

Ontogenia del comportamiento en ratas en una batería de pruebas conductuales.

Ontogeny of rats behavior on a battery of behavioral tests.

Carlos M. Coronel Oliveros, Renny Pacheco Calderón.

RESUMEN

Gran parte de la neurobiología humana se ha estudiado experimentalmente mediante el uso de modelos animales. Uno de los aspectos cruciales que debe tener en cuenta el investigador es la edad y los cambios asociados a la evolución de las características fisiológicas y conductuales a lo largo de la vida del animal. En función de ello, se evaluó el comportamiento de una cohorte de ratas (Sprague-Dawley, machos) desde el estadio juvenil (4ta semana) al adulto (10ma semana) en una batería de pruebas conductuales: prueba de alternación espontánea en el laberinto en T (cognición), prueba de campo abierto (actividad exploratoria y ansiedad), prueba de nado forzado (depresión) y prueba de interacción social (comportamiento social). Los animales adultos mostraron un mayor desempeño en las tareas cognitivas (relacionadas con la memoria espacial), mayor actividad exploratoria y mayor inmovilización (depresión), en contraste con los individuos juveniles, más no se observaron diferencias en el comportamiento social. Estos cambios conductuales, analizados en conjunto, evidencian firmemente una diferenciación del comportamiento con el desarrollo ontogenético, consecuencia del desarrollo encefálico y crecimiento del animal.

Palabras clave: alternación, exploración, neurobiología, ontogenia, roedores.

ABSTRACT

Many aspects of human neurobiology were studied through animal models. A critical issue that the researcher must be counting on is the age of the experimental animal. Thus, it was pretended to evaluate the behavior of a cohort of male Sprague-Dawley rats from the juvenile stage (4th week old) to adult stage (10th week old) on a battery of behavioral tests: spontaneous alternation test on the T-maze (cognition), open field test (exploratory activity and anxiety like-behavior), forced swim test (depression like-behavior) and social interaction test (social behavior). Adult animals showed a greater performance in spatial memory tasks, more exploratory activity and increased immobility (depression like-behavior), in contrast with juvenile animals, however no differences in social behavior were found. These differences highlight the divarication of behavior with the ontogenetic development, a possible consequence of the encephalic development and animal growth.

Key words: alternation, exploration, neurobiology, ontogeny, rodents.

INTRODUCCIÓN

El estudio de las enfermedades y patologías en el ser humano se ve dificultado tanto por disposiciones éticas y morales, como por impedimentos prácticos y metodológicos. Como alternativa, los modelos animales surgen como una ventana para comprender la biología detrás del comportamiento humano, la fisiopatología de diversas afecciones y enfermedades, y como punto de inicio para los ensayos preclínicos de fármacos y medicamentos. En neurociencia y neuropsiquiatría, los animales de mayor uso en investigación corresponden a las ratas y ratones (1, 2), por encima de otras especies modelo usadas en investigación biomédica, como primates, peces cebras, moscas de la fruta y gusanos de tierra (*C. elegans* por antonomasia).

Actualmente, los ratones gozan de una alta popularidad en la investigación biomédica, consecuencia de la posibilidad de manipular genéticamente a estos animales desde la obtención del primer ratón modificado genéticamente (3). Empero, el uso de ratas como biomodelo sigue siendo metodológicamente atractivo por las diversas ventajas que presentan estos animales respecto a los ratones: comportamiento más complejo, facilidad de realizar cirugías e intervenciones intracraneales con menor probabilidad de causar daño al tejido cerebral, mejor resolución espacial en técnicas de neuroimagen, y facilidad de manipulación (1). Todo esto añadido al surgimiento de las técnicas de manipulación genética en ratas (4, 5).

Laboratorio de Neurociencias y Comportamiento (LabNeC), Centro de Estudios en Zoología Aplicada (CEZA), Facultad Experimental de Ciencias y Tecnología (FACyT), Universidad de Carabobo, Valencia, Venezuela

Autor de Correspondencia: Renny Pacheco.

E-mail: rjpacheco@uc.edu.ve

Recibido: 14-03-18

Aprobado: 03-05-18

En neurociencia existen modelos animales para el estudio de la memoria (6), el dolor (7), la ansiedad (8), la depresión (9), el párkinson (10), el alzhéimer (11), la esquizofrenia y trastornos psicóticos relacionados (12, 13, 14, 15). Los cambios en el comportamiento, producto de un tratamiento o de la manipulación farmacológica, clásicamente son evaluados a través de pruebas conductuales. Estas pruebas, por la complejidad del comportamiento como un fenómeno biológico emergente, se ven influenciadas por un número importante de variables: luz, hora del día, temperatura, olores, ruido, manipulación, presencia de observadores, pre-exposición a otras pruebas, cepa, sexo y edad del animal experimental. Así como en humanos existe una diferencia marcada en el comportamiento de acuerdo al período del desarrollo ontogenético del individuo, esta evolución temporal de la conducta también ha sido planteada en ratas como modelo animal. A pesar de ello, la información sobre el desempeño de ratas y ratones en diversas pruebas conductuales parece ser poco clara, considerando variables como el sexo, edad, cepa del animal, hora del día, entre otras (16, 17, 18, 19, 20). Respecto al periodo equivalente a la adolescencia y la adultez en las ratas, actualmente se acepta que los días postnatales 33-34 y 60 corresponden al inicio de los periodos puberal y adulto, respectivamente (21). De la misma forma que el comportamiento en humanos presenta marcadas diferencias con la edad del individuo, es previsible que esta variabilidad debe estar presente en un modelo murino, lo cual puede resultar en una influencia relevante de la edad de los individuos seleccionados, sobre los resultados y conclusiones de los estudios conductuales con estos modelos animales. En consecuencia, el presente trabajo pretende evaluar el desempeño de ratas en los estadios equivalentes a la adolescencia y adultez temprana en humanos, en una serie de pruebas conductuales clásicas en neurociencia y psicología experimental, con la finalidad de establecer la importancia de la edad del animal como variable en los estudios de comportamiento, debido a la limitada información disponible relacionada al tema.

