



2009, 15(1),67-84

ANSIEDAD EN RATAS GENÉTICAMENTE HETEROGÉNEAS: HACIA LA IDENTIFICACIÓN DE GENES PARA CARACTERES CONDUCTUALES CUANTITATIVOS

Regina López-Aumatell, Elia Vicens-Costa, Marc Guitart-Masip,
Esther Martínez-Membrives, William Valdar, Martina Johannesson, Toni Cañete,
Gloria Blázquez, Lydia Giménez-Llort, Jonathan Flint, Adolf Tobeña
y Alberto Fernández-Teruel

Universidad Autónoma de Barcelona
University of Oxford

Resumen: El uso de roedores genéticamente heterogéneos constituye una estrategia única para la identificación y el “mapeo fino” a alta resolución de locus genéticos (QTL) con influencia sobre fenotipos cuantitativos biológicos y conductuales, permitiendo la identificación de genes individuales (genes cuantitativos) con acción sobre aquéllos. Presentamos el primer estudio de este tipo con ratas genéticamente heterogéneas (N/Nih-HS; derivadas de ocho cepas de ratas consanguíneas), que se evalúan en varias pruebas conductuales que miden ansiedad/miedo no aprendidos (“Caja blanca/negra”, “Laberinto en ‘cero’ elevado”) o aprendidos (conducta de petrificación en contexto condicionado, adquisición de la evitación activa en dos sentidos en la caja de vaivén). Las ratas N/Nih-HS presentan una conducta más parecida a la de la cepa consanguínea RLA-I (ansiosas) que a la de la RHA-I (poco ansiosas). Se hallan correlaciones significativas entre variables incondicionadas de ansiedad y de la adquisición de la evitación activa en dos sentidos, confirmadas parcialmente por análisis de regresión múltiple. Las ratas N/Nih-HS relativamente “evitadoras” exhiben niveles más bajos de ansiedad no aprendida que las poco “evitadoras”. Los resultados de esta evaluación del comportamiento de las ratas N/Nih-HS son discutidos en términos de su potencial utilidad para la investigación neurogenética de la ansiedad y el miedo.

Palabras clave: Ratas genéticamente heterogéneas, ratas “Roman”, genética de la ansiedad, miedo incondicionado, miedo condicionado, perfiles defensivos.

Abstract: The use of genetically heterogeneous (outbred) rodents is a unique resource for the identification and fine mapping of genetic loci (QTL) influencing biological and behavioural quantitative phenotypes, allowing the identification of quantitative genes. We present the first study of this kind carried out with genetically heterogeneous rats (N/Nih-HS; derived from an eight-way cross of inbred strains), whose behaviour is assessed in tests evoking unlearned (Black/white box, Elevated “zero” maze) or learned (context conditioned freezing, two-way active avoidance acquisition in the shuttlebox) anxious/fearful responses. The behavioural profile of N/Nih-HS rats is more similar to that of RLA-I (anxious) rats rather than to RHA-I (low anxious) rats. Significant correlations are found among unconditioned anxiety variables and two-way active avoidance acquisition in the shuttlebox; these are partially confirmed by multiple regression analysis. “High avoider” N/Nih-HS rats show lower unlearned anxiety levels than “low avoiders”. Results of this behavioural assessment of the N/Nih-HS rats are discussed in terms of their potential usefulness for present and future neurobehavioural and genetic studies of fearfulness and anxiety.

Key words: Genetically heterogeneous rats, Roman rats, genetics of anxiety, unlearned fear, learned fear, defensive profiles.

Título: *Anxiety in genetically heterogeneous rats: towards the identification of quantitative genes for behavioural traits*

*Dirigir la correspondencia a:

Alberto Fernández-Teruel
Medical Psychology Unit, Department of Psychiatry & Forensic Medicine Institute of Neurosciences, School of Medicine, Autonomous University of Barcelona
08193-Bellaterra, Barcelona, Spain
E-mail: albert.fernandez.teruel@uab.es

© Copyright 2009: de los Editores de *Ansiedad y Estrés*

El uso de cepas consanguíneas (“Inbred”) de roedores (ratas y ratones) de laboratorio en las últimas tres décadas ha promovido un muy importante progreso en la investigación neurocientífica y en la neurogenética en particular. Sin embargo, la utilización de cepas no consanguíneas (“outbred”; o, genéticamente heterogéneas) ha contribuido y continúa contribuyendo enormemente a nuestro conocimiento sobre los mecanismos subyacentes a los rasgos y procesos psicobiológicos. A este respecto, una de las evidencias más importantes de la utilidad de los animales de laboratorio genéticamente heterogéneos en la investigación neurogenética viene dada por la demostración de que dichos stocks de roedores constituyen un recurso único para el “mapeo” fino y de alta resolución de “locus cromosómicos cuantitativos” (QTLs, “Quantitative Trait Loci”) que influyen en caracteres conductuales o biológicos complejos (y continuos). Así, en ratones genéticamente heterogéneos (llamados “HS”, procedentes del cruce de 8 cepas consanguíneas, y tras más de 50 generaciones de cruce), se ha conseguido el mapeo genético fino de diversos caracteres biológicos y conductuales cuantitativos, identificando gran cantidad de QTLs con influencia sobre dichos fenotipos y a intervalos cromosómicos de 1 centimorgan o menos. Cada uno de los diferentes QTLs suele explicar el 5% o menos de la varianza del rasgo fenotípico (e.g., Mott & Flint, 2002; Mott, Talbot, Turri, Collins, & Flint, 2000; Valdar, Solberg, Gauguier, Burnett et al., 2006), pero los reducidos intervalos cromosómicos (de ahí el nombre de “mapeo fino” o “fine mapping”) en los que se “mapean” permiten la identificación de genes (llamados “genes cuantitativos” o “QTL genes”) con influencia significativa sobre esos caracteres cuantitativos (ej. Yalcin et al., 2004), así como el análisis de las interacciones epistáticas (entre genes, o entre locus genéticos –QTLs-) y las inter-

acciones “locus genéticos X ambiente” (Valdar, Solberg, Gauguier, Cookson et al., 2006).

Los trabajos mencionados anteriormente, realizados con ratones HS, son los mejores ejemplos recientes de cómo y en qué medida el uso de roedores genéticamente heterogéneos se ha convertido en crucial para los estudios sobre los mecanismos genéticos de fenotipos cuantitativos complejos.

La ansiedad y el miedo se hallan entre tales rasgos/fenotipos complejos, y han despertado un gran interés científico en las últimas décadas. La susceptibilidad a la ansiedad, al miedo, al estrés y a los trastornos relacionados con ellos suponen un problema sanitario creciente (y con manifestaciones muy diversas) que, a pesar del intenso esfuerzo en su estudio desde diferentes perspectivas - psicológica, psicopatológica, neurobiológica - tanto en animales como en humanos, aún se resisten a la “disección” definitiva de sus mecanismos genéticos (p. ej. Cano-Vindel, Miguel-Tobal, González-Ordi, & Iruarrizaga-Díez, 2007; Eysenck & Eysenck, 2007; Fernández-Teruel et al., 2002a; Fullerton et al., 2003; González-Ramírez & Landero-Hernández, 2006; Leza, 2005; Scherrer et al., 2000; ver Willis-Owen & Flint, 2007 para revisión). En este sentido, la posibilidad de llevar a cabo estudios genéticos (y con alta resolución) de rasgos cuantitativos relacionados con la ansiedad o el miedo en ratas genéticamente heterogéneas puede dar lugar a avances muy significativos respecto a la identificación de locus (o QTLs), genes y/o procesos moleculares/fisiológicos (dependientes de dichos genes) reguladores de tales procesos o respuestas (ver por ejemplo, Flint, 2004; Willis-Owen & Flint 2007). La rata ha sido un organismo favorecido, con respecto al ratón de laboratorio, por su mayor validez translacional (validez a través de especies) en cuanto al análisis de procesos fisiológi-

cos y genéticos (Jacob & Kwitek, 2002). Los modelos de enfermedades que se han desarrollado en ratas tienen la ventaja, cuando se comparan con los modelos de ratón, de ser más fáciles de analizar debido al mayor tamaño de la rata. Así mismo, la rata ha sido objeto de estudios neuroanatómicos clásicos y electrofisiológicos, y ha sido clave para la comprensión de diversos procesos psico y neurobiológicos, entre ellos el aprendizaje y la memoria, y como modelo neuropsicológico de enfermedades mentales humanas (Weiss & Feldon, 2001).

Hansen y Spuhler (1984) desarrollaron un stock de ratas genéticamente heterogéneas (las ratas N/Nih-HS a partir de ahora; o “National Institutes of Health Genetically Heterogeneous Stock”), a través de un cruce de ocho cepas de ratas consanguíneas, tan separadas genéticamente como fue posible en ese momento (en función del conocimiento disponible sobre los ancestros de dichas cepas). Las ocho cepas parentales eran: la MR/N, la WN/N y la WKY/N (estas tres cepas remontan su ascendencia a la cepa Wistar original); la M520/N y la F344/N (ambas establecidas en los años 20, pero de origen desconocido); la ACI/N (híbrida entre las cepas “August” y “Copenhague”), la BN/SsN (derivada de una mutante del color de un stock de ratas salvajes mantenido en el instituto “Wistar”), y la cepa BUF/N (Hansen & Spuhler, 1984).

