



## VALIDEZ DEL LABERINTO CIRCULAR ELEVADO COMO MODELO ANIMAL DE ANSIEDAD EN ESTUDIOS TOXICOLÓGICOS

**Luis Heredia Santaella**

**Dipòsit Legal: T.1558-2013**

**ADVERTIMENT.** L'accés als continguts d'aquesta tesi doctoral i la seva utilització ha de respectar els drets de la persona autora. Pot ser utilitzada per a consulta o estudi personal, així com en activitats o materials d'investigació i docència en els termes establerts a l'art. 32 del Text Refós de la Llei de Propietat Intel·lectual (RDL 1/1996). Per altres utilitzacions es requereix l'autorització prèvia i expressa de la persona autora. En qualsevol cas, en la utilització dels seus continguts caldrà indicar de forma clara el nom i cognoms de la persona autora i el títol de la tesi doctoral. No s'autoritza la seva reproducció o altres formes d'explotació efectuades amb finalitats de lucre ni la seva comunicació pública des d'un lloc aliè al servei TDX. Tampoc s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant als continguts de la tesi com als seus resums i índexs.

**ADVERTENCIA.** El acceso a los contenidos de esta tesis doctoral y su utilización debe respetar los derechos de la persona autora. Puede ser utilizada para consulta o estudio personal, así como en actividades o materiales de investigación y docencia en los términos establecidos en el art. 32 del Texto Refundido de la Ley de Propiedad Intelectual (RDL 1/1996). Para otros usos se requiere la autorización previa y expresa de la persona autora. En cualquier caso, en la utilización de sus contenidos se deberá indicar de forma clara el nombre y apellidos de la persona autora y el título de la tesis doctoral. No se autoriza su reproducción u otras formas de explotación efectuadas con fines lucrativos ni su comunicación pública desde un sitio ajeno al servicio TDR. Tampoco se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al contenido de la tesis como a sus resúmenes e índices.

**WARNING.** Access to the contents of this doctoral thesis and its use must respect the rights of the author. It can be used for reference or private study, as well as research and learning activities or materials in the terms established by the 32nd article of the Spanish Consolidated Copyright Act (RDL 1/1996). Express and previous authorization of the author is required for any other uses. In any case, when using its content, full name of the author and title of the thesis must be clearly indicated. Reproduction or other forms of for profit use or public communication from outside TDX service is not allowed. Presentation of its content in a window or frame external to TDX (framing) is not authorized either. These rights affect both the content of the thesis and its abstracts and indexes.

**UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI**  
**Departamento de Psicología**



**TESIS DOCTORAL**

Defendida por:

Luis HEREDIA SANTAELLA

**Validez del laberinto circular  
elevado como modelo animal de  
ansiedad en estudios toxicológicos**

Dirigida por la Dra. Margarita TORRENTE TORNÉ

Codirigida por la Dra. María Teresa COLOMINA FOSCH

Tarragona 2013



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI  
VALIDEZ DEL LABERINTO CIRCULAR ELEVADO COMO MODELO ANIMAL DE ANSIEDAD EN ESTUDIOS TOXICOLÓGICOS  
Luis Heredia Santaella  
Dipòsit Legal: T.1558-2013



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

Hago constar que el trabajo titulado "Validez del laberinto circular elevado como modelo animal de ansiedad en estudios toxicológicos" que presenta el Sr. Luis Heredia Santaella para la obtención del título de Doctor, se ha realizado bajo mi dirección en el Departamento de Psicología de esta Universidad.

Tarragona, 20 de Abril del 2013

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'M. T. Torné'.

Margarita Torrente Torné

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'M. Teresa Colomina Fosch'.

M. Teresa Colomina Fosch

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI  
VALIDEZ DEL LABERINTO CIRCULAR ELEVADO COMO MODELO ANIMAL DE ANSIEDAD EN ESTUDIOS TOXICOLÓGICOS  
Luis Heredia Santaella  
Dipòsit Legal: T.1558-2013

## Agradecimientos

A las Dras. Torrente y Colomina por ofrecerme la oportunidad de acercarme a la ciencia. A la Dra. Vicens por su ayuda desinteresada y esforzada en tiempos difíciles. A mis compañeros de facultad por amenizar esos ‘ratos de desconexión’ necesarios y urgentes en ocasiones. A Antonio Espadas por sus ‘matemáticas’. A Jose Lima, por su apoyo y comprensión, porque siempre está a mi lado. A mi familia, que sufre y se alegra conmigo. A mi mujer Miriam. Tu amor incondicional es la única ciencia exacta, verdadera y útil que existe en mi vida. Y a mi hija Abril porque desde que nació en mi vida siempre es primavera. Gracias a todos.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI  
VALIDEZ DEL LABERINTO CIRCULAR ELEVADO COMO MODELO ANIMAL DE ANSIEDAD EN ESTUDIOS TOXICOLÓGICOS  
Luis Heredia Santaella  
Dipòsit Legal: T.1558-2013

*‘La verdad adelgaza y no quiebra’  
Miguel de Cervantes*

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI  
VALIDEZ DEL LABERINTO CIRCULAR ELEVADO COMO MODELO ANIMAL DE ANSIEDAD EN ESTUDIOS TOXICOLÓGICOS  
Luis Heredia Santaella  
Dipòsit Legal: T.1558-2013

# Índice general

<b>I</b>	<b>Introducción</b>	<b>1</b>
<b>1.</b>	<b>Toxicología de la conducta</b>	<b>3</b>
1.1.	Estudios neuroconductuales en toxicología . . . . .	3
1.2.	Éteres difenílicos polibromados . . . . .	5
1.2.1.	Estructura, propiedades y usos . . . . .	5
1.2.2.	Fuentes de exposición ambiental . . . . .	7
1.2.3.	Efectos adversos descritos . . . . .	8
<b>2.</b>	<b>La ansiedad</b>	<b>11</b>
2.1.	Definición del concepto de ansiedad . . . . .	11
2.2.	Epidemiología de la ansiedad . . . . .	12
2.3.	Psicobiología de la ansiedad . . . . .	16
2.3.1.	Bases genéticas y vulnerabilidad . . . . .	16
2.3.2.	Neuroanatomía de la ansiedad . . . . .	18
2.3.3.	Neurotransmisores y farmacopea . . . . .	21
<b>3.</b>	<b>Modelos animales de ansiedad</b>	<b>27</b>
3.1.	Introducción teórica e importancia en la investigación	27
3.2.	Paradigma de aproximación/evitación . . . . .	30
3.2.1.	Laberinto circular elevado (Zero maze test) . .	32
3.3.	Limitaciones de los modelos incondicionados . . . . .	36
3.3.1.	Nivel basal de ansiedad y capacidad de detección	36
3.3.2.	Procedimiento experimental e influencia ambiental . . . . .	38
3.3.3.	Interpretación de los parámetros (Ansiedad vs Actividad) . . . . .	39
3.3.4.	Traslación de los resultados a humanos . . . . .	41
<b>II</b>	<b>Hipótesis y Objetivos</b>	<b>45</b>
1.1.	Propósito y fundamento . . . . .	47



## Índice general

---

1.2. Hipótesis . . . . .	47
1.3. Objetivo general . . . . .	48
1.3.1. Objetivos específicos . . . . .	48
<b>III Materiales y Métodos</b>	<b>49</b>
<b>1. Materiales generales</b>	<b>51</b>
1.1. Animales de experimentación . . . . .	51
1.2. Tóxicos, fármacos y método de administración . . . . .	52
<b>2. Métodos generales</b>	<b>53</b>
2.1. Procedimiento de amansamiento . . . . .	53
2.2. Procedimiento de aislamiento social . . . . .	54
2.3. Valoración conductual . . . . .	54
2.3.1. Batería de observación funcional . . . . .	54
2.3.2. Laberinto acuático de Morris . . . . .	55
2.3.3. Caja de luz-oscuridad . . . . .	57
2.3.4. Laberinto circular elevado . . . . .	58
2.4. Estadística . . . . .	59
<b>IV Resultados</b>	<b>61</b>
<b>1. Behavioral effects of oral subacute exposure to BDE-209 in young adult mice: A preliminary study</b>	<b>63</b>
<b>2. Individual housing and handling procedures modify anxiety levels of Tg2576 mice assessed in the zero maze test</b>	<b>71</b>
<b>3. Assessing anxiety in C57BL/6J mice: A pharmacological characterization of the zero maze test</b>	<b>79</b>

**Índice general**

---

<b>V</b>	<b>Discusión</b>	<b>91</b>
<b>VI</b>	<b>Conclusiones</b>	<b>101</b>
<b>VII</b>	<b>Bibliografía</b>	<b>105</b>
<b>VIII</b>	<b>Anexos</b>	<b>129</b>

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI  
VALIDEZ DEL LABERINTO CIRCULAR ELEVADO COMO MODELO ANIMAL DE ANSIEDAD EN ESTUDIOS TOXICOLÓGICOS  
Luis Heredia Santaella  
Dipòsit Legal: T.1558-2013

## Parte I

# Introducción

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

VALIDEZ DEL LABERINTO CIRCULAR ELEVADO COMO MODELO ANIMAL DE ANSIEDAD EN ESTUDIOS TOXICOLÓGICOS

Luis Heredia Santaella

Dipòsit Legal: T.1558-2013

## CAPÍTULO 1

# Toxicología de la conducta

---

### 1.1. Estudios neuroconductuales en toxicología

En la actualidad existe una gran preocupación por evaluar los posibles efectos adversos de una gran cantidad de compuestos químicos que son liberados a la atmósfera principalmente en los países más industrializados. A pesar de que existen mecanismos de control para la fabricación, comercialización y uso de dichos productos, la validez de dichos métodos de control podría ser cuestionada por reduccionista y por no tener en cuenta muchos factores involucrados en la capacidad de los agentes químicos contaminantes para afectar a la salud de la población (Balbus y cols., 2013). Existe a este respecto abundante literatura que muestra como la liberación de dichos compuestos químicos a la atmosfera y la posterior exposición de la población a ellos puede producir efectos adversos en la salud física de los seres humanos y afectar a la salud mental alterando funciones de la cognición humana como la memoria, la atención y el aprendizaje (Zala y Penn 2004).

La toxicología de la conducta es el estudio de cómo algunas drogas, compuestos químicos y otras condiciones ambientales (en su consideración de tóxicas) cambian la forma en que se comportan los organismos. De especial interés es el sistema nervioso como uno de los posibles objetivos de dichos compuestos químicos dando

## Capítulo 1. Toxicología de la conducta

---

<b>Dominio</b>	<b>Modelos</b>
Baterías de cribado	Batería de observación funcional (FOB) Batería de análisis funcional y conductual del fenotipo del ratón (SHIRPA)
Actividad y función motora	Test del campo abierto Rotarod Cajas de actividad Ritmo circadiano de actividad (24 h)
Memoria y aprendizaje	Laberinto acuático de Morris Test de evitación activa/pasiva Laberinto de Barnes Condicionamiento operante
Ansiedad	Laberinto elevado en cruz Test del tablero agujereado Conflicto de Vogel

---

Cuadro 1.1: Algunos de los modelos animales utilizados en toxicología de la conducta agrupados por dominios

lugar al campo de la neurotoxicología. La neurotoxicología es un campo importante en la prevención de riesgos para la salud de la población ya que el sistema nervioso es especialmente vulnerable a muchos compuestos químicos que pueden actuar en múltiples sitios y de formas diferentes (Moser y cols., 2008). Los efectos observados en la conducta son considerados como el reflejo de cambios en la comunicación neuronal o como alteraciones morfológicas susceptibles de evaluación. Por ello, la conducta se considera un indicador de la función neural general (Tilson 1990; Kulig 1996). En la actualidad disponemos de un gran número de modelos animales para el estudio de los efectos neuroconductuales producidos por la exposición a tóxicos. Todos estos modelos se encuentran agrupados dentro de diferentes dominios que abarcan: baterías de cribado iniciales, modelos para el estudio de la función y la actividad motora,

## 1.2. Éteres difenílicos polibromados

modelos para la evaluación del aprendizaje y la memoria y, para otros dominios de la emocionalidad como la ansiedad o la depresión. En el cuadro 1.1 se encuentran recopilados algunos de ellos.

Algunos de estos modelos animales han sido incluidos en las guías de algunos organismos internacionales de protección ambiental para evaluar la toxicidad de compuestos químicos siguiendo la recomendación de expertos en el ámbito y, actualmente, su aplicación está ampliamente extendida (Moser 2011). De especial interés es el estudio de los denominados disruptores de la función endocrina debido a que han demostrado ampliamente producir alteraciones conductuales en animales y humanos (Zala y Penn 2004). Dedicaremos el siguiente apartado de este capítulo a conocer uno de estos compuestos, los éteres difenílicos polibromados.

## 1.2. Éteres difenílicos polibromados

### 1.2.1. Estructura, propiedades y usos

Los éteres difenílicos polibromados (PBDEs) constituyen un grupo de compuestos químicos ampliamente utilizados en la industria. Su estructura química general es  $C_{12}H_{10-x}Br_xO$  y forman una gran familia de 209 congéneres categorizados en función del número de átomos de bromo (Br) que contienen y su posición relativa en el interior de la molécula (Darnerud y cols., 2001) Figura 1.1

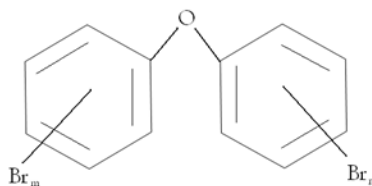


Figura 1.1: Estructura química general de los PBDEs

De los 209 congéneres son principalmente tres los que tienen interés a nivel comercial: el éter de pentabromodifenilo (penta-



## **Capítulo 1. Toxicología de la conducta**

---

BDE), el éter de octabromodifenilo (octa-BDE) y el éter de decabromodifenilo (deca-BDE), siendo este último compuesto el más bromado de la familia de congéneres y el que se comercializa de una forma más pura (superior al 98 %) (Costa y Giordano 2007). Son compuestos resistentes a la degradación y con tendencia a acumularse en el medio ambiente tal como muestra su detección en sedimentos, aguas superficiales, lodos residuales, el polvo de las casas y muestras de aire en el interior de edificios y fuera de ellos en varios continentes (Schechter y cols., 2009; Ali y cols., 2011; Covaci y cols., 2011). Además, dada su naturaleza lipofílica, se acumulan en el tejido adiposo de humano siendo aquellas formas menos bromadas las que tienden a acumularse en mayor cantidad (Stapleton y cols., 2006).

El interés comercial de dichos productos radica en su capacidad para actuar como pirorretardantes aumentando la resistencia al fuego de aquellos productos a los que se adiciona (Darnerud, Eriksen y cols., 2001). Debido a esta capacidad, se podían encontrar en las cubiertas plásticas de muchos electrodomésticos, mobiliario, asientos de coches, alfombras y diversos tipos de goma (Schechter y cols., 2005; Talsness 2008). Sin embargo, el penta-BDE y el octa-BDE fueron prohibidos en la Unión Europea en 2004, quedando el deca-BDE fuera de esta prohibición hasta el año 2008. En ese año se prohibía en la Unión Europea la comercialización y el uso de dicho compuesto en aplicaciones eléctricas y electrónicas (OJ\_L\_271/48 15.10.2005). En este lapso de cuatro años, el uso de la forma más bromada de los compuestos, el deca-BDE, se incrementó de forma notable por ser el único permitido. De hecho, el deca-BDE es el compuesto más utilizado todavía en muchos países y supone el 83 % de la producción total de PBDEs en el mundo (BSEF 2009).

### **1.2.2. Fuentes de exposición ambiental**

Las principales rutas de exposición a los PBDEs son la dieta, la inhalación de aire contaminado y la inhalación/ingesta del polvo en las casas (Costa y Giordano 2007; Talsness 2008; Besis y Samara 2012). Entre ellas, la dieta se considera la vía de exposición más

## 1.2. Éteres difenílicos polibromados

---

importante (Talsness 2008). Se ha detectado la presencia de estos compuestos en diversos alimentos como el marisco, el pescado, los productos cárnicos y algunos vegetales (Oros y cols., 2005; Domingo y cols., 2008; Domingo 2012). Esto podría ser debido a la naturaleza lipofílica de los PBDEs y a su resistencia a la degradación que favorecería su acumulación en el medio ambiente pasando a formar parte de la cadena alimenticia. Una muestra de ello es su presencia en distintas especies de mamíferos, peces y aves (Ueno y cols., 2004; Guerra y cols., 2012; Rotander y cols., 2012). En este sentido y en especial para la población infantil, existe una vía de exposición a través de la leche materna debido a que ha demostrado acumular dichos compuestos (Park y cols., 2011). Sin embargo, la exposición a través de la dieta resulta insuficiente para explicar los altos niveles de estos productos encontrados en humanos (Lorber 2008).

Una de las rutas de exposición propuestas para explicar estos niveles es la que se produce a través de la inhalación de aire contaminado y la inhalación/ingesta de polvo, siendo ésta última especialmente relevante para la población infantil (Besis y Samara 2012). Las concentraciones de PBDEs en muestras de aire del exterior de los edificios son especialmente altas en los meses más calurosos (Cetin y Odabasi 2008) y en zonas urbanas e industrializadas (Castro-Jimenez y cols., 2011). A pesar de ello, numerosos estudios muestran concentraciones superiores, de hasta 50 veces, en muestras de aire del interior de edificios (Besis y Samara 2012). La presencia tan alta de estos compuestos en el interior de los mismos favorece que éstos acaben depositándose en el polvo y puedan acabar siendo inhalados o ingeridos incrementando la aportación de estas vías de exposición y explicando los niveles hallados en humanos (Lorber 2008). A remarcar en este sentido son los resultados de algunas investigaciones que sugieren que, en las sociedades modernas los seres humanos pasan el 80 % del tiempo en el interior de edificios (Butt y cols., 2004; Wilford y cols., 2004).

## **Capítulo 1. Toxicología de la conducta**

---

### **1.2.3. Efectos adversos descritos**

En la actualidad, la mayoría de estudios disponibles se centran en los efectos derivados de una exposición pre y postnatal a PBDEs. Esto es debido a la gran alarma social generada por la exposición de la población infantil y su posible repercusión sobre el desarrollo del sistema nervioso en sus etapas críticas (Costa y Giordano 2007; Besis y Samara 2012). Dentro de los diversos congéneres de los PBDEs, son los menos bromados aquellos que presentan una mayor toxicidad. Entre los efectos adversos observados en estos estudios podemos encontrar alteraciones en el sistema reproductivo como la reducción de esperma en machos y cambios en la maduración de los ovarios y otras estructuras del sistema reproductor en hembras (Costa y Giordano 2007).

Los PBDEs y en especial aquellos congéneres menos bromados, como el tetra-BDE o el penta-BDE, también actúan como disruptores endocrinos alterando las concentraciones de la hormona tiroxina (T4) como demuestran diversos estudios (Driscoll y cols., 2006; Richardson y cols., 2008; Feng y cols., 2012; Leijds y cols., 2012; Johnson y cols., 2013). La alteración del sistema endocrino puede resultar crítica para un correcto desarrollo del sistema nervioso y conducir a posteriores alteraciones neuroconductuales en animales y humanos (Ahmed y cols., 2008).

Los estudios que se han realizado en animales respecto al neurodesarrollo muestran la presencia de alteraciones derivadas de la exposición a varios congéneres de los PBDEs. Entre ellos podemos encontrar retrasos en la adquisición del reflejo parpebral (Gee y Moser 2008) y en habilidades motoras como la capacidad de escalar (Branchi y cols., 2002). A nivel neuroconductual, y tras exposición postnatal, encontramos alteraciones en la capacidad de habituación a nuevos espacios, alteraciones en el aprendizaje espacial, en la capacidad de atención y el control inhibitorio (Driscoll, Gibson y cols., 2006; Viberg y cols., 2006; Johansson y cols., 2008; Viberg 2009).

A pesar de los numerosos estudios realizados en animales con exposición pre y postnatal, en la actualidad disponemos de pocos

## **1.2. Éteres difenílicos polibromados**

---

estudios que hayan evaluado los efectos neuroconductuales de los PBDEs en población adulta. Sólo disponemos de algunos estudios que se han centrados principalmente en los daños fisiopatológicos hallados a grandes dosis de exposición (Norris y cols., 1975; Darnerud, Eriksen y cols., 2001). En estos estudios se consideró el deca-BDE como seguro debido a su relativamente baja biodisponibilidad y acumulación en el organismo en comparación con otros congéneres menos bromados. Sin embargo, este compuesto puede ser metabolizado generando compuestos menos bromados y acumularse de esta forma en humanos y animales (Kierkegaard y cols., 2007; Stapleton y cols., 2009; Noyes y cols., 2011). Dado que el BDE-209 ha demostrado causar alteraciones permanentes en el sistema colinérgico tras una exposición repetida (Liang y cols., 2010) y el BDE-47 puede actuar como agonista parcial o total de los receptores GABA<sub>A</sub> (Hendriks y cols., 2010), una alteración en la memoria y los niveles de ansiedad en adultos podría ser una hipótesis coherente. Sin embargo, en un reciente estudio realizado por Belles y cols., (2010) no se encontraron alteraciones en ratas adultas expuestas a penta-BDE.

No obstante, nuestro conocimiento sobre los efectos derivados de la exposición a PBDEs en adultos debería ser ampliado ya que cada vez existe una mayor evidencia de una exposición laboral en trabajadores de fábricas de reciclaje de material electrónico entre otros (Qu y cols., 2007; Yuan y cols., 2008; Schecter, Colacino y cols., 2009).

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

VALIDEZ DEL LABERINTO CIRCULAR ELEVADO COMO MODELO ANIMAL DE ANSIEDAD EN ESTUDIOS TOXICOLÓGICOS

Luis Heredia Santaella

Dipòsit Legal: T.1558-2013

## CAPÍTULO 2

# La ansiedad

---

### 2.1. Definición del concepto de ansiedad

La definición de la ansiedad es una tarea difícil en la actualidad. La ansiedad es una emoción primaria cuya función es preservar la vida. En individuos sanos, dicha emoción facilita la predisposición a mantener acciones que preservan la seguridad y el bienestar (Lang y cols., 2000). La ansiedad podría ser definida como una compleja mezcla de emociones y cogniciones orientadas hacia un futuro incierto (Barlow 2002). Sin embargo, muchos autores no estarían de acuerdo con esta definición. Una de las dificultades más frecuentes es la incapacidad para distinguir entre ansiedad y miedo.

Entre las diferentes propuestas teóricas tradicionales que tratan de explicar la relación entre ansiedad y miedo encontramos: la consideración de la ansiedad como un caso concreto de miedo aprendido (Eysenck 1991) o la ansiedad entendida como un estado de miedo elicitado por estímulos condicionados relacionados con el castigo o bien como una anticipación de la frustración generada por otros estímulos (Gray 1982). Algunos autores sugieren que los términos ansiedad y miedo son totalmente intercambiables ya que consideran que 'el miedo implica la evaluación intelectual de un estímulo amenazante y la ansiedad es la respuesta emocional a esta evaluación' (Beck y Emery 2005). Entre los autores que defienden la diferenciación entre ansiedad y miedo encontramos también diferentes consideraciones. Para Sullivan (1956), el miedo hace referencia a una situación de autoprotección mientras que la ansiedad es un producto de la educación. Por su parte, Ohman (1993) distinguió entre miedo

## Capítulo 2. La ansiedad

---

y ansiedad en función de si su desencadenante es conocido (miedo) o no (ansiedad) y en una propuesta más actual sugiere que es la incapacidad para evitar el estímulo aversivo lo que conduce a la ansiedad (Ohman 2008). Con todo esto y a pesar de la abundancia de estudios que muestran la separación entre miedo y ansiedad, tanto de enfoque biológico como cognitivo, la discusión respecto a la definición de la experiencia subjetiva de estas emociones sigue vigente hoy en día (Barlow 2002).

Respecto a la dimensionalidad de la ansiedad encontramos la tradicional distinción propuesta por Spielberger (1983) entre ansiedad estado y ansiedad rasgo que ha sido relacionada con miedo y ansiedad respectivamente. Y la propuesta realizada por Nitschke y cols., (2000) que distingue entre una ansiedad somática relacionada con las experiencias de pánico, la emoción del miedo y diversas repuestas fisiológicas, y la ansiedad anticipatoria relacionada con una cierta preocupación por el futuro acompañada de expectativas pesimistas y negativas. Toda esta variedad de teorizaciones acerca del fenómeno de la ansiedad dificulta enormemente el trabajo científico que, en última instancia, debe optar por alguna de sus diversas conceptualizaciones y trabajar a partir de ella.

### 2.2. Epidemiología de la ansiedad

Los trastornos mentales suponen un serio problema que causa un evidente declive en la calidad de vida, el nivel de independencia y la productividad de las personas afectadas (Ormel y cols., 2008; Alonso y cols., 2011). Sólo en Europa, recientes estudios estiman que cerca del 27% de la población adulta, con edades comprendidas entre los 18 y los 65 años, sufre algún tipo de trastorno mental. Esto supone una cantidad estimada de 300 millones de personas afectadas (Wittchen y cols., 2011). La aparición temprana de los trastornos mentales ha sido relacionada con el nivel de desarrollo de los países, siendo los países más desarrollados aquellos que presentan una mayor tasa de prevalencia-vida (21,5%) y los de bajo nivel de desarrollo los que

## 2.2. Epidemiología de la ansiedad

presentan una tasa de prevalencia-vida menor (11,7%) (Kawakami y cols., 2012). Entre los diferentes tipos de trastornos mentales, son los trastornos de ansiedad los que presentan una prevalencia más alta. En Europa se ha estimado para los trastornos de ansiedad una prevalencia-año del 14% (Wittchen, Jacobi y cols., 2011). Una tasa muy superior al resto de trastornos mentales (Figura 2.1). En los Estados Unidos (EUA), se estima una prevalencia-año mayor que en Europa, alcanzando una cifra cercana al 28,8% (Kessler y Wang 2008).

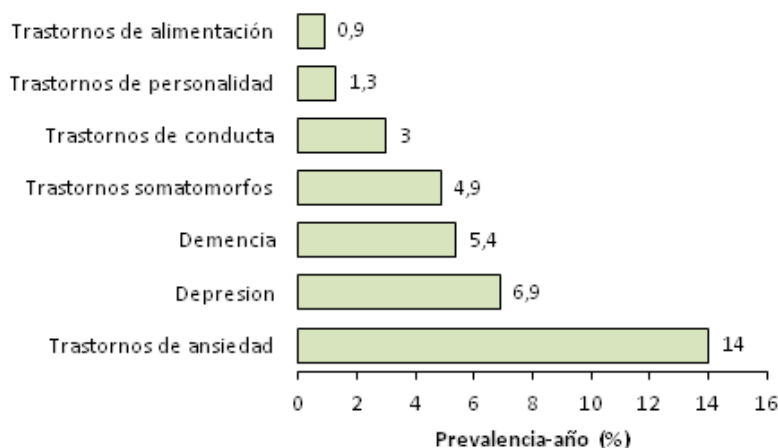


Figura 2.1: Trastornos mentales según su prevalencia-año en Europa. Adaptado de Wittchen, Jacobi y cols., (2011).

Entre los adolescentes son también estos trastornos los predominantes por encima de los trastornos del estado de ánimo y de abuso de sustancias (Kessler y cols., 2012). Respecto a la población mayor de 65 años, se ha pensado tradicionalmente que la prevalencia de dichos trastornos se reducía con la edad (Jorm 2000). Sin embargo, se han encontrado diferencias significativas en la prevalencia de dichos trastornos entre los países más desarrollados y el resto. Un reciente



## Capítulo 2. La ansiedad

---

estudio realizado por Prina y cols., (2011) ha encontrado tasas de prevalencia menores en países como China e India frente a los países europeos durante la vejez. Dentro de los denominados trastornos de ansiedad el Manual diagnóstico y estadístico de los trastornos mentales (DSM-IV-TR) contempla diferentes subtipos (Cuadro 2.1).

### Trastornos de ansiedad

---

	Crisis de angustia
	Agorafobia
F41.00	Trastorno de angustia sin agorafobia
F40.01	Trastorno de angustia con agorafobia
F40.00	Agorafobia sin historia de trastorno de angustia
F40.02	Fobia específica
F40.10	Fobia social
F42.80	Trastorno obsesivo-compulsivo
F43.10	Trastorno por estrés postraumático
F43.00	Trastorno por estrés agudo
F41.10	Trastorno de ansiedad generalizada
F06.40	Trastorno de ansiedad debido a enfermedad médica
F1x.80	Trastorno de ansiedad inducido por sustancias
F41.90	Trastorno de ansiedad no especificado

---

Cuadro 2.1: Clasificación de los trastornos de ansiedad según el manual diagnóstico y estadístico de los trastornos mentales (DSM-IV-TR)

De los diferentes tipos de trastornos de ansiedad, los más prevalentes en Europa son las fobias específicas (6,4%), seguidas de los trastornos de ansiedad generalizada (1,7-3,4%) y los trastornos por estrés postraumático (1,1-2,9%) (Wittchen, Jacobi y cols., 2011). Por otro lado, en los EUA, el trastorno de ansiedad más prevalente es la fobia específica (12,1%), seguida de la fobia social (12,1%) y el trastorno por estrés postraumático (6,8%) (Kessler y Wang 2008). (Figura 2.2).