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales. Se emplearon ratas Sprague-Dawley macho (*Rattus norvegicus*, $n = 12$) de 21 días de edad, proporcionadas por el Bioterio de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad de Carabobo. Estas se alojaron en jaulas de acero inoxidable de 50 x 40 x 20 cm, a razón de 3 animales por jaula, a $23,2 \pm 1,9$ °C de temperatura, $38,5 \pm 4,9\%$ de humedad relativa, con camas de aserrín de cedro previamente tamizado, un ciclo de 12/12 h de luz-oscuridad, y suministro de agua y alimento ad libitum. Los animales se trataron en acuerdo a lo establecido en la "Guidelines for the Care and Use of Mammals in Neuroscience and Behavioral Research" (22), y el "Manual para la producción y uso ético de animales de laboratorio" (23). Los protocolos experimentales se aprobaron por La Comisión Permanente de Bioética y Bioseguridad de la Universidad de Carabobo (CPBBUC).

Pruebas conductuales. Las pruebas se realizaron en dos fases temporales: en la semana postnatal (SPN) 4, equivalente al día postnatal (DPN) 28, y en la SPN 10 (DPN 70), periodos relacionados con el inicio de la adolescencia y el inicio de la adultez, respectivamente (21). De esta forma quedan establecidos dos subgrupos: estadios juvenil y adulto.

Una cámara web conectada a una laptop se utilizó como sistema de captura de video. Los videos se tomaron a 32 cuadros por segundo (31,25 ms de intervalo entre cuadros). Las pruebas se realizaron sobre un fondo negro y se ejecutaron entre las 10 am y 5 pm, a temperatura ambiente ($22,5$ °C \pm $1,1$ °C), $38,6\% \pm 3,3\%$ de humedad relativa, 17° lux de intensidad lumínica, y ruido ambiental bajo. Las variables conductuales se analizaron a posteriori por dos observadores ciegos, previamente entrenados para el reconocimiento de las variables de interés en cada video.

Prueba de alternación espontánea. Para evaluar la memoria espacial, se procedió con la prueba de alternación espontánea (spontaneous alternation test, SAT) en un laberinto en T, según el protocolo descrito por Deacon & Rawlins (24). La estructura estuvo constituida por paredes gris mate de cloruro de polivinilo (PVC) en forma de "T", de 3 mm de espesor y 30 cm de altura, con compuertas deslizantes y una partición central. Se realizó un total de 10 ensayos por rata en bloques de 5 ensayos por día, midiendo el porcentaje de aciertos positivos y el número de piezas fecales totales contabilizadas al finalizar la prueba.

Prueba de campo abierto. La prueba de campo abierto (open field test, OFT) se empleó para estudiar la actividad exploratoria general y comportamientos relacionados con la ansiedad en los animales experimentales (25). La prueba se llevó a cabo en una caja rectangular de madera, de color gris mate, de 70 x 70 x 35 cm, por un tiempo de 10 min. Se determinó la distancia total recorrida y el tiempo de estadía en la región central (actividad central) utilizando las coordenadas de posición del animal obtenidas mediante el software Tracker v4.87 (26), procesando los videos a 1,6 cuadros por segundo, y considerando una región central equivalente al 33% de la arena del campo abierto. Se cuantificó igualmente la actividad vertical (rearing behavior) como una medida complementaria de la actividad exploratoria (27). Se midió además el tiempo invertido en aseo (grooming behavior) y el porcentaje de transiciones de aseo incorrectas, como índices auxiliares de estrés y ansiedad (28). Una transición correcta de aseo sigue los siguientes pasos en orden estricto: patas delanteras, cabeza, cuerpo, patas traseras, cola y/o genitales.

Prueba de interacción social. La prueba de interacción social (social interaction test, SIT) se empleó para estudiar el comportamiento social de los animales experimentales. La prueba se ejecutó en la arena de la OFT (70 x 70 x 35 cm). Se implementó una variación del protocolo desarrollado por File & Hyde (29). Se utilizaron para la prueba dos animales

sin contacto previo, que no se diferenciaron en más de 10 g de peso corporal, y sin aislamiento social previo. La SIT se llevó a cabo por un tiempo de 7 min en condiciones poco estresantes: baja iluminación (17° lux), ruido ambiental bajo y arena de pruebas familiar tras dos días de habituación. Se contabilizó el comportamiento no agresivo (olfateo, juego social, persecución), y el comportamiento agresivo (mordiscos, arañazos, golpes) durante los 7 min de duración de cada video. Cada pareja de animales se utilizó una única vez.