La caracterización inicial de las ratas N/Nih-HS demostró, a partir del estudio de 16 fenotipos relacionados con el consumo de alcohol y sensibilidad al etanol, que el programa de generación de un stock de ratas genéticamente heterogéneo había sido exitoso, puesto que en casi la totalidad de los rasgos (relacionados con consumo/efectos del etanol) los valores del stock de animales heterogéneo caían aproximadamente en medio de los valores altos y bajos de las ocho cepas parentales consan-

guíneas (Hansen & Spuhler, 1984; Spuhler & Deitrich, 1984). A partir de las ratas N/Nih-HS se han realizado, desde entonces, varios programas de selección psicogenética exitosos, dando lugar a líneas/cepas de ratas divergentes en base a sus valores extremos en, por ejemplo, sensibilidad al etanol agudo (Draski, Spuhler, Erwin, Baker, & Deitrich, 1992), capacidad aeróbica (Koch & Britton, 2001) y sensibilidad de los receptores serotoninérgicos 1A centrales (Overstreet, Rezvani, Pucilowski, Gause, & Janowsky, 1994). Sin embargo, las ratas heterogéneas N/Nih-HS no han sido hasta hoy caracterizadas en conductas, aprendidas o no, que reflejen ansiedad o miedo, así como tampoco respecto a otros tipos de fenotipos conductuales.

En el contexto de un amplio estudio sobre las bases genéticas de la ansiedad/temerosidad/miedo (esto es, un estudio de “mapeo” fino de QTLs para la ansiedad/miedo, que se halla en curso en el marco de un proyecto europeo; ver Aitman et al., 2008), nuestro laboratorio adquirió las ratas heterogéneas N/Nih-HS. El objetivo del proyecto es el “mapeo” fino de QTLs para la ansiedad/miedo/temerosidad en ratas, tomando como base nuestro anterior trabajo (Fernández-Teruel et al., 2002a), en el que por primera vez identificamos varios QTL para diferentes conductas de ansiedad/miedo en animales híbridos (generación F2) de las ratas Romanas de Alta Evitación (RHA-I, poco ansiosas) y Romanas de Baja Evitación (RLA, muy ansiosas) (ver Aguilar et al., 2002, 2003; Fernández-Teruel et al., 2002a). En dicho trabajo (Fernández-Teruel et al., 2002a) se estableció que un QTL (en un intervalo de unos 40 centimorgans; es decir, puede contener aún centenares de genes) en el cromosoma 5 de la rata era el que presentaba una influencia más significativa sobre diversos fenotipos del rasgo de ansiedad en la generación F2 de ratas citada, de tal ma-

nera que tanto conductas de ansiedad incondicionada (no aprendida) como de miedo aprendido eran influidas por dicho QTL. Es decir, nos hallamos ante un QTL con efectos pleiotrópicos sobre diversos fenotipos que pueden contribuir a un rasgo complejo (el QTL influye significativamente sobre la conducta de adquisición de la evitación activa en dos sentidos –mediada por la ansiedad, como se sabe (Fernández-Teruel, Escorihuela, Boix, & Tobeña, 1991)-, de condicionamiento clásico de miedo a un contexto y a un estímulo condicionado, y de exploración del “Campo Abierto” –Open Field- y de los brazos abiertos del laberinto en cruz elevado –Elevated Plus-Maze-; Fernández-Teruel et al., 2002a). Ello nos llevó a plantearnos, en el presente proyecto, el “mapeo fino” a alta resolución del mencionado QTL del cromosoma 5, con el objetivo de poder fragmentarlo en intervalos suficientemente reducidos como para que contengan un pequeño número de genes que influyan sobre los fenotipos de ansiedad/miedo que son objetivo del proyecto (de acuerdo con lo hallado en el proyecto anterior; Fernández-Teruel et al., 2002a).

Dado que las ratas heterogéneas N/Nih-HS no han sido caracterizadas por sus perfiles de ansiedad/miedo, y dadas las dificultades para obtener las 8 cepas parentales originales de las que se derivaron las N/Nih-HS (dos de dichas cepas ya no existen, y algunas de las otras no son las originales), nos planteamos compararlas con las mencionadas cepas RHA-I y RLA-I, psicogenéticamente seleccionadas (a partir de ratas Wistar) por su facilidad vs. extrema dificultad para la adquisición de la conducta de evitación activa en dos sentidos (ej. Driscoll & Bättig, 1982; Driscoll et al., 1998; Escorihuela et al. 1995, 1999; Fernández-Teruel, Escorihuela, Castellano, González, & Tobeña, 1997). La particularidad de las cepas RHA-I y RLA-I es que, como consecuencia de su selección psico-

genética y de la co-selección (aleatoria) de otros caracteres a través de décadas, también muestran respuestas muy divergentes (diferencias extremas, en ocasiones, según la variable que se mida) de ansiedad/miedo y de estrés. Así, las respuestas conductuales (condicionadas e incondicionadas) y neuroendocrinas de ansiedad/estrés de las ratas RHA son consistentemente inferiores a las de las RLA, como se ha demostrado en múltiples tests y/o tareas de laboratorio, tales como la respuesta de sobresalto (basal, sensibilizada y condicionada –o potenciada por miedo-), diversos tests de conflicto, pruebas de ansiedad incondicionada, procedimientos de frustración experimental, respuesta del eje hipotálamo-pituitario-adrenal, y otras (e.g., Aguilar, Gil, Tobeña, Escorihuela, & Fernández-Teruel, 2000; Carrasco et al., 2008; Driscoll et al., 1998; Driscoll, Fernández-Teruel, Corda, Giorgi, & Steimer, 2009; Escorihuela et al., 1997, 1999; Fernández-Teruel, Escorihuela, Driscoll, Tobeña, & Bättig, 1991; Fernández-Teruel, Escorihuela, Driscoll, Tobeña, & Bättig, 1992; Fernández-Teruel et al. 1992, 1997, 1998; Fernández-Teruel, Giménez-Llort et al., 2002; Ferré et al., 1995; López-Aumatell et al., 2008, 2009; Rosas et al., 2007; Schwegler et al., 1997; Steimer, LaFleur, & Schulz, 1997; Steimer & Driscoll, 2003; Gómez et al., 2008).

La batería de pruebas usada incluyó tres tests/tareas relacionadas con la ansiedad/miedo y validadas para la medida de tales procesos en ratas de laboratorio, como son la “Caja Blanca/Negra” (ej. Ramos & Mormede, 1998; Steimer & Driscoll, 2003) y el “laberinto en ‘cero’ elevado” (ej. Pähkla, Kask, & Rägo, 2000; Shepherd, Grewal, Fletcher, Bill, & Dourish 1994), como tests de ansiedad incondicionada, y la adquisición de la evitación activa en dos sentidos (en caja de vaivén, o “shuttlebox”) como tarea instrumental mediada por ansiedad/miedo condicionado (ej. Boix, Fernández-Teruel, & Tobeña, 1988;

Escorihuela, Fernández-Teruel, Zapata, Núñez, & Tobeña, 1993; Fernández-Teruel, Escorihuela, Boix et al., 1991; Fernández-Teruel, Escorihuela, Núñez et al. 1991; Fernández-Teruel, Escorihuela et al., 2002; Fernández-Teruel, Escorihuela, Tobeña, & Driscoll, 1991; Prunell, Escorihuela, Fernández-Teruel, Núñez, & Tobeña, 1994 a,b).

Método

Animales

Se han utilizado 143 ratas macho del stock de ratas N/Nih-HS (véase Hansen & Spuhler 1984; los progenitores nos fueron amablemente proporcionados por la Dra. Eva Redei, Center for Comparative Medicine, Northwestern University, Chicago, USA). Se utilizaron también 37 ratas macho RHA-I y RLA-I (n= 18-19 por cepa) de la misma edad, procedentes de nuestra colonia del laboratorio de Barcelona (UAB). Los animales tenían aproximadamente 4 meses de edad al inicio de los experimentos (peso: 350-400 g). Fueron estabulados en jaulas del macrolon (50 x 25 x 14 centímetros) y en parejas del mismo sexo, y mantenidos con libre acceso a comida (pienso estándar, Panlab) y agua, bajo condiciones de temperatura controlada ($22\pm 2^\circ$ C) y de un ciclo luz-oscuridad controlado de 12 h (encendido en 08:00 h). Los grupos de ratas RHA-I y de RLA-I se componían de ratas de 7 familias diferentes por lo menos, mientras que el grupo de ratas N/Nih-HS procedía de 40 familias diferentes.

Aparatos y procedimiento

Los experimentos fueron realizados durante la fase de luz del ciclo, entre las 09:00 y 19:00 h, y de acuerdo con la legislación española sobre la "Protección de los animales usados para propósitos científicos y experimentales" y la directiva del Consejo de la Comunidad Europea (86/609/EEC) sobre este tema. Se administraron tres pruebas o

tareas comportamentales a lo largo de un período aproximado de 2 meses, con un intervalo de unas 2-3 semanas entre cada dos pruebas consecutivas. Los grupos de ratas RHA-I y RLA-I fueron intercalados en los diferentes tests de comportamiento, de la manera más contrabalanceada posible (por día y por horario), entre las ratas del grupo N/Nih-HS. La secuencia y las características de las pruebas fueron como sigue:

Caja Blanca-Negra (CBN).

