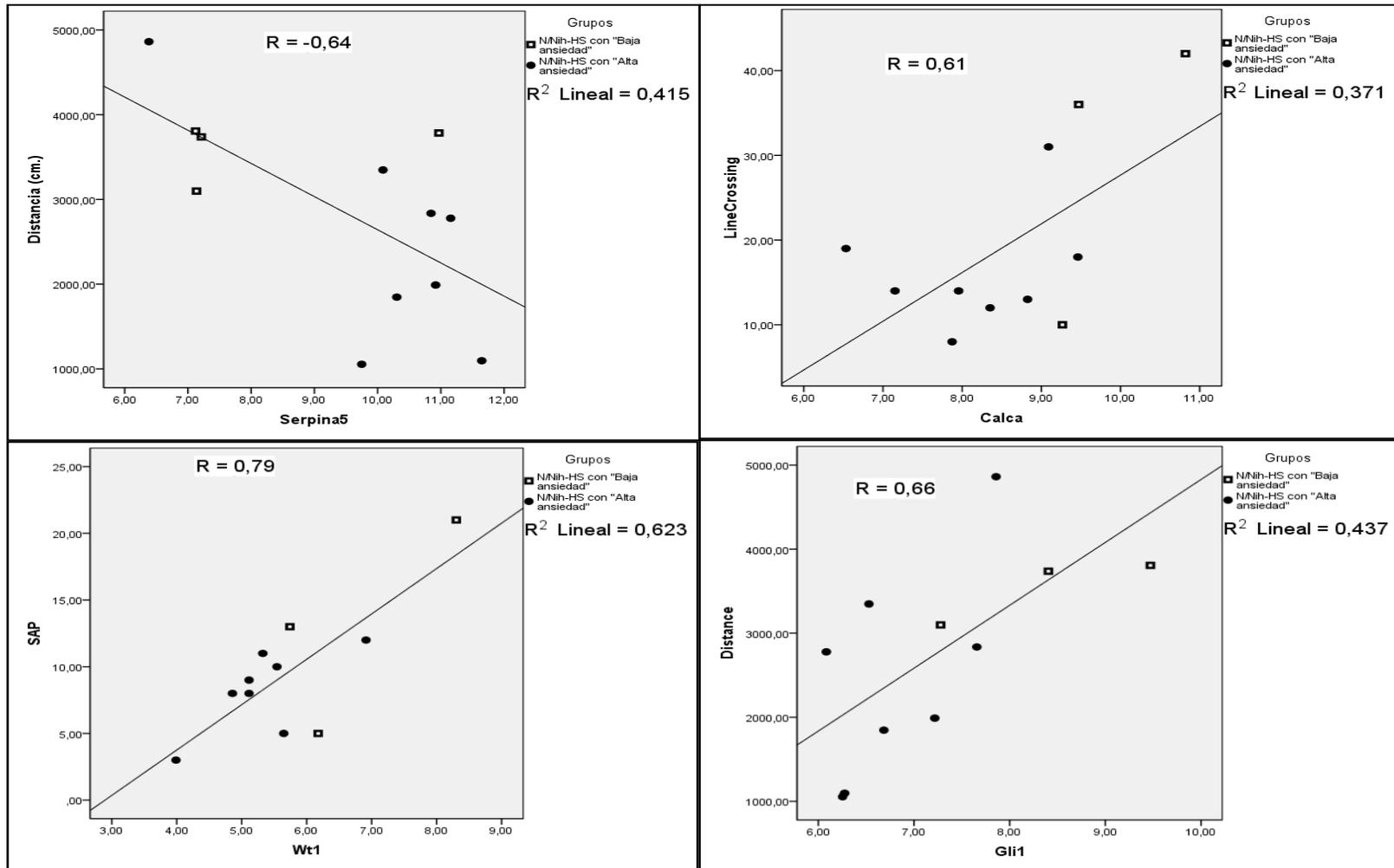


Figura 32.-Capacidad predictiva de los genes *Wt1*, *Serpina 5*, *Calca* y *Gli1* en variables relacionadas con la ansiedad incondicionada ($n = 12$)

5. DISCUSIÓN

5.1 PARTE I: Perfiles conductuales ansioso-depresivos y neuroendocrinos

5.1.1 Caracterización conductual y hormonal de la ratas N/Nih-HS en situaciones de conflicto y estrés (Estudio 1 y 2)

A partir de los experimentos realizados con las ratas N/Nih-HS comparadas con las RHA-I y RLA-I en el Estudio 1 y Estudio 2, se puede concluir que este stock de ratas presentan un perfil conductual similar al observado en las ratas RLA-I (estilo de afrontamiento pasivo) en pruebas de miedo, y de ansiedad condicionada como la tarea de evitación en la tarea de “*Shuttle-box*”, junto con comportamientos de exploración y ansiedad incondicionada en su mayoría intermedios entre los valores mostrados por las dos cepas de ratas *Roman* en la prueba del Laberinto Circular Elevado y en test de Campo Abierto (López-Aumatell y cols., 2008; 2009b). En otro estudio paralelo (Experimento 2 del “Estudio 1”) se mostró como las ratas N/Nih-HS presentaban comportamientos de tipo depresivo –afrontamiento pasivo- durante la prueba de natación forzada (mostrando tiempos largos de inmovilidad y periodos muy cortos de natación activa o lucha).

En mayor detalle, en relación al test de Campo Abierto, las ratas N/Nih-HS mostraron también un perfil de comportamiento en algunos aspectos más cercano al de las ratas RLA-I que al de la cepa RHA-I. La selección realizada en las ratas N/Nih-HS a partir de las puntuaciones extremas (altas o bajas) obtenidas en variables conductuales relevantes muestra que los animales con mayor presencia de “*grooming*” son los que presentan menores niveles de respuestas de petrificación y de SAP (evaluación de riesgo; véase Figura 13), mientras que las ratas con mayores niveles de respuestas de petrificación (“*freezing*”) son las que realizan menor conducta de “*grooming*”, menos exploración/actividad horizontal y menos entradas y tiempo en las secciones abiertas del Laberinto Circular Elevado (ver Figura 14).

Según nuestras hipótesis iniciales, asumiendo que tanto la “petrificación” como el “*grooming*” son indicadores directos de ansiedad/miedo, las ratas que realizaran más tiempo de “*grooming*” serían las que presentarían también más tiempo de “petrificación”,

aunque a partir de los resultados mencionados en el párrafo anterior debemos concluir que no es así, sino más bien al contrario. Además, y confirmando lo anterior, el análisis factorial (Tabla 13) muestra que ambas variables tienen una relación inversa entre sí (Figuras 13). Los pesos obtenidos en el análisis factorial (solución de dos factores) en las variables del Laberinto Circular Elevado y el test de Campo Abierto, nos hacen pensar que la presencia de la conducta de petrificación (“*freezing*”) es la que selecciona entre los animales que actúan (que se muestran activos) o no durante las pruebas –en especial en el Campo Abierto-. Ello sugiere que el animal se enfrenta a un conflicto de “aproximación/evitación” en las fases iniciales del test (ver p. ej. Gray 1982; Gray y McNaughton 2000), con una tendencia a explorar activamente opuesta a otra de “protegerse”, o “petrificarse”. Para que la conducta de “*grooming*” aparezca es necesario que el animal deje de estar “petrificado” (es decir, que se haya iniciado el movimiento o la actividad) (Estanislau y cols. 2012 a-b; Kalueff y Tuohimaa, 2005). Por tanto, si bien las comparaciones entre grupos o tipos de ratas diferentes indican que la conducta de “*grooming*” se presenta en mayor grado en las ratas con niveles de ansiedad basal más altos, como son por ejemplo las ratas N/Nih-HS y RLA-I (respecto a las RHA-I; Tabla 11 y Figura 14), los resultados descritos, de la comparación de subgrupos extremos (en “*grooming*” o tiempo de petrificación) y del análisis correlacional/factorial, claramente indican que el significado de las respuestas de “*grooming*” intratest e intrasujeto es más complejo y va más allá de una simple relación directa con la ansiedad, el miedo o el estrés (p. ej. Estanislau y cols. 2012 a-b; Kalueff y Tuohimaa, 2005).

A partir de estos resultados es necesario realizar más experimentos en este sentido que ayuden a esclarecer la función de la conducta de “*grooming*” como marcador de ansiedad en las ratas N/Nih-HS. Algunos de estos experimentos se hallan ya en marcha en nuestro laboratorio (Estanislau y cols., 2012 a-b; Kalueff y Tuohimaa, 2005).

A nivel hormonal, en el Estudio 1 se presentó por primera vez, la respuesta hormonal del eje HPA, y el grado de reactividad de la prolactina ante una situación de novedad/estrés en las ratas N/Nih-HS. Las ratas N/Nih-HS mostraron niveles plasmáticos de corticosterona y ACTH similares a las ratas RLA-I, y superiores a los de las RHA-I, mientras que el incremento post-estrés de los niveles plasmáticos de prolactina fue mayor al observado en las dos cepas de ratas *Roman*; La prolactina tiene un papel importante como

mediadora entre el sistema immune y endocrino, e implicación en la regulación de la homeostasis del organismo durante la exposición a situaciones estresantes o de novedad (Freeman y cols., 2000). Es bien conocido que diferentes tipos de estímulos ansiógenos, incluyendo la exposición a situaciones de novedad, el condicionamiento de miedo, la exposición a una situación estresante aguda o crónica, a estímulos nociceptivos o ejercicio físico, activan las neuronas que regulan la secreción de prolactina en diferentes áreas cerebrales (Onaka y cols., 2010). Varios estudios muestran especificidad de la respuesta de la prolactina en función del tipo de situación estresante (Ratner y cols., 1989; Yelvington y cols., 1984; 1985). Otros estudios muestran que el grado de control de cada organismo sobre la fuente de estrés será determinante en la respuesta de la prolactina frente a la situación (Steime y cols., 1997b; Telner y cols., 1982).

Estructuras relacionadas con la respuesta de estrés, también parecen estar vinculadas a la secreción y aumento/disminución de estas hormonas, como por ejemplo los sistemas dopaminérgicos centrales (López-Aumatell y cols., 2009). Estudios anteriores indican que las ratas RHA-I muestran respecto a las RLA-I, un decremento en la respuesta al estrés del eje hipotálamo-hipofiso-adrenal ante un estímulo aversivo y mayor actividad cortical en el sistema dopaminérgico y serotoninérgico (Steimer y cols., 1997a; Aguilar y cols., 2004), así como incremento de la actividad locomotora y la activación de los procesos cognitivos enfocados al afrontamiento activo del estímulo estresante (Aguilar y cols., 2004; Driscoll y cols., 1998). Estos resultados concuerdan con los niveles hormonales encontrados en el Estudio 1, puesto que el grupo de RHA-I, presentó el menor nivel basal tanto en prolactina como en ACTH, así como el menor incremento post-estrés, en comparación las ratas RLA-I y N/Nih-HS. Así mismo, parecen coherentes con la conocida función dopaminérgica incrementada (teniendo en cuenta el papel de la dopamina como inhibidor de la prolactina) en las ratas RHA (Driscoll y cols., 1998; Freeman y cols., 2000). En este sentido, análisis genéticos en las subcepas suizas de ratas RHA y RLA han mostrado como la reactividad de la prolactina al estrés es una característica neuroendocrina discriminante de la divergencia entre las cepas de ratas *Roman* (Castanon y cols., 1995; Castanon y cols., 1992; Steimer y Driscoll, 2005; Steimer y cols., 1997).

Estudios recientes con microarray (Sabariego y cols., 2011) mostraron que las ratas RLA-I presentaban, en estado basal, sobre-expresión en el gen regulador de la prolactina en el cerebro, en relación a los niveles de expresión obtenidos por las ratas RHA-I.

De hecho, el estudio genético de Castanon y cols. (1995) con ratas de las sublíneas suizas RHA y RLA mostró que la capacidad de adquirir la tarea de evitación activa en dos sentidos y la respuesta de la prolactina al estrés fueron las variables que mejor diferenciaron ambas líneas de ratas *Roman*, mientras que la inter-correlación de ambas variables en cruces segregados sugirió que podrían compartir mecanismos reguladores comunes que estarían controlados a nivel genético (Castanon y cols., 1995).

Los incrementos de los niveles plasmáticos de prolactina durante la exposición a una situación aversiva, están relacionados con estrategias pasivas de afrontamiento (Castanon y cols., 1995; Steimer y Driscoll, 2003; Steimer y Driscoll, 2005; Steimer y cols., 1997b); esto es coherente con el perfil de comportamiento ansioso/miedoso y pasivo característico de las ratas RLA-I, en comparación con las RHA-I, que muestran respuestas proactivas de afrontamiento (Castanon y cols., 1995; Driscoll y cols., 1998; 2009; Escorihuela y cols., 1999; López-Aumatell y cols., 2009a; 2009b; Steimer y Driscoll, 2005; Steimer y cols., 1997; 1998).

Las diferencias encontradas en los niveles de reactividad de prolactina entre las ratas N/Nih-HS y ambas cepas *Roman* podrían estar relacionadas con diferente “*background*” genético, ya que las ratas *Roman* derivan de ratas Wistar mientras que las ratas N/Nih-HS proceden del cruce de ocho cepas consanguíneas genéticamente separadas entre sí.

Cabe destacar, en este sentido, que las ratas Wistar-Kyoto (WKY) son una de las ocho cepas parentales de las ratas N/Nih-HS, y representan uno de los mejores modelos animales de depresión existentes (Armario y cols., 1995; Braw y cols., 2006; Malkesman y cols., 2005; 2006). Las ratas WKY muestran un perfil de afrontamiento pasivo durante la prueba de natación forzada, en el “*hole board test*”, el “*open-field test*” y la adquisición de la tarea de evitación activa en dos sentidos en la tarea de “*Shuttle-box*”, así como también muestran niveles elevados de corticosterona y ACTH tras un estrés (Gómez y cols., 1996;

Lahmame y cols., 1997). Parece, por tanto, que las ratas N/Nih-HS han retenido algunos de los rasgos fenotípicos de las WKY.

A partir de los resultados obtenidos (Estudio 1 y Estudio 2), y en concordancia con estudios previos (López-Aumatell y cols., 2008; 2009b; Vicens-Costa y cols., 2011), podemos concluir que las ratas N/Nih-HS presentan un perfil de comportamiento defensivo y de respuestas hormonales cercano al estilo de afrontamiento pasivo característico de las ratas RLA-I, como indican por los siguientes aspectos: (a) tiempos prolongados de miedo condicionado y pobre adquisición de la actividad de evitación activa en dos sentidos; (b) relativa reducción del comportamiento espontáneo de exploración en las pruebas de ansiedad incondicionada; (c) incremento en las repuestas hormonales antes estrés, y (d) comportamiento de tipo depresivo durante la prueba de natación forzada. Por tanto, las ratas N/Nih-HS se caracterizan por presentar niveles relativamente altos de ansiedad (especialmente de ansiedad condicionada), perfil de afrontamiento pasivo y vulnerabilidad hacia el estrés.

5.2 PARTE II: Expresión génica diferencial en amígdala e hipocampo en función de los niveles de ansiedad y miedo

5.2.1 Expresión genética diferencial en amígdala de ratas N/Nih-HS extremas en ansiedad

En un esfuerzo para la comprensión de las respuestas genéticas producidas en estado basal por las ratas de la cepa N/Nih-HS, se aplicó el análisis de microarray con el objetivo de identificar cambios en la expresión genética amigdalar relacionados con la ansiedad y el miedo. Como se describe en los “*Resultados*”, se identificaron 414 genes en amígdala con diferente perfil de expresión genética entre los dos grupos de ratas seleccionados por sus valores extremos en ansiedad condicionada (valores de evitación activa en dos sentidos en la *shuttle-box*). Los resultados de los genes seleccionados para validar por qRT-PCR (Avpr1b, H2-M9, Ucn3, Arr3, Tacr3 y Prl4a1), sugieren la vinculación de las respuestas conductuales divergentes (en los subgrupos “extremos” de ratas) con el nivel de expresión genética diferencial y las funciones neuroendocrinas subyacentes (Tabla 17). La replicación de los resultados conductuales obtenidos por estas ratas con respecto a estudios previos de nuestro laboratorio (López-Aumatell y cols., 2008; 2009b; Vicens-Costa y cols., 2011), nos sirvió de control interno para las interpretaciones conductuales y las relaciones con los niveles de expresión génica diferencial.

Los genes Ucn3, Arr3, Tacr3 y H2-M9 fueron validados a partir de la aplicación de la técnica qRT-PCR (Tabla 16). Dos de ellos, el gen Urocortina 3 (Ucn3) y el gen receptor de la taquinina 3 (Tacr3; también conocido como Neurokinin 3, Nker y Nmkr), presentaron niveles de expresión más altos en las ratas con “Alta ansiedad”. Estos genes están involucrados en las vías de señalización de las proteínas G y los dos participan en la regulación de la respuesta de las hormonas esteroideas. En concreto, el gen Ucn3, identificado en humanos y roedores, es miembro de la familia de péptidos del factor liberador de corticotropina (CRF) (Lewis y cols., 2001), presenta elevada afinidad por el tipo 2 del receptor CRF (CRFR2) pero no tanta por el receptor de tipo 1 (CRFR1, Lewis y cols., 2001; Fekete y cols., 2007). El Ucn3 se expresa en neuronas localizadas en el hipotálamo y amígdala medial (Li y cols., 2002), y, de forma similar al neuropéptido

encefalina (miembro de la familia de los péptidos opioides con gran afinidad por el receptor delta opioide), se ha involucrado en la modulación de las respuestas de estrés (Janecka y cols., 2004). La interacción precisa del gen *Ucn3* con los cambios hormonales y conductuales involucrados en las respuestas de estrés es aún controvertida, ya que en algunos estudios la inyección intracerebral de *Ucn3* indujo incrementos plasmáticos de ACTH y corticosterona en ratas, mientras que otros estudios de tipo conductual no mostraron resultados coherentes con dicha evidencia hormonal (Jamieson y cols., 2006). En nuestros resultados no obtuvimos, sin embargo, relaciones predictivas entre la expresión diferencial de este gen y comportamientos relacionados con la ansiedad y el miedo.

Al igual que la Urocortina, el gen *Tacr3* está implicado en procesos hormonales, en concreto en la modulación de los esteroides sexuales sobre la secreción de gonadotropinas, y se ha sugerido que podría modular la secreción de GnRH desde los terminales nerviosos de la eminencia media a través de los receptores NK3 (Navarro y cols., 2011; Sladek y cols., 2011). Estudios previos lo han identificado en regiones involucradas en los trastornos mentales del estado de ánimo y del consumo de sustancias de abuso (Lessard y cols., 2009). Experimentos en varias especies de mamíferos han mostrado que la administración de antagonistas NK3R reducía la presión sanguínea en ratas hipertensas espontáneas (Lessard y cols., 2003), y bloqueaba la actividad locomotora y comportamientos ansiosos producidos por el consumo de cocaína en tities (De Souza Silva y cols., 2006). En cambio, la administración del agonista NK3 inyectado en el SNC y en el área tegmental ventral incrementaba la actividad locomotora y el comportamiento de “rearing” en ratas (Stoessl y cols., 1990). De forma paradójica, nuestros resultados sugieren que el gen *Tacr3* podría tener capacidad predictiva sobre el estilo de afrontamiento pasivo durante la tarea “*Shuttle-box*” (Tabla 18 y Figura 16), es decir, en ratas con niveles sobre-expresados en este gen se podría esperar un comportamiento pasivo (conducta de petrificación) en pruebas conductuales relacionadas con la ansiedad condicionada, en las que mostrarán periodos más largos de miedo condicionado y menor número de evitaciones.

Los otros genes validados a partir de la aplicación de la técnica qRT-PCR fueron los genes *Arr3* y *H2-M9*. El gen *H2-M9* está involucrado en la respuesta inmune, pero

actualmente existe gran desconocimiento sobre sus funciones, y por ello será necesario esperar futuras investigaciones (Hurt y cols., 2004).

El gen Arr3 subyace a la regulación de la arrestina 3 (también “Arrestina C”), implicada en la percepción visual, fosforilación de proteínas y en particular procesos relacionados con proteínas G. El Arr3 se halla presente en la retina y en la glándula pineal, y se ha sugerido que este gen participa en las cascadas de señalización del impulso nervioso de la visión así como en la regulación de ritmos circadianos (Craft y cols., 1994).

Algunos estudios recientes han sugerido interacciones entre el receptor D2, la arrestina 2 endógena y la arrestina 3 en las células NS20Y, aunque otros autores indican que la colocolización elevada de la arrestina 3 y del receptor D2 de la dopamina no reflejan interacción entre estas proteínas (ver revisión en Macey y cols., 2004). En la Figura 33 se muestra la colocolización a nivel molecular de la arrestina 3 y del receptor de dopamina D2.

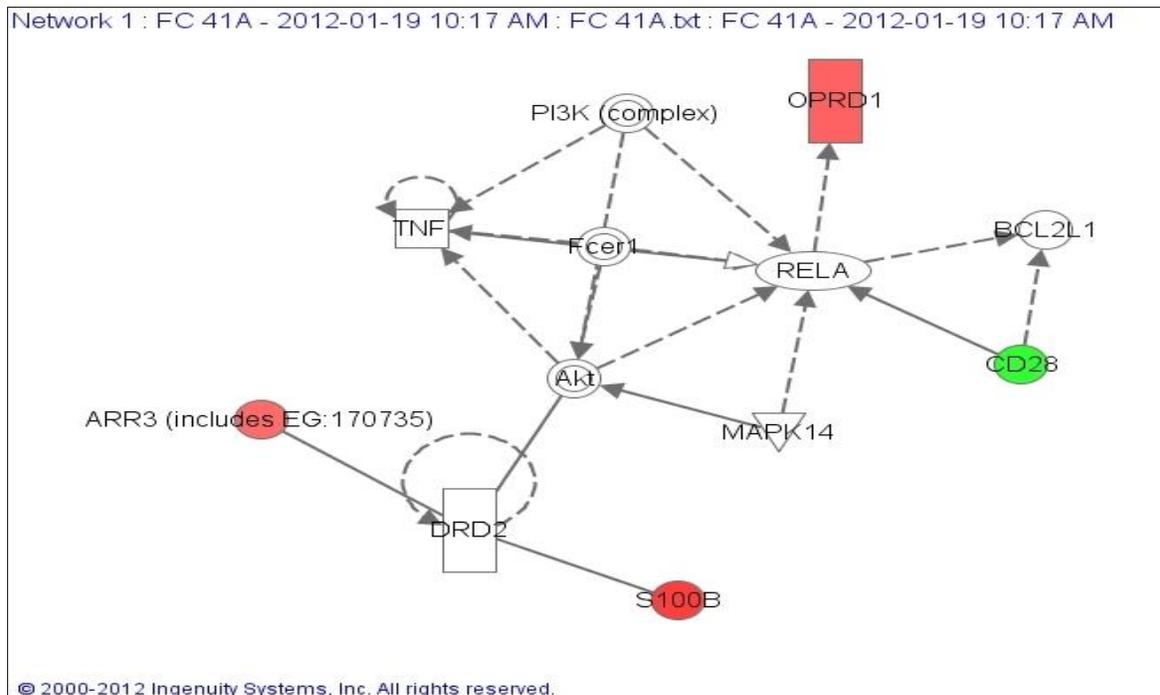


Figura 33.-Red de las vías moleculares reguladas por genes con expresión diferencial en ratas N/Nih-HS extremas en ansiedad (extraído de Ingenuity Systems, Inc.). DRD2: receptor 2 dopaminérgico, Akt: proteína kinasa BCP (“serine/threonin specific protein kinase”), MAPK14: MAP quinasa 14 (enzima en humanos por el gen mapk14), RELA: el gen RELA en humanos condifica el factor de transcripción p65, Fcεr1: “Anti-Mouse Fc epsilon Receptor I alpha”, Complejo PI3K (“phosphatidyl inositol-3 kinase): se activa por el receptor de tirosina kinasa y otros tipos de receptores, BCL2L1: pertenece a las proteínas BCL-2 (el gen que las codifica gen es inhibidor de la muerte celular, TNF: “tumor necrosis factor. Genes que aparecen en nuestro estudio: Arr3 (arrestina 3), S100b, Cd28 y Oprd1 (receptor opiode).

A partir del análisis de nuestros resultados hemos detectado sobre-regulación en los niveles de expresión en estos genes, y de los análisis de regresión se puede sugerir que estos genes presentan capacidad predictiva en relación a comportamientos relacionados con la ansiedad in/condicionada de las ratas, pero en sentido opuesto. Los niveles de expresión elevados en el gen H2-M9, han mostrado estar asociados a la disminución del comportamiento exploratorio durante las pruebas de ansiedad incondicionada como en el Laberinto Circular Elevado (menor conducta de evaluación del riesgo, SAP) y latencias más altas en entrar por primera vez en las secciones abiertas, Figura 15). Es decir, las ratas que presentaran mayores niveles de expresión en este gen mostrarían más tendencia a comportamientos inhibidos, al contrario de lo que observamos en los análisis de regresión

del gen *Arr3*, en que los niveles altos de expresión predijeron un estilo de afrontamiento más activo durante la tarea de “*shuttle-box*” (Figura 17-18). Estos resultados podrían parecer coherentes con estudios previos sobre las cepas de ratas *Roman* (seleccionadas por sus puntuaciones extremas en la tarea de evitación en la “*shuttle-box*”), en las que se encontraron diferencias significativas en la glándula pineal (con la que está asociada el gen *Arr3*, como vimos), con diferencias en el volumen (las ratas RHA/Verh tenían más volumen que las ratas RLA/Verh) y en la velocidad de producción de melatonina (en las ratas RHA/Verh fue el doble de activo que las ratas RLA/Verh, Seidel, 1990). Por otra parte, la asociación entre *Arr3* y el receptor de dopamina D2 (Figura 33) es también muy interesante, pues es sabido que fármacos que actúan sobre este receptor modulan la evitación activa en dos sentidos (Fernández-Teruel y cols., 1991) y, además, las ratas *Roman* “muy” y “poco” evitadoras (RHA-I y RLA-I) presentan diferencias claras en función dopaminérgica cerebral asociada a dichos receptores (Driscoll y cols., 2009).

Del total de genes identificados por las diferencias en sus niveles de expresión entre los dos grupos de ratas N/Nih-HS extremas en ansiedad, y que presentaban también funciones relacionadas con respuestas hormonales, en su mayoría pudimos seleccionar los genes que también tuvieron buena capacidad para predecir comportamientos relacionados con la ansiedad. Con el objetivo de agilizar su lectura, los siguientes apartados se han ordenado a partir de las funciones biológicas en las que están implicados estos genes y los sistemas en los que están involucrados.

5.2.1.1 Genes relacionados con la respuesta hormonal

Nuestros resultados han mostrado que algunos genes relacionados con funciones neuroendocrinas presentan capacidad predictiva sobre determinados comportamientos relacionados con la ansiedad. Así, por ejemplo, las ratas con más expresión de *Avpr1b* mostraron mayor conducta de exploración en la prueba de ansiedad incondicionada del Laberinto Circular Elevado (“*head-dips*”, Tabla 18), mientras que una mayor expresión del gen *Prl4a1* se asoció a un estilo de afrontamiento más pasivo en la prueba de ansiedad condicionada de la “*Shuttle-box*” (en el gen *Prl4a1*, Figuras 19-20).

Teniendo en cuenta que en la caracterización hormonal realizada previamente en las ratas N/Nih-HS (Díaz-Morán y cols., 2012) ya se mostraba que tanto la corticosterona como la ACTH y, sobre todo, la prolactina, mostraron respuestas iguales o superiores ante una situación de estrés a la observada en la cepa (ansiosa) RLA-I, no es de extrañar que genes reguladores de productos hormonales que se han asociado a la ansiedad y el estrés como es el caso de *Avpr1* y *Prl4a1*, muestren asociaciones con los comportamientos relacionados con la ansiedad, puesto que los productos (prolactina y arginina vasopresina) que regulan están íntimamente relacionados con las vías neuroendocrinas de la ansiedad/estrés. En este sentido es importante puntualizar algunas funciones reconocidas de estos genes. Así, por ejemplo, el gen *Avpr1b* regula las funciones del receptor b de la arginina vasopresina (también llamado vasopresina 3 ó V3) que media la modulación del eje HPA y las respuestas comportamentales relacionadas, así como las respuestas vegetativas ante el estrés (sobre todo del estrés crónico) que están mediadas por la vía de señalización del gen *AVP/V3* en la amígdala, el hipocampo y el septum lateral (Bradesi y cols., 2009). Algunos estudios han sugerido, incluso, que la vasopresina podría tener potencial terapéutico para el tratamiento de alteraciones mentales que cursan con estrés, como en el caso de algunos subtipos de depresión y algunos trastornos de ansiedad (Landgraf, 2006; Zhao y Ai, 2011).

Por otro lado, en los mamíferos, las funciones de la prolactina en primer lugar se basaron fundamentalmente en la regulación de las funciones de las glándulas mamarias y los ovarios durante el embarazo, pero más recientemente investigaciones en este campo han descubierto que la prolactina participa en otras funciones, que incluyen: regulación del comportamiento y mantenimiento de la homeostasis corporal, fertilidad maternal, procesos metabólicos, interacciones con el sistema inmune e intervención en las respuestas de estrés (Dorshkind y Horseman, 2001; Goffin y cols., 2002 citados en Alam y cols., 2006; Díaz-Morán y cols., 2012). Miembros de la familia de los receptores de la prolactina se han encontrado expresados en la pituitaria anterior, útero y placenta (Alam y cols., 2006). En concreto, el gen *PLP-A* (también llamado *Prl4a1*) regula las vías moleculares del receptor de la prolactina de la familia 4 (subfamilia a, miembro 1). Este receptor se une a las células Natural Killer uterinas, ya que regula la “interfase” materno-fetal y garantiza el adecuado crecimiento y desarrollo embrionario (Ain y cols., 2003). Sin embargo, no hemos hallado

literatura que se refiera al papel (o funciones) que el gen *Prl4a1* podría desempeñar en la amígdala.

Siete del total de genes identificados con expresión diferencial entre los dos grupos de ratas mostraron implicaciones en las respuestas neuroendocrinas con repercusiones sobre la ansiedad (Tabla 23). Tres de estos genes se localizaron en el mismo cromosoma, los genes relacionados con receptores de la prolactina (*Prl4a1* y *Prl5a2*) y el gen *Ucn3*, comentados anteriormente. En concreto, estudios previos han mostrado que el gen *Ucn3* está involucrado en la homeostasis de la glucosa, la secreción de insulina (Lovenberg y cols., 1995), en la regulación del miedo condicionado a partir de la modulación de la actividad GABAérgica (Chen y cols., 2011), y que la urocortina 3 presenta elevada afinidad por el tipo 2 del receptor CRF (CRFR2). El gen *Ucn3* se expresa (entre otros) en neuronas localizadas en el hipotálamo y amígdala medial (Li y cols., 2002; Chen y cols., 2011), lo que unido a su interacción con el CRF le otorga un papel relevante en las respuestas de estrés y de afrontamiento del mismo (Coste y cols., 2002; Chen y cols., 2010). Teniendo en cuenta la interacción entre los productos que regulan estos genes (es decir entre la prolactina y el CRF) no es de extrañar que tengan funciones relacionadas entre sí, y el hecho de localizarse en el mismo cromosoma (en el cromosoma 17) podría ser un factor predisponente para esta relación.

Otro gen identificado en nuestro análisis, relacionado con las respuestas hormonales y el estrés, es el gen *Oxt* (“*Oxytocin, prepropeptide*”), que codifica a la hormona oxitocina. Este gen está involucrado en el comportamiento de ingesta y participa en las vías de señalización de la oxitocina (Rat Genome Database, 2012). La oxitocina se sintetiza en el núcleo paraventricular y supraóptico del hipotálamo, tiene funciones inhibitorias sobre la actividad del eje HPA y modula la respuesta de estrés en ratas (Windle y cols., 2004; Babygirija y cols., 2012). Esta hormona se libera en el núcleo paraventricular ante diferentes tipos de estresores como en el test de natación forzada (Wotjak y cols., 1996), inhibe la liberación de ACTH y corticosterona (Windle y cols., 2004), atenua la ansiedad en ratas en algunos tests incondicionados (ver revisión de Driscoll y cols., 2009) y disminuye el miedo condicionado en ratas RLA (ver revisión en Driscoll y cols., 2009; Roozendaal y cols., 1992) que, como es sabido, son ratas que presentan altos niveles de ansiedad, miedo y susceptibilidad al estrés como rasgo fenotípico básico y estable (ver

“Introducción”, y revisiones de Driscoll y Bättig 1982; Driscoll y cols., 1998; 2009; Steimer y Driscoll, 2003). Por último, los presentes resultados, indicativos de que el gen *Oxt* se halla más expresado en las ratas N/Nih-HS de “Baja ansiedad” (Tabla 16), son del todo coherentes con los obtenidos en un estudio en el que ratas Sprague-Dawley seleccionadas por su alta reactividad emocional (mostrando, como consecuencia, una pobre adquisición de la evitación activa en dos sentidos) mejoraron en la adquisición de la tarea de evitación activa en la “*Shuttle-box*” tras la administración de oxitocina durante 5 días (Uvnäs-Moberg y cols., 2000).

Por otro lado, las hormonas esteroideas gonadales podrían interaccionar con los receptores de glucocorticoides y sobre el sistema liberador de CRH (Chrousos y cols., 1998; Sapolsky, 1992). Así, por ejemplo, en la expresión genética diferencial entre los dos grupos de ratas N/Nih-HS (extremas en ansiedad) se ha identificado al gen *Acr* (*Acrosin*, también llamado *Acro*), que regula la actividad del enzima acrosín, principalmente involucrado en la fertilidad (Chen, y cols., 1993), al tiempo que también se le ha relacionado con la regulación de hormonas esteroideas. Estas hormonas se sintetizan a partir del colesterol y entre ellas encontramos las hormonas sexuales masculinas como la testosterona, con la que algunos estudios han relacionado el gen *Acr*.

Otros genes, relacionados con la respuesta sexual, con expresión genética diferencial en las ratas N/Nih-HS extremas en ansiedad, fueron *Pik3r5* (“phosphoinositide-3-kinase, regulatory subunit 5”) y *Sit1* (“signaling threshold regulating transmembrane adaptor 1”).

Otros genes en los que se han identificado funciones importantes sobre respuestas hormonales son, por ejemplo, el gen *Duox2*, implicado en el hipotiroidismo en humanos y en la síntesis de hormonas tiroideas (Moreno y cols., 2002; Morand y cols., 2003), el gen *Ahsg* y el gen *Cyp4a8* (Tabla 23). En la actualidad existe gran desconocimiento sobre las funciones concretas de estos tres genes. A partir de nuestros resultados conductuales pudimos determinar la capacidad predictiva de estos genes sobre comportamientos relacionados con la ansiedad, de forma que las ratas que presentaran sobre-expresión en estos genes (en nuestro caso las ratas con “Baja ansiedad”) también presentarían menor

tiempo de miedo condicionado y mayor exploración horizontal y vertical en situaciones novedosas (Figuras 21-23).

Tabla 23.-Sumario de genes diferencialmente expresados, con funciones relacionadas con el SNC y/o neuroendocrinas y con capacidad predictiva sobre comportamientos relacionados con la ansiedad.

Genes relacionados con la respuesta hormonal		
Prl4a1	Prolactin family 4, subfamily a, member 1	17:43276214-43284152
Prl5a2	Prolactin family 5, subfamily a, member 2	17:42984939-42991275
Ucn3	Urocortin 3 (stresscopin)	17:77487977-77488471
Ahsg	Alpha-2-HS-glycoprotein	11:80327147-80354656
CCK	cholecystokinin	8:126492636-126499220
Cyp4a8	Cystatin F (leukocystatin) cytochrome P450, family 4, subfamily a, polypeptide 8	5:135546859-135578199
Duox2	Dual oxidase 2	3:109059360-109077106
Oxt	Oxytocin, prepropeptide	3:118194219-118195056
Acr	Acrosin	7:127885399-127891552
Genes relacionados con comportamiento locomotor		
Cx3Cr1	Chemokine (C-X3-C motif) receptor 1	8:125033630-125047335
Hoxb8	Homeo box B8	10:85013711-85015221
Genes relacionados con la percepción sensorial		
Arr3	Arrestin 3, retinal (x-arrestin)	X:88602642-88614621
Vegp2	von Ebners gland protein 1: von Ebners gland protein 2	3:4862645-4867267
Olr312	olfactory receptor	1:200805140-200806078

5.2.1.2 Genes relacionados con el comportamiento locomotor

En la tabla 23 se muestran los genes identificados que se hallan involucrados directamente en la regulación del comportamiento locomotor, como son los genes *Cx3cr1* (“*Chemokine (C-X3-C motif) receptor 1*”) y *Hoxb8* (“*Homeobox protein Hox-B8*” ó “*Homeobox protein R1A*”). El gen *Hoxb8* se ha relacionado con el comportamiento de grooming, comportamiento locomotor adulto y con la percepción del dolor (Rat Genome Database, 2012), aunque actualmente existe gran desconocimiento sobre las bases

funcionales de este gen. A diferencia del gen *Cx3cr1*, sobre el que se han realizado mayor número de experimentos. En este sentido, la vía fractalquina/*Cx3cr1* se ha implicado en la mediación de la respuesta inflamatoria en varios trastornos neurológicos (Sato y cols., 2006), y se han sugerido interacciones –aún no del todo claras– con las neuronas dopaminérgicas y la glía (Shan y cols., 2009). De hecho, ya que se ha postulado dicha vía como posible diana para el tratamiento de la enfermedad de Parkinson (EP). En efecto, en experimentos previos se concluyó que la microinyección de fractalquina en el SNC de las ratas, exhibió la mayor parte de los síntomas característicos de los modelos experimentales de la EP, como la muerte de células dopaminérgicas, la activación glial, alteraciones comportamentales y la respuesta a la levodopa (Shan y cols., 2009).