Prueba de nado forzado. Para evaluar depresión, como una contra respuesta a una situación de estrés/riesgo, se utilizó la prueba de nado forzado modificada (forced swim test, FST) siguiendo el protocolo de Slattery & Cyan (30), con una columna de agua de 30 cm. Se evaluaron tres variables conductuales en la FST: inmovilización, nado y escalado. El nado y escalado corresponden a movimientos activos dirigidos a lo largo del cilindro y hacia las paredes del mismo, respectivamente. La inmovilización constituye la ausencia de actividad, salvo la necesaria para que el animal se mantenga a flote. Un ensayo de 10 min de duración se realizó 24 horas previas a la FST para aumentar la inmovilidad al momento de la prueba (31). Los videos se grabaron por 5 min. Se midió el comportamiento predominante, como puntuaciones, en cada intervalo de 5 seg de los 300 seg de duración total de cada video (para un total de 60 puntuaciones).

Análisis estadístico. Para el análisis estadístico se utilizó el software R 3.1.3 (32). Las diferencias entre los grupos juvenil y adulto, en cada una de las pruebas, se determinaron con una prueba de Wilcoxon de rangos y signos. La data se analizó previamente para verificar el cumplimiento de los supuestos de normalidad y de homogeneidad de varianzas, mediante las pruebas de Shapiro-Wilk y Levene, respectivamente. Para separar los grupos en base a todo el conjunto de variables conductuales que los definen, se realizó un análisis de factores confirmatorio por el método de máxima verosimilitud, utilizando el método "varimax" de rotación ortogonal. Se ejecutó además un análisis de factores exploratorio (extracción por el método de componentes principales), con la finalidad de incluir solo las variables con comunalidades mayores a 0,5. Los datos se analizaron previamente con las pruebas de Mardia y M de Box para verificar el cumplimiento de los supuestos de normalidad multivariada y homogeneidad de las matrices de covarianza, respectivamente. Se consideró un valor $p < 0,05$ como estadísticamente significativo. Los descriptivos se representan como la media \pm SD. Los diagramas de cajas están constituidos por la mediana, el 1er y 3er cuartil, y los valores mínimos y máximos de la distribución.

RESULTADOS

Los animales adultos mostraron mayor capacidad cognitiva (en relación a la memoria espacial) en función de su mejor desempeño en la SAT. De este modo, los adultos presentaron mayor porcentaje de aciertos positivos en la

SAT que los juveniles ($51,67 \pm 11,15\%$, juveniles, vs $79,17 \pm 10,84\%$, adultos, $W = 0$, $p < 0,01$, $n = 12/12$), más no se hallaron diferencias en el número de piezas fecales totales, un indicativo de ansiedad, contabilizadas por animal al finalizar la prueba ($5,58 \pm 1,73$, juveniles, vs $4,58 \pm 1,56$, adultos, $W = 35$, $p = 0,153$, $n = 12/12$). Estos resultados se presentan en la Fig. 1.

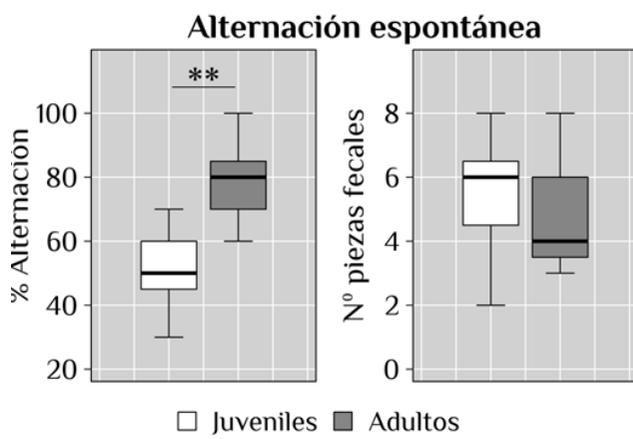


Figura 1. Prueba de alternación espontánea en el laberinto en T. Los animales adultos muestran mayor desempeño en la prueba (mayor alternancia) respecto a los juveniles. Sin diferencias significativas en los niveles de defecación (indicativo de estrés/ansiedad), $n = 12$ por grupo, $**p < 0.01$.

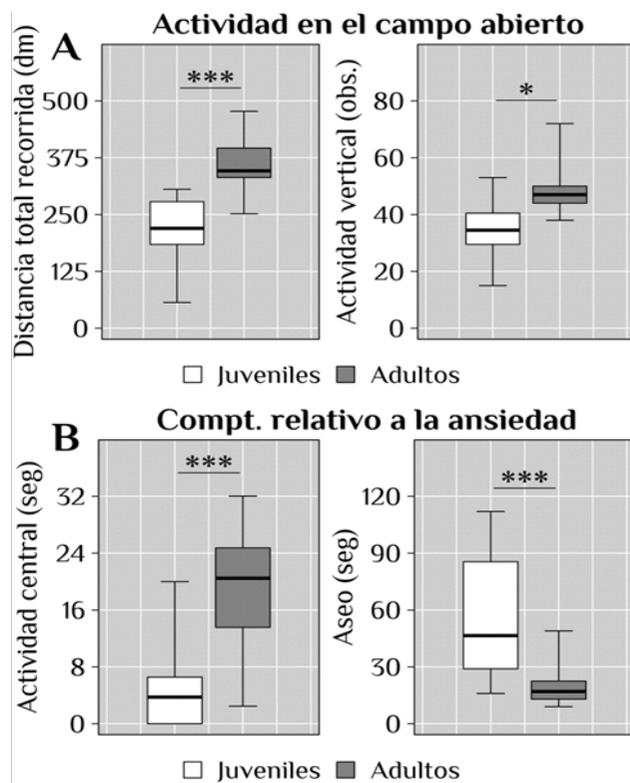


Figura 2. Actividad exploratoria en la prueba de campo abierto. A) Los animales adultos muestran tanto mayor actividad locomotora como actividad vertical (rearings), respecto a los juveniles. B) Los animales juveniles muestran menor actividad central e incremento del tiempo utilizado en aseo corporal, ambos índices de estrés y ansiedad producto de la exposición a un ambiente novedoso, $n = 12$ por grupo, $*p < 0.05$, $***p < 0.001$.