Caja de dos compartimientos (Panlab, Barcelona, España), consistente en un compartimiento negro y oscuro (27x18x27 centímetro) y un compartimiento blanco (27x27x27 centímetro). Este último estaba iluminado por un débil bulbo rojo de 40 W colocado a 35 centímetros de altura sobre el suelo. Ambos compartimientos estaban separados por una pared (47 centímetros de alto) con una abertura en su base (7x7 centímetros) a modo de puerta, a través de la cual la rata puede cambiar libremente de compartimiento. El aparato se situaba en una habitación pintada de negro e iluminada con la luz fluorescente roja (60 W) situada en el techo. La conducta de cada animal se filmó con una cámara de vídeo desde el exterior de la habitación experimental. Cada animal fue individualmente colocado en el compartimiento negro mirando frente a la pared del mismo. Durante 5 minutos se midió, para cada rata, la latencia (en segundos) de salida del compartimiento negro (BWB-LAT), el tiempo pasado en el compartimiento blanco (BWB-T), el número de entradas en el compartimiento blanco (BWB-E) y el número de posturas de "evaluación del riesgo" (BWB-SAP; postura de estiramiento de la cabeza y mitad anterior del cuerpo hacia el compartimiento blanco, pero sin llegar a entrar en él completamente) (e.g., Ramos & Mormede, 1998; Steimer & Driscoll, 2003).

“Laberinto elevado en ‘cero’ ” (LC)

El laberinto, similar al descrito por Shepherd et al. (1994), consiste en una plataforma anular (diámetro de 105 centímetros; anchura de 10 centímetros) hecha de madera negra y elevada a 65 centímetros sobre el nivel del suelo. Tiene dos secciones (cuadrantes) abiertas y otras dos (de idéntica superficie) flanqueadas paredes de una altura de 40 centímetros. Para el test, cada rata fue situada en una de las secciones protegidas por paredes (mirando hacia ellas). El aparato se hallaba situado en una sala experimental pintada de negro, la misma que para la prueba anterior, con condiciones de iluminación y de grabación de la conducta de los animales también idénticas. Para cada rata se midieron, durante 5 minutos, la latencia (en segundos) de entrada en una sección abierta (LC-LAT), tiempo pasado en las secciones abiertas (LC-T), número de entradas en las secciones abiertas (LC-E), el número de posturas de “evaluación del riesgo” (LC-PER, ver arriba), tiempo pasado en postura de evaluación de riesgo (LC-TPER) y porcentaje de tiempo pasado en zonas abiertas (LC-%T: se calcula teniendo en cuenta y descontando el tiempo que el sujeto ha pasado haciendo posturas de evaluación de riesgo; de acuerdo a la fórmula $LC\%T = [\text{tiempo en secciones abiertas} / (300 - \text{tiempo pasado en posturas de evolución de riesgo})] \times 100$). (Ej. Pähkla et al., 2000; Shepherd et al., 1994).

Adquisición de la evitación activa en dos sentidos en la “shuttlebox” (SH)

El experimento fue realizado con tres “shuttleboxes” (cajas de lanzadera o de vaivén) idénticas (Letica, Panlab, Barcelona, España), cada una colocada dentro de una caja de insonorización de madera. Un bulbo fluorescente colocado detrás de la pared opaca de los shuttleboxes proporcionaba iluminación débil y difusa a cada caja. La sala experimental se mantuvo oscura.

Cada shuttlebox se compone de dos compartimientos idénticos (25x25x28 cm), conectados por una abertura (8x10 cm). El estímulo condicionado (EC) fue un tono de 2400-Hz y 63-dB más una luz (de una pequeña lámpara de 7-W). El estímulo incondicionado (EI), que se iniciaba al finalizar el EC, consistió en una descarga eléctrica (con “scrambler”) de 0.7 mA a través de la reja de acero. Una vez que las ratas eran (individualmente) colocadas en la shuttlebox se iniciaba un periodo de familiarización a la caja de 4 minutos de duración. Tras ese periodo de 4 minutos se iniciaba la sesión de evitación activa en dos sentidos de 40 ensayos. Cada ensayo de entrenamiento consistió en un EC de 10 s, seguido por el EI (choque eléctrico) de duración máxima de 20 s. El EC o el EI finalizaban cuando la rata cruzaba al compartimiento opuesto, considerándose una respuesta de evitación cuando el cruce se producía en presencia del EC y una respuesta de escape cuando se producía en presencia del EI. Una vez producido un cruce (evitación o escape) al compartimiento opuesto se iniciaba un intervalo de descanso (intervalo entre ensayos) de 1 minuto. El entrenamiento consistió en una sola sesión de 40 ensayos.

Las variables registradas fueron el número total de evitaciones (SH-EV40), así como el número de evitaciones acumuladas en diferentes bloques de ensayos (ej. evitaciones a los 10 ensayos y a los 20 ensayos), el número de cruces durante el intervalo entre ensayos (SH-C40) y la latencia (en segundos) media de respuesta para toda la sesión de entrenamiento (SH-LAT40) (véase a Aguilar et al., 2002; Fernández-Teruel, Escorihuela, Boix et al., 1991; Fernández-Teruel, Escorihuela, Núñez et al., 1991; Fernández-Teruel, Escorihuela, Tobeña et al. 1991).

Análisis estadístico

Para los diferentes análisis se han utilizado el coeficiente de correlación de Pearson y la regresión múltiple (paso a paso, “Step wise”), así como ANOVAs de un factor (tres grupos experimentales) seguidos de pruebas de Duncan para comparaciones múltiples y pruebas “t” de Student para grupos independientes. Las pruebas “t” de Student se aplicaron tanto para los análisis de comparación entre dos grupos extremos (sujetos seleccionados por tener valores de una desviación estándar por encima o por debajo de la media del grupo N/Nih-HS para una determinada variable) como para comparación directa entre los grupos RHA-I y RLA-I, puesto que existen hipótesis claras sobre la dirección de las diferencias esperables entre ambas cepas de ratas (las RHA-I se espera que sean menos ansiosas que las RLA-I, en función de toda la literatura previa; ver “Introducción”).

Resultados

La Tabla 1 muestra los descriptivos de los valores de las ratas N/Nih-HS en las variables más relevantes de los diferentes tests de ansiedad.

En la Figura 1A-C se observa que las ratas RLA-I presentan mayor ansiedad incondicionada que las RHA-I en el test LC, representada por diferencias significativas en las variables de ansiedad “entradas en secciones abiertas” [ANOVA $F(2,170)=3.2$ $p<.01$; $p<.05$, tests de Duncan entre RHA-I y los otros dos grupos] y “tiempo pasado en secciones abiertas” [$t(35)=2.2$ $p=.03$ entre RHA-I y RLA-I], así como en la “latencia de la primera entrada a una sección abierta” (en esta variable el ANOVA no fue significativo, pero sí lo fue la prueba de “Chi cuadrado”, pues el % de animales que salieron a una sección abierta en menos de 30 segundos fue mayor en el grupo RHA-I que

Tabla 1. Descriptivos de las variables conductuales en los diferentes tests de ansiedad en las ratas N/Nih-HS (n=143)

	Mean ± SEM
Caja Blanca-Negra	
Latencia de entrada en el compartimiento blanco (s)	133.3 ± 9.9
# Entradas en compartimiento blanco	2.3 ± 0.2
Tiempo pasado en el compartimiento blanco (s)	36.2 ± 3.5
# Posturas de evaluación del riesgo	5.5 ± 0.2
Laberinto Elevado en "Cero"	
Latencia de entrada en una sección abierta (s)	74.9 ± 8.9
# Entradas en secciones abiertas	4.3 ± 0.3
Tiempo pasado en secciones abiertas (s)	61.8 ± 4.6
# Posturas de evaluación del riesgo	7.7 ± 0.3
Tiempo de posturas de evaluación del riesgo (s)	35.8 ± 1.6
% Tiempo en secciones abiertas	23.6 ± 1.7
Adquisición de la evitación activa en dos sentidos en la Shuttlebox	
Latencia media de respuesta (s)	11.7 ± 0.3
# Evitaciones 10 ensayos	0.2 ± 0
# Evitaciones 20 ensayos	1.6 ± 0.2
# Evitaciones 40 ensayos	7.9 ± 0.6
# Cruces entre ensayos	23.1 ± 1.5
Conducta de petrificación (<i>Freezing</i>) primeros 5 intervalos entre ensayos (s)	216.2 ± 6.2

en las RLA-I; $-\text{Chi}=8.99$ $p=.011$). Los valores del grupo N/Nih-HS en esas tres variables se situaron entre los de las ratas RHA-I y RLA-I, siendo significativamente diferentes respecto al grupo RHA-I sólo en la variable “entradas en secciones abiertas” ($p<.05$, test de Duncan; Fig. 1A).