Por lo que respecta a España, en un estudio realizado por

## 2.2. Epidemiología de la ansiedad

Caballero y cols., (2009), de una muestra de 20.347 pacientes, el 26,7% acudió a consultas ambulatorias de psiquiatría por motivos relacionados con alteraciones relacionadas con el estado de ánimo, un 18,2% por motivos relacionados con trastornos de ansiedad y un 15,2% por esquizofrenia y otros trastornos psicóticos.

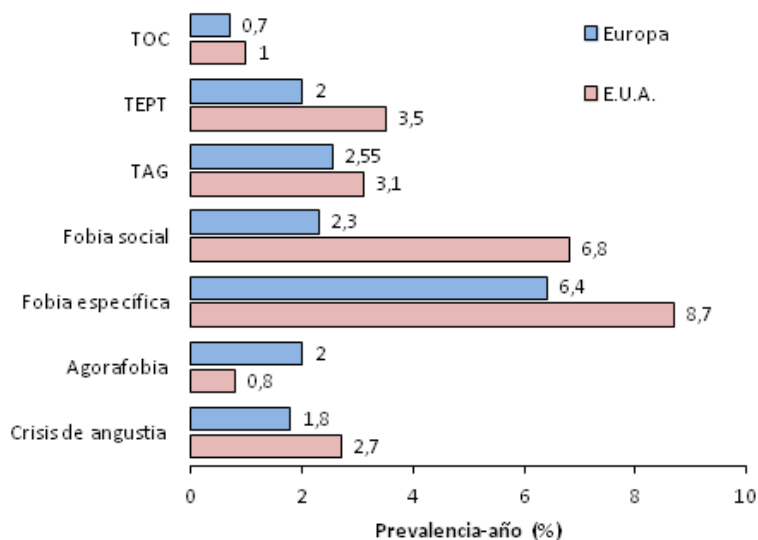


Figura 2.2: Tasa de prevalencia-año de los diferentes trastornos de ansiedad en Europa y los E.U.A. Adaptado de Wittchen, Jacobi y cols., (2011) y Kessler y Wang (2008) respectivamente. TOC: Trastorno obsesivo-compulsivo. TEPT: Trastorno por estrés postraumático. TAG: Trastorno de ansiedad generalizada.

En los resultados del estudio ESEMed sobre la prevalencia de los trastornos mentales en España realizado en 2006, la prevalencia-año de cualquier trastorno mental entre la población fue del 8,48%. De entre los diferentes trastornos fueron los más prevalentes los trastornos de ansiedad con una tasa de prevalencia-año del 6,20%, seguidos de los trastornos del estado de ánimo (4,37%) (Haro y

## **Capítulo 2. La ansiedad**

---

cols., 2006). Sin embargo, dichas tasas de prevalencia pueden ser en la actualidad mucho mayores debido a la influencia de la actual crisis económica. A este respecto, un estudio realizado por Gili y cols., (2013) muestra incrementos aproximados del 19,4% para los trastornos de depresión mayor y del 8,4% para los trastornos de ansiedad generalizada en pacientes usuarios de los servicios de atención primaria tras el inicio de la actual crisis económica.

### **2.3. Psicobiología de la ansiedad**

#### **2.3.1. Bases genéticas y vulnerabilidad**

Hoy en día es comúnmente aceptado que las bases genéticas de la ansiedad son debidas a una compleja herencia poligénica que interactúa con diversos factores ambientales (Vieland y cols., 1996). Para poder dilucidar los factores genéticos que forman parte de la etiología de dichos trastornos son de especial interés los denominados estudios de familias, estudios con gemelos y en adopciones. Los trastornos de ansiedad acostumbran a presentar patrones de herencia familiar como se deduce de los estudios realizados en familias y con gemelos (Hollander y Simeon 2008). Algunos estudios han demostrado un incremento del riesgo de padecer un trastorno de ansiedad si existen antecedentes familiares. En particular, la presencia en la familia de pacientes con trastorno de angustia, trastorno de ansiedad generalizada, fobias específicas o trastorno por estrés posttraumático incrementa aproximadamente 3 veces el riesgo de padecer algún trastorno de ansiedad en familiares de primer grado (Maier y cols., 1993; Hettema y cols., 2001; Yehuda y cols., 2008).

Dicho incremento de riesgo puede verse influido por la presencia de variables ambientales que interactúan con la predisposición genética particular. En un reciente estudio con gemelos se ha remarcado un peso aproximado de la herencia genética que oscila entre el 54 y el 48% frente al ambiente compartido (Tambs y cols., 2009; Domschke y Deckert 2012). El peso de la herencia genética frente a las

### 2.3. Psicobiología de la ansiedad

variables ambientales ha sido estimado para los diferentes trastornos de ansiedad mediante meta análisis realizados sobre estudios de gemelos monocigóticos y dizigóticos (Figura 2.3).

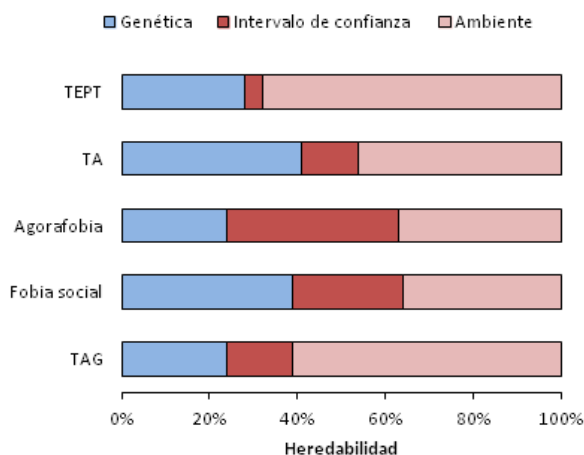


Figura 2.3: Influencia de los factores genéticos frente a los ambientales y heredabilidad estimada de los diferentes trastornos de ansiedad. TEPT: Trastorno por estrés postraumático. TA: Trastorno de angustia. TAG: Trastorno de ansiedad generalizada. Adaptado de (Kendler y cols., 1999; Hettema, Neale y cols., 2001).

Estos estudios muestran un porcentaje de heredabilidad aproximado del 32% para el trastorno de ansiedad generalizada, un 30% para las fobias, un 61% para el trastorno de agorafobia, un 40% para el trastorno de angustia y valores cercanos al 30% para el trastorno por estrés postraumático (Kendler, Karkowski y cols., 1999; Hettema, Neale y cols., 2001; Segman y Shalev 2003; Domschke y Deckert 2012). A nivel genético se han detectado diferentes loci de riesgo para los trastornos de angustia y las fobias, tanto las específicas como la social. Dichos loci están situados en los cromosomas 1p, 4q, 7p, 9q, 11p, 15q y 20p para los trastornos de angustia y, los cromosomas 16q y 14p para la fobia social y

## Capítulo 2. La ansiedad

---

las fobias específicas. (para una revisión consultar Smoller y cols., (2008)). En estudios de asociación se han identificado diversos genes como posibles candidatos a incrementar el riesgo de padecer un trastorno de ansiedad. Entre ellos podemos encontrar los genes que codifican el receptor A<sub>2A</sub> de adenosina (ADORA<sub>2A</sub>) y la monoamino oxidasa A (MAO-A) para los trastornos de angustia (Deckert y cols., 1998; Samochowiec y cols., 2004), variantes en el gen que codifica el transportador de la dopamina (DAT1) para la fobia social y el trastorno de ansiedad generalizada (Rowe y cols., 1998) y, variantes en el transportador de la serotonina (5-HTT) y de genes implicados en el sistema dopaminérgico (DRD2, DRD4, DAT1) para los trastornos de estrés postraumático (Cornelis y cols., 2010).

A pesar de la creciente información sobre las bases genéticas de los trastornos de ansiedad, sabemos muy poco sobre los efectos de la interacción gen-ambiente. Un estudio paradigmático que analiza esta relación ha sido el realizado por Stein y cols., (2008) que muestra que existe una interacción entre los niveles de maltrato (físico o psicológico) recibidos por los niños y las variaciones en el transportador de la serotonina que genera diferencias en la sensibilidad a la ansiedad.

### 2.3.2. Neuroanatomía de la ansiedad

La neuroanatomía de la ansiedad ha sido abordada principalmente a través de estudios con animales por razones obvias de ética. La traslación de resultados se realiza considerando que la ansiedad humana es un rasgo evolutivo presente en otras especies que genera repertorios conductuales ante estímulos amenazantes promoviendo la conservación de la vida (Rauch y cols., 2006). Abordaremos esta sección desde este punto de vista ya que trataremos más adelante los problemas traslacionales de los resultados entre animales y humanos respecto a la ansiedad.

Una de las aproximaciones más utilizadas en el estudio de la neuroanatomía de la ansiedad en animales ha sido el condicionamiento Pavloviano del miedo. Diversos estudios han

### **2.3. Psicobiología de la ansiedad**

---

mostrado que el circuito neural en que se basa se encuentra presente en todos los mamíferos, incluidos los humanos (LeDoux 2012). Los resultados en este tipo de estudios han puesto de manifiesto un papel principal de la amígdala en el condicionamiento del miedo y, en especial, de tres núcleos de esta estructura denominados lateral, central y basolateral (LeDoux 2000). Esto se ve refrendado por los hallazgos realizados en estudios en humanos que muestran una activación de dicha estructura ante estímulos con valencia negativa (Wager y cols., 2003) y la inducción de los mismos mediante microelectrodos (Lanteaume y cols., 2007).

El núcleo lateral ha sido propuesto como responsable de la adquisición y retención del miedo y el núcleo central en su expresión (LeDoux 2000; Gale y cols., 2004). El papel del núcleo basolateral en el circuito neural no está suficientemente determinado hoy en día (Anglada-Figueroa y Quirk 2005). En un estudio realizado por Herry y cols., (2007) se observó que dicha activación se produce también ante la impredecibilidad estimular tanto en animales como en humanos. Este hallazgo es de una particular importancia dado que en muchos trastornos de ansiedad la intolerancia a la ambigüedad o incerteza juega un papel importante (Boelen y Reijntjes 2009; Grillon y cols., 2009).

En lo referente a los mecanismos de detección de un depredador, se ha propuesto una vía que, a través de proyecciones desde las zonas amigdalares implicadas, pasarían a través del núcleo transversal del lecho de la estría terminal hacia el núcleo ventromedial del hipotálamo (Canteras y cols., 2001). El sistema septo-hipocampal aportaría información contextual de relevancia dado que el hipocampo ventral ha sido relacionado con los procesos ansiosos (Nascimento Hackl y Carobrez 2007). Dicho sistema también ha sido relacionado con la generación de ansiedad en las situaciones de conflicto entre diferentes metas. Es sabido que la exposición a nuevos ambientes provoca tendencias de aproximación/evitación en roedores (Montgomery y Monkman 1955). La inhibición conductual en estas situaciones ha sido relacionada con dicho sistema septo-hipocampal (Gray 1982;

## Capítulo 2. La ansiedad

---

McNaughton y Gray 2000).

Por último, el córtex prefrontal también ha sido relacionado con la ansiedad. El córtex prefrontal medial parece especialmente relacionado con procesos de extinción del miedo (Quirk y Mueller 2008), pero su relación con el miedo innato en animales genera mucha controversia debido a una gran heterogeneidad de estudios con resultados contradictorios (Jinks y McGregor 1997). Sin embargo, algunos autores siguen proponiendo el córtex prefrontal como una estructura con un papel muy importante en la ansiedad en humanos (Berkowitz y cols., 2007). También en humanos se han propuesto como estructuras relevantes en los procesos ansiosos la ínsula por hallarse altamente interconectada con la amígdala, el hipotálamo y la sustancia gris periacueductal. Sin embargo su relación con los procesos ansiosos no ha sido tan estudiada (Etkin y Wager 2007).

A nivel clínico, los estudios de neuroimagen en humanos muestran niveles bajos de activación del córtex prefrontal en trastornos de miedo intenso como las fobias o el trastorno de angustia y, niveles altos de activación en el trastorno por estrés postraumático o el obsesivo-compulsivo (Milad y Rauch 2007). El trastorno por estrés postraumático también ha sido relacionado con un menor volumen del córtex prefrontal ventromedial y el hipocampo y, una mayor activación de la amígdala (Quirk y Mueller 2008). En la actualidad no disponemos de muchos estudios para el trastorno de ansiedad generalizada, sin embargo, recientes estudios muestran que podría estar relacionado con una hiperactivación amigdalal frente a estímulos emocionalmente negativos en niños y adolescentes (Monk y cols., 2008). Y, más recientemente se ha implicado a la amígdala como estructura candidata a desarrollar un papel importante en la expresión de dicho trastorno en adultos (Etkin y cols., 2009).

### 2.3.3. Neurotransmisores y farmacopea

La comprensión de la neuroquímica de la ansiedad resulta crucial para poder desarrollar nuevos fármacos que resulten efectivos en

### 2.3. Psicobiología de la ansiedad

---

el tratamiento de los trastornos de ansiedad. Esta necesidad se vuelve urgencia si tenemos en cuenta los datos epidemiológicos que muestran su amplia extensión entre la población y que hemos explicado con más detalle anteriormente. La investigación sobre los diferentes neurotransmisores implicados en los procesos ansiosos se ha centrado principalmente en el sistema del ácido gamma aminobutírico (GABA). Sin embargo, existe abundante investigación sobre la implicación de otros sistemas de neurotransmisión como el noradrenérgico, el serotoninérgico y el dopaminérgico en menor medida.

**El sistema GABAérgico:** Las neuronas GABAérgicas se encuentran ampliamente distribuidas por todo el sistema nervioso central y escasamente en el sistema nervioso periférico (Nutt 2006). El GABA es el principal neurotransmisor inhibitorio del sistema nervioso de los mamíferos y juega un papel crucial en la excitabilidad de la actividad neuronal en el cerebro (Sieghart 2006). El sistema GABA actúa principalmente a través de dos tipos de receptores: ionotrópicos (GABA<sub>A</sub> y GABA<sub>C</sub>) y metabotrópicos (GABA<sub>B</sub>). De ellos, es el receptor GABA<sub>A</sub> el más numeroso en el cerebro (Nutt 2006). Es a este receptor al que se le ha dedicado una mayor atención en la investigación. No obstante, resulta interesante comentar que la expresión del receptor GABA<sub>B</sub> es particularmente alta en el sistema límbico que, como hemos comentado en la sección de neuroanatomía, contiene estructuras relevantes involucradas en los procesos ansiosos (Cryan y Kaupmann 2005). Las benzodiazepinas (BDZs) son agonistas GABAérgicos que actúan sobre los receptores GABA<sub>A</sub> potenciando la afinidad del GABA por este receptor, lo que conduce a una mayor frecuencia de apertura del canal de cloro que, a su vez posibilita un mayor efecto inhibitorio (Nutt 1990; López-Muñoz y cols., 2011) (Figura 2.4).

A través de esta potenciación se producen efectos ansiolíticos, anticonvulsivos y sedantes, siendo uno de los compuestos más utilizados para el tratamiento de los trastornos de ansiedad durante muchos años (López-Muñoz, Alamo y cols., 2011). De igual forma se



## Capítulo 2. La ansiedad

---

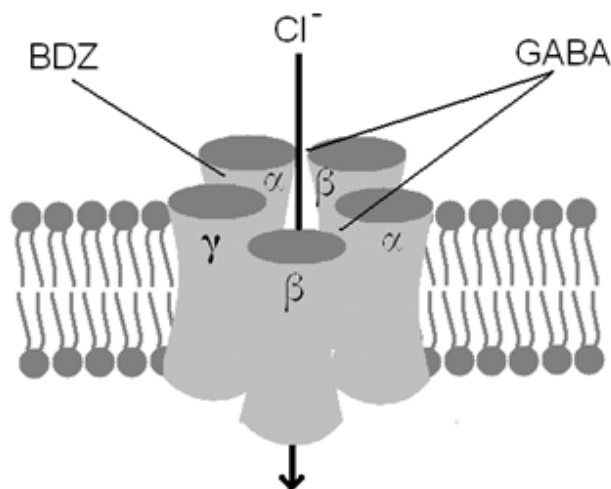


Figura 2.4: Esquema prototípico de un receptor GABA con sus subunidades y lugares de unión.

ha demostrado que la atenuación de la acción inhibitoria del GABA mediante el uso de antagonistas producen ansiedad, hipervigilancia e insomnio, poniendo de relieve la clara bidireccionalidad del sistema (Gentil y cols., 1990; Clement y Chapouthier 1998). El clordiazepóxido (CLZ) fue la primera BDZ clínicamente disponible y sigue siendo utilizada en la actualidad en muchos países para tratar los trastornos de ansiedad (López-Muñoz, Alamo y cols., 2011).

A partir del descubrimiento del CLZ, la familia de las BDZs creció rápidamente agrupando compuestos como el diazepam, lorazepam, clonazepam y alprazolam entre otros (Pillay y Stein 2007). A pesar del creciente cuerpo de conocimiento acumulado durante años sobre estos compuestos y los receptores GABA<sub>A</sub>, pocos estudios se han centrado en el estudio conciso de los diferentes subunidades de dicho receptor. Actualmente la investigación intenta determinar cómo cada subunidad de este receptor se relaciona con los procesos ansiosos intentando encontrar nuevos compuestos que consigan producir

### **2.3. Psicobiología de la ansiedad**

---

ansiólisis reduciendo los efectos sedantes asociados (de Haas y cols., 2008; de Haas y cols., 2009; de Haas y cols., 2010).

**El sistema serotoninérgico:** La serotonina (5HT) es un neurotransmisor que se sintetiza a partir del triptófano, un aminoácido incorporado al organismo principalmente a través de la dieta. Las neuronas serotoninérgicas tienen proyecciones desde los núcleos medial y dorsal del raquí en el tronco encefálico hacia muchas áreas cerebrales (Ruddick y cols., 2006) (Figura 2.5). A pesar de la gran variedad de receptores de 5HT identificados en la actualidad, es el receptor 5HT-1A el que ha sido más directamente relacionado con los trastornos de ansiedad (Clement y Chapouthier 1998). Diversos estudios han mostrado la efectividad de los agentes serotoninérgicos y los inhibidores selectivos de la recaptación de la serotonina (SSRI) en el tratamiento de la ansiedad (para una revisión consultar (Ravindran y Stein 2010)).

La teoría del exceso de 5HT, postula que es dicho exceso de serotonina la causa de los trastornos de ansiedad. Esta teoría ha encontrado confirmación en diversos estudios (Tancer y cols., 1994; George y cols., 1995) y es compatible con los efectos observados con los SSRI que producen un aumento en la ansiedad en un primer momento, desarrollando su efecto ansiolítico tras un periodo de 2 a 6 semanas de administración aproximadamente, tras una regulación a la baja de los receptores postsinápticos, principalmente el receptor 5HT-2C (Millan 2005; Eser y cols., 2007; Sinclair y cols., 2009; Farach y cols., 2012).

**El sistema noradrenérgico:** La noradrenalina (NA) es una catecolamina producida a partir de la hidroxilación de la dopamina y que es catabolizada en el interior de las neuronas a través de la mono amino oxidasa (MAO) o en las células gliales a través de la catechol-O-metiltransferasa (COMT). Las proyecciones de las neuronas noradrenérgicas se distribuyen ampliamente en el encéfalo principalmente a partir del locus coeruleus en el tronco encefálico.

Existen dos tipos principales de receptores noradrenérgicos: los receptores  $\alpha$  y los receptores  $\beta$ , ambos con sus correspondientes

## Capítulo 2. La ansiedad

---

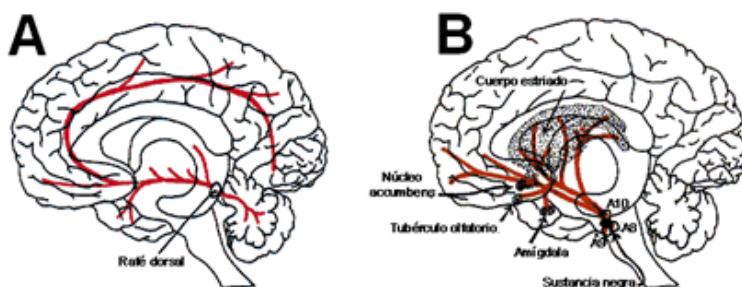


Figura 2.5: Proyecciones de las vías serotoninérgicas (Panel A) y dopaminérgicas (Panel B).

subtipos. Entre ellos, son los receptores postsinápticos  $\alpha_1$  y  $\beta_1$ , y el autoreceptor presináptico  $\alpha_2$  los que más han sido relacionados con los trastornos de ansiedad (Dowben y cols., 2011). Dado que el estado ansioso es elicitado por la hiperactivación del sistema de la NA, los tratamientos farmacológicos se sirven del uso de compuestos agonistas de los receptores  $\alpha_2$  como la clonidina o inhibidores de la recaptación de la noradrenalina (ISRN) para tratar la sintomatología (Dell'Osso y cols., 2010; Dowben, Grant y cols., 2011). Mediante el uso de los denominados  $\beta$  bloqueantes, como el propranolol, se consigue reducir la sintomatología clínica relacionada con el sistema nervioso autónomo (palpitaciones, sudoración, etc.), pero no para la sintomatología psíquica (Maes y cols., 2002).

**Sistema dopaminérgico:** La dopamina (DA) se sintetiza a través de una serie de reacciones químicas iniciadas a partir de la tirosina. Se cataboliza a través de la MAO o de la COMT como en el caso de la NA. Las principales vías dopaminérgicas son: la nigroestriatal (implicada en el control motor), la mesolímbica (asociada a los sistemas de refuerzo) y la mesocortical (implicada en la esquizofrenia) (Figura 6B). En relación con los procesos ansiosos, ha sido relacionada principalmente con el trastorno de fobia social

### 2.3. Psicobiología de la ansiedad

(Bell y cols., 2013). El ácido homovanílico (AHV), un subproducto de la catabolización de la DA, ha sido utilizado como medida aproximada del nivel de DA. Una reducción en la actividad del sistema dopaminérgico ha sido relacionada con los procesos ansiosos en el trastorno de fobia social (Bell, Bhikha y cols., 2013), ya que se han encontrado niveles reducidos de AHV en pacientes con fobia social y trastorno de angustia respecto a pacientes que presentaban trastorno de angustia únicamente (Johnson y cols., 1994). Por otro lado, un estudio mediante el uso de SPECT ha demostrado una reducción en la unión de la DA a los receptores D2 en este trastorno (Schneier y cols., 2008).

**Conclusiones:** Como hemos podido comprobar a lo largo de esta sección, los trastornos de ansiedad llevan implícita una gran complejidad neuroquímica que implica diversos sistemas de neurotransmisión y que además se encuentra condicionada por las diversas interacciones que entre ellos se producen. Ello se debe por ejemplo a la presencia compartida de receptores como los autoreceptores  $\alpha_2$  del sistema noradrenérgico, que se encuentran también presinápticamente en el sistema serotoninérgico y dopaminérgico (Trendelenburg y cols., 1994; Trendelenburg y cols., 1994). En la actualidad se trabaja con fármacos que pueden actuar sobre varios sistemas simultáneamente como los inhibidores de la recaptación de NA y la 5HT (IRNS), y en la inclusión de otros sistemas de neurotransmisión para el tratamiento de los trastornos de ansiedad como el sistema glutamatérgico (Farach, Pruitt y cols., 2012).

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI  
VALIDEZ DEL LABERINTO CIRCULAR ELEVADO COMO MODELO ANIMAL DE ANSIEDAD EN ESTUDIOS TOXICOLÓGICOS  
Luis Heredia Santaella  
Dipòsit Legal: T.1558-2013

## CAPÍTULO 3

# Modelos animales de ansiedad

---

### 3.1. Introducción teórica e importancia en la investigación

El desarrollo de los modelos animales de ansiedad y de nuevos compuestos para el tratamiento de sus trastornos han discurrido paralelamente a los largo de muchas décadas. De hecho, desde el año 1912 en el que se introdujo por primera vez en la práctica clínica el fenobarbital como hipnótico hasta 1987 en el que se aprobó el primer SSRI denominado fluoxetina, encontramos también el desarrollo de la mayor parte de los denominados tests clásicos de ansiedad para animales de investigación (Cryan y Sweeney 2011). Este desarrollo conjunto se debe principalmente a las altas tasas de prevalencia de los trastornos de ansiedad en los países desarrollados (consultar Capítulo 2) y a los altos costes derivados de los ensayos preclínicos en humanos que, además, presentan altas tasas de efecto placebo (Lakoff 2002).

A pesar de las obvias objeciones que se pueden argumentar en contra de la igualdad conceptual entre la ansiedad como experiencia humana y la ansiedad en animales, es importante destacar que dichos modelos no pretenden en ningún caso ser un equivalente directo entre ambos tipos de ansiedad. Los modelos animales de ansiedad consideran que la ansiedad en animales es análoga a la ansiedad en humanos pero no homóloga (Ohl 2005). Es importante destacar también que en la actualidad el término ‘modelo animal de ansiedad’

### **Capítulo 3. Modelos animales de ansiedad**

---

se utiliza indistintamente para referirse a dos enfoques totalmente distintos. Por un lado encontramos el abordaje de la ansiedad desde la genética y su expresión fenotípica. Bajo este punto de vista un modelo animal de ansiedad sería una determinada cepa que expresa de forma estable un patrón alterado de conducta ansiosa. Por otro lado el mismo término se utiliza también para definir aquellos paradigmas a partir de los cuales se han generado los diversos tests capaces de evaluar los niveles de ansiedad en animales (Cryan y Slattery 2007). A partir de ahora siempre se interpretará la expresión desde la segunda conceptualización, aunque consideramos que la distinción es forzada ya que ambos enfoques deben necesariamente interactuar en la práctica de la investigación.

<b>Tipo de validez</b>	<b>Concepto</b>
Validez aparente	Manifestación similar de síntomas respecto a la situación clínica
Validez de constructo	Similares bases biológicas
Validez predictiva	Respuesta a compuestos clínicamente efectivos
Validez etológica	Inducida por un estímulo similar al de la situación clínica
Validez convergente	Convergencia con las medidas realizadas en otros modelos basados en el mismo constructo
Validez divergente	Divergencia con las medidas realizadas en otros modelos basados en diferente constructo

Cuadro 3.1: Requisitos de validez en los modelos animales de ansiedad. Adaptado de Geyer y Markou (2002)

Se ha propuesto que un modelo animal, para ser considerado válido, debería cumplir idealmente diferentes tipos de validez teórica (Cuadro 3.1). No obstante, la presencia de un elevado nivel de fiabilidad y de validez predictiva serían los más importantes a la

### **3.1. Introducción teórica e importancia en la investigación**

hora de estimar la validez general del modelo (Geyer y Markou 2002). En una propuesta más reciente, se considera la validez de un modelo a partir de tres premisas. La primera requiere la correlación significativa entre la conducta de los animales y sus bases bioquímicas o fisiológicas y que éstas se expresan isomórficamente en humanos. La segunda expone que, en ausencia de la primera premisa, quede conservada la función biológica entre humanos y animales, es decir, su cometido para preservar la vida y la especie. Y la tercera, que queden conservados los mecanismos neurales entre ambos (Treit y cols., 2010).

En la actualidad disponemos de una gran variedad de modelos animales de ansiedad entre los que encontramos: el test del laberinto en cruz elevado, el test del campo abierto, el test de hipertermia inducida por estrés, el test de luz-oscuridad y el test del tablero agujereado entre otros (para una revisión consultar (Hart y cols., 2010)). Queda lejos de las pretensiones de esta tesis explicar en detalle cada uno de los diferentes modelos existentes. No obstante, sí estableceremos la distinción principal entre dos grandes categorías: los modelos condicionados y los no condicionados (Cuadro 3.2).

<b>Respuestas condicionadas</b>	<b>Respuestas incondicionadas</b>
Conflicto de Vogel	Test de luz-oscuridad
Evitación activa/pasiva	Test del laberinto elevado en cruz
Respuestas emocional condicionada	Test del campo abierto
Test de los cuatro discos	Hipertermia inducida por estrés
Supresión condicionada de la conducta de beber	Test del tablero agujereado

Cuadro 3.2: Clasificación de algunos de los modelos animales de ansiedad más utilizados.

Esta distinción se realiza en función de la naturaleza condicionada



### **Capítulo 3. Modelos animales de ansiedad**

---

o no condicionada de la respuesta producida por un estímulo que se considera ansiógeno (Bourin y cols., 2007). Mientras que los modelos condicionados permiten un control más estable de la línea basal ansiosa de los animales presentan inconvenientes entre los que podemos destacar: largos periodos experimentales, la necesidad de privación o la administración de descargas eléctricas. Los modelos no condicionados, en cambio, poseen una mayor validez etológica, requieren de tiempos de experimentación más cortos y permiten una menor influencia de los procesos relacionados con la memoria o confusiones interpretativas derivadas de la privación. Sin embargo, poseen una alta variabilidad en el establecimiento de la línea basal ansiosa (Rodgers y cols., 1997).