En relación a la actividad exploratoria en la OFT, los animales adultos mostraron un mayor interés en la exploración del entorno, hecho coligado además a menores niveles de ansiedad durante la realización de la prueba. En este sentido, se determinó una mayor distancia total recorrida en los animales adultos respecto a los juveniles ($221,21 \pm 69,85$ dm, juveniles, vs $359,53 \pm 69,71$ dm, adultos, $W = 1$, $p < 0,001$, $n = 12/12$) en los 10 min totales de duración de la prueba, así como un mayor número eventos de rearing (levantamientos sobre las patas traseras, o actividad vertical) ($35 \pm 10,83$, juveniles, vs $48 \pm 8,72$, adultos, $W = 12$, $p < 0,05$, $n = 12/12$). Estos resultados se aprecian en la Fig. 2A, y señalan una mayor actividad locomotora y exploratoria en el grupo de animales adultos. Como se muestra en la Fig. 2B, en relación a las medidas del nivel de estrés y ansiedad de los animales en la OFT, se hallaron diferencias significativas entre los grupos juvenil y adulto tanto en la actividad central ($4,58 \pm 5,68$ seg, juveniles, vs $19,31 \pm 8,70$ seg, adultos, $W = 0$, $p < 0,001$, $n = 12/12$) como en el tiempo invertido en aseo ($55,25 \pm 34,33$ seg, juveniles, vs $19,75 \pm 11,08$ seg, adultos, $W = 77$, $p < 0,001$, $n = 12/12$).

Respecto al comportamiento en la SIT, no se encontraron diferencias significativas entre juveniles y adultos tanto en el número total de eventos no agresivos ($19,17 \pm 5,47$, juveniles, vs $20,00 \pm 8,28$, adultos, $W = 36$, $p = 0,84$, $n = 12/12$) como en el número total de eventos agresivos ($0,5 \pm 0,8$, juveniles, vs $1,08 \pm 1,73$, adultos, $W = 10,5$, $p = 0,32$, $n = 12/12$), contabilizados durante los 7 min de duración de la prueba, tal como se muestran en la Fig. 3.

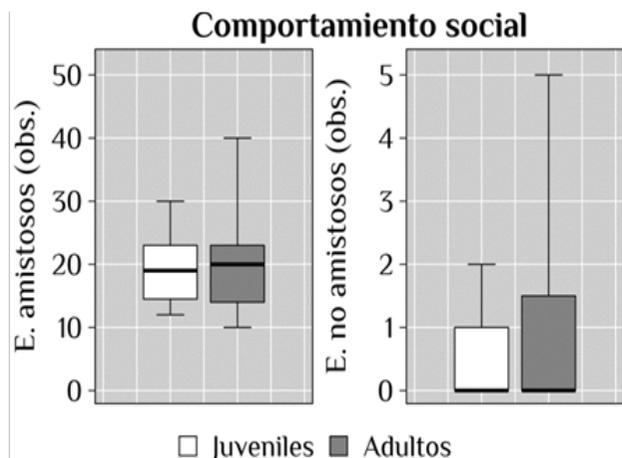


Figura 3. Prueba de interacción social. Sin diferencias significativas tanto en el comportamiento amistoso, como en el no amistoso entre animales juveniles y adultos, $n = 12$ por grupo.

En relación a la última de las pruebas, la FST como medida del nivel de depresión en los animales, se contabilizó (a manera de puntuaciones) mayor inmovilización en los animales adultos respecto a los juveniles ($10,58 \pm 3,09$, juveniles, vs $17,00 \pm 8,26$, adultos, $W = 3$, $p < 0,05$, $n = 12/12$), más no se encontraron diferencias significativas ni en la actividad de nado ($21,42 \pm 9,03$, vs $19,17 \pm 6,63$, adultos, $W = 46,5$, $p = 0,58$, $n = 12/12$) ni en la de escalado ($28,00 \pm 8,73$, juveniles, vs $23,83 \pm 9,16$, adultos, $W = 49,5$, $p = 0,43$, $n = 12/12$). Estos resultados se muestran en la Fig. 4, y sugieren un mayor comportamiento depresivo en los animales adultos.

4, y sugieren un mayor comportamiento depresivo en los animales adultos.

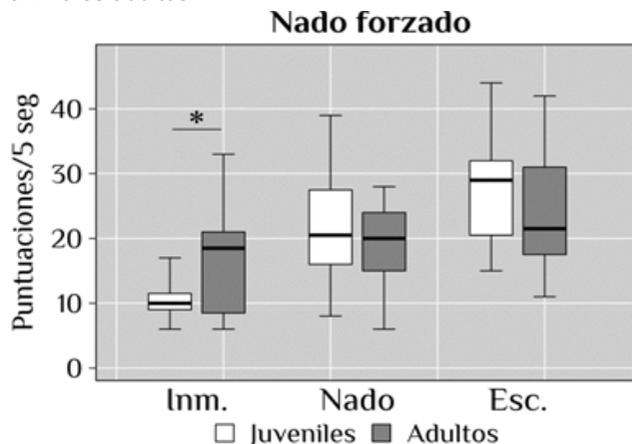


Figura 4. Prueba de nado forzado. Los animales adultos mostraron mayor inmovilización durante la prueba, un indicativo de depresión como resultado de la exposición a una situación de estrés. Sin diferencias significativas entre los comportamientos de nado y escalado entre juveniles y adultos, $n = 12$ por grupo, $*p < 0,05$.