La literatura especializada resalta la implicación del gen *Cx3cr1* en enfermedades neurológicas que cursan con alteraciones en el comportamiento locomotor, como en la EP, y en este sentido los análisis de regresión realizados sugieren que este gen podría ser buen predictor de comportamientos de tipo locomotor relacionados con la ansiedad condicionada. En el apartado de “*Resultados*” (Figura 23) se muestra que la sobreexpresión de este gen podría predecir un estilo de afrontamiento de tipo más activo durante la realización de la tarea de “*Shuttle-box*” (es decir, menor comportamiento ansioso y/o más respuesta locomotora activa), hallándose especialmente asociado a menor tiempo de petrificación de los animales (“*freezing*” o miedo condicionado).

5.2.1.3 Genes relacionados con la neurotransmisión sináptica y el sistema inmune

Cuatro genes se identificaron con funciones importantes en la neurotransmisión. Dos de estos genes fueron la taquinina 3 y la arginina vasopresina, comentadas anteriormente por sus implicaciones con los comportamientos relacionados con la ansiedad en nuestro estudio. Los otros dos genes no mostraron relaciones significativas con la conducta, aunque es importante mencionar sus funciones sobre el Sistema Nervioso Central (Tabla 24). Así, el gen *Slc6a14* (“*solute carrier family 6, neurotransmitter transporter, member 14*” localizado en el cromosoma X: 12049011-12073581) está implicado en el transporte de aminas y se ha relacionado con la obesidad en investigaciones con humanos (Durand y col., 2004), mientras que el gen *Slc6a2* (“*Norepinephrine transporter*” o también llamado “*Net*”) está involucrado en el transporte de noradrenalina y es una diana

farmacológica importante para los antidepresivos tricíclicos como la desipramina (Zhao y cols., 2008) y drogas psicoestimulantes como la cocaína (Mannangatti y cols., 2011).

A partir de nuestros resultados conductuales pudimos determinar la capacidad predictiva de este gen sobre comportamientos relacionados con la ansiedad condicionada, de forma que las ratas que presentaran sobre-expresión en el gen *Slc6a2* (subgrupo de “Baja ansiedad”) también presentarían menor tiempo de miedo condicionado y de latencia media de respuesta, así como mayor número de evitaciones y cambios entre compartimentos durante la tarea de “*Shuttle-box*” (Figuras 27, Tabla 18). Por otra parte, la asociación entre *Slc6a2* y el receptor de noradrenalina (Figura 27, Tabla 18) es también muy interesante, puesto que las ratas *Roman* “muy” y “poco” evitadoras (RHA-I y RLA-I) presentan diferencias claras en los niveles de noradrenalina en estriado y núcleo accumbens. En concreto, las ratas RHA-I presentaron niveles mayores en ambas áreas en comparación a las ratas RLA-I (Moreno y cols., 2010).

Por último, el gen *S100b* (“*S100 calcium binding protein B*”, localizado en el cromosoma 20: 12791440-12824508) subyace a la regulación de la proteína *S100b*, y se ha relacionado el impulso nervioso y la plasticidad neuronal.

La proteína *S100* está compuesta por dos subunidades inmunológicamente diferentes (α y β), de las que la forma β (*S100b*), se localiza predominantemente en el Sistema nervioso central, es secretada /liberada principalmente por astrocitos, y en función de su concentración extracelular tendrá una función trófica o tóxica en las neuronas y las células gliales (Goncalves y cols., 2000). El incremento de los niveles de *S100b* en el fluido cerebroespinal y en el serum está relacionado con la muerte de astrocitos y su proliferación compensatoria (gliosis), por lo que la proteína *S100b* se utiliza como marcador de lesiones neurológicas (Lima y cols., 2006). Estudios con ratones PSAPP/*S100B*^{-/-} han descubierto que tratamientos inhibidores del gen *S100b* podrían ser una buena estrategia para la reducción de la carga de placa amiloidea cortical, la gliosis y la disfunción neural en la enfermedad de Alzheimer (Roltsch y cols., 2010). En la Figura 33 se muestra colocalización de estas proteínas con el receptor 2 dopaminérgico, aunque se desconoce la posible interacción entre ambos.

A partir del análisis de microarray se pudieron identificar tres genes con implicaciones en el sistema inmune (Cd28, Oasf1 y RT1-Dob) y un cuarto gen relacionado con la proyección neural y las vías de señalización de las proteínas G (Bcan, Tabla 24). Los análisis de regresión, realizados sobre la expresión de estos genes y la conducta evaluada en las pruebas de ansiedad, sugieren que dichos genes podrían ser buenos predictores de comportamientos relacionados con la ansiedad/miedo en ratas. Así, la sobre-expresión de los genes Bcan, Oasf1 y RT1-Dob (Figura 24) predeciría comportamientos menos ansiosos y más activos durante la prueba de “*Shuttle-box*” y en pruebas incondicionadas de exposición a situaciones novedosas (como el test de la “Caja nueva” en nuestro estudio) y, por otro lado, la mayor expresión relativa de la molécula Cd28 sería predictiva de latencias más cortas en la primera entrada a las secciones abiertas (esto es, menor ansiedad) del Laberinto Circular Elevado. Tal y como muestra la Figura 33, este gen presenta interacciones, en humanos, con el factor de transcripción p65 y con los procesos de muerte celular a través de su relación con el gen BCL-2.

Tabla 24.-Genes con funciones relacionadas con el Sistema Nervioso Central y capacidad predictiva sobre comportamientos relacionados con la ansiedad.

Símbolo	Descripción	Localización
Genes relacionados con la respuesta sexual		
Acr	Acrosin	7:127885399-127891552
Pik3r5	Phosphoinositide-3-kinase, regulatory subunit 5	10:55227872-55247889
Sit1	Signaling threshold regulating transmembrane adaptor 1	5:59963398-59965018
Ahsg	Alpha-2-HS-glycoprotein	11:80327147-80354656
Genes relacionados con proyección neural y las proteínas G		
Bcan	Brevican	2:180067867-180080947
Ahsg	Alpha-2-HS-glycoprotein	11:80327147-80354656
Genes relacionados con el sistema inmune		
Cd28	Cd28 molecule	9:59342273-59367743
Oasf1	2'-5' oligoadenylate synthetase 1F	12:36833433-36842796
RT1-Dob	Histocompatibility 2, O region beta locus	20:4753940-4759648
Genes relacionados con neurotransmisión		
S100b	S100 calcium binding protein B	20:12791440-12824508
Tacr3	Tachykinin receptor 3	2:232309015-232404964
Avpr1b	Arginine vasopressin receptor 1B	13:44536742-44547983
Slc6a14	Solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter), member 14	X:12049011-12073581
Slc6a2	Solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter, noradrenalin), member 2	19:15098275-15139898

5.2.1.4 Genes relacionados con la percepción sensorial

En relación a los genes que hemos destacado en la Tabla 23, con implicaciones en la percepción sensorial, cabe destacar el gen *Arr3* (comentado anteriormente, con importantes implicaciones en la percepción visual) y algunos de genes de receptores olfatorios.

En los mamíferos, las vías neurales implicadas en diferentes tipos de percepción sensorial, y entre ellas la olfativa y la visual, son un factor clave en la detección de amenazas y para la supervivencia (ante ellas), así como en la búsqueda de alimentos o en la respuesta sexual. Así, en situaciones amenazantes, de peligro (o estresantes), la percepción

sensorial de estímulos/”señales” (que pueden ser, en ocasiones, condicionados/as o aprendidos/as) olfativas o visuales podría activar dos vías neurales diferentes: 1) en la que el tálamo se comunica directamente con el complejo amigdalino (su función es emitir una respuesta rápida para evitar cualquier peligro), o 2) en la que el tálamo sensorial envía la información a la corteza sensorial y es ésta la que se comunica con el complejo amigdalino (esta vía analiza con exactitud todos los estímulos –condicionados, a menudo-, para evitar respuestas inadecuadas). Por otro lado, en relación con la ansiedad/miedo y la percepción de amenazas potenciales, según el eje de la rueda del miedo de LeDoux (1996), el complejo amigdalino tiene conexiones principales con el tálamo sensorial, la corteza sensorial, el hipocampo, la corteza prefrontal, regiones de corteza de transición, la sustancia gris periacueductal, el hipotálamo lateral y el núcleo caudado (estriado), entre otras (Figura 34).



Figura 34.-El eje de la rueda del miedo (adaptado de LeDoux, 2008)

Es claro, por tanto, que los estímulos olfativos y visuales son claves en la respuesta del organismo ante las situaciones amenazantes o de peligro, y no debería extrañarnos que en las ratas N/Nih-HS con niveles divergentes de ansiedad se haya identificado expresión diferencial en numerosos genes implicados en la percepción olfativa (Buck y Axel, 1991;

HHMI, 2004). Se identificaron 21 genes de receptores olfatorios, aunque actualmente se desconoce las funciones concretas que desempeñan o las diferencias funcionales entre ellos.

En nuestros resultados se puede observar que no todos los genes olfatorios se expresan en el mismo sentido entre los dos grupos de ratas (sólo 5 genes mostraron sub-regulación de sus niveles de expresión en relación a las ratas con “Baja ansiedad”; Figura 24; Buck y Axel, 1991; Cutforth y cols., 2003). Los análisis de regresión indicaron que sólo tres de estos genes (Olr312, Olr689 y Olr872) mostraron capacidad predictiva sobre variables relacionadas con respuestas de ansiedad, indicando que a mayor expresión génica menores signos de ansiedad condicionada y/o incondicionada (ver Tabla 18 y Figuras 24.1-2). Es especialmente remarcable que el análisis de regresión mostró que el gen Olr312 está asociado positivamente (relación predictiva) con el número de evitaciones en la tarea de adquisición de evitación activa en dos sentidos, además de, predecir negativamente los niveles de “freezing” (petrificación, miedo) condicionado y positivamente los “CET” (cruces espontáneos –incondicionados- durante el periodo de habituación/exploración, de 4 minutos, en la “Shuttle-box”, ver Tabla 18 y Figura 24.1).

5.2.1.5 Otros genes de posible relevancia

Otro gen, con funciones centrales importantes y expresado diferencialmente en los dos grupos de ratas extremas en ansiedad, es el gen Oprd1, que codifica al receptor opioide delta-1 y juega un papel importante en la respuesta a la morfina (Rozenfeld y cols., 2007; Wu y cols., 2011). Estudios con ratones mutantes knockout para este receptor mostraron atenuación de la tolerancia y dependencia a la morfina contingente a la ausencia de receptores opioides (Zhu y cols., 1999). Otros estudios sugieren que participa en la regulación de la secreción de gonadotropinas y que tiene un papel indirecto en el control de la actividad secretora por parte del hipotálamo (Pimpinelly y cols., 2006), al tiempo que también se han descrito relaciones con la ansiedad, ya que se ha mostrado que la activación del receptor opioide delta (en el núcleo central de la amígdala) redujo el comportamiento de tipo ansioso/miedoso durante la prueba del Laberinto Circular Elevado (Randall-Thompson y cols., 2010). Por último en la Figura 33, ilustrativa de las relaciones entre las vías moleculares de los genes hasta ahora mencionados, podemos observar como el gen Oprd1 presenta interacciones indirectas con el factor de transcripción p65 (“RELA”).

Por último, hemos encontrado coincidencias entre los genes detectados en nuestro estudio y trabajos previos, en los que se emplearon en su mayoría animales seleccionados por sus niveles extremos de miedo/ansiedad en diferentes pruebas conductuales y aplicaron el análisis de microarray o de QTLs en diferentes estructuras cerebrales. Es el caso de los genes Oprd1 (Conti y cols., 2004), FTH1 (Sabariego y cols., 2011), Ttr (Kyoung-Shim y Pyung-Lim, 2006; Andrus y cols., 2010), S100b y Mbp (Yoshikawa y cols., 2000), Slc6a2 (McClung y cols., 2005), RPL26 y Tuba1a (Blalock y cols., 2003), vegfb, Arf3 y Nptn (Kabbaj y cols., 2004), Cpe y Penk (Mei y cols., 2005), Hba-a2 (Andrus y cols., 2010) y Rpl26 (Irwin y cols., 2001). A pesar de tener resultados compartidos con otros estudios, es necesario interpretar con cautela estas coincidencias, sobre todo teniendo en cuenta las diferencias metodológicas entre los diferentes trabajos y las limitaciones aún existentes en la técnica de microarray.

A partir de los resultados descritos el presente estudio confirma la aplicabilidad de las ratas N/Nih-HS como buen modelo animal para el estudio de las bases neurogenéticas de los procesos psicológicos superiores y, con la necesaria cautela podríamos concluir que: 1) los genes validados a partir de la técnica qRT-PCR podrían ser buenos predictores de comportamientos implicados en la ansiedad in/condicionada, y 2) el análisis de microarray se ha mostrado como una técnica eficiente en la detección de genes posiblemente involucrados en las respuestas diferenciales de ansiedad y miedo.

¿Qué genes amigdalares muestran más relevancia en funciones relacionadas con la ansiedad o el miedo?

Los genes identificados en este estudio, con capacidad predictiva sobre comportamientos relacionados con la ansiedad, están también involucrados en funciones neurendocrinas e implicados en la respuesta de estrés y en el miedo condicionado. En este sentido, el conflicto creado en la tarea de evitación activa en la “*Shuttle-box*” está muy relacionado con la circuitería amigdalina, y por este motivo no sería de extrañar que genes con implicaciones amigdalares estuviesen también relacionados con comportamientos ansiosos.

La amígdala, como comentamos anteriormente, participa en la recepción de información sensorial (a través del núcleo lateral y basolateral) y en la emisión de respuestas a otras áreas cerebrales (a través del núcleo central). Envía eferencias a varios núcleos del hipotálamo, como son el núcleo lateral (media la activación simpática) y el núcleo paraventricular (que implica la activación del eje HPA), así como también tiene conexiones con el sistema nervioso parasimpático (respuestas vegetativas ante miedo) y el núcleo reticular caudal (incrementa el reflejo de sobresalto). Pero una estructura clave en el miedo condicionado es la sustancia gris periacueductal, porque, activada por la amígdala, es la responsable de la respuesta conductual de petrificación, característica del miedo condicionado. Esta estructura también está directamente relacionada con la analgesia producida por estrés, que está regulada por péptidos opiáceos endógenos.

Por otro lado, a nivel hormonal, ante una situación de estrés, la acción de la amígdala da lugar a la activación dos rutas cerebrales paralelas (Sánchez y cols., 2008), el eje simpático-adreno-medular (SAM) y el eje hipotalámico-pituitario-adrenal (HPA). A partir de la acción del eje SAM se activan las neuronas preganglionares simpáticas, y esto produce los llamados efectos catabólicos del estrés: 1) aumento de la liberación de adrenalina/dopamina y reducción de noradrenalina; 2) aumento del nivel plasmático de glucosa y ácidos grasos; 3) aumento de tirosina, y 4) reducción de niveles de insulina, estrógenos y testosterona. Es destacable, en este sentido, que en el presente trabajo se han hallado genes, expresados diferencialmente en amígdala de ratas extremas en ansiedad, que están relacionados con buena parte de las acciones del eje SAM (ver secciones previas de la “Discusión”).

Estudios previos, sobre la respuesta del eje HPA producto de situaciones de estrés, obtuvieron que las ratas RHA mostraron (en comparación con las RLA) un decremento en la respuesta del eje hipotálamo-pituitario-adrenal ante un estímulo aversivo y mayor actividad cortical en el sistema dopaminérgico y serotoninérgico (Steimer y cols., 1997; Aguilar y cols., 2004), así como incremento de la actividad locomotora y la probable activación de procesos cognitivos enfocados al afrontamiento activo del estímulo estresante (Aguilar y cols., 2004; Driscoll y cols., 1998). Estos resultados concuerdan con los niveles

hormonales encontrados en el primer experimento de esta tesis (Estudio 1), puesto que el grupo de ratas RHA-I presentó menores niveles de prolactina, corticosterona y ACTH post-estrés que las ratas RLA-I y las N/Nih-HS. Estos resultados parecerían coherentes con otros estudios en los que presentan la función clave de la dopamina (incrementada en las ratas RHA-I, respecto a las RLA-I) como inhibidor de la prolactina, y a su vez como moduladora de la respuesta de (o respuestas de afrontamiento ante el) estrés (p. ej. Driscoll y cols., 1998; Freeman y cols., 2000).

En nuestros resultados genéticos obtuvimos que los genes con implicaciones conductuales más importantes están implicados en funciones hormonales que se han relacionado con las respuestas de ansiedad/miedo y de estrés. Así, por ejemplo, los niveles de expresión de los receptores de prolactina Prl4a1 y Prl5a2 estaban muy relacionados con el miedo condicionado. En la Figura 35 se muestra como las ratas con mayor miedo condicionado presentaban expresión incrementada del gen Prl4a1 pero disminuida del otro gen, el Prl5a2.

Como comentamos en el apartado de “Resultados”, el hecho de que los niveles de expresión sean diferentes entre estos genes sugiere que los receptores que están regulando podrían tener funciones diferentes dentro de la función homeostática de la prolactina. En este sentido, y según los análisis de regresión, se identificó una relación predictiva entre la sobre-expresión del gen Prl5a2 y el hecho de realizar menos tiempo de miedo condicionado y menor latencia de respuesta durante la prueba de “Shuttle-box”, que coincide con el perfil de afrontamiento más activo observado en las ratas N/Nih-HS menos ansiosas. Por contra, se identificó una relación predictiva entre la sobre-expresión del gen Prl4a1 y el estilo de afrontamiento más pasivo durante esta prueba de ansiedad condicionada. Parecería que ambos genes (Prl5a2 y Prl4a1), relacionados con la prolactina, representarían dos caras de una misma moneda, de forma que -si existiese alguna relación causal entre su acción y la ansiedad/miedo condicionados- cada uno de ellos realizaría una función complementaria a la del otro. Es decir, según nuestros resultados, es tentador concluir que ambos genes podrían actuar concertadamente, en interacción, complementándose.

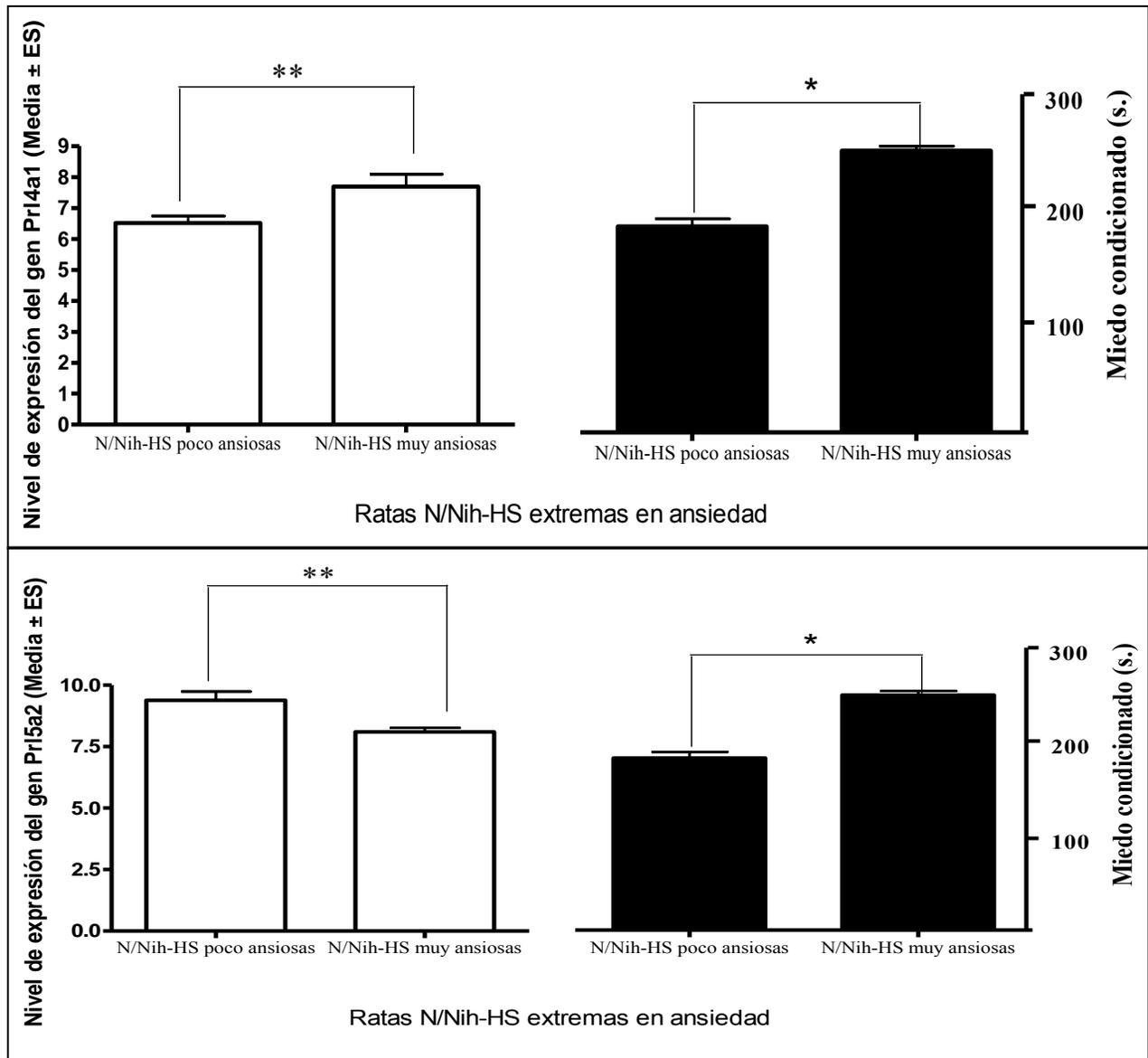


Figura 35.-Nivel de miedo condicionado en las ratas N/Nih-HS extremas en ansiedad y nivel de expresión diferencial de los genes Prl4a1 y Prl5a2 (n = 14). *p<0,05 vs. el grupo de ratas con “Baja ansiedad” (“Student’s t-test”, para muestras independientes), **p<0,05 diferencias entre los grupos de ratas N/Nih-HS extremas en ansiedad en los niveles de expresión genética (fold-change >|2|, FDR< 0,05).

En las figuras 35-36 se muestra como los animales seleccionados por su estilo de afrontamiento durante la tarea de “*Shuttle-box*” también mostraron diferencias en variables conductuales indicadoras de miedo condicionado (como la petrificación –o *freezing*- ante el contexto condicionado) en congruencia con niveles diferenciales de expresión génica. El miedo condicionado no es una de las variables de adquisición/ “*performance*” de la tarea de evitación en dos sentidos en la “*Shuttle-box*” (aunque se den correlaciones entre -0.1 y -0.3 entre ellas; ver Díaz-Morán y cols., 2012; López-Aumatell y cols., 2011), como sí lo son las “evitaciones” o la latencia media de respuesta. Por ello es de gran importancia observar que los resultados obtenidos en los análisis de regresión no son únicamente respecto a variables directamente relacionadas con el criterio de selección (“evitaciones”, latencia media de respuesta) de los subgrupos de ratas N/Nih-HS extremas (en ansiedad condicionada; “nº de evitaciones”), sino que dicha selección ha mostrado que otras variables conductuales (ej. el miedo condicionado, o “petrificación”; los “*Head dips*”, etc) presentan asociaciones significativas con los niveles de expresión de ciertos genes.

Otro gen asociado con la respuesta neuroendocrina y conductual, y posiblemente relacionado con respuestas de estrés y de consumo de sustancias, es el gen regulador de la taquinina 3 (Figura 36). Anteriormente se han comentado los efectos que produce la administración de antagonistas del receptor de neuroquinina 3 sobre el comportamiento y la ansiedad, y aunque se podría pensar que tiene funciones excitatorias y de desinhibición conductual, nuestros resultados tienden a indicar lo contrario. Actualmente no podemos dar una explicación firme sobre esta posible incongruencia, puesto que es necesario un mayor número de investigaciones al respecto para desesmarañar el circuito neural en el que están implicados estos receptores.

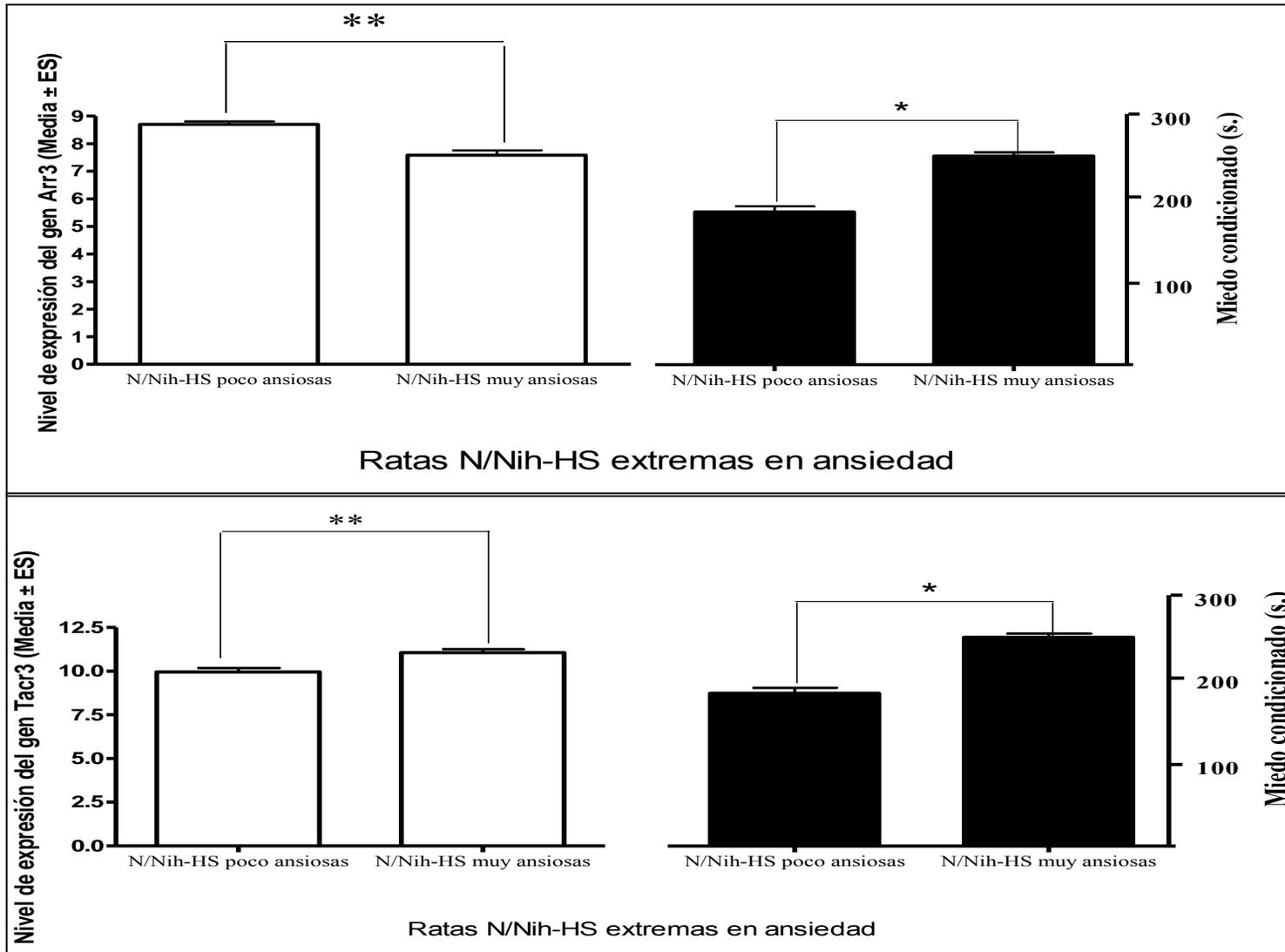


Figura 36.-Nivel de miedo condicionado en las ratas N/Nih-HS extremas en ansiedad y nivel de expresión diferencial de los genes *Arr3* y *Tacr3* ($n = 14$). * $p < 0,05$ vs. el grupo de ratas con “Baja ansiedad” (“Student’s t-test”, para muestras independientes), ** $p < 0,05$ diferencias entre los grupos de ratas N/Nih-HS extremas en ansiedad en los niveles de expresión genética ($fold-change > |2|$, $FDR < 0,05$)

A modo ilustrativo, se puede observar en la Figura 37 las relaciones entre las vías moleculares que regulan los genes expresados diferencialmente entre las ratas N/Nih-HS extremas en ansiedad. En concreto se muestra, que el transportador de noradrenalina (Slc6a2) recibe interacciones indirectas del receptor II (tipo b) de la angiotensina y del complejo PI3k. También en esta figura se representa la colocalización de la arrestina3 y el receptor dopaminérgico D2, la inhibición indirecta de la arginina-vasopresina sobre NPR2 y la interacción indirecta de la colecistoquinina sobre la oxitocina.¹

¹ Figura 37_ Red de las vías moleculares reguladas por genes con expresión diferencial en ratas N/Nih-HS extremas en ansiedad (extraído de Ingenuity Systems, Inc.). DRD2 (receptor 2 dopaminérgico), TNF (“tumor necrosis factor”), DBP (“D site of albumin promoter (albumin D-box) binding protein”), ICAM1 (“intercellular adhesion molecule 1”), NR1D1 (“nuclear receptor subfamily 1, group D, member 1”), CCKAR (“cholecystokinin A receptor”), EGR1 (“early growth response 1”), NPR2 (“natriuretic peptide receptor B/guanylate cyclase B (atrionatriuretic peptide receptor B)”), Pkc (“protein kinase C”), NFKB1A (“nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha”), CACNA1B (“calcium channel, voltage-dependent, N type, alpha 1B subunit”), CACNA1E (“calcium channel, voltage-dependent, R type, alpha 1E subunit”), KAT5 (“K(lysine) acetyltransferase 5”), NOS2 (“nitric oxide synthase 2, inducible”), IL6 (“interleukin 6”), CXCL2 (“chemokine (C-X-C motif) ligand 2”), Akt (“v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1”), Beta Arrestin, SYTI (“synaptotagmin 1”), Agtr1b (“angiotensin II receptor, type 1b”), NR1H3 (“nuclear receptor subfamily 1, group H, member 3”), STAR (“steroidogenic acute regulatory protein”), IGFBP3 (“insulin-like growth factor binding protein 3”), FOS (“FBJ osteosarcoma oncogene”), FST (“follistatin”), GSK3B (“glycogen synthase kinase 3 beta”), CEBPB (“CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), beta”), CXCL2 (“chemokine (C-X-C motif) ligand 2”), PI3k complex (“phosphoinositide-3-kinase, catalytic, gamma polypeptide”), NR1D1 (“nuclear receptor subfamily 1, group D, member 1”), NRP2 (“neuropilin 2”), QKI (“Protein quaking”) y los genes ADCY, L1B, RAK3d, SIpi y CCL13 (no encontrados en la base de datos Ensemble Genome Browser y Pubmed).

Genes que se han identificado en este estudio: OXT (oxitocina), AVP (arginina-vasopresina), Arr3 (arrestina 3), CRYM (“crystallin, mu”) CX3CL1 (“chemokine (C-X3-C motif) ligand 1”), CPE (“carboxypeptidase E”), MBP (“myelin basic protein”), CST7 (“cystatin F (leukocystatin)”), MYOG (“myogenin”), TUBA1A (“tubulin, alpha 1A”), SLC6a2 (“solute carrier family 6, neurotransmitter transporter, noradrenalin, member 2”), YWHAE (“tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, epsilon polypeptide”), PTCRA (“pre T-cell antigen receptor alpha”), AP2M1 (“adaptor-related protein complex 2, mu 1 subunit”), (desconocido) y CYP17a1 (“cytochrome P450, family 17, subfamily a, polypeptide 1”) y los genes HLA-C y ANGTL3 (no encontrados en la base de datos Ensemble Genome Browser y Pubmed).

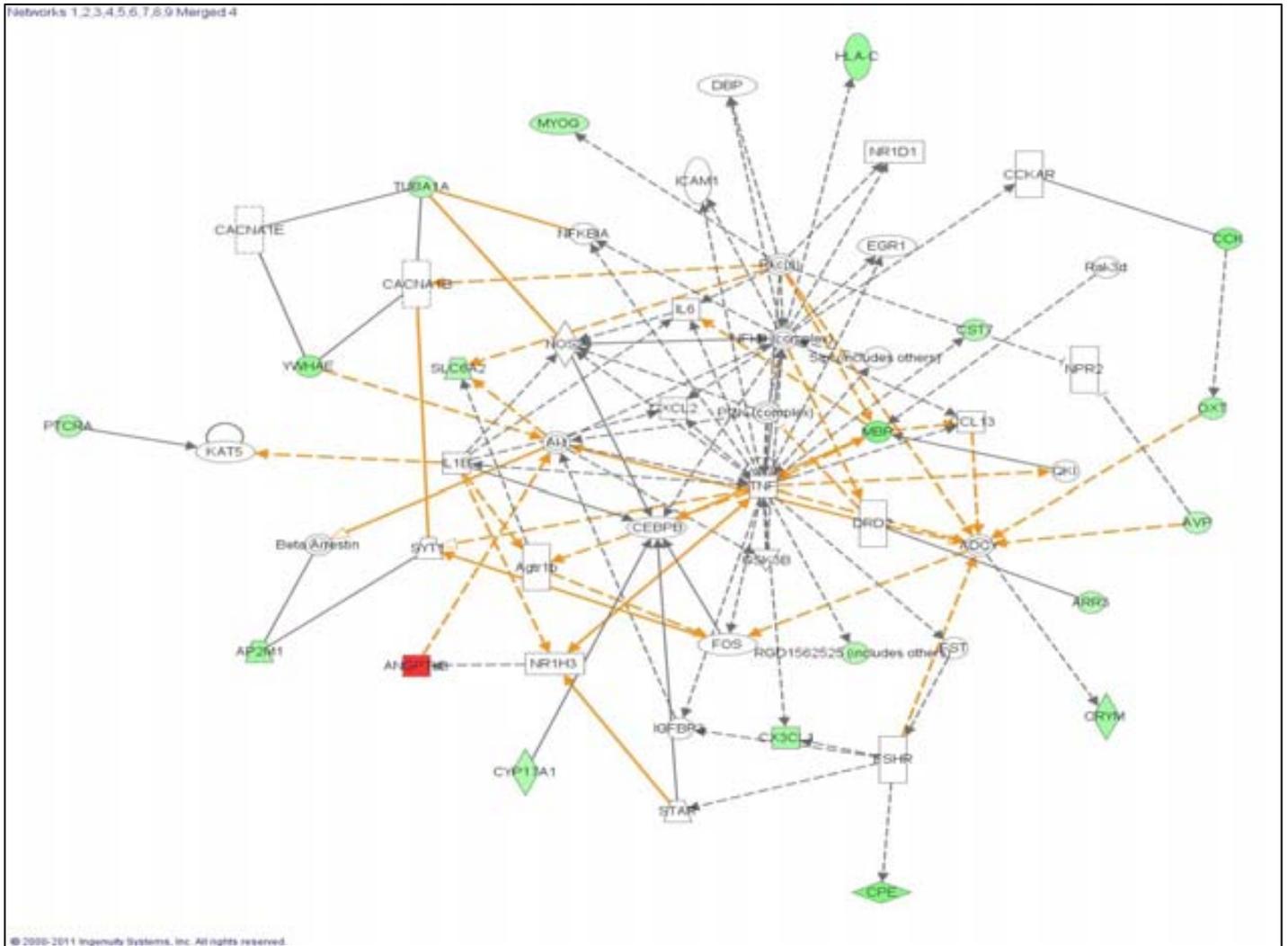


Figura 37.-Red de las vías moleculares reguladas por genes con expresión diferencial en ratas N/Nih-HS extremas en ansiedad (extraído de Ingenuity Systems, Inc.). En nota 1 (página anterior) se muestran los nombres oficiales de todos los genes.

5.2.2 Expresión genética diferencial en hipocampo de ratas N/Nih-HS extremas en ansiedad

El análisis de microarray identificó 208 genes con expresión diferencial (ver “*Resultados*”) entre los dos subgrupos de ratas N/Nih-HS extremas en ansiedad. A pesar de ser datos preliminares, previos a la validación por qRT-PCR (se han enviado a validar los genes: *Avpr1b*, *H2-M9*, *Ltb*, *Gna13*, *Slc5a7*, *Slc10a4*, *Trh*, *Cd74*, *RT1-EC12*, *Drp2*, *Accn3*, *Galr3*, *Oprl1* y *Nrg2*), a continuación se describirán las implicaciones funcionales más importantes de los genes candidatos para la validación, así como su capacidad predictiva sobre comportamientos relacionados con el estilo de afrontamiento activo/pasivo en las pruebas/tareas de ansiedad condicionada e incondicionada utilizadas.

A modo de contextualización, la corteza entorrinal es la principal fuente de aferencias y eferencias del hipocampo, y actúa de interfaz entre esta estructura y otras regiones cerebrales. Pero el hipocampo también cuenta con interacciones con el córtex prefrontal y el área septal. Por otro lado, a nivel de neurotransmisión, el hipocampo recibe inputs moduladores del sistema dopaminérgico, serotoninérgico, noradrenérgico, además de proyecciones de fibras colinérgicas y gabaérgicas desde el área septal medial. A partir de la implicación de los sistemas de neurotransmisión mencionados y de las conexiones funcionales entre estas regiones cerebrales, incluyendo también la amígdala, numerosos estudios han demostrado la implicación del hipocampo en los diversos tipos de respuestas defensivas frente a diferentes tipos de “amenaza”, y en particular en las respuestas de ansiedad, frustración, miedo y estrés (ej. Gray y McNaughton 2000; LeDoux, 1995). Así, a título de ejemplos de intervención o de modulación hipocámpica, podemos recordar que el aprendizaje de miedo con claves sólo requiere de la amígdala, mientras que el aprendizaje de miedo a un contexto depende de la acción conjunta de la amígdala y el hipocampo (Rodrigues y cols., 2001); o bien, que exposiciones prolongadas a niveles elevados de glucocorticoides, por administración exógena, por estrés crónico o como consecuencia de la depresión, causan daño neural y alteraciones en la expresión génica del hipocampo (Brown y cols., 2004; Kajiyama y cols., 2010).