#### **3.2. Paradigma de aproximación/evitación**

Los modelos basados en el paradigma de aproximación/evitación se desarrollaron principalmente a partir de las observaciones realizadas en ratas por Montgomery y Monkman (1955). Dichas observaciones ponían de relieve la presencia de un potencial conflicto de preponderancia entre la natural tendencia a explorar (curiosidad) de los animales y el posible peligro (miedo) derivado de la exposición a nuevos contextos situacionales. En la actualidad disponemos de abundante literatura que demuestra la presencia de dicho conflicto y su existencia es ampliamente aceptada (Rodgers, Cao y cols., 1997; Bourin, Petit-Demouliere y cols., 2007). Los modelos desarrollados a partir de este paradigma gozan de una gran validez etológica, ya que se basan en las respuestas conductuales naturales elicidadas por la situación contextual y, en comparación con los modelos condicionados, parecen presentar una mayor analogía con la ansiedad humana (Bourin, Petit-Demouliere y cols., 2007). De la anterior argumentación se puede deducir que uno de los primeros requisitos necesarios en cualquier modelo basado en este paradigma es que permita a los animales exhibir aquellas conductas naturales y propias de la especie que están relacionadas con la ansiedad (Ohl 2005). En

### **3.2. Paradigma de aproximación/evitación**

segundo lugar, deben contener aquellos estímulos que han demostrado inducir ansiedad o sensación de peligro en los animales. En roedores los más utilizadas son: la elevación (relacionada con la posibilidad de caída) o la desprotección de zonas abiertas y de zonas iluminadas (ambas relacionadas con la predación) (Montgomery y Monkman 1955; Belzung y Lepape 1994).

A partir de este paradigma se han desarrollado algunos de los modelos animales para el estudio de la ansiedad más utilizados en la actualidad. Entre ellos encontramos el laberinto elevado en cruz (plus maze), el laberinto circular elevado (zero maze), el test del campo abierto (open field test) o el test luz-oscuridad (light/dark test) (Hall 1936; Crawley y Goodwin 1980; Pellow y cols., 1985; Shepherd y cols., 1994) aplicados principalmente en la evaluación de la ansiedad en ratones y ratas (Figura 3.1).

Estos laberintos combinan la exposición a nuevos contextos situacionales con la presencia de estímulos más o menos ansiógenos permitiendo al animal exhibir de forma natural su conducta ante ellos. De forma más concreta, el laberinto circular elevado y el laberinto elevado en cruz presentan zonas protegidas mediante paredes y zonas desprotegidas, abiertas a la exposición que, además, se encuentran elevadas sobre el suelo (Pellow, Chopin y cols., 1985; Shepherd, Grewal y cols., 1994). El test del campo abierto permite a los roedores exponerse de una forma más directa en la parte central del laberinto y protegerse en las zonas periféricas próximas a las paredes (Hall 1936). Por último, el test luz-oscuridad, permite a los roedores aventurarse en una zona profusamente iluminada o guarecerse en el compartimento oscuro (Crawley y Goodwin 1980) (Figura 3.1).

Es en base a la conducta expresada por los roedores en estos contextos y, en función de las posibilidades ofrecidas por la construcción de cada laberinto, como estableceremos los niveles de ansiedad de los animales (Ohl 2005; Bourin, Petit-Demouliere y cols., 2007).

### Capítulo 3. Modelos animales de ansiedad

---

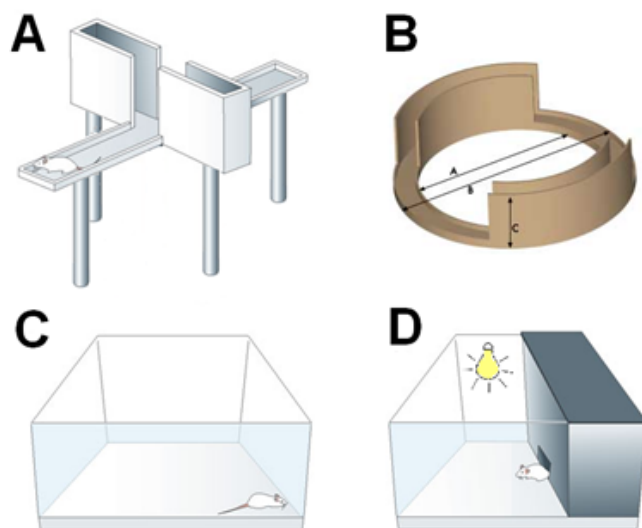


Figura 3.1: Laberinto elevado en cruz (plus maze) (Panel A). Laberinto circular elevado (zero maze) (Panel B). Test del campo abierto (open field test) (Panel C). Test luz-oscuridad (light/dark test) (Panel D). Adaptado de Cryan y Holmes (2005).

#### 3.2.1. Laberinto circular elevado (Zero maze test)

El laberinto circular elevado fue desarrollado como una modificación del laberinto elevado en cruz para tratar de resolver algunos problemas presentes en su predecesor (Shepherd, Grewal y cols., 1994). A pesar de ello, el laberinto elevado en cruz goza de una gran popularidad como modelo animal de ansiedad en la actualidad y ha sido utilizado de forma muy generalizada (Carobrez y Bertoglio 2005; Walf y Frye 2007). Dicho laberinto se basa en la capacidad para inducir ansiedad de las zonas elevadas y abiertas frente a las zonas cerradas y es comúnmente utilizado según una variación que fue propuesta por Lister (1987).

Se considera que los animales más ansiosos tienden a pasar menos

### 3.2. Paradigma de aproximación/evitación

tiempo en las zonas desprotegidas y a entrar menos veces en ellas para explorarlas. Sin embargo, la configuración del laberinto elevado en cruz contiene una zona central en la que los animales acostumban a pasar entre un 20-30% del tiempo total de la prueba y cuya interpretación es ambigua (Lee y Rodgers 1990; Rodgers y cols., 1992). Para solucionar este problema y permitir una exploración continua evitando zonas de final de recorrido, como la parte final de los brazos del laberinto elevado en cruz, Shepherd, Grewal y cols., (1994) propusieron una nueva configuración que daría lugar al denominado laberinto circular elevado (zero maze) (Figura 3.2).

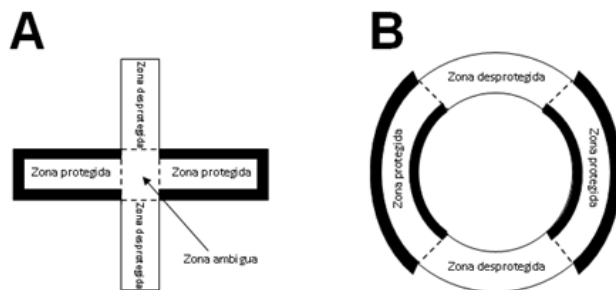


Figura 3.2: Distribución de zonas en el laberinto elevado en cruz (Panel A) y en el laberinto circular elevado (Panel B).

Como se puede observar en la figura 3.2, el laberinto circular elevado contiene un par de zonas protegidas por paredes y dos zonas desprotegidas. Todo el conjunto se encuentra elevado sobre el suelo y permite al animal avanzar continuamente si lo desea ya que han sido eliminados los tramos finales y las esquinas. La línea basal ansiosa de los animales se determina a través del registro de diferentes parámetros durante el tiempo de administración del test que suele ser 5 ó 10 minutos (Shepherd, Grewal y cols., 1994; Walf y Frye 2007; Hart, Bergner y cols., 2010). Existe una gran variedad de parámetros que han sido relacionados con la ansiedad

### Capítulo 3. Modelos animales de ansiedad

---

principalmente en experimentos con roedores. Los más clásicos son el tiempo que el animal permanece en el área abierta y la latencia en realizar la primera entrada en el área desprotegida. A más tiempo pasa el animal en la zona desprotegida se considera menos ansioso. Al contrario, una elevada latencia se interpreta como un mayor nivel de ansiedad (Lister 1987; Shepherd, Grewal y cols., 1994). Por otro lado, encontramos algunos parámetros que han sido denominados 'conductas de evaluación del riesgo' (Blanchard y cols., 1990). Una de las más usuales son los '*head dips*' que tienen lugar cuando el animal saca la cabeza por debajo del círculo del laberinto (mirando hacia el suelo) y que se puede producir en las zonas desprotegidas o en el límite entre ambas zonas. A mayor número de head dips consideramos que el animal presenta un menor nivel de ansiedad (Blanchard, Blanchard y cols., 1990; Shepherd, Grewal y cols., 1994). Otra conducta de evaluación del riesgo es la denominada conducta de atención extremada o '*stretched attend posture*' (SAP). Dicha conducta se produce cuando el animal se estira y explora olfateando sin moverse del sitio para después retornar a su posición inicial. Un incremento en el número de estas conductas se relaciona con elevados niveles de ansiedad (Blanchard, Blanchard y cols., 1990; Shepherd, Grewal y cols., 1994; Kulkarni y cols., 2007).

Otro parámetro que se registra y que forma parte del repertorio conductual de los roedores son los '*rearings*'. En esta conducta el animal se eleva apoyándose en las dos patas traseras para explorar las aristas superiores del laberinto en la mayoría de ocasiones. Se considera que un incremento en el número de *rearings* está relacionado con un incremento en los niveles de actividad exploratoria general del animal o con sus niveles de actividad vertical (Rodgers, Cao y cols., 1997; Weiss y cols., 1998), aunque algunos autores lo sugieren como un parámetro relacionado con la ansiedad cuando los valores son bajos (Hart, Bergner y cols., 2010). Otro parámetro que genera una gran confusión y falta de consenso es el número de entradas en las zonas desprotegidas (Bourin, Petit-Demouliere y cols., 2007). En la literatura científica podemos encontrar dicho

### **3.3. Limitaciones de los modelos incondicionados**

---

parámetro interpretado como un índice de actividad o de ansiedad indistintamente y algunos autores lo han propuesto como parámetro puro de ansiedad (Lister 1987) o de naturaleza mixta (Rodgers y Johnson 1995). Por último, otros parámetros como el número de defecaciones, el número de micciones o las conductas de aseo ‘*groomings*’ han sido relacionadas también con la ansiedad (Rodgers, Cao y cols., 1997).

El laberinto circular elevado ha sido validado para su uso en ratas (Shepherd, Grewal y cols., 1994; Mombereau y cols., 2007; Braun y cols., 2011) y recientemente en ratones (Kulkarni, Singh y cols., 2007; Mathiasen y cols., 2008). No obstante, dichas validaciones en el caso de ratones, han sido realizadas con un escaso número de cepas y el número de estudios disponibles en la actualidad también es escaso. La suposición de validez del laberinto circular elevado ha sido heredada en gran medida por los estudios realizados en el laberinto elevado en cruz del que sí disponemos de abundante literatura científica al respecto (Carobrez y Bertoglio 2005). En este sentido, se considera que el laberinto circular elevado goza de validez etológica, ya que utiliza estímulos naturales que pueden elicitar respuestas ansiosas en humanos (Dawson y Tricklebank 1995). De igual forma se le atribuye validez aparente, validez de constructo y validez predictiva (Walf y Frye 2007).

### **3.3. Limitaciones de los modelos incondicionados**

Como en cualquier modelo científico de investigación, y a pesar de las muchas virtudes descritas hasta el momento, los modelos animales para el estudio de la ansiedad presentan algunas limitaciones que deben ser tenidas en consideración a la hora de abordar el proceso experimental y en la posterior interpretación de resultados (Bouwknrecht y Paylor 2008). Desafortunadamente, en la mayoría de ocasiones dichas distorsiones no son tenidas en cuenta, fundamentalmente por la aplicación del método como una

## **Capítulo 3. Modelos animales de ansiedad**

---

simple ejecución de instrucciones y una interpretación rígida de los datos obtenidos. En los siguientes apartados, trataremos de comentar algunas de las limitaciones más importantes centrandó nuestra atención en el laberinto circular elevado y utilizándolo como modelo de ejemplo.

### **3.3.1. Nivel basal de ansiedad y capacidad de detección**

La limitación impuesta por el nivel basal de ansiedad de los animales utilizados en el experimento, viene dada por un simple pero evidente hecho. Resulta imposible reducir los niveles de ansiedad de animales que no muestran respuestas ansiosas a nivel basal, es decir, en la exposición al nuevo contexto y sin tratamiento alguno. De igual forma, no podremos elevar los niveles de ansiedad de animales que muestran una reacción ansiosa extrema (Bouwknrecht y Paylor 2008). En este caso podemos considerar que se ha producido en la prueba un ‘efecto suelo’ o ‘efecto techo’ respectivamente. En la actualidad, podemos encontrar en la literatura científica ejemplos de ambos casos (Hascoet y Bourin 1998; Kulkarni, Singh y cols., 2007). Dicho problema es fácilmente identificable si tomamos como ejemplo uno de los parámetros espacio-temporales más utilizados en estos modelos: el tiempo de exploración en el contexto ansiógeno.

A nivel teórico, el tiempo máximo que el animal puede exponerse a dicho contexto es el 50 % del tiempo total de la prueba, considerando un margen de  $\pm 10\%$  aproximadamente (Bouwknrecht y Paylor 2008). Por ejemplo, en un ensayo de 5 minutos utilizando el laberinto circular elevado como modelo, podemos considerar que los animales no presentan ansiedad si pasan entre 120 y 160 segundos en el área desprotegida. Niveles inferiores indicarían la presencia de ansiedad (preferencia por las áreas protegidas) y niveles superiores una preferencia por las áreas desprotegidas, algo que no se puede explicar a no ser que existan otras variables interfiriendo, como una posibilidad mayor de escape en dicha zona (Figura 3.3).

En lo concerniente a otros parámetros como el número de entradas

### 3.3. Limitaciones de los modelos incondicionados

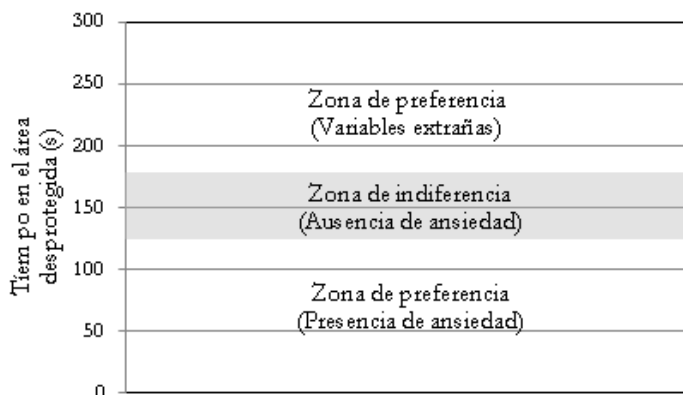


Figura 3.3: Definición teórica de las zonas identificables en el parámetro 'tiempo en el área desprotegida'.

o las conductas de evaluación del riesgo, se ha demostrado una clara diferencia en los niveles basales de estos parámetros en función de la cepa de ratón utilizada. Cabe al respecto destacar el estudio comparativo realizado por Milner y Crabbe (2008) con 15 cepas de ratón diferentes y en tres clásicos modelos incondicionados de ansiedad: el laberinto circular elevado, el test del campo abierto y el test luz-oscuridad.

Queda pues patente la importancia de la elección de la cepa de ratón más adecuada al propósito experimental y a sus expectativas. Cepas con elevados niveles de ansiedad ofrecen un amplio margen de detección de efectos ansiolíticos, mientras que cepas con bajos niveles de ansiedad, facilitan la detección de efectos ansiógenos. En el caso de trabajar con tóxicos, de los cuales desconocemos a priori su acción, resulta indispensable la elección de una cepa con niveles medios de ansiedad y tener siempre en cuenta la limitación de detección de la prueba a la hora de interpretar nuestros resultados. En la actualidad, la cepa C57BL/6J es la más utilizada en estudios de ansiedad (Bouwknrecht y Paylor 2008) y ha sido recomendada como cepa de elección (Hart, Bergner y cols., 2010).



### Capítulo 3. Modelos animales de ansiedad

---

#### 3.3.2. Procedimiento experimental e influencia ambiental

Otra de las limitaciones a tener en cuenta en la utilización de un modelo de ansiedad animal es la posible influencia de variables relacionadas con el procedimiento experimental. En una revisión al respecto, Bourin, Petit-Demouliere y cols., (2007) han sugerido la existencia de un gran número de condiciones que afectarían a los test de base etológica a partir del análisis de los estudios realizados en el laberinto elevado en cruz (Figura 3.4).

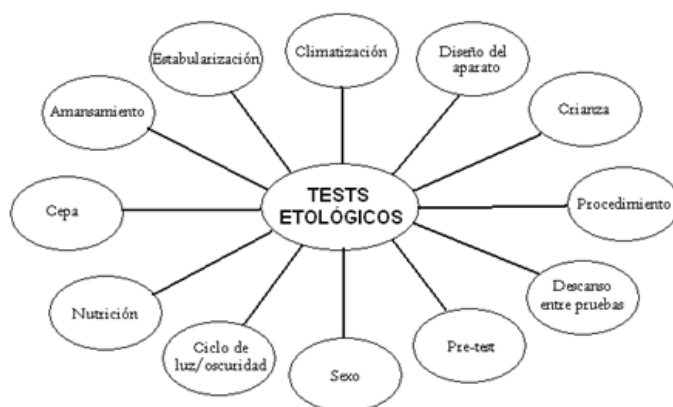


Figura 3.4: Condiciones experimentales que pueden afectar a la respuesta conductual en el laberinto elevado en cruz. Adaptado de Bourin, Petit-Demouliere y cols., (2007).

Por comentar alguno de ellos podemos citar, respecto al diseño del aparato, el trabajo de Hagenbuch y cols., (2006) en el que se observaron mayores niveles de ansiedad en los animales expuestos al laberinto elevado en cruz con paredes opacas que con paredes transparentes. Por otro lado, la influencia del sexo y en particular del ciclo estral de las hembras ha sido también demostrada y se contempla en los protocolos más recientes (Walf y Frye 2007; Simpson y cols., 2012). En lo referente al laberinto circular elevado, disponemos

### **3.3. Limitaciones de los modelos incondicionados**

---

de pocos estudios en la actualidad sobre la influencia de dichas condiciones. A destacar es la influencia del amansamiento que ha sido ampliamente descrita en ratas pero no en ratones y los resultados contradictorios respecto a la estabularización en cajas individuales (Voikar y cols., 2005; Arndt y cols., 2006; Walf y Frye 2007; Kwak y cols., 2009).

Por último, resulta interesante comentar que esta influencia ambiental acaba afectando a los niveles basales de ansiedad de los animales y en última instancia compromete la capacidad de detección de la prueba como se ha explicado en el apartado anterior (Bouwknicht y Paylor 2008).

#### **3.3.3. Interpretación de los parámetros (Ansiedad vs Actividad)**

Uno de los principales problemas que encontramos en los modelos animales de ansiedad basados en el paradigma de aproximación/evitación es encontrar índices de ansiedad y de actividad que resulten fiables. Es requisito de cualquier test obtener una consistencia interna suficiente que permita identificar parámetros que estén altamente relacionados entre sí y que, en última instancia puedan ser relacionados con algún criterio externo.

En los primeros modelos adaptados de los trabajos de Montgomery y Monkman (1955) se siguió la denominada ‘teoría de los dos factores’. En ella se asumía que la exploración en los animales era instigada por sistemas ‘motivacionales’ independientes de los mecanismos de miedo/ansiedad (Weiss, Wadsworth y cols., 1998). Sin embargo, la realidad de esta teoría, que establece una diferenciación clara entre actividad exploratoria y ansiedad, ha sido cuestionada sistemáticamente los últimos años (Ramos 2008; Ennaceur 2012). A éste tema, que es motivo de desacuerdo aún hoy día, se han dedicado diversos estudios para intentar esclarecer la existencia de dicha independencia. Por un lado se han realizado estudios mediante análisis de componentes principales, y análisis factoriales, tanto exploratorios como confirmatorios, de la conducta de los animales

### **Capítulo 3. Modelos animales de ansiedad**

---

para intentar determinar la dimensionalidad en diversos modelos (Rodgers y Johnson 1995; Rodgers, Cao y cols., 1997; Wall y Messier 2000; Clement y cols., 2007).

Sin embargo, no existe una estructura dimensional estable que pueda ser replicable y las conclusiones sobre la misma son contradictorias. En un reciente estudio con 15 cepas diferentes de ratón se ha concluido que, de hecho, las conductas relacionadas con la ansiedad y con el nivel de actividad general se encuentran relacionadas y no son fácilmente dissociables (Milner y Crabbe 2008). Por otro lado, en estudios de validación farmacológica, dicha independencia también ha sido cuestionada mediante el uso de estimulantes del sistema nervioso central como la d-anfetamina que han demostrado ser capaces de producir 'falsos positivos' modificando los parámetros tradicionales y comúnmente aceptados como indicadores de los niveles de ansiedad (Dawson y cols., 1995; Weiss, Wadsworth y cols., 1998).

Los resultados de estos dos tipos de estudios tienen consecuencias directas sobre la validez de los modelos. En particular, la imposibilidad de distinguir dimensiones claramente independientes en los diferentes modelos compromete la fiabilidad de los mismos. Por otro lado, los estudios farmacológicos que han demostrado la capacidad de producir falsos positivos de algunas sustancias comprometen la validez predictiva del modelo. A todo esto, debemos añadir los resultados contradictorios entre estudios que utilizan diferentes modelos animales de ansiedad (Mathiasen, Mirza y cols., 2008; Clement y cols., 2009; Braun, Skelton y cols., 2011). La falta de coherencia entre los resultados obtenidos entre modelos basados en el mismo paradigma compromete la validez convergente de los mismos.

Como se puede concluir de las líneas anteriores y a pesar del largo recorrido que los modelos animales de ansiedad basados en el paradigma de aproximación/evitación tienen en la literatura científica, la discusión acerca de su validez y la interpretación de sus resultados sigue siendo un tema de debate en la actualidad. Podemos por ello encontrar actualmente diferentes proposiciones para intentar

### **3.3. Limitaciones de los modelos incondicionados**

---

solucionar dichas limitaciones proponiendo nuevas configuraciones físicas de los tests para aumentar la riqueza estimular de los mismos y explorar una posible dimensionalidad de las pruebas o distinguir entre miedo y ansiedad (Ramos y cols., 2008; Michalikova y cols., 2010; Ennaceur 2012; Haller y Alicki 2012).

#### **3.3.4. Traslación de los resultados a humanos**

Como se ha comentado en el capítulo 2 de esta tesis, la conceptualización de la ansiedad sigue generando discusión hoy día. Los principales problemas radican en la separación entre los conceptos de ansiedad y miedo. En una investigación sobre fisiopatología de los circuitos neurales de la ansiedad en roedores, Crestani y cols., (1999) sugirieron que '*Los estados ansiosos en humanos están caracterizados por conductas de evitación del daño y un sesgo en la interpretación de los estímulos amenazantes*' (p. 833). Sin embargo, el '*freezing*' o '*quedarse paralizado*' es una conducta de evitación del daño que ha sido relacionada con el miedo en animales (Lang, Davis y cols., 2000). La falta de consenso entre la literatura clínica y la científica hace difícil diseñar modelos animales de ansiedad con una mayor validez aparente.

Por otro lado, resulta evidente que es imposible simular en animales algunos síntomas de los trastornos de ansiedad dependientes de complejos conceptos cognitivos como '*el miedo a perder el control*' o '*el miedo a enloquecer*'. Ningún modelo animal podrá emular totalmente ningún trastorno de ansiedad y debe entenderse como una aproximación al mismo (Arguello y Gogos 2006). Aunque algunos nuevos enfoques como la traslación inversa pueden ayudarnos a generar modelos de ansiedad más efectivos mediante el estudio, por ejemplo, de la conducta exploratoria en humanos (Perry y cols., 2009).

Por último, los modelos animales deberían reproducir la dimensionalidad de la ansiedad encontrada en humanos. A este respecto, la clásica distinción entre ansiedad estado y ansiedad rasgo ha sido asumida dentro de los modelos animales de ansiedad bajo

### **Capítulo 3. Modelos animales de ansiedad**

---

la consideración de que la ansiedad estado estaría elicitada por las diferentes pruebas de evaluación mientras que la ansiedad rasgo correspondería a los diversos modelos genéticos y sus variaciones en la expresión fenotípica de la misma (Ohl 2005). Sin embargo, recientes propuestas sobre la multidimensionalidad de la ansiedad en roedores nos alejan de dicho propósito. Entre ellas encontramos la hipótesis de que cada modelo estaría evaluando un rasgo diferente de la emocionalidad de los animales pero que compartirían como elemento común la ansiedad (Ramos 2008).

En la actualidad, todos estos problemas se incrementan debido al desarrollo de nuevas aproximaciones a la ansiedad mediante la proposición de su estudio en otros animales como el pez cebra que nos aleja de los supuestos de validez y presenta mayores problemas de traslación de resultados (Cachat y cols., 2010). Por otro lado, encontramos nuevas proposiciones que, a través de la manipulación farmacológica o ambiental intentan especializarse en algunos trastornos de ansiedad como la crisis de angustia, el trastorno obsesivo compulsivo o la fobia social para hacer más plausible la traslación (Andersen y cols., 2010; Barys y cols., 2010; Klein y cols., 2010).

La traslación de resultados entre animales y humanos respecto a la ansiedad presenta múltiples limitaciones pero, a pesar de ello, los modelos animales de ansiedad son un instrumento indispensable en la investigación actual. Por este motivo, es necesaria una mayor integración entre los resultados provenientes de la investigación clínica y la neurociencia para poder generar y adaptar los modelos existentes en base a un consenso conceptual entre los investigadores dedicados a esta tarea.

## Parte II

# Hipótesis y Objetivos

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI  
VALIDEZ DEL LABERINTO CIRCULAR ELEVADO COMO MODELO ANIMAL DE ANSIEDAD EN ESTUDIOS TOXICOLÓGICOS  
Luis Heredia Santaella  
Dipòsit Legal: T.1558-2013

# Hipótesis y Objetivos

## 1.1. Propósito y fundamento

En la actualidad, los estudios sobre los efectos neuroconductuales derivados de la exposición a tóxicos son una importante herramienta para preservar la salud mental de la población. La extensión de este campo de investigación ha crecido notablemente en los últimos años. Este trabajo empieza como uno más de los muchos estudios centrados en la evaluación de dichos efectos producidos por uno de los tóxicos ambientales que más literatura científica está generando en los últimos años, los PBDEs. Sin embargo, ante los problemas detectados en la interpretación de los resultados del mismo y siendo conscientes de que la validez de los mismos se sustenta en la correcta interpretación de las pruebas que se administran en este tipo de estudios, esta tesis se focaliza inmediatamente en un intento de solución a dichos problemas a través del estudio de la teoría de uno de los modelos animales disponibles para evaluar alteraciones en los niveles de ansiedad, el laberinto circular elevado. Por lo tanto, este trabajo a diferencia de la mayoría de tesis, se mueve desde lo asumible a lo cuestionable y no a la inversa, en un intento por dilucidar el fundamento y validez del modelo.

## 1.2. Hipótesis

La exposición a PBDEs y en concreto a deca-DBE es capaz de producir alteraciones neuroconductuales en población adulta que pueden ser detectadas de forma eficaz a través de los modelos animales disponibles para evaluarlas.



---

## 1.3. Objetivo general

Evaluar los efectos neuroconductuales derivados de la exposición a deca-BDE y resolver los posibles problemas de interpretación derivados de las pruebas administradas.

### 1.3.1. Objetivos específicos

- Evaluar los efectos neuroconductuales derivados de una exposición subaguda a uno de los congéneres más bromados de los PBDEs el deca-BDE sobre la ansiedad, el aprendizaje y la memoria espacial.
- Analizar la influencia de dos variables ambientales, el amansamiento y el aislamiento social, en los niveles de ansiedad evaluados mediante el laberinto circular elevado.
- Analizar la relación existente entre los parámetros de actividad y los de ansiedad en el laberinto circular elevado y utilizarla para generar un método que permita disociar la interacción entre ambos.
- Evaluar la validez predictiva bidireccional del laberinto circular elevado y la presencia de elementos de confusión en la interpretación de los efectos relacionados con la actividad que puedan dar lugar a la aparición de falsos positivos.

## Parte III

# Materiales y Métodos

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI  
VALIDEZ DEL LABERINTO CIRCULAR ELEVADO COMO MODELO ANIMAL DE ANSIEDAD EN ESTUDIOS TOXICOLÓGICOS  
Luis Heredia Santaella  
Dipòsit Legal: T.1558-2013

## CAPÍTULO 1

# Materiales generales

---

### 1.1. Animales de experimentación

Para la realización de los dos primeros experimentos se utilizaron 54 ratones machos wild type y 18 ratones machos transgénicos del modelo Tg2576 cuyo background genético procede de la mezcla de las cepas C57BL6 y SJL (Lille Skensved, Dinamarca). Para el tercer experimento se utilizaron 99 ratones macho de la cepa C57BL/6J (obtenidos de Charles River, CRIFFA, Barcelona, España). Los animales fueron acomodados en el estabulario en cajas estándar de policarbonato (220 x 220 x 145 mm) sobre estanterías fijas suministradas por PanLab S.L.U.