La Figura 1D-F muestra la correspondiente comparación entre los tres grupos de

ratas en las variables relevantes de la prueba de adquisición activa en dos sentidos. Como se esperaba, las ratas RHA-I mostraron diferencias muy marcadas respecto a las RLA-I. Así, el grupo RHA-I realizó más respuestas de evitación (Fig. 1D), menor latencia media de respuesta (Fig. 1E) y mucho menos tiempo de conducta condicionada (por miedo) de petrificación

Tabla 2. Correlaciones entre las variables de los diferentes tests de ansiedad (A) y regresión múltiple para las variables de “evitación” (B) en las ratas N/Nih-HS (n=143)

A) Correlaciones

	CBN-E	CBN-T	CBN-PER	LC-E	LC-T	LC-% T	LC-PER	LC-T PER	SH-EV 10	SH-EV 20	SH-EV 40	SH-LAT	SH-C	SH-PETR
CBN-E	1													
CBN-T	.70***	1												
CBN-PER	.52***	.14	1											
LC-E	.51***	.43***	.30***	1										
LC-T	.45***	.41***	.26**	.83***	1									
LC-% T	.45***	.40***	.29***	.86***	.99***	1								
LC-PER	.17*	.08	.29***	.52***	.29***	.36***	1							
LC-T PER	.02	-.07	.32***	.22**	.06	.15	.74***	1						
SH-EV10	.15	.01	-.01	.23**	.21**	.21**	.05	-.09	1					
SH-EV20	.16	.09	.04	.23***	.18*	.18*	.07	-.06	.47***	1				
SH-EV40	.16	.07	.03	.16	.15	.13	-.05	-.19*	.31***	.78***	1			
SH-LAT	-.13	-.02	-.01	-.15	-.13	-.12	.08	.14	-.24**	-.62***	-.73***	1		
SH-C	.17*	.08	-.02	.15	.13	.11	-.08	-.19*	.30***	.72***	.74***	-.65***	1	
SH-PETR (#)	-.11	-.24	.11	.02	-.16	-.15	.05	.06	.02	-.38**	-.43**	.44**	-.46**	1

Nota. Correlaciones entre las variables de los diferentes tests de ansiedad en las ratas N/Nih-HS (n=143). CBN-E, entradas (n) en la Caja Blanca-Negra; CBN-T, tiempo pasado (s) en el compartimento blanco; CNB-PER posturas de evaluación del riesgo (n); LC-E, entradas en las secciones abiertas (n) en el Laberinto Elevado en “Cero”; LC-T, tiempo pasado (s) en las secciones abiertas; LC-%, porcentaje de tiempo pasado en las secciones abiertas (ver modo de cálculo de esta variable en el apartado “2. Material y Métodos. Laberinto Elevado en Cero”); LC-PER, posturas de evaluación del riesgo (n); SH-EV10, evitaciones a los 10 ensayos (n); SH-EV20, evitaciones a los 20 ensayos (n); SH-EV40, evitaciones a los 40 ensayos (n); SH-LAT, latencia media de respuesta en la shuttlebox (s); SH-C cruces entre ensayos; SH-PETR, conducta de petrificación (s).

* $p\leq.05$, ** $p\leq.01$, *** $p\leq.001$, Coeficiente de correlación de Pearson. Se destacan en negrita las correlaciones $> .25$ y enmarcadas en un recuadro, las correlaciones más relevantes entre variables del LC (ansiedad espontánea) y la sesión de SH (ansiedad condicionada). (#) Para la conducta de petrificación (SH-PETR) n=46.

B) Regresión múltiple (stepwise).

Variable dependiente	Paso	Variable predictora	R acumulada	$p\leq$
# Evitaciones a los 10 ensayos	1	# Entradas en las secciones abiertas en el Laberinto Elevado en “Cero”	.26	.01
# Evitaciones a los 20 ensayos	1	# Entradas en las secciones abiertas en el Laberinto Elevado en “Cero”	.22	.01
# Evitaciones a los 40 ensayos	1	# Posturas de evaluación del riesgo en el Laberinto Elevado en “Cero”	.2	.02
	2	# Entradas en las secciones abiertas del Laberinto Elevado en “Cero”	.29	.01

Nota. Análisis de regresión múltiple (stepwise) para las variables de los tests incondicionados y de evitación (parciales y totales) en las ratas N/Nih-HS (n=143).

freezing; Fig. 1F) en los primeros 5 intervalos entre ensayos. Todo ello fue reflejado por ANOVAs muy significativos (ver más abajo), observándose a su vez que, comparadas con las ratas RHA-I, las ratas N/Nih-HS muestran menor número de evitaciones [F(2,170)=26.5 $p < .001$; $p < .05$ test de Duncan; Fig. 1D], mayor latencia media de respuesta [[F(2,170)=16.9 $p < .001$; $p < .05$ test de Duncan; Fig. 1E] y niveles superiores de conducta de petrificación condicionada al contexto [F(2,63)=55.3 $p < .001$; $p < .05$ test de Duncan; Fig. 1F]. En cambio, las ratas N/Nih-HS sólo se diferencian de las RLA-I en la latencia media de respuesta (ANOVA citado arriba para Fig. 1E).

En la Figura 2A-B se presentan las diferencias que se producen entre ratas N/Nih-HS agrupadas por sus valores extremos (media + 1 desviación estándar) en la variable “evitaciones totales” en la sesión de adquisición de evitación activa en dos sentidos. Se observa que las ratas N/Nih-HS relativamente buenas “evitadoras” son las menos ansiosas, pues muestran un mayor “% de tiempo transcurrido en las secciones abiertas del LC” [t(50) = 2.5 $p < .03$; Fig. 2A] y menor tiempo de petrificación condicionada al contexto [t(20) = 2.09 $p = .05$; Fig. 2B].

El análisis correspondiente seleccionando grupos de ratas N/Nih-HS con valores extremos en “% de tiempo pasado en secciones abiertas del LC” (con los mismos criterios de arriba (ver leyenda de Figura 2C-D), muestra que las ratas menos ansiosas, es decir, aquellas que pasaron un mayor porcentaje de tiempo en las secciones abiertas del test, son también las que más respuestas de evitación realizan, en especial durante los 10 [t(87) = 3.0 $p = .004$; Fig. 2C].

La Tabla 2A muestra los patrones de correlaciones entre variables de los diferentes tests en la muestra de ratas N/Nih-HS.

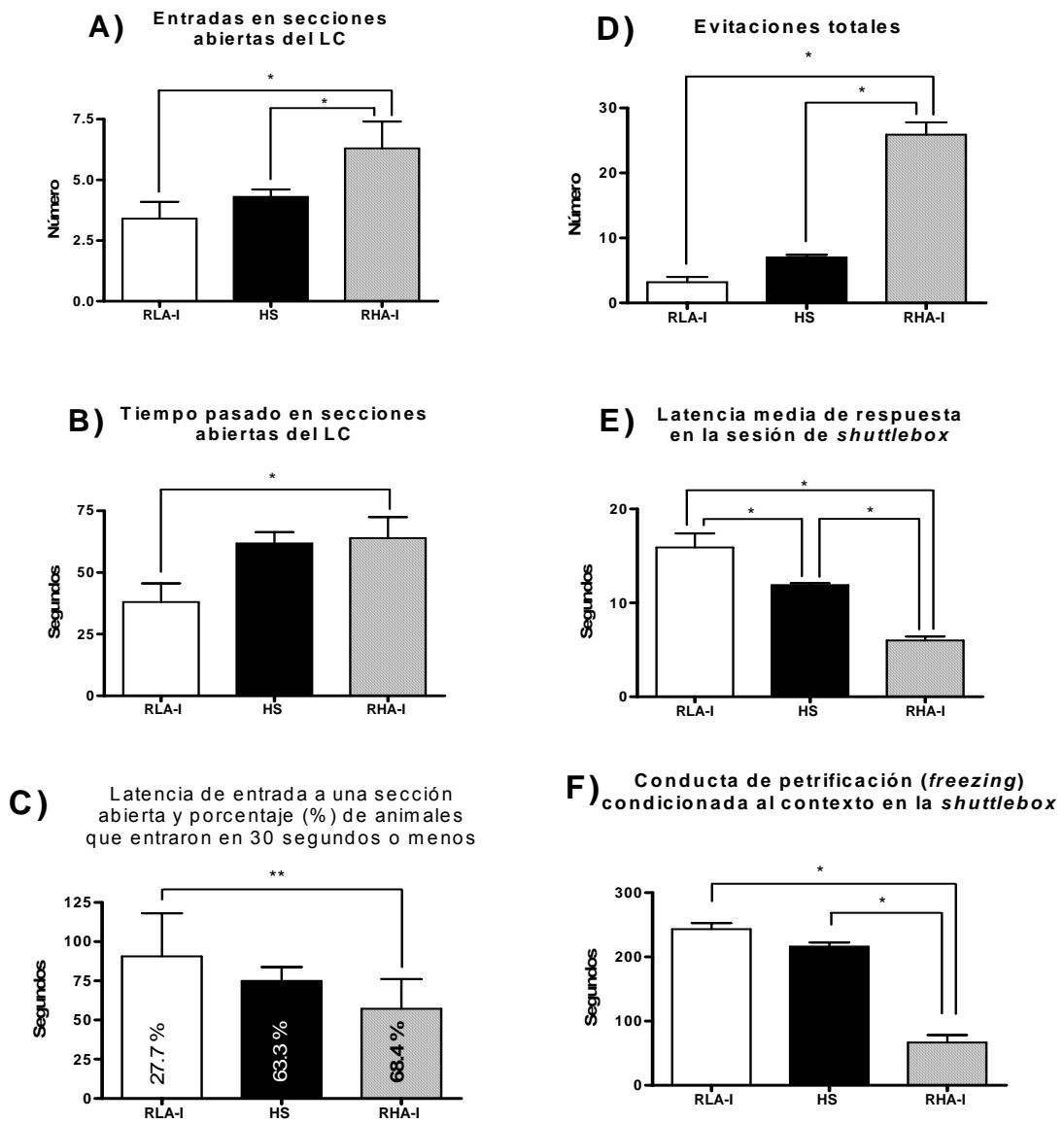
Se observan correlaciones sistemáticas y significativas entre los dos tests incondicionados, la CBN y el LC, como sería esperable. También aparecen correlaciones, más bajas pero significativas (.18 a .23), entre algunas variables de ansiedad del LC y las evitaciones a los 10 y 20 ensayos de la prueba de adquisición de evitación activa en dos sentidos, indicando (en general) que a mayor conducta en las secciones abiertas del LC (menor ansiedad incondicionada) se corresponde una tendencia a realizar con más eficacia la tarea de evitación en dos sentidos. La Tabla 2B da apoyo parcial a lo anterior, pues la regresión múltiple indica que las “entradas en secciones abiertas del LC” y las “posturas de evaluación de riesgo” son predictores significativos de las respuestas de evitación a los 10, 20 ó 40 ensayos (el total de la sesión) en la caja de vaivén (shuttlebox).