En nuestro estudio, del total de genes con expresión diferencial entre los grupos de ratas, se identificaron 65 genes con funciones principalmente relacionadas con el sistema inmune, respuesta hormonal, percepción sensorial, participación en las vías moleculares de las proteínas G y proyección neural.

Sólo seis de los genes candidatos para validar por qRT-PCR mostraron capacidad predictiva significativa en relación a comportamientos relacionados con la ansiedad in/condicionada (Tabla 20). Los genes Drp2, H2-M9 y RT1-EC12 mostraron sobre-expresión en el subgrupo de ratas de “Baja ansiedad” y fueron predictores principalmente de comportamientos relacionados con la ansiedad condicionada. Es decir, a un mayor nivel de expresión de estos genes se correspondió una menor inhibición conductual –Drp2- (mayor actividad exploratoria en la “Caja nueva” y mayor número de cruces –ITC- en la “Shuttle-box”) y un estilo de afrontamiento más activo durante la tarea de “Shuttle-box” –genes H2-M9 y RT1-EC12- (Figura 30 y 31).

El gen Drp2 (“*Dystrophin related protein 2*”, Tabla 25.1) se ha relacionado en algunos estudios con la proyección neural, la organización central de las sinapsis colinérgicas (Roland y Sheng, 2000) y con la plasticidad neuronal relacionada con trastornos mentales del estado de ánimo. En un estudio basado en el modelo de depresión de “*chronic mild stress*” (o estrés crónico leve en ratas), descubrieron que la adaptación o la plasticidad neural podría ser un elemento esencial en la etiología de la depresión (Bisgaard y cols., 2007). En este estudio también se propuso a este gen como un potencial marcador para la resistencia al fármaco antidepresivo escitalopram (Bisgaard y cols., 2007).

Por otro lado, los genes Avpr1b, Ltb y Slc5a7 mostraron sub-expresión en las ratas N/Nih-HS de “Baja ansiedad” y fueron predictores de comportamientos relacionados con la ansiedad in/condicionada. En particular, el gen Slc5a7 (también llamado -Cht1-), implicado en la neurotransmisión colinérgica (Rana y cols., 2010) y síntesis colinérgica en células NIH3T3ChAT (Fujii y cols., 2009), mostró asociación con comportamientos relacionados con la ansiedad incondicionada como el número de entradas en las secciones abiertas del Laberinto Circular Elevado, el número de SAP y los cruces entre las secciones del laberinto (Figura 29). La sobre-expresión de este gen fue predictora de un estilo de comportamiento más inhibido y menos exploratorio en las ratas (Figura 29).

En relación a los genes implicados en funciones neuroendocrinas, se han identificado principalmente cuatro genes con funciones relevantes, como son el gen *Pdgfb*, el gen que codifica a la tiroglobulina (TG), el gen receptor 1b de la arginina vasopresina y el gen que codifica a la hormona liberadora de tirotropina –TRH- (Tabla 25.1). En la Figura 38 se muestran las interacciones directas que recibe la tiroglobulina desde FOXE1, PAX8 y LRP2, e indirectas desde PTPRJ, Gnas e IFNG.

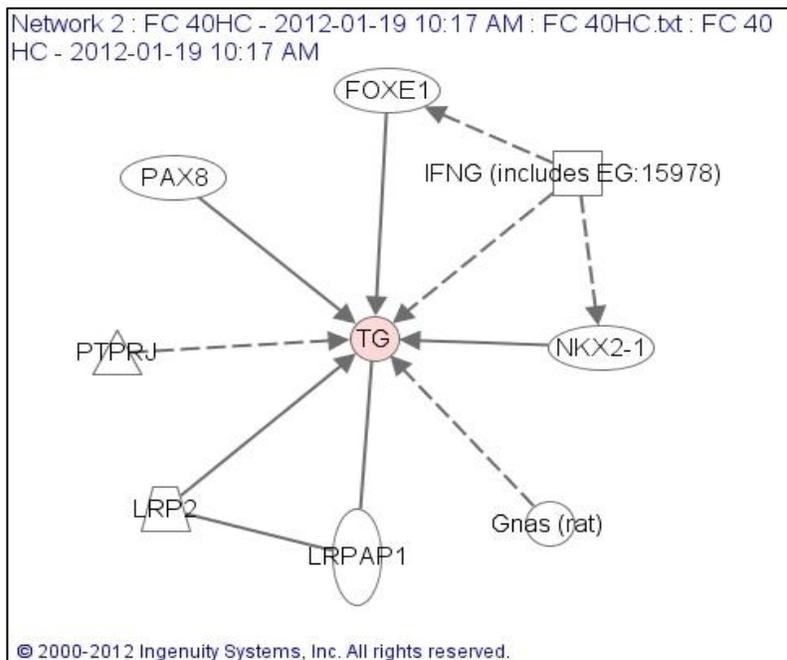


Figura 38.-Red de las vías moleculares reguladas por genes con expresión diferencial en ratas N/Nih-HS extremas en ansiedad (extraído de Ingenuity Systems, Inc.). TG (tiroglobulina), PAX8 “paired box 8”, PTPRJ (“protein tyrosine phosphatase, receptor type, J”), LRP2 (“low density lipoprotein receptor-related protein 2”), LRPAP1 (“low density lipoprotein receptor-related protein associated protein”), Gnas (“GNAS complex locus”), NKX2-1 (“NK2 homeobox 1”), FOXE1 (“forkhead box E1 (thyroid transcription factor 2)”) e IFNG (“interferon gamma”).

El péptido hipotalámico TRH posee múltiples funciones hormonales y autonómicas. Estudios previos han mostrado evidencias de respuesta hipofisaria al TRH reducida en varios trastornos mentales, como en la esquizofrenia, el trastorno bipolar, el alcoholismo y la depresión, y ello ha sido relacionado con anomalías específicas durante la diferenciación de las neuronas TRH hipotalámicas (ej. Gary y cols., 2003; Guerra-Crespo y cols., 2011).

En humanos se han mostrado como ante exposiciones a factores estresantes severos se produce un incremento en las concentraciones de CRH en amígdala, hipocampo y locus coeruleus. Otros estudios, en los que se aplicaban terapias de sustitución con ratas

adrenalectomizadas y en situaciones de estrés, sugirieron el rol inhibitorio de los glucocorticoides sobre el eje HPT (Hipotalámico-pituitario-tiroideo) y la expresión de TRH en el núcleo paraventricular del hipotálamo (Kakucska y cols., 1995). Por último, en algunos estudios se han mostrado incrementos en los niveles de corticosterona y sobre-regulación de los niveles de mRNA del gen TRH, medido entre 45-60 minutos posterior a la administración de una batería de pruebas conductuales (Aguilar-Valles y cols., 2005).

Tabla 25.1.-Genes hipocampales con funciones relacionadas con el Sistema Nervioso Central y capacidad predictiva sobre comportamientos relacionados con la ansiedad.

Símbolo	Descripción	Localización
Genes relacionados con la respuesta hormonal		
Tg	Thyroglobulin	7:104035776-104220754
Pdgfb	Platelet-derived growth factor beta polypeptide (simian sarcoma viral (v-sis) oncogene homolog)	7:118244386-118262021
Avpr1b	Arginine vasopressin receptor 1B	13:44536742-44547983
Trh	Thyrotropin releasing hormone	4:126425185-126427651
Genes relacionados con proyección neural y las proteínas G		
Drp2	Dystrophin related protein 2	X:121881801-121929386
Galr3	Galanin receptor 3	117014148..117017058 (pubmed)
Gna13	Guanine nucleotide binding protein, alpha 13	10:98933230-98965795
Oprl1	Opiate receptor-like 1	3:170869291-170874913
Trh	Thyrotropin releasing hormone	4:126425185-126427651
Avpr1b	Arginine vasopressin receptor 1B	13:44536742-44547983

Por otro lado los genes Galr3, Gna13 y Oprd11 (Tabla 25.1) se han implicado en las vías de señalización de las proteínas G. En concreto, el gen Gna13 codifica una proteína de ligamiento para el receptor D5 dopaminérgico y para el receptor de la angiotensina subtipo 1 (Suzuki y cols., 2009; Zhang y cols., 2011). Por su parte, el gen Galr3 subyace a la regulación del receptor de la galanina subtipo 3, que pertenece a la familia de los receptores acoplados a las proteínas G (Barreda-Gómez y cols., 2005), está involucrado en la regulación de la cognición, estado de ánimo, conducta de ingesta, movimientos convulsivos y dolor (Barreda-Gómez y cols., 2005). Al contrario que en el caso de los receptores GalR1

y GalR2 extendidos ampliamente por el cerebro, la distribución neural del receptor GalR3 es contradictoria en varios estudios (revisado por Lu y cols., 2005).

Otros genes, con diferencias significativas en el nivel de expresión entre los dos grupos de ratas N/Nih-HS extremas en ansiedad, se muestran en la Tabla 25.2. Estos genes están principalmente implicados en la respuesta (neuro)-inmune. Así, por ejemplo, el gen Cd74 codifica una proteína de ligamiento de la “clase II MHC”, del beta-amiloide y de citoquinas, está involucrado en la actividad MAPK, la proliferación celular y el procesamiento/presentación de antígenos (según Rat Genome Database). El gen Calca (“*calcitonin-related polypeptide alpha*”) codifica una proteína para el receptor de la calcitonina, está involucrado en la presión arterial y en la contracción del músculo liso. Está asociado, además, con enfermedades como la diabetes Mellitus tipo 2, la encefalomiелitis, la esclerosis amiotrófica lateral, la isquemia, la osteoporosis y los trastornos de la migraña. Además este gen interactúa con la noradrenalina, las anfetaminas y el 17beta-estradiol (Rat Genome Database).

A partir de los análisis de regresión realizados, el gen Calca presentó capacidad predictiva significativa sobre variables relacionadas con la ansiedad incondicionada. La sobre-expresión de este gen en las ratas N/Nih-HS de “Baja ansiedad” fue predictor de mayor locomoción/actividad exploratoria en el Laberinto Circular Elevado (mayor número de cruces entre las secciones o “*Line-crossings*”, Figura 32).

Por último, en el estudio realizado por Hurt y cols. (2004) determinaron la secuencia del complejo mayor de histocompatibilidad en un intervalo de 4-Mb en el cromosoma 20 de la rata (siendo éste el segundo en ser completado, después del MHC humano). Del total de genes que descubrieron en dicho estudio (más de 220), en nuestro análisis de microarray hemos identificado tres genes con diferente nivel de expresión (entre los dos grupos de ratas N/Nih-HS) que pertenecen al MHC, a saber: H2-M9, RT1-EC12 y RT1-T24-1 (Tabla 25.2). Se han involucrado estos genes (sobre todo el gen H2-M9) en la respuesta inmune, aunque aún falta por esclarecer las funciones concretas que llevan a cabo.

Tabla 25.2.-Genes hipocampales con funciones relacionadas con el Sistema Nervioso Central y capacidad predictiva sobre comportamientos relacionados con la ansiedad.

Símbolo	Descripción	Localización
Genes relacionados con el sistema inmune		
Calca	Calcitonin/calcitonin-related polypeptide, alpha	1:172686170-172691061
Cd74	Cd74 molecule, major histocompatibility complex, class II invariant chain	18:56756511-56765707
H2-M9	Histocompatibility 2, M region locus 9; similar to RT1 class I, M1, gene 2	20:1945294-1947325
RT1-A2	RT1 class, CE14: RT1 class I, CE16: RT1 class Ia, locus A2: RT1 class Ib, locus CI: RT1 class Ia, locus A1: RT1 class I, A3	20:5021800-5025330
RT1-EC12	Chain: class I MHC heavy chain RT1.A (n) antigen, chain: MHC class I protein, chain: MHC class I RT1.Ac heavy chain, signal peptide, RT1 class I. CE1: RT1 class I. CE12: similar to RT1 class I. CE1	20:3594968-3598027
RT1-T24-1	RT1 class I, locus T24, gene 1 (pubmed)	20:2907237-2922971
Ltb	Lymphotoxin beta (TNF superfamily, member 3)	20:3666525-3668369
Genes relacionados con la percepción sensorial		
Accn3	Amiloride-sensitive cation channel 3	4:6125614-6129660
Mab21l1	Mab-21-like 1 (C. elegans)	2:145006131-145008520:1
Calca	Calcitonin/calcitonin-related polypeptide, alpha	1:172686170-172691061
Pcdh15	Protocadherin 15: similar to protocadherin 15	20:14505890-14990127
Rtp3	Receptor (chemosensory) transporter protein 3	8:115388094-115392602
Or1594	Olfactory receptor 594	3:71616656-71617591
Trh	Thyrotropin releasing hormone	4:126425185-126427651

Además de los genes ya comentados, se identificaron un conjunto de genes que también presentaban funciones relacionadas con el Sistema Nervioso Central y que mostraron capacidad predictora relevante en relación a las respuestas de ansiedad y miedo (Tabla 20). Ejemplos de ello son los genes “*GLI-Kruppel family member GLI 1 gene*” (Gli1) y “*Wilms tumor 1*” (Wt1), de los que se han descrito funciones relacionadas con la reproducción sexual y el desarrollo del Sistema Nervioso Central. Estos genes mostraron sobre-regulación en sus niveles de expresión (en el grupo “Baja ansiedad”), y presentaron buena capacidad predictora de comportamientos relacionados con la ansiedad

incondicionada, tales como la distancia total recorrida en la “Caja nueva”, el número de SAP, el número de entradas en las secciones abiertas y el número de cruces entre las secciones en el test del Laberinto Circular Elevado (Figuras 32).

A pesar de ser resultados preliminares (previos a la validación por qRT-PCR), es importante resaltar que en las muestras de hipocampo analizadas se ha identificado un listado de genes que sobretodo tiene implicaciones en la regulación de la plasticidad/proyección neural, respuesta inmune y de las vías de señalización de las proteínas G, así como también en la modulación de respuestas hormonales vinculadas al estrés (como la hormona liberadora de tirotrópina).

5.2.3 Recapitulación: miedo y ansiedad condicionada, expresión genética diferencial y relación funcional entre amígdala e hipocampo

En primer lugar, ante una situación “amenazante” que implica conflicto, como la adquisición de la evitación activa en dos sentidos en la “*Shuttle-box*” (implica el conflicto “evitación pasiva/evitación activa”), la amígdala intervendría en la ejecución de la respuesta de escape en el primer ensayo tras recibir el sujeto el primer choque eléctrico. A partir del segundo ensayo, cuando aparece el estímulo condicionado –que irá seguido del incondicionado, el choque eléctrico- el sujeto probablemente empiece a experimentar el conflicto “evitación pasiva-*freezing*”/“evitación activa” al tiempo que el sistema septo-hipocámpico ya está actuando como “comparador” de las posibilidades de respuesta (p. ej. Gray y McNaughton, 2000; Figura 1). El “diálogo septo-hipocámpico-amigdalino” continua a lo largo de los ensayos sucesivos de la tarea, y la función comparadora del sistema septo-hipocámpico -y las respuestas ejecutadas a través de la amígdala- sería la que permitirá al sujeto “aprender”, en mayor o menor grado, las respuestas más adaptativas en la tarea de “*Shuttle-box*”, la huida o la evitación activa del choque (Driscoll y cols., 2009; Fernández-Teruel y cols., 1991; Figura 2).

La adquisición de la evitación activa en dos sentidos en la “*Shuttle-box*” es, por tanto, un buen modelo animal de ansiedad (condicionada) en el que el miedo condicionado

inicial (la tendencia a la evitación pasiva o al “*freezing*”, consecuencia del condicionamiento clásico de miedo en las fases iniciales) es uno de los determinantes (p.ej. Fernández-Teruel y cols., 1991; Gray, 1982; Gray y McNaughton, 2000). A diferencia del miedo condicionado puro, en el que está implicada básicamente la amígdala, en esta tarea estarían implicados dinámicamente e interactivamente el hipocampo y la amígdala (ver revisión en Gray y McNaughton, 2000; López-Aumatell y cols., 2008). Es por esto por lo que esperábamos que, tanto en amígdala como en hipocampo, la diferenciación por el rasgo “Baja vs. Alta capacidad de adquisición” (Alta vs. Baja ansiedad), conllevara “rasgos de regulación” génica diferencial.

En nuestros análisis hemos obtenido 414 genes expresados diferencialmente en las muestras de amígdala y 208 en las muestras de hipocampo. En amígdala, se identificaron 36 genes (8%, 30 sobre-expresados/6 sub-expresados) con funciones relacionadas con neurotransmisión, procesos neuroinmunitarios, neuroendocrinos y/o comportamentales, de los que el 53% (19 genes) presentaron capacidad predictiva (según los análisis de regresión) sobre variables que no eran el criterio de selección (número de evitaciones o el tiempo medio de latencia en la tarea de “*Shuttle-box*”), esto es, variables como el “miedo – *freezing*- condicionado al contexto” u otras de los tests incondicionados.

Por su parte, en hipocampo, se identificaron 28 genes (13%, 19 sobre-expresados/9 sub-expresados) con funciones relacionadas con neurotransmisión, procesos neuroinmunitarios, neuroendocrinos y/o comportamentales, de los que el 46% (13 genes) presentaron capacidad asociación (según las regresiones) con variables que no eran el criterio de selección.

Parece interesante señalar que en amígdala 14 genes (23 %) fueron predictores del miedo condicionado (“*freezing*”), a diferencia de los resultados de hipocampo, que mostraron sólo dos genes (7%) asociados al miedo condicionado. Por contra, sólo un 18% de regresiones (entre genes y respuestas conductuales) significativas asociaron genes de la amígdala con respuestas incondicionadas de ansiedad (“*head-dips*”, latencia primera entrada en secciones abiertas del laberinto circular, SAP en este mismo test, distancia recorrida o “*rearings*” en la “caja nueva”, CET -cruces durante el periodo de exploración de la “*Shuttle-box*”), mientras que estas regresiones fueron un total del 57% en el hipocampo. Estos resultados, si bien provisionales por no disponer aún de la validación por

PCR de los genes de hipocampo, muestran coherencia con las principales y más actuales teorías (y evidencia experimental) sobre las funciones de ambas estructuras y la relación funcional entre ellas, pues se atribuye a la amígdala un papel predominante en el condicionamiento de miedo, y al hipocampo una función “comparadora” en situaciones de conflicto (entre posibles tendencias de respuesta) o incerteza que determinaría las respuestas de ansiedad (incondicionada y condicionada) (ver p. ej. Gray y McNaughton, 2000; LeDoux, 1996; McNaughton y Corr, 2004).

Esquema estructural-funcional hipotético

Entre los genes expresados diferencialmente, en amígdala e hipocampo, en las ratas de “Baja ansiedad” vs “Alta ansiedad”, creemos que es especialmente destacable el hecho de que el gen *Avpr1b* (relacionado con la arginina-vasopresina) ha sido hallado en ambas estructuras (aparte del gen *H2-M9*, del que su función en los rasgos que nos ocupan es desconocida), aunque aparentemente esté regulado de manera opuesta en ambas (ver Tabla 17 y Tabla 21).

La vasopresina se ha propuesto como un gen candidato a regular la ansiedad, según Landgraf y cols. (2007) a partir de sus estudios con las ratas HAB (“altas ansiosas”) y LAB (“bajas ansiosas”). Son notables algunas similitudes con el trabajo de Landgraf, pues sus ratas se diferencian en adquisición de la evitación activa en dos sentidos en la “*Shuttle-box*” (aparte de por sus niveles de ansiedad incondicionada en el test de ansiedad del “laberinto en cruz elevado”, que ha sido su criterio de selección), siendo las LAB las que mejor adquieren la tarea, de modo similar a nuestra selección de extremos N/Nih-HS (Landgraf y cols., 2003; Landgraf y Wigger, 2003). Y es remarcable que, a través de dos procesos de selección tan diferentes, y de “*backgrounds*” genéticos de los animales tan diversos, se pueda llegar a implicar a una misma vía genética (la de la vasopresina) en la regulación de conductas/respuestas ansiosas o de miedo (o temerosidad). Dicho de otra manera, se produce un cierto paralelismo entre el hecho de que las ratas HAB y las RLA (“altas ansiosas”, pobres evitadoras en la “*Shuttle-box*”) presenten mayor expresión central del gen AVP que las LAB y las RHA (“bajas ansiosas”, buenas evitadoras en la “*Shuttle-box*”, Landgraf y cols., 2007; ver también Aubry y cols. 1995) y el hecho de que las ratas N/Nih-HS de “Alta ansiedad” del presente estudio presenten menor expresión del gen del

receptor *Avpr1b* en la amígdala. Esta regulación a la baja del receptor sería compatible con el hecho de que las ratas N/Nih-HS de “Alta ansiedad” pudiesen estar sintetizando mayores cantidades de AVP (sea en hipotálamo, en amígdala, o en ambos) que podrían redundar en la regulación del receptor a la baja. En cualquier caso, aún si puede parecer lógico, el razonamiento anterior es altamente especulativo en el momento presente, puesto que los niveles de expresión de AVP en amígdala en nuestro estudio fueron “Alta ansiedad” = 10.1 vs “Baja ansiedad” = 9.6 (FC = -1.41), diferencia no significativa, y puesto que dicha argumentación no sería válida si la aplicamos a los datos de hipocampo (en que la relación entre los niveles de expresión del gen *Avpr1b* en los dos grupos de ratas es inversa a la de la amígdala). Además, no disponemos de resultados de microarray en hipotálamo (aunque están en proceso).

En su mayoría, la arginina vasopresina es sintetizada principalmente en el hipotálamo, y en menor grado en otras regiones del SNC como la amígdala y la estra terminalis. Sin embargo, estudios con hibridación *in situ* consiguieron observar expresión prepro AVP (ppAVP) y mRNA en el hipocampo (regiones CA1 y CA3, Habener y cols., 1989). Esta hormona participa en procesos de aprendizaje y memoria, lo que es coherente con que esté conectada con funciones del hipocampo. En varios estudios se descubrió que la administración crónica de AVP mejoraba ligeramente el comportamiento de las ratas con lesiones en el hipocampo, pero sobretodo potenciaba el aprendizaje estratégico en ratas con lesiones en la corteza prefrontal (Dietrich y Allen, 1997).

Estudios con humanos han descubierto que la oxitocina puede considerarse antagonista de la vasopresina cuando en ciertas situaciones/condiciones inhibe la liberación de ACTH y cortisol (McCarthy, 1995). La oxitocina es una hormona secretada por la glándula pituitaria, y sus receptores se expresan en la médula espinal y en neuronas de muchas regiones cerebrales, como: la amígdala, el hipotálamo ventromedial, el tronco del encéfalo y el séptum. Entre otros, tiene efecto anti-estresante en mamíferos, tanto en machos como en hembras, reduce la presión sanguínea, los niveles de corticosterona e incrementa los niveles de insulina y colecistoquinina (Gimpl y Fahrenholz, 2001). Estudios de exposiciones a estrés agudo (inmovilización) en ratas comprobaron incrementos de los niveles de mRNA de oxitocina posteriores a esta exposición (Jezova y cols., 1995). Por otro

lado, la estimulación de la liberación de oxitocina podría facilitar la activación del eje HPA e incrementar la liberación de glucocorticoides, y algunos de estos efectos podrían estar mediados por la acción dopaminérgica en regiones límbicas (McCarthy, 1995). Abundando en este perfil de efectos aparentemente “bimodales” de la oxitocina y la vasopresina, otros estudios muestran que la infusión de dosis bajas de vasopresina en el núcleo central de la amígdala aumentó las respuestas de miedo condicionado de las ratas RLA (“muy ansiosas”), mientras que la administración de dosis altas de vasopresina u oxitocina atenuaba dichas respuestas (Driscoll y cols., 2009). Debido a que la vasopresina y la oxitocina sólo se diferencian en dos aminoácidos de los nueve, y que algunos de sus receptores muestran reactividad cruzada, se ha sugerido que existe interacción potencial entre ambos sistemas de neuropéptidos (Veenema, 2012).

Resumiendo, en nuestros resultados hemos obtenido diferencias en el nivel de expresión del gen *Avpr1b* entre los dos grupos de ratas analizados (en amígdala este gen estaba sobre-expresado en las ratas del grupo con “Baja ansiedad”, mientras que en hipocampo sucedió al revés). Otros genes identificados en nuestro estudio, con implicaciones en respuestas/funciones neuroendocrinas, y que parecen interactuar con las dos estructuras que nos ocupan (amígdala e hipocampo) son, por ejemplo, los genes que codifican receptores de prolactina (como el *Pr14a1* y *Pr15a2* en amígdala) y los reguladores de hormonas tiroideas (como el *TRH* y *Tg* en hipocampo, o el gen *Duox2* en amígdala).

Por todo lo comentado anteriormente, no parece incongruente que, dadas las conexiones anatómico-funcionales entre hipocampo y amígdala, y las relaciones jerárquicas entre ésta y el eje HPA, hayamos observado en las ratas N/Nih-HS (extremas en ansiedad) expresión diferencial de genes implicados en vías neuroendocrinas relacionadas con la regulación/modulación de la ansiedad, el miedo o el estrés.

No parece descabellado pensar, por tanto, que los genes *Avpr1b*, *H2-M9*, *TRH* y *Tg* en hipocampo, o los procesos dependientes de ellos, estén vinculados (en función de “niveles” del rasgo de ansiedad, o de situaciones de estrés) a modificaciones/modulación de la función amigdalina, puesto que en la amígdala también se hallan diferencialmente expresados el *Avpr1b* y *H2-M9*. La función amigdalina, que podría ser afectada, entre otros, por dicho mecanismo “vasopresinérgico” e hipocámpico, podría a su vez modular la

actividad del eje HPA por acción, por ejemplo, del gen *Ucn3*, con interacciones con el receptor *CRFR2*, o/y por acción del mismo gen *Avpr1b* (que regula a la hormona arginina vasopresina, potenciadora del efecto del CRH junto con la hormona oxitocina; Aubry y cols., 1995; Driscoll y cols., 2009).

Por otro lado las interacciones entre la amígdala y el hipotálamo, nos dan claves sobre la implicación de genes relacionados con la regulación de las catecolaminas (como el gen *Slc6a2* involucrado en el transporte de noradrenalina), del receptor opioide delta-1 (gen *oprd1*, que regula indirectamente la actividad hipotalámica y modula asimismo la ansiedad; Randall-Thompson y cols., 2010), de las hormonas esteroideas (como por ejemplo es el caso del gen regulador de la taquinina 3), de los niveles plasmáticos de glucosa, de la producción de tirosina o de los niveles de insulina (como en el caso del gen *Duox2* relacionado con el hipotiroidismo en humanos y la síntesis de hormonas tiroideas), y con la regulación de la prolactina (como los genes *Prl4a1* y *Prl5a2*).

A partir de este trabajo exploratorio, hemos propuesto el anterior “esquema estructural-funcional hipotético” con el objetivo, en la medida de lo posible, de integrar nuestros resultados genéticos en el esquema general de la neuroanatomía y neurobiología de las respuestas de ansiedad y miedo. Aunque no deja de ser una aproximación preliminar, puesto que para interpretar correctamente estos resultados es necesario tener en cuenta las limitaciones metodológicas de nuestro estudio y de la técnica de microarray que hemos aplicado. Algunas de estas limitaciones metodológicas, son por ejemplo, la “n” reducida, la necesidad de extraer RNAm de alta calidad, las incompatibilidades y el elevado coste económico de los equipamientos tecnológicos, la falta de reproductibilidad de los resultados, la variación de los protocolos del análisis en función del objetivo del estudio y los sesgos metodológicos como artefactos en el análisis de los datos y de las imágenes (Esteban y cols., 2008).

A pesar del cariz hipotético y preliminar de las conclusiones derivadas de estos estudios, pensamos que pueden servir como punto de partida/referencia en el diseño de nuevas hipótesis, más dirigidas y concretas, para la realización de nuevos experimentos genéticos.

Limitaciones del presente trabajo y perspectivas futuras

Este trabajo presenta la primera caracterización neuroendocrina y en parte conductual de las ratas genéticamente heterogéneas N/Nih-HS, por lo que respecta al estilo conductual de afrontamiento y de respuestas de estrés. Asimismo presenta, por primera vez, los perfiles de expresión génica central (amígdala/hipocampo) en ratas N/Nih-HS seleccionadas por presentar diferencias extremas en respuestas de ansiedad.

Los resultados obtenidos hasta el momento posicionan al stock de ratas N/Nih-HS como animales con estilo de afrontamiento predominantemente pasivo y con elevadas respuestas neuroendocrinas ante el estrés. Y, desde el punto de vista genético, han permitido observar la expresión diferencial de diversos genes con función neuroendocrina, en función de los niveles divergentes de ansiedad, lo que supone un paso inicial importante (creemos) para el establecimiento y estudio de posibles genes candidatos a ser relevantes en la regulación de los fenotipos estudiados.

Es pertinente remarcar, aquí, que somos conscientes de que la información que nos aporta el estudio de microarray ha de ser considerada con máxima cautela, pues se deben aún validar (por PCR) una serie de genes, y porque, en su defecto, hemos apoyado nuestras interpretaciones de los resultados genéticos en las diferencias en expresión de genes aparentemente interesantes entre los grupos de ratas (“Alta ansiedad” vs “Baja ansiedad”) y en las asociaciones “gen-conducta” observadas a través de modelos de regresión lineal. La reducida “n” es un aspecto que evidentemente limita estos análisis y recomienda cautela en su interpretación.

No obstante lo anterior, que obviamente da carácter esencialmente exploratorio al Estudio 3, el hecho de que algunos de los genes diferencialmente expresados tengan funciones neuroendocrinas que han sido relacionadas con la ansiedad, el miedo o el estrés, nos ha llevado a permitirnos un cierto nivel de especulación (siempre sobre las bases más lógicas posibles) en la “Discusión” de la presente Tesis.

Con todas estas cautelas en mente, a partir de los resultados genéticos obtenidos parecería lógico plantearse algunos estudios futuros destinados a comprender mejor las

funciones –respecto a los rasgos conductuales que nos interesan- de los genes (o, al menos, de algunos de ellos) con expresión diferencial identificados en el Estudio 3. Sería interesante, por ejemplo, estudiar en más detalle las implicaciones funcionales tanto de los receptores prolactínicos (Pr14a1 y Pr15a2) como de los genes reguladores de la Oxitocina y Colecistoquinina, y sus implicaciones en las respuestas de ansiedad y miedo; así como también analizar las relaciones/interacciones entre los genes relacionados con la función tiroidea (como el TRH y Tg en hipocampo o el gen *Duox2* en amígdala) y genes prolactínicos, o estudiar la posible implicación en la ansiedad de los genes receptores opioides, como el gen *Oprd1* (en amígdala) y el *Oprl1* (en hipocampo).

Además de los resultados descritos en la presente Tesis, en un estudio paralelo se realizaron análisis de microarray sobre muestras en amígdala e hipocampo de las ratas de las cepas RHA-I/RLA-I (caracterizadas de forma conductual y hormonal en el Estudio 1). El análisis de este estudio se halla en curso, y es esperable que aporte datos interesantes al ser comparado con los presentes resultados de expresión génica en ratas N/Nih-HS. Por otra parte, tanto de las ratas N/Nih-HS como de las cepas de ratas *Roman*, conservamos muestras congeladas de otras estructuras cerebrales (córtex prefrontal medial, núcleo accumbens e hipotálamo, entre otras) interesantes para futuros estudios de expresión génica en relación con respuestas de ansiedad y miedo.

A partir de la experiencia adquirida en el análisis de microarray con la realización de la presente Tesis cabe tener en cuenta algunos factores limitantes existentes en la aplicación del análisis de microarray y que pueden dificultar el alcance de los objetivos. Entre otras, es necesario apuntar, el elevado coste económico de los análisis genéticos (por ejemplo, 60 muestras cuestan aproximadamente 30.000 euros), que en nuestro caso, impidió enviar a analizar un mayor número de muestras y/o estructuras, lo que disminuyó la potencia del Estudio 3. También, el hecho de depender de organismos externos (empresa externa que realiza los análisis de microarray) influye de forma importante sobre la planificación temporal de la realización de los microarrays y su validación por qRT-PRC (por este motivo, en nuestro caso, no se han podido presentar todavía los resultados de la validación por qRT-PCR de los genes hipocámpicos). El tamaño de la muestra (la “n” de muestras de cada grupo experimental), en parte condicionado por los precios de estos

análisis genéticos, suele ser otro factor limitante que tiene que ver con que sea difícil relacionar expresión génica diferencial con determinados fenotipos y, probablemente, también con el hecho de que sea más difícil la replicabilidad de resultados.

El tamaño de la muestra (las “n”) es posible que también tenga influencia sobre el riesgo de que aparezcan “falsos negativos”, esto es, genes que realmente pueden ser importantes y que quedan excluidos por falta de potencia en el diseño (en lo que la “n” es un factor crítico). Es importante afinar en el criterio de selección de los genes, para minimizar al máximo el riesgo de excluir genes que realmente sean interesantes para el objetivo de cada estudio. Así, por ejemplo, en los resultados amigdalares obtuvimos inicialmente un array con 45.222 genes expresados, que a partir de las técnicas estadísticas empleadas (ver *Métodos*) se redujo a 19.175 genes, de los que sólo 414 tenían expresión diferencial significativa. Es razonable preguntarse si habríamos hallado más genes expresados diferencialmente de haber utilizado, por ejemplo, 30 muestras de amígdala de cada subgrupo de ratas (“Alta ansiedad” y “Baja ansiedad”), es decir una “N” total de 60 en lugar de 14 en el Estudio 3.

6. CONCLUSIONES

Conclusiones generales

A partir de los resultados obtenidos en los tres estudios de la presente Tesis, se puede concluir que:

- (1) Las ratas genéticamente heterogéneas N/Nih-HS presentan un perfil de comportamiento defensivo, en situaciones de conflicto incondicionado/condicionado y de estrés inescapable, muy similar al estilo de afrontamiento pasivo que es característico de las ratas RLA-I (muy ansiosas).
- (2) Las ratas N/Nih-HS presentan un perfil de respuestas hormonales al estrés relativamente elevadas, de magnitud similar a la de las ratas RLA-I (muy sensibles al estrés) en cuanto a la ACTH y la corticosterona (eje HPA), e incluso de mayor magnitud por lo que respecta a la respuesta de la prolactina.
- (3) Los estudios correlacionales y factoriales (Estudio 1 y Estudio 2) indican asociaciones esperables entre la ansiedad incondicionada (Laberinto Circular Elevado) y la condicionada (adquisición evitación activa en dos sentidos), así como que el significado de la conducta de “*grooming*” (acicalamiento, autohigiene; test de Campo Abierto) va más allá de reflejar únicamente niveles de ansiedad/miedo de forma lineal.
- (4) A nivel genético, la técnica de análisis de microarray (de expresión génica), aplicada a muestras de amígdala e hipocampo de ratas N/Nih-HS con “Baja ansiedad” vs “Alta ansiedad”, ha resultado ser útil para detectar expresión diferencial de genes con funciones neuroendocrinas, algunas de ellas relacionadas con los fenotipos (o rasgos) de interés.

CONCLUSIONES

- (5) Debido a su heterogeneidad genética, y a los resultados obtenidos en los análisis de microarray en amígdala e hipocampo, se puede concluir que las ratas N/Nih-HS pueden ser un modelo animal útil para el estudio de las bases genéticas de la ansiedad y el miedo condicionado.
- (6) Genes que aparecen como relevantes (expresados diferencialmente) en la amígdala se hallan relacionados con vías neuroendocrinas, como la de la prolactina, la arginina-vasopresina y la oxitocina, a las que se han atribuido funciones relevantes en la regulación de las respuestas de estrés.
- (7) En hipocampo, los genes que codifican sobretodo TRH, Tg, Avpr1b han mostrado asociaciones con respuestas de ansiedad.

7. REFERENCIAS

- Aguilar, R., Gil, L., Flint, J., Gray, J.A., Dawson, G.R., Driscoll, P., Giménez-Llort, L., Escorihuela, R.M., Fernández-Teruel, A. y Tobeña, A. (2002). Learned fear, emotional reactivity and fear of heights: a factor analytic map from a large F2 intercross of Roman rat strains. *Brain Res Bull*, 57: 17-26.
- Aguilar, R.; Gil, L.; Fernández-Teruel, A. y Tobeña, A. (2004). Genetically-based behavioral traits influence the effects of Shuttle Box avoidance overtraining and extinction upon intertrial responding: a study with the Roman rat strains. *Behav Processes.*, 66: 63-72.
- Aguilar-Valles, A.; Sánchez, E.; de Gortari, P.; Balderas, I.; Ramírez-Amaya, V.; Bermúdez-Rattoni, F. y Joseph-Bravo, P. (2005). Analysis of the stress response in rats trained in the water-maze: differential expression of corticotropin-releasing hormone, CRH-R1, glucocorticoid receptors and brain-derived neurotrophic factor in limbic regions. *Neuroendocrinology*, 82: 306-19.
- Ain, R.; Tash, J.S. y Soares, M.J. (2003). Prolactin-like protein-A is a functional modulator of natural killer cells at the maternal-fetal interface. *Mol Cell Endocrinol*, 204: 65-74.
- Alam, I.; Koller, D.L.; Sun, Q.; Roeder, R.K.; Cañete, T.; Blázquez, G.; López-Aumatell, R.; Martínez-Membrives, E.; Vicens-Costa, E.; Mont, C.; Díaz, S.; Tobeña, A.; Fernández-Teruel, A.; Whitley, A.; Strid, P.; Díez, M.; Johannesson, M.; Flint, J.; Econs, M.J.; Turner, C.H. y Foroud, T. (2011). Heterogeneous stock rat: A unique animal model for mapping genes influencing bone fragility. *Bone*, 48: 1169-1177.
- Alam, S.M.; Ain, R.; Konno, T.; Ho-Chen, J.K. y Soares, M.J. (2006). The rat prolactin gene family locus: species-specific gene family expansion. *Mamm Genome*, 17: 858-77.
- Andrus, B.M.; Blizinsky, K.; Vedell, P.T.; Dennis, K.; Shukla, P.K.; Schaffer, D.J.; Radulovic, J.; Churchill, G.A. y Redei, E.E. (2010). Gene expression patterns in the hippocampus and amygdala of endogenous depression and chronic stress models. *Molecular psychiatry*, 1-13. doi:10.1038/mp.2010.119.
- Armario, A.; Gavalda, A. y Marti, J. (1995). Comparison of the behavioural and endocrine response to forced swimming stress in five inbred strains of rats. *Psychoneuroendocrinology*, 20: 879-90.
- Armario, A. (2006). The hypothalamic-pituitary-adrenal axis: what can it tell us about stressors? *CNS Neurol Disord Drug Targets*, 5: 485-501. Review.
- Aubry, J.M.; Bartanusz, V.; Driscoll, P.; Schulz, P.; Steimer, T. y Kiss, J.Z. (1995). Corticotropin-releasing factor and vasopressin mRNA levels in Roman High-and Low-Avoidance rats: response to open-field exposure. *Neuroendocrinology*, 61: 89-97.
- Babygiriya, R.; Bülbül, M.; Yoshimoto, S.; Ludwig, K. y Takahashi, T. (2012). Central and peripheral release of oxytocin following chronic homotypic stress in rats. *Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical*, 167: 56-60.
- Barreda-Gómez, G.; Giralt, M.T. y Rodríguez-Puertas, R. (2005). G protein-coupled galanin receptor distribution in the rat central nervous system. *Neuropeptides*, 39: 153-6.
- Battaglia, M. y Ogliari, A. (2005). Anxiety and panic: from human studies to animal research and back. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*: 169-179.