Las condiciones ambientales se mantuvieron constantes con una temperatura de  $22 \pm 2$  C°, una humedad relativa de  $50 \pm 10$  % y un ciclo de luz-oscuridad constante de 12 horas diarias (luz: 08:00 a 20:00 h). Todos los animales dispusieron de acceso libre a la comida (pienso para roedores suministrado por Harlan, Barcelona, España) y agua del servicio municipal *ad libitum*.

Los procedimientos utilizados en la experimentación fueron protocolarizados y aprobados por el Comité Ético de Cuidado y Uso animal de la Universitat Rovira i Virgili siguiendo los 'Principios de cuidado del animal de laboratorio' establecidos en la directiva 2010/63/EU de la Unión Europea.

## Capítulo 1. Materiales generales

---

### 1.2. Tóxicos, fármacos y método de administración

El éter de decabromodifenilo (BDE-209) bajo la denominación de Saytex 102-E© fue suministrado por LG Promochem, Barcelona, España. El compuesto fue disuelto en aceite de girasol (Koipesol) y se administró mediante sonda intragástrica al grupo correspondiente a una dosis de 20 mg/kg/día durante 15 días. Dicha dosis ha demostrado tener efectos adversos en estudios de neurodesarrollo (Goodman 2009).

En el estudio de caracterización se utilizó clordiazepóxido (Teofarma Iberica, Barcelona, España), picrotoxina (Sigma-Aldrich Química, Madrid, España) y metilfenidato (Laboratorios Rubió, Barcelona, España). Los compuestos fueron disueltos en suero fisiológico y administrados intraperitonealmente a sus grupos correspondientes 30 minutos antes de la prueba conductual. Las dosis administradas fueron las siguientes: clordiazepóxido (2,5 mg/kg; 5 mg/kg y 10 mg/kg), picrotoxina (0,5 mg/kg; 1 mg/kg; 2 mg/kg) y metilfenidato (2,5 mg/kg; 5 mg/kg y 10 mg/kg). Las dosis elegidas para los compuestos se basaron en estudios realizados anteriormente con estos fármacos (Niculescu y cols., 2005; Kulkarni, Singh y cols., 2007; Mathiasen, Mirza y cols., 2008).

## CAPÍTULO 2

# Métodos generales

---

### 2.1. Procedimiento de amansamiento

En la actualidad disponemos de pocos trabajos en los que se hayan estudiado los efectos del amansamiento en ratones. Por otro lado, los estudios que lo utilizan presentan una gran heterogeneidad respecto a las formas y, en muchas ocasiones, éste se encuentra poco detallado. En nuestro estudio el procedimiento de amansamiento fue realizado por todos los experimentadores implicados en la posterior valoración conductual. El protocolo fue aplicado durante 5 días consecutivos. El tiempo aproximado del protocolo fue fijado en 1 minuto por cada animal. Cada día y a la misma hora se administró el protocolo de amansamiento a los animales correspondientes de acuerdo a los siguientes pasos:

- Coger al animal por la cola, colocarlo sobre el antebrazo e identificarlo.
- Pesar al animal en la báscula trasladándolo otra vez cogido por la cola.
- Colocar al animal de nuevo sobre el antebrazo y tratar de acariciarlo.
- Colocar al animal sobre la palma de la mano y acercarla a su caja para permitirle descender libremente.

## Capítulo 2. Métodos generales

---

### 2.2. Procedimiento de aislamiento social

La restricción de interacción social se realizó mediante el alojamiento individual de los animales en las cajas. Aquellos animales bajo la condición de aislamiento estuvieron alojados individualmente durante 30 días antes de la valoración conductual. En este periodo de tiempo no hubo interacción tampoco con los experimentadores salvo aquellos animales que estuvieran asignados a la condición de amansamiento.

### 2.3. Valoración conductual

#### 2.3.1. Batería de observación funcional

La batería de observación funcional (FOB) fue desarrollada originalmente por Moser (2000) para su utilización como método de cribaje en estudios toxicológicos para ratas. La FOB fue posteriormente adaptada para su uso en ratones (Sills y cols., 2000; Franco-Pons y cols., 2007). En ella se evalúan de forma general los efectos producidos por la exposición a tóxicos a través de 18 ítems que cubren el correcto funcionamiento del sistema nervioso central (CNS) y su excitabilidad, la posible afectación neuromotora y del sistema autonómico así como la reactividad sensoriomotora. Esta valoración se efectúa en tres contextos diferentes: mediante la observación de la conducta del animal en su propia caja, en un campo abierto y en respuesta a la manipulación y estimulación. En la observación del animal en su propia caja se evalúa la actividad del animal a través del número de rearings que realiza, las veces que come pienso o bebe agua, su disposición a escalar colgándose de la rejilla superior de la caja, la presencia de estereotipias, la cuantificación de las conductas de aseo (*groomings*) y cualquier conducta que pueda ser considerada anormal. Tras ser extraído de su caja, el experimentador observa cómo responde a la manipulación, la dificultad para atraparlo y su apariencia general. Posteriormente, en un campo abierto de 60 x 90 cm se evalúa la actividad general del SNC puntuando el

## **2.3. Valoración conductual**

---

nivel de alerta que presenta el animal y registrando el número de rearings que realiza. Los efectos autonómicos se evalúan mediante la cuantificación del número de micciones y defecaciones. El tono muscular y el equilibrio se evalúan mediante la observación de la marcha, la movilidad general, la capacidad de escalar por una rejilla y el reflejo natural de darse la vuelta cuando son colocados con el dorso en el suelo. Finalmente, la reactividad sensoriomotriz se evalúa a través de la reacción expresada por el animal ante el acercamiento de un objeto, al tocarlo y al escuchar un ruido generado encima de él (Golub y cols., 2004). En los anexos se pueden consultar las hojas de registro con las conductas registradas en nuestro protocolo.

### **2.3.2. Laberinto acuático de Morris**

El laberinto acuático de Morris es una prueba de conducta que nos permite evaluar los posibles déficits en aprendizaje y memoria espacial en estudios neuroconductuales. Dicha prueba consiste en una piscina circular llena de agua (diámetro: 1 m y profundidad: 60 cm) que contiene, en uno de los cuatro cuadrantes imaginarios que podríamos delimitar mediante dos líneas ortogonales, una plataforma (diámetro: 10 cm) sumergida 1 cm bajo la superficie del agua que el animal deberá ir aprendiendo a localizar mediante señales situadas en el exterior de la piscina (extralaberínticas) (Morris 1984) (Figura 2.1). Al cuadrante que contiene dicha plataforma se le denomina cuadrante objetivo.

En nuestro protocolo, los animales realizaron dos ensayos de aprendizaje cada día (duración máxima: 90 s cada uno) durante 10 días. En cada ensayo el animal era colocado en la piscina en un lugar de salida diferente situado en uno de los tres cuadrantes que no contenían la plataforma. Una vez hallada la plataforma el animal debía permanecer sobre ella 30 segundos. Si transcurrido el tiempo máximo de cada ensayo, el animal no conseguía localizar la plataforma, el experimentador colocaba al animal sobre ella permitiéndole observar el entorno durante 30 segundos más. El tiempo entre ensayo y ensayo fue fijado en 30 minutos. En



## Capítulo 2. Métodos generales

---

el protocolo desarrollado en nuestro laboratorio se incluyó una pared interna giratoria a la piscina para evitar que los animales acabaran aprendiendo la posición de la plataforma mediante señales intralaberínticas (defectos en las paredes de la piscina) y obligarlos, de esta forma, a referenciarse en el exterior (Ribes y cols., 2008). Dicha pared era cambiada de posición en cada ensayo aleatoriamente.



Figura 2.1: Distribución de cuadrantes y señales extralaberínticas en la prueba del laberinto acuático de Morris.

En cada ensayo se midió la latencia de escape, es decir, el tiempo que cada animal tardaba en encontrar la plataforma. Una reducción paulatina en dicha latencia a lo largo de los ensayos nos sugiere que se ha producido aprendizaje (Vicens y cols., 2003). Para evaluar la capacidad de retención, en nuestro protocolo realizamos 5 ensayos de prueba (*probe trials*) los días 3, 5, 8 y 10 antes de los dos ensayos de entrenamiento excepto el 10 día que se realizó después. En dichos

## **2.3. Valoración conductual**

---

ensayos se retiró la plataforma sumergida del cuadrante objetivo y se permitió a los animales nadar libremente durante 60 segundos. De interés en este tipo de ensayos es el tiempo que los animales pasan nadando en el cuadrante objetivo, es decir, en aquel cuadrante en el que deberían encontrar la plataforma. Un ensayo de prueba adicional se realizó también transcurridas 72 del último ensayo de entrenamiento. Todas las mediciones fueron realizadas a través de una videocámara situada en la parte superior del laberinto y conectada a un ordenador que realizaba la gestión del material visual mediante el software Etho-Vision© v3.0 (Noldus Information Technologies, Wageningen, Países Bajos).

### **2.3.3. Caja de luz-oscuridad**

El test luz-oscuridad fue desarrollado como modelo de ansiedad por Crawley y Goodwin (1980) y ha sido varias veces objeto de revisión (Hascoet y Bourin 1998; Bourin y Hascoet 2003). El aparato utilizado en nuestros experimentos está basado en dichos estudios y consiste en una caja de metacrilato de 45 x 27 x 27 cm con una tapa en la parte superior. Dicha caja se encuentra dividida en dos compartimentos. Uno de los compartimentos es negro y el otro es blanco y posee una fuente de iluminación en la parte superior adherida a la tapa que, en el caso del compartimento blanco es transparente para permitir observar al animal. Entre ambos compartimentos, en la pared central que divide la caja, se encuentra una apertura de 7,5 x 7,5 cm que permite al animal pasar de un compartimento a otro libremente.

Los indicadores de ansiedad más utilizados en este modelo animal de ansiedad son: el número de transiciones que el animal realiza entre compartimentos y el tiempo que el animal pasa en uno u otro compartimento. Considerando más ansioso a aquel animal que pasa menos tiempo en el compartimento iluminado. Este aparato también permite realizar otro tipo de mediciones como el número de *rearings*, el número de micciones y el de defecaciones. En nuestro protocolo, el animal era transportado al compartimento oscuro y, tras cerrar la

## Capítulo 2. Métodos generales

---

tapa, se le permitió explorar el aparato libremente durante 5 minutos. Una vez finalizado el tiempo y registrados los parámetros, el laberinto se limpió con una solución de etanol al 50% para evitar que los posteriores animales pudieran percibir el olor de los animales que ya habían pasado la prueba.

### 2.3.4. Laberinto circular elevado

El laberinto circular elevado se basa en la capacidad para generar ansiedad en roedores de los espacios abiertos y elevados (Montgomery y Monkman 1955). Se concibió como una modificación del laberinto elevado en cruz para solventar algunos problemas de interpretación relacionados con áreas ambiguas presentes en el mismo. Ha sido validado para su uso en ratas (Shepherd, Grewal y cols., 1994) y recientemente en ratones (Kulkarni, Singh y cols., 2007). Dicho laberinto está formado por un aro blanco de 6 cm de ancho y un diámetro exterior de 45 cm. Dicho aro se encuentra elevado 40 cm del suelo y está dividido en cuatro zonas. Dos de ellas poseen paredes laterales (consideradas zonas protegidas) y las otras dos no (consideradas zonas desprotegidas) (Figura 2.2).

A través del tiempo que los animales pasan en las zonas desprotegidas se puede inferir el nivel de ansiedad que presentan. Se considera de esta manera que el animal más ansioso pasará menos tiempo en dichas áreas.



Figura 2.2: Estructura del laberinto circular elevado

## 2.4. Estadística

---

No obstante existen una gran variedad de índices que han sido relacionados con la ansiedad como la latencia en realizar la primera entrada en una zona desprotegida, el número de entradas o el número de *head dips*. A través del número de *rearings* puede ser evaluado el nivel de actividad vertical de los animales y, dada su construcción, permite realizar otras observaciones como el número de micciones, defecaciones y conductas de aseo (*groomings*). En nuestro protocolo los animales fueron transportados y depositados en una de las zonas protegidas permitiendo al animal explorar libremente el laberinto durante 5 minutos. Una vez transcurrido ese periodo de tiempo, y tras registrar todos los parámetros descritos anteriormente, el animal era devuelto a su caja y el laberinto era limpiado con una solución de etanol al 50% para eliminar los olores que hubiera podido dejar el animal.

## 2.4. Estadística

Para analizar los datos de este trabajo se utilizó el software de análisis estadístico SPSS© v17.0. La homogeneidad de la varianza se analizó mediante el test de Levene. Las diferencias entre grupos, excepto para el estudio de validación farmacológica, se realizaron mediante test ANOVA seguido de las pruebas post-hoc con la corrección de Tukey. En aquellos casos en que el diseño fue de medidas repetidas se realizó un test ANOVA para medidas repetidas y las pruebas post-hoc con la corrección de Bonferroni. Las comparaciones entre los diferentes grupos de tratamiento y el grupo control se realizó mediante t-test en el estudio de validación farmacológica. En los casos de violación de supuestos estadísticos se utilizaron la U de Mann-Whitney y el test de Kruskal-Wallis como alternativas no paramétricas. Para el análisis de la concordancia entre los parámetros registrados de dos formas diferentes en el estudio de caracterización farmacológica se utilizó el coeficiente de correlación intraclase (ICC) (Shrout y Fleiss 1979). El nivel de significación se fijó en  $p < 0.05$ .

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI  
VALIDEZ DEL LABERINTO CIRCULAR ELEVADO COMO MODELO ANIMAL DE ANSIEDAD EN ESTUDIOS TOXICOLÓGICOS  
Luis Heredia Santaella  
Dipòsit Legal: T.1558-2013

## Parte IV

# Resultados

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI  
VALIDEZ DEL LABERINTO CIRCULAR ELEVADO COMO MODELO ANIMAL DE ANSIEDAD EN ESTUDIOS TOXICOLÓGICOS  
Luis Heredia Santaella  
Dipòsit Legal: T.1558-2013

## CAPÍTULO 1

**Behavioral effects of oral subacute exposure to  
BDE-209 in young adult mice: A preliminary  
study**

---

Dada la importancia que la investigación está dando al estudio de los éteres difenílicos polibromados y su ya demostrada acumulación en el medio ambiente, este trabajo se centró en la evaluación de los efectos neuroconductuales derivados de una exposición subaguda a BDE-209 en población adulta. En él se evaluó el estado general del animal a través de la batería de observación funcional, la ansiedad mediante el laberinto circular elevado y la caja luz-oscuridad y, por último, la memoria espacial y la retención mediante el laberinto acuático de Morris. Los resultados no mostraron alteraciones significativas en el estado general del animal. No obstante, se pudo detectar un retraso en el aprendizaje espacial en los animales expuestos a BDE-209. A destacar es la incongruencia entre los resultados obtenidos en los dos modelos animales de ansiedad utilizados. Mientras que la caja luz-oscuridad no mostró diferencias significativas, el laberinto circular elevado evidenció diferencias significativas que podrían ser interpretadas como una reducción en los niveles de ansiedad de los animales expuestos a BDE-209. Sin embargo, el hecho de presentar mayor nivel de entradas en las zonas protegidas en este grupo y que resultaran significativas respecto al grupo control, sugiere que los resultados podrían deberse a la interferencia de el nivel general de actividad de los animales intoxicados. El problema se acrecentó al comprobar que en la literatura científica al respecto este parámetro es interpretado como indicador de alteraciones en los niveles de ansiedad y actividad indistintamente.



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI  
VALIDEZ DEL LABERINTO CIRCULAR ELEVADO COMO MODELO ANIMAL DE ANSIEDAD EN ESTUDIOS TOXICOLÓGICOS  
Luis Heredia Santaella  
Dipòsit Legal: T.1558-2013



## Behavioral effects of oral subacute exposure to BDE-209 in young adult mice: A preliminary study

Luis Heredia<sup>a,b</sup>, Margarita Torrente<sup>a,b,\*</sup>, María T. Colomina<sup>a,b</sup>, José L. Domingo<sup>b</sup>

<sup>a</sup>CRAMC, Department of Psychology, Universitat "Rovira i Virgili", Tarragona, Catalonia, Spain

<sup>b</sup>Laboratory of Toxicology and Environmental Health, School of Medicine, IISPV, Universitat "Rovira i Virgili", Reus, Catalonia, Spain

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 14 November 2011

Accepted 1 December 2011

Available online 9 December 2011

#### Keywords:

BDE-209

Tg2576 mice

Anxiety

Spatial learning

Subacute exposure

### ABSTRACT

In this study, we examined the effects of an oral subacute exposure to 2,2',3,3',4,4',5,5',6,6'-decabromodiphenyl ether (BDE-209) on young adult inbred wild type Tg2576 mice. BDE-209 was administered by gavage at doses of 0 and 20 mg/kg/day dissolved in sunflower oil for 15 days. Two behavioral endpoints were examined: anxiety-activity in a light/dark test and a zero maze test, and learning and spatial memory in a water maze test. Young adult mice exposed to BDE-209 showed a reduction in anxiety levels and a delayed learning in a spatial memory task. Although the results indicated that behavioral effects were present in a young adult exposed population of wild type Tg2576 mice, further studies on chronic exposure to BDE-209 are clearly necessary in order to corroborate these effects.

© 2011 Elsevier Ltd. All rights reserved.

### 1. Introduction

Polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) are a group of chemical substances that are used as additive flame-retardants in a number of consumer products. PBDEs are present in the environment, having been found at different levels in samples from sediments, surface waters, sludge, as well as house dust and indoor air (Ali et al., 2011; Covaci et al., 2011; Peng et al., 2009; Wang et al., 2011). Because PBDEs are lipophilic, they accumulate in fatty tissues of humans, mammals, fish, and birds (Anderson et al., 2008; Guerra et al., 2011; Moon et al., 2011; Rotander et al., 2011). The theoretical number of PBDE congeners is 209, which are divided into 10 congener groups (mono- to decabromodiphenyl ethers, based on the amount and position of the bromine atoms). Lower brominated congeners tend to accumulate in adipose tissue more than higher brominated congeners (Stapleton et al., 2006).

Concerning human exposure to PBDEs, the diet is considered to be the principal route, being PBDEs mainly detected in fish and shellfish (Bocio et al., 2003; Domingo et al., 2008; Domingo, 2011). PBDEs have been also found at relatively notable concentrations in indoor air and house dust. Therefore, some studies consider that inhalation is another important route by which PBDE levels increase in humans (Ali et al., 2011; Lorber, 2008; Vorkamp et al., 2011). Recently, Meeker et al. (2009) showed that human hormone levels (free T4) could be affected by concentrations of PBDEs (BDE 47, 99, and 100) in house dust.

Children are a high-risk population for PBDEs because these compounds can act as endocrine disruptors (Legler, 2008; Meerts et al., 2000), and be consumed in breast milk at critical stages in the development of the nervous system. Animal studies have shown that exposure to PBDEs at these critical stages may impair locomotor activity, habituation, and accuracy in learning and spatial memory tasks (Costa and Giordano, 2007). PBDEs can also decrease T4 levels in serum and alter the development of the cholinergic system after neonatal exposure (Costa and Giordano, 2007), while the effects on anxiety or impulsivity have been punctually studied (Driscoll et al., 2009; Fowles et al., 1994).

Although lower brominated congeners of PBDEs are banned by the EU, the highest brominated congener, 2,2',3,3',4,4',5,5',6,6'-decabromodiphenyl ether (BDE-209), is still being added to consumer products, as it was excluded from this ban (OJ L 271/48, 15.10.2005). The half-life and bioavailability of BDE-209 are lower than those of other PBDE congeners (Darnerud et al., 2001; Sandholm et al., 2003; Talsness, 2008). However, recent studies have shown that BDE-209 can be metabolized and accumulated through debromination and dehydroxylation processes in animal organisms (Kierkegaard et al., 2007; Sandholm et al., 2003) and human hepatocytes (Qiu et al., 2009; Stapleton et al., 2009).

BDE-209 is used in electronic appliances, car seats, carpets, mattresses, furniture, and building materials (Darnerud et al., 2001; Talsness, 2008). Recent studies have been focused on determining the potential risk of BDE-209 exposure. However, most investigations were based on acute prenatal or postnatal exposure (Rice et al., 2007; Viberg et al., 2006). Thus, information on the possible effects of BDE-209 intoxication on the adult population is

\* Corresponding author. Tel.: +34 977 759325; fax: +34 977 759322.

E-mail address: margarita.torrente@urv.cat (M. Torrente).

scarce. Studies on adults have mainly focused on physiopathological impairment at high dietary doses of BDE-209. Thyroid hyperplasia, liver enlargement, kidney-hyaline degeneration, as well as hematocrit and red cell count decreases have been observed (Darnerud et al., 2001; Norris et al., 1975). Moreover, after exposure for 15, 30, and 60 days, adult Swiss mice showed a permanent and dose-dependent impairment in the cholinergic system; more specifically an increase in total cholinesterase activity (Liang, 2010). This finding agrees with the learning and memory impairment reported in neonatal studies (Costa and Giordano, 2007).

The main goal of the present study was to investigate in young adult animals the behavioral effects of a subacute exposure to BDE-209, for which there is not available information. This preliminary study was focused on assessing these potential alterations in wild type Tg2576 mice, a genetic combination between C57BL/6N and SJL/N mice, widely used in toxicological studies as control animals. Inbred strains show low-level genetic polymorphism due to small original colony (Koide et al., 2011; Valdar et al., 2006). Thus, the use of wild type Tg2576 mice with a combined genetic background should allow that the results generalization may be more suitable given that behavior has been proven extremely variable among human beings (Koide et al., 2011).

## 2. Materials and methods

### 2.1. Animals and treatment

Male wild type Tg2576 mice (Taconic Europe, Lille Skensved, Denmark) were used in this study. At the beginning of the experimental period animals were 3 months old. Mice were individually housed in plastic cages (28 × 28 cm) in an animal room, which was maintained at a temperature of 22 ± 2 °C, with a relative humidity of 50 ± 10%, and a 12-h light/dark automatic light cycle (light, 8:00 AM to 8:00 PM) with food and water *ad libitum*. Two groups were randomly generated: (a) control group, 9 animals, and (b) BDE-209-treated group, 8 animals. Food and water consumption were recorded throughout the experimental period, which was established in 15 days (subacute exposure). During that period, mice were daily weighed. The BDE-209 treated group received doses of 20 mg/kg/day, a dose with adverse effects in neurodevelopmental studies (Goodman, 2009), by gavage of this compound (Saytexit102-E<sup>®</sup> provided by IGC Promochem, Barcelona, Spain) dissolved in sunflower oil (Koipesol<sup>®</sup>), while animals in the control group received sunflower oil only. At the end of the experimental period, all mice were sacrificed by cervical dislocation. The use of animals and the experimental protocol were approved by the Animal Care and Use Committee of the Universitat "Rovira i Virgili" (Tarragona, Catalonia, Spain).

### 2.2. Behavioral tests

#### 2.2.1. Functional observational battery (FOB)

Originally designed to assess neurotoxic effects on rats (Moser, 2000), the FOB has been also widely used and adapted for mice (Franco-Pons et al., 2007; Golub et al., 2004; Sills et al., 2000). In the present study, the FOB protocol consisted of 18 end-points, which evaluated central nervous system (CNS) activity and excitability, neuromuscular and autonomic effects, as well as sensorimotor reactivity (Franco-Pons et al., 2007; Sills et al., 2000). After animals were assessed in their own cages for activity, rearing, eating, climbing, stereotypy, grooming, and abnormal movements, they were removed and held by the observer so that ease-of-removal, handling reactivity and general appearance could be scored. Each mouse was then placed in an experimental white box (60 × 90 cm), while the observer analyzed CNS activity (arousal, rearing), autonomic effects (urination, defecation), muscle tone/equilibrium (gait, mobility, righting reflex, inverted screen), and sensorimotor reactivity (approach response, click response, touch response) (Franco-Pons et al., 2007; Golub et al., 2004). Both, control and BDE-209-treated groups performed this test on the same day.

#### 2.2.2. Light/dark test

The apparatus used for the light/dark test was based on that described by Crawley and Goodwin (1980). A closed top arena (45 × 27 × 27 cm), with methacrylate walls and opaque floor, comprised two compartments. One compartment was painted black and another white. The compartments were separated by a methacrylate partition with a centrally-positioned 7.5 × 7.5 cm opening at floor level. Testing was performed in a room with standard background illumination. The white compartment was illuminated by a lamp in the ceiling, while the dark compartment was not illuminated. Mice were individually placed in the center of the black compartment and allowed 5 min to explore the apparatus. Between a

mouse and the next one, the apparatus was cleaned with cloths dampened with 50% ethanol. The following parameters were evaluated: inter-compartmental transitions, time spent in the black compartment, latency to first entry into the white compartment, and number of urinations and defecations.

#### 2.2.3. Zero maze test

All animals were evaluated for anxiety and activity levels with the zero maze test. This is a pharmacologically validated assay of anxiety in animal models, which is based on the natural aversion of mice to elevated and open mazes (Kulkarni et al., 2007; Shepherd et al., 1994). It consists of a 6 cm wide ring with an outer diameter of 45 cm containing four equal quadrants of alternating walled (closed) or unwalled (open) sections. The entire ring is elevated 40 cm. Mice were placed in the closed region at the start of their 5-min sessions. The following parameters were examined: time spent in the open region, latency to first entry into the open region, number of entries into the open region, number of rearings (number of times the mouse stood on their two hind legs), number of groomings (self-cleaning behavior), number of head dips (downward movements of mouse's head toward the floor), and number of urinations and defecations. The maze was cleaned with tissue dampened with 50% ethanol between experiments.

#### 2.2.4. Water maze test

The water maze consisted of a circular tank (diameter: 1 m; height: 60 cm) divided into four quadrants. An escape platform (10 cm in diameter) was located 1 cm below the water surface in the target quadrant (Morris, 1984). Mice performed two trials per day for 10 consecutive days. During each trial, mice were allowed 90 s to find the hidden platform and remained on it for 30 s. If they failed to find the platform, they were placed on it by the experimenter. The inter-trial interval was 30 min. At the start of each trial, mice were randomly placed in one of the three non-target quadrants. Animals learn where the platform is from signals external to the maze (Vicens et al., 2003). To avoid proximal cues and to prevent egocentric learning, an internal mobile wall was added to the maze and randomly moved between trials (Ribes et al., 2008). On days 3, 5, 8, and 10 after the acquisition trials, animals performed a probe trial, which consisted of 60 s of free navigation without the platform. Seventy-two hours after the last training session, retention of the task was again tested by using the same procedure. Performance was recorded by a video camera placed above the maze and data were analyzed by the video tracking program Etho-Vision<sup>®</sup> v3.0 (Noldus Information Technologies, Wageningen, The Netherlands). The latency to find the escape platform, the distance traveled, and the swim velocity during the training sessions were measured. During the probe trials, total time spent in the target quadrant and the time spent in the other quadrants were also measured in order to compare the time searching in the target quadrant with the average time spent in the other quadrants.

### 2.3. Statistics

The statistical software SPSS<sup>®</sup> v17.0 was used to analyze the data. Behavioral data were compared by means of the *t*-test. The acquisition data, body weight, and food and water consumption were compared by means of one-way ANOVA for repeated measures. Variance homogeneity was analyzed using the Levene test. The Mann-Whitney *U*-test was used when appropriate. Significance was set at  $p < 0.05$ .

## 3. Results

### 3.1. Food and water consumption, and body weight

No deaths occurred during the experimental period. Body weight of the animals significantly increased during that period in both the control and the BDE-209-treated group ( $p = 0.001$ ). No significant differences in body weight were observed between these groups. To analyze food and water consumption, a mean value per cage was used. Significant differences in food consumption were observed over the experimental period ( $p = 0.045$ ). On days 14, 17, 19, 22, 24, and 25, water and food consumption were higher than in the remaining days. However, no significant differences between groups were observed.

### 3.2. Behavioral tests

#### 3.2.1. Functional observational battery (FOB)

Eighteen parameters were scored using the FOB in order to assess CNS activity and excitability, neuromuscular and autonomic effects, and sensorimotor reactivity. Statistical significance between the group means was tested. Results in arousal, expressed

as mean  $\pm$  SEM, were  $4.43 \pm 0.20$  and  $3.50 \pm 0.37$  for the control and the BDE-209-treated group, respectively. The results showed that *arousal* (state of being awake or reactive to stimuli) in the open-field was significantly higher in the control group than in the BDE-209-treated group ( $p = 0.027$ ). FOB test did not reveal any significant differences in other variables.