Finalmente, el análisis de factores confirmatorio define un sistema constituido por tres factores ($\chi^2_{23} = 7,33$, $p = 0,06$, bajo la hipótesis nula de que la varianza del sistema puede explicarse por medio de los tres primeros factores), considerando las variables con comunalidades superiores a 0,5: alteración espontánea (SA), defecación (FB), inmovilización (IN) durante la FST, actividad locomotora (LA), actividad central (CN), actividad vertical (VA), y tiempo usado en aseo (GM). El diagrama de dispersión, junto con los poliedros de grupo y los vectores asociados a cada variable, se presenta en la Fig. 5.

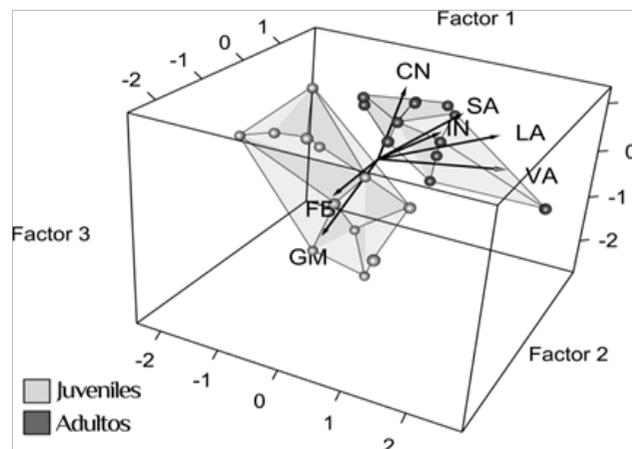


Figura 5. Análisis factorial. El sistema se condensó en tres factores, considerando las variables alternación espontánea (SA), defecación (FB), inmovilización (IN), actividad locomotora (LA), actividad central (CN), actividad vertical (VA) y tiempo invertido en aseo (GM). Los vectores señalan la correlación y el peso de la variable con cada factor. Los poliedros agrupan todos los puntos correspondientes a cada grupo en el espacio tridimensional. Los grupos de animales juveniles y adultos se separan claramente en el espacio de coordenadas, siendo notable como ambos grupos se distinguen por las variables relacionadas con la actividad exploratoria (SA, LA, VA, CN), mayor en los adultos (véase la dirección de los vectores asociados a estas variables), y la ansiedad (CN, GM, FB). A su vez, en el grupo adulto se aprecia una mayor tendencia a la inmovilización (en la FST), comportamiento relacionado a la depresión. Método de extracción de los factores por máxima verosimilitud, rotación "varimax" ortogonal, $n = 12$ por grupo.

Tabla 1. Resumen del análisis factorial. Se presentan las pruebas estadísticas para normalidad multivariada (prueba de Mardia), homogeneidad de las matrices de covarianza (M de Box), y bondad de ajuste para el análisis factorial. Se muestran los autovalores y la proporción de la varianza asociada a cada factor, así como los pesos de las variables en cada uno de estos. SA: alternación espontánea, FB: defecación, IN: inmovilización, LA: actividad locomotora, CN: actividad central, VA: actividad vertical, GM: tiempo usado en aseo.

Estadísticos			Variable	Peso		
Mardia (asimetría y curtosis)	$\chi^2_{84} = 100,76$	$p = 0,10$		Factor 1	Factor 2	Factor 3
M de Box	$\chi^2_{28} = 37,41$	$p = 0,11$	SA	0,26	0,95	0,13
Bondad de ajuste	$\chi^2_3 = 7,33$	$p = 0,06$	FB	-0,14	-0,41	-0,21
	Autovalores	P. varianza	IN	0,40	0,21	0,29
Factor 1	1,96	0,28	LA	0,77	0,48	0,24
Factor 2	1,47	0,21	CN	0,03	0,32	0,60
Factor 3	1,40	0,20	VA	0,98	0,13	0,12
		0,69	GM	-0,40	-0,07	-0,91

Los poliedros, los cuales agrupan todas las observaciones correspondientes a cada grupo, se separan claramente en el sistema de coordenadas tridimensional. Las variables que mayor peso tienen sobre cada factor corresponden a SA (0,95, factor 2), LA (0,77, factor 1), VA (0,98, factor 1), CN (0,60, factor 3), y GM (-0,91, factor 3). La dirección de los vectores señala, al igual que en el caso univariado, mayor alternación espontánea, actividad locomotora, central y vertical, mayor inmovilización, y menor tiempo usado en aseo. Esto se traduce en mayor capacidad cognitiva, actividad exploratoria, depresión y menor ansiedad en los adultos respecto a los juveniles. El resumen del análisis factorial se presenta en la Tabla 1.

DISCUSIÓN

Nuestros resultados señalan una clara diferenciación del comportamiento, en roedores, como consecuencia de la edad del animal. Es importante resaltar qué, aunque este hecho pareciera lógico, en la actualidad no está plenamente documentada la importancia de la edad como una variable determinante en las pruebas de comportamiento. Por ende, escoger equivocadamente un estadio de la edad del animal para realizar una batería de pruebas conductuales, puede llevar a conclusiones erróneas sobre el fenómeno de estudio.