Discusión y conclusiones

El presente estudio muestra los resultados de la evaluación del comportamiento de temerosidad (ansiedad, miedo) en una muestra amplia de ratas N/Nih-HS en varios tests validados para la medida de ansiedad o miedo, tanto condicionados como incondicionados, en ratas de laboratorio (ver referencias sobre su validez en la “Introducción”). Además, se ha comparado el perfil de las ratas genéticamente heterogéneas con los valores de dos cepas consanguíneas, las RHA-I y las RLA-I, que presentan comportamiento divergente en medidas de ansiedad, miedo y estrés.

Los resultados de este estudio constituyen una confirmación parcial y una extensión de nuestro trabajo previo de caracterización dimensional (factorial) del comportamiento ansioso/temeroso en ratas heterogéneas (López-Aumatell et al., 2008), tanto en el patrón de correlaciones entre diferentes medidas como en los resultados del análisis de regresión múltiple, puesto

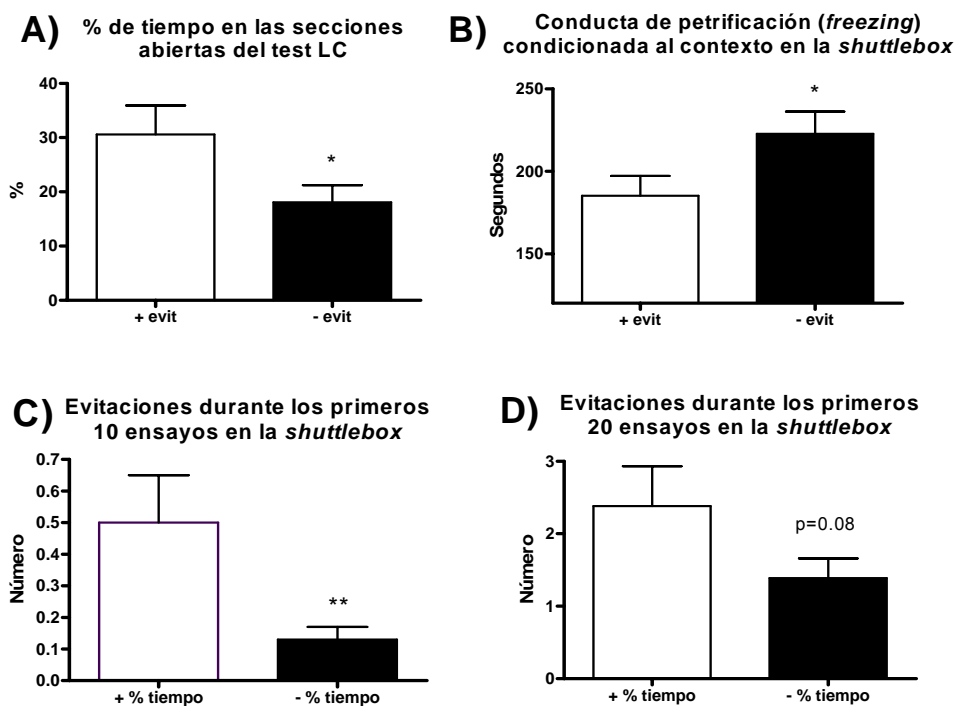
Figura 1.



A-C) Comparación, en variables de ansiedad incondicionada, entre las ratas N/Nih-HS (n=143) y las ratas RHA-I (n=18) y RLA-I (n=19). Se presentan medias \pm error estándar, y significación de la prueba de Duncan (tras ANOVA significativo) en la Fig 1A. Se presenta la prueba t de Student entre los grupos RHA-I y RLA-I en la Fig. 1B. Para la gráfica 1C, se presenta prueba de Chi-cuadrado. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$.

D-F) Comparación, en variables de la prueba de evitación activa, entre las ratas N/Nih-HS (n=143) y las ratas RHA-I (n=18) y RLA-I (n=19). Se presentan medias \pm error estándar, y significación de las pruebas de Duncan (tras ANOVA significativo). * $p \leq 0.05$.

Figura 2.



A-B) Medias \pm error estándar de la variable (A) “% de tiempo en secciones abiertas” del test LC (ver modo de cálculo de esta variable en el apartado “2.Material y Métodos. Laberinto Elevado en Cero”) y (B) “tiempo de petrificación condicionada al contexto” en la shuttlebox en ratas N/Nih-HS que presentan valores extremos en adquisición de la evitación activa en dos sentidos. Los grupos extremos fueron seleccionados por presentar un número de evitaciones totales una desviación estándar por encima (“+ evit”) o por debajo (“- evit”) de la media de evitaciones totales de todo el grupo (media= 7.9 y desviación estándar= 7.0). * $p \leq 0.05$, Prueba t de Student.

C-D) Medias \pm error estándar de variables de evitación activa en dos sentidos en ratas N/Nih-HS que presentan valores extremos en porcentaje de tiempo transcurrido en las secciones abiertas del test Laberinto Elevado en “Cero”. Los grupos extremos fueron seleccionados por presentar valores en la variable “% de tiempo en secciones abiertas” una desviación estándar por encima (“+ % tiempo”) o por debajo (“- % tiempo”) de la media de % de tiempo de todo el grupo (media= 23.6, desviación estándar= 20.3). ** $p \leq 0.01$, Prueba t de Student.

que aparecen asociaciones significativas entre variables de los tests incondicionados de ansiedad y la adquisición de la evitación activa en dos sentidos. No obstante, el actual trabajo añade nueva e importante información con respecto a algunas características del perfil de comportamiento “defensivo” (esto es, ansioso o miedoso) de las ratas N/Nih-HS, pues la comparación con las cepas RHA-I y RLA-I indica, por vez primera, que: 1) En el laberinto elevado en “cero” las ratas N/Nih-HS muestran valo-

res en “latencia de la primera entrada en una sección abierta”, en “número de entradas en secciones abiertas” y en “tiempo pasado en secciones abiertas” que caen entre los valores medios de las cepas RHA-I y RLA-I. 2) Los niveles de miedo condicionado al contexto de las ratas N/Nih-HS, medidos por la conducta de petrificación (freezing) durante los primeros 5 intervalos entre ensayos del entrenamiento (cuando ninguna rata ha hecho aún respuestas de evitación), son mucho más cercanos a los

de la cepa de ratas RLA-I (que son muy ansiosas, y condicionan estímulos y contextos aversivos fácilmente; ver López-Aumatell et al., 2009). 3) El nivel de adquisición de la evitación activa en dos sentidos de las ratas N/Nih-HS (7.9 evitaciones en promedio) es también más similar al de las RLA-I (3.2 evitaciones de media) que al de las ratas RHA-I (promedio de 25 evitaciones) (a título informativo, en varios estudios hemos comprobado que las ratas Sprague-Dawley de la colonia de la UAB, Barcelona, realizan medias de entre 10 y 18 evitaciones en 40 ensayos; véanse por ejemplo Aguilar, Gil, Fernández-Teruel & Tobeña, 2004; Escorihuela et al., 1993; Fernández-Teruel, Escorihuela, Boix et al., 1991; Fernández-Teruel, Escorihuela, Núñez et al., 1991; Fernández-Teruel, Escorihuela, Tobeña et al. 1991; Prunell et al., 1994a,b). 4) En el total de la sesión de entrenamiento de evitación las ratas heterogéneas N/Nih-HS exhiben niveles de cruces entre ensayos (23 de media) similares a los valores de las RLA-I (media de 19) y muy inferiores a los de las ratas RHA-I (media de 109 cruces) (los resultados de las cepas RHA-I y RLA-I no se han incluido aquí por motivos de espacio).