### 3.2.2. Light/dark test

The means of inter compartmental transitions, time spent in the black compartment, latency to first entry into the white compartment, and the number of urinations and defecations were compared. No significant differences between groups were found in these parameters (Fig. 1).

### 3.2.3. Zero maze test

The latency to enter into the open region, as well as the time spent there, are probably the best indicators of anxiety in this paradigm (Kulkarni et al., 2007; Shepherd et al., 1994). As anxiety indexes, we also tested the number of entries into the open region, number of head dips, number of groomings, number of rearings, and number of defecations and urinations (Milner and Crabbe, 2008). The *t*-test showed significant differences between groups in the number of entries ( $p = 0.033$ ), number of head dips ( $p = 0.034$ ), latency to first entry ( $p = 0.027$ ), and time spent in the unprotected area ( $p = 0.039$ ) (Fig. 2). Animals in the BDE-209-treated group showed an increase in these parameters with respect to those in the control group. However, no significant differences in other parameters were noted.

### 3.2.4. Water maze test

During the acquisition trials, both groups of mice showed significant differences in escape latencies over days ( $p = 0.025$ ). The time to find the platform decreased during the acquisition trials for both groups (Fig. 3). It also occurred with the distance traveled ( $p = 0.013$ ). Notwithstanding, no significant differences were observed between groups in these variables.

During the retention trials, the time spent in the target quadrant increased significantly throughout the probe trials for all groups ( $p = 0.006$ ). However, no significant differences were observed between groups in this variable. When the means of the time spent in the target quadrant were compared with the means of the time spent in other quadrants, for both the control group and treatment groups (Fig. 4), all differences were statistically significant ( $p = 0.001$ ), excepting those concerning the first probe trial in the treated group ( $p = 0.071$ ). It suggests that the initial performance of the BDE-209-exposed group was worse than that of the control group.

## 4. Discussion

The results of the current study show that 3 month-old mice, wild type Tg2576, orally exposed for 15 days to BDE-209 showed lower *arousal* (state of being awake or reactive to stimuli) than control mice, showing also lower anxiety levels (tested with the zero maze test). Moreover, in the water maze test, the BDE-209-treated group performed as the controls, with the exception noted in the first test, where they did not swim more time in the target quadrant than in the other quadrants. Regarding to water and food intakes, on days 14, 17, 19, 22, 24, and 25, the consumptions were higher than those observed in the remaining days. On those days, mice first came into contact with water and probe trials. This result can be explained by the increased anxiety levels due to water contact or the increased activity levels required at these days.

The lack of significant differences in the results, other than an increased *arousal* in the FOB, agrees with the results of a previous study showing that subacute exposure to BDE-209 at doses of 3000, 7500, and 15,000 mg/kg/day, given in the diet, did not alter the behavior of male adult mice (Darnerud et al., 2001). In the current investigation, treatment with BDE-209 led to significant alterations in the learning task. The lack of significant differences in the first trial of BDE-209-treated group might indicate that BDE-209-treated animals would need more trials to perform similarly than non-treated animals. Further studies are required to corroborate the impairment of learning and spatial memory. Recently, Liang (2010) reported an increase in total cholinesterase activity after a period of 15 days of exposure (gavage) of adult mice to BDE-209. A reduction in acetylcholine bioavailability might explain the current delay in learning noted in BDE-209-treated mice.

The results of the zero maze test showed an alteration in the anxiety levels. That test detected that the anxiety level of animals in the BDE-209 treated group was lower than that in mice of the control group. It was evidenced by increases in the time spent in the open area, the number of entries, and the number of head dips. These parameters have been related to a reduction in anxiety levels (Shepherd et al., 1994). Nevertheless, they could also reflect an increase in the activity levels.

Based on their chemical structures, it has been suggested that PBDEs and PCBs could have similar toxicity mechanisms (Darnerud et al., 2001; Talsness, 2008). It has been reported that anxiety and corticosterone levels increase in the offspring of rats following exposure to PCBs on gestation day 15 (Orito et al., 2007). In the current study, mice reduced their levels of anxiety after exposure to BDE-209. It has been reported that BDE-47, another PBDE congener, and its metabolites, act as full and partial agonists on the GABA<sub>A</sub> receptor, resulting in concentration-dependent activation and

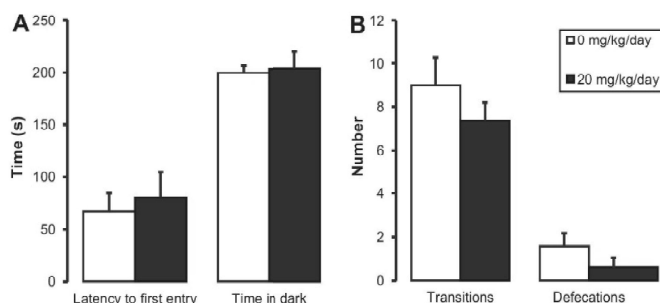
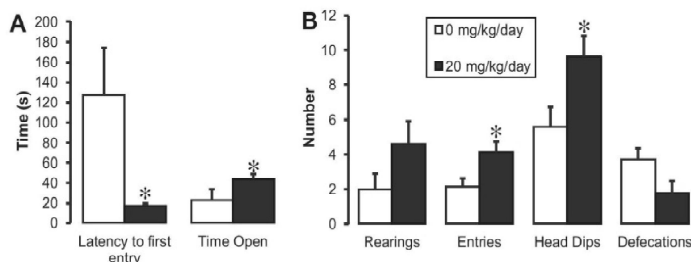
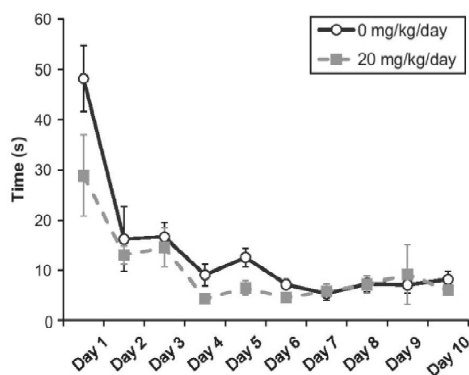


Fig. 1. Mean values ( $\pm$ SEM) of latencies of first entry into the white compartment and the time spent in the black compartment in the light/dark test (Panel A). Mean values ( $\pm$ SEM) of transitions and defecations in the light/dark test (Panel B).



**Fig. 2.** Mean values ( $\pm$ SEM) of latencies of first entry into the open region and the time spent in the open region in the zero maze test (Panel A). Mean values ( $\pm$ SEM) of rearings, entries to open area, head dips, and defecations in the zero maze test (Panel B). An asterisk indicates significant differences between the control and the BDE-209-treated group at  $p < 0.05$ .



**Fig. 3.** Escape latencies (mean values  $\pm$  SEM) in the water maze test during the acquisition days.

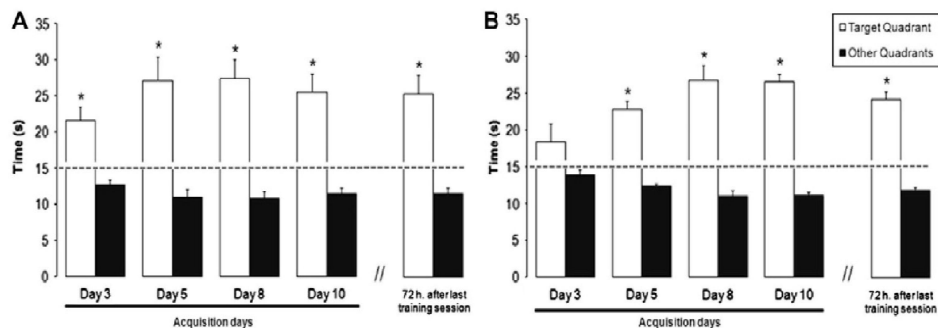
potentiation of the GABA<sub>A</sub> receptor (Hendriks et al., 2010). Based on this, and taking into account the current decreased anxiety levels, the present reduction in anxiety levels could be mediated by the potentiation of the GABA<sub>A</sub> receptor. However, data on the possible relationship between BDE-209, its metabolites, and the GABA<sub>A</sub> receptor are not available. In contrast to the present reduction in

the anxiety levels, it should be remarked that the increase in the levels of anxiety noted in rats prenatally exposed to PCB126 (Orito et al., 2007) might be due to the different action of the substance in prenatal and adult exposures. A better knowledge of the effects of PBDEs on anxiety and how these effects can be related to those found in PCB studies need additional investigations.

On the other hand, we also observed that the light/dark and zero maze anxiety tests were not equally sensitive. The light/dark test was not able to detect differences in anxiety levels between the control and the BDE-209-treated groups, which did the zero maze test. The differences in sensitivity were also found in a study comparing these tests using different strains and drugs (Mathiasen et al., 2008). The sensitivities of the light/dark and zero maze tests were clearly different and depended on the strain used, which is in agreement with the current results. These anxiety tests must be validated and characterized.

Johansson et al. (2008) analyzed the effects of BDE-209 in mice at four months old after a neonatal intoxication. No significant alterations were observed in anxiety levels assessed by the plus maze. The difference in sensitivity between anxiety tests may explain why no alterations were found in anxiety levels in a BDE-209 neonatal intoxication in young mice assessed by a plus maze. Anyhow, the available information on the effects of PBDEs on anxiety levels is clearly scarce, being even controversial because the results are strain and test dependent.

Based on the above, it is evident that studies on the neurotoxicity of PBDEs focused on the perinatal and neonatal periods are clearly required, while additional information on the effects of



**Fig. 4.** Retention trials in the water maze task. The mean time spent in the target quadrant in comparison to the other quadrants for the control group (Panel A) and the BDE-209-treated group (Panel B). The dashed line indicates an equal chance performance. Data are expressed as mean values  $\pm$  SEM. An asterisk indicates significant ( $p < 0.05$ ) retention of the task for this group.

BDE-209 exposure in adults is also essential. Further studies should be also performed in order to determine if the alterations detected in anxiety levels and learning may be explained by an increase in acetylcholinesterase activity, and an interaction between BDE-209 and the GABA<sub>A</sub> receptor. As PBDEs continue being accumulated in the environment, the knowledge of these effects should be useful to develop a better protection against them and, if necessary, to find alternative compounds to PBDEs not showing these potentially adverse health effects.

### Conflict of Interest

The authors declare that there are no conflicts of interests.

### Acknowledgments

The authors wish to thank Dr. Salazar, Dr. Ribes, and Ms. Reverté for their technical support. The present research was supported by the Spanish government (Fondo de Investigación Sanitaria). Project Number PI070823.

### References

- Ali, N., Harrad, S., Goosey, E., Neels, H., Covaci, A., 2011. "Novel" brominated flame retardants in Belgian and UK indoor dust: implications for human exposure. *Chemosphere* 83, 1360–1365.
- Anderson, H.A., Imm, P., Knobloch, L., Turyk, M., Mathew, J., Buelow, C., Persky, V., 2008. Polybrominated diphenyl ethers (PBDE) in serum: findings from a US cohort of consumers of sport-caught fish. *Chemosphere* 73, 187–194.
- Bocio, A., Llobet, J.M., Domingo, J.L., Corbella, J., Teixidó, A., Casas, C., 2003. Polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) in foodstuffs: human exposure through the diet. *J. Agric. Food. Chem.* 51, 3191–3195.
- Costa, L., Giordano, G., 2007. Developmental neurotoxicity of polybrominated diphenyl ether (PBDE) flame retardants. *Neurotoxicology* 28, 1047–1067.
- Covaci, A., Harrad, S., Abdallah, M.A., Ali, N., Law, R., Herzke, D., de Wit, C., 2011. Novel brominated flame retardants: a review of their analysis, environmental fate and behaviour. *Environ. Int.* 37, 532–556.
- Crawley, J., Goodwin, F.K., 1980. Preliminary report of a simple animal behavior model for the anxiolytic effects of benzodiazepines. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 13, 167–170.
- Damerud, P.O., Eriksen, G.S., Johannesson, T., Larsen, P.B., Viluksela, M., 2001. Polybrominated diphenyl ethers: occurrence, dietary exposure, and toxicology. *Environ. Health Perspect.* 109, 49–68.
- Domingo, J.L., Martí Cid, R., Castell, V., Llobet, J., 2008. Human exposure to PBDEs through the diet in Catalonia, Spain: temporal trend. A review of recent literature on dietary PBDE intake. *Toxicology* 248, 25–32.
- Domingo, J.L., 2011. Polybrominated diphenyl ethers in food and human dietary exposure: A review of the recent scientific literature. *Food Chem. Toxicol.* (in press).
- Driscoll, L.L., Gibson, A.M., Hieb, A., 2009. Chronic postnatal DE-71 exposure: effects on learning, attention and thyroxine levels. *Neurotoxicol. Teratol.* 31, 76–84.
- Fowles, J.R., Fairbrother, A., Baecher Steppan, L., Kerkvliet, N.I., 1994. Immunologic and endocrine effects of the flame-retardant pentabromodiphenyl ether (DE-71) in C57BL/6j mice. *Toxicology* 86, 49–61.
- Franco-Pons, N., Torrente, M., Colomina, M.T., Vilella, E., 2007. Behavioral deficits in the cuprizone-induced murine model of demyelination/remyelination. *Toxicol. Lett.* 169, 205–213.
- Golub, M., Germann, S., Lloyd, K.C.K., 2004. Behavioral characteristics of a nervous system-specific erbB4 knock-out mouse. *Behav. Brain Res.* 153, 159–170.
- Goodman, J.E., 2009. Neurodevelopmental effects of decabromodiphenyl ether (BDE-209) and implications for the Reference Dose. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 54, 91–104.
- Guerra, P., Alae, M., Jiménez, B., Papepavicius, G., Marvín, C., Macinnis, G., Eljarrat, E., Barceló, D., Champoux, L., Fernie, K., 2011. Emerging and historical brominated flame retardants in peregrine falcon (*Falco peregrinus*) eggs from Canada and Spain. *Environ. Int.* (in press).
- Hendriks, H., Antunes Fernandes, E., Bergman, A., van den Berg, M., Westerink, R.H.S., 2010. PCB-47, PBDE-47, and 6-OH-PBDE-47 differentially modulate human GABA<sub>A</sub> and alpha<sub>2</sub>beta<sub>2</sub> nicotinic acetylcholine receptors. *Toxicol. Sci.* 118, 635–642.
- Johansson, N., Viberg, H., Fredriksson, A., Eriksson, P., 2008. Neonatal exposure to deca-brominated diphenyl ether (PBDE 209) causes dose-response changes in spontaneous behaviour and cholinergic susceptibility in adult mice. *Neurotoxicology* 29, 911–919.
- Kierkegaard, A., Asplund, L., de Wit, C.A., McLachlan, M.S., Thomas, G.O., Sweetman, A.J., Jones, K.C., 2007. Fate of higher brominated PBDEs in lactating cows. *Environ. Sci. Technol.* 41, 417–423.
- Koide, T., Ikeda, K., Ogasawara, M., Shiroishi, T., Moriwaki, K., Takahashi, A., 2011. A new twist on behavioral genetics by incorporating wild-derived mouse strains. *Exp. Anim.* 60, 347–354.
- Kulkarni, S.K., Singh, K., Bishnoi, M., 2007. Elevated zero maze: a paradigm to evaluate anti-anxiety effects of drugs. *Methods Find. Exp. Clin. Pharmacol.* 29, 343–348.
- Legler, J., 2008. New insights into the endocrine disrupting effects of brominated flame retardants. *Chemosphere* 73, 216–222.
- Liang, S., 2010. Effects of repeated exposure to decabrominated diphenyl ether (BDE-209) on mice nervous system and its self repair. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 29, 297–301.
- Lorber, M., 2008. Exposure of Americans to polybrominated diphenyl ethers. *J. Expo. Sci. Environ. Epidemiol.* 18, 2–19.
- Mathiasen, L.S., Mirza, N.R., Rodgers, R.J., 2008. Strain- and model-dependent effects of chlordiazepoxide, L-838, 417 and zolpidem on anxiety-like behaviours in laboratory mice. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 90, 19–36.
- Meeker, J., Johnson, P., Camann, D., Hauser, R., 2009. Polybrominated diphenyl ether (PBDE) concentrations in house dust are related to hormone levels in men. *Sci. Total Environ.* 407, 3425–3429.
- Meerts, I.A., van Zanden, J.J., Luijckx, E.A., van Leeuwen-Bol, I., Marsh, G., Jakobsson, E., Bergman, A., Brouwer, A., 2000. Potent competitive interactions of some brominated flame retardants and related compounds with human transthyretin in vitro. *Toxicol. Sci.* 56, 95–104.
- Milner, L.C., Crabbe, J.C., 2008. Three murine anxiety models: results from multiple inbred strain comparisons. *Genes Brain Behav.* 7, 496–505.
- Moon, H., Lee, D., Lee, Y., Choi, M., Choi, H., Kannan, K., 2011. Polybrominated diphenyl ethers, polychlorinated biphenyls, and organochlorine pesticides in adipose tissues of Korean women. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* (in press).
- Morris, R., 1984. Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *J. Neurosci. Methods* 11, 47–60.
- Moser, V.C., 2000. The functional observational battery in adult and developing rats. *Neurotoxicology* 21, 989–996.
- Norris, J.M., Kociba, R.J., Schwetz, B.A., Rose, J.Q., Humiston, C.G., Jewett, G.L., Gehring, P.J., Mailhes, J.B., 1975. Toxicology of octabromobiphenyl and decabromodiphenyl oxide. *Environ. Health Perspect.* 11, 153–161.
- OJ L271/48, 15.10.2005, p.1. COMMISSION DECISION of 13 October 2005, amending for the purposes of adapting to the technical progress the Annex to Directive 2002/95/EC of the European Parliament and of the Council on the restriction of the use of certain hazardous substances in electrical and electronic equipment.
- Orito, K., Gotanda, N., Murakami, M., Ikeda, T., Egashira, N., Mishima, K., Fujiwara, M., 2007. Prenatal exposure to 3,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl (PCB126) promotes anxiogenic behavior in rats. *Tohoku J. Exp. Med.* 212, 151–157.
- Peng, X., Tang, C., Yu, Y., Tan, J., Huang, Q., Wu, J., Chen, S., Mai, B., 2009. Concentrations, transport, fate, and releases of polybrominated diphenyl ethers in sewage treatment plants in the Pearl River Delta, South China. *Environ. Int.* 35, 303–309.
- Qiu, X., Bigsby, R., Hites, R., 2009. Hydroxylated metabolites of polybrominated diphenyl ethers in human blood samples from the United States. *Environ. Health Perspect.* 117, 93–98.
- Ribes, D., Colomina, M.T., Vicens, P., Domingo, J.L., 2008. Effects of oral aluminum exposure on behavior and neurogenesis in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Exp. Neurol.* 214, 293–300.
- Rice, D., Reeve, E., Herlihy, A., Zoeller, R.T., Thompson, W.D., Markowski, V., 2007. Developmental delays and locomotor activity in the C57BL/6j mouse following neonatal exposure to the fully-brominated pbde, decabromodiphenyl ether. *Neurotoxicol. Teratol.* 29, 511–520.
- Rotander, A., van Bavel, B., Polder, A., Rigét, F., Auðunsson, G.A., Gabrielsen, G.W., Vikingsson, G., Bloch, D., Dam, M., 2011. Polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) in marine mammals from Arctic and North Atlantic regions, 1986–2009. *Environ. Int.* (in press).
- Sandholm, A., Emanuelsson, B., Wehler, E.K., 2003. Bioavailability and half-life of decabromodiphenyl ether (BDE-209) in rat. *Xenobiotica* 33, 1149–1158.
- 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 (Berl.)* 116, 56–64.
- Sills, R.C., Valentine, W.M., Moser, V., Graham, D.G., Morgan, D.L., 2000. Characterization of carbon disulfide neurotoxicity in C57BL/6 mice: behavioral, morphologic, and molecular effects. *Toxicol. Pathol.* 28, 142–148.
- Stapleton, H., Brazil, B., Holbrook, R.D., Mitchellmore, C., Benedict, R., Konstantinov, A., Potter, D., 2006. In vivo and in vitro debromination of decabromodiphenyl ether (BDE 209) by juvenile rainbow trout and common carp. *Environ. Sci. Technol.* 40, 4653–4658.
- Stapleton, H., Kelly, S., Pei, R., Letcher, R., Gunsch, C., 2009. Metabolism of polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) by human hepatocytes in vitro. *Environ. Health Perspect.* 117, 197–202.
- Talsness, C., 2008. Overview of toxicological aspects of polybrominated diphenyl ethers: a flame-retardant additive in several consumer products. *Environ. Res.* 108, 158–167.
- Valdar, W., Solberg, L., Gauguier, D., Cookson, W., Rawlins, J.N.P., Mott, R., Flint, J., 2006. Genetic and environmental effects on complex traits in mice. *Genetics* 174, 959–984.
- Viberg, H., Johansson, N., Fredriksson, A., Eriksson, J., Marsh, G., Eriksson, P., 2006. Neonatal exposure to higher brominated diphenyl ethers, hepta-, octa-, or nonabromodiphenyl ether, impairs spontaneous behavior and learning and memory functions of adult mice. *Toxicol. Sci.* 92, 211–218.

Vicens, P., Carrasco, M.d.C., Redolat, R., 2003. Aprendizaje espacial y laberinto de agua: metodología y aplicaciones. *Psicothema* 15, 539–544 (in Spanish).

Vorkamp, K., Thomsen, M., Frederiksen, M., Pedersen, M., Knudsen, L.E., 2011. Polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) in the indoor environment and associations with prenatal exposure. *Environ. Int.* 37, 1–10.

Wang, L., Lee, W., Lee, W., Chang Chien, G., 2011. Polybrominated diphenyl ethers in various atmospheric environments of Taiwan: their levels, source identification and influence of combustion sources. *Chemosphere* 84, 936–942.

## CAPÍTULO 2

### **Individual housing and handling procedures modify anxiety levels of Tg2576 mice assessed in the zero maze test**

---

Dado que los niveles basales de ansiedad podrían estar detrás de la incapacidad para detectar diferencias significativas en algunos parámetros espacio-temporales relacionados con la ansiedad como el tiempo en las áreas ansiógenas, en este estudio se evaluó la capacidad del amansamiento y el aislamiento social para modificar los niveles iniciales de ansiedad en el laberinto circular elevado bajo la hipótesis de que el amansamiento conseguiría reducirlos y el aislamiento incrementarlos. Se utilizaron ratones Tg2576 que en procedimientos experimentales deben ser sistemáticamente aislados debido a sus altos niveles de agresividad. Los resultados mostraron que el aislamiento social es capaz de incrementar los niveles de ansiedad de los animales y que el amansamiento puede revertir dicho efecto. Debido a que en los resultados se volvieron a encontrar diferencias significativas en el número de entradas entre algunos grupos, se realizó un estudio detallado de su relación con el tiempo para poder encontrar una expresión matemática que disociara los efectos correspondientes a variaciones en los niveles de ansiedad de los efectos derivados de cambios en los niveles de actividad. Los resultados mostraron que un nuevo parámetro basado en esta relación y denominado 'Tiempo por entradas' (TbE) es capaz de corregir el valor del tiempo en aquellos grupos con diferencias significativas en el número de entradas.



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI  
VALIDEZ DEL LABERINTO CIRCULAR ELEVADO COMO MODELO ANIMAL DE ANSIEDAD EN ESTUDIOS TOXICOLÓGICOS  
Luis Heredia Santaella  
Dipòsit Legal: T.1558-2013



## Individual housing and handling procedures modify anxiety levels of Tg2576 mice assessed in the zero maze test

Luis Heredia<sup>a,b</sup>, Margarita Torrente<sup>a,b,\*</sup>, José L. Domingo<sup>b</sup>, María T. Colomina<sup>a,b</sup>

<sup>a</sup> CRAMC, Department of Psychology, Universitat Rovira i Virgili University, Tarragona, Spain

<sup>b</sup> Laboratory of Toxicology and Environmental Health, School of Medicine, IISPV, Universitat Rovira i Virgili, Reus, Spain

### HIGHLIGHTS

- ▶ Individual housing increased the anxiety levels of wild type mice.
- ▶ Handling procedure reversed the effect of individual housing on anxiety levels.
- ▶ Tg2576 mice showed higher levels of activity compared to wild type mice.
- ▶ It is possible to reduce activity influence from anxiety indexes in a zero maze test.

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 24 March 2012

Received in revised form 11 June 2012

Accepted 30 June 2012

#### Keywords:

Anxiety

Activity

Zero maze test

Individual housing

Handling

Tg2576 mice

### ABSTRACT

The zero maze is an unconditioned anxiety test for mice, in which a number of environmental variables can modify the anxiety levels of the animals. In the present study, we have assessed how individual housing, handling procedure and interaction between individual housing and handling procedure affect the baseline anxiety of mice. Thirty-seven wild type mice and eighteen Tg2576 mice were used (obtained from crossing APPSWE hemizygous male C57BL6/SJL background with C57BL6/SJL female). Wild type mice were randomly assigned to four experimental groups: 1) group housed and unhandled, 2) group housed but handled, 3) individually housed, unhandled, and 4) individually housed and handled. In turn, Tg2576 mice were randomly assigned to two experimental groups: 1) individually housed, unhandled, and 2) individually housed and handled. The results show that individually housed mice exhibited more anxiety-related behaviors over a 5 min testing period than the other experimental groups. Use of the handling procedure was associated with a statistically significant reduction in anxiety-related behaviors among individually housed mice. No effects on anxiety-related behavior levels were observed when group housed animals were handled. When activity levels were significantly increased, a new parameter, "Time by Entries", helped to prevent activity from influencing anxiety parameters such as time in the open section of the zero maze test. This knowledge can help to design more efficient experiments without bias from data obtained by means of unconditioned tests.

© 2012 Elsevier Inc. All rights reserved.

### 1. Introduction

Nowadays, a number of different tests are available for assessing anxiety in rodents. These tests are classically divided between conditioned and unconditioned tests. Unconditioned tests are based on the natural aversion of rodents to novel environments, which evoke a conflict in rodents between exploratory and fear/defensive behavior [1]. This kind of test has certain advantages over conditioned tests; they require no previous training period, they are based on the spontaneous behavior of animals, they use a natural stimulus to induce anxiety states, they are not expensive, and they are simple to apply [2].

The zero maze is an unconditioned test for anxiety. It was developed as a modification of the plus maze test [3] and it was validated to assess anxiety in mice [4]. The zero maze test consists of a circular maze containing four equal quadrants alternating between unwallied (open) and walled (closed) sections. The baseline anxiety is scored using the values from different parameters. Time spent in the open sections is the scoring parameter most widely accepted as reflecting anxiety, while increases in the amount of time spent in the open sections are interpreted as decreased anxiety [5,6]. The time taken to leave the first closed section (latency) is another scoring parameter. Longer latencies suggest higher anxiety. The number of head dips is another index of anxiety [3,7–9]. Anxiety is thought to decrease as the number of head dips increases. The number of entries is partially related to anxiety levels and activity levels, while the number of rearings is generally used as an index of activity [6,10]. The number of groomings, number of defecations and number of urinations are

\* Corresponding author at: CRAMC, Department of Psychology, Universitat Rovira i Virgili University, Tarragona, Spain. Tel.: +34 977 759325; fax: +34 977 759322.  
E-mail address: [margarita.torrente@urv.cat](mailto:margarita.torrente@urv.cat) (M. Torrente).

also recorded. However, the meaning of these parameters and the interpretation of the increases or decreases derived from them are not sufficiently clear yet.

Interactions between environmental conditions and genetic background determine their behavior [11]. Many environmental variables can produce modifications on the baseline anxiety of mice [2]. Differences in home cage features can affect anxiety levels [12]. In turn, the protocol can modify baseline anxiety by adopting different handling methods [13,14], while maze construction can also modify anxiety levels [15].

Thus, experimental conditions must be adopted to modulate the baseline anxiety of mice in order to avoid “ground effect” or “ceiling effect”; otherwise, if the animals are very anxious, significant differences in their anxiety levels might not be detected [4,16]. Routine handling and individual housing are two experimental conditions that can modify baseline anxiety in mice. Routine handling of laboratory animals is an essential, but frequently ignored component, which has a considerable potential to influence anxiety and aversion to human approach and contact. Moreover, in a number of studies it is necessary to house animals individually. Some reasons to isolate animals are aggressiveness, experimental conditions, and/or technical requirements. Increased anxiety-like behavior in isolated mice has recently been shown [17–19], which indicates that it is necessary to control housing conditions. If the housing conditions are not controlled, groups cannot be compared and significant differences cannot be observed. At present, there have been few studies on the influence of routine handling and individual housing on the baseline anxiety of mice, as well as on information about how the two procedures interact.

In the present study, we determined how a handling protocol, individual housing, and the interaction between both, could modify anxiety-related behavior levels in Tg2576 mice and their corresponding wild type. Tg2576 mice are a widely used model in Alzheimer’s Disease (AD) studies. Because of their aggressiveness, they are usually individually housed [20] and compared with their corresponding wild type, which are usually housed in group.