- Becerra-García, M.; Madalena, A.C.; Estanislao, C.; Rodríguez-Rico, J.L. y Dias, H. (2007). Fear and anxiety: adaptive value and maladaptations. *Rev Latinoam Psicol*, 39: 75-81.
- Bentareha, R.; Araujo, F.; Ruano, D.; Driscoll, P.; Escorihuela, R.M.; Tobeña, A.; Fernández-Teruel, A. y Vitorica, J. (1998). Pharmacological properties of the GABA(A) receptor complex from brain regions of (hypoemotional) Roman high- and (hyperemotional) low-avoidance rats. *Eur J Pharmacol*, 354: 91-7.
- Bisgaard, C.F.; Jayatissa, M.N.; Enghild, J.J.; Sánchez, C.; Artemychyn, R. y Wiborg, O. (2007). Proteomic investigation of the ventral rat hippocampus links DRP-2 to escitalopram treatment resistance and SNAP to stress resilience in the chronic mild stress model of depression. *Mol Neurosci*, 32: 132-44.
- Blalock, E.M.; Chen, K.C.; Sharrow, K.; Herman, J.P.; Porter, N.M.; Foster, T.C. y Landfield, P.W. (2003). Gene microarrays in hippocampal aging: statistical profiling identifies novel processes correlated with cognitive impairment. *J Neurosci.*, 23: 3807-19.
- Blanchard, D.C. y Blanchard, R.J. (1972). Innate and conditioned reactions to threat in rats with amygdaloid lesions. *J Comp Physiol Psychol*, 81: 281-290.
- Blanchard, R.J.; Blanchard, D.C.; Rodgers, J. y Weiss, S.M. (1990). The characterization and modeling of antipredator defensive behavior. *Neurosci. Biobehav Rev*, 14: 463-472.
- Blanchard, R.J.; Yudko, E.B.; Rodgers, R.J. y Blanchard, D.C. (1993). Defense system psychopharmacology: an ethological approach to the pharmacology of fear and anxiety. *Behav Brain Res*, 58: 155-65.
- Blohm, D.H. y Guiseppi-Elie, A. (2001). New developments in microarray technology. *Curr Opin Biotechnol*, 12: 41-7.
- Boix, F., Fernández-Teruel, A. y Tobeña, A. (1988) The anxiolytic action of benzodiazepines is not present in handling-habituated rats. *Pharmacol Biochem Behav* 31, 541-6.
- Bradesi, S.; Martinez, V.; Lao, L.; Larsson, H. y Mayer, E.A. (2009). Involvement of vasopressin 3 receptors in chronic psychological stress-induced visceral hyperalgesia in rats. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 296: G302-9.
- Braw, Y.; Malkesman, O.; Merlender, A.; Bercovich, A.; Dagan, M.; Maayan, R.; Weizman, A. y Weller, A. (2006). Stress hormones and emotion-regulation in two genetic animal models of depression. *Psychoneuroendocrinology*, 31: 1105-16.
- Broadhurst, P.L. (1957). Determinants of emotionality in the rat. I. Situational factors. *British Journal of Psychology*, 48: 1-12.
- Broadhurst, P.L. (1958a). Determinants of emotionality in the rat. II. Antecedent factors. *British Journal of Psychology*, 49: 12-20.
- Broadhurst, P.L. (1958b). Determinants of emotionality in the rat. II. Strain differences. *British Journal of Psychology*, 50: 55-59.
- Broadhurst, P.L. (1975). The Maudsley reactive and non reactive strains of rats: a survey. *Behavior Genetics*, 5: 299-319.
- Broadhurst, P.L. y Bignami, G. (1965). Correlative effects of psychogenetic selection: a study of the Roman high and low avoidance strains of rats. *Behav Res Ther*, 2: 273-280.

- Bronstein, J.M.; Popper, P.; Micevych, P.E. y Farber, D.B. (1996). Isolation and characterization of a novel oligodendrocyte-specific protein. *Neurology*, 47: 772-8.
- Brown, E.S. J.; Woolston, D.; Frol, A.; Bobadilla, L.; Khan, D.A.; Hanczyc, M.; Rush, A.J.; Fleckenstein, J.; Babcock, E. y Cullum, C.M. (2004). Hippocampal volume, spectroscopy, cognition, and mood in patients receiving corticosteroid therapy. *Biol Psychiatry*, 55: 538-45.
- Brush, R.R. (2003). Selection for differences in avoidance learning: the Syracuse strains differ in anxiety, not learning ability. *Behavior Genetics*, 33: 677-696.
- Buck, L. y Axel, R. (1991). A nove multigene family may encode odorant receptors: a molecular basis for odor recognition. *Cell*, 65: 175-187.
- Carrasco, J.; Márquez, C.; Nadal, R.; Tobeña, A.; Fernández-Teruel, A. y Armario, A. (2008). Characterization of central and peripheral components of the hypothalamus-pituitary-adrenal axis in the inbred Roman rat strains. *Psychoneuroendocrinology*, 33: 437-45.
- Casada, J. y Amdur, R. (1998). Psychophysiologic responsivity in posttraumatic stress disorder: generalized hyperresponsiveness versus trauma especificity. *Biol Psychiatry*, 44: 1037-44.
- Castanon, N., Dulluc, J., Le Moal, M y Mormède, P. (1992) Prolactin as a link between behavioral and immune differences between the roman rat lines. *Physiol Behav* 51, 1235-1241.
- Castanon, N.; Dulluc, J.; Le Moal, M. y Mormède, P. (1994a). Maturation of the behavioral and neuroendocrine differences between the Roman rat lines. *Physiology & Behavior*, 55: 775-782.
- Castanon, N., y Mormède, P. (1994b). Psychobiogenetics: adapted tolos for the study of the coupling between behavioral and neuroendocrine traits of emotional reactivity. *Psychoneuroendocrinology*, 19: 257-282.
- Castanon, N.; Pérez-Díaz, F. y Mormede, P. (1995). Genetic analysis of the relationship between behavioral and neuroendocrine traits in Roman high and low avoidance rat lines. *Behav Geneti*, 25: 371-383.
- Castanon, N.; Konsman, J.P.; Médina, C.; Chauvet, N. y Dantzer, R. (2003). Chronic treatment with the antidepressant tianeptine attenuates lipopolysaccharide-induced Fos expression in the rat paraventricular nucleus and HPA axis activation. *Psychoneuroendocrinology*, 28: 19-34.
- Cavallaro, S.; D'Agata, V.; Manickam, P.; Dufour, F. y Alkon, D.L. (2002). Memory-specific temporal profiles of gene expression in the hippocampus. *Proc Natl Acad Sci USA*, 99: 16279-84.
- Chen, J.S.; Menesini-Chen, M.G.; Giachetti, D.; Matteucci, F.; Barbetti, M.; Sensini, C. y Baccetti, B. (1993). Correlation between male fertility and acrosin-like protease activity in rats treated with *Spartium junceum*. *Zygote*, 1: 309-13.
- Chen, P.; Lin, D.; Giesler, J. y Li, C. (2011). Identification of urocortin 3 afferent projection to the ventromedial nucleus of the hypothalamus in rat brain. *J Comp Neurol*, 519: 2023-42.

- Chen, P.; Vaughan, J.; Donaldson, C.; Vale, W. y Li, C. (2010). Injection of Urocortin 3 into the ventromedial hypothalamus modulates feeding, blood glucose levels, and hypothalamic POMC gene expression but not the HPA axis. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 298: E337-45.
- Chrousos, G.P., Torpy, D.J. y Gold, P.W. (1998). Interactions between the Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis and the Female Reproductive System: Clinical Implications. *Ann Intern Med*, 129: 229-240.
- Conti, L.; Jirout, M.; Breen, L.; Vanella, J.J.; Schork, N.J.; y Printz, M.P. (2004). Identification of quantitative trait loci for anxiety and locomotion phenotypes in rat recombinant inbred strains. *Behavior Genetics*, 34: 93-103.
- Cordeiro, M.G.; Piras, G.; Lecca, D.; Fernández-Teruel, A.; Driscoll, P. y Giorgi, O. (2005). The psychogenetically selected Roman rat lines differ in the susceptibility to develop amphetamine sensitization. *Behavioural Brain Research*, 157: 147-156.
- Coste, S.C.; Quintos, R.F. y Stenzel-Poore, M.P. (2002). Corticotropin-releasing hormone-related peptides and receptors: emergent regulators of cardiovascular adaptations to stress. *Trends Cardiovasc Med*, 12: 176-82.
- Craft, C.M.; Whitmore, D.H. y Wiechmann, A.F. (1994). Cone arrestin identified by targeting expression of a functional family. *J Biol Chem*, 269: 4613-9.
- Cutforth, T.; Moring, L.; Mendelsohn, M.; Nemes, A.; Shan, N.S.; Kim, M.M.; Frisén, J. y Axel, R. (2003). Axonal Ephrin-As and odorant receptors: coordinate determination of the olfactory sensory map. *Cell*, 114: 31-32.
- D'Agata, V. y Cavallaro, S. (2003). Hippocampal gene expression profiles in passive avoidance conditioning. *Eur J Neurosci*, 18: 2835-41.
- D'Angio, M.; Serrano, A.; Driscoll, P. y Scatton, B. (1988). Stressful environmental stimuli increase extracellular DO-FAC levels in the prefrontal cortex of hypoemotional (Roman high-avoidance) but not hyperemotional (Roman lo-avoidance) rats. An in vivo voltammetric study. *Brain Res*, 451: 237-247.
- Davis, M. (1997). Neurobiology of fear responses: the role of the amygdala. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci*, 9: 382-402.
- De Souza Silva, M.A.; Mello, E.L.; Muller, C.P.; Jocham, G.; Maior, R.S.; Huston, J.P.; Tomaz, C. y Barros, M. (2006). The tachykinin NK3 receptor antagonist SR142801 blocks the behavioral effects of cocaine in marmoset monkeys. *European journal of pharmacology*, 536: 269-278.
- Dent, G.W.; O'Dell, D.M. y Eberwine, J.H. (2001). Gene expression profiling in the amygdala: an approach to examine the molecular substrates of mammalian behavior. *Psychophysiol Behav*, 73: 841-7.
- Díaz-Morán, S.; Palència, M.; Mont-Cardona, C.; Cañete, T.; Blázquez, G.; Martínez-Membrives, E.; López-Aumatell, R.; Tobeña, A. y Fernández-Teruel, A. (2012). Coping style and stress hormone responses in genetically heterogeneous rats: comparison with the Roman rat strains. *Behav Brain Res*, 228: 203-10.

- Dietrich, A. y Allen, J.D. (1997). Vasopressin and memory. I. The vasopressin analogue AVP4-9 enhances working memory as well as reference memory in the radial arm maze. *Behav Brain Res*, 87: 195-200.
- Dopazo, J. (2006). Functional interpretation of microarray experiments. *OMICS*, 10: 398-410.
- Driscoll, P. y Bättig, K. (1982). Behavioral, emotional and neurochemical profiles of rats selected of extreme differences in active, two-way avoidance performance. En Liebrich I (Ed.) *Genetics of the brain*. Amsterdam: Elsevier Biomedical Press: 95-123.
- Driscoll, P.; Escorihuela, R.M.; Fernández-Teruel, A.; Giorgi, O.; Schwegler, H.; Steimer, T.H.; Wiersma, A.; Corda, M.G.; Flint, J.; Koolhaas, J.M.; Langhans, W.; Schultz, P.E.; Siegel, J. y Tobeña, A. (1998). Genetic selection and differential stress responses. *Ann NY Acad Sci*, 851: 501-510.
- Driscoll, P.; Fernández-Teruel, A.; Corda, M.G.; Giorgi, O. y Steimer, T. (2009). Some guidelines for defining personality differences in rats (pp. 281-300). *Handbook of Behavior Genetics*. Yong-Kyu Kim (ed.). Springer: USA.
- Durand, E.; Boutin, P.; Meyre, D.; Charles, M.A.; Clement, K.; Dina, C. y Froguel, P. (2004). Polymorphisms in the amino acid transporter solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter) member 14 gene contribute to polygenic obesity in French Caucasians. *Diabetes*, 53: 2483-6.
- Duval, F.; González, F. y Rabia, H. (2010). Neurobiology of stress. *Rev Chil Neuro-psiquiatría*, 48: 307-318.
- Estanislau, C.; Díaz-Morán, S.**; Cañete, T.; Blásquez, G.; Tobeña, A. y Fernández-Teruel, A. (2012a). The Roman strains and the NIH-heterogeneous stock rats: comparing grooming behavior in the home-cage and in its time course in response to novelty. *FeSBE. Federação das Sociedades de Biologia Experimental*.
- Estanislau, C. (2012b). Cues to the usefulness of grooming behavior in the evaluation of anxiety in the elevated plus-maze. *Psychology & Neuroscience*, 5: 105-112.
- Escorihuela, R.M. y Fernández-Teruel, A. (1998). Modelos animales en psicopatología y psicofarmacología: del análisis experimental de la conducta a la neurogenética. *Psicología Conductual*, 6: 165-191.
- Escorihuela, R.M.; Fernández-Teruel, A.; Gil, L.; Aguilar, R.; Tobeña, A. y Driscoll, P. (1999) Inbred Roman high and low avoidance rats: differences in anxiety, novelty-seeking and shuttlebox behaviors. *Physiology & Behavior*, 67: 19-26.
- Escorihuela, R.M.; Tobeña, A.; Driscoll, P. y Fernández-Teruel, A. (1995). Effects of training, early handling, and perinatal flumazenil on shuttle box acquisition in Roman low-avoidance rats: toward overcoming a genetic deficit. *Neurosci Biobehav Rev*, 19: 353-367.
- Esteban, F.J.; Cano, C.; de la Haza, I.; Cano-Ortiz, A.; Vélez de Mendizábal, N.; Goñi, J. y Horcajadas, J.A. (2008). Análisis bioinformático de datos: aplicación en microarrays. *CMR* 2008, 14: 87-96.
- Fekete, E.M.; Inoue, K.; Zhao, Y.; Rivier, J.E.; Vale, W.W.; Szücs, A.; Koob, G.F. y Zorrilla, E.P. (2006). Delayed satiety-like actions and altered feeding microstructure by a

- selective type 2 corticotropin-releasing factor agonist in rats: intra-hypothalamic urocortin 3 administration reduces food intake by prolonging the post-meal interval. *Neuropsychopharmacology*, 32: 1052-68
- Feldman, R.S.; Meyer, J.S. y Quenzer, L.F. (1997). *Principles of Neuropsychopharmacology*. Massachusetts: Sinauer Associates, Inc.
- Fernández-Teruel, (2008). *Farmacología de la conducta. De los psicofármacos a las terapias psicológicas. Ciencia y Técnica. Farmacología conductual: del análisis de la interacción entre factores psicológicos y farmacológicos a los modelos animales (pp. 37-73)* Universidad Autónoma de Barcelona (Ed.): Barcelona.
- Fernández-Teruel, A., Escorihuela, R.M., Núñez, J.F., Zapata, A., Boix, F., Salazar, W. y Tobeña, A. (1991). The early acquisition of two-way (shuttle-box) avoidance as an anxiety-mediated behavior: psychopharmacological validation. *Brain Res Bull* 26, 173–6.
- Fernández-Teruel, A.; Escorihuela, R.M.; Núñez, J.F.; Gomá, M.; Driscoll, P.; y Tobeña, A. (1992). Early stimulation effects on novelty-induced behavior in two psychogenetically selected rats lines with divergent emotionality profiles. *Neurosci Lett*, 137: 185-188.
- Fernández-Teruel, A.; Giménez-Llort, L.; Aguilar, R. y Tobeña, A. (2005). Modelos animales en psiquiatría (pp.: 341-356) *Tratado de psiquiatría*. Madrid: Ars Médica.
- Fernández-Teruel, A. y Escorihuela, R.M. (1997a). Modeling emotional reactivity and sensation/novelty seeking with the Roman/Verh rat lines/strains: an introduction. *Behav Genet*, 27: 499-501.
- Fernández-Teruel, A.; Escorihuela, R.M.; Castellano, B.; González, B. & Tobeña, A. (1997b). Neonatal handling and environmental enrichment effects on emotionality, novelty/reward seeking, and age-related cognitive and hippocampal impairments: focus on the Roman rat lines. *Behav Genet*, 27: 513-26.
- Fernández-Teruel, A.; Escorihuela, R.M.; Tobeña, A. y Driscoll, P. (1997c). The inbred Roman rat strains: similarities in morphological findings to the outbred Roman lines. 27th Annual Meeting of the Behavior Genetics Association. Toronto (Canadá). Published on: *Behavior Genetics* 27, p. 589, 1997.
- Fernández-Teruel, A.; Giménez-Llort, L.; Escorihuela, R.M.; Gil, L.; Aguilar, R.; Steimer, T. y Tobeña, A. (2002a). Early-life handling stimulation and environmental enrichment: are some of their effects mediated by similar neural mechanisms? *Pharmacol Biochem Behav*, 73: 233-45.
- Fernández-Teruel, A.; Escorihuela, R.M.; Gray, J.A.; Aguilar, R.; Gil, L.; Giménez-Llort, L.; Tobeña, A.; Bhomra, A.; Nicod, A.; Mott, R.; Driscoll, P.; Dawson, G.R. y Flint, J. (2002b). A quantitative trait locus influencing anxiety in the laboratory rat. *Genome Res*, 12: 618-26.
- Ferré, P.; Fernández-Teruel, A.; Escorihuela, R.M.; Driscoll, P.; Corda, M.G.; Giorgi, O. y Tobeña, A. (1995). Behavior of the Roman/Verh high and low avoidance rat lines in anxiety tests: relationship with defecation and self-grooming. *Physiology & Behavior*, 58 (6): 1209-1213.
- Flaherty, C. F. (1996). *Incentive relativity*. Cambridge, UK: Cambridge University Press.

- Flint, J. (2003). Analysis of Quantitative Trait Loci That Influence Animal Behavior. *Inc. J Neurobiol*, 54: 46–77.
- Flint, J. y Mott, R. (2001). Finding the molecular basis of quantitative traits: successes and pitfalls. *Nat Rev Genet*, 2: 437-45.
- Flint, J. y Shifman, S. (2008). Animal models of psychiatric disease. *Genetics & Development*, 18: 235-240.
- Flint, J.; Corley, R.; DeFries, J.C.; Fulker, D.W.; Gray, J.; Miller, S. y Collins, A. (1995). A simple genetic basis for a complex psychological trait in laboratory mice. *Science*, 269: 1432-1435.
- Freeman, M.E.; Kanyicska, B.; Lerant, A. y Nagy, G. (2000). Prolactin: structure, function, and regulation of secretion. *Physiol Rev*, 80: 1523-631.
- Fujii, T.; Masai, M.; Misawa, H.; Okuda, T. ; Takada-Takatori, Y. ; Moriwaki, Y.; Haga, T. y Kawashima, K. (2009). Acetylcholine synthesis and release in NIH3T3 cells coexpressing the high-affinity choline transporter and choline acetyltransferase. *J Neurosci Res*, 87: 3024-32.
- Fullerton, J.M.; Willis-Owen, S.A.; Yalcin, B.; Shifman, S.; Copley, R.R.; Miller, S.R.; Bhomra, A.; Davidson, S.; Oliver, P.L.; Mott, R. y Flint, J. (2008). Human-mouse quantitative trait locus concordance and the dissection of a human neuroticism locus. *Biol Psychiatry*, 63: 874-83.
- Garcia-Falgueras, A.; Castillo-Ruiz, M.M.; Put, T.; Tobeña, A. & Fernández-Teruel, A. (2012). Differential hippocampal neuron density between inbred Roman high- (low anxious) and low-avoidance (high anxious) rats. *Neurosci Lett.*, 522: 41-6.
- Gary, K.A.; Sevarino, K.A.; Yarbrough, G.G.; Prange, A.J. y Winokur, A. (2003). The thyrotropin releasing hormone (TRH) hypothesis of homeostatic regulation: implications for TRH-based therapeutics. *J Pharmacol Exp Ther*, 305: 410-416.
- Gentsch, C.; Litchsteiner, M. y Feer, H. (1981). Locomotor activity, defecation score and corticosterone levels during an openfield exposure: a comparison among individually and group-housed rats, and genetically selected rat lines. *Physiology & Behavior*, 27: 183-186.
- Gentsch, C.; Litchsteiner, M., Driscoll, P. y Feer, H. (1982). Differential hormonal and physiological responses to stress in Roman high- and low-avoidance rats. *Physiol Behav*, 28: 259-263.
- Gimpl, G. y Fahrenholz, F.(2001). The oxytocin receptor system: structure, function, and regulation. *Physiol Rev*, 81: 629-83.
- Giorgi, O.; Orlandi, M.; Escorihuela, R.M.; Driscoll, P.; Lecca, D. y Corda, M.G. (1994). GABAergic and dopaminergic transmission in the brain of Roman high-avoidance and Roman low-avoidance rats. *Brain Research*, 638: 133-138.
- Giorgi, O.; Piras, G.; Lecca, D. y Corda, M.G. (2005). Behavioural effects of acute and repeated cocaine treatments: a comparative study in sensitisation-prone RHA rats and their sensitisation-resistant RLA counterparts. *Psychopharmacology (Berl)*, 180: 530-8.

- Giorgi, O.; Piras, G. y Corda, M.G. (2007). The psychogenetically selected Roman high- and low-avoidance rat lines: a model to study the individual vulnerability to drug addiction. *Neurosci Biobehav Rev*, 31: 148-63.
- Gómez, C., Saldívar-González, J. A., y Rodríguez, R. (2002). Modelos animales para el estudio de la ansiedad: una aproximación crítica. *Salud Mental*, 25: 14-24.
- Gómez, M.J.; de la Torre, L.; Callejas-Aguilera, J.E.; Lerma-Cabrera, J.M.; Rosas, J.M.; Escarabajal, M.D.; Agüero, A.; Tobeña, A.; Fernández-Teruel, A. y Torres, C. (2008). The partial reinforcement extinction effect (PREE) in female Roman high- (RHA-I) and low-avoidance (RLA-I) rats. *Behavioural Brain Research*, 194: 187-192.
- Gómez, C.; González, A. y Rodríguez, R. (2002). Modelos animales para el estudio de la ansiedad: una aproximación crítica. *Salud Mental*, 25: 14-24.
- Gómez, F.; Lahmame, A.; de Kloet, E.R. y Armario, A. (1996). Hypothalamic-pituitary-adrenal response to chronic stress in five inbred rat strains: differential responses are mainly located at the adrenocortical level. *Neuroendocrinology*, 63: 327-37.
- Goncalves, D.S.; Lenz, G.; Karl, J. y cols. (2000). Extracellular S100B protein modulates ERK in astrocyte cultures. *NeuroReport*, 11: 807-809.
- González, M.J. (1996). Efectos des estrés crónico y de la actividad glucocorticoide sobre el crecimiento: modificaciones enel esqueleto craneal de la rata. Tesis Doctoral, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Complutense de Madrid.
- González-Perez, O.; Ramos-Remus, C.; Garcia-Estrada, J. y Luquin, S. (2001). Prednisone induces anxiety and glial cerebral changes in rats. *J Rheumatol*, 28: 2529-34.
- Grandin, T. y Deesing, M.J. (1988). Genetics and behavior during handling, restraint and herding. In: *Genetics and the Behavior of Domestic Animals*. T, Grandin (ed.) pp. 113-144, Academic Press, San Diego, CA.
- Gray, J. (1982). *The neuropsychology of anxiety*. New York: Oxford University Press.
- Gray, J. y Lalljee, B. (1974). Sex differences in emotional behavior in the rat: correlation between open field defecation and active avoidance. *Anim Behav*, 22: 856-61.
- Gray, J. y McNaughton, N. (2000). *The Neuropsychology of anxiety*. London: Oxford University Press.
- Griegel, G.; Blanchard, C. y Blanchard, R. (1996). Evidence that behaviors in the mouse defense test battery relate to different emotional states: a factor analytic study. *Physiol Behav*, 60: 1255-1260.
- Guerra-Crespo, M.; Pérez-Monter, C.; Chandra, S.; Castillo-Ramírez, S.; Gutiérrez-Rios, R.M. ; Joseph-Bravo, P. ; Pérez-Martínez, L. y Charli, J.L. (2011). Transcriptional profiling of fetal hypothalamic TRH neurons. *BMC Genomics*, 12: 222. <http://www.biomedcentral.com/1471-2164/12/222>.
- Guitart-Masip, M.; Giménez-Llort, L.; Fernández-Teruel, A.; Cañete, T.; Tobeña, A.; Ogren, S.O.; Terenius, L. y Johansson, B. (2006). Reduced ethanol response in the alcohol-preferring RHA rats and neuropeptide mRNAs in relevant structures. *Eur J Neurosci*, 23: 531-40.
- Guitart-Masip, M.; Johansson, B.; Cañete, T.; Fernández-Teruel, A.; Tobeña, A.; Terenius, L. y Giménez-Llort, L. (2008). Regional adaptations in PSD-95, NGFI-A and secretogranin

- gene transcripts related to vulnerability to behavioral sensitization to amphetamine in the Roman rat strains. *Neuroscience*, 151: 195-208.
- Habener, J.F.; Cwikel, B.J.; Hermann, H.; Hammer, R.E.; Palmiter, R.D. y Brinster, R.L. (1989). Metallothionein-vasopressin fusion gene expression in transgenic mice. Nephrogenic diabetes insipidus and brain transcripts localized to magnocellular neurons. *J Biol Chem*, 264: 18844-52.
- Hansen, C. y Spuhler, K. (1984). Development of the National Institutes of Health genetically heterogeneous stock. *Alcohol Clin Exp Res*, 8: 477-9.
- Harada, K.; Yamaji, T. y Matsuoka, N. (2008). Activation of the serotonin 5-HT_{2C} receptor is involved in the enhanced anxiety in rats after single-prolonged stress. *Pharmacol Biochem Behav*, 89: 11-6.
- Henderson, N.D.; Turri, M.G.; DeFries, J.C. y Flint, J. (2004). QTL analysis of multiple behavioral measures of anxiety in mice. *Behavior Genetics*, 34: 267-293.
- HHMI – Research News <http://www.hhmi.org/news/2004nobel.html> (04/10/2004)
- Hu, J. y Tsien, J.Z. (2003). Functional genomics: profiling the brain and cognition with DNA microarrays. *Appl Genomics Proteomics*, 1: 219-226.
- Hurt, P.; Walter, L.; Sudbrak, R.; Klages, S.; Müller, I.; Shiina, T.; Inoko, H.; Lehrach, H.; Günther, E.; Reinhardt, R. y Himmelbauer, H. (2004). The genomic sequence and comparative analysis of the rat major histocompatibility complex. *Genome Res*, 14: 631-9.
- Irwin, L.N. (2001). Gene expression in the hippocampus of behaviorally stimulated rats: analysis by DNA microarray. *Mol Brain Res*, 96: 163-9.
- Jamieson, P.M.; Li, C.; Kukura, C.; Vaughan, J. y Vale, W. (2006). Urocortin 3 modulates the neuroendocrine stress response and is regulated in rat amygdala and hypothalamus by stress and glucocorticoids. *Endocrinology*, 147: 4578-88.
- Janecka, A. ; Fichna, J. y Janecki, T. (2004). Opioid receptors and their ligands. *Curr Top Med Chem*, 4: 1-17.
- Jaroenporn, S.; Nagaoka, K.; Ohta, R.; Watanabe, G. y Taya, K. (2009). Prolactin induces phosphorylation of the STAT5 in adrenal glands of Hatano rats during stress. *Life Sci*, 85: 172-7.
- Jezova, D.; Skultetyova, I.; Tokarev, D.I.; Bakos, P. y Vigas, M. (1995). Vasopressin and oxytocin in stress. *Ann NY Acad Sci*, 771: 192–203.
- Johannesson, M.; López-Aumatell, R.; Stridh, P.; Díez, M.; Tuncel, J.; Blázquez, G.; Martínez-Membrives, E.; Cañete, T.; Vicens-Costa, E.; Graham, D.; Copley, R.R.; Hernández-Pliego, P.; Beyeen, A.D.; Öckinger, J.; Fernández-Santamaría, C.; Gulko, P.S.; Brenner, M.; Tobeña, A.; Guitart-Masip, M.; Giménez-Llort, L.; Dominiczak, A.; Holmdahl, R.; Gauguier, D.; Olsson, T.; Mott, R.; Valdar, W.; Redei, E.E.; Fernández-Teruel, A. y Flint, J. (2009). A resource for the simultaneous high-resolution mapping of multiple quantitative trait loci in rats: the NIH heterogeneous stock. *Genome Res*, 19: 150-158.

- Kabbaj, M. (2004) Neurobiological bases of individual differences in emotional and stress responsiveness. High responders-Low responders model. *Basic Science Seminars in Neurology*, 61: 1009-1012.
- Kabbaj, M.; Evans, S.; Watson, S.J. y Akil, H. (2004). The search for the neurobiological basis of vulnerability to drug abuse: using microarrays to investigate the role of stress and individual differences. *Neuropharmacology*, 47: 111-22.
- Kajiyama, Y.; Iijima, Y.; Chiba, S.; Furuta, M.; Ninomiya, M.; Izumi, A.; Shibata, S. y Kunugi, H. (2010). Prednisolone causes anxiety- and depression-like behaviors and altered expression of apoptotic genes in mice hippocampus. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 34: 159-65.
- Kakucska, J.; Qi, Y. y Lechan, R.M. (1995). Changes in adrenal status affect hypothalamic thyrotropin-releasing hormone gene expression in parallel with corticotropin-releasing hormone. *Endocrinology*, 136: 2795-802.
- Kalueff, A.V. y Tuohimaa, P. (2005). The grooming analysis algorithm for neurobehavioural stress research. *Brain Res Protoc*, 13: 151-8.
- Kent, J.; Sullivan, G. y Rauch, S. (2000). The neurobiology of fear: relevance to panic disorder and PTSD. *Psychiatr Ann*, 30: 733-42.
- Kim, K.S. y Han, P.L. (2006). Optimization of chronic stress paradigms using anxiety- and depression-like behavioral parameters. *J Neurosci Res*, 83: 497-507.
- Koolhaas, J.M.; Bartolomucci, A.; Buwalda, B.; de Boer, S.F.; Flügge, G.; Korte, S.M.; Meerlo, P.; Murison, R.; Olivier, B.; Palanza, P.; Richter-Levin, G.; Sgoifo, A.; Steimer, T.; Stiedl, O.; van Dijk, G.; Wöhr, M. y Fuchs, E. (2011). Stress revisited: a critical evaluation of the stress concept. *Neurosci Biobehav Rev*, 35: 1291-301.
- Kyoung-Shim, K. y Pyung-Lim, H. (2006). Optimization of chronic stress paradigms using anxiety- and depression-like behavioral parameters. *Journal of Neuroscience Research*, 83: 497-507.
- Laborda, M. A. (2009). Modelos animales en psicopatología experimental: miedo, tolerancia a las drogas y condicionamiento. *Revista de Psicología*, XVIII: 81-104.
- Lahmame, A.; Grigoriadis, D.E.; De Souza, E.B. y Armario, A. (1997). Brain corticotropin-releasing factor immunoreactivity and receptors in five inbred rat strains: relationship to forced swimming behaviour. *Brain Res*, 750: 285-92.
- Lander, E.S.; Linton, L.M.; Birren, B.; Nusbaum, C.; Zody, M.C.; Baldwin, J. y cols. (2001). Initial Sequencing and Analysis of the Human Genome. *Nature*, 409: 860-921.
- Landgraf, R. (2003). HAB/LAB rats: an animal model of extremes in trait anxiety and depression. *Clinical Neuroscience Research*, 3: 239-244.
- Landgraf, R. y Wigger, A. (2003). Born to be anxious: neuroendocrine and genetic correlates of trait anxiety in HAB rats. *Stress*, 6: 111-119.
- Landgraf, R.; Keßler, M.; Bunk, M.; Murgatroyd, C.; Spengler, D.; Zimbelmann, M.; Nußbaumer, M.; Czibere, L.; Turck, C.; Singewald, N.; Rujescu, D. y Frank, E. (2007).

- Candidate genes of anxiety-related behavior in HAB/LAB rats and mice: focus on vasopressin and glyoxalase-I. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 31: 89-102.
- Landgraf, R.; Wigger, A.; Holsboer, F. y Neumann, I.D. (1999). Hyperreactive hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis in rats bred for high anxiety-related behaviors. *J Neuroendocrinol*, 11: 405-7.
- LeDoux, J.E. (1995). Emotion: clues from the brain. *Annual Review of Psychology*, 46: 209-235.
- LeDoux, J.E. (1996). *El cerebro emocional*. New York, Simon and Schuster.
- LeDoux, J.F. (2000). Emotion circuits in the brain. *Annu Rev Neurosci*, 23: 155-184.
- Lessard, A.; Campos, M.M.; Neugebauer, W. y Couture, R. (2003). Implication of nigral tachykinin NK3 receptors in the maintenance of hypertension in spontaneously hypertensive rats: a pharmacologic and autoradiographic study. *Br J Pharmacol*, 138: 554-63.
- Lessard, A.; Savard, M.; Gobeil, F.; Pierce, J.P. y Pickel, V.M. (2009). The neurokinin-3 (NK₃) and the neurokinin-1 (NK₁) receptors are differentially targeted to mesocortical and mesolimbic projection neurons, and to neuronal nuclei in the rat ventral tegmental area. *Synapse*, 63: 484-501.
- Letwin, N.E.; Kafkafi, N.; Benjamini, Y.; Mayo, C.; Frank, B.C.; Luu, T.; Lee, N.H. y Elmer, G.I. (2006). Combined application of behavior genetics and microarray analysis to identify regional expression themes and gene-behavior associations. *J Neurosci*, 26: 5277-87.
- Lewis, K.; Li, C.; Perrin, M.H.; Blount, A.; Kunitake, K.; Donaldson, C.; Vaughan, J.; Reyes T.M.; Gulyas, J.; Fischer, W.; Bilezikjian, L.; Rivier, J.; Sawchenko, P.E. y Vale, W.W. (2001). Identification of urocortin III, an additional member of the corticotropin-releasing factor (CRF) family with high affinity for the CRF2 receptor. *Proc Natl Acad Sci USA*, 98: 7570-5.
- Li, C.; Vaughan, J.; Sawchenko, P.E. y Vale, W.W. (2002). Urocortin III-immunoreactive projections in rat brain: partial overlap with sites of type 2 corticotrophin-releasing factor receptor expression. *J Neurosci*, 22: 991-1001.
- Lima, J.E.; Walz, R.; Tort, A.; Souza, D.; Portela, L.; Bianchin, M.M.; Takayanagui, O.M. y Leite J.P. (2006). Serum and cerebrospinal fluid S100B concentrations in patients with neurocysticercosis. *Braz J Med Biol Res*, 39: 129-135. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-879X2006000100015>
- Lipp, H.P.; Schwegler, H.; Crusio, W.E.; Wolfer, D.P.; Leisinger-Trigona, M.C.; Heimrich, B. y Driscoll, P. (1989). Using genetically-defined rodent strains for the identification of hippocampal traits relevant for two-way avoidance behavior: a non-invasive approach. *Experientia*, 45: 845-859.
- Logan, C.A. (2005). The legacy of Adolf Meyer's comparative approach: Worcester rats and the strange birth of the animal model. *Integrative Physiological & Behavioral Science*, 40: 169-181.