La alternación espontánea refleja la motivación del animal en explorar su ambiente para localizar comida, agua, pareja, refugio o cualquier otro recurso de interés. En un laberinto en T, con solo dos opciones a escoger, existe igual probabilidad de escoger cualquiera de los brazos del laberinto. Cuando el ambiente es pre-explorado, el animal crea una representación espacial del entorno que ha visitado, disminuyendo la probabilidad de volver a visitar el mismo brazo en el ensayo subsiguiente, alcanzando hasta un 75% de alternación (24), incluso 85-90% en la versión modificada del laberinto por la añadidura de una partición central (33). Este comportamiento de alternación es proporcional a la edad del animal; las ratas normales alternan por encima del 50% desde el DPN 30. Antes, su alternación es totalmente azarosa (34). Esto es consecuencia de la falta de

maduración de los circuitos cerebrales durante las primeras semanas de vida de los roedores (35). Por otro lado, los niveles de estrés y ansiedad en el animal pueden disminuir la alternación espontánea (36). Aun así, al no encontrarse diferencias en la defecación entre los individuos juveniles y adultos en la ST, se sugiere que las diferencias en el desempeño en esta prueba pueden responder a la falta de maduración encefálica en los individuos juveniles y de su relación con el establecimiento adecuado de las memorias espaciales.

La OFT, propuesta originalmente como una medida del comportamiento emocional en ratas (37), permite determinar sistemáticamente la actividad exploratoria en un ambiente novedoso, la actividad locomotora general, y proveer al observador un panorama general del comportamiento relacionado con la ansiedad en roedores. En neurociencia y neuropsiquiatría, está extensamente reportado el efecto de fármacos, lesiones, condiciones de cría, entre otros factores, sobre la actividad exploratoria en la OFT. No obstante, la información pertinente a la ontogenia del comportamiento en esta prueba está poco documentada (19). En la OFT y en el laberinto en cruz elevado (elevated plus maze, EPM), las variables usualmente evaluadas comprenden la actividad locomotora y los comportamientos relacionados con la ansiedad y preservación (p.e., tigmotaxis, defecación, evitar los brazos abiertos/expuestos) (25, 38). Adicionalmente, un incremento de la actividad vertical (rearing behavior) se ha correlacionado con la actividad locomotora en la OFT (39, 40); la postura erigida tomada por el animal le permite obtener mayor información somatosensitiva del entorno, siendo este comportamiento parte insigne de la actividad exploratoria (27). El incremento de esta actividad podría explicarse por el aumento de las capacidades físicas del animal a medida que se desarrolla. Sin embargo, el aumento del peso y de estas capacidades no pueden explicar por sí solos el incremento de la actividad exploratoria durante la adolescencia (19). Una posible causa subyace en los cambios en el sistema endocrino durante este período involucrados en el miedo, ansiedad, desinhibición, atracción a lo novedoso y toma de riesgos (19). En este sentido, existe

evidencia de que los cambios en los niveles de hormonas esteroideas juegan un papel importante en el desarrollo del cerebro y del comportamiento durante la adolescencia (41).

Respecto al aseo (grooming), esta variable constituye un comportamiento importante y evolutivamente antiguo observado en muchos taxas animales (42). Más allá de su función higiénica, el aseo tiene otros propósitos no relacionados, como la reducción del estrés, y puede ser desencadenado por varios factores, como por ejemplo la exposición a un ambiente novedoso o a una situación estresante (28, 42). Las condiciones que llevan a la sobreexcitación o agitación del animal, como la novedad y agentes estresores, parecen activar tanto el comportamiento de aseo como el sistema hipotálamo-pituitario-adrenal (42), lo que conlleva a la liberación de la hormona adrenocorticotrófica (ACTH). Esta hormona ejerce su efecto en la corteza suprarrenal, donde se secretan los glucocorticoides (cortisol y corticosterona) involucrados en la respuesta al estrés. Por otro lado, la administración de compuestos ansiolíticos, como el diazepam, tiene el efecto contrario (43). En base a lo anterior, las diferencias observadas en los individuos juveniles y adultos en el presente estudio, respecto a la actividad exploratoria, podrían responder al instinto de preservación de los animales en el estadio juvenil, el cual actúa como agente inhibitorio parcial de la exploración y de la exposición a entornos abiertos sin resguardo.

En relación al comportamiento social en la SIT, son pocos los reportes enfocados en la ontogenia tanto del comportamiento amistoso como del agresivo en ratas. En este sentido, Panksepp (44) estudia el comportamiento de juego en ratas desde el DPN 18 al 62. Reporta un pico en el tiempo dedicado a la actividad de juego entre los DPN 32-40, el cual luego disminuye de forma gradual hasta el DPN 62. Este pico se mantiene tanto en los animales sometidos al procedimiento de aislamiento previo a la prueba, como en los animales mantenidos siempre en grupo antes de la realización de la misma. Sin embargo, su estudio está delimitado al comportamiento asociado al juego, sin tomar en cuenta el resto de los ítems que componen el comportamiento amistoso. Esto podría sugerir que, aunque se observó un nivel similar de interacción social en los grupos juvenil y adulto, la naturaleza de tal interacción podría diferir en estos (mayor tiempo dedicado al juego en los juveniles, por ejemplo).