## 2. Methods

### 2.1. Animals and treatment

Parental APPSWE hemizygous male mice (B6; SJL-Tg(APPSWE)2576Kha) were obtained from Taconic Europe (Lille Skensved, Denmark), the genetic background of this model (model 001349) is a on a mixed C57BL6 and SJL. These male mice were backcrossed with female (C57BL6/SJL) obtained from Charles River (Barcelona, Spain). At 2 months of age, animals were genotyped cutting the edge of mouse tail and analyzing and separated according to the genotype.

Thirty-seven wild type male mice and eighteen Tg2576 male mice were used in this study. Wild type mice were randomly assigned to four experimental groups: 1) group housed/unhandled (GU), 2) group housed/handled (GH), 3) individually housed/unhandled (IU), and 4) individually housed/handled (IH). Tg2576 mice were randomly assigned to two experimental groups: 1) individually housed/unhandled group (TgI), and 2) individually housed/handled group (TgH) (Fig. 1). Tg2576 mice were individually housed because, usually, they show a high level of aggressiveness in social interaction [20]. In group housed condition, there were 2 to 3 mice per cage.

All animals were housed in plastic cages, standard polycarbonate cages (220×220×145 mm), on standard fixed self-racks provided all by PanLab, S.L.U. in a climate-controlled facility at a temperature of 22±2 °C, a relative humidity of 50±10%, and a constant day-night cycle (light: 08:00–20:00 h) with free access to rodent chow (Harlan, Barcelona, Spain) and municipal tap water. The use of animals and the experimental protocol were approved by the Animal Care and

	Wild type mice		Tg 2576 mice	
	Unhandled	Handled	Unhandled	Handled
Group housed	Group GU (n=9)	Group GH (n=10)		
Individually housed	Group IU (n=9)	Group IH (n=9)	Group TgI (n=9)	Group TgH (n=9)

Fig. 1. Experimental groups of wild type and Tg2576 mice generated under different handling and isolation conditions.

Use Committee of the Universitat Rovira i Virgili (Tarragona, Catalonia, Spain).

### 2.2. Individual housing and handling procedures

All animals were housed individually for thirty days prior to behavioral testing (groups IU, IH, TgI and TgH). Individually housed animals were not allowed social interaction during the experimental procedure excepting those that were being handled by researchers.

A standardized protocol interaction between handled animals and researchers was systematically applied. This protocol was daily used at the same time for five days prior to the anxiety assessment. The protocol consisted of the following procedure: firstly, the animal was taken and identified; secondly, the animal was weighed; thirdly, the animal was placed on the forearm and touched, and finally, the animal was placed on the palm and returned to the home cage. The duration of the protocol was fixed at one minute for each mouse. For all groups of mice, behavioral testing was performed by all co-workers involved in the experimental procedures.

### 2.3. Zero maze test

All animals, at 9 months of age, were analyzed using indexes related to anxiety and activity levels. The zero maze test is a pharmacologically validated assay of anxiety in animal models, which is based on the natural aversion of mice to elevated and open mazes [3,4]. It is comprised of a white 6 cm wide ring with an outer diameter of 45 cm containing four equal zones of alternating walled (closed) or unwalled (open) sections. The entire ring is 40 cm high. All animals were tested at the same time of the day, from 09:00 to 11:00 AM. In the current investigation, mice were placed in the walled section at the start of a 5 minute session, being the following parameters analyzed: time spent in the open section, latency to first entry into the open section, number of entries into the open section, number of rearings (vertical standing of mice on two hind legs), number of groomings (self-cleaning behavior), number of head dips (downward movements of mice’s head toward the floor), and number of urinations and defecations. The maze was cleaned between experiments with a damp tissue containing 50% ethanol. During the behavioral testing, the lighting levels were maintained at 48.6 lx in all quadrants of the maze for the entire experimental period. The zero maze had no shadows over the surface. Similar lighting levels were used in previous studies [3,21].

### 2.4. Statistics

The statistical software SPSS© v17.0 was used to analyze the results. Behavioral data of the wild type mice were compared using an ANOVA test. Data from the Tg2576 groups were compared by the *t*-test, which was also used to compare Tg2576 groups and their respective wild type control groups. A Levene test was used to analyze variance homogeneity. Mann–Whitney U tests were used when appropriate. Significance was set at  $p < 0.05$ .

### 3. Results

#### 3.1. Wild type mice

Individually housed/unhandled wild type mice (group IU) showed increased levels of anxiety-like behaviors, which was demonstrated by the reduced amount of time that the mice spent in the open section ( $p=0.02$ ), as well as the reduced number of head dips they made ( $p=0.01$ ). Differences between these parameters were not found for the individually housed/handled animals (group IH, Fig. 3), so that individually housed/handled animals (group IH) showed the same levels of anxiety-like behaviors than group housed and unhandled (group GU) animals.

Finally, group housed/handled animals (group GH) showed an increase in the number of groomings (Fig. 4) compared to individually housed groups (groups IU and IH) ( $p=0.001$ ;  $p=0.02$ ). No significant differences in other parameters were observed for wild type animals (Fig. 5).

#### 3.2. Tg2576 mice

Tg2576 mice were systematically individually housed due to their high aggressiveness in social interaction. No significant differences in time spent in the open section were found (Fig. 3). Because time spent in the open section can be affected by activity levels, we developed a new parameter in order to minimize this effect. We divided the time spent in the open section by the square-root of number of entries for each animal (Fig. 2). We named this new anxiety index "Time by Entries" (TbE). Since entries only partially explain the anxiety levels, this parameter adjusts the influence of activity on time in the open section. We used the square-root in order to maximize differences at low levels of activity and minimize differences at high levels of activity or hyperactivity. It is based on the theoretical function of square-root as a half of parabola with a vertical directrix. If the entries increase (for example, when an animal crosses the open section rapidly and continuously), this parameter minimizes the effect of the high levels of activity over time spent in the open section. Since time in the open section increases when there are high activity levels, we can reevaluate the time spent in the open section by controlling for high activity levels with the TbE parameter. Because TbE is a correction of time in an open area, TbE must be interpreted as the time spent in the open area. Therefore, high TbE rating is indicative of low levels of anxiety, while low TbE rating is indicative of high levels of anxiety.

Although there were significant differences in the TbE parameter between the Tg2576 groups (Fig. 6), no differences in time were noted in the open section. TbE was higher among individually housed/handled animals (group TgH) than among individually housed/unhandled mice (group TgI) ( $p=0.024$ ). The Tg2576 handled animals (group TgH) showed a reduction in the number of rearings ( $p=0.001$ ) and entries ( $p=0.001$ ) (Fig. 5). These behaviors are indicators of activity levels. Moreover, the Tg2576 handled animals (group TgH) showed an increase in the number of groomings ( $p=0.001$ ) (Fig. 4).

#### 3.3. Tg2576 mice vs. wild type mice

The anxiety-related behaviors and activity levels of Tg2576 mice and wild type mice, under the same experimental conditions, were compared. The individually housed/unhandled wild type mice

$$TbE = \frac{\text{Time in open section}}{\sqrt{\text{Number of entries}}}$$

Fig. 2. Mathematical equation of the new anxiety index "Time by Entries" (TbE).

(group IU) were the control group for the individually housed/unhandled Tg2576 mice (group TgI). Time spent in the open section ( $p=0.002$ ) and number of head dips ( $p=0.001$ ) were higher in individually housed/unhandled Tg2576 animals (group TgI) than in individually housed/unhandled wild type mice (group IU) (Fig. 3). However, the number of rearings ( $p=0.002$ ) and the number of entries ( $p=0.004$ ) (Fig. 5) were higher in individually housed/unhandled Tg2576 mice (group TgI) than in individually housed/unhandled wild type mice also (group IU). Because activity levels can affect the time spent in the open section, we calculated the TbE for these groups (Fig. 6). The individually housed/handled wild type mice (group IH) were the control group for the individually housed/handled Tg2576 mice (group TgH). The number of groomings was higher in the individually housed/handled Tg2576 mice (group TgH) than in the individually housed/handled wild type mice (group IH) ( $p=0.024$ ) (Fig. 4). No significant differences were observed in the remaining parameters (Figs. 3, 5 and 6).

### 4. Discussion

The results of this study show that the handling procedure in wild type animals did not show any consistent effect on anxiety-like behavior levels if the animals were not individually housed (group GH). With respect to Tg2576 animals, individually housed/handled Tg2576 mice (group TgH) were less anxious than the individually housed/unhandled animals (group TgI), and Tg2576 handled animals (group TgH) showed a reduction in activity levels compared to the Tg2576 unhandled animals (group TgI). Comparing Tg2576 mice with their wild type controls, our results suggest that Tg2576 mice are less

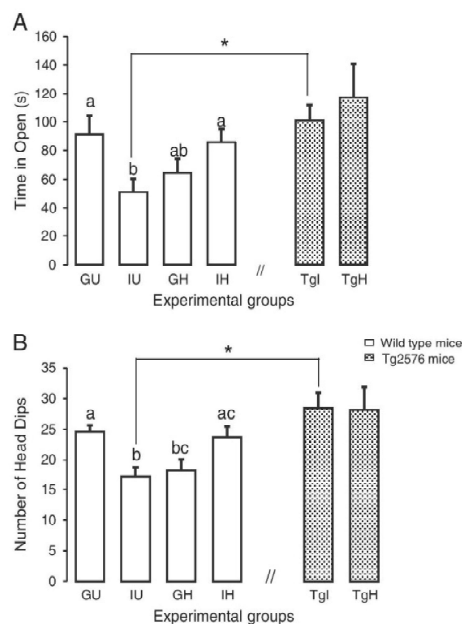
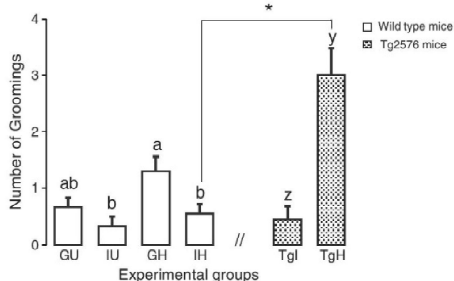
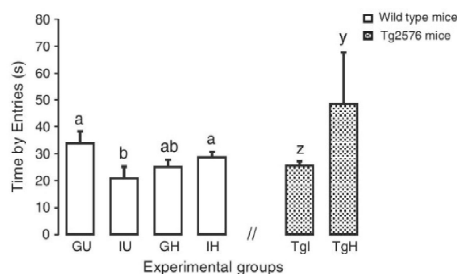


Fig. 3. Mean values ( $\pm$ SEM) of time spent in the open section of the zero maze test (Panel A). Mean values ( $\pm$ SEM) of the number of head dips in the zero maze test (Panel B). GU: group housed and unhandled mice. IU: individually housed and unhandled mice. GH: group housed and handled mice. IH: individually housed and handled mice. TgI: individually housed and unhandled mice. TgH: individually housed and handled mice. Different letters (a, b) indicate significant differences ( $p<0.05$ ) between wildtype genotype. An asterisk indicates significant differences between Tg2576 groups and their wild controls at  $p<0.05$ .



**Fig. 4.** Mean values ( $\pm$ SEM) of the number of groomings in the zero maze test. GU: group housed and unhandled mice. IU: individually housed and unhandled mice. GH: group housed and handled mice. IH: individually housed and handled mice. TgI: individually housed and unhandled mice. TgH: individually housed and handled mice. Different letters (a, b) and (z, y) indicate significant differences ( $p < 0.05$ ) between experimental groups for each genotype. An asterisk indicates significant differences between Tg2576 groups and their wild controls at  $p < 0.05$ .

anxious than wild type animals. But, after calculating TbE index, our results did not show significant differences for this parameter, and therefore, it is concluded that significant differences in time spent in



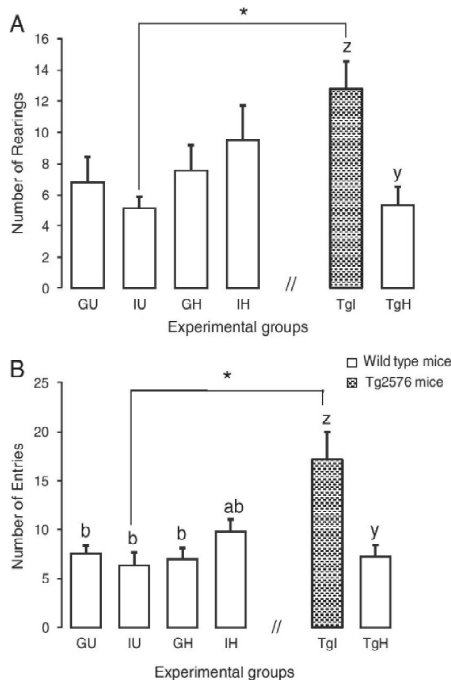
**Fig. 6.** Mean values ( $\pm$ SEM) of the time by entries in the zero maze test. GU: group housed and unhandled mice. IU: individually housed and unhandled mice. GH: group housed and handled mice. IH: individually housed and handled mice. TgI: individually housed and unhandled mice. TgH: individually housed and handled mice. Different letters (a, b) and (z, y) indicate significant differences ( $p < 0.05$ ) between experimental groups for each genotype.

the open section by Tg2576 mice are mediated by the activity levels of this group. It means that differences in time spent in the open section between individually housed/unhandled Tg2576 mice (group TgI) and individually housed/unhandled wild type mice (group IU), are not due to differences in anxiety-like behavior levels, but are due to differences in activity levels (Fig. 6).

Revising all the results overall we can conclude that individual housing procedure increased the anxiety-like behavior levels of wild type mice, while the handling procedure reversed the effect of individual housing in both wild type and Tg2576 animals. Tg2576 mice showed higher levels of activity compared to wild type mice. However, no consistent differences in anxiety-related behavior levels were observed.

Home cage features and housing conditions were controlled for individually housed and group housed animals. The current results confirm that individual housing can increase anxiety-like behavior levels in mice. Social isolation was the experimental condition that modified anxiety-like behavior. A similar conclusion was also reached by Kwak et al. in a recent study with C57BL/6J mice, who used the open field test and the forced swim test, reporting that social isolation selectively increased anxiety-like behavior levels in mice, while leaving depression-like behaviors unchanged [18]. In contrast, Voikar et al. observed a reduction in the anxiety-like behavior levels of isolated mice (C57BL/6J) examined using the plus maze test [22]. We assessed wild type and Tg2576 mice using a zero maze test. Our results show an increase in anxiety-related behavior levels caused by the individual housing as an isolation procedure. A possible reason for the differences with the results of previous investigations may be the duration of the individual housing before the behavioral testing. In the study by Kwak et al., animals were individually housed one week before the tests, while in the investigation by Voikar et al., animals were individually housed for seven weeks. Because in our study wild type mice were individually housed for four weeks prior to behavioral testing, we could argue that animals individually housed for seven weeks are fully habituated, being their anxiety-related behavior levels not modified as a result of their social isolation. This is an important finding because social isolation can be a source of bias in experimental data when comparing individually housed and group housed animals. Another possible reason for the contradictory results may be due to the use of different mazes (open field test, plus maze test and zero maze test), which could lead to different interpretations.

The handling procedure is a frequently ignored component of animal experiments. Our results show that the handling procedure does not affect anxiety-like behavior in mice when the animals are not individually housed. In a recent study, Arndt et al. did not observe differences in anxiety-like behavior levels due to individual housing in handled animals [23]. These results are congruent with our present data because,



**Fig. 5.** Mean values ( $\pm$ SEM) of the number of rearings in the zero maze test (Panel A). Mean values ( $\pm$ SEM) of number of entries in the zero maze test (Panel B). GU: group housed and unhandled mice. IU: individually housed and unhandled mice. GH: group housed and handled mice. IH: individually housed and handled mice. TgI: individually housed and unhandled mice. TgH: individually housed and handled mice. Different letters (a, b) and (z, y) indicate significant differences ( $p < 0.05$ ) between experimental groups for each genotype. An asterisk indicates significant differences between Tg2576 groups and their wild controls at  $p < 0.05$ .

anxiety-related behavior levels of individually housed animals diminished when they interacted with the researchers through the handling protocol. It suggests that the interaction with researchers maintains the mice at low levels of anxiety. Thus, differences in anxiety-related behavior levels due to individual housing were not observed if animals were handled previously. In other study, Arndt et al. (2006) did not observe differences in anxiety-related behavior levels due to individual housing without using a handling protocol [24]. However, the animals were individually housed for at least two weeks. In the present study, the interaction/handling protocol was well defined. The handling protocol was the same each day in which the interaction occurred. The handling protocol should be well defined to avoid novel situations in the procedure.

Only two parameters were able to detect differences in anxiety. These parameters were the time spent in the open sections and the number of head dips. Differences in other parameters were not found. Although groomings had been indicated as a measure of anxiety [25], our results indicated that grooming behavior is not related to other traditional measures of anxiety. It indicates that the latency to first entry and the number of urinations and defecations are less sensitive to changes in anxiety levels. However, this depends on basal anxiety levels of the strain used. Regarding the activity levels, Tg2576 mice showed increased levels in both vertical and horizontal activities compared with that in the wild type mice. Our results agree with those of previous studies in which increased levels of activity in Tg2576 mice were observed. Using open field test, increased levels of vertical activity in Tg2576 mice have been observed [26,27]. Tg2576 mice showed increased activity levels compared to wild type mice also in a plus maze test [28]. In our study, the number of entries and the number of rearings were the most sensitive activity parameters, not decreasing/increasing in accordance with the traditional anxiety-like parameters. It is important to note that, nowadays, the number of entries is a focus of considerable discussion, because it is not clear if this parameter is an activity index or an anxiety index. In the scientific literature, there are a number of studies whose results explain the increases or decreases in this parameter as either anxiety or activity differences [10,29–31]. One possible reason for these contradictory interpretations is that entries parameter is only partially related to anxiety levels. Time in the open section, as a parameter of anxiety, can be affected by the number of entries. It is important to distinguish if differences are related to anxiety or activity levels. We propose “*Time by Entries*” as a new index of anxiety to solve this question. Time by entries can give new information when levels in horizontal activity (measured by the entries parameter) are significantly different. This parameter can minimize the influence of activity levels on time spent in the open section and maintain the differences in anxiety levels when activity is not significantly increased.

To date, a notable number of studies have investigated anxiety alterations using unconditioned tests. In the current study, we have shown that environmental conditions such as individual housing and handling procedure can alter the results of an investigation. Although the baseline levels of anxiety-related behaviors in Tg2576 mice and their corresponding wild type are not always the same, we have demonstrated that after modifying experimental conditions through handling routine, their baseline levels of anxiety-related behaviors are comparable. Using a new anxiety index “*Time by Entries*”, it is also possible to remove activity influences from anxiety indexes in the zero maze test.

#### Conflict of interests

The authors declare that there are no conflicts of interests.

#### Acknowledgments

The authors wish to thank Dr Ribes and Dr Reverté for their technical support and Mr Espadas for his help with the statistical discussion of the

results. The present study was supported by the Spanish Government (SEJ2006-15628-C02-02).

#### References

- [1] Montgomery KC, Monkman JA. The relation between fear and exploratory behavior. *J Comp Physiol Psychol* 1955;48:132–6.
- [2] Bourin M, Petit-Demouliere B, Dhonnchadha BN, Hascoet M. Animal models of anxiety in mice. *Fundam Clin Pharmacol* 2007;21:567–74.
- [3] Shepherd JK, Grewal SS, Fletcher A, Bill DJ, Dourish CT. Behavioural and pharmacological characterisation of the elevated “zero-maze” as an animal model of anxiety. *Psychopharmacology (Berl)* 1994;116:56–64.
- [4] Kulkarni SK, Singh K, Bishnoi M. Elevated zero maze: a paradigm to evaluate anti-anxiety effects of drugs. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 2007;29:343–8.
- [5] Lister RG. The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. *Psychopharmacology* 1987;92:180–5.
- [6] Rodgers RJ, Cao BJ, Dalvi A, Holmes A. Animal models of anxiety: an ethological perspective. *Brain J Med Biol Res* 1997;30:289–304.
- [7] Cruz APM, Frei F, Graeff FG. Ethopharmacological analysis of rat behavior on the elevated plus-maze. *Pharmacol Biochem Behav* 1994;49:171–6.
- [8] Schneider P, Ho Y-J, Spanagel R, Pawlak CR. A novel elevated plus-maze procedure to avoid the one-trial tolerance problem. *Front Behav Neurosci* 2011;5:43.
- [9] Mathiasen LS, Mirza NR, Rodgers RJ. Strain- and model-dependent effects of chlordiazepoxide, L-838,417 and zolpidem on anxiety-like behaviours in laboratory mice. *Pharmacol Biochem Behav* 2008;90:19–36.
- [10] Weiss SM, Wadsworth G, Fletcher A, Dourish CT. Utility of ethological analysis to overcome locomotor confounds in elevated maze models of anxiety. *Neurosci Biobehav Rev* 1998;23:265–71.
- [11] Post AM, Weyers P, Holzer P, Painsipp E, Pauli P, Wulstsch T, et al. Gene-environment interaction influences anxiety-like behavior in ethologically based mouse models. *Behav Brain Res* 2011;218:99–105.
- [12] Bilkei-Gorzo A, Otto M, Zimmer A. Environmental modulation of anxiety-related neuronal activity and behaviors. *Behav Brain Res* 2008;186:289–92.
- [13] Hurst JL, West RS. Taming anxiety in laboratory mice. *Nat Methods* 2010;7:825–U1516.
- [14] Rasmussen S, Miller MM, Filipski SB, Tolwani RJ. Cage change influences serum corticosterone and anxiety-like behaviors in the mouse. *J Am Assoc Lab Anim Sci* 2011;50:479–83.
- [15] Hagenbuch N, Feldon J, Yee BK. Use of the elevated plus-maze test with opaque or transparent walls in the detection of mouse strain differences and the anxiolytic effects of diazepam. *Behav Pharmacol* 2006;17:31–41.
- [16] Hall FS, Humby T, Wilkinson LS, Robbins TW. The effects of isolation-rearing of rats on behavioural responses to food and environmental novelty. *Physiol Behav* 1997;62:281–90.
- [17] Arranz L, Giménez-Llort L, De Castro NM, Baeza I, De la Fuente M. Social isolation during old age worsens cognitive, behavioral and immune impairment. *Rev Esp Geriatr Gerontol* 2009;44:137–42.
- [18] Kwak C, Lee SH, Kaang BK. Social isolation selectively increases anxiety in mice without affecting depression-like behavior. *Korean J Physiol Pharmacol* 2009;13:357–60.
- [19] Conrad KL, Loderback KM, Gessner CP, Winder DG. Stress-induced alterations in anxiety-like behavior and adaptations in plasticity in the bed nucleus of the stria terminalis. *Physiol Behav* 2011;104:248–56.
- [20] Moechars D, Gilis M, Kuiperi C, Laenen I, Van Leuven F. Aggressive behaviour in transgenic mice expressing APP is alleviated by serotonergic drugs. *Neuroreport* 1998;9:3561–4.
- [21] Cook MN, Crouse M, Flaherty L. Anxiety in the elevated zero-maze is augmented in mice after repeated daily exposure. *Behav Genet* 2002;32:113–8.
- [22] Voikar V, Polus A, Vasar E, Rauvala H. Long-term individual housing in C57BL/6j and DBA/2 mice: assessment of behavioral consequences. *Genes Brain Behav* 2005;4:240–52.
- [23] Arndt SS, Laarakker MC, van Lith HA, van der Staay FJ, Gieling E, Salomons AR, et al. Individual housing of mice – impact on behaviour and stress responses. *Physiol Behav* 2009;97:385–93.
- [24] Arndt SS, Laarakker M, Sommer R, Lemmens I, Fielmich X, Van Lith HA, et al. Social housing in male mice – impact on experimental anxiety-related behaviour? *Eur Neuropsychopharmacol* 2006;16:S462.
- [25] Kalieff AV, Tuohimaa P. Mouse grooming microstructure is a reliable anxiety marker bidirectionally sensitive to GABAergic drugs. *Eur J Pharmacol* 2005;508:147–53.
- [26] Ribes D, Colomina MT, Vicens P, Domingo JL. Effects of oral aluminum exposure on behavior and neurogenesis in a transgenic mouse model of Alzheimer’s disease. *Exp Neurol* 2008;214:293–300.
- [27] García T, Ribes D, Teresa Colomina M, Cabre M, Domingo JL, Gomez M. Evaluation of the protective role of melatonin on the behavioral effects of aluminum in a mouse model of Alzheimer’s disease. *Toxicology* 2009;265:49–55.
- [28] Gil-Bea FJ, Aisa B, Schilebs R, Ramirez MJ. Increase of locomotor activity underlying the behavioral disinhibition in Tg2576 mice. *Behav Neurosci* 2007;121:340–4.
- [29] Naghibi B, Rayatnia F. Co-administration of subeffective anxiolytic doses of diazepam and hydroxyzine in elevated zero-maze in mice. *Psychiatry Invest* 2011;18:69–73.
- [30] Braun AA, Skelton MK, Vorhees CV, Williams MT. Comparison of the elevated plus and elevated zero mazes in treated and untreated male Sprague-Dawley rats: effects of anxiolytic and anxiogenic agents. *Pharmacol Biochem Behav* 2011;97:406–15.
- [31] Kulkarni SK, Singh K, Bishnoi M. Comparative behavioural profile of newer anti-anxiety drugs on different mazes. *Indian J Exp Biol* 2008;46:633–8.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI  
VALIDEZ DEL LABERINTO CIRCULAR ELEVADO COMO MODELO ANIMAL DE ANSIEDAD EN ESTUDIOS TOXICOLÓGICOS  
Luis Heredia Santaella  
Dipòsit Legal: T.1558-2013

### CAPÍTULO 3

## Assessing anxiety in C57BL/6J mice: A pharmacological characterization of the zero maze test

---

Ante la escasez de estudios de validación farmacológica del laberinto circular elevado con la cepa C57BL/6J y, sin embargo, siendo esta cepa recomendada para estudios de ansiedad y una de las más utilizadas en la actualidad, este trabajo se centró en evaluar la capacidad bidireccional de este laberinto para detectar alteraciones en los niveles de ansiedad mediante fármacos ansiolíticos y ansiógenos. Adicionalmente, se introdujo un fármaco estimulante psicomotor para producir alteraciones en los niveles de actividad y hallar una relación disociativa como se hizo en el anterior estudio. Para complementar el estudio fueron añadidos nuevos parámetros no testados hasta el momento en validaciones farmacológicas y un análisis pormenorizado minuto a minuto de algunos de ellos. Los resultados mostraron una conducta paradójica de estos animales ante el agente ansiolítico que podría ser interpretada como un incremento en los niveles de ansiedad, así como un efecto en los parámetros relacionados con la ansiedad debido al compuesto estimulante psicomotor. También se observó una alta resistencia a los efectos del fármaco ansiógeno. Dada la clara afectación de los niveles de actividad producida por el agente ansiolítico, los resultados podrían también explicarse por la presencia de un efecto sedante del compuesto, introduciendo una nueva variable en la interpretación de los resultados obtenidos en el laberinto circular elevado. El estudio pone en cuestión la fiabilidad de los resultados interpretados literalmente cuando se utiliza esta cepa y la confusión entre diferentes afectaciones.



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI  
VALIDEZ DEL LABERINTO CIRCULAR ELEVADO COMO MODELO ANIMAL DE ANSIEDAD EN ESTUDIOS TOXICOLÓGICOS  
Luis Heredia Santaella  
Dipòsit Legal: T.1558-2013



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Journal of Pharmacological and Toxicological Methods

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/jpharmtox](http://www.elsevier.com/locate/jpharmtox)



Original article

## Assessing anxiety in C57BL/6J mice: A pharmacological characterization of the zero maze test

Luis Heredia<sup>a,b</sup>, Margarita Torrente<sup>a,b,\*</sup>, María T. Colomina<sup>a,b</sup>, José L. Domingo<sup>b</sup>

<sup>a</sup> CRAMC (Research Center for Behavior Assessment), Department of Psychology, Universitat Rovira i Virgili, Tarragona, Spain

<sup>b</sup> Laboratory of Toxicology and Environmental Health, School of Medicine, ISPV, Universitat Rovira i Virgili, Reus, Spain

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 17 January 2013  
Accepted 19 February 2013  
Available online xxx

#### Keywords:

Anxiety  
Chlordiazepoxide  
C57BL/6J mice  
Methylphenidate  
Picrotoxine  
Zero maze test

### ABSTRACT

**Introduction:** Anxiety disorders affect the quality of life and good health of millions of people over the world. Because clinical trials are expensive and frequently show high rates of placebo responses, animal models have become an important tool for drug discovery and brain research. Zero maze is a commonly used test to assess anxiety-like levels in mice, being the C57BL/6J strain one of the most widely used. However, only few studies have focused on the pharmacological characterization of this strain in the various anxiety tests. **Methods:** In this study, we analyzed the changes in the anxiety-like behaviors of mice exposed to chlordiazepoxide (CLZ), as an anxiolytic drug, at doses of 2.5, 5 and 10 mg/kg, picrotoxine (PTX), as an anxiogenic drug, at doses of 0.5, 1 and 2 mg/kg, and methylphenidate (MPH), as a psychomotor stimulant, at doses of 2.5, 5 and 10 mg/kg. Data were hand recorded in situ by an observer and through a camcorder by computer software.