- López-Aumatell, R., Guitart-Masip, M., Vicens-Costa, E., Giménez-Llort, L., Valdar, W., Johannesson, M., Flint, J., Tobeña, A. y Fernández-Teruel, A. (2008) Fearfulness in a large N/Nih genetically heterogeneous rat stock: Differential profiles of timidity and defensive flight in males and females. *Behav Brain Res* 188, 41–55.
- López-Aumatell, R., Vicens-Costa, E., Guitart-Masip, Martínez-Membrives, M., Valdar, W., Johannesson, M., Cañete, T., Blázquez, G., Driscoll, P., Flint, J., Tobeña, A. y Fernández-Teruel, A. (2009b). Unlearned anxiety predicts learned fear: A comparison among heterogeneous rats and the Roman rat strains. *Behav Brain Res*, 202: 92-101.
- López-Aumatell, R.; Blázquez, G.; Gil, L.; Aguilar, R.; Cañete, T.; Giménez-Llort, L.; Tobeña, A. y Fernández-Teruel, A. (2009a). The Roman high-and low-avoidance rat strains differ in fear-potentiated startle and classical aversive conditioning. *Psicothema*, 21: 27-32.
- López-Aumatell, R; Martínez-Membrives, E.; Vicens-Costa, E.; Cañete, T.; Blázquez, G.; Mont-Cardona, C.; Johannesson, M.; Flint, J, Tobeña, A. y Fernández-Teruel, A. (2011). Effects of environmental and physiological covariates on sex differences in unconditioned and conditioned anxiety and fear in a large sample of genetically heterogeneous (N/Nih-HS) rats. *Behav Brain Funct*, 7:48.
- Lovenberg, T.W.; Chen, W.L.; Grigoriadis, D.E.; Clevenger, W.; Chalmers, D.T.; De Souza, E.B. y Oltersdorf, T (1995). Cloning and characterization of a functionally distinct corticotropin-releasing factor receptor subtype from rat brain. *Proc Natl Acad Sci USA*, 92: 836–840.
- Lu, X.; Mazarati, A.; Sanna, P.; Shinmei, S. y Bartfai, T. (2005). Distribution and differential regulation of galanin receptor subtypes in rat brain: effects of seizure activity. *Neuropeptides*, 39: 147-52.
- Macey, T.A.; Gurevich, V.V. y Neve, K.A. (2004). Preferential Interaction between the dopamine D2 receptor and Arrestin2 in neostriatal neurons. *Mol Pharmacol*, 66: 1635-42.
- Malkesman, O.; Braw, Y.; Maayan, R.; Weizman, A.; Overstreet, D.H.; Shabat-Simon, M.; Kesner, Y.; Touati-Werner, D.; Yadid, G. y Weller, A. (2006). Two different putative genetic animal models of childhood depression. *Biol Psychiatry*, 59: 17-23.
- Malkesman, O.; Braw, Y.; Zagoory-Sharon, O.; Golan, O.; Lavi-Avnon, Y.; Schroeder, M.; Overstreet, D.H.; Yadid, G. y Weller, A. (2005). Reward and anxiety in genetic animal models of childhood depression. *Behav Brain Res*, 164: 1-10.
- Mannangatti, P.; Arapulisy, O.; Shippenberg, T.S.; Ramamoorthy, S.; y Jayanthi, L. (2011). Cocaine up-regulation of the norepinephrine transporter requires threonine 30 phosphorylation by p38 mitogen-activated protein kinase. *The Journal of Biological Chemistry*, 286: 20239-20250.
- Manual diagnóstico y estadístico de los trastornos mentales: DSM-IV-TR. Barcelona: Masson, 2002.
- Martínez-Conejero, J.A. y Horcajadas, J.A. (2008). La tecnología de los microarrays en Medicina Reproductiva. *CMR*, 14: 51-63.

- Martí, J. y Armario, A. (1996). Forced swimming behavior is not related to the corticosterone levels achieved in the test: a study with four inbred rat strains. *Psychology & Behavior*, 59: 369-373.
- Martin, J.R.; Oettinger, R.; Driscoll, P.; Buzzi, R. & Bättig, K. (1982). Effects of chlordiazepoxide and imipramine on maze patrolling within two different maze configurations by psychogenetically selected lines of rats. *Psychopharmacology (Berl)*, 78: 58-62.
- McCallion, A.S.; Stewart, G.J.; Montague, P.; Griffiths, I.R. y Davies, R.W. (1999). Splicing pattern, transcript start distribution, and DNA sequence of the mouse gene (*Mobp*) encoding myelin-associated oligodendrocytic basic protein. *Mol Cell Neurosci*, 13: 229-36.
- McCarthy, M.M. (1995). Estrogen modulation of oxytocin and its relation to behavior. *Adv Exp Med Biol*, 395: 235-245.
- McClung, C.A.; Nestler, E.J. y Zachariou, V. (2005). Regulation of gene expression by chronic morphine and morphine withdrawal in the locus ceruleus and ventral tegmental area. *J Neurosci*, 25: 6005-15.
- McEwen, B.S. (2000). Effects of adverse experiences for brain structure and function. *Biological Psychiatry*, 48:721-731.
- McNaughton, N. (1997). Cognitive dysfunction resulting from hippocampal hyperactivity - a possible cause of anxiety disorder? *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 56: 603-611.
- McNaughton, N. (1999). A gene promotes anxiety in mice - and also scientists. *Nature Medicine* 5, 1131-1132.
- McNaughton, N. y Corr, P.J. (2004). A two-dimensional neuropsychology of defense: fear/anxiety and defensive distance. *Neurosci Biobehav Rev*, 28: 285-305.
- Meaney, M.J. (2010). Epigenetics and the biological definition of gene x environment interactions. *Child Dev*, 81: 41-79.
- Mei, B.; Li, C.; Dong, S.; Jiang, C.H.; Wang, H. y Hu, Y. (2005). Distinct gene expression profiles in hippocampus and amygdala after fear conditioning. *Brain Res Bull.*, 67: 1-12.
- Meiza, K.Z.; Boguszewski, P.M.; Nikolaev, E. y Zagrodzka, J. (2009) Diverse sensitivity of RHA/Verh and RLA/Verh rats to emotional and spatial aspects of a novel environment as a result of distinct pattern of neuronal activation in the fear/anxiety circuit. *Behavioural Genetics*, 39: 48-61.
- Meng, Q.Y.; Chen, X.N.; Tong, D.L. y Zhou, J.N. (2011). Stress and glucocorticoids regulated corticotropin releasing factor in rat prefrontal cortex. *Moll Cell Endocrinol*, 342: 54-63.
- Misawa, H.; Kawasaki, Y.; Mellor, J.; Sweeney, N.; Jo, K.; Nicoll, R.A. y Brecht, D.S. (2001). Contrasting localizations of MALS/LIN-7 PDZ proteins in brain and molecular compensation in knockout mice. *J Biol Chem*, 276: 9264-72.
- Morand, S.; Dos Santos, O.F.; Ohayon, R.; Kaniewski, J.; Noel-Hudson, M.S.; Virion, A. y Dupuy, C. (2003). Identification of a truncated dual oxidase 2 (DUOX2) messenger

- ribonucleic acid (mRNA) in two rat thyroid cell lines. Insulin and forskolin regulation of DUOX2 mRNA levels in FRTL-5 cells and porcine thyrocytes. *Endocrinology*, 144: 567-74.
- Moreno, J.C.; Bikker, H.; Kempers, M.J.; van Trotsenburg, A.S.; Baas, F.; de Vijlder, J.J.; Vulmsa, T. y Ris-Stalpers, C. (2002). Inactivating mutations in the gene for thyroid oxidase 2 (THOX2) and congenital hypothyroidism. *N Engl J Med*, 347: 95-102.
- Moreno, M.; Cardona, D.; Gómez, M.J.; Sánchez-Santed, F.; Tobeña, A.; Fernández-Teruel, A.; Campa, L.; Suñol C.; Escarabajal, M.D. y Torres, C. y Flores, P. (2010). Impulsivity Characterization in the Roman High- and Low-Avoidance Rat Strains: Behavioral and Neurochemical Differences. *Neuropsychopharmacology*, 35: 1198–1208.
- Morón, I.; Gómez, M.J.; Escarabajal, M.D.; de la Torre, L.; Cándido, A.; Maldonado, A.; Tobeña, A.; Fernández-Teruel, A. y Torres, C. (2010). One-way avoidance learning in female inbred Roman high- and low-avoidance rats: Effects of bilateral electrolytic central amygdala lesions. *Neuroscience Letters*, 474: 32–36.
- Mustaca, A.E., Bentosela, M., Ruetti, E., Kamenetzky, G., Cuenya, L., Justel, N., Lopez Seal, F., Fosachea, S. y Papini, M. (2009). Similitudes y discrepancias en dos modelo animales de frustración. En: *Investigación en Ciencias del Comportamiento. Avances Iberoamericanos*. Ed: Richaud, M.C. y Moreno, J.E. Argentina, Buenos Aires: CIIPME-CONICET, 921-940.
- Navarro, V.M.; Castellano, J.M.; McConkey, S.M.; Pineda, R.; Ruiz-Pino, F.; Pinilla, L.; Clifton, D.K.; Tena-Sempere, M. y Steiner, R.A. (2011). Interactions between kisspeptin and neurokinin B in the control of GnRH secretion in the female rat. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 300: E202-10.
- Onaka, T.; Takayanagi, Y. y Leng, G. (2010). Metabolic and stress-related roles of prolactin releasing peptide. *Trends Endocrinol Metab*, 21: 287-93.
- Overmier, J.B. (2007). Basic research with animals strengthens science and Psychology practice. *Interdisciplinaria*, 24: 211-228.
- Pacák, K. y Palkovits, M. (2001). Stressor specificity of central neuroendocrine responses: Implications for stress-related disorders, *Endocrine Reviews*, 22: 502-548.
- Pähkla, R., Kask, A. & Rägo, L. (2000) Differential effects of beta-carbolines and antidepressants on rat exploratory activity in the elevated zero-maze. *Pharmacol Biochem Behav* 65, 737-42.
- Paradee, W.; Melikian, H.E.; Rasmussen, D.L.; Kenneson, A.; Conn, P.J. y Warren, S.T. (1999). Fragile X mouse: strain effects of knockout phenotype and evidence suggesting deficient amygdala function. *Neuroscience*, 94: 185-92.
- Peng, X., Wood, C.L.; Blalock, E.M.; Chen, K.C.; Landfield P.W. y Stromberg, A.J. (2003). Statistical implications of pooling RNA samples for microarray experiments. *BMC Bioinformatics*, 4: 26. doi:10.1186/1471-2105-4-26.
- Pimpinelli, F.; Parenti, M.; Guzzi, F.; Piva, F.; Hokfelt, T. y Maggi, R. (2006). Presence of delta opioid receptors on a subset of hypothalamic gonadotropin releasing hormone (GnRH) neurons. *Brain Res*, 1070: 15-23.

- Pinel, J.P.J. (2007). *Biopsicología*. Addison Wesley: Madrid.
- Piras, G.; Giorgi, O. y Corda, M.G. (2010). Effects of antidepressants on the performance in the forced swim test of two psychogenetically selected lines of rats differ in coping strategies to aversive conditions. *Psychopharmacology*, 211: 403-14.
- Prunell, M.; Escorihuela, R.M.; Fernández-Teruel, A.; Núñez, J.F. y Tobeña, A. (1994) Anxiolytic profiles of alprazolam and ethanol in the elevated plus-maze test and the early acquisition of shuttle-box avoidance. *Pharmacol Res*, 29: 37-45.
- Ramos, A. y Mormede, P. (1998). Stress and emotionality: a multidimensional and genetic approach. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 22: 33-57.
- Rana, O.R.; Schauerte, P.; Kluttig, R.; Schröder, J.W.; Koenen, R.R.; Weber, C.; Nolte, K.W.; Weis, J.; Hoffmann, R.; Marx, N. y Saygili, E. (2010). Acetylcholine as an age-dependent non-neuronal source in the heart. *Auton Neurosci*, 156: 82-9.
- Ramos, A.; Moisan, M.P.; Chaouloff, F.; Mormède, C. & Mormède, P. (1999). Identification of female-specific QTLs affecting an emotionality-related behavior in rats. *Mol Psychiatry*, 4: 453-62.
- Randall-Thompson, J.F.; Pescatore, K.A. y Unterwald, E.M. (2010). A role for delta opioid receptors in the central nucleus of the amygdala in anxiety-like behaviors. *Psychopharmacology (Berl)*, 212: 585-95.
- Rash, J.E.; Yasumura, T.; Dudek, F.E. y Nagy, J.I. (2001). Cell-specific expression of connexins and evidence of restricted gap junctional coupling between glial cells and between neurons. *J Neurosci*, 21: 1983-2000.
- Ratner, A.; Yelvington, D.B. y Rosenthal, M. (1989) Prolactin and corticosterone response to repeated footshock stress in male rats. *Psychoneuroendocrinology* 14, 393-396.
- Rentaría-Alcántara, M. (2007). Capítulo 18: Breve revisión de los marcadores moleculares, en *Ecología molecular*. Comp: L. E. Eguarte, V. Souza y X. Aguirre. Ed. Instituto Nacional de Ecología, Semarnat y Conabio. México, pp: 541-566.
- Ressler, K.J.; Paschall, G.; Zhou, X.L. y Davis, M. (2002). Regulation of synaptic plasticity genes during consolidation of fear conditioning. *J Neurosci*, 22: 7892-902.
- Rodrigues, S.M.; Schafe, G.E. y LeDoux, J.E. (2001). Intra-amygdala blockade of the NR2B subunit of the NMDA receptor disrupts the acquisition but not the expression of fear conditioning. *J Neurosci*, 21: 6889-96.
- Roland, G.R. y Sheng, M. (2000). Association of Dystrophin-Related protein 2 (DRP2) with postsynaptic densities in rat brain. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 16: 674-685.
- Roltsch, E.; Holcomb, L.; Young, K.A.; Marks, A. y Zimmer, D.B. (2010). PSAPP mice exhibit regionally selective reductions in gliosis and plaque deposition in response to S100B ablation. *J Neuroinflammation*, 7: 78.
- Roozendaal, B.; Wierma, A.; Driscoll, P.; Koolhaas, J.M. y Bohus, B. (1992). Vasopressinergic modulation of stress responses in the central amygdala of the Roman high-avoidance and low-avoidance rat. *Brain Research*, 596: 35-40.

- Rosa de la Cruz, A.; Fatjó-Vilas, M.; Gutiérrez, B.; Arias, B. y Fañanás, L. (2009). Genética. Vallejo, J. y Leal, C. (Eds.) En: Tratado de psiquiatría (pp. 183-218). Ars Medica (volumen I).
- Rozenfeld, R.; Abul-Husn, N.S.; Gomez, I. y Devi, L.A. (2007). An emerging role for the delta opioid receptor in the regulation of mu opioid receptor function. *Scientific World Journal*, 7: 64-73.
- Sabariego, M.; Gómez, M.J.; Morón, I.; Torres, C.; Fernández-Teruel, A.; Tobeña, A.; Cañete, T.; Martínez-Conejero, J.A.; Horcajadas, J.A. y Esteban, F.J. (2011). Differential gene expression between inbred Roman high- (RHA-I) and low- (RLA-I) avoidance rats. *Neurosci Lett*, 504: 265-70.
- Sallés, J.; López de Jesús, M.; Goñi, O.; Fernández-Teruel, A.; Driscoll, P.; Tobeña, A. y Escorihuela, R.M. (2001). Transmembrane signaling through phospholipase C in cortical and hippocampal membranes of psychogenetically selected rat lines. *Psychopharmacology*, 154: 115-125.
- Sapolsky, R.M. (1992). Stress, the aging brain and the mechanisms of neuron death. Cambridge [Mass.]: The MIT Press, cop.
- Sapolsky, R. M. (1992). Neuroendocrinology of the stress-response. En: Becker, J.B. y Crew, B.S., editores. *Behavioral Endocrinology*. London, England: Massachusetts Institute of Technology, MIT Press, Cambridge. p 287-324.
- Sapolsky, R.M.; Romero, L.M.; Munck, A.U. (2000). How do glucocorticoids influence stress responses? Integrating permissive, suppressive, stimulatory, and preparative actions. *Endocr Rev*, 21: 55-89. Review.
- Sánchez, P.T.; Sirena, R.; Peiró, G. y Palmero, F. (2008). Estrés, depresión, inflamación y dolor. *REME*, 11 (revista electrónica) <http://reme.uji.es>
- Sato, E.; Iikuni, N.; Yoshio, T.; Minota, S.; Kamatani, N. y Okamoto, H. (2006). Soluble fractalkine in the cerebrospinal fluid of patients with neuropsychiatric lupus. *Ann Rheum Dis*, 65: 1257-1259.
- Schroeder, A.; Mueller, O.; Stocker, S.; Salowsky, R.; Leiber, M.; Gassmann, M.; Lightfoot, S.; Menzel, W.; Granzow, M. y Ragg, T. (2006). The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNAs. *BMC Mol Biol*, 31: 7-3.
- Seidel, A.; Sousa Neto, J.A.; Huesgen, A.; Vollrath, L.; Manz, B.; Gentsch, C. y Lichtsteiner, M. (1990). The pineal complex in Roman high avoidance and Roman low avoidance rats. *J Neural Transm Gen Sect*, 81: 73-82.
- Selye, H. (1950) Stress and the general adaptation syndrome. *British Medical Journal*, 1383-1392.
- Selye, H. (1976). The stress concept. *Can Med Assoc J*, 115: 718.
- Shan, S.; Hong-Min, T.; Yi, F.; Jun-Peng, G.; Yue, F.; Yan-Hong, T.; Yun-Ke, Y.; Wen-Wei, L.; Xiang-Yu, W.; Jun, M.; Guo-Hua, W.; Ya-Ling, H.; Hua-Wei, L. y Ding-Fang, C. (2009). NEW evidences for fractalkine/CX3CL1 involved in substantia nigral microglial activation and behavioral changes in a rat model of Parkinson's disease. *Neurobiology of Aging*, 32: 443-458.

- Shepherd, J.K.; Grewal, S.S.; Fletcher, A.; Bill, D.J. y Dourish, C.T. (1994) Behavioural and pharmacological characterisation of the elevated “zero-maze” as an animal model of anxiety. *Psychopharmacology*, 116: 56-64.
- Sladek, C.D.; Stevens, W.; Levinson, S.R.; Song, Z.; Jensen, D.D. y Flynn, F.W. (2011). Characterization of nuclear neurokinin 3 receptor expression in rat brain. *Neuroscience*, 196: 35-48.
- Smoller, J.W.; Paulus, M.P.; Fagerness, J.A.; Purcell, S.; Yamaki, L.H.; Hirshfeld-Becker, D.; Biederman, J.; Rosenbaum, J.F.; Gelernter, J. y Stein, M.B. (2008). Influence of RGS2 on anxiety-related temperament, personality, and brain function. *Arch Gen Psychiatry*, 65: 298-308.
- Solberg, L.C.; Stelloh, C.; Regner, K.R.; Schwabe, T.; Eisenhauer, J. y Garrett, M.R. (2010a). Heterogeneous stock rats: a new model to study the genetics of renal phenotypes. *Am J Physiol Renal Physiol*, 298: 1484-91.
- Solberg, L.C.; Holl, K.; Tschannen, M. y Valdar, W. (2010b). Fine-mapping a locus for glucose tolerance using heterogeneous stock rats. *Physiol Genomics*, 41: 102-8.
- Spisak, S.; Tulassay, Z.; Molnar, Z. y Guttman, A. (2007). Protein microchips in biomedicine and biomarker discovery. *Electrophoresis*, 28: 4261–4273.
- Steimer, T. y Driscoll, P. (2005) Inter-individual vs line/strain differences in psychogenetically selected Roman High-(RHA) and Low-(RLA) avoidance rats: neuroendocrine and behavioural aspects. *Neurosci Biobehav Rev* 29, 99-112.
- Steimer, T. y Driscoll, P. (2003). Divergent stress responses and coping styles in psychogenetically selected Roman high-(RHA) and low-(RLA) avoidance rats: behavioral, neuroendocrine and developmental aspects. *Stress*, 6: 87–100.
- Steimer, T., la Fleur, S. y Schulz, P.E. (1997a) Neuroendocrine correlates of emotional reactivity and coping in male rats from the Roman High (RHA/Verh)- and Low (RLA/Verh)-Avoidance lines. *Behav Genet* 27, 503-512.
- Steimer, T.; Driscoll, P. y Schulz, P.E. (1997b). Brain metabolism of progesterone, coping behaviour and emotional reactivity in male rats from two psychogenetically selected lines. *J Neuroendocrinol*, 9: 169-75.
- Stoessl, A.J.; Dourish, C.T. y Iversen, S.D. (1990). Pharmacological characterization of the behavioural syndrome induced by the NK-3 tachykinin agonist senktide in rodents: Evidence for mediation by endogenous 5-HT. *Brain Res*, 517:111–116.
- Suzuki, H.; Kimura, K.; Shirai, H.; Eguchi, K.; Higuchi, S.; Hinoki, A.; Ishimaru, K.; Brailoiu, E.; Dhanasekaran, D.N.; Stemmler, L.N.; Field, T.A.; Frank, G.D.; Autieri, M.V. y Eguchi, S. (2009). Endothelial nitric oxide synthase inhibits G12/13 and rho-kinase activated by the angiotensin II type-1 receptor: implication in vascular migration. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*, 29: 217-24.
- Telner, J.I.; Merali, Z. y Singhal, R.L. (1982) Stress controllability and plasma prolactin levels in the rat. *Psychoneuroendocrinology* 7, 361-364.

- Tobeña, A y Fernández-Teruel, A. (2009). Modelos animales en psiquiatría. Tratado de psiquiatría. Ars Médica. Volumen I. 2ª ed.
- Torres, C.; Escarabajal, M.D.; Cándido, A.; de la Torre, L.; Gómez, M.J.; Maldonado, A.; Tobeña, A. y Fernández-Teruel, A. (2007). One-way avoidance learning and diazepam in female roman high-avoidance and low-avoidance rats. *Behav Pharmacol*, 18: 251-3.
- Turpen, C.; Johnson, D.C. y Dunn, J.D. (1976). Stress-induced gonadotropin and prolactin secretory patterns. *Neuroendocrinology*, 20: 339-51.
- Uvnäs-Mosberg, K.; Eklund, M.; Hillegaart, V. y Ahlenius, S. (2000). Improved conditioned avoidance learning by oxytocin administration in high-emotional male Sprague-Dawley rats. *Regul Pept*, 88: 27-32.
- Van de Kar, L.D.; Javed, A.; Zhang, Y.H.; Serres, F.; Raap, D.K.; Gray, T.S. (2001). 5-HT_{2A} receptors stimulate ACTH, corticosterone, oxytocin, renin, and prolactin release and activate hypothalamic CRF and oxytocin-expressing cells. *J Neurosci*, 21: 3572– 3579.
- Veenema, A.H. (2012). Toward understanding how early-life social experiences alter oxytocin- and vasopressin-regulated social behaviors. *Hormones and Behaviors*, 61: 304-312.
- Vendruscolo, L.F.; Terenina-Rigaldie, E.; Raba, F.; Ramos, A.; Takahashi, R.N. y Mormède, P. (2006). Evidence for a female-specific effect of a chromosome 4 locus on anxiety-related behaviors and ethanol drinking in rats. *Genes Brain Behav*, 5: 441-50.
- Venter, J.C.; Adams, M.D.; Muers, E.W.; Li P.W.; Mural, R.J.; Sutton, G.G., y cols. (2001). The Sequence of the Human Genome. *Science*, 291: 1304 -1351.
- Vicens-Costa, E., Martínez-Membrives, E., López-Aumatell, R., Guitart-Masip, M., Cañete, T., Blázquez, G., Tobeña, A. y Fernández-Teruel, A. (2011) Two-way avoidance acquisition is negatively related to conditioned freezing and positively associated with startle reactions: a dissection of anxiety and fear in genetically heterogeneous rats. *Physiol Behav* 103, 148-156.
- Walker, C.D.; Aubert, M.L.; Meaney, M.J. y Driscoll, P. (1992). Individual differences in the activity of the hypothalamus-pituitary-adrenocortical system after stressors: use of psychogenetically selected rat lines as a model. En: P. Driscoll (Ed.), *Genetically Defined Animal Models of Neurobehavioral Dysfunctions* (pp. 276-296). Cambridge: Birkhäuser Boston.
- Walker, C.D.; Rivest, R.W.; Meaney, M.J. y Aubert, M.L. (1989). Differential activation of the pituitary-adrenocortical axis after stress in the rat: use of two genetically selected lines (Roman low- and high-avoidance rats) as a model. *J Endocrinol*, 123: 477-85.
- Wang, H.; Zhu, Y.Z.; Wong, P.T.; Farook, J.M.; Teo, A.L.; Lee, L.K. y Moochhala, S. (2003). cDNA microarray analysis of gene expression in anxious PVG and SD rats after cat-freezing test. *Exp Brain Res*, 149: 413-21.
- Wigger, A.; Sánchez, M.M.; Mathys, K.C.; Ebner, K.; Frank, E.; Liu, D.; Kresse, A.; Neumann, I.D.; Holsboer, F.; Plotsky, P.M. y Landgraf, R. (2003). Alterations in central neuropeptide expression, release, and receptor binding in rats bred for high anxiety: critical role of vasopressin. *Neuropsychopharmacology*, 29: 1-14.

- Willis-Owen, S.A. y Flint, J. (2007). Identifying the genetic determinants of emotionality in humans; insights from rodents. *Neurosci Biobehav Rev*, 31: 115-24.
- Wandler, R.J.; Kershaw, Y.M.; Shanks, N.; Wood, S.A.; Lightman, S.L. y Ingram, C.D. (2004). Oxytocin attenuates stress-induced c-fos mRNA expression in specific forebrain regions associated with modulation of hypothalamo-pituitary-adrenal activity. *J Neurosci*, 24: 2974-2982.
- Wotjak, C.T.; Kubota, M.; Liebsch, G.; Montkowski, A.; Holsboer, F.; Neumann, I. y Landgraf, R. (1996). Release of vasopressin within the rat paraventricular nucleus in response to emotional stress: a novel mechanism of regulating adrenocorticotrophic hormone secretion. *Neurosci*, 16: 7725-7732.
- Wu, Y.; Chen, R.; Zhao, X.; Li, A.; Li, G. y Zhou, J. (2011). JWA regulates chronic morphine dependence via the delta opioid receptor. *Biochem Biophys Res Commun*, 409: 520-5.
- Yalcin, B.; Willis-Owen, S.A.; Fullerton, J.; Meesaq, A.; Deacon, R.M.; Rawlins, J.N.; Copley, R.R.; Morris, A.P.; Flint, J. y Mott, R. (2004). Genetic dissection of a behavioral quantitative trait locus shows that *Rgs2* modulates anxiety in mice. *Nat Genet*, 36: 1197-202.
- Yelvington, D.B., Weiss, G.K. y Ratner, A. (1984) Effect of corticosterone on the prolactin response to psychological and physical stress in rats. *Life Sciences* 35, 1705-1711.
- Yelvington, D.B., Weiss, G.K. y Ratner, A. (1985) Habituation of the prolactin response in rats to psychological stress. *Psychoneuroendocrinology* 10, 95-102.
- Yilmazer-Hanke, D.M.; Faber-Zuschratter, H.; Linke, R. y Schwegler, H. (2002). Contribution of amygdala neurons containing peptides and calcium-binding proteins to fear-potentiated startle and exploration-related anxiety in inbred Roman high- and low-avoidance rats. *Eur J Neurosci*, 15: 1206-18.
- Yool, D.A.; Klugmann, M.; McLaughlin, M.; Vouyiouklis, D.A.; Dimou, L.; Barrie, J.A.; McCulloch, M.C.; Nave, K.A. y Griffiths, I.R. (2001). Myelin proteolipid proteins promote the interaction of oligodendrocytes and axons. *J Neurosci Res*, 63: 151-64.
- Yoshikawa, T.; Nagasugi, Y.; Azuma, T.; Kato, M.; Sugano, S.; Hashimoto, K.; Masuho, Y.; Muramatsu, M. y Seki, N. (2000). Isolation of novel mouse genes differentially expressed in brain using cDNA microarray. *Biochem Biophys Res Commun*, 275: 532-7.
- Zhao, Z.; Baros, A.; Zhang, H.; Lapiz, M.; Bondi, C.; Morilak, D. y O'Donnell, J.M. (2008). Norepinephrine transporter regulation mediates the long-term behavioral effects of the antidepressant desipramine. *Neuropsychopharmacology*, 33: 3190-3200.
- Zhang, S., Amstein, T.; Shen, J.; Brush, R.F. y Gershenfeld, H.K. (2005). Molecular correlates of emotional learning using genetically selected rat lines. *Genes, Brain and Behavior*, 4: 99-109.
- Zhang, Y.; Fu, C.; Asico, L.D.; Villar, V.A.; Ren, H.; He, D.; Wang, Z.; Yang, J.; Jose, P.A. y Zeng, C. (2011). Role of $G\alpha(12)$ - and $G\alpha(13)$ -protein subunit linkage of D(3) dopamine receptors in the natriuretic effect of D(3) dopamine receptor in kidney. *Hypertens Res*, 34: 1011-6.

- Zhao, D.Q. y Ai, H.B. (2011). Oxytocin and vasopressin involved in restraint water-immersion stress mediated by oxytocin receptor and vasopressin 1b receptor in rat brain. PLoS One, 6: e23362.
- Zhao, Y.; Ma, R.; Shen, J.; Su, H.; Xing, D. y Du, L. (2008). A mouse model of depression induced by repeated corticosterone injections. Eur J Pharmacol, 581: 113-20.
- Zhu, Y.; King, M.A.; Schuller, A.G.; Nitsche, J.F.; Reidl, M.; Elde, R.P.; Unterwald, E.; Pasternak, G.W. y Pintar, J.E. (1999). Retention of supraspinal delta-like analgesia and loss of morphine tolerance in delta opioid receptor knockout mice. Neuron, 24: 243-52.

Referencia de las bases de datos y programas utilizados en los análisis genéticos:

- “Babelomics 4.2” (<http://babelomics.bioinfo.cipf.es/>).
- “The R project for statistical computing” (R, <http://www.r-project.org/>), con paquetes de Bioconductor (<http://www.bioconductor.org/packages/release/bioc/>).
- “TmV Microarray Software” (<http://www.tm4.org/>).
- “Functional Annotation Bioinformatics Microarray Analysis” (DAVID, <http://david.abcc.ncifcrf.gov/>).
- “Ingenuity Pathways Analysis platform” (IPA, <http://www.ingenuity.com/>).
- “Ensemble Genome Browser” (<http://www.ensembl.org/>).
- “Rat Genome Data Base” (RGD, <http://rgd.mcw.edu/>).

8. ANEXOS



Research report

Coping style and stress hormone responses in genetically heterogeneous rats: Comparison with the Roman rat strains

Sira Díaz-Morán^a, Marta Palència^a, Carme Mont-Cardona^a, Toni Cañete^a, Gloria Blázquez^a, Esther Martínez-Membrives^a, Regina López-Aumatell^b, Adolf Tobeña^a, Alberto Fernández-Teruel^{a,*}

^a Medical Psychology Unit, Department of Psychiatry & Forensic Medicine, Institute of Neurosciences, School of Medicine, Autonomous University of Barcelona, 08193 Bellaterra, Barcelona, Spain

^b Welcome Trust Centre for Human Genetics, Roosevelt Drive, Oxford, UK

ARTICLE INFO

Article history:

Received 10 October 2011

Received in revised form

27 November 2011

Accepted 2 December 2011

Available online 9 December 2011

Keywords:

Genetically heterogeneous rats

Roman rat strains

Anxiety

Fear

Hypothalamus–pituitary–adrenal

responses

Behavioral–hormonal associations

ABSTRACT

The purpose of the present study was to evaluate for the first time the stress-induced hypothalamus–pituitary–adrenal (HPA), adrenocorticotrophic hormone (ACTH), corticosterone and prolactin responses of the *National Institutes of Health* genetically heterogeneous rat stock (N/Nih-HS rats) in comparison with responses of the relatively high and low stress-prone Roman Low- (RLA-I) and High-Avoidance (RHA-I) rat strains. The same rats were also compared (experiment 1) with respect to their levels of unconditioned anxiety (elevated zero-maze test), novelty-induced exploratory behavior, conditioned fear and two-way active avoidance acquisition. In experiment 2, naive rats from these three strains/stocks were evaluated for “depressive-like” behavior in the forced swimming test. N/Nih-HS and RLA-I rats showed significantly higher post-stress ACTH, corticosterone and prolactin levels than RHA-I rats. N/Nih-HS rats also presented the highest context-conditioned freezing responses, extremely poor two-way avoidance acquisition and very low novelty-induced exploratory behavior. Experiment 2 showed that, compared to RHA-I rats, N/Nih-HS and RLA-I rats displayed significantly less struggling (escape-directed) and increased immobility responses in the forced swimming test. Factor analysis of data from experiment 1 showed associations among behavioral and hormonal responses, with a first factor comprising high loadings of elevated zero-maze variables and lower loadings of conditioned fear, two-way avoidance acquisition and hormonal measures, while a second factor mainly grouped conditioned fear and two-way avoidance acquisition with novelty-induced exploration and post-stress prolactin. Thus, regarding their anxiety/fearfulness, passive coping style, “depressive-like” and stress-induced hormonal responses the N/Nih-HS rats resemble the phenotype profiles of the relatively high-anxious and stress-prone RLA-I rat strain.

© 2011 Elsevier B.V. All rights reserved.

Abbreviations: HPA, hypothalamic–pituitary–adrenal axis; ACTH, adrenocorticotrophic hormone; N/Nih-HS, heterogeneous rat stock; RLA-I, Roman low-avoidance Inbred; RHA-I, Roman high-avoidance Inbred; WKY, Wistar Kyoto rat strain; QTL's, quantitative trait loci; MR/N, Maudsley reactive rat strain; WR/N, Wistar Nettle-ship rat strain; F344/H, Fischer 344 rat strain; ACI/N, Agouti rat strain; BN/SsN, brown Norway rat strain; BUF/N, Buffalo rat strain; FirstLAT, latency to enter into an open sections; Ttime, time spent in the open sections; Tentries, number of entries in the open sections; SAP, number of stretched attend postures; NACT, automated novel-cage activity; Distance, total spontaneous horizontal activity; Rearings, total number of rearing during 20 min; CS, conditioned stimulus; US, unconditioned stimulus; SHAV, shuttle-box avoidance; CET, number of the change in exploration time; Freezing, freezing time; ITC, number of inter-trial crossings; Avoidances, total number of avoidances; Latency, average response latency for the whole training session; ITI, inter-trial interval; ITC, inter-trial crossings; EIA, enzyme immunoassays; ELISA, enzyme linked immuno sorbent assay; BAS-C, basal corticosterone; BAS-PR, basal prolactin; POST-C, post-stress corticosterone; POST-PR, post-stress prolactin.

* Corresponding author. Tel.: +34 93 581 34 56; fax: +34 93 581 14 35.

E-mail address: albert.fernandez.teruel@uab.es (A. Fernández-Teruel).

1. Introduction

The “National Institutes of Health – N/Nih – Genetically Heterogeneous Rat Stock” (N/Nih-HS rats) was developed by Hansen and Spuhler [25] with the aim of having a more naturalistic, genetically heterogeneous rat stock which could yield a broad-range distribution of responses to experimental conditions and could serve as a base population for selection studies. With this aim, the N/Nih-HS rat stock was formed through an eight-way cross among 8 inbred rat strains (see Section 2 below [25]).

The N/Nih-HS rat is a unique genetic resource for the fine mapping of Quantitative trait loci (QTLs) to very small genomic regions [2,26]. In fact, these rats have been successfully used to fine map QTLs for anxiety/fear-related responses [26] and for diabetes [56]. In previous works we have characterized the N/Nih-HS rat stock (>1000 rats) for their fear/anxiety-related unconditioned and conditioned responses. Thus, with regard to their defensive

behavioral profiles in a variety of testing situations (i.e. unconditioned or conditioned anxiety and fear, coping style) we have previously reported that N/Nih-HS rats resemble more the scores of the high anxiety/stress-prone RLA-I (Roman low-avoidance) strain than those of the relatively low anxious RHA-I (Roman high-avoidance) rat strain [14–16,18,31–33,46,59,60].

As a further step in the same direction, we have undertaken the present study in a different sample of male N/Nih-HS rats with the following aims: (1) to achieve a better characterization of N/Nih-HS rats with regard to their levels of (unlearned) anxiety and learned fear as compared to rat strains with divergent profiles in those phenotypes (see below), and (2) to study for the first time HPA-axis and prolactin stress responses of the heterogeneous rat stock, as well their coping response profiles in the forced-swimming test, in comparison with responses of relatively high and low anxiety/stress-prone RLA-I/RHA-I rat strains [14–16,18,31,33,46,59,60]. In this regard, the evaluation of stress-induced HPA-axis and prolactin responses are relevant to complete the characterization of the emotional profile of the N/Nih-HS rat stock as: (1) HPA-axis responses are known to be altered in affective symptoms and disorders and they are related to differential stress sensitivity [3,27,28], and, (2) clinical and basic studies have suggested associations between prolactin levels and depressive-like symptoms, anxiety and different stressor intensities/qualities, although these are still controversial issues (e.g. [3–5,12,52,62,63]).

Finally, provided that previous reports showed that N/Nih-HS rats display anxious/fearful response profiles of similar magnitude to those shown by the (relatively high anxious) RLA-I rats strain [32,33,64], our hypotheses are that: (1) the N/Nih-HS rat stock would show stress-induced hormonal levels closer to those of the relatively high anxious RLA-I rat strain than to the RHA-I strain, and (2) N/Nih-HS rats would display passive coping responses in the forced swimming test which would be more similar to those shown by RLA-I rats than to the RHA-I rat strain [13,46,47].

2. Methods

2.1. Animals

In Experiment 1 subjects were 45 male N/Nih-HS, 8 male RHA-I and 13 male RLA-I rats, while in experiment 2 subjects were 20 male N/Nih-HS, 10 male RHA-I and 10 male RLA-I rats (see further details of the experiments below).

The differences in “*n*” for each group of rats ($n=20-45$ in N/Nih-HS groups depending on the experiment; $n=8-13$ in RHA-I/RLA-I groups depending on the experiment) is justified because, in principle, greater phenotypic variability could be expected in N/Nih-HS rats (than in the RHA-I/RLA-I rat strains), as they are genetically heterogeneous and the breeding colony includes 40 families, whereas RHA-I and RLA-I rats are inbred strains and the breeding colony includes 15–18 families/strain. As will be seen below, regardless these “*n*” differences there were no differences in variances among the 3 rat groups in any of the variables/experiments (see Section 3).

The RHA-I and RLA-I groups had rats from 8 to 13 different litters (in both experiment 1 and experiment 2), while N/Nih-HS group had rats from 40 different litters in experiment 1 and from 20 different litters (randomly chosen) in experiment 2.

The progenitors of the N/Nih-HS rats (“National Institutes of Health Genetically Heterogeneous Rat Stock” [25,58] were kindly provided by Dr. Eva Redei (Center for Comparative Medicine, Northwestern University, Chicago, USA) derived from 40 different families which are breeding colony kept at our laboratory [32]. The original heterogeneous rat stock was derived from an eight-way cross of the following 8 inbred strains: the MR/N (Maudsley Reactive), WN/N (Wistar Nettlehip) and WKY/N (Wistar Kyoto; these three strains trace their ancestry to the original Wistar stock); the M520/N and F344/N (Fischer 344; both strains established in the 1920s, but of unknown origin); the ACI/N (Agouti; hybrid between the August and Copenhagen strains), the BN/SsN (Brown Norway; derived from a color mutant from a stock of wild rats kept at the Wistar Institute) and the BUF/N (Buffalo) strain [25].