Los resultados indican que, en la prueba de ansiedad incondicionada (el LC), las ratas N/Nih-HS no presentan un perfil que indique de manera definitiva que son más ansiosas o menos que alguna de las dos cepas consanguíneas de comparación (las relativamente muy ansiosas RLA-I, y las relativamente poco ansiosas RHA-I), aunque sus valores en las tres variables relevantes mencionadas caen entre los márgenes de los mostrados por las cepas Romanas. En cambio, respecto a los niveles de miedo condicionado al contexto (freezing o petrificación durante los 5 primeros intervalos entre ensayos, esto es, condicionamiento clásico de miedo) es claro que las ratas N/Nih-HS muestran perfiles “defensivos” (en terminología de Blanchard, Blanchard,

Rodgers, & Weiss, 1990; Blanchard, Yudko, Rodgers, & Blanchard, 1993; Gray & McNaughton, 2000; Griebel, Blanchard, & Blanchard, 1996; McNaughton & Gray 2000) que en gran medida las asemejan a las ratas RLA-I. En línea con dicho perfil defensivo, de tipo predominantemente “petrificador” (o freezer) ante situaciones condicionadas de conflicto (como lo es el inicio del entrenamiento en la shuttlebox, un conflicto de “evitación pasiva/evitación activa”), las ratas N/Nih-HS claramente presentan poca habilidad para la adquisición de la evitación activa en dos sentidos, que se manifiesta en las respuestas de evitación totales e, indirectamente, en el número de cruces entre ensayos mencionado arriba (conducta “pseudocondicionada” que se halla relacionada con el aprendizaje eficaz de esta tarea; ej. Aguilar et al., 2004). En suma, en comparación con las cepas RHA-I/RLA-I, las ratas heterogéneas N/Nih-HS muestran un perfil conductual intermedio de ansiedad incondicionada (test LC), mientras que en un procedimiento que implica condicionamiento de miedo y conflicto condicionado (es decir, la adquisición de respuestas de evitación activa en dos sentidos) presentan valores conductuales mucho más cercanos a la cepa (ansiosa) RLA-I que a la cepa (no ansiosa) RHA-I. Por tanto, y a falta de más estudios comparativos entre las ratas N/Nih-HS y otras cepas en tareas de ansiedad incondicionada, parece claro que en algunos procedimientos/tareas que implican condicionamiento aversivo, las ratas heterogéneas N/Nih-HS presentan algunas características conductuales que las acercan más al perfil de la cepa ansiosa RLA-I que al de las ratas RHA-I (poco ansiosas; véanse referencias arriba).

Algunos trabajos previos han estudiado en ratas no seleccionadas (ej. Wistar, Sprague-Dawley) la relación entre ansiedad incondicionada y condicionada, utilizando el test de ansiedad del “laberinto en cruz ele-

vado” (“Elevated Plus-Maze”) y evaluando si una menor ansiedad medida en dicho test (mayor exploración de los brazos abiertos) predice que los animales adquirirán la evitación activa en dos sentidos más rápidamente. Los resultados de dichos estudios no han sido concluyentes, pues en algún caso han hallado esa hipotética relación (Ho, Eichendorff, & Schwarting, 2002; Prunell et al., 1994b) y en otros casos tal asociación no ha aparecido (Ribeiro-Barbosa, Canteras, Cezario, Blanchard, & Blanchard, 1999). Aparte de utilizar diferentes cepas de ratas y procedimientos en los tests conductuales empleados, dichos trabajos se han realizado con un número de animales relativamente reducido ($n < 50$).

En cambio, el presente estudio representa la primera ocasión en que en ratas genéticamente heterogéneas (Johannesson et al., 2009), y en una muestra grande de ellas ($n=143$), se evalúa la relación entre conductas de ansiedad no aprendidas y respuestas aprendidas (condicionadas) de miedo. Ello se ha llevado a cabo por tres procedimientos que se complementan: 1) el análisis de las correlaciones entre las variables de los diferentes tests en toda la muestra; 2) la selección de sub-muestras de animales con valores extremos en las variables conductuales de interés para observar cómo esto predice los valores que tomarán otras variables de ansiedad y, 3) el análisis de regresión múltiple, en toda la población de ratas usada, para la evaluación de qué variables predicen la adquisición de la evitación activa en dos sentidos.

Así, se observan correlaciones significativas (aunque bajas; entre $r= 0.18$ y $r= 0.23$) entre diferentes variables que representan ansiedad incondicionada en el test LC, como por ejemplo el “% de tiempo pasado en las secciones abiertas” y el “n° de entradas en secciones abiertas”, y el número de evitaciones durante los primeros 20 ensayos (Tabla 1A). El análisis de regre-

sión múltiple confirma, además, que el “número de entradas en secciones abiertas” predice positivamente y significativamente el número de evitaciones que las ratas realizan tanto durante los 10-20 primeros ensayos como en el total de la sesión de adquisición (40 ensayos; Tabla 1B). Y, por último, y de forma coherente con los análisis mencionados, la comparación entre subgrupos de ratas N/Nih-HS que muestran valores extremadamente bajos o altos (1 desviación de estándar por debajo o por encima de la media) en diversas variables muestra que: 1) En comparación con las ratas que no adquieren conducta de evitación, las ratas con más altos valores de evitaciones (o sea, las que muestran una más eficaz resolución del conflicto que supone la adquisición de la evitación activa en dos sentidos) son animales que pasan más tiempo en las secciones abiertas del test LC y que muestran menores niveles de conducta de petrificación condicionada (miedo condicionado) al contexto (Fig. 2A-B). 2) En línea con lo anterior, seleccionando las ratas que presentan valores extremos en “% de tiempo pasado en secciones abiertas del LC”, se observa que las menos ansiosas (las que pasan más tiempo en secciones abiertas) son las que con más rapidez/facilidad inician el aprendizaje de la evitación activa en dos sentidos (o sea, las que mejor resuelven el conflicto inicial en esta tarea; Fig. 2C-D).

Los resultados obtenidos poseen especial interés por varios motivos. En primer lugar, son la primera comparación experimental entre el perfil de ansiedad/miedo de las ratas heterogéneas N/Nih-HS y el de dos cepas de ratas consideradas como un buen modelo genético de baja y alta ansiedad, las RHA-I y las RLA-I respectivamente. Los resultados (medias + error estándar), tanto de las variables de ansiedad incondicionada como de miedo condicionado (petrificación condicionada al contexto) y adquisición de evitación en dos sentidos en

la presente muestra de ratas N/Nih-HS, son en general similares a los de la muestra utilizada en nuestro trabajo previo (López-Aumatell et al., 2008). El hecho de que los valores del stock de ratas N/Nih-HS se sitúan entre los de las cepas Romanas y de que en las medidas relacionadas con miedo condicionado (miedo condicionado al contexto y ejecución en la tarea de evitación activa en dos sentidos) se encuentren cercanas a las ratas ansiosas RLA-I, unido al hecho de que (las N/Nih-HS) son las ratas con mayor heterogeneidad genética disponibles, permite pensar que las ratas N/Nih-HS son fenotípicamente y genotípicamente adecuadas para la realización de estudios genético-cuantitativos, más concretamente estudios de “mapeo” fino de QTLs para los rasgos ansiedad o/y miedo.

En segundo lugar, los diferentes análisis realizados (correlaciones, regresión, comparación de grupos extremos en ansiedad) indican, de forma considerablemente consistente, que existen relaciones entre variables de ansiedad (no aprendida, o espontánea) y medidas de miedo aprendido. Estas relaciones no son, sin embargo, muy intensas si se tiene en cuenta toda la muestra de ratas y se aplica análisis correlacional o de regresión, aunque, como ya se ha dicho, son también similares (en cuanto a magnitud y sentido) a las de nuestro trabajo previo (López-Aumatell et al., 2008). Por otra parte, el análisis comparativo de subgrupos con valores extremos en variables relevantes (por tanto, sólo con los extremos de la muestra) confirma que las asociaciones (indicadas por las correlaciones y el análisis de regresión) existen. En definitiva, se demuestran asociaciones (o covariación) moderadas entre repuestas de ansiedad incondicionada y respuestas de miedo condicionado y evitación activa en dos sentidos. Esto parece compatible con la idea de que ansiedad incondicionada y miedo condicionado pueden compartir ciertos elemen-

tos o procesos (psicobiológicos), pero a su vez indica, indirectamente, que entre la ansiedad incondicionada y las respuestas condicionadas aversivamente existen mecanismos o procesos diferenciables (véase p. ej. Gray & McNaughton, 2000; López-Aumatell et al., 2008). En línea con lo que indican estudios anteriores de QTLs para la ansiedad en ratas (Fernández-Teruel et al., 2002a) se puede hipotetizar, por tanto, que en el proyecto genético de búsqueda y “mapeo” fino de QTLs para la ansiedad y el miedo (condicionado) que ya está en curso (ver Johannesson et al., 2009; en el marco del proyecto europeo que llevamos a cabo, ver Aitman et al., 2008) sería esperable hallar algún QTL con influencia significativa sobre más de una conducta de ansiedad o de miedo, por ejemplo sobre el número de “entradas en secciones abiertas” de los tests incondicionados, el número de evitaciones y el tiempo de “petrificación” (miedo) condicionada al contexto (ver Fernández-Teruel et al., 2002a). Pero, asimismo, sería esperable también hallar otro u otros QTLs que presentasen influencia significativa sobre variables específicas de tests conductuales concretos (p. ej. algún QTL que influya sólo sobre las variables de entradas y/o tiempo en secciones abiertas del test LC; ver también Fernández-Teruel et al., 2002a). De acuerdo con las hipótesis anteriores, los primeros resultados del estudio de mapeo fino de QTLs que estamos realizando indican, por el momento, que en el cromosoma 5 de las ratas N/Nih-HS se halla un QTL para la conducta de adquisición de la evitación activa en dos sentidos (Johannesson et al., 2009), así como otros probables QTLs para conductas incondicionadas de ansiedad en los tests utilizados aquí (ver López-Aumatell, 2008). Son QTLs obtenidos con alta resolución, de manera que lo reducido de los intervalos “mapeados” podrá permitir la identificación de los pocos genes (menos de una decena, en el caso de alguno