En la FST, una mayor inmovilización en el grupo adulto sugiere mayores niveles de depresión en estos animales. Además, la FST modificada es de utilidad en el estudio de las bases fisiológicas que subyacen la depresión: estudios farmacológicos muestran que las drogas que actúan como inhibidores de los transportadores de serotonina (serotonin transporter, SERT) incrementan el nado, sin afectar el escalado. Asimismo, las drogas que actúan como inhibidores de los transportadores de noradrenalina (norepinephrine transporter, NET) aumentan el escalado sin afectar el nado

(45, 46). Aun así, no puede llegarse a ninguna conclusión al no encontrarse diferencias significativas, ni en la actividad de nado ni en la de escalado entre juveniles y adultos. Se requeriría un aumento del tamaño de la muestra para comprobar si las diferencias en la inmovilización son producto de diferencias en el comportamiento de nado, de escalado o de ambas. Respecto a la inmovilización, los resultados de la FST presentan ciertas similitudes con los obtenidos por Ulloa et al. (20). Las ratas prepubertas (DPN 24) presentan menor inmovilización que las pubertas (DPN 40) y cierta tendencia (no estadísticamente significativa) de menor inmovilización que las adultas. Además, estos autores señalan un posible aumento de la actividad serotoninérgica en los animales prepubertos, aumento correlacionado al comportamiento de nado en estos animales.

Para finalizar, el análisis factorial señala una clara separación de los grupos juvenil y adulto, y resalta las observaciones ya descritas en el análisis univariado. Las características asociadas a la adultez corresponden a mayor capacidad cognitiva, incremento de la actividad ambulatoria y de la exploración. La inhibición y ansiedad (actitud de resguardo) pareciesen ser características del estadio juvenil, al igual que un menor índice de depresión (menor inmovilización en la FST). No obstante, nuestro estudio limita sus observaciones a los estadios correspondientes al inicio de la adolescencia y de la adultez en las ratas. Por lo anterior se sugiere, para obtener un panorama más amplio, indagar sobre los cambios en períodos más posteriores del desarrollo. Los resultados plantean que en relación a la conducta, evaluada globalmente, los animales se comportan en su adolescencia y adultez como individuos totalmente diferentes, lo cual enfatiza la importancia de considerar la edad de los especímenes como una variable relevante en el diseño y análisis de cualquier prueba experimental de comportamiento.

CONCLUSIONES

El desarrollo ontogenético en roedores conlleva a cambios en el comportamiento sustanciales, producto del crecimiento y de la maduración encefálica del animal. En contraste con los individuos adultos, los juveniles, pertenecientes a los estadios prepuberal y puberal, muestran disminución de la actividad exploratoria, menor exposición a entornos abiertos, menor desempeño cognitivo y menor tendencia a tomar comportamientos relacionados con la depresión bajo situaciones de estrés. Estas observaciones se materializan en menor actividad locomotora, menor actividad vertical, disminución de la actividad central en el campo abierto, comportamiento de aseo incrementado, menor alternación espontánea en el laberinto en T, e inmovilización disminuida en la prueba de nado forzado. Además, bajo condiciones poco estresantes, el comportamiento social no parece diferir sustancialmente.

Agradecimientos. Los autores desean agradecer al Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico de la Universidad