Inbred RHA-I and RLA-I rats (48–49 generation) come from the permanent colony kept at our laboratory since 1996. Subjects were approximately 4 months old at the beginning of the experiments (weight: 342 ± 6.95 ; mean \pm SEM). They were housed in pairs in macrolon cages (50 cm \times 25 cm \times 14 cm), maintained with food and tap water available ad libitum, under conditions of controlled temperature ($22 \pm 2^\circ\text{C}$; 50–70% humidity) and a 12-h light/12-h dark cycle (lights on at 08:00 h).

We have chosen the (Wistar-derived) psychogenetically selected inbred Roman (RHA-I and RLA-I) rat strains for comparison, given the difficulties to obtain the 8

parental inbred strains from which the N/Nih-HS stock was derived (two of these parental strains are not in existence, and some of the others are not the originals) and to maintain them in our animal resources, and because we already have previous phenotypical comparisons among the heterogeneous rat stock and the Roman rat strains [31–33,64].

2.2. Procedure and apparatus

Experiments were performed during the light cycle, between 09:00 and 19:00 h, and in accordance with the Spanish legislation on “Protection of Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes” and the European Communities Council Directive (86/609/EEC) on this subject. The experimental protocol was approved by the Autonomous University of Barcelona Ethics committee.

Two separate experiments were carried out. *Experiment 1* consisted of the following tests/measures: (1) Elevated zero-maze (ZM; day: 1–6); (2) Basal (pre-stress) hormone measurements (day: 7–9); (3) Automated novel-cage activity (day: 14–22; starting at least 7 days after basal hormone measurement); (4) Post-stress hormone measurements (day: 14–22; plasma samples were taken at the end of the 20-min “automated novel-cage activity” exposure); and, (5) Two-way active, shuttle box avoidance acquisition (day: 36–52; performed at least 11 days after the post-stress hormonal measurements – i.e. blood sampling).

Experiment 2 consisted of administering only the “Forced swimming test” and was carried out along a 1-week period.

The specific procedures for behavioral tests/tasks and hormonal measurements were as follows:

2.2.1. Elevated zero-maze (ZM; Experiment 1)

The maze, similar to that described by [55], comprised an annular platform (105 cm diameter; 10 cm width) made of black plywood and elevated to 65 cm above the ground level. It had two open sections (quadrants) and two enclosed ones (with walls 40 cm height). The subject was placed in an enclosed section facing the wall. The apparatus was situated in a black testing room, dimly illuminated with red fluorescent light (50 lx at the level of the apparatus), and the behavior was videotaped and measured outside the testing room. Latency to enter into an open section (FirstLAT), time spent in the open sections (Time), number of entries in the open sections (Tentries), number of stretched attend postures (SAP) were measured for 5 min [32,33,39,55].

2.2.2. Automated novel-cage activity (NACT; Experiment 1)

The apparatus (Panlab, Barcelona, Spain) consisted of 3 horizontal surfaces (50 cm \times 50 cm) provided with photobeams that detect movement and measure it automatically, loading the data in a computer. The subjects were individually placed in transparent plexiglass cages (40 cm \times 40 cm \times 40 cm) and an opaque surface separated each cage from the closest one to avoid visual interaction. They were situated, in a white fluorescent illuminated (65 lx at the level of the testing cages) chamber. Spontaneous horizontal activity (Distance) and total number of rearings (Rearings), were measured for 20 min.

2.2.3. Two-way active, shuttle box avoidance acquisition (SH; Experiment 1)

The experiment was carried out with 3 identical shuttle boxes (Leticia, Panlab, Barcelona, Spain), each placed within independent, sound-attenuating boxes constructed of plywood. A dim and diffuse illumination (50 lx inside the shuttle boxes) was provided by a fluorescent bulb placed behind the opaque wall of the shuttle boxes. The experimental room was kept dark. The shuttle boxes consisted of two equally sized compartments (25 cm \times 25 cm \times 28 cm), connected by an opening (8 cm \times 10 cm). A 2400-Hz, 63-dB tone plus a light (from a small, 7-W lamp) functioned as the CS (conditioned stimulus). The US (unconditioned stimulus), which commenced at the end of the CS, was a scrambled electric shock of 0.7 mA delivered through the grid floor. Once the rats were placed into the shuttle box, a 4-min familiarization period elapsed before training commenced. Each training trial consisted of a 10-s CS, followed by a 20-s US. The CS or US was terminated when the animal crossed to the other compartment, with crossing during the CS being considered as an avoidance response and during the US as an escape response. Once a crossing had been made or the shock (US) discontinued, a 60-s inter-trial interval (ITI) was presented during which crossings (ITC) were also scored. Training consisted of a single 50-trial session.

The variables recorded were the number of changes in exploration time (CET, during 4-min familiarization period), the freezing time (Freezing), the number of inter-trial crossings (ITC), the total number of avoidances (Avoidances), and the average response latency for the whole training session (LAT) [1,7,17,19–22,48,49].

Context-conditioned freezing, was measured by two trained observers (between-observer reliability, $r > 0.95$), as the time a rat spent completely motionless except for breathing movements. Freezing measures were taken during the first five 60-s inter-trial (resting) intervals of the 50-trial acquisition session.

2.2.4. Hormonal measurements (Experiment 1)

The experimental procedures were all done in the morning (9:30 to 13:00). Blood samples were taken by tail-nick procedure in resting conditions, in order to evaluate basal and post-stress hormone levels. For stress induction, one week after basal blood sampling (for baseline hormonal measurements), all animals were

exposed to the “automated novel-cage activity test (NACT)” for 20 min. Post-stress blood samples (for post-stress hormonal measurements) were taken by tail-nick immediately following the 20 min exposure to the NACT test. Especial care was taken to get each animal’s blood sample in less than 2 min after removal from its home cage (baseline sampling) or from the NACT test cages (post-stress sampling). The animals were returned to their home cages in the animal room after each blood sampling.

The tail-nick consisted of gently wrapping the animals with a cloth, making a 2 mm incision at the end of one of the tail arteries and then massaging the tail while collecting, within 2 mm, approximately 200 μ l of blood into ice-cold Safe-lock 2.0 ml tubes (Eppendorf, Hamburg, Germany). Plasma obtained after centrifugation was stored at -80°C until processing.

Enzyme-linked immuno sorbent assay (competitive ELISA), determined plasma corticosterone and prolactin levels, and chemiluminescence determined ACTH levels. EMS Reader MF V.2.9-0 was the reader make used.

Corticosterone ELA (Immunodiagnostic System Ltd, IDS Ltd; Boldon, United Kingdom) was the corticosterone reagent used, Prolactin Rat ELISA (Demeditec Diagnostics, GmbH; Germany) was the prolactin reagent used, and the kit for Immulite[®] 1000 (Siemens) was the apparatus used to obtain the results.

2.2.5. Forced swimming test (Experiment 2)

The procedure used was very similar to that described by Porsolt et al. [47] and modified by Detke et al. [13] (see also Piras et al. [46]). Swim sessions were conducted by plunging the rats in individual vertical plastic cylinders (60 cm tall \times 19 cm diameter), containing 40 cm of water at $24\text{--}26^{\circ}\text{C}$. The experimental procedure consisted of two sessions: an initial 15-min “pretest” followed 24 h later by a 5-min test. Following swim sessions, rats were removed from the cylinders, gently dried with paper towels and returned to their home cages. Water was changed for each rat. The apparatus was situated in a black-painted testing room dimly illuminated with white fluorescent light (65 lx at the level of the water) situated in the ceiling (2.5 height), and the behavior was videotaped and measured outside the testing room. Variables recorded during two sessions, were: (a) Immobility: rat was making only those movements necessary to keep its head above water. (b) Struggling: rat was making active swimming motions, thus displaying vigorous (escape-directed) activity with its four legs and keeping a vertical position [13].

2.3. Statistical analysis

Homogeneity of variances among groups was tested through Levene’s test. One-way ANOVAs for the three experimental groups and Duncan’s test for comparisons between groups when appropriate were used (SPSS Windows, 17.0, SPSS Inc., USA). Repeated-measures MANOVA analyses were used to jointly analyze pre- and post-stress corticosterone, prolactin and ACTH levels.

A correlation matrix and obliquely rotated (oblimin direct) factor analysis were applied to study the associations among the different and most relevant dependent variables (14 variables) of the N/Nih-HS group. According our previous works [32,33], the next step was to reduce the initial obtained solution to a minimum and meaningful number of non test-related factors (Direct Oblimin method) following appropriate application of the Catell’s Scree test (for more detailed justification of these factorial procedures see [1,32]). Student’s *t*-tests for independent groups were also applied (when necessary) for comparison between values of the RHA-I and RLA-I groups, provided that *a priori* hypotheses were made regarding the expected higher levels of (both conditioned or unconditioned) anxiety/fear in the RLA-I strain.

3. Results

Levene’s test for homogeneity of variances revealed no significant variance differences among the three experimental groups in any of the behavioral (experiments 1 and 2) or hormonal (experiment 1) variables (not shown).

Table 1 shows the descriptive values of the different variables in N/Nih-HS rats, as well as the results of the statistical comparisons (one-way ANOVA and Duncan’s tests) with the corresponding scores of both the RHA-I and RLA-I rat strains. Additional *t*-tests were applied between both Roman rat strains to confirm the predicted between-strain differences in anxious or fear-related behavior. As can be seen, ANOVAs were significant for FirstLAT and SAP (these two variables measured in the elevated zero-maze test, all $F(2, 63) > 4.6$, all $p < 0.05$). Distance and Rearings (both measures from the “automated novel-cage activity” test; both $F(2, 63) > 6.1$, $p < 0.05$) and for the five measures of the two-way active avoidance task (all $F(2, 63) \geq 12.1$, $p < 0.001$). Student’s *t*-tests showed the predicted differences in FirstLAT and Tentries between the RLA-I and RHA-I groups (i.e. RLA-I rats show longer latency to the first entry

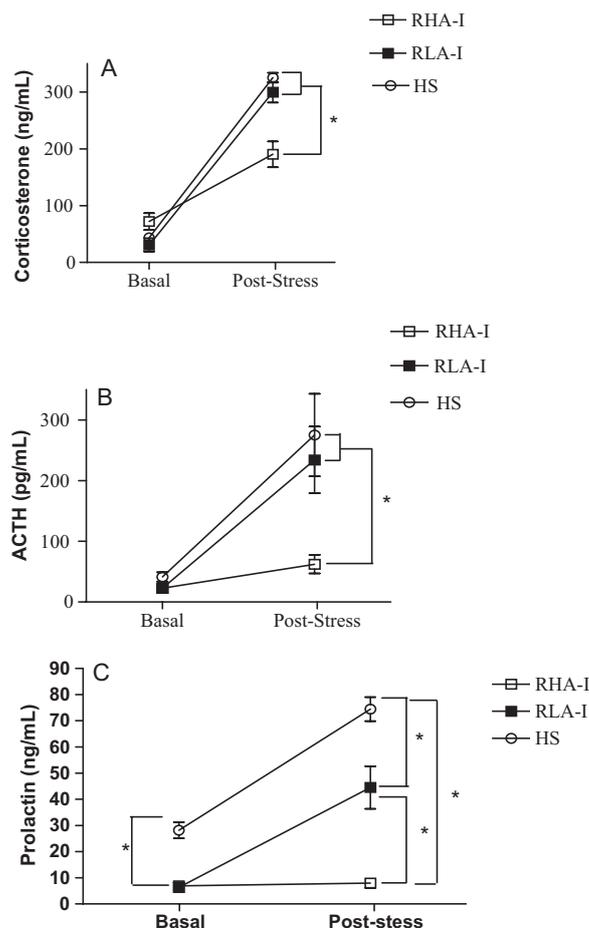


Fig. 1. Descriptive comparison: pre- and post stress hormone stress, in the three strains (Experiment 1). The figure shows the basal and post-stress values (means \pm SEM) of corticosterone (A), ACTH (B) and prolactin (C), for the 3 groups of male rats (rats used were $n = 8$ RHA-I, $n = 13$ RLA-I and $n = 49$ N/Nih-HS). * $p < 0.05$ among the groups indicated (Duncan’s multiple range test) following significant MANOVA’s “Time \times Strain” and “Strain” effects (see text for details).

into an open section – FirstLAT – and less number of entries in open sections – Tentries – than RHA-I rats; both $t(19) = 2.1$, $p = 0.05$). For the remaining variables, Duncan’s multiple range tests (following the above-mentioned significant one-way ANOVAs) indicated that, compared to RHA-I rats, RLA-I rats showed decreased Rearings and CET (representing elevated behavioral inhibition in novel – unconditioned – situations), as well as decreased ITC and Avoidances and increased Freezing and LAT (indicating elevated conditioned-fear and conditioned anxiety under a conflict situation, i.e. the passive avoidance/active avoidance conflict involved in the initial phases of two-way avoidance acquisition).

Regarding N/Nih-HS rats, Table 1 indicates that their values in ZM variables fall in between those of the RLA-I and RHA-I groups (except in SAP; no significant Duncan’s tests, however), while closely resembling RLA-I scores in Rearings and CET variables (see Duncan’s tests in Table 1), as well as regarding context-conditioned fear (Freezing) and two-way avoidance acquisition measures (Avoidances, LAT and ITC; see Table 1). Horizontal activity levels (in the “novel-cage activity test”) were significantly lower in N/Nih-HS than in RLA-I rats (see Duncan’s tests in Table 1).

Fig. 1 describes baseline and post-stress hormone values from experiment 1 (corticosterone, ACTH and prolactin). Repeated-measures MANOVAs were significant for the three hormonal comparisons, thus showing significant main effects of “Time” (within-subject factor; all $F_s \geq 18.5$, $p \leq 0.001$), “Strain” (all $F_s \geq 4.5$,

Table 1
Comparison of behavioral responses among the Roman rat strains and the N/Nih-HS rat stock (Experiment 1).

		RHA-I	RLA-I	N/Nih-HS
Elevated zero-maze	FirstLAT (s)	63.9 ± 34.1	169.9 ± 36.1 (a, b)	93.8 ± 17.9
	Ttime (s)	44.4 ± 13.4	33.5 ± 11.9	41.2 ± 7.1
	Tentries (n)	4.2 ± 1.2	1.7 ± 0.6 (a)	2.8 ± 0.4
	SAP (n)**	11.4 ± 1.5	11.5 ± 3.0	6.8 ± 0.5
Automated novel-cage activity	Distance (cm)	3824.9 ± 380.1	4161.8 ± 215.6	2741.3 ± 236.4 (c)
	Rearings (n)	103.4 ± 28.8	52.6 ± 4.7 (b)	64.9 ± 7.8
	CET (n)	10.9 ± 1.1	5.3 ± 0.8 (b)	4.3 ± 0.4 (b)
Shuttle box	Freezing (s)	28.2 ± 10.2	169.0 ± 12.9 (b)	221.6 ± 5.8 (b, c)
	ITC (n)	71.8 ± 11.8	24.9 ± 4.4 (b)	22.0 ± 2.4 (b)
	Latency (s)	6.1 ± 0.7	14.1 ± 1.0 (b)	12.4 ± 0.4 (b)
	Avoidances (n)	38.9 ± 2.8	3.2 ± 1.2 (b)	3.6 ± 0.7 (b)

Means ± SEM of behavioral measures of the 3 groups of rats are shown. RHA-I, $n=8$; RLA-I, $n=13$, and HS, $n=45$. FirstLAT: latency (s) to the first entry into an open section in the elevated Zero-maze. Ttime: time spent (s) in the open sections. Tentries: total number of the entries in the open sections (n). SAP: stretched attend postures (n). Distance: distance (cm) travelled during 20 min of the automated novel-cage activity test. Rearings: total number of the rearings during 20 min. CET: total number of the changes in the exploration time (4 min). Freezing: total time of freezing (s) during 5 min. ITC: total number of Intertrial crossings (n). Latency: mean response latency (s) for the whole the 50-trial shuttle box avoidance session. Avoidances: number of avoidances in the 50-trial shuttle box (n). (a), $p < 0.05$ vs RHA-I group (Student's *t*-test for independent samples, as *a priori* hypotheses were made for differences between the Roman rat strains in these variables: i.e. the RLA-I should display higher behavioral inhibition/anxiety; see for instance [33]); (b), $p < 0.05$ vs RHA-I (Duncan's test after significant one-way ANOVA); (c), $p < 0.05$ vs RLA-I (Duncan's tests after significant oneway ANOVA); **, indicates significant one-way ANOVA for SAP without any significant post hoc Duncan's test.

$p \leq 0.03$) and for the "Time x Strain" interaction in the cases of corticosterone and prolactin (both $F_s \geq 5.9$, $p < 0.004$; $df=63$ for corticosterone and prolactin; $df=14$ for ACTH analyses; see Fig. 1).

The detailed comparisons between pairs of groups (Duncan's tests) indicated that, as expected, RLA-I rats displayed elevated stress-induced responses of the three hormones, as compared to RHA-I rats (see post-stress Duncan's tests in Fig. 1). The novel and relevant result is that the post-stress values of corticosterone and ACTH from N/Nih-HS rats are remarkably similar to those of RLA-I rats and much higher than those of RHA-I rats (see Duncan's tests in Fig. 1). Still more outstanding is the very significant difference found between both Roman rat groups and N/Nih-HS rats in post-stress prolactin levels (oneway ANOVA and Duncan's tests of post-stress prolactin; $F(2,63) = 14.3$, $p < 0.01$; see Duncan's tests in Fig. 1), as it is clear that N/Nih-HS rats display a markedly higher response of that hormone.

The correlation matrix (Table 2) mainly shows: (1) mostly moderately to high correlations among variables from (and within) the elevated zero-maze test ($r = -0.48$ to 0.91); (2) some expected, lower but significant correlations among measures from the shuttle box task, including conditioned freezing (e.g. between 0.31 and -0.41 among LAT, Freezing and ITC); (3) significant moderate correlations between some shuttle box measure and some of the variables from the elevated "zero-maze" ($r = 0.41$ – 0.48 , between ITC and Tentries and Ttime); and (4) low (but significant) correlations between BAS-PR and Freezing ($r = 0.30$) and between POST-PR and Rearings ($r = -0.30$).

Obliquely rotated factor analyses (direct oblimin) were then applied to 14 target variables (Table 3), including the hormonal (corticosterone and prolactin) baseline and post-stress measures (ACTH has been excluded because of the low "n"), and only excluding Avoidances, as values of N/Nih-HS rats are very extremely low in that variable and for this reason LAT has been taken as the variable reflecting performance in the shuttle box acquisition task. To be consistent with our previous studies [1,32,33,64], we aimed to obtain a minimum number of conceptually meaningful (and not so much test-related) factors, thus the first test-related 5-factor structure was reduced to two-factor solution after applying the Catell's Scree test (see Eigenvalues Table 3A). This solution (Direct Oblimin) showed two independent factors (correlation between factors = -0.014), with Factor 1 grouping unconditioned anxiety responses (ZM test; loadings of -0.69 to 0.88 ; we called it "timidity/conflict") plus lower loadings of measures from the shuttle box session (especially CET and ITC, loading 0.47 – 0.59) and all hormonal

variables (loadings of -0.25 to -0.30), except post-stress prolactin. Factor 2 mainly represents conditioned conflict, as indicated by the loadings of shuttle box avoidance behavior/acquisition (loadings of -0.47 to 0.69 for Freezing, ITC and LAT), which are accompanied by loadings – in the expected direction – of Rearings (rearing behavior in the 20-min novel cage test; loading -0.58) and POST-PR (post-stress prolactin, loading 0.43). We thus tentatively called Factor 2 as "fear conditioning" factor.

Table 4 shows the behavioral profiles of the three strains/stocks, and comparisons among them, in both sessions of the forced swimming test ($F = 6.19$, $p = 0.008$, with $df = 37$). ANOVAs from the first swimming session showed overall differences in immobility ($F = 6.19$, $p = 0.008$, with $df = 37$) and struggling ($F = 5.7$, $p < 0.01$, with $df = 37$), with N/Nih-HS rats showing higher values in the former and lower in the latter variable, with respect to both the RHA-I and RLA-I groups ($p < 0.05$, Duncan's test; Table 4). The second, 5-min swimming session, showed higher immobility values and lesser struggling for RLA-I and N/Nih-HS rats as compared to the RHA-I group (ANOVAs for both variables respectively; $F = 10.9$, $p < 0.001$, and $F = 26.7$, $p < 0.001$; $df = 37$. See Duncan's tests in Table 4).

4. Discussion

The present report shows the results of a behavioral evaluation of N/Nih-HS rats in a battery of anxiety/fearfulness tests and, for the first time, HPA-axis and prolactin responses to novelty stress have been also evaluated in a genetically heterogeneous rat stock in comparison with the profiles of the (relatively low anxious) RHA-I and (relatively high anxious) RLA-I rat strains. The results of this study lend support to our previous multitest behavioral characterization of a different sample of the heterogeneous rat stock [32,33], as it is observed that N/Nih-HS rats present a behavioral profile similar to RLA-I rats in the shuttle box task/measures, while they mostly fall in between the values of both Roman rat strains in the ZM test of anxiety. The correlation and factor analysis results of N/Nih-HS data also cohere with the above mentioned study, both regarding the pattern of within-test correlations (i.e. correlations among variables within ZM or within the shuttle box task) as well as the correlation coefficients of 0.41 – 0.48 between "entries and time in open sections" (ZM test) and ITCs in the two-way avoidance session [32,33]. Still concerning the behavioral variables, the present factor analysis shows a picture which is similar to the factorial structure reported by López-Aumatell et al. [32,33], with a first factor (provisionally named "Timidity/conflict" factor) with a low

Table 2
Correlation matrix among the main variables for the N/NiH-HS rats (Experiment 1).

	FirstLAT	Tentries	Ttime	SAP	CET	Freezing	ITC	Latency	Avoidances	Distance	Rearings	BAS-C	POST-C	BAS-PR	POST-PR
Zero-maze															
FirstLAT	1														
Tentries	-.57***	1													
Ttime	-.54***	.91***	1												
SAP	-.48***	.71***	.61***	1											
Shuttle box															
CET	-.31*	.17	.31*	.18	1										
Freezing	-.04	-.14	-.28	.04	-.23	1									
ITC	-.21	.41**	.48***	.13	.27	-.49***	1								
Latency	.12	-.04	-.13	.00	-.43**	.31*	-.35*	1							
Avoidances	-.12	-.01	-.08	-.16	.04	-.12	.19	-.22	1						
Novel-cage															
Distance	.04	.08	.06	-.05	-.01	.04	.11	.21	-.18	1					
Rearings	.20	.01	.04	-.17	-.16	-.17	.17	.04	-.01	-.29	1				
Hormones															
BAS-C	.04	-.07	-.15	-.05	-.23	.03	-.10	.06	.16	-.17	.19	1			
POST-C	.27	-.11	-.07	-.22	-.21	-.10	-.03	.00	.06	.19	-.12	.23	1		
BAS-PR	.04	-.10	-.22	-.07	-.05	.30*	-.16	-.17	.26	-.10	.12	.27	.09	1	
POST-PR	-.10	.10	.08	.27	-.04	-.15	-.04	-.12	.18	.07	-.30*	-.07	.19	.08	1

Correlations ≥ 0.25 are shown in bold. FirstLAT: latency (s) to the first entry into an open section in the elevated Zero-maze; Tentries: total number of entries in the open sections (n); Ttime: time spent (s) in the open sections; SAP: stretched attend postures (n); CET: total number of the changes in the exploration time (4 min); Freezing: total time of freezing (s) during 5 min; ITC: total number of intertrial crossings (n); Latency: mean response latency (s) for the whole the 50-trial shuttle box avoidance session; Avoidances: number of avoidances in the 50-trial shuttle box (n); Distance: distance (cm) travelled during 20 min of the automated novel-cage activity test; Rearings: total number of the rearings during 20 min; BAS-C: basal corticosterone values; POST-C: post-stress corticosterone values; BAS-PR: basal prolactin values; POST-PR: post-stress prolactin values; $p \leq 0.05$ Pearson's correlation coefficient. ** $p \leq 0.01$ Pearson's correlation coefficient. *** $p \leq 0.001$ Pearson's correlation coefficient; $n = 45$.

loading (–0.28) of Latency (acquisition/performance index: average response latency in the 50-trial shuttle box session) and high loadings of ZM behavior, whereas higher loadings of Latency (0.47), ITC (–0.54) and Freezing (0.69) are clustered with a –0.58 loading of rearing (exploratory) behavior and to moderate loadings of stretched-attend postures (0.38) and horizontal activity (0.31) in the second factor (provisionally named “Fear conditioning” factor; see Table 3). Thus, the behavioral evaluation and analyses of experiment 1 give results which are in line with those obtained before in N/Nih-HS rats [32,33,64].

In addition, the present work adds relevant and completely new information regarding HPA-axis and prolactin reactivity to stress of N/Nih-HS rats, as well as regarding their “depressive-like” profile, in comparison with the Roman rat strains. To sum up (but see more details below), the results show, for the first time, that: (1) HPA-axis (i.e. ACTH and corticosterone) responses to stress, which are more marked in RLA-I than RHA-I rats [9,59,60], show values which are similar between N/Nih-HS and RLA-I rats. (2) Most outstandingly, prolactin responses to stress in N/Nih-HS rats are significantly more elevated than even those of RLA-I rats. (3) The factor analysis shows that endocrine variables load in a hypothetically congruent direction in both factors (i.e. the higher the hormonal values the higher the signs of anxious behavior or of behavioral inhibition). (4) The N/Nih-HS rats also show a behavioral “depressive-like” profile which is closer to that of RLA-I rats than to the profile shown by RHA-I animals in the forced swimming test [46]. It is unlikely that the particularly passive coping style of N/Nih-HS rats in the forced swimming test, as well as in the shuttle box task (and some ZM test measures), can be accounted for by their relatively low levels of activity as indicated by the “novel-cage activity” test as: (1) “Distance” travelled in the “novel-cage activity” test is not correlated (see Table 2) to any other behavioral measure in any test/task nor it loads in the first factor of the factor analysis (see Table 3B), in which there are relevant loadings of ZM and shuttle box variables. (2) Although “distance” loads in the second factor it has the opposite sign to what could be expected (see Table 3B), i.e. a positive loading of 0.31, which would indicate that the higher the “distance” value the higher the “Freezing” and response “Latency” and the lowest “ITC” values in the shuttle box task. (3) With regard to the relatively high levels of immobility (and relatively low levels of struggling) of N/Nih-HS rats in the forced swimming test, we can rule out that these could be due to any motor problem or to any general activity deficit, as in separate experiments we have found that N/Nih-HS rats show higher swimming speed and better efficiency in several learning tasks in the Morris water maze (MWM) than those seen in RHA-I and RLA-I rats. Thus, in “escapable” MWM tasks in which rats can escape from the pool by finding the platform, N/Nih-HS rats display more activity (i.e. higher swimming speed) than the RHA-I/RLA-I strains (Martínez-Membrives et al. submitted; unpublished Master Thesis, 2009), thus indicating that the relatively low levels of activity seen in N/Nih-HS rats are specific of novel/threatening, inescapable and conflict situations as the ones used in the present work.

Among the present results there is one, however, that we think deserves especial attention: the markedly elevated prolactin levels of N/Nih-HS rats. It is well known that prolactin works as a mediator between neural and both endocrine and immune systems, with an important involvement in homeostatic regulation when an organism is facing an anxiogenic or stressful situation [23]. Thus, it has been repeatedly reported that a variety of anxiogenic stimuli, including novelty exposure, conditioned fear, acute or chronic restraint stress, nociceptive stimuli and exercise, all activate prolactin-releasing peptide neurons that regulate prolactin levels in several brain areas [38]. However, the implication of prolactin in anxiety and stress seems to vary with the particular type of stressful situation [50,65,66] and suggests that the amount of

Table 3
Factor analyses for the N/NiH-HS rat sample (five-and two-factor solutions, for Experiment 1).

	Factor 1	Factor 2	Factor 3	Factor 4	Factor 5
(A) First obliquely rotated factor analysis					
Elevated zero-maze					
FisrtLAT	-0.75	-	-	0.27	-
Tentries	0.92	-0.27	-	-	-
Ttime	0.87	-0.44	-	-	-
SAP	0.84	-	-	-	-
Two-way shuttlebox avoidance session					
CET	0.26	-	-	-0.62	-0.38
Freezing	-	0.83	-	-	-
ITC	0.37	-0.77	-	-0.25	-
Latency	-	0.28	-	0.84	-
Automated novel-cage activity test					
Distance	-	-	-0.62	0.30	0.33
Rearings	-	-0.31	0.74	-	-
Hormonal values					
BAS-C	-	-	0.65	-	0.39
POST-C	-0.26	-	-	-	0.75
BAS-PR	-	0.44	0.41	-0.44	0.47
POST-PR	0.25	-	-0.43	-	0.52
Eigenvalues	3.56	1.91	1.61	1.45	1.41
Suggested names					
	Factor 1	Factor 2			
	"Timidity/conflict"	"Fear conditioning"			
(B) Second obliquely rotated factor analysis: two-fold solution					
Elevated zero-maze					
FisrtLAT	-0.69	-	-	-	-
Tentries	0.86	-	-	-	-
Ttime	0.88	-	-	-	-
SAP	0.72	-	0.38	-	-
Two-way shuttlebox avoidance session					
CET	0.47	-	-0.28	-	-
Freezing	-0.32	-	0.69	-	-
ITC	0.59	-	-0.54	-	-
Latency	-0.28	-	0.47	-	-
Automated novel-cage activity test					
Distance	-	-	0.31	-	-
Rearings	-	-	-0.58	-	-
Hormonal values					
BAS-C	-0.30	-	-	-	-
POST-C	-0.29	-	-	-	-
BAS-PR	-0.25	-	-	-	-
POST-PR	-	-	0.43	-	-

Loadings ≥ 0.25 are shown. (A) Oblique five-factor solution (direct oblimin) with 14 selected variables (factors with eigenvalues greater than 1). (B) Two-factor solution and correlation between factors, showing that both factors are orthogonal (independent); $n=45$. FisrtLAT: latency (s) to the first entry into a open section in the elevated Zero-maze. Tentries: total number of the entries in the open sections (n). Ttime: time spent (s) in the open sections. SAP: stretched attend postures (n). CET: total number of the changes in the exploration time (4 min). Freezing: total time of freezing (s) during 5 min. ITC: total number of Intertrial crossings (n). Latency: mean response latency (s) for the whole the 50-trial shuttle box avoidance session. Distance: distance (cm) travelled during 20 min of the automated novel-cage activity test. Rearings: total number of the rearings during 20 min. BAS-C: basal corticosterone values. POST-C: post-stress corticosterone values. BAS-PR: basal prolactin values. POST-PR: post-stress prolactin values.

Explained variance: 71%.

Explained variance: 39%.

Correlation between factor = -0.014.

Table 4
Immobility and struggling scores of the three groups of rats in both forced swimming sessions (Experiment 2).

	RHA-I	RLA-I	N/Nih-HS
Immobility 15'	408.2 \pm 69.6	413.0 \pm 74.9	659.2 \pm 48.5*
Struggling 15'	134.4 \pm 34.6	120.8 \pm 22.13	47.4 \pm 12.8*
Immobility 5'	46.2 \pm 11.7	115.9 \pm 28.1**	169.8 \pm 15.5**
Struggling 5'	157.8 \pm 17.0	78.8 \pm 18.4**	33.5 \pm 6.2*

Mean \pm SEM are shown. Groups: RHA-I ($n=10$), RLA-I ($n=10$) and HS ($n=20$). * $p < 0.05$ vs both RHA-I and RLA-I groups, ** $p < 0.05$ vs RHA-I group (one-way ANOVA). "Immobility15'" and "Struggling15'": measures (s) from the first 15-min swimming session. "Immobility5'" and "Struggling5'": measures (s) from the second 5-min swimming session.

control an organism exerts over the stressor is a salient determinant of the responsivity of prolactin to aversive/stressful situations [62,63].

Of particular interest in this context is the finding that the Roman rat lines/strains exhibit very large differences in their prolactin response to novelty-related stressful situations, the RLA line/strain showing an exacerbated prolactin response that is not observed in their RHA counterparts [10,60,62]; as it is again confirmed by the results of the present study. Recent microarray results [53] from our group show that baseline prolactin gene expression is very significantly upregulated in the brain of RLA-I compared to RHA-I rats. Such a neuroendocrine difference has been shown to be abolished by neonatal handling [61], a treatment which in parallel decreases anxiety/fearfulness and sensitivity to stress in RLA and unselected rats while increasing active coping strategies and two-way avoidance acquisition efficiency [18,36,37]. Turning back to the above mentioned between-line/strain prolactin differences, it is outstanding that stress-induced prolactin responses appear to be the only neuroendocrine factor which remains correlated with two-way avoidance acquisition (the initial selection trait of RHA/RLA rats) in segregating crosses, i.e. after genetic recombination between both Roman rat lines [11]. The results of that genetic study indicated that two-way avoidance acquisition and prolactin responses to stress were the most important variables to differentiate the Roman lines, while the intercorrelation of both variables in segregating crosses suggested that they could share common regulatory mechanisms which are under genetic control [11]. Increased stress-induced prolactin responses have been linked to passive coping strategies when the subject is facing an aversive situation [11,59,60,62], and this fits well with the profile of the RLA line/strain of rats, as these rats are anxious/fearful and display passive/reactive coping responses (e.g. freezing) compared with their RHA counterparts, which show proactive coping responses (e.g. active exploration, escape/avoidance responses [11,14–16,31,33,59–62]).

Our results show that N/Nih-HS rats also display predominantly passive/reactive coping responses (as well as HPA-axis responses close to those of RLA-I rats), i.e. high conditioned freezing levels, very poor efficiency to acquire the two-way avoidance response and relatively high levels of immobility (and low levels of struggling) in the forced swimming test. Moreover, our study shows for the first time that basal and stress-induced prolactin response of N/Nih-HS rats are markedly elevated, much higher than the values of RHA-I and RLA-I rat strains. The reason why baseline prolactin levels are significantly elevated in N/Nih-HS rats is unclear and will need further study. In any case, the especially marked elevation of post-stress prolactin in these rats seems outstanding, as it is more than twice the prolactin response observed in the anxious RLA-I strain. As far as prolactin responses to stress appear to be associated to the particular strategies of coping with aversive situations [11,13,59,60,62], the passive coping profile of the N/Nih-HS rats, which even display about 50 s more conditioned freezing and significantly less struggling than RLA-I rats (experiment 2), seems to be congruent with an elevated prolactin response. It is outstanding, in addition, that the present factor analytical results are consistent with the factorial associations reported in the genetic study by Castanon et al. [11] using segregating crosses of RHA and RLA rats, as we have also found that post-stress prolactin levels are negatively related to the efficiency of two-way avoidance acquisition and positively associated with the levels of context-conditioned freezing/fear (see Factor 2 in Table 3).

The fact that such a prolactin response in N/Nih-HS rats about 50% higher than the one shown by RLA-I rats raises the possibility that the different genetic background of the Roman rat strains (RHA and RLA were derived from Wistar) and the N/Nih-HS rat stock (derived from 8 inbred strains; see Section 2), might be a factor

underlying such a particularly elevated hormonal response. This is an issue, however, that will need further studies to be clarified.

On the other hand, it is worth point out that WKY (Wistar-Kyoto) rats are among the eight founder strains of the N/Nih-HS rats stock. In this sense, it is interesting that WKY rats have become one of the best models for depression research [5,8,34,35,40–43,57], thus showing a predominantly passive coping (behavioral) profile in the forced swimming test, in the hole board, in the open-field test and in the acquisition of two-way active avoidance in the shuttlebox, as well as relatively high stress-induced corticosterone and ACTH levels [6,24,29,30,40–45,51,54]. The present study suggests, jointly with our previous work [33], that N/Nih-HS rats have retained some of the most relevant phenotypic characteristics of the WKY rat strain, i.e. a rather passive coping style and a relatively exacerbated hormonal stress response profile.

Therefore, putting together the present results and those from our previous reports [32,33], it appears conclusive that N/Nih-HS rats display “defensive” behavioral and hormonal profiles which are much closer to the (high anxious) passive copier RLA-I rats than to the (low anxious) proactive copier RHA-I rat strain, as it is mainly indicated by (i) their elevated conditioned (fear) freezing levels and extremely poor two-way avoidance acquisition (and very few inter-trial crossing responses), (ii) by some spontaneous activity (exploration) measures under unconditioned novelty situations (i.e. rearing in the novel cage; free exploration of the shuttle box), (iii) by their hormonal responses to stress and (iv) by their “depressive-like” behavior in the forced swimming test.

Thus, it can be said that the N/Nih-HS rat stock presents a behavioural/endocrine profile which fits well with one of a mildly anxious, passive copier and stress-prone rat.

Acknowledgements

Supported by grants for the MICINN (SAF2009-10532), “Fundació La Marató TV3” (ref. 092630), 2009SGR-0051, the European project/consortium “EURATRANS” (grant agreement HEALTH-F4-2010-241504) and the Welcome Trust (UK). C.M.-C. is recipient of a FPI (2010; MICINN) PhD fellowship.