de esos QTLs) que dichos intervalos contienen. Nos proponemos investigar (trabajo ya en curso) si alguno de los genes contenidos en dichos QTLs (con influencia significativa sobre la ansiedad) se expresan diferencialmente en las ratas muy ansiosas (RLA-I) y poco ansiosas (RHA-I) aquí utilizadas. Si así fuese, el siguiente paso sería construir, con ese gen (o genes) candidato, ratas transgénicas, con sobreexpresión del gen, y ratas “knock down”, con expresión disminuida del gen, partiendo de las cepas RHA-I/RLA-I. Esas dos nuevas cepas de ratas con el gen manipulado serían evaluadas conductualmente en pruebas de ansiedad diversas, a efectos de observar si nues-

tra manipulación de los niveles de expresión del gen confirma que el mismo está realmente implicado en la regulación del rasgo de ansiedad/miedo/temerosidad.

Agradecimientos

Financiado por becas del “Ministerio de Ciencia y Tecnología” (SAF2003-03480), DGR (2005SGR-00885), programa FPI (R. L-A) y por el proyecto europeo “EURATools” (European Commission Contract no. LSHG-CT-2005-019015).

Artículo recibido: 29-04-2008
aceptado: 17-05-2009

Referencias

- Aguilar, R., Gil, L., Tobeña, A., Escorihuela, R. M., & Fernández-Teruel, A. (2000). Differential effects of cohort removal stress on the acoustic startle response of the Roman/Verh rat strains. *Behavior Genetics*, *30*, 71-75.
- Aguilar, R., Gil, L., Flint, J., Gray, J. A., Dawson, G. R., Driscoll, P., et al. (2002). Learned fear, emotional reactivity and fear of heights: A factor analytic map from a large F2 intercross of Roman rat strains. *Brain Research Bulletin*, *57*, 17-26.
- Aguilar, R., Gil, L., Gray, J. A., Driscoll, P., Flint, J., Dawson, G. R., et al. (2003). Fearfulness and sex in F2 Roman rats: Males display more fear though both sexes share the same fearfulness traits. *Physiology & Behavior*, *78*, 723-732.
- Aguilar, R., Gil, L., Fernández-Teruel, A., & 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. *Behavioural Processes*, *66*, 63-72.
- Aitman, T. J., Crister, J., Cuppen, E., Dominiczak, A., Fernández-Suarez, X., Flint, J., et al. (2008). Progress and prospects in rat genetics: A community view. *Nature Genetics*, *40*, 516-522.
- Blanchard, R. J., Blanchard, D. C., Rodgers, J., & Weiss, S. M. (1990). The characterization and modeling of antipredator defensive behavior. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, *14*, 463-472.
- Blanchard, R. J., Yudko, E. B., Rodgers, J., & Blanchard, D.C. (1993). Defense system psychopharmacology: An ethological approach to the pharmacology of fear and anxiety. *Behavioural Brain Research*, *58*, 155-165.
- Boix, F., Fernández-Teruel, A., & Tobeña, A. (1988). The anxiolytic action of benzodiazepines is not present in handling-habituated rats. *Pharmacology Biochemistry and Behaviour*, *31*, 541-546.
- Cano-Vindel, A., Miguel-Tobal, J. J., González-Ordí, H., & Iruarrizaga-Díez, I. (2007). Hiperventilación y experiencia de ansiedad. *Ansiedad y Estrés*, *13*, 291-302.
- Carrasco, J., Márquez, C., Nadal, R., Tobeña, A., Fernández-Teruel, A., & Armario, A. (2008). Characterization of central and peripheral components of the hypothalamus-pituitary-adrenal axis in the inbred Roman rat strains. *Psychoneuroendocrinology*, *33*, 437-445.
- Draski, L. J., Spuhler, K. P., Erwin, V. G., Baker, R. C., & Deitrich, R. A. (1992). Selective breeding of rats differing in sensitivity to the effects of acute ethanol administration. *Alcoholism, Clinical and Experimental Research*, *16*, 48-54.
- Driscoll, P., & Bättig, K. (1982). Behavioral, emotional and neurochemical profiles of rats selected for extreme differences in active, two-way avoidance performance. En I. Lieblisch (Ed.) *Genetics of the brain* (pp.

- 95-123). Amsterdam: Elsevier Biomedical Press.
- Driscoll, P., Escorihuela, R. M., Fernández-Teruel, A., Giorgi, O., Schwegler, H., Steimer, T., et al. (1998). Genetic selection and differential stress responses. The Roman lines/strains of rats. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 851, 501-510.
- Driscoll, P., Fernández-Teruel, A., Corda, M.G., Giorgi, O., & Steimer, T. (2009). Some guidelines for defining personality differences in rats. En Y.K. Kim (Ed.), *Handbook of Behavior Genetics* (pp. 95-123). New York: Springer.
- Escorihuela, R. M., Fernández-Teruel, A., Zapata, A., Núñez, J. F., & Tobeña, A. (1993). Flumazenil prevents the anxiolytic effects diazepam, alprazolam and adinazolam on the early acquisition of two-way active avoidance. *Pharmacological Research*, 28, 53-58.
- Escorihuela, R.M., Tobeña, A., Driscoll, P., & 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, 353-67.
- Escorihuela, R. M., Fernández-Teruel, A., Tobeña, A., Langhans, W., Bättig, K., & Driscoll, P. (1997). Labyrinth exploration. Emotional reactivity, and conditioned fear in young Roman/Verh inbred rats. *Behavior Genetics*, 27, 573-578.
- Escorihuela, R. M., Fernández-Teruel, A., Gil, L., Aguilar, R., Tobeña, A., & Driscoll, P. (1999). Inbred Roman high- and low-avoidance rats: differences in anxiety, novelty seeking and shuttle box behaviors. *Physiology & Behavior*, 67, 19-26.
- Eysenck, M. W., & Eysenck, W. (2007). Four-factor theory and the anxiety disorders. *Ansiedad y Estrés*, 13, 283-289.
- Fernandes, C., González, M. I., Wilson, C., & File, S.E. (1999). Factor analysis shows that female rat behavior is characterized primarily by activity, male rats are driven by sex and anxiety. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 64, 731-738.
- Fernández-Teruel, A., Escorihuela, R. M., Boix, F., & Tobeña, A. (1991). Effects of different handling- stimulation procedures and benzodiazepines on two-way active avoidance acquisition in rats. *Pharmacological Research*, 24, 273-282.
- Fernández-Teruel, A., Escorihuela, R. M., Driscoll, P., Tobeña, A., & Bättig, K. (1991). Infantile (handling) stimulation and behavior in young Roman High- and Low-Avoidance rats. *Physiology & Behavior*, 50, 563-565.
- Fernández-Teruel, A., Escorihuela, R. M., Núñez, J. F., Zapata, A., Boix, F., Salazar, W., et al. (1991). The early acquisition of two-way (shuttle-box) avoidance as an anxiety-mediated behaviour: psychopharmacological validation. *Brain Research Bulletin*, 26, 173-176.
- Fernández-Teruel, A., Escorihuela, R. M., Tobeña, A., & Driscoll, P. (1991). Stress and putative endogenous ligands for benzodiazepine receptors: The importance of characteristics of the aversive situation and of differential emotionality in experimental animals. *Experientia*, 47, 1051-1056.
- Fernández-Teruel, A., Escorihuela, R.M., Driscoll, P., Tobeña, A., & Bättig, K. (1992). Differential effects of early stimulation and/or perinatal flumazenil treatment in young low- and high-avoidance rats. *Psychopharmacology*, 108, 170-176.
- Fernández-Teruel, A., Escorihuela, R. M., Núñez, J. F., Goma, M., Driscoll, P., & Tobeña, A. (1992). Early stimulation effects on novelty-induced behaviour in two psychogenetically-selected rat lines with divergent emotionality profiles. *Neuroscience Letters*, 137, 185-188.
- Fernández-Teruel, A., Escorihuela, R. M., Castellano, B., González, B., & Tobeña, A. (1997). Neonatal handling and environmental enrichment effects on emotionality, novelty/reward seeking, and age-related cognitive and hippocampal impairments: focus on the Roman rat lines. *Behavior Genetics*, 6, 513-526.
- Fernández-Teruel, A., Escorihuela, R. M., Aguilar, R., Gil, L., González, B., Castellano, B., et al. (1998). Respuestas de estrés y efectos de la experiencia temprana: Evidencia conductual, fisiológica y neuromorfológica. *Ansiedad y Estrés*, 4, 135-170.
- Fernández-Teruel, A., Escorihuela, R. M., Gray, J. A., Aguilar, R., Gil, L., Gimenez-Llort, L., et al. (2002). A quantitative trait locus influencing anxiety in the laboratory rat. *Genome Research*, 12, 618-626.
- Fernández-Teruel, A., Giménez-Llort, L., Escorihuela, R.M., Gil, L., Aguilar, R., Steimer, T., et al. (2002). Early-life handling stimulation and environmental enrichment: are some of their effects mediated by similar neural mechanisms? *Pharmacology, Biochemistry, & Behavior*, 73, 233-245.
- Ferré, P., Fernández-Teruel, A., Escorihuela, R. M., Driscoll, P., Corda, M. G., Giorgi, O., et al. (1995). Behavior of the Roman/Verh high -and low-avoidance rat lines in anxiety tests: relationship with defecation and self-grooming. *Physiology & Behavior*, 58, 1209-1213.