**Results:** Results showed that CLZ and MPH had an anxiogenic effect at the two highest doses. Only CLZ at 2.5 mg/kg reduced the anxiety-like levels of mice. Moreover, PTX exerted an anxiogenic effect in mice only at 2 mg/kg. The drugs affecting the anxiety-like levels also affected the activity levels. Thus, the differences might have been mediated by changes in activity levels.

**Discussion:** Globally, these data demonstrate that the results obtained from the zero maze test are difficult to interpret when the C57BL/6J strain is used. On the other hand, high doses of substances that interact with the GABAergic system, as CLZ, can produce sedation in these mice. In contrast, high doses of GABA<sub>A</sub> antagonists, as PTX, are necessary if anxiogenic effects should be observed. Further investigations with this strain are necessary in order to corroborate the results of the present study.

© 2013 Elsevier Inc. All rights reserved.

### 1. Introduction

As WH Auden said more than 60 years ago, 'Now is the age of anxiety' (Auden, 1947). Nowadays, anxiety is a life partner for many people and an ever-increasing strain on healthcare resources (Kessler et al., 2009). Anxiety is defined as an emotional state represented by a feeling of worry, apprehension, nervousness, or discomfort concerning an imminent or anticipated event whose resolution is uncertain. In Europe, a recent epidemiological study showed that nearly 69.1 million people are affected by anxiety disorders, 14% of which have a 12-month prevalence (Wittchen et al., 2011). Similar results were found in the USA, where anxiety disorders show a 12-month prevalence of 18.1% (Kessler & Wang, 2008). In adolescents, anxiety disorders are the most common class of disorders with prevalence ratios higher than

for mood or substance abuse disorders (Kessler et al., 2012). Generalized anxiety disorder (GAD) is one of the most common anxiety disorders in the general population with a lifetime prevalence of 5.7% in the USA and 1.7–3.4% in Europe (Kessler & Wang, 2008; Wittchen et al., 2011). Recently, it has been suggested that GAD is exacerbated by stressful life events (Francis, Moitra, Dyck, & Keller, 2012). Although anxiety disorders affect the quality of life and good health of millions of people around the world, little is still known about their etiology and causative factors. Therefore, more efficient methods of diagnosis and treatment should be necessary.

Because clinical trials are expensive, and frequently show high rates of placebo responses (Lakoff, 2002), animal models have become an important tool for drug discovery, identifying the genes underlying anxiety and brain research (Laarakker, van Lith, & Ohl, 2011). Nowadays, various tests for anxiety and stress are available. These tests are based on approach–avoidance conflicts, conditioned fear, punished responding conflict, and aggression and social behavior (Bakshi & Kalin, 2002; Hart et al., 2010). Some of the most used unconditioned tests are the open-field test, the light–dark paradigm and the plus/zero maze tests (Bourin, Petit-Demouliere, Dhonnchadha, & Hascoet, 2007). The zero

\* Corresponding author at: CRAMC (Research Center for Behavior Assessment), Department of Psychology, Universitat Rovira i Virgili, Tarragona, Spain. Tel.: +34 977 758933; fax: +34 977 759322.

E-mail address: margarita.torrente@urv.cat (M. Torrente).

## ARTICLE IN PRESS

2

L. Heredia et al. / Journal of Pharmacological and Toxicological Methods xxx (2013) xxx–xxx

maze test consists of a circular maze containing four equal quadrants with alternate unwall (open) and walled (closed) sections. It was developed as a modification of the plus maze test to solve the problems of interpreting the time that animals spent in the central square of maze (Shepherd, Grewal, Fletcher, Bill, & Dourish, 1994). Although the zero maze test is widely used to assess the psychological and neurochemical basis of anxiety, the results can be affected by environmental variables such as the housing conditions, the test conditions, the rest period, and the apparatus design, among others (Bourin et al., 2007; Heredia, Torrente, Domingo, & Colomina, 2012). Moreover, the interpretation of the experimental results must take into account various aspects that can lead to wrong conclusions (e.g. baseline, the animals' starting point, and floor and ceiling effects) (Bouwknrecht & Paylor, 2008). The zero maze test is based on the animals' aversion to elevated and open spaces (Montgomery & Monkman, 1955; Shepherd et al., 1994). Several measures are considered to be indicators of anxiety-like levels. The most commonly accepted measures are the time that the animals spend in open sections, as well as the latency to the first entry into open sections (Lister, 1987). Increases in the amount of time spent in open sections and shorter latencies are interpreted as decreased anxiety-like levels. However, other measures as the number of defecations, the number of head dips, the total number of transitions between sections and the number of groomings have also been proposed as indicators of anxiety-like levels (Kalueff & Tuohimaa, 2004). The zero maze test was pharmacologically validated for rats by Shepherd et al. (1994) and more recently by Kulkarni, Singh, and Bishnoi (2007) for mice.

Nowadays, a large number of genetic models of anxiety are available (Finn, Rutledge-Gorman, & Crabbe, 2003). It is important to note that the choice of strain can be crucial if reliable data should be obtained in anxiety-like animal models (Mathiasen, Mirza, & Rodgers, 2008). C57BL/6J mice are commonly used in the background to these models and they are one of the most used strain in comparative strain studies on anxiety ahead of DBA/2, BALB/c and 129 mice strains (Bouwknrecht & Paylor, 2008). Crawley (1996) observed that this strain had unusual anxiety-related behaviors and very low levels of anxiety (Tang, Xiao, Parris, Fang, & Sanford, 2005), while recently a "paradoxical" response to stress in this strain has been observed using the light/dark exploration test (Ihne, Fitzgerald, Hefner, & Holmes, 2012). However, few studies have focused on the pharmacological characterization of this strain.

The main goal of the present study was to perform a pharmacological characterization of the zero maze test using C57BL/6J mice. Chlordiazepoxide (CLZ), picrotoxine (PTX) and methylphenidate (MPH) were used. CLZ was the first clinically available benzodiazepine, being commonly used in the pharmacological characterizations of anxiety tests (Holmes, Iles, Mayell, & Rodgers, 2001; Kulkarni et al., 2007; Mathiasen et al., 2008; Weiss, Wadsworth, Fletcher, & Dourish, 1998). In turn, PTX is a GABA<sub>A</sub> receptor antagonist which blocks the chloride channel and it has already been used in pharmacological characterizations as an anxiogenic drug (Clenet, Hascoet, Fillion, Galons, & Bourin, 2005; Kulkarni et al., 2007). The capability of PTX to induce anxiogenic effects in mice has been reported in previous studies (Clement & Chapouthier, 1998; Kulkarni et al., 2007; Venault, Chapouthier, Prado de Carvalho, & Rossier, 1992). In turn, MPH blocks dopamine and norepinephrine reuptake transporters. However, they exert a minimal effect on serotonin transporters. This drug is able to increase the activity levels of mice (Ihne et al., 2012; Niculescu, Ehrlich, & Unterwald, 2005). Because changes in the activity levels can be confounded with changes in anxiety-like levels of mice, we used MPH in order to control potential 'false positives' related to increases in activity levels (Dawson, Crawford, Collinson, Iversen, & Tricklebank, 1995; Weiss et al., 1998). In addition, we also made an exhaustive analysis in time fractions of 1 min, analyzing whether there were differences between two different methods of recording measures: an experimented observer *in situ*, and computer software (Ethovision® v3.0).

## 2. Materials and methods

### 2.1. Animals

Ninety-nine male C57BL/6J mice (provided by Charles River, CRIFFA, Barcelona, Spain) were used in this study. All mice weighed between 25 and 30 g, being three months old at the beginning of the experimental procedure. They were all housed in the same standard plastic cages (4–5 animals/cage) in a climate-controlled facility at a temperature of  $22 \pm 2$  °C, a relative humidity of  $50 \pm 10\%$ , and a constant day–night cycle (light: 08:00–20:00 h), with free access to food and municipal tap water. At the end of the experimental period, all mice were sacrificed by cervical dislocation. The use of animals and the experimental protocol were approved by the Animal Care and Use Committee of the Universitat Rovira i Virgili (Tarragona, Catalonia, Spain) following the "Principles of laboratory animal care", and were carried out in accordance with the European Union Directive 2010/63/EU for animal experiments.

### 2.2. Groups and drug administration

The drugs used in this study were CLZ (Teofarma Iberica, Barcelona, Spain), PTX (Sigma-Aldrich Química, Madrid, Spain) and MPH (Laboratorios Rubió, Barcelona, Spain). Mice were randomly assigned to ten experimental groups. In experiment I (pharmacological validation with the initial doses of anxiolytic, anxiogenic drugs and a psychomotor stimulant), the experimental groups were the following: control (0.9% saline,  $n = 9$ ), CLZ groups (5 mg/kg,  $n = 9$  and 10 mg/kg,  $n = 9$ ), PTX groups (0.5 mg/kg,  $n = 9$  and 1 mg/kg,  $n = 9$ ), and MPH groups (5 mg/kg,  $n = 9$  and 10 mg/kg,  $n = 9$ ) (Table 1). In experiment II (complementary pharmacological validation with refined doses of anxiolytic, anxiogenic drugs and a psychomotor stimulant), there were four groups: control (0.9% saline,  $n = 9$ ), CLZ group (2.5 mg/kg,  $n = 9$ ), PTX group (2 mg/kg,  $n = 9$ ) and MPH group (2.5 mg/kg,  $n = 9$ ) (Table 2). All animals in each group were tested in the zero maze only once for 5 min. Thirty minutes before the test they were given an intraperitoneal (i.p.) injection of the drug dissolved in 0.9% saline solution or of the 0.9% saline solution without any drug (control group). All drug doses were based on the results of previous investigations with these drugs and their effects on anxiety in rodents (Kulkarni et al., 2007; Mathiasen et al., 2008; Niculescu et al., 2005).

### 2.3. Zero maze test

All animals were assessed using the zero maze test and their anxiety-like behaviors and activity-like indexes recorded. This test is a pharmacologically validated assay of anxiety in rodents, which is based on the natural aversion of mice to elevated and open spaces (Kulkarni et al., 2007; Shepherd et al., 1994). It is comprised of a white ring 6 cm wide with an outer diameter of 45 cm containing four equal quadrants of alternating walled (closed) or unwall (open) sections. The entire ring is elevated to the height of 40 cm. Mice were transported to the testing room 30 min before behavioral testing. Each animal was placed in the closed section at the start of

**Table 1**

Experimental groups generated under different drug and dose conditions for experiment I: Pharmacological validation with the initial doses of anxiolytic, anxiogenic drugs and a psychomotor stimulant.

Control group	Chlordiazepoxide groups (CLZ)		Picrotoxine groups (PTX)		Methylphenidate groups (MPH)	
Saline solution $n = 9$	5 mg/kg $n = 9$	10 mg/kg $n = 9$	0.5 mg/kg $n = 9$	1 mg/kg $n = 9$	5 mg/kg $n = 9$	10 mg/kg $n = 9$

**Table 2**

Experimental groups generated under different drug and dose conditions for Experiment II: Complementary pharmacological validation with refined doses of anxiolytic, anxiogenic drugs and a psychomotor stimulant.

Control group	Chlordiazepoxide group (CLZ)	Picrotoxine group (PTX)	Methylphenidate group (MPH)
Saline solution n = 9	2.5 mg/kg n = 9	2 mg/kg n = 9	2.5 mg/kg n = 9

the 5-min session. The following parameters were recorded in situ: time spent in the open section, latency to first entry into the open section, number of entries into the open section, number of rearings (vertical standing of mice on two hindlegs), number of groomings (self-cleaning behavior), number of head dips (downward movements of the head toward the floor), as well as the number of urinations and defecations. Moreover, performance was recorded by a video camera placed above the maze, being the data analyzed by the video tracking program Ethovision® v3.0 (Noldus Information Technologies, Wageningen, The Netherlands). The following parameters were analyzed: latency to first entry into the open section, time spent in the open section, number of entries into the open section, distance traveled in the maze, the distance ratio (distance traveled in open section/total distance traveled in the maze) and movement time (time in which the mouse actively explores the maze). These Ethovision® parameters were also analyzed in fractions of a minute. Each time, the maze was cleaned with a damp tissue containing 50% ethanol. During the behavioral testing, the lighting levels were maintained at 48.6 lx in all the quadrants of the maze. The zero maze had no shadows over the surface. Similar lighting levels were already used in previous studies (Cook, Crounse, & Flaherty, 2002; Shepherd et al., 1994).

#### 2.4. Statistical analysis

The statistical software SPSS® v17.0 was used to analyze the results. Analyses for variance homogeneity were performed using a Levene test. Each drug dose group was compared with its control group by the Student t-test (this method of analysis has been used in previous pharmacological characterizations (Kulkarni et al., 2007; Kulkarni, Singh, & Bishnoi, 2008; Weiss et al., 1998)). The Mann-Whitney U test was used as a non-parametric alternative test when the data were not normally distributed. The ANOVA test for repeated measures and Bonferroni post hoc were used to evaluate the progression of the parameters recorded by the Ethovision® software. A paired comparisons adjusted by Bonferroni's correction were also used to analyze differences between groups in each fraction of time. The intraclass correlation coefficient (ICC) was used to analyze the level of consistency between data recorded in situ by the observer and the data recorded by the Ethovision® software (Shrout & Fleiss, 1979). Significance was set at  $p < 0.05$ .

**Table 3**

The effects of CLZ, PTX and MPH on C57BL/6j mice exposed to the zero maze test in Experiment I for data recorded in situ.

Treatment	Dose	Time in open section (s)	Latency to enter in open section (s)	Number of entries	Number of rearings	Number of groomings	Number of head dips	Number of defecations	Number of urinations
Control		64.33 ± 4.78	17.66 ± 4.83	8.88 ± 0.91	6.00 ± 1.05	0.44 ± 0.17	28.77 ± 1.80	1.00 ± 0.44	0.22 ± 0.14
Chlordiazepoxide	5 mg/kg	55.44 ± 8.11	44.88 ± 16.57	7.77 ± 1.32	6.66 ± 0.83	1.11 ± 0.30	26.77 ± 3.79	0.77 ± 0.22	0.44 ± 0.17
	10 mg/kg	22.89 ± 8.64 <sup>*</sup>	70.66 ± 16.53 <sup>*</sup>	4.22 ± 1.21 <sup>*</sup>	2.22 ± 0.68 <sup>*</sup>	1.44 ± 0.37 <sup>*</sup>	17.22 ± 3.54 <sup>*</sup>	0.88 ± 0.35	0.11 ± 0.11
Picrotoxine	0.5 mg/kg	50.22 ± 7.14	42.55 ± 6.87 <sup>*</sup>	7.55 ± 1.21	3.22 ± 0.89	0.66 ± 0.37	30.33 ± 2.80	0.55 ± 0.33	0
	1 mg/kg	65.11 ± 10.84	28.44 ± 10.54	6.77 ± 0.90	4.77 ± 0.82	1.22 ± 0.27	25.77 ± 2.22	1.44 ± 0.64	0.33 ± 0.16
Methylphenidate	5 mg/kg	30 ± 8.79 <sup>*</sup>	18.44 ± 4.31	3.66 ± 1.37 <sup>*</sup>	2.55 ± 1.31	0.22 ± 0.14	15.77 ± 3.04 <sup>*</sup>	0.22 ± 0.22	0.11 ± 0.11
	10 mg/kg	15.44 ± 6.37 <sup>*</sup>	41.22 ± 16.67	2.66 ± 1.35 <sup>*</sup>	1.88 ± 0.67 <sup>*</sup>	1.11 ± 0.45	15.11 ± 1.44 <sup>*</sup>	0	0

Data are expressed as means ± SEM.

\*  $p < 0.05$  versus control group.

### 3. Results

#### 3.1. Experiment I: Pharmacological validation with the initial doses of anxiolytic, anxiogenic drugs and a psychomotor stimulant

##### 3.1.1. Effects of CLZ

Mice given 10 mg/kg of CLZ showed a reduction of time spent in the open section ( $p = 0.001$ ), number of head dips ( $p = 0.013$ ), and number of entries ( $p = 0.007$ ) in comparison to animals in the control group. The mean time to the first entry into the open section (latency) was also higher in this group than in the control group ( $p = 0.013$ ). Mice receiving 10 mg/kg of CLZ showed also fewer rearings ( $p = 0.008$ ). An increase in the number of groomings was observed at 10 mg/kg ( $p = 0.021$ ) (Table 3). In contrast, no significant differences were observed between the 5 mg/kg groups and the control group for all the variables recorded in situ.

In the parameters recorded by the software, mice exposed to 10 mg/kg of CLZ showed less time spent in the open section ( $p = 0.001$ ), a lower distance ratio ( $p = 0.001$ ), and fewer entries ( $p = 0.007$ ). The latency to the first entry into the open section was higher at the 5 and 10 mg/kg groups than in the control group ( $p = 0.040$  and  $p = 0.011$ , respectively). However, only mice given 10 mg/kg of CLZ showed a reduction in the distance traveled in the open section ( $p = 0.006$ ), the total distance traveled ( $p = 0.025$ ), the movement time in the open section ( $p = 0.002$ ) and total movement time ( $p = 0.025$ ) (Table 4).

When we explored the parameters for each minute using ANOVA for repeated measures, data showed an overall effect of the group factor on the time spent in open sections ( $p = 0.001$ ), total distance traveled ( $p = 0.034$ ), number of entries ( $p = 0.032$ ), and total movement time ( $p = 0.015$ ). Post-hoc analyses showed significant differences between the control group and the 10 mg/kg of CLZ group in these variables ( $p = 0.001$ ,  $p = 0.049$ ,  $p = 0.046$ , and  $p = 0.027$ , respectively). Regarding the time spent in the open section, differences were observed in minutes 0-1 and 3-4 ( $p = 0.006$  and  $p = 0.025$ ) (Fig. 1B). Animals in the CLZ 10 mg/kg group spent less time in the open section than those in the control group. This group also traveled less distance in the maze in minutes 0-1, 3-4 and 4-5 ( $p = 0.025$ ,  $p = 0.025$ , and  $p = 0.025$ , respectively) than the control group (Fig. 1C). The CLZ 10 mg/kg group did also fewer entries than the control group in minutes 0-1 and minutes 3-4 ( $p = 0.006$  and  $p = 0.025$ ) (Fig. 1A). Finally, the CLZ 10 mg/kg group showed less total movement time than the control group in minutes 0-1, 3-4 and 4-5 ( $p = 0.036$ ,  $p = 0.028$ , and  $p = 0.029$ , respectively) (Fig. 1D).

##### 3.1.2. Effects of PTX

Mice given 0.5 mg/kg of PTX showed an increased latency to the first entry into the open section. This increase was observed in the parameters recorded in situ ( $p = 0.011$ ) and also by the software ( $p = 0.037$ ). No significant differences were observed in the remaining parameters (Tables 3 and 4). Our analyses showed that time had an overall effect

ARTICLE IN PRESS

4

L. Heredia et al. / Journal of Pharmacological and Toxicological Methods xxx (2013) xxx-xxx

**Table 4**

The effects of CLZ, PTX and MPH on C57BL/6J mice exposed to the zero maze test in Experiment I for data recorded by computer software.

Treatment	Dose	Time in open section (s)	Latency to enter in open section (s)	Number of entries	Distance in open section (cm)	Total distance traveled (cm)	Movement time in open section (s)	Total movement time (s)	Distance ratio
Control		94.66 ± 7.48	9.02 ± 2.62	20.33 ± 1.50	366.95 ± 36.76	1175.94 ± 54.23	68.91 ± 5.82	201.64 ± 7.95	30.67 ± 1.71
Chlordiazepoxide	5 mg/kg	77.22 ± 10.09	22.28 ± 6.63*	19.44 ± 2.78	338.62 ± 52.12	1204.22 ± 126.92	59.37 ± 7.45	196.95 ± 15.78	26.85 ± 2.85
	10 mg/kg	38.82 ± 11.20*	68.71 ± 18.05*	11.88 ± 2.29*	155.31 ± 55.71*	824.51 ± 123.95*	30.04 ± 9.04*	144.15 ± 17.32*	15.25 ± 3.31*
Picrotoxine	0.5 mg/kg	97.68 ± 9.27	20.08 ± 4.07*	22.77 ± 1.93	351.04 ± 34.71	1107.36 ± 60.04	66.17 ± 5.98	204.48 ± 9.01	31.54 ± 2.26
	1 mg/kg	96.68 ± 12.93	13.35 ± 3.51	18.11 ± 1.09	333.23 ± 47.78	1030.53 ± 66.07	66.13 ± 8.23	193.73 ± 10.51	31.40 ± 3.26
Methylphenidate	5 mg/kg	45.13 ± 9.65*	19.13 ± 5.12	13.55 ± 2.31*	184.90 ± 53.08*	934.71 ± 114.20	37.04 ± 8.88*	182.48 ± 17.29	16.84 ± 3.51*
	10 mg/kg	31.53 ± 8.76*	13.02 ± 2.75	13.88 ± 2.61*	140.15 ± 52.63*	1133.49 ± 108.64	28.86 ± 8.17*	218.66 ± 15.42	11.07 ± 2.94*

Data are expressed as means ± SEM.

\* P < 0.05 versus control group.

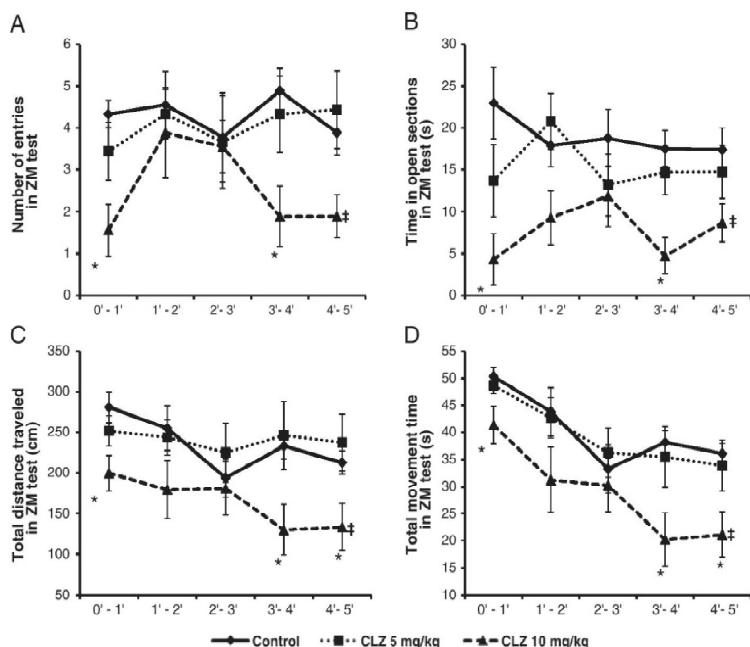
on movement time in the open section ( $p = 0.019$ ), total movement time ( $p < 0.001$ ), and total distance traveled ( $p = 0.036$ ). Mice exposed to 1 mg/kg of PTX did not show significant differences with the control group.

3.1.3. Effects of MPH

At doses of 5 mg/kg and 10 mg/kg of MPH, mice showed a reduction in the time spent in the open section ( $p = 0.005$  and  $p < 0.001$ ), the number of head dips ( $p = 0.002$  and  $p < 0.001$ ) and the number of entries ( $p = 0.006$  and  $p = 0.003$ ) recorded in situ, as well as a reduction in the time spent in the open section ( $p = 0.001$  and  $p < 0.001$ ), number of entries ( $p = 0.026$  and  $p = 0.048$ ), distance traveled in the open section ( $p = 0.012$  and  $p = 0.003$ ), movement time in the open section ( $p = 0.009$  and  $p = 0.001$ ), distance ratio ( $p = 0.004$  and  $p < 0.001$ )

and total movement time ( $p = 0.009$  and  $p = 0.001$ ) in the parameters recorded by the software. A reduction in the number of rearings was only observed at 10 mg/kg of MPH ( $p = 0.005$ ) (Tables 3 and 4).

ANOVA for repeated measures showed an overall effect of time and group on the time spent in the open section ( $p = 0.008$  and  $p < 0.001$ ), distance traveled in the open section ( $p = 0.006$  and  $p = 0.007$ ), movement time in the open section ( $p = 0.001$  and  $p = 0.003$ ), and distance ratio (distance traveled in the open section/total distance traveled) ( $p = 0.019$  and  $p < 0.001$ ). An overall effect of time was observed on total distance traveled ( $p < 0.001$ ) and number of entries ( $p < 0.001$ ). Moreover, a time × group effect was also noted on the number of entries ( $p = 0.006$ ). Post-hoc analyses revealed significant differences between the groups given MPH at 5 and 10 mg/kg, and the control group, in the time spent in the open



**Fig. 1.** Differences in number of entries (Panel A), time spent in open sections (Panel B), total distance traveled (Panel C), and total movement time (Panel D) between each of the CLZ groups and the control group in time fractions of 1 min. A double cross indicates significant differences between the CLZ group and the control group in post hoc analyses at  $p < 0.05$ . An asterisk indicates significant ( $p < 0.05$ ) differences in paired comparisons adjusted by Bonferroni's correction in each time fraction between the CLZ-treated group and the control group. Data are expressed as means ± SEM.

Please cite this article as: Heredia, L. et al., Assessing anxiety in C57BL/6J mice: A pharmacological characterization of the zero maze test, *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods* (2013), <http://dx.doi.org/10.1016/j.vascn.2013.02.010>

section ( $p = 0.001$  and  $p < 0.001$ ), distance traveled in the open section ( $p = 0.040$  and  $p = 0.008$ ), movement time in the open section ( $p = 0.023$  and  $p = 0.004$ ), and distance ratio ( $p = 0.005$  and  $p < 0.001$ ).

When we explored the parameters for each minute, mice in the MPH groups (5 and 10 mg/kg) showed fewer entries than animals in the control group in minutes 3-4 ( $p = 0.002$  and  $p = 0.003$ ) and 4-5 ( $p = 0.016$  and  $p = 0.009$ ) (Fig. 2A). In time spent in the open section, the MPH-10 mg/kg group spent less time than the control group in minutes 1-2, 2-3, 3-4 and 4-5 ( $p = 0.033$ ,  $p = 0.005$ ,  $p < 0.001$ , and  $p = 0.002$ , respectively). These differences were also observed in the MPH-5 mg/kg group, but only in minutes 2-3, 3-4, and 4-5 ( $p = 0.002$ ,  $p < 0.001$ , and  $p = 0.001$ , respectively) (Fig. 2B). In the distance traveled in the open section, there were differences between the MPH-10 mg/kg group and the control group in minutes 2-3 ( $p = 0.033$ ) and 3-4 ( $p = 0.004$ ). A similar difference was also observed in the MPH-5 mg/kg group, but only in minutes 3-4 ( $p = 0.001$ ) (Fig. 2C). Similar results were found in the movement time in the open sections. The MPH groups showed a lower movement time than the control group. The MPH-10 mg/kg group was significantly different in minutes 2-3, 3-4 and 4-5 ( $p = 0.038$ ,  $p < 0.001$ , and  $p = 0.013$ , respectively). In the MPH-5 mg/kg group these differences were only observed in minutes 3-4 ( $p = 0.002$ ) and 4-5 ( $p = 0.019$ ) (Fig. 3A). Finally, the MPH groups had a lower distance ratio than the control group: the MPH-10 mg/kg group in minutes 1-2 ( $p = 0.029$ ), 2-3 ( $p = 0.001$ ), 3-4 ( $p < 0.001$ ) and 4-5 ( $p = 0.002$ ), and the MPH-5 mg/kg group in minutes 2-3 ( $p = 0.004$ ), 3-4 ( $p = 0.004$ ), and 4-5 ( $p = 0.006$ ) (Fig. 3B).

### 3.2. Experiment II: Complementary pharmacological validation with refined doses of anxiolytic, anxiogenic drugs and a psychomotor stimulant

#### 3.2.1. Effects of CLZ

The analysis of the measures recorded in situ showed that the mice injected with 2.5 mg/kg of CLZ spent more time in the open section than those in the control group ( $p = 0.016$ ). Similarly, CLZ treated mice showed an increase in the number of rearings ( $p = 0.006$ ) and the number of entries ( $p = 0.031$ ). In the measures recorded by the software, the total distance traveled and total movement time were higher in the CLZ-2.5 mg/kg group than in the control group ( $p = 0.016$  and  $p = 0.038$ ) (Tables 5 and 6). No significant differences were observed using ANOVA for repeated measures analyses.