References

- [1] Aguilar R, Gil L, Flint J, Gray JA, Dawson GR, Driscoll P, et al. Learned fear, emotional reactivity and fear of heights: a factor analytic map from a large F2 intercross of Roman rat strains. *Brain Res Bull* 2002;57:17–26.
- [2] Alam I, Koller DL, Sun Q, Roeder RK, Cañete T, Blázquez G, et al. Heterogeneous stock rat: a unique animal model for mapping genes influencing bone fragility. *Bone* 2011;48:1169–77.
- [3] Armario A, Escorihuela RM, Nadal R. Long-term neuroendocrine and behavioural effects of a single exposure to stress in adult animal. *Neurosci Biobehav Rev* 2008;32:1121–35.
- [4] Armario A, Martí J. Forced swimming behaviour is not related to the corticosterone levels achieved in the test: a study with four inbred rat strains. *Physiol Behav* 1994;369–73.
- [5] Armario A, Gabaldá A, Martí J. Comparison of the behavioural and endocrine response to forced swimming stress in five inbred strains of rats. *Psychoneuroendocrinology* 1994;20:879–90.
- [6] Athey GR, Iams SG. Cold-restraint induced gastric lesions in normotensive and spontaneously hypertensive rats. *Life Sci* 1981;28:889–94.
- [7] Boix F, Fernández-Teruel A, Tobeña A. The anxiolytic action of benzodiazepines is not present in handling-habituated rats. *Pharmacol Biochem Behav* 1988;31:541–6.
- [8] Braw Y, Malkesman O, Dagan M, Bercovich A, Lavi-Avnon Y, Schroeder M, et al. Anxiety-like behaviours in pre-pubertal rats of the flinders sensitive lines (FSL) and Wistar-Kyoto (WKY) animal models of depression. *Behav Brain Res* 2006;167:261–9.
- [9] Carrasco J, Márquez C, Nadal R, Tobeña A, Fernández-Teruel A, Armario A. Characterization of central and peripheral components of the hypothalamus–pituitary–adrenal axis in the inbred Roman rat strains. *Psychoneuroendocrinology* 2008;33:437–45.
- [10] Castanon N, Dulluc J, Le Moal M, Mormède P. Prolactin as a link between behavioural and immune differences between the Roman rat lines. *Physiol Behav* 1992;51:1235–41.

- [11] Castanon N, Pérez-Díaz F, Mormede P. Genetic analysis of the relationship between behavioral and neuroendocrine traits in Roman high and low avoidance rat lines. *Behav Genet* 1995;25:371–83.
- [12] Craft RM, Kostick ML, Rogers JA, White CL, Tsutsui KT. Forced swim test behavior in postpartum rats. *Pharmacol Biochem Behav* 2010;96:402–12.
- [13] Detke M, Rickels M, Lucki I. Active behaviors in the rat forced swimming test differentially activated by serotonergic and noradrenergic antidepressants. *Psychopharmacology (Berl)* 1995;121:66–72.
- [14] Driscoll P, Escorihuela RM, Fernández-Teruel A, Giorgi O, Schwegler H, Steimer TH, et al. Genetic selection and differential stress responses. *Ann NY Acad Sci* 1998;851:501–10.
- [15] Driscoll P, Fernández-Teruel A, Corda MG, Giorgi O, Steimer T. Some guidelines for defining personality differences in rats. In: Yong-Kyu K, editor. *Handbook of behavior genetics*. New York: Springer; 2009. p. 281–300.
- [16] Escorihuela RM, Fernández-Teruel A, Gil L, Aguilar R, Tobeña A, Driscoll P. Inbred Roman high- and low- avoidance rats: differences in anxiety, novelty-seeking, and shuttlebox behaviors. *Physiol Behav* 1999;67:19–26.
- [17] Escorihuela RM, Fernández-Teruel A, Zapata A, Núñez JF, Tobeña A. Flumazenil prevents the anxiolytic effects diazepam, alprazolam and adinazolam on the early acquisition of two-way active avoidance. *Pharmacol Res* 1993;28:53–8.
- [18] Escorihuela RM, Tobeña A, Driscoll P, Fernández-Teruel A. Effects of training, early handling, and perinatal flumazenil on shuttle box acquisition in Roman low-avoidance rats: toward overcoming a genetic deficit. *Neurosci Biobehav Rev* 1995;19:353–67.
- [19] Fernández-Teruel A, Escorihuela RM, Boix F, Tobeña A. Effects of different handling-stimulation procedures and benzodiazepines on two-way active avoidance acquisition in rats. *Pharmacol Res* 1991;24:273–82.
- [20] Fernández-Teruel A, Escorihuela RM, Gray JA, Aguilar R, Gil L, Giménez-Llort L, et al. A quantitative trait locus influencing anxiety in the laboratory rat. *Genome Res* 2002;12:618–26.
- [21] Fernández-Teruel A, Escorihuela RM, Núñez JF, Zapata A, Boix F, Salazar W, et al. The early acquisition of two-way (shuttle-box) avoidance as an anxiety-mediated behavior: psychopharmacological validation. *Brain Res Bull* 1991;26:173–6.
- [22] Fernández-Teruel A, Escorihuela RM, Tobeña A, Driscoll P. Stress and putative endogenous ligands for benzodiazepine receptors: the importance of characteristics of the aversive situation and of differential emotionality in experimental animals. *Experientia* 1991;47:1051–6.
- [23] Freeman ME, Kanyicska B, Lerant A, Nagy G. Prolactin: structure, function and regulation of secretion. *Physiol Rev* 2001;80:1523–631.
- [24] Gomez F, Lahmame A, de Kloet ER, Armario A. Hypothalamic–pituitary–adrenal response to chronic stress in five inbred rat strains: differential responses are mainly located at the adrenocortical level. *Neuroendocrinology* 1996;63:327–37.
- [25] Hansen C, Spuhler K. Development of the National Institutes of Health genetically heterogeneous stock. *Alcohol Clin Exp Res* 1984;8:477.
- [26] Johannesson M, López-Aumatell R, Stridh P, Diez M, Tuncel J, Blázquez G, et al. A resource for the simultaneous high-resolution mapping of multiple quantitative trait loci in rats: the NIH heterogeneous stock. *Genome Res* 2008;19:150–8.
- [27] Koolhaas JM, Bartolomucci A, Buwalda B, de Boer SF, Flügge G, Korte SM, et al. Stress revisited: a critical evaluation of the stress concept. *Neurosci Biobehav Rev* 2011;35:1291–2130.
- [28] Korte SM, Koolhaas JM, Wingfield JC, McEwen BS. The Darwinian concept of stress: benefits of allostasis and costs of allostatic load and the trade-offs in health and disease. *Neurosci Biobehav Rev* 2005;29:3–38.
- [29] Lahmame A, Grigoriadis DE, De Souza EB, Armario A. Brain corticotropin-releasing factor immunoreactivity and receptors in five inbred rat strains: relationship to forced swimming behaviour. *Brain Res* 1997;750:285–92.
- [30] Ledoux JE, Sakaguchi A, Reis DJ. Strain differences in fear between spontaneously hypertensive and normotensive rats. *Brain Res* 1983;277:137–43.
- [31] López-Aumatell R, Blázquez G, Gil L, Aguilar R, Cañete T, Giménez-Llort L, et al. The Roman high- and low-avoidance rat strains differ in fear-potentiated startle and classical aversive conditioning. *Psicothema* 2009;21:27–32.
- [32] López-Aumatell R, Guitart-Masip M, Vicens-Costa E, Giménez-Llort L, Valdar W, Johannesson M, et al. Fearfulness in a large N/Nih genetically heterogeneous rat stock: differential profiles of timidity and defensive flight in males and females. *Behav Brain Res* 2008;188:41–55.
- [33] López-Aumatell R, Vicens-Costa E, Guitart-Masip M, Martínez-Membrives M, Valdar W, Johannesson M, et al. Unlearned anxiety predicts learned fear: a comparison among heterogeneous rats and the Roman rat strains. *Behav Brain Res* 2009;202:92–101.
- [34] Malkesman O, Braw Y, Maayan R, Weizman A, Overstreet DH, Shabat-Simon M, et al. Two different putative genetic animal models of childhood depression. *Biol Psychiatry* 2006;59:17–23.
- [35] Malkesman O, Braw Y, Zagoory-Sharon O, Golan O, Lavi-Avnon Y, Schroeder M, et al. Reward and anxiety in genetic animal models of childhood depression. *Behav Brain Res* 2005;164:1–10.
- [36] Núñez JF, Ferré P, Escorihuela RM, Tobeña A, Fernández-Teruel A. Effects of handling of rats on emotional, HPA-Axis, and prolactin reactivity to novelty and conflict. *Physiol Behav* 1996;60:1355–9.
- [37] Núñez JF, Ferré P, García E, Escorihuela RM, Fernández-Teruel A, Tobeña A. Post-natal handling reduces emotionality ratings and accelerates two-way active avoidance in female rats. *Pharmacol Biochem Behav* 1995;51:199–203.
- [38] Onaka T, Takayanagi Y, Leng G. Metabolic and stress-related roles of prolactin-releasing peptide. *Trends Endocrinol Metab* 2010;21:287–93.
- [39] Pähkla R, Kask A, Rågo L. Differential effects of beta-carbolines and antidepressants on rat exploratory activity in the elevated zero-maze. *Pharmacol Biochem Behav* 2000;65:737–42.
- [40] Paré WP. Behavioral despair test predicts stress ulcer in WKY rats. *Physiol Behav* 1989;46:483–7.
- [41] Paré WP. Stress ulcer susceptibility and depression in wistar Kyoto (WKY) rats. *Physiol Behav* 1989;46:993–8.
- [42] Paré WP. The performance of WKY rats on three tests of emotional behaviour. *Physiol Behav* 1992;51:1051–6.
- [43] Paré WP. Open field, learned helplessness, conditioned defensive burying, and forced swim test in WKY rats. *Physiol Behav* 1994;55:433–9.
- [44] Paré WP, Redei E. Depressive behaviour and stress ulcer in Wistar-Kyoto rats. *J Physiol (Paris)* 1993;87:229–38.
- [45] Paré WP. Open-field, learned helplessness, conditioned defensive burying, and forced-swim tests in WKY rats. *Physiol Behav* 1994;55:433–9.
- [46] Piras G, Barbato A, Giorgi O, Corda M. Effects of antidepressants on the performance in the forced swim test of two psychogenetically selected lines of rats that differ in coping strategies to aversive conditions. *Psychopharmacology (Berl)* 2010;211:403–14.
- [47] Porsolt RD, Le Pichon M, Jalfre M. Depression: a new animal model to antidepressant treatments. *Nature* 1977;266:730–2.
- [48] Prunell M, Escorihuela RM, Fernández-Teruel A, Núñez JF, Tobeña A. Differential interactions between ethanol and Ro 15-4513 on two anxiety tests in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 1994;47:147–51.
- [49] Prunell M, Escorihuela RM, Fernández-Teruel A, Núñez JF, Tobeña A. Anxiolytic profiles of alprazolam and ethanol in the elevated plus-maze test and the early acquisition of shuttle-box avoidance. *Pharmacol Res* 1994;29:37–45.
- [50] Ratner A, Yelvington DB, Rosenthal M. Prolactin and corticosterone response to repeated footshock stress in male rats. *Psychoneuroendocrinology* 1989;14:393–6.
- [51] Redei E, Pare WP, Aird F, Klucynski J. Strain differences in hypothalamic–pituitary–adrenal activity and stress ulcer. *Am J Physiol* 1994;266:R353–60.
- [52] Ribeiro MF, Ferigolo M, Reis FM, Barros HM, Spritzer PM. Paradoxical effect of imipramine in hyperprolactinemic female rats exposed to the forced swimming test. *Physiol Behav* 2000;68:619–23.
- [53] Sabariego M, Gómez MJ, Morón I, Torres C, Fernández-Teruel A, Tobeña A, Cañete T, Martínez-Conejero JA, Horcajadas JA, Esteban FJ. Differential gene expression between inbred Roman high- (RHA-I) and low- (RLA-I) avoidance rats. *Neurosci Lett* 2011;504:265–70.
- [54] Servatius RJ, Ottenweller JE, Beldowicz D, Guo W, Zhu G, Natelson BH. Persistently exaggerated startle responses in rats treated with pyridostigmine bromide. *J Pharmacol Exp Ther* 1998;287:1020–8.
- [55] Shepherd JK, Grewal SS, Fletcher A, Bill DJ, Dourish CT. Behavioural and pharmacological characterisation of the elevated zero-maze as an animal model of anxiety. *Psychopharmacology (Berl)* 1994;116:56–64.
- [56] Solberg LC, Holl K, Tschannen M, Valdar W. Fine-mapping a locus for glucose tolerance using heterogeneous stock rats. *Physiol Genomics* 2010;41:102–8.
- [57] Solberg LC, Olson SL, Turek FW, Redei E. Altered hormone levels and circadian rhythm of activity in the WKY rat, a putative animal model of depression. *Am J Physiol-Reg I* 2001;281:R786–94.
- [58] Spuhler K, Dietrich RA. Correlative analysis of ethanol-related phenotypes in rat inbred strains. *Alcohol Clin Exp Res* 1984;8:480–4.
- [59] Steimer T, Driscoll P. Divergent stress responses and coping styles in psychogenetically selected Roman high-(RHA) and low-(RLA) avoidance rats: behavioral, neuroendocrine and developmental aspects. *Stress* 2003;6:87–100.
- [60] Steimer T, Driscoll P. Inter-individual vs line/strain differences in psychogenetically selected Roman High-(RHA) and Low-(RLA) avoidance rats: neuroendocrine and behavioural aspects. *Neurosci Biobehav Rev* 2005;29:99–112.
- [61] Steimer T, Escorihuela RM, Fernández-Teruel A, Driscoll A. Long-term behavioural and neuroendocrine changes in Roman High- (RHA/Verh) and Low-(RLA/verh) Avoidance rats following neonatal handling. *Int J Dev Neurosci* 1998;5:54–63.
- [62] Steimer T, la Fleur S, Schulz PE. Neuroendocrine correlates of emotional reactivity and coping in male rats from the Roman High (RHA/Verh)- and Low (RLA/Verh)-Avoidance lines. *Behav Genet* 1997;27:503–12.
- [63] Telner JJ, Merali Z, Singhal RL. Stress controllability and plasma prolactin levels in the rat. *Psychoneuroendocrinology* 1982;7:361–4.
- [64] Vicens-Costa E, Martínez-Membrives E, López-Aumatell R, Guitart-Masip M, Cañete T, Blázquez G, et al. Two-way avoidance acquisition is negatively related to conditioned freezing and positively associated with startle reactions: a dissection of anxiety and fear in genetically heterogeneous rats. *Physiol Behav* 2011;103:148–56.
- [65] Yelvington DB, Weiss GK, Ratner A. Effect of corticosterone on the prolactin response to psychological and physical stress in rats. *Life Sci* 1984;35:1705–11.
- [66] Yelvington DB, Weiss GK, Ratner A. Habituation of the prolactin response in rats to psychological stress. *Psychoneuroendocrinology* 1985;10:95–102.

..... Marta Palència Coll, amb el DNI/Passaport núm. 46984133-D
nascut/da el 06-10-1985 i amb domicili al carrer/plaça/avda. Carles III
....., núm. 51, pis i porta 3er. 1a
codi postal 08028, Població Barcelona, telèfon 651 30 06 34
e-mail m.palenciacoll@gmail.com

MANIFESTO QUE

I Com a COAUTOR NO DOCTOR, estic assabentat/da que el/la senyor/a Sra Dña Marian.....
vol demanar autorització a la Comissió de Doctorat de la Universitat Autònoma de Barcelona per a la
presentació de la seva tesi doctoral en forma de compendi de publicacions i que faig la renúncia com
a coautor a la presentació dels treballs com a part d'una altra tesi doctoral

II. Com a COAUTOR DOCTOR, estic assabentat/da que el/la senyor/a.....
vol demanar autorització a la Comissió de Doctorat de la Universitat Autònoma de Barcelona per a la
presentació de la seva tesi doctoral en forma de compendi de publicacions

I, a aquest efecte

FAIG CONSTAR

Que accepto que s'utilitzin el/els treballs:

Sra Díaz-Marcín, Marta Palència, Carme Martí-Gordina, Gui Carrete, Glòria
Blaquero, Esther Martínez-Humbres, Regina López-Sumata,
Abel Torres, Alberto Rincón-González (2012) Coping style and trust
in human responses in genetically heterogeneous sets: comparison with
the Rhesus monkey. Behav Brain Res, 225: 203-210.

(indiqueu tots i cadascun dels treballs en els que consteu com a coautor)

per a la presentació de la seva tesi doctoral a la Universitat Autònoma de Barcelona, en forma de
compendi de publicacions

Signatura



Sr. Delegat de la Rectora per al Doctorat

Bellaterra (Cerdanyola del Vallès), 10 de Gener de 2012

TES33

CARME MONT CARDONA....., amb el DNI/Passaport núm. 46977265-H
nascut/da el 07/08/1983 i amb domicili al carrer/plaça/avda. Gran Via de les
Glòries Catalanes....., núm. 389....., pis i porta 3^o 2^a
codi postal 08024....., Població BARCELONA....., telèfon 645 110 114
e-mail car.me@well.ox.ac.uk

MANIFESTO QUE

I Com a COAUTOR NO DOCTOR, estic assabentat/da que el/la senyor/a SIRA DÍAZ MORÁN
vol demanar autorització a la Comissió de Doctorat de la Universitat Autònoma de Barcelona per a la
presentació de la seva tesi doctoral en forma de compendi de publicacions i que faig la renúncia com
a coautor a la presentació dels treballs com a part d'una altra tesi doctoral

II. Com a COAUTOR DOCTOR, estic assabentat/da que el/la senyor/a.....
vol demanar autorització a la Comissió de Doctorat de la Universitat Autònoma de Barcelona per a la
presentació de la seva tesi doctoral en forma de compendi de publicacions

I, a aquest efecte

FAIG CONSTAR

Que accepto que s'utilitzin el/els treballs:

Díaz-Morán, S.; Palencia, M.; Mont, C.; Cañete, T.; Blázquez, G.; Martínez-Membrives E.; López-
Aumatell R.; Tobeña A. & Fernández-Teruel, A. (2011). Coping style and stress hormone responses
in genetically heterogeneous rats: comparison with the Roman rat strains. Behavioral Brain Research,
228 : 203-210.

(indiqueu tots i cadascun dels treballs en els que consteu com a coautor)

per a la presentació de la seva tesi doctoral a la Universitat Autònoma de Barcelona, en forma de
compendi de publicacions

Signatura



Sr. Delegat de la Rectora per al Doctorat

Bellaterra (Cerdanyola del Vallès),.....12..... de Gener..... de 2012

TES33

...GLORIA BLÁZQUEZ... KOREKO....., amb el DNI/Passaport n.º. ...41656900-A.
nascut/da el ...20/10/1980... i amb domicili al carrer/plaça/avda. ...MARNOV.....
....., n.º. ...25....., pis i porta ...2.º. 1.º
codi postal ...08905....., Població ...L'Esp. Falt. ...Urbegot....., telèfon ...626.83.9258,
e-mail ...gloria.blazquez@uab.cat...

MANIFESTO QUE

I Com a COAUTOR NO DOCTOR, estic assabentat/da que el/la senyor/a ...Sira Díaz Morán...
vol demanar autorització a la Comissió de Doctorat de la Universitat Autònoma de Barcelona per a la
presentació de la seva tesi doctoral en forma de compendi de publicacions i que faig la renúncia com
a coautor a la presentació dels treballs com a part d'una altra tesi doctoral

II. Com a COAUTOR DOCTOR, estic assabentat/da que el/la senyor/a.....
vol demanar autorització a la Comissió de Doctorat de la Universitat Autònoma de Barcelona per a la
presentació de la seva tesi doctoral en forma de compendi de publicacions

I, a aquest efecte

FAIG CONSTAR

Que accepto que s'utilitzin el/els treballs:

Sira Díaz-Morán, Marta Palència, Carme Mont-Cardona, Toni Cañete, Gloria Blázquez,
Esther Martínez-Membrives, Regina López-Aumatell, Adolf Tobeña, Alberto Fernández-
Teruel (2011) Coping style and stress hormone responses in genetically heterogeneous rats:
comparison with the Roman rat strains. Behavioral Brain Research, in press.

(indiqueu tots i cadascun dels treballs en els que consteu com a coautor)

per a la presentació de la seva tesi doctoral a la Universitat Autònoma de Barcelona, en forma de
compendi de publicacions

Signatura

Sr. Delegat de la Rectora per al Doctorat

Bellaterra (Cerdanyola del Vallès), ...20 de desembre..... de de 2011

TES33

Esther Martínez Membrives..., amb el DNI/Passaport n.º ... 52629900-N
nascut/da el 22.3.81 i amb domicili al carrer/plaça/avda. ... Girona 6
..., n.º ... 2 ... pis i porta 3 ...
codi postal 08940, Població Cornellà ..., telèfon 600493264
e-mail martinez_esther@hotmail.com

MANIFESTO QUE

I Com a COAUTOR NO DOCTOR, estic assabentat/da que el/la senyor/a Sira Díaz Morán
vol demanar autorització a la Comissió de Doctorat de la Universitat Autònoma de Barcelona per a la
presentació de la seva tesi doctoral en forma de compendi de publicacions i que faig la renúncia com
a coautor a la presentació dels treballs com a part d'una altra tesi doctoral

II. Com a COAUTOR DOCTOR, estic assabentat/da que el/la senyor/a.....
vol demanar autorització a la Comissió de Doctorat de la Universitat Autònoma de Barcelona per a la
presentació de la seva tesi doctoral en forma de compendi de publicacions

I, a aquest efecte

FAIG CONSTAR

Que accepto que s'utilitzin el/els treballs:

Sira Díaz-Morán, Marta Palència, Carme Mont-Cardona, Toni Cañete, Gloria Blázquez,
Esther Martínez-Membrives, Regina López-Aumatell, Adolf Tobeña, Alberto Fernández-
Teruel (2011) Coping style and stress hormone responses in genetically heterogeneous rats:
comparison with the Roman rat strains. Behavioral Brain Research, in press.

(indiqueu tots i cadascun dels treballs en els que consteu com a coautor)
per a la presentació de la seva tesi doctoral a la Universitat Autònoma de Barcelona, en forma de
compendi de publicacions

Signatura

Sr. Delegat de la Rectora per al Doctorat

Bellaterra (Cerdanyola del Vallès), 20 de Desembre de 2011

TES33

.....REGINA LOPEZ AUMATELL....., amb el DNI/Passaport núm. 47791952-E
nascut/da el 12/03/1981... i amb domicili al carrer/plaça/avda. COMTE
....., núm. 4....., pis i porta.....
codi postal 08560....., Població MANLLEV....., telèfon 654156307.....
e-mail regina.aumatell@gmail.com

MANIFESTO QUE

I Com a COAUTOR NO DOCTOR, estic assabentat/da que el/la senyor/a.....
vol demanar autorització a la Comissió de Doctorat de la Universitat Autònoma de Barcelona per a la
presentació de la seva tesi doctoral en forma de compendi de publicacions i que faig la renúncia com
a coautor a la presentació dels treballs com a part d'una altra tesi doctoral

II. Com a COAUTOR DOCTOR, estic assabentat/da que el/la senyor/a Sira Díaz-Morán.....
vol demanar autorització a la Comissió de Doctorat de la Universitat Autònoma de Barcelona per a la
presentació de la seva tesi doctoral en forma de compendi de publicacions

I, a aquest efecte

FAIG CONSTAR

Que accepto que s'utilitzin el/els treballs:

Sira Díaz-Morán, Marta Palència, Carme Mont-Cardona, Toni Cañete, Gloria Blázquez,
Esther Martínez-Membrives, Regina López-Aumatell, Adolf Tobeña, Alberto Fernández-
Teruel (2011) Coping style and stress hormone responses in genetically heterogeneous rats:
comparison with the Roman rat strains. Behavioral Brain Research, in press.

(indiqueu tots i cadascun dels treballs en els que consteu com a coautor)

per a la presentació de la seva tesi doctoral a la Universitat Autònoma de Barcelona, en forma de
compendi de publicacions

Signatura Regina Lopez

Sr. Delegat de la Rectora per al Doctorat

Bellaterra (Cerdanyola del Vallès), 15 de desembre de 2011

TES33

Melby Tobeña Palencia, amb el DNI/Passaport núm.
nascut/da el i amb domicili al carrer/plaça/avda.
....., núm., pis i porta
codi postal 08173 .., Població Sant Agustí del Vallès .., telèfon
e-mail melby.tobena@uab.cat ..

MANIFESTO QUE

I Com a COAUTOR NO DOCTOR, estic assabentat/da que el/la senyor/a
vol demanar autorització a la Comissió de Doctorat de la Universitat Autònoma de Barcelona per a la
presentació de la seva tesi doctoral en forma de compendi de publicacions i que faig la renúncia com
a coautor a la presentació dels treballs com a part d'una altra tesi doctoral

II. Com a COAUTOR DOCTOR, estic assabentat/da que el/la senyor/a Sra. Díaz Morán.....
vol demanar autorització a la Comissió de Doctorat de la Universitat Autònoma de Barcelona per a la
presentació de la seva tesi doctoral en forma de compendi de publicacions

I, a aquest efecte

FAIG CONSTAR

Que accepto que s'utilitzin el/els treballs:

.....
Díaz-Morán, S.; Palencia, M.; Mont, C.; Cañete, T.; Blázquez, G.; Martínez-Membrives E.; López-
Aumatell R.; Tobeña A. & Fernández-Teruel, A. (2011). Coping style and stress hormone responses
in genetically heterogeneous rats: comparison with the Roman rat strains. Behavioral Brain Research,
228 : 203-210.

(indiqueu tots i cadascun dels treballs en els que consteu com a coautor)
per a la presentació de la seva tesi doctoral a la Universitat Autònoma de Barcelona, en forma de
compendi de publicacions

Signatura



Sr. Delegat de la Rectora per al Doctorat

Bellaterra (Cerdanyola del Vallès), 27 de 27 de 20.12

TES33

Alberto Fernández Teruel, amb el DNI/Passaport n.º 39.157.272 E
nascut/da el 26/2/1961, i amb domicili al carrer/plaça/avda. C/ Fontetes, 27, Àbs. C,
n.º 27, pis i porta Àbs. C,
codi postal 08290, Població Cerdanyola del Vallès, telèfon 93.581.3456,
e-mail albertofernandezteruel@uab.es

MANIFESTO QUE

I Com a COAUTOR NO DOCTOR, estic assabentat/da que el/la senyor/a
vol demanar autorització a la Comissió de Doctorat de la Universitat Autònoma de Barcelona per a la
presentació de la seva tesi doctoral en forma de compendi de publicacions i que faig la renúncia com
a coautor a la presentació dels treballs com a part d'una altra tesi doctoral

II. Com a COAUTOR DOCTOR, estic assabentat/da que el/la senyor/a Sra. Díaz Morán
vol demanar autorització a la Comissió de Doctorat de la Universitat Autònoma de Barcelona per a la
presentació de la seva tesi doctoral en forma de compendi de publicacions

I, a aquest efecte

FAIG CONSTAR

Que accepto que s'utilitzin el/els treballs:

Díaz-Morán, S.; Palencia, M.; Mont, C.; Cañete, T.; Blázquez, G.; Martínez-Membrives E.; López-Aumatell R.; Tobeña A. & Fernández-Teruel, A. (2011). Coping style and stress hormone responses in genetically heterogeneous rats: comparison with the Roman rat strains. Behavioral Brain Research, 228 : 203-210.

(indiqueu tots i cadascun dels treballs en els que consteu com a coautor)

per a la presentació de la seva tesi doctoral a la Universitat Autònoma de Barcelona, en forma de compendi de publicacions

Signatura



Sr. Delegat de la Rectora per al Doctorat

Bellaterra (Cerdanyola del Vallès), 16 de Juny de 2012

TES33

Aplicabilidad del análisis de microarray en la detección de patrones de expresión genética diferencial en procesos psicológicos: expresión genética amigdalina en ratas N/Nih-HS extremas en ansiedad

Sira Díaz-Morán¹, Marta Palència¹, Toni Cañete¹, Gloria Blázquez¹, Ignacio Morón², Marta Sabariego³, Rocío Donaire³, Carmen Torres³, Carme Mont-Cardona¹, Esther Martínez-Membrives¹, Regina López-Aumatell⁴, Adolf Tobeña¹, Alberto Fernández-Teruel¹

¹Unidad de Psicología Médica, Departamento de Psiquiatría y de Medicina Legal, Instituto de Neurociencia, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Barcelona, 08193-Bellaterra, Barcelona, España.

²Departamento de Psicobiología, Facultad de Psicología, Instituto de Neurociencias F. Olóriz, Universidad de Granada, Granada, España.

³Departamento de Psicología, Universidad de Jaén, Jaén, España. ⁴Welcome Trust Centre for Human Genetics, Roosevelt Drive Oxford, UK.

Sira.Diaz@uab.cat

Resumen

En el presente trabajo se revisan las principales investigaciones sobre las bases genéticas del miedo, los trastornos de ansiedad y depresivos, así como de la susceptibilidad a las drogas, que han utilizado la técnica de microarray. Finalmente se presenta un resumen de algunos resultados preliminares, obtenidos por nuestro grupo de investigación, en el análisis de la expresión génica diferencial en ratas genéticamente heterogéneas (N/Nih-HS), seleccionadas por su alta/baja ansiedad, en función de su capacidad para la adquisición de la tarea de evitación activa en dos sentidos (en la *Shuttle-box*).

INTRODUCCIÓN

El descubrimiento del genoma completo marcó el inicio de una nueva era en la investigación sobre las bases funcionales de los sistemas biológicos, y permitió grandes avances en la comprensión del papel funcional de la expresión génica en situaciones conductuales complejas. Uno de los objetivos más importantes fue la identificación y localización de genes con expresión y funciones reguladoras en los mecanismos moleculares del comportamiento, de la emoción y los procesos cognitivos en diferentes especies (Mei et al., *Brain Res Bull* 2005, 67: 1-12; Wang et al., *Exp Brain Res* 2003, 149: 413-421).

Tradicionalmente, en modelos animales de ansiedad, para detectar expresión genética diferencial, se han aplicado una serie de "herramientas" como la hibridación "*in situ*" (Birzniece et al., *Neurosci Lett* 2002, 319: 157-161; Keck et al., *Neuropsychopharmacol* 2002, 26: 94-105), "*northern blot*" y "*reverse transcription-polymerase chain reaction*" (RT-PCR, Wang et al., *Exp Brain Res* 2003, 149: 413-421). Estos procedimientos analizan grupos pequeños de genes y, por este motivo, tienen rendimientos limitados (Lomax et al., *Hear Res* 2000, 147:293-302; Yoshikawa et al., *Biochem Biophys Res Commun* 2000, 275: 532-537). La técnica de análisis con microarray (finales siglo XX), inició el camino en la

investigación de los procesos moleculares subyacentes al procesamiento y almacenamiento de la información en el cerebro, a pesar de sus limitaciones (falsos positivos/negativos) (Irwin, *Mol Brain Res* 2001, 96: 163-169). Los primeros trabajos se centraron en la diferenciación de la expresión genética (análisis de *clusters*) de conjuntos de genes que podrían subyacer a cambios en alguna función macroscópica. Posteriormente, la investigación se focalizó en el estudio de expresión genética diferencial en condiciones experimentales (Dopazo, *OMIC* 2006, 10: 398-410). En la actualidad, se están desarrollando nuevos procedimientos inspirados en la biología de sistemas, focalizados en el estudio funcional de bloques/grupos de genes relacionados entre sí funcionalmente (Dopazo, *OMICS* 2006, 10: 398-410). El microarray ha mostrado ser un instrumento eficiente para el análisis de expresión de genes relacionados con los mecanismos moleculares subyacentes a los estados de ansiedad/miedo, puesto que permite el análisis en paralelo de miles de genes (Blohm & Guiseppi-Elie, *Curr Opin Biotechnol* 2001, 12: 41-47; Wang et al., *Exp Brain Res* 2003, 149: 413-421).

En el presente trabajo se revisan los principales estudios en los que se empleó el análisis de microarray para detectar diferencias de expresión genética en relación a comportamientos y procesos cognitivos/emocionales. Se muestran, además, resultados preliminares de una investigación en curso sobre las bases genéticas del miedo condicionado en ratas N/Nih-HS.

Análisis de microarray aplicado a la investigación de la depresión, el estrés y la susceptibilidad a las drogas de abuso

El eje hipotálamo-pituitario-adrenal (HPA) juega un papel importante en el estrés y en la patofisiología del trastorno depresivo (Andrus et al., *Mol Psychiatr* 2010, 1-13). En roedores, la administración repetida de corticosterona induce comportamientos/síntomas de tipo depresivo y psicótico (Patten, *J Psychosom Res* 2000, 49: 447-449; Zhao et al., *Eur J Pharmacol* 2008, 581: 113-120). La "Prednisolona" –PSL-, glucocorticoide sintético, también causa comportamiento ansioso-depresivo en ratones C57BL/6n y en ratas (González-Pérez et al., *J Rheumatol* 2001, 28: 2529-2534; Kajiyama et al., *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2010, 34: 159-165). Exposiciones prolongadas a niveles elevados de glucocorticoides, por administración exógena, por estrés crónico o como consecuencia de la depresión, causan daño neural en el hipocampo y alteraciones en la expresión génica en esta estructura (Brown et al., *Biol. Psychiatry* 2004, 55: 538-545; Kajiyama et al., *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2010, 34: 159-165).

El factor liberador de corticotropina (CRF) es clave en la respuesta de estrés y en la actividad del eje HPA. Exposiciones a estrés agudo incrementan la expresión genética de CRFR1 (receptor del CRF) a través de la vía MEK-ERK1/2 (proteína quinasa que activa el factor de transcripción nuclear –ERK-) en el córtex prefrontal (Meng et al., *Mol Cell Endocrinol* 2011, 342: 54-63).

En un estudio de estrés crónico, Kim y Han (Kim & Han, *J Neurosci Res* 2006, 83: 497-507) identificaron, en amígdala de ratones C57BL/6j, sub-expresión del gen relacionado con la hormona estimulante de la glándula tiroides (TSH) y de genes de factores de crecimiento, mientras que el gen de la hormona liberadora de la tirotrópina (TRH) se mostraba sobre-expresado.

Abuso de sustancias

En general, se asume que el consumo de sustancias de abuso se asume que resulta de la interacción entre predisposiciones genéticas y factores ambientales. Ratas que presentan más actividad locomotora durante una prueba conductual ("high responders", HR), también mostraron mayor conducta de auto-administración de psicoestimulantes que las ratas con menos conducta de locomotora ("low responders", LR, Kabbaj et al., *Psychopharmacology* (Berl) 2001, 158: 382-387). Estas diferencias conductuales, se acompañan de diferencias basales en la expresión genética de las vías moleculares de la circuitería emocional. También se ha identificado expresión diferencial de glucocorticoides en hipocampo, siendo más alta en las ratas LR (más inhibidas), y explicando la secreción diferencial de corticosterona en respuesta a estrés agudo (Kabbaj et al., *J. Neurosci* 2000, 20: 6983-6988).

Diversos estudios de expresión genética comparativa ponen de manifiesto los diferentes efectos de la exposición a un estrés psicosocial en función de la propensión al consumo de sustancias como el alcohol. Por ejemplo, se han identificado diferencias en la expresión de genes implicados en el ciclo celular (Ccn3 y Pctk1), en BDNF (promueve la locomoción y el efecto reforzante del consumo de drogas a partir del sistema dopaminérgico mesolímbico), CAM-KIIb, leptina y en genes relacionados con receptores de neurotransmisores como el ácido gamma-aminobutírico (GABA) y el glutamato, entre otros (Kabajj et al., *Neuropharmacology* 2004, 47: 111-122).

Asimismo, y a partir de estudios en los que se identificó sobre-regulación del gen Fkbp5 con administración repetida de morfina, se considera que este gen media los procesos de tolerancia y dependencia de dicha droga, (McClung et al., *J. Neurosci* 2005, 25: 6005-6015). Otros estudios han relacionado genes del complejo de histocompatibilidad tipo II (MHC), como Rt1.D β , Rt1.Ba y Rt1.B β , con la mediación de respuestas inmunes en el tratamiento con morfina en ratas (Beagle et al., *Mol Pharmacol* 2004, 65: 437-442). También se han identificado una serie de genes implicados en la regulación de la acción de la oxicodona (analgésico opioide agonista sintético), como son Fkbp5, Per2, Rt1.Da, Slc16a1 y Abcg2 (Hassan et al., *Drug Metab Dispos* 2010, 38: 157-167).

Análisis de microarray aplicado al estudio de los trastornos de ansiedad y al miedo

A principios del siglo XXI se empezaron a esclarecer las funciones de genes relacionados con la ansiedad. Se descubrió, por ejemplo, la implicación de la proteína microtubular asociada -MAP- en este trastorno, así como la de genes relacionados con neurotransmisores (GABA, serotonina, norepinefrina y dopamina), receptores de -5HT₃-, receptores de colecistoquinina y sistemas neuropéptidos (Wang et al., *Exp Brain Res* 2003, 149: 413-421).

Debido a la heterogeneidad de las respuestas/rasgos de ansiedad y miedo en diferentes cepas de ratas, un mismo comportamiento puede implicar (o estar asociado a) rutas génicas diferentes o estar asociado a ellas. Por ejemplo, se han descrito varios *QTLs* (o "Locus para Rasgos Cuantitativos", del inglés "*Quantitative Trait Loci*") en cromosoma 5 y 10 de rata, implicados en el comportamiento de adquisición de la tarea de evitación activa en dos sentidos (Fernández-Teruel et al., *Genome Res.* 2002, 12: 618-626), que no fueron correspondidos con resultados de estudios de microarray (Zhang et al., *Genes Brain Behav* 2005, 4: 99-109). Estos

autores concluyen que las pequeñas diferencias observadas en los genes *Veli1* y *SLC6A4*, *Ptpro*, *Ykt6p* y *Id3a* contribuirían de manera relevante, a lo largo del ciclo vital, a las diferencias en comportamiento ansioso. Sin embargo, estos genes no están contenidos en las *QTLs* arriba citadas, lo que puede deberse a las diferentes tecnologías utilizadas.

En otro estudio con otro modelo de ansiedad, se detectaron 54 genes con diferencias significativas entre las dos cepas de ratas estudiadas (16/sobre-expresados y 38/su-expresados). Las ratas menos ansiosas, las *Sprague-Dawley* (SD), presentaban sobre-expresión del gen asociado a la actividad reguladora de citoesqueleto (ARC) y del factor trófico NGFI-A, así como sub-expresión del gen *5HT3R*, en comparación con las ratas más ansiosas, la cepa PVG (Wang et al., *Exp Brain Res* 2003, 149: 413-421). Por otra parte, en modelos animales de Trastorno por Estrés Postraumático (TEPT) se identificaron 31 genes correspondientes a los cambios observados en las ratas con síntomas de TEPT, observándose sobre-expresión del gen receptor 5-HT_{2C} y la enzima "angiotensin I-converting enzyme" (Harada et al., *Pharmacol Biochem Behav* 2008, 89: 11-16).