- Flint, J. (2004). The genetic basis of neuroticism. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 28, 307-316.
- Fullerton, J., Cubin, M., Tiwari, H., Wang, C., Bomhra, A., Davidson, S., et al. (2003). Linkage analysis of extremely discordant and concordant sibling pairs identifies quantitative-trait loci influence variation in the human personality trait neuroticism. *American Journal of Human Genetics*, 72, 879-890.
- Gómez, M.A., de la Torre, L., Callejas-Aguilera, J.E., Lerma-Cabrera, J.M., Rosas, J.M., Escarabajal, M.A., et al. (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.
- González-Ramírez, M. T., & Landeró-Hernández, R. (2006). Síntomas psicósomáticos y teoría transaccional del estrés. *Ansiedad y Estrés*, 12, 45-61.
- Griebel, G., Blanchard, D. C., & Blanchard, R. J. (1996). Evidence that behaviors in the mouse defense test battery relate to different emotional states: A factor analytic study. *Physiology & Behavior*, 60, 1255-1260.
- Gray, J. A., & McNaughton, N. (2000). *The Neuropsychology of Anxiety*. Oxford: Oxford University Press.
- Hansen, C., & Spuhler, K. (1984). Development of the National Institutes of Health genetically heterogeneous stock. *Alcoholism, Clinical and Experimental Research*, 8, 477-479.
- Ho, Y.J., Eichendorff, J., & Schwarting, R.K. (2002). Individual response profiles of male Wistar rats in animal models for anxiety and depression. *Behavioural Brain Research*, 136, 1-12.
- Jacob, H.J., & Kwitek, A.E. (2002). Rat genetics: attaching physiology and pharmacology to the genome. *Nature Reviews Genetics*, 3, 33-42.
- Johannesson, M., López-Aumatell, R., Strid, P., Díez, M., Tuncel, J., Blázquez, G., et al. (2009). A resource for the simultaneous high-resolution mapping of multiple quantitative trait loci in rats: the NIH heterogeneous stock. *Genome Research*, 19, 150-158.
- Koch, L. G., & Britton, S. L. (2001). Artificial selection for intrinsic aerobic endurance running capacity in rats. *Physiological Genomics*, 5, 45-52.
- Leza, J. C. (2005). Mecanismos del daño cerebral inducido por estrés. *Ansiedad y Estrés*, 11, 123-140.
- López-Aumatell, R. (2008). Temerositat en rates heterogènies (N/Nih-HS): Vers els gens quantitius de l'ansietat i la por. Tesis doctoral publicada en TDX, Bellaterra: Servei de Publicacions de la Universitat Autònoma de Barcelona.
- López-Aumatell, R., Guitart-Masip, M., Vicens-Costa, E., Giménez-Llort, L., Valdar, W., Johannesson, M., et al. (2008). Fearfulness in a large N/Nih genetically heterogeneous rat stock: Differential profiles of timidity and defensive flight in males and females. *Behavioural Brain Research*, 188, 41-55.
- López-Aumatell, R., Blázquez, G., Gil, L., Aguilar, R., Giménez-Llort, L., Tobeña, A. et al. (2009). The Roman rat strains differ in fear-potentiated startle and fear conditioning to cues and contexts. *Psicothema*, 21, 27-32.
- McNaughton, N., & Gray, J.A. (2000). Anxiolytic action on the behavioural inhibition system implies multiple types of arousal contribute to anxiety. *Journal of Affective Disorders*, 28, 285-305.
- Mott, R., Talbot, C. J., Turri, M. G., Collins, A. C., & Flint, J. (2000). A method for fine mapping quantitative trait loci in outbred animal stocks. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97, 12649-12654.
- Mott, R., & Flint, J. (2002). Simultaneous detection and fine mapping of quantitative trait loci using heterogeneous stocks. *Genetics*, 160, 1609-1618.
- Overstreet, D. H., Rezvani, A. H., Pucilowski, O., Gause, L., & Janowsky, D. S. (1994). Rapid selection for serotonin-1A sensitivity in rats. *Psychiatric Genetics*, 4, 57-62.
- Pähkla, R., Kask, A., & Rågo, L. (2000). Differential effects of beta-carbolines and antidepressants on rat exploratory activity in the elevated zero-maze. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 65, 737-742.
- Prunell, M., Escorihuela, R. M., Fernández-Teruel, A., Núñez, J. F., & Tobeña, A. (1994a). Differential interactions between ethanol and Ro 15-4513 on two anxiety tests in rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 47, 147-151.
- Prunell, M., Escorihuela, R. M., Fernández-Teruel, A., Núñez, J. F., & Tobeña, A. (1994b). Anxiolytic profiles of alprazolam and ethanol in the elevated plus-maze test and the early acquisition of shuttlebox avoidance. *Pharmacological Research* 29, 37-45.
- Ramos, A., & Mormede, P. (1998). Stress and emotionality: A multidimensional and genetic approach. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 22, 33-57.
- Ribeiro-Barbosa, E.R., Canteras, N.S., Cezario, A.F., Blanchard, R.J., & Blanchard, D.C. (2006). An alternative experimental procedure for studying predator-related defensive responses. *Neuroscience and*

- Biobehavioral Reviews*, 79, 359-365.
- Rosas, J.M., Callejas-Aguilera, J.E., Escarabajal, M.D., Gómez, M.J., de la Torre, L., Agüero, A., et al. (2007). Successive negative contrast effect in instrumental runway behaviour: a study with Roman high-(RHA) and Roman low-(RLA) avoidance rats. *Behavioural Brain Research*, 185, 1-8.
- Scherrer, J. F., True, W. R., Xian, H., Lyons, M. J., Eisen, S. A., Goldberg, J., et al. (2000). Evidence for genetic influences common and specific to symptoms of generalized anxiety and panic. *Journal of Affective Disorders*, 57, 25-35.
- Shepherd, J. K., Grewal, S. S., Fletcher, A., Bill, D. J., & Dourish, C. T. (1994). Behavioural and pharmacological characterisation of the elevated "zero-maze" as an animal model of anxiety. *Psychopharmacology*, 116, 56-64.
- Spuhler, K., & Deitrich, R. A. (1984). Correlative analysis of ethanol-related phenotypes in rat inbred strains. *Alcoholism, Clinical and Experimental Research*, 8, 480-484.
- Steimer, T., LaFleur, S., & Schulz, P.E. (1997). Neuroendocrine correlates of emotional reactivity and coping in male rats from the Roman high (RHA-I/Verh)- and low (RLA-I/Verh)- avoidance lines. *Behavior Genetics*, 27, 503-512.
- Steimer, T., & Driscoll, P. (2003). Divergent stress responses and coping styles in psychogenetically selected Roman high-(RHA) and low-(RLA) avoidance rats: Behavioural, neuroendocrine and developmental aspects. *Stress*, 6, 87-100.
- Schwegler, H., Pilz, P. K. D., Koch, M., Fendt, M., Linke, R., & Driscoll, P. (1997). The acoustic startle response in inbred Roman High- and Low-avoidance rats. *Behavior Genetics*, 27, 579-582.
- Valdar, W., Solberg, L. C., Gauguier, D., Burnett, S., Klenerman, P., Cookson, W. O., et al. (2006). Genome-wide genetic association of complex traits in heterogeneous stock mice. *Nature Genetics*, 38, 879-887.
- Valdar, W., Solberg, L. C., Gauguier, D., Cookson, W. O., Rawlins, J. N. P., Mott, R., et al. (2006). Genetic and environmental effects on complex traits in mice. *Genetics*, 174, 959-984.
- Weiss, I.C., & Feldon, J. (2001). Environmental animal models for sensorimotor gating deficiencies in schizophrenia: a review. *Psychopharmacology*, 156, 305-26.
- Willis-Owen, S. A., & Flint, J. (2007). Identifying the genetic determinants of emotionality in humans; insights from rodents. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 31, 115-124.
- Yalcin, B., Willis-Owen, S. A., Fullerton, J., Meesaq, A., Deacon, R. M., Rawlins, J. N., et al. (2004). Genetic dissection of a behavioral quantitative trait locus shows that Rgs2 modulates anxiety. *Nature Genetics*, 36, 1197-1202.

Copyright of *Ansiedad y Estrés* is the property of *Ansiedad y Estres* and its content may not be copied or emailed to multiple sites or posted to a listserv without the copyright holder's express written permission. However, users may print, download, or email articles for individual use.