de Carabobo, por el financiamiento parcial de este estudio a través del proyecto CDCH AM-012-2014, al Dr. Antonio Eblen-Zajjur por su asesoría científica en el diseño del estudio y a la M.V. Silvia Guidotti por su asesoría científica en el manejo de los grupos de animales.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ellenbroek B, Youn J. Rodent models in neuroscience research: is it a rat race? *Dis Model Mech*. 2016;9(10):1079-1087.
- Caldarone BJ, Zachariou V, King SL. Rodent models of treatment-resistant depression. *Eur J Pharmacol*. 2015;753(15):51-65.
- Thomas KR, Capecchi MR. Site-directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryo-derived stem cells. *Cell*. 1987;51(3):503-512.
- Tong C, Huang G, Ashton C, Li P, Ying QL. Generating gene knockout rats by homologous recombination in embryonic stem cells. *Nat Protoc*. 2011;6(6):827-844.
- Shao Y, Guan Y, Wang L, Qiu Z, Liu M, Chen Y, et al. CRISPR/Cas-mediated genome editing in the rat via direct injection of one-cell embryos. *Nat Protoc*. 2014;9(10):2493-2512.
- Crystal JD. Animal models of source memory. *J Exp Anal Behav*. 2016;105(1):56-67.
- Mogil JS. Animal models of pain: progress and challenges. *Nat Rev Neurosci*. 2009;10(4):283-294.
- Kumar V, Bhat ZA, Kumar D. Animal models of anxiety: a comprehensive review. *J Pharmacol Toxicol Methods*. 2013;68(2):175-183.
- Reus GZ, Abelaira HM, Leffa DD, Quevedo J. Cognitive dysfunction in depression: lessons learned from animal models. *Neurol Disord Drug Targets*. 2014;13(10):1860-70.
- Betarbet R, Sherer TB, Greenamyre JT. Animal models of Parkinson's disease. *Bioessays*. 2002;24(4):308-318.
- Götz J, Ittner LM. Animal models of Alzheimer's disease and fronto temporal dementia. *Nat Rev Neurosci*. 2008;9(7):532-544.
- Ratajczak P, Wozniak A, Nowakowska E. Animal models of schizophrenia: developmental preparation in rats. *Acta Neurobiol Exp*. 2013;73(4):472-84.
- Coronel-Oliveros CM, Pacheco-Calderón R. Prenatal exposure to ketamine in rats: Implications on animal models of schizophrenia. *Dev Psychobiol*. 2018;60(1):30-42.
- Nestler EJ, Hyman SE. Animal models of neuropsychiatric disorders. *Nat Neurosci*. 2010;13(10):1161-1169.
- Neha I, Sodhi RK, Jaggi AS, Singh N. Animal models of dementia and cognitive dysfunction. *Life Sci*. 2014;109(2):73-86.
- Dixon LK, Defries JC. Development of open-field behavior in mice: Effects of age and experience. *Dev Psychobiol*. 1968;1(2):100-107.
- Goodrick CL. Free exploration and adaptation within an open field as a function of trials and between-trial-interval for mature-young, mature-old, and senescent Wistar rats. *J Gerontol*. 1971;26(1):58-62.
- Masur J, Schutz MT, Boerngen R. Gender differences in open-field behavior as a function of age. *Dev Psychobiol*. 1980;13(2):107-110.
- Lynn DA, Brown GR. The ontogeny of exploratory behavior in male and female adolescent rats (*Rattus norvegicus*). *Dev Psychobiol*. 2009;51(6):513-520.
- Ulloa RE, Díaz-Valderrama A, Herrera-Pérez J, León-Olea M, Martínez-Mota L. Age differences in the impact of forced swimming test on serotonin transporter levels in lateral septum and dorsal raphe. *Behav Brain Funct*. 2014; 10(1):3.
- Tirelli E, Laviola G, Adriani W. Ontogenesis of behavioral sensitization and conditioned place preference induced by psychostimulants in laboratory rodents. *Neurosci Biobehav Rev*. 2003; 27(1):163-178.
- vanSluytersRC, Obernier A. Guidelines for the care and use of mammals in neuroscience and behavioral research. *Contemp Top Lab Anim Sci*, 2004; 43(2):48-52.
- AVECAL. Manual para la producción y uso ético de animales de laboratorio. Caracas, Venezuela: AVECAL; 2002.
- Deacon RM, Rawlins JNP. T-maze alternation in the rodent. *Nat Protoc*. 2006; 1(1):7-12.
- Prut L, Belzung C. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. *Eur J Pharmacol*. 2003; 463(1):3-33.
- Brown G. Tracker 4.87: Video Analysis and Modeling Tool. Open Source Physics. Davidson College, USA; 2009.
- Lever C, Burton S, O'Keefe J. Rearing on hind legs, environmental novelty, and the hippocampal formation. *Rev Neurosci*. 2006; 17(1-2):111-134.
- Smolinsky AN, Bergner CL, LaPorte JL, Kalueff AV. Analysis of grooming behavior and its utility in studying animal stress, anxiety, and depression. En: GouldTD, editor. *Mood and Anxiety Related Phenotypes in Mice: Characterization Using Behavioral Tests [E-reader version]*. Humana Press; 2009. p.21-36
- File SE, Hyde JRG. Can social interaction be used to measure anxiety?. *Br J Pharmacol*. 1978; 62(1):19-24.
- Slattery DA, Cryan JF. Using the rat forced swim test to assess antidepressant-like activity in rodents. *Nat Protoc*. 2012;7(6):1009-1014.
- Lucki I. The forced swimming test as a model for core and component behavioral effects of antidepressant drugs. *Behav Pharmacol*. 1997; 8(6-7):523-532.
- R Core Team. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing. Vienna, Austria; 2015. <http://www.R-project.org/>
- Deacon RM, Penny C, Rawlins JNP. Effects of medial prefrontal cortex cytotoxic lesions in mice. *Behav Brain Res*. 2003; 139(1):139-155.
- Egger GJ, Livesey PJ, Dawson RG. Ontogenetic aspects of central cholinergic involvement in spontaneous alternation behavior. *Dev Psychobiol*. 1973;6(4):289-299.
- Lalonde R (2002). The neurobiological basis of spontaneous alternation. *Neurosci Biobehav Rev*. 2002; 26(1):91-104.

36. Bardgett ME, Taylor GT, Csemansky JG, Newcomer JW, Nock B. Chronic corticosterone treatment impairs spontaneous alternation behavior in rats. *Behav Neural Biol.* 1994;61(2):186-190.
37. Hall CS. Emotional behavior in the rat. I. Defecation and urination as measures of individual differences in emotionality. *J Comp Psychol.* 1934; 18(3):385-403.
38. Walf AA, Frye CA. The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents. *Nat Protoc.* 2007;2(2):322-328.
39. Thiel CM, Müller CP, Huston JP, Schwarting RKW. High versus low reactivity to a novel environment: behavioural, pharmacological and neurochemical assessments. *Neuroscience.* 1999; 93(1):243-251.
40. Bland BH, Oddie SD. Theta band oscillation and synchrony in the hippocampal formation and associated structures: the case for its role in sensorimotor integration. *Behav Brain Res.* 2001; 127(1):119-136.
41. Sisk CL, Zehr JL. Pubertal hormones organize the adolescent brain and behavior. *Front Neuroendocrinol.* 2005; 26(3):163-174.
42. Spruijt BM, Van Hooff JA, Gispen WH. Ethology and neurobiology of grooming behavior. *Physiol Rev.* 1992; 72(3):825-852.
43. Barros HMT, Tannhauser SL, Tannhauser MAL, Tannhauser M. The effects of GABAergic drugs on grooming behaviour in the open field. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 1994;74(4-5):339-344.
44. Panksepp J. The ontogeny of play in rats. *Dev Psychobiol.* 1981;14(4):327-332.
45. Detke MJ, Lucki I. Detection of serotonergic and noradrenergic antidepressants in the rat forced swimming test: the effects of water depth. *Behav Brain Res.* 1995;73(1):43-46.
46. Cryan JF, Valentino RJ, Lucki I. Assessing substrates underlying the behavioral effects of antidepressants using the modified rat forced swimming test. *Neurosci Biobehav Rev.* 2005;29(4):547-569.