Miedo condicionado

En el proceso de miedo condicionado están implicados cambios bioquímicos y estructurales en las sinapsis, que requieren alteraciones en la función y expresión genética (Ressler et al., *J. Neurosci* 2002, 22: 7892-7902). En la comparación de la expresión génica hipocámpica entre las ratas "*Syracusa*" de alta vs baja evitación, que difieren claramente en sus respuestas de miedo condicionado, se identificaron ocho genes candidatos (p. ej. *SLC6A4*, *Veli1*, *Ptpro*, *Id3a*, *CD74*) con implicación relevante en el comportamiento de miedo y ansioso-depresivo en ratas y humanos, como es el caso del gen *SLC6A4* (Zhang et al., *Genes Brain Behav* 2005, 4: 99-109).

Los genes *Synapogyrin1* y *Rab1b*, se hallaron expresados diferencialmente en hipocampo en estudios en los que los fenotipos valorados se relacionaban con diversos tipos de aprendizaje, entre ellos el miedo condicionado (Cavallaro et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2002, 99: 16279-16284; D'Agata & Cavallaro, *Eur. J. Neurosci.* 2003, 18: 2835-2841; Zhang et al., *Genes Brain Behav* 2005, 4: 99-109). Es preciso ser cautos en la interpretación de estos resultados, puesto que se han obtenido empleando ratas seleccionadas genéticamente, y algunas diferencias encontradas podrían deberse a esta selección previa. Además, otra dificultad añadida a la hora de interpretar los resultados de los estudios con microarray, es que algunos genes como *Veli1* tienen dos isoformas homólogas en el hipocampo, cada una con distribuciones diferentes (Misawa et al., *J Biol Chem* 2001, 276: 9264-9272; Peng et al., *BMC Bioinformatics* 2003, 4: 26).

Gran parte del conocimiento que se posee actualmente sobre la memoria emocional proviene de la investigación del condicionamiento clásico de miedo (Mei et al., *Brain Res Bull* 2005, 67: 1-12). Se considera que el condicionamiento de miedo contextual depende del hipocampo y amígdala, y el condicionamiento de miedo con claves sólo requiere de la amígdala (Rodrigues et al., *J. Neurosci* 2001, 21: 6889-6896). Varios estudios farmacológicos y genéticos, sugieren que la formación de asociaciones en la memoria del miedo (contextuales y de claves) requiere de la activación de receptores NMDA glutamérgicos (Sara, *Mem* 2000, 7: 73-84). Mei et al. (*Brain Res Bull* 2005, 67: 1-12) hallaron 222 genes, relacionados con el miedo condicionado, que presentaban expresión diferencial en amígdala (123/sobre-expresados y 99/sub-expresados). De ellos, el 22% presentó funciones

relacionadas con la adhesión celular y la estructura proteínica (por ejemplo: α -actina, β -tubulina y proteínas microtubulares asociadas -MAP4-). Varios genes regulados por la amígdala están involucrados en la regulación de receptores ionotrópicos, como el receptor GABA_A (GABARAP). La baja regulación de este receptor, hallada después de la tarea de miedo condicionado, sugiere que el efecto inhibitorio observado decrece para permitir un incremento en la excitabilidad sináptica. Otros receptores que también se han encontrado asociados al miedo aprendido en ratas son, por ejemplo, el complejo actina-actinina,-CaMKII-, que interactúa con el receptor antagonista AMPA -CNQX-, y la proteína fosfatasa A2 -PP2A-, que los puede desfosforilar. El gen relacionado con el "cromosoma X frágil" -FXR1- también se ha asociado al miedo aprendido (Paradee et al., Neuroscience 1999, 94: 185-192). Ratones mutantes knockout para este gen, muestran un déficit significativo en la formación de la memoria relacionada con el miedo condicionado.

Otros genes, como el "*astrocyte-specific connexin-30*" -Cx30-, relacionado con funciones gliales, pueden cambiar su expresión en respuesta al miedo condicionado (Rash et al., J Neurosci 2001, 21: 1983-2000). De modo parecido ocurre con genes implicados en la formación de mielina, como la "*myelin-associated oligodendrocytic basic protein*" -MOBP- (McCallion et al., Mol Cell Neurosci 1999, 13: 229-236), "*proteolipid protein*" -PLP- (Yool et al., J Neurosci Res 2001, 63: 151-164) y "*oligodendrocyte-specific protein*" -OSP- (Bronstein et al., Neurology 1996, 47: 772-778).

Por último, el gen activador del transcrito Egr-1 en rata, muestra incremento en sus niveles de expresión después de miedo condicionado. La administración de diazepam provoca el bloqueo de este incremento y la reducción de la ansiedad (Letwin et al., J Neurosci 2006, 26: 5277-5287).

Expresión genética amigdalар en ratas N/Nih-HS extremas en ansiedad

Estudios neuroanatómicos y de comportamiento, han demostrado que el complejo amigdalino y estructuras como el hipocampo son componentes esenciales en las vías neurales mediadoras de emociones como el miedo y la ansiedad, o de procesos cognitivos como el aprendizaje y la memoria (Blalock et al., J Neurosci 2003, 23: 3807-3819; Dent et al., Physiol Behav 2001, 73: 841-847).

Nuestros resultados previos, obtenidos en cepas de ratas seleccionadas genéticamente por sus respuestas extremas en ansiedad condicionada (en la evitación activa en dos sentidos; las cepas de RHA-I y RLA-I), mostraron diferencias en expresión genética central relacionada con ansiedad/frustración (Sabariego et al., Neurosci Lett 2011, 504: 265-270). Continuación lógica de dicho trabajo ha sido estudiar la expresión genética diferencial en amígdala e hipocampo en relación a diferentes niveles de ansiedad en ratas genéticamente heterogéneas N/Nih-HS.

Las ratas N/Nih-HS derivan del cruce de ocho cepas consanguíneas genéticamente alejadas entre sí (las MR/N, WN/N, WKY/N, M520/N, F344/N, ACI/N, BN/SsN y BUF/N) (Hansen & Spuhler, Alcohol Clin Exp Res 1984, 8: 477-9). Este stock de ratas genéticamente heterogéneas constituye un recurso genético único para el mapeo fino de *QTLs*, a intervalos cromosómicos muy reducidos, y de *QTGs* ("*Quantitative Trait Genes*"), como ya han mostrado estudios sobre parámetros óseos (Alam et al., Bone 2011, 48: 1169-1177), sobre repuestas/rasgos de ansiedad/miedo (Johannesson et al., Genome Res 2008, 19: 150-158) y sobre diabetes (Solberg et al., Physiol Genom 2010, 41: 102-108).

Las ratas N/Nih-HS muestran un perfil de comportamiento y hormonal “defensivo”, con rendimiento pobre en situaciones de conflicto como la evitación en la “shuttle-box”, elevado tiempo de *freezing* (miedo), estilo conductual ansioso-depresivo y elevadas respuestas hormonales al estrés (Díaz-Morán et al., Behav Brain Res. 2012, 228:203-10; López-Aumatell et al., Behav Brain Res 2008; 188: 41–55; López-Aumatell et al., Behav Brain Res 2009, 202: 92-101).

En el estudio que estamos completando actualmente, del que a continuación presentamos algunos resultados preliminares relevantes, se seleccionaron tres grupos de ratas N/Nih-HS por sus niveles –altos, intermedios o bajos- de ansiedad/miedo condicionado (respuestas de evitación en la tarea de la *Shuttle-box*). Todos los animales habían sido evaluados en pruebas de ansiedad incondicionada, como el Laberinto Circular Elevado, miedo condicionado a un contexto y ansiedad condicionada (tarea de evitación en la “*Shuttle-box*”). Tres semanas después de la evaluación conductual, se diseccionaron las amígdalas e hipocampos, y tras la extracción de ARN se analizaron mediante microarray.

Los resultados relativos a expresión génica en amígdala se hallan en una fase de análisis casi definitiva, a falta únicamente de la validación por RT-PCR de algunos genes relevantes. Podemos decir que se identificaron 414 genes con expresión diferencial significativa en amígdala ($FDR < 0.05$), 341 genes sobre-expresados (el grupo de ratas “Baja-ansiedad” presentaba mayor nivel de expresión genética que el grupo “Moderada/Alta-ansiedad”) y 73 genes sub-expresados (el grupo de ratas “Baja- ansiedad” presentaban menor nivel de expresión genética que el grupo “Moderada/Alta-ansiedad”). Del total de genes, 28 se relacionaban con funciones del sistema nervioso central (neurotransmisión, procesos inmunitarios, procesos hormonales, drogas de abuso y comportamiento), de los que 6 se presentaron sobre-expresados y 22 sub-expresados (*fold-change* $> |2|$, $FDR < 0.05$, ver algunos genes relevantes en **Tabla 1**).

La **Figura 1** representa un claro ejemplo de la relación entre los niveles de expresión de uno de estos genes y las respuestas de miedo condicionado (*freezing*/petrificación). Tal y como podemos observar en dicha figura, el gen receptor 3 de la taquinina (*Tacr3*), implicado en la respuesta hormonal ante estrés (Tabla 1), muestra niveles sub-expresados en amígdala en el grupo “Baja-Ansiedad” (menor nivel de expresión que el grupo “Moderada/Alta-ansiedad”). Además, cabe destacar que la regresión lineal muestra que los niveles de expresión de *Tacr3* predicen positivamente los niveles de “petrificación” o miedo condicionado (*Freezing*; Figura 1; correlación de *Pearson* $R=0.59$, modelo de regresión *stepwise* –pasos sucesivos-, $R^2 = 0.343$, $p = 0.028$).

A partir de estos resultados y de los análisis en curso en los hipocampos, de las diferencias de expresión génica encontradas entre estos dos grupos de ratas y la relación con las variables conductuales, podemos concluir: 1) las ratas N/Nih-HS son un buen modelo animal para el estudio de las bases neurogenéticas de los procesos psicológicos superiores; 2) los genes identificados con diferencias significativas de expresión, podrían ser buenos predictores de comportamientos relacionados con la ansiedad/miedo condicionado.

Por último, estos resultados preliminares (pero en apariencia suficientemente consistentes) sugieren que la aplicación del microarray en modelos animales en situaciones de ansiedad/miedo (condicionados o incondicionados) se perfila como una técnica analítica de relevante potencial para la detección de genes candidatos a influir (o estar asociados a) fenotipos complejos.

Tabla 1. Listado de genes sobre/sub-expresados en amígdala entre los extremos en ansiedad de las ratas N/Nih-HS: funciones relacionadas con el Sistema nervioso central.

Grupo "Baja-ansiedad" > Grupo "Moderada/Baja-ansiedad"	Nombre genes	Función
Pr15a2	<i>Prolactin family 5, subfamily a, member 2</i>	Regulación actividad hormonal (prolactina).
Duox2	<i>Dual oxidase 2</i>	Está implicado en el desarrollo y procesos metabólicos de la hormona tiroidea, así como en la reproducción sexual, en la morfogénesis de estructuras del sistema nervioso (diencefalo, glándula pituitaria, adenohipófisis, glándula tiroidea), así como del sistema endocrino y óseo.
Igfbp7	<i>Insulin-like growth factor binding protein 7</i>	Implicado en la respuesta a estímulos hormonales, regulación del crecimiento, respuesta a estimulación de corticoesteroides, cortisol, glucocorticoides y hormonas esteroideas. Está presente durante la gestación e implicado en la percepción de estímulos térmicos.
Grupo "Baja-ansiedad" < Grupo "Moderada/Alta-ansiedad"		
Pr14a1	<i>Prolactin family 4, subfamily a, member 1</i>	Regulación actividad hormonal (prolactina), papel mediador con las células "Natural Killer" durante la gestación. Función importante en la fisiología de la reproducción.
Slc6a14	<i>Solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter), member 14</i>	Es el miembro 14 (familia 6) del transportador de serotonina, implicado en el transporte de aminos, ácidos orgánicos, aminoácidos y neurotransmisores.
Tacr3	<i>Tachykinin receptor 3</i>	Está implicado en la regulación del sistema circulatorio, del comportamiento de ingesta, de la respuesta a estrógenos, estradiol y hormonas esteroideas, así como al consumo de cocaína y morfina, y participa en la regulación metabólica de la dopamina, así como en las vías de las proteínas G.
Ucn3	<i>Urocortin 3 (stresscopin)</i>	Está implicado en la activación y regulación AMPc, y en la regulación de: la secreción hormonal, de la respuesta a estímulos de hormonas esteroideas, glucocorticoides, mineralcorticoides, corticosterona e insulina. Así como también participa en procesos que involucren a la proteína G.

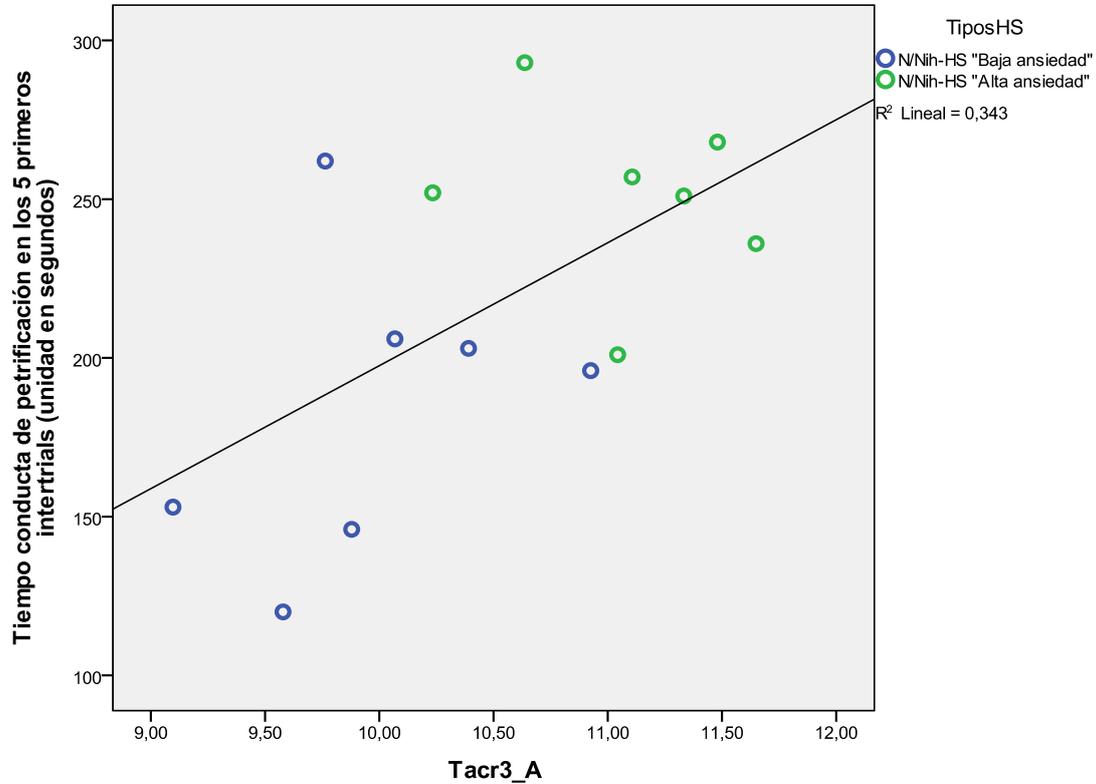


Figura 1. Relación entre los niveles de expresión genética (Tacr3) y conducta de miedo (*freezing*) en ratas N/Nih-HS, n = 14.

Agradecimientos

Los autores agradecen al Dr. F.J. Esteban su inestimable ayuda en la realización de este trabajo. Recibimos financiación del MICINN (SAF2009-10532), "Fundació La-Marató-TV3" (092630/31), 2009SGR-0051, y del consorcio EURATRANS (beca HEALTH-F4-2010-241504).

ANTONI CAÑETE RADIÓ....., amb el DNI/Passaport núm. 45472060
nascut/da el 10/10/1974 amb domicili al carrer/plaça/avda. C/ HOLLANDA.....
....., núm. 42....., pis i porta B.....
codi postal 08228....., Població TERRASSA....., telèfon 635 625 626
e-mail Antoni.Cañete@uab.cat.....

MANIFESTO QUE

I Com a COAUTOR NO DOCTOR, estic assabentat/da que el/la senyor/a.....
vol demanar autorització a la Comissió de Doctorat de la Universitat Autònoma de Barcelona per a la
presentació de la seva tesi doctoral en forma de compendi de publicacions i que faig la renúncia com
a coautor a la presentació dels treballs com a part d'una altra tesi doctoral

II. Com a COAUTOR DOCTOR, estic assabentat/da que el/la senyor/a SIRA DÍAZ MORÁN.....
vol demanar autorització a la Comissió de Doctorat de la Universitat Autònoma de Barcelona per a la
presentació de la seva tesi doctoral en forma de compendi de publicacions

I, a aquest efecte

FAIG CONSTAR

Que accepto que s'utilitzin el/els treballs:

Díaz-Morán, S.; Palència, M.; Cañete, T.; Blázquez, G.; Morón, I.; Sabariego, M.; Donaire, R.; Torres,
C.; Mont-Cardona, C.; Martínez-Membrives, E.; López-Aumatell, R.; Tobeña, A. & Fernández-Teruel,
A. (2011). Aplicabilidad del análisis de microarray en la detección de patrones de expresión genética
diferencial en procesos psicológicos: expresión genética amigdalар en ratas N/Nih-HS extremas en
ansiedad. Ini. Inv., 6: r2.

(indiqueu tots i cadascun dels treballs en els que consteu com a coautor)

per a la presentació de la seva tesi doctoral a la Universitat Autònoma de Barcelona, en forma de
compendi de publicacions

Signatura

Sr. Delegat de la Rectora per al Doctorat

Bellaterra (Cerdanyola del Vallès).....18..... de JUNY..... de 2012

**MODEL D'ACCEPTACIÓ DEL COAUTORS
(Doctors i no Doctors)**

.....
nascut/da el amb el DNI/Passaport núm.
i amb domicili al carrer/plaça/avda.
....., núm., pis i porta
codi postal Població telèfon
e-mail

MANIFESTO QUE

I Com a COAUTOR NO DOCTOR, estic assabentat/da que el/la senyor/a
vol demanar autorització a la Comissió de Doctorat de la Universitat Autònoma de Barcelona per a la
presentació de la seva tesi doctoral en forma de compendi de publicacions i que faig la renúncia com
a coautor a la presentació dels treballs com a part d'una altra tesi doctoral

II. Com a COAUTOR DOCTOR, estic assabentat/da que el/la senyor/a
vol demanar autorització a la Comissió de Doctorat de la Universitat Autònoma de Barcelona per a la
presentació de la seva tesi doctoral en forma de compendi de publicacions

I, a aquest efecte

FAIG CONSTAR

Que accepto que s'utilitzin el/els treballs:

.....
Díaz-Morán, S.; Palència, M.; Cañete, T.; Blázquez, G.; Morón, I.; Sabariego, M.; Donaire, R.; Torres,
C.; Mont-Cardona, C.; Martínez-Membrives, E.; López-Aumatell, R.; Tobeña, A. & Fernández-Teruel,
A. (2011). Aplicabilidad del análisis de microarray en la detección de patrones de expresión genética
diferencial en procesos psicológicos: expresión genética amigdalар en ratas N/Nih-HS extremas en
ansiedad. Ini. Inv., 6: r2.
.....

(indiqueu tots i cadascun dels treballs en els que consteu com a coautor)
per a la presentació de la seva tesi doctoral a la Universitat Autònoma de Barcelona, en forma de
compendi de publicacions

Signatura



Sr. Delegat de la Rectora per al Doctorat

Bellaterra (Cerdanyola del Vallès), de de 20..

TES33

Ignacio Morón Henche....., con el DNI/Passaport nº 44289892-B
nacido/a el 21/07/1975..... y con domicilio en Cijuela (Granada)
calle Transversal Luna, núm. 4, piso y puerta ..,
código postal..... 18339, ciudad y país Cijuela (Granada).....
telefono 656181001 ,e-mail imoron@ugr.es ...

MANIFIESTO QUE

I Como COAUTOR NO DOCTOR, estoy informado/a que el/la señor/a.....
quiere solicitar la autorizació a la Comisión de Doctorado de la Universitat Autònoma de Barcelona
para la presentación de su tesis doctoral en forma de compendio de publicaciones y que hago la
renuncia como coautor a la presentación de los trabajos como parte de otra tesis doctoral

II. Com a COAUTOR DOCTOR, estoy informado/a que el/la señor/a Sira Díaz Moran
quiere solicitar la autorizació a la Comisión de Doctorado de la Universitat Autònoma de Barcelona
para la presentación de su tesis doctoral en forma de compendio de publicaciones

Y, a este efecto

HAGO CONSTAR

Que acepto que se utilicen el/los trabajos:

.....
.. Díaz-Morán, S.; Palència, M.; Cañete, T.; Blázquez, G.; Morón, I.; Sabariego, M.; Donaire, R.;
Torres, C.; Mont-Cardona, C.; Martínez-Membrives, E.; López-Aumatell, R.; Tobeña, A. &
Fernández-Teruel, A. (2011). Aplicabilidad del análisis de microarray en la detección de patrones de
expresión genética diferencial en procesos psicológicos: expresión genética amigdalara en ratas N/Nih-
HS extremas en ansiedad. Ini. Inv., 6: r2.
.....
.....

(indicad todos y cada uno de los trabajos en los que consta como coautor)

para la presentación de su tesis doctoral en la Universitat Autònoma de Barcelona, en forma de
compendio de publicaciones

Firma



Sr. Delegado de la Rectora per al Doctorat

Bellaterra (Cerdanyola del Vallès),.....21.....de ...Junio.....
de 2012...

TES36

Marta Sabariego Almazán , con el DNI/Passaport nº 77374075F
nacido/a el 12/08/1986..... y con domicilio en Jaén
calle Avda de Madrid..... , núm. 43 , piso y puerta 4-1ºC...
código postal 23008..... , ciudad y país Jaén (España)
telefono 63473999..... , e-mail m.sabariegoalmazan@gmail.com.....

MANIFIESTO QUE

I Como COAUTOR NO DOCTOR, estoy informado/a que el/la señor/a Sira Díaz Morán
quiere solicitar la autorització a la Comisión de Doctorado de la Universitat Autònoma de Barcelona
para la presentación de su tesis doctoral en forma de compendio de publicaciones y que hago la
renuncia como coautor a la presentación de los trabajos como parte de otra tesis doctoral

II. Com a COAUTOR DOCTOR, estoy informado/a que el/la señor/a.....
quiere solicitar la autorització a la Comisión de Doctorado de la Universitat Autònoma de Barcelona
para la presentación de su tesis doctoral en forma de compendio de publicaciones

Y, a este efecto

TES36

HAGO CONSTAR

Que acepto que se utilicen el/los trabajo/s:

.....
.. Díaz-Morán, S.; Palència, M.; Cañete, T.; Blázquez, G.; Morón, I.; Sabariego, M.; Donaire, R.;
Torres, C.; Mont-Cardona, C.; Martínez-Membrives, E.; López-Aumatell, R.; Tobeña, A. &
Fernández-Teruel, A. (2011). Aplicabilidad del análisis de microarray en la detección de patrones de
expresión genética diferencial en procesos psicológicos: expresión genética amigdalар en ratas N/Nih-
HS extremas en ansiedad. Ini. Inv., 6: r2.
.....
.....

(Indicad todos y cada uno de los trabajos en los que consta como coautor)

para la presentación de su tesis doctoral en la Universitat Autònoma de Barcelona, en forma de
compendio de publicaciones

Firma



Sr. Delegado de la Rectora per al Doctorat

Bellaterra (Cerdanyola del Vallès),.....de de 20...

Rocío Donaire Cortés con el DNI/Passaport nº 77342808H.....
nacido/a el 26-11-1984 y con domicilio en Jaén
calle Avda. de Andalucía , núm.73 , piso y puerta 4ºB
código postal 23005..... , ciudad y país Jaén.....
telefono 635283707 , e-mail rdcortes84@gmail.com

MANIFIESTO QUE

I Como COAUTOR NO DOCTOR, estoy informado/a que el/la señor/a Sira Díaz Morán..... quiere solicitar la autorització a la Comisión de Doctorado de la Universitat Autònoma de Barcelona para la presentación de su tesis doctoral en forma de compendio de publicaciones y que hago la renuncia como coautor a la presentación de los trabajos como parte de otra tesis doctoral

II. Com a COAUTOR DOCTOR, estoy informado/a que el/la señor/a..... quiere solicitar la autorització a la Comisión de Doctorado de la Universitat Autònoma de Barcelona para la presentación de su tesis doctoral en forma de compendio de publicaciones

Y, a este efecto

TES36

HAGO CONSTAR

Que acepto que se utilicen el/los trabajo/s:

.....
.. Díaz-Morán, S.; Palència, M.; Cañete, T.; Blázquez, G.; Morón, I.; Sabariego, M.; Donaire, R.; Torres, C.; Mont-Cardona, C.; Martínez-Membrives, E.; López-Aumatell, R.; Tobeña, A. & Fernández-Teruel, A. (2011). Aplicabilidad del análisis de microarray en la detección de patrones de expresión genética diferencial en procesos psicológicos: expresión genética amigdalар en ratas N/Nih-HS extremas en ansiedad. Iní. Inv., 6: r2.
.....
.....

(indicad todos y cada uno de los trabajos en los que consta como coautor)
para la presentación de su tesis doctoral en la Universitat Autònoma de Barcelona, en forma de compendio de publicaciones

Firma



Sr. Delegado de la Rectora per al Doctorat

Bellaterra (Cerdanyola del Vallès),.....22.....deJunio..... de 2012...

Carmen Torres Bares....., con el DNI/Passaport nº 26003136A.....
nacido/a el 10/02/1967..... y con domicilio en Jaén
calle Avda. Andalucía....., núm. 1....., piso y puerta 2ºB.....,
código postal 23006....., ciudad y país Jaén, España.....
telefono 630 773487....., e-mail mctorres@ujaen.es.....

MANIFIESTO QUE

I Como COAUTOR NO DOCTOR, estoy informado/a que el/la señor/a Sira Díaz Morán..... quiere solicitar la autorització a la Comisión de Doctorado de la Universitat Autònoma de Barcelona para la presentación de su tesis doctoral en forma de compendio de publicaciones y que hago la renuncia como coautor a la presentación de los trabajos como parte de otra tesis doctoral

II. Com a COAUTOR DOCTOR, estoy informado/a que el/la señor/a Sira Díaz Morán..... quiere solicitar la autorització a la Comisión de Doctorado de la Universitat Autònoma de Barcelona para la presentación de su tesis doctoral en forma de compendio de publicaciones

Y, a este efecto

TES36

HAGO CONSTAR

Que acepto que se utilicen el/los trabajo/s:

.....
.. Díaz-Morán, S.; Palència, M.; Cañete, T.; Blázquez, G.; Morón, I.; Sabariego, M.; Donaire, R.; Torres, C.; Mont-Cardona, C.; Martínez-Membrives, E.; López-Aumatell, R.; Tobeña, A. & Fernández-Teruel, A. (2011). Aplicabilidad del análisis de microarray en la detección de patrones de expresión genética diferencial en procesos psicológicos: expresión genética amigdalara en ratas N/Nih-HS extremas en ansiedad. Ini. Inv., 6: r2.
.....
.....

(indicad todos y cada uno de los trabajos en los que consta como coautor)

para la presentación de su tesis doctoral en la Universitat Autònoma de Barcelona, en forma de compendio de publicaciones

Firma

Sr. Delegado de la Rectora per al Doctorat

Bellaterra (Cerdanyola del Vallès).....de..... de 20...

Carine Mont....., amb el DNI/Passaport núm. *46977265-11*
nascut/da el *7/8/1983* i amb domicili al carrer/plaça/avda.
....., núm., pis i porta
codi postal Població telèfon *645 110 714*.....
e-mail *carine.mont@uab.cat*

MANIFESTO QUE

I Com a COAUTOR NO DOCTOR, estic assabentat/da que el/la senyor/a
vol demanar autorització a la Comissió de Doctorat de la Universitat Autònoma de Barcelona per a la
presentació de la seva tesi doctoral en forma de compendi de publicacions i que faig la renúncia com
a coautor a la presentació dels treballs com a part d'una altra tesi doctoral

II. Com a COAUTOR DOCTOR, estic assabentat/da que el/la senyor/a.....
vol demanar autorització a la Comissió de Doctorat de la Universitat Autònoma de Barcelona per a la
presentació de la seva tesi doctoral en forma de compendi de publicacions

I, a aquest efecte

FAIG CONSTAR

Que accepto que s'utilitzin el/els treballs:

.....
Díaz-Morán, S.; Palència, M.; Cañete, T.; Blázquez, G.; Morón, I.; Sabariego, M.; Donaire, R.; Torres,
C.; Mont-Cardona, C.; Martínez-Membrives, E.; López-Aumatell, R.; Tobeña, A. & Fernández-Teruel,
A. (2011). Aplicabilidad del análisis de microarray en la detección de patrones de expresión genética
diferencial en procesos psicológicos: expresión genética amigdalар en ratas N/Nih-HS extremas en
ansiedad. Ini. Inv., 6: r2.
.....

(indiqueu tots i cadascun dels treballs en els que consteu com a coautor)

per a la presentació de la seva tesi doctoral a la Universitat Autònoma de Barcelona, en forma de
compendi de publicacions

Signatura

Sr. Delegat de la Rectora per al Doctorat

Bellaterra (Cerdanyola del Vallès).....*04*.....de *09*..... de 20*12*

Estic: Estic amb el DNI/Passaport núm. 52629900-N
nascut/da el 22-03-81 i amb domicili al carrer/plaça/avda. Granèria 6 2-3
núm. 6, pis i porta 2-3
codi postal 08940, Població Cornellà, telèfon 600493264
e-mail mariborja.estaes@uab.cat

MANIFESTO QUE

I Com a COAUTOR NO DOCTOR, estic assabentat/da que el/la senyor/a
vol demanar autorització a la Comissió de Doctorat de la Universitat Autònoma de Barcelona per a la
presentació de la seva tesi doctoral en forma de compendi de publicacions i que faig la renúncia com
a coautor a la presentació dels treballs com a part d'una altra tesi doctoral

II. Com a COAUTOR DOCTOR, estic assabentat/da que el/la senyor/a Sra. Dèz Morán
vol demanar autorització a la Comissió de Doctorat de la Universitat Autònoma de Barcelona per a la
presentació de la seva tesi doctoral en forma de compendi de publicacions

I, a aquest efecte

FAIG CONSTAR

Que accepto que s'utilitzin el/els treballs:

.....
Díaz-Morán, S.; Palència, M.; Cañete, T.; Blázquez, G.; Morón, I.; Sabariego, M.; Donaire, R.; Torres,
C.; Mont-Cardona, C.; Martínez-Membrives, E.; López-Aumatell, R.; Tobeña, A. & Fernández-Teruel,
A. (2011). Aplicabilidad del análisis de microarray en la detección de patrones de expresión genética
diferencial en procesos psicológicos: expresión genética amigdalina en ratas N/Nih-HS extremas en
ansiedad. *Ini. Inv.*, 6: r2.
.....

(Indiqueu tots i cadascun dels treballs en els que consteu com a coautor)

per a la presentació de la seva tesi doctoral a la Universitat Autònoma de Barcelona, en forma de
compendi de publicacions

Signatura

ESTIC

Sr. Delegat de la Rectora per al Doctorat

Bellaterra (Cerdanyola del Vallès), 03 de 29 de 2012

Regina Lopez Aumatell, amb el DNI/Passaport núm. 47791952-E
nascut/da el 12/03/1981..... i amb domicili al carrer/plaça/avda. Salvà,
....., núm. 35....., pis i porta 2n 1a.,
codi postal 08004....., Població Barcelona....., telèfon
654156307....., e-mail regina.aumatell@gmail.com.....

MANIFESTO QUE

I. Com a COAUTOR NO DOCTOR, estic assabentat/da que el/la senyor/a
vol demanar autorització a la Comissió de Doctorat de la Universitat Autònoma de Barcelona per a la
presentació de la seva tesi doctoral en forma de compendi de publicacions i que faig la renúncia com
a coautor a la presentació de's treballs com a part d'una altra tesi doctoral'

II. Com a COAUTOR DOCTOR, estic assabentat/da que el/la senyor/a Sira Diaz Moran
vol demanar autorització a la Comissió de Doctorat de la Universitat Autònoma de Barcelona per a la
presentació de la seva tesi doctoral en forma de compendi de publicacions

I, a aquest efecte

TESIS

FAIG CONSTAR

Que accepto que s'utilitzin els treballs:

.....
Díaz-Morán, S.; Palència, M.; Cañete, T.; Blázquez, G.; Mocón, J.; Sabariego, M.; Doñaire, R.; Torres,
C.; Mont-Cardona, C.; Martínez-Membrives, E.; López-Aumatell, R.; Toberña, A. & Fernández-Teruel,
A. (2011). Aplicabilidad del análisis de microarray en la detección de patrones de expresión genética
diferencial en procesos psicológicos: expresión genética amigdalar en ratas N/Nib-HS extremas en
ansiedad. In: Inv., 6: r2.

(indiqueu tots i cadascun dels treballs en els que consteu com a coautor)

per a la presentació de la seva tesi doctoral a la Universitat Autònoma de Barcelona, en forma de
compendi de publicacions

Signatura

Regina Lopez

Sr. Delegat de la Rectora per al Doctorat

Barcelona,.....13.....dejuliol..... de 2012...

..... Adolfo Tobeña Palencia, amb el DNI/Passaport núm.
nascut/da el i amb domicili al carrer/plaça/avda.
....., núm., pis i porta
codi postal 08173, Població Sant Cugat del Vallès, telèfon
e-mail adolfo.tobena@uab.cat

MANIFESTO QUE

I Com a COAUTOR NO DOCTOR, estic assabentat/da que el/la senyor/a
vol demanar autorització a la Comissió de Doctorat de la Universitat Autònoma de Barcelona per a la
presentació de la seva tesi doctoral en forma de compendi de publicacions i que faig la renúncia com
a coautor a la presentació dels treballs com a part d'una altra tesi doctoral

II. Com a COAUTOR DOCTOR, estic assabentat/da que el/la senyor/a Sra. D. M. H. M.
vol demanar autorització a la Comissió de Doctorat de la Universitat Autònoma de Barcelona per a la
presentació de la seva tesi doctoral en forma de compendi de publicacions

I, a aquest efecte

FAIG CONSTAR

Que accepto que s'utilitzin el/els treballs:

.....
Díaz-Morán, S.; Palència, M.; Cañete, T.; Blázquez, G.; Morón, I.; Sabariego, M.; Donaire, R.; Torres,
C.; Mont-Cardona, C.; Martínez-Membrives, E.; López-Aumatell, R.; Tobeña, A. & Fernández-Teruel,
A. (2011). Aplicabilidad del análisis de microarray en la detección de patrones de expresión genética
diferencial en procesos psicológicos: expresión genética amigdalар en ratas N/Nih-HS extremas en
ansiedad. *Iniciación a la Investigación*, 6: r2: 1-8.

(indiqueu tots i cadascun dels treballs en els que consteu com a coautor)
per a la presentació de la seva tesi doctoral a la Universitat Autònoma de Barcelona, en forma de
compendi de publicacions

Signatura

Sr. Delegat de la Rectora per al Doctorat

Bellaterra (Cerdanyola del Vallès), 03 de 09 de 20.12

TES33

..... ALBERTO FERNÁNDEZ TERUEL, amb el DNI/Passaport núm. 39157292E
nascut/da el 26-2-1961 i amb domicili al carrer/plaça/avda. C/ FONTETES, 27, ATIC, C
....., núm. 27, pis i porta ATIC, C
codi postal 08290, Població CERDANYOLA DEL VALLES, telèfon 93-5813456
e-mail albert.fernandez.teruel@uab.es

MANIFESTO QUE

I Com a COAUTOR NO DOCTOR, estic assabentat/da que el/la senyor/a
vol demanar autorització a la Comissió de Doctorat de la Universitat Autònoma de Barcelona per a la
presentació de la seva tesi doctoral en forma de compendi de publicacions i que faig la renúncia com
a coautor a la presentació dels treballs com a part d'una altra tesi doctoral

II. Com a COAUTOR DOCTOR, estic assabentat/da que el/la senyor/a SIRA DIAZ MORAN
vol demanar autorització a la Comissió de Doctorat de la Universitat Autònoma de Barcelona per a la
presentació de la seva tesi doctoral en forma de compendi de publicacions

I, a aquest efecte

FAIG CONSTAR

Que accepto que s'utilitzin el/els treballs:

.....
Díaz-Morán, S.; Palència, M.; Cañete, T.; Blázquez, G.; Morón, I.; Sabariego, M.; Donaire, R.; Torres,
C.; Mont-Cardona, C.; Martínez-Membrives, E.; López-Aumatell, R.; Tobeña, A. & Fernández-Teruel,
A. (2011). Aplicabilidad del análisis de microarray en la detección de patrones de expresión genética
diferencial en procesos psicológicos: expresión genética amigdalар en ratas N/Nih-HS extremas en
ansiedad. *Iniciación a la Investigación*, 6: r2: 1-8.
.....

(indiqueu tots i cadascun dels treballs en els que consteu com a coautor)

per a la presentació de la seva tesi doctoral a la Universitat Autònoma de Barcelona, en forma de
compendi de publicacions

Signatura



Sr. Delegat de la Rectora per al Doctorat

Bellaterra (Cerdanyola del Vallès), 26 de Juliol de 20.....

TES33

**TEMEROSIDAD EN RATAS HETEROGÉNEAS
(N/NIH-HS) Y ROMANAS (RHA/RLA): ESTUDIOS
HORMONALES Y DE EXPRESIÓN GÉNICA
DIFERENCIAL**

*Tesis Doctoral presentada por Sira Díaz Morán
para obtener el grado de Doctor*

Institut de Neurociències. Universitat Autònoma
de Barcelona, Barcelona, 2012