#### 3.2.2. Effects of PTX

A reduction in the time spent in the open section ( $p = 0.024$ ), the number of head dips ( $p < 0.001$ ), the number of entries ( $p < 0.001$ ), and an increase in the latency to the first entry into the open section ( $p = 0.024$ ) were observed in the measures recorded in situ for mice given PTX. Differences were also observed in the software measurements: time spent in open section ( $p < 0.001$ ), number of entries ( $p < 0.001$ ), latency to the first entry in open section ( $p < 0.001$ ), and the distance ratio ( $p = 0.022$ ). Moreover, a reduction in the distance traveled in the open section ( $p < 0.001$ ), the total distance traveled ( $p < 0.001$ ), the movement time in the open section ( $p < 0.001$ ) and the total movement time ( $p = 0.001$ ) was also noted (Tables 5 and 6). ANOVA for repeated measures showed an overall effect of time on the number of entries ( $p = 0.001$ ), the total distance traveled

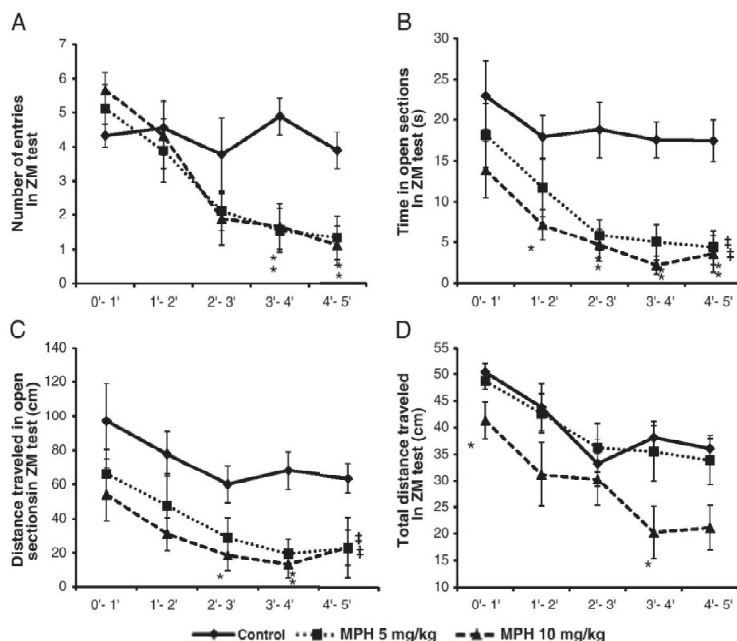


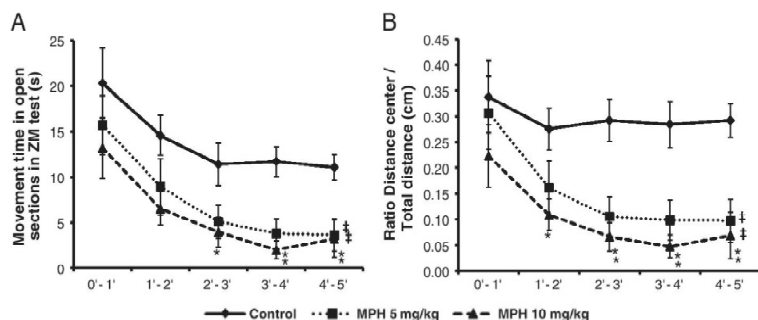
Fig. 2. Differences in number of entries (Panel A), time spent in open sections (Panel B), distance traveled in open sections (Panel C), and total distance traveled (Panel D) between each of the MPH groups and the control group in time fractions of 1 min. A double cross indicates significant differences between the MPH and the control group in post hoc analyses at  $p < 0.05$ . An asterisk indicates significant differences ( $p < 0.05$ ) in paired comparisons adjusted by Bonferroni's correction in each time fraction between the MPH-treated group and the control group. Data are expressed as means  $\pm$  SEM.

Please cite this article as: Heredia, L., et al., Assessing anxiety in C57BL/6J mice: A pharmacological characterization of the zero maze test, *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods* (2013), <http://dx.doi.org/10.1016/j.vascn.2013.02.010>

ARTICLE IN PRESS

6

L. Heredia et al. / Journal of Pharmacological and Toxicological Methods xxx (2013) xxx-xxx



**Fig. 3.** Differences in movement time in open sections (Panel A) and distance ratio (Panel B) between each of the MPH group and the control group in time fractions of 1 min. A double cross indicates significant differences between the MPH group and the control group in post hoc analyses at  $p < 0.05$ . An asterisk indicates significant differences ( $p < 0.05$ ) in paired comparisons adjusted by Bonferroni's correction in each time fraction between the MPH-treated group and the control group. Data are expressed as means  $\pm$  SEM.

( $p = 0.006$ ) and the total movement time ( $p = 0.001$ ). Post-hoc analyses revealed significant differences between the PTX-2 mg/kg group and the control group in the number of entries ( $p < 0.001$ ), the total distance traveled ( $p < 0.001$ ), the total movement time ( $p < 0.001$ ) and the distance ratio ( $p = 0.040$ ). When the parameters for each minute were assessed, the PTX-2 mg/kg group showed fewer entries into the open section than the control group in minutes 0-1 ( $p = 0.005$ ), 1-2 ( $p = 0.037$ ), 3-4 ( $p = 0.043$ ), and 4-5 ( $p = 0.010$ ) (Fig. 4A). Likewise, this group of mice showed a reduction in the total distance traveled and total movement time in minutes 0-1 ( $p < 0.001$  and  $p < 0.001$ ), 1-2 ( $p < 0.001$  and  $p < 0.001$ ), 3-4 ( $p = 0.002$  and  $p = 0.001$ ) and 4-5 ( $p < 0.001$  and  $p < 0.001$ ) (Fig. 4B, C). Finally, the PTX-2 mg/kg group showed a lower distance ratio than that of the control group in minutes 3-4 ( $p = 0.002$ ) (Fig. 4D).

3.2.3. Effects of MPH

Neither in situ nor software measures showed significant differences in relation to values from the control group. When the parameters

for each minute were assessed, the results did not show significant differences between groups.

3.3. Consistency between data recorded in situ and data recorded by the software

In order to analyze the levels of consistency and agreement between the two scoring methods, we used the intraclass correlation coefficient (ICC 3,1) as described by Shrout and Fleiss (1979). Two indexes were calculated - "consistency" and "absolute agreement" - to detect the presence of a potential systematic error in the measurements. We calculated these indexes for the time spent in the open section, the number of entries and the latency to the first entry into the open section only, because these were the coincident measures recorded by the two methods. Analyses of the time spent in the open section indicated an index of consistency  $ICC(C,1) = 0.86$  ( $p < 0.001$ ) and an index of absolute agreement  $ICC(A,1) = 0.71$  ( $p < 0.001$ ). The results for latency measures were  $ICC(C,1) = 0.64$  ( $p < 0.001$ ) and  $ICC(A,1) = 0.60$

**Table 5**

The effects of CLZ, PTX and MPH on C57BL/6J mice exposed to the zero maze test in experiment II for data recorded in situ.

Treatment	Dose	Time in open section (s)	Latency to enter in open section (s)	Number of entries	Number of rearings	Number of groomings	Number of head dips	Number of defecations	Number of urinations
Control		29.77 $\pm$ 2.84	28.77 $\pm$ 6.01	5.33 $\pm$ 0.79	2.44 $\pm$ 0.76	0.66 $\pm$ 0.16	21.44 $\pm$ 1.44	1.00 $\pm$ 0.50	0.11 $\pm$ 0.11
Chlordiazepoxide	2.5 mg/kg	45.22 $\pm$ 4.98*	61.55 $\pm$ 19.57	7.77 $\pm$ 1.01*	7.11 $\pm$ 1.26*	0.66 $\pm$ 0.16	25.55 $\pm$ 2.87	0.77 $\pm$ 0.36	0
Picrotoxine	2 mg/kg	14.44 $\pm$ 9.93*	215 $\pm$ 38.97*	0.88 $\pm$ 0.53*	0.66 $\pm$ 0.47	0.22 $\pm$ 0.22	5 $\pm$ 1.21*	0.55 $\pm$ 0.29	0.44 $\pm$ 0.24
Methylphenidate	2.5 mg/kg	42.22 $\pm$ 7.23	34.77 $\pm$ 7.09	6 $\pm$ 1.28	2.22 $\pm$ 0.87	0.44 $\pm$ 0.17	19.77 $\pm$ 1.62	0.55 $\pm$ 0.44	0.11 $\pm$ 0.11

Data are expressed as means  $\pm$  SEM.

\*  $p < 0.05$  versus control group.

**Table 6**

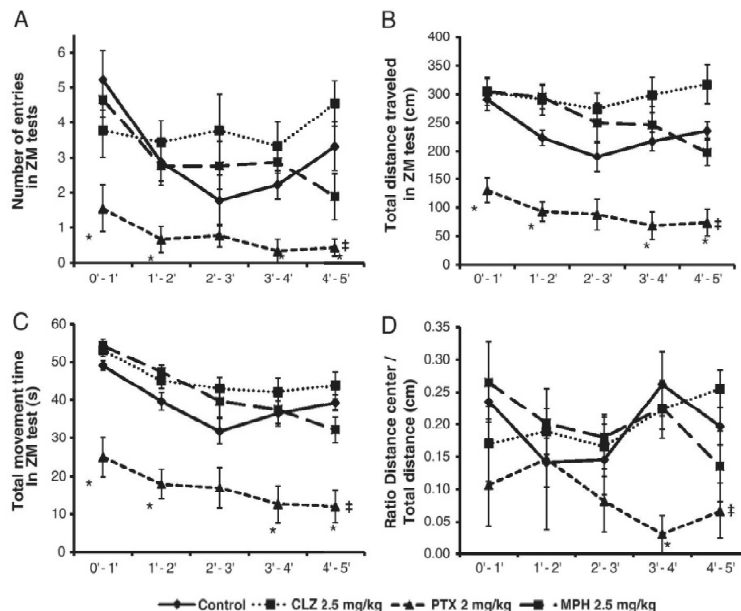
The effects of CLZ, PIX and MPH on C57BL/6J mice exposed to the zero maze test in experiment II for data recorded by computer software.

Treatment	Dose	Time in open section (s)	Latency to enter in open section (s)	Number of entries	Distance in open section (cm)	Total distance traveled (cm)	Movement time in open section (s)	Total movement time (s)	Distance ratio
Control		49.71 $\pm$ 4.03	8.06 $\pm$ 2.50	14.77 $\pm$ 1.50	248.43 $\pm$ 21.19	1158.33 $\pm$ 48.73	41.51 $\pm$ 2.97	196.40 $\pm$ 6.66	21.24 $\pm$ 1.11
Chlordiazepoxide	2.5 mg/kg	57.66 $\pm$ 7.32	23.60 $\pm$ 8.81	18.11 $\pm$ 1.73	326.31 $\pm$ 49.72	1484.56 $\pm$ 111.36*	49.51 $\pm$ 5.87	227.11 $\pm$ 11.81*	20.86 $\pm$ 2.58
Picrotoxine	2 mg/kg	25.53 $\pm$ 14.66*	122 $\pm$ 44.66*	3.22 $\pm$ 1.25*	47.55 $\pm$ 25.15*	453.97 $\pm$ 105.72*	8.75 $\pm$ 4.78*	84.68 $\pm$ 21.58*	9.15 $\pm$ 4.23*
Methylphenidate	2.5 mg/kg	57.02 $\pm$ 8.14	5.77 $\pm$ 1.56	14.11 $\pm$ 1.78	303.65 $\pm$ 56.06	1293.67 $\pm$ 114.89	47.40 $\pm$ 6.49	210.93 $\pm$ 12.42	21.86 $\pm$ 2.77

Data are expressed as means  $\pm$  SEM.

\*  $p < 0.05$  versus control group.

Please cite this article as: Heredia, L. et al., Assessing anxiety in C57BL/6J mice: A pharmacological characterization of the zero maze test, *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods* (2013), <http://dx.doi.org/10.1016/j.vascn.2013.02.010>



**Fig. 4.** Differences in number of entries (Panel A), total distance traveled (Panel B), total movement time (Panel C) and distance ratio (Panel D) between each of the treatment groups and the control group in time fractions of 1 min. A double cross indicates significant differences between the treatment group and the control group in post hoc analyses at  $p < 0.05$ . An asterisk indicates significant ( $p < 0.05$ ) differences in paired comparisons adjusted by Bonferroni's correction in each time fraction between the respective treated group and the control group. Data are expressed as means  $\pm$  SEM.

( $p < 0.001$ ). Finally, the results for the number of entries were  $ICC(C,1) = 0.69$  ( $p < 0.001$ ) and  $ICC(A,1) = 0.29$  ( $p < 0.001$ ).

#### 4. Discussion

The present study focused on the reliability of the various measures available when an experimenter decides using the zero maze as an anxiety-like test. We selected C57BL/6J mice because this strain is frequently used in anxiety and toxicological studies, while it has been subjected to few pharmacological characterizations in the zero maze test (Bouwknicht & Paylor, 2008). To analyze the various measures that can be recorded in the test, we used a GABA<sub>A</sub> agonistic drug (CLZ) and a GABA<sub>A</sub> antagonist drug (picrotoxine). It was expected that the mice anxiety-like levels would be reduced after administration of CLZ and would be increased after administration of PTX. The validity of zero maze test has been questioned because psychostimulants that increase activity levels such as d-amphetamine can produce 'false-positives' (Weiss et al., 1998). The most commonly used parameters as indicators of anxiety-like levels can be modified after d-amphetamine administration (Dawson et al., 1995; Reynolds, McKernan, & Dawson, 2001; Weiss et al., 1998). In these cases, to distinguish the changes in anxiety or activity levels is not possible. In order to assess whether an increase in the activity levels of the mice might affect the anxiety-like measures, we also included different doses of MPH in this study (Niculescu et al., 2005).

In the first experiment, the results of administering CLZ were unexpected. Mice given 5 mg/kg of CLZ showed a general tendency to increase their anxiety-like levels, whereas mice receiving 10 mg/kg of CLZ showed significant increases. Specifically, animals spent less time in the open section, making also fewer head dips than those in the control group. The latency to the first entry into the open section was also

lower in the CLZ-10 mg/kg group than in the control group. These results suggest that CLZ increased the anxiety-like levels of the mice. In a pharmacological validation conducted by Mathiasen et al. (2008), CLZ showed an anxiogenic profile in C57BL/6J mice, but not in NMRI and DBA mice. Specifically, a dose of 20 mg/kg of CLZ reduced the time spent in open sections, the number of rearings and the number of stretched-attend postures (SAP) in C57BL/6J mice. In contrast, in a recent study conducted by Ihne et al. (2012), a dose of 10 mg/kg of CLZ did not modify the anxiety-like levels of C57BL/6J mice, assessed in both the plus maze test and the open-field test. This absence of anxiolytic-like effects of CLZ in C57 mice agrees with the previous results reported by Rodgers, Davies, and Shore (2002). However, the anxiolytic effects of CLZ have been observed in Sprague-Dawley and Lister rats, and also in Swiss Webster and NMRI mice, in the plus maze and zero maze tests (Lister, 1987; Pellow, Chopin, File, & Briley, 1985; Shepherd et al., 1994; Troelsen, Nielsen, & Mirza, 2005). In the current study, a dose of 10 mg/kg of CLZ modified the anxiety-like and also the activity levels. At this dose of CLZ, activity indexes such as the total distance traveled, total movement time, and number of entries were lower. Therefore, it could be argued that these differences were due to changes in the locomotor activity of mice. Since this strain is considered to show "an unusual anxiety-like behavior" (Crawley, 1996), this dose of CLZ may have a sedative effect on C57BL/6J mice. A similar conclusion was obtained by Mathiasen et al. (2008). In a previous study, Yilmazer-Hanke, Roskoden, Zilles, and Schwegler (2003) observed that this strain of mice showed a reduction in the density of the GABA<sub>A</sub> receptor in more regions of the amygdala than other strains. Recently, Ressler (2010) reported that the amygdala is probably related to fear and anxiety. Thus, the differences in the gabaergic system might explain our results. When we analyzed the data in fractions of 1 min, the mice given CLZ showed a stable pattern of behavior, and time did not have



## ARTICLE IN PRESS

8

L. Heredia et al. / Journal of Pharmacological and Toxicological Methods xxx (2013) xxx–xxx

a significant effect on behavior. Differences were significant at the beginning and during the last 2 min, being observed in both anxiety-like and activity measures. Thus, the levels of anxiety in mice are affected by activity levels. The current results suggest that the test should last at least 5 min, because in the first 3 min the differences may be difficult to observe.

PTX significantly increased only the latency to the first entry into the open section when the animals received 0.5 mg/kg of this drug. These data were not in agreement with the other measures of anxiety. No effects were observed at 1 mg/kg of PTX. Therefore, the results cannot be interpreted as increased anxiety-like levels, because a minimum level of congruence between parameters is necessary to interpret the mice behavior (Bouwknicht & Paylor, 2008). However, there is a general tendency in all measures that indicates that these doses were probably too low for C57BL/6J mice. The groups injected with 5 mg/kg and 10 mg/kg of MPH showed a consistent anxiogenic profile. These doses of MPH significantly increased the traditional measures of anxiety-like behavior. When we analyzed the five-minute period by fractions of one minute, the differences between groups were maximum during the last three minutes of the test. The anxiogenic effects of various psychomotor stimulants (such as methylphenidate, caffeine and d-amphetamine) in the light/dark test were previously reported (Hascoet & Bourin, 1998; Ihne et al., 2012; Imaizumi, Suzuki, Machida, & Onodera, 1994). Biala and Kruk (2007) observed that d-amphetamine induced anxiety-related behavior in Swiss mice in a plus maze test. Recently, Ihne et al. (2012) also suggested a possible anxiogenic effect of MPH, at 7.5 mg/kg, in C57BL/6J mice. MPH modified activity indexes such as the number of entries and rearings. However, we did not observe differences in other activity measures, as the total distance traveled in the maze or in total movement time. Notwithstanding, when activity levels were assessed in plastic cages with a photo beam recording system, increased levels of activity were seen in CD-1 mice at these doses of MPH (Niculescu et al., 2005). These differences may be due to the differences between strains, or differences between the tests used. An interaction between maze and strain was noted by Mathiasen et al. (2008). The zero maze test was developed to assess anxiety-like behavior and its ability to assess activity levels is not currently clear. Taking into account our results and the results of these authors, we conclude that differences between MPH groups are due to changes in anxiety-like levels.

In the first experiment, we found that CLZ had a sedative effect on C57BL/6J mice, being the PTX doses too low to show an anxiogenic effect. In the second experiment, we used doses of 2.5 mg/kg of CLZ, 2 mg/kg of PTX, and 2.5 mg/kg of MPH, expecting to observe an anxiogenic effect of PTX and an anxiolytic effect of CLZ. Results indicated that CLZ had an anxiolytic effect because mice increased the time spent in the open section, as well as the number of entries. However, these differences were also noted in the activity measures: increases in the total distance traveled and total movement time. Therefore, this reduction in anxiety levels might be explained by an increase in the activity levels. Mice injected with PTX showed changes in all the traditional measures of anxiety, showing a clear anxiogenic profile. However, these animals reduced their activity levels. These lower levels might explain the differences in the anxiety measures. The 2.5 mg/kg dose of MPH did not change the behavioral measures. This dose may be too low to alter anxiety and activity indexes. Regarding time fractions, the PTX group showed differences in every fraction of time, while time did not show any effect on behavior.

Finally, the ICC indexes showed a good level of agreement for time spent in the open section and latency to the first entry into the open section. However, there were differences between the two ICC coefficients calculated for the number of entries. In accordance with the two-coefficient theory, this difference may be due to a systematic error in the measurement of entries, as the second index "absolute agreement" takes into account the systematic error in the measures.

The criterion used by the computer software and the experimenter was probably not the same. The researcher counted entries only if the animal had its four paws in the open section, while the computer software determined the position of the animal on the basis of the center of the figure recorded by the camera above the maze.

## 5. Conclusions

Although C57BL/6J is the most commonly used strain in anxiety and toxicological studies, little is known about how these mice behave in the mazes used to evaluate anxiety levels. In the present study, the changes in the measures traditionally used as anxiety indicators were mediated through changes in activity levels (when we used the elevated zero maze as anxiety test). Therefore, it is rather difficult to interpret the results in the zero maze test when this strain is used to assess the effects of new drugs on anxiety/activity levels. Moreover, high doses of substances that interact with the gabaergic system can produce sedation in these animals. In contrast, high doses of GABA<sub>A</sub> antagonists are necessary to observe an anxiogenic effect in the behavior of these mice. If an anxiety study is conducted with C57BL/6J mice, this information about their anxiety-related behavior should be considered to interpret the results. Consequently, this strain may not be the best option for testing novel substances and their effects on anxiety levels. Further investigations with other strains and different mazes are required if anxiety should be properly evaluated.

## Acknowledgments

The authors wish to thank Ms. Aguilar, Ms. Chernichero and Mr. Valencia for their technical support. The present research was supported by the 'Rovira i Virgili' University (project number 2010-AIRE-03).

## References

- Auden, W. H. (1947). *The age of anxiety: A baroque eclogue*. New York: Random House.
- Bakshi, V. P., & Kalin, N. H. (2002). Animal models and endophenotypes of anxiety and stress disorders. *Neuropsychopharmacology: The Fifth Generation of Progress* (pp. 883–900). Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins.
- Biala, G., & Kruk, M. (2007). Amphetamine-induced anxiety-related behavior in animal models. *Pharmacological Reports*, 59, 636–644.
- Bourin, M., Petit-Demouliere, B., Dhonnchadha, B. N., & Hascoet, M. (2007). Animal models of anxiety in mice. *Fundamental and Clinical Pharmacology*, 21, 567–574.
- Bouwknicht, J. A., & Paylor, R. (2008). Pitfalls in the interpretation of genetic and pharmacological effects on anxiety-like behaviour in rodents. *Behavioural Pharmacology*, 19, 385–402.
- Clement, Y., & Chapouthier, G. (1998). Biological bases of anxiety. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 22, 623–633.
- Clenet, F., Hascoet, M., Fillion, G., Galons, H., & Bourin, M. (2005). Role of GABA-ergic and serotonergic systems in the anxiolytic-like mechanism of action of a 5-HT<sub>2</sub>-moduline antagonist in the mouse elevated plus maze. *Behavioural Brain Research*, 158, 339–348.
- Cook, M. N., Crouse, M., & Flaherty, L. (2002). Anxiety in the elevated zero-maze is augmented in mice after repeated daily exposure. *Behavior Genetics*, 32, 113–118.
- Crawley, J. N. (1996). Unusual behavioral phenotypes of inbred mouse strains – Commentary. *Trends in Neurosciences*, 19, 181–182.
- Dawson, G. R., Crawford, S. P., Collinson, N., Iversen, S. D., & Tricklebank, M. D. (1995). Evidence that the anxiolytic-like effects of chlordiazepoxide on the elevated plus-maze are confounded by increases in locomotor-activity. *Psychopharmacology*, 118, 316–323.
- Finn, D. A., Rutledge-Gorman, M. T., & Crabbe, J. C. (2003). Genetic animal models of anxiety. *Neurogenetics*, 4, 109–135.
- Francis, J. L., Moltra, E., Dyck, I., & Keller, M. B. (2012). The impact of stressful life events on relapse of generalized anxiety disorder. *Depression and Anxiety*, 29, 386–391.
- Hart, P. C., Bergner, C. L., Smolinsky, A. N., Dufour, B. D., Egan, R. J., Laporte, J. L., et al. (2010). Experimental models of anxiety for drug discovery and brain research. *Methods in Molecular Biology*, Vol. 602. (pp. 299–321).
- Hascoet, M., & Bourin, M. (1998). A new approach to the light/dark test procedure in mice. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 60, 645–653.
- Heredia, L., Torrente, M., Domingo, J. L., & Colomina, M. T. (2012). Individual housing and handling procedures modify anxiety levels of Tg2576 mice assessed in the zero maze test. *Physiology and Behavior*, 107, 187–191.
- Holmes, A., Iles, J. P., Mayell, S. J., & Rodgers, R. J. (2001). Prior test experience compromises the anxiolytic efficacy of chlordiazepoxide in the mouse light/dark exploration test. *Behavioural Brain Research*, 122, 159–167.

Please cite this article as: Heredia, L., et al., Assessing anxiety in C57BL/6J mice: A pharmacological characterization of the zero maze test, *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods* (2013), <http://dx.doi.org/10.1016/j.vascn.2013.02.010>

## ARTICLE IN PRESS

L. Heredia et al. / Journal of Pharmacological and Toxicological Methods xxx (2013) xxx–xxx

9

- Ihne, J. L., Fitzgerald, P. J., Hefner, K. R., & Holmes, A. (2012). Pharmacological modulation of stress-induced behavioral changes in the light/dark exploration test in male C57BL/6j mice. *Neuropharmacology*, *62*, 464–473.
- Imaizumi, M., Suzuki, T., Machida, H., & Onodera, K. (1994). A fully automated apparatus for a light/dark test measuring anxiolytic or anxiogenic effects of drugs in mice. *Japanese Journal of Psychopharmacology*, *14*, 83–91.
- Kaloupek, A. V., & Tuohimaa, P. (2004). Experimental modeling of anxiety and depression. *Acta Neurobiologicae Experimentalis*, *64*, 439–448.
- Kessler, R. C., Aguilar-Gaxiola, S., Alonso, J., Chatterji, S., Lee, S., Ormel, J., et al. (2009). The global burden of mental disorders: An update from the WHO World Mental Health (WMH) Surveys. *Epidemiologia e Psichiatria Sociale*, *18*, 23–33.
- Kessler, R. C., Avenevoli, S., Costello, E. J., Georgiades, K., Green, J. G., Gruber, M. J., et al. (2012). Prevalence, persistence, and sociodemographic correlates of DSM-IV disorders in the national comorbidity survey replication adolescent supplement. *Archives of General Psychiatry*, *69*, 372–380.
- Kessler, R. C., & Wang, P. S. (2008). The descriptive epidemiology of commonly occurring mental disorders in the United States. *Annual Review of Public Health*, *29*, 115–129.
- Kulkarni, S. K., Singh, K., & Bishnoi, M. (2007). Elevated zero maze: A paradigm to evaluate anti-anxiety effects of drugs. *Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology*, *29*, 343–348.
- Kulkarni, S. K., Singh, K., & Bishnoi, M. (2008). Comparative behavioural profile of newer anti-anxiety drugs on different mazes. *Indian Journal of Experimental Biology*, *46*, 633–638.
- Laarakker, M. C., van Lith, H. A., & Ohl, F. (2011). Behavioral characterization of A/J and C57BL/6j mice using a multidimensional test: Association between blood plasma and brain magnesium-ion concentration with anxiety. *Physiology and Behavior*, *102*, 205–219.
- Lakoff, A. (2002). The mousetrap: managing the placebo effect in antidepressant trials. *Molecular Interventions*, *2*, 72–76.
- Lister, R. G. (1987). The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. *Psychopharmacology*, *92*, 180–185.
- Mathiasen, L. S., Mirza, N. R., & Rodgers, R. J. (2008). Strain- and model-dependent effects of chlordiazepoxide, L-838,417 and zolpidem on anxiety-like behaviours in laboratory mice. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, *90*, 19–36.
- Montgomery, K. C., & Monkman, J. A. (1955). The relation between fear and exploratory behavior. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, *48*, 132–136.
- Niculescu, M., Ehrlich, M. E., & Unterwald, E. M. (2005). Age-specific behavioral responses to psychostimulants in mice. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, *82*, 280–288.
- Pellow, S., Chopin, P., File, S. E., & Briley, M. (1985). Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *Journal of Neuroscience Methods*, *14*, 149–167.
- Ressler, K. J. (2010). Amygdala activity, fear, and anxiety: modulation by stress. *Biological Psychiatry*, *67*, 1117–1119.
- Reynolds, D. S., McKernan, R. M., & Dawson, G. R. (2001). Anxiolytic-like action of diazepam: which GABA(A) receptor subtype is involved? *Trends in Pharmacological Sciences*, *22*, 402–403.
- Rodgers, R. J., Davies, B., & Shore, R. (2002). Absence of anxiolytic response to chlordiazepoxide in two common background strains exposed to the elevated plus-maze: Importance and implications of behavioural baseline. *Genes, Brain, and Behavior*, *1*, 242–251.
- 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.
- Shrout, P. E., & Fleiss, J. L. (1979). Intraclass correlations – Uses in assessing rater reliability. *Psychological Bulletin*, *86*, 420–428.
- Tang, X. D., Xiao, J. H., Parris, B. S., Fang, J. D., & Sanford, L. D. (2005). Differential effects of two types of environmental novelty on activity and sleep in BALB/cj and C57BL/6j mice. *Physiology and Behavior*, *85*, 419–429.
- Troelsen, K. B., Nielsen, E. O., & Mirza, N. R. (2005). Chronic treatment with duloxetine is necessary for an anxiolytic-like response in the mouse zero maze: The role of the serotonin transporter. *Psychopharmacology*, *181*, 741–750.
- Venault, P., Chapouthier, G., Prado de Carvalho, L., & Rossier, J. (1992). Effects of convulsant ligands of the GABA-benzodiazepine receptor complex in conflict and learning tasks in mice. *L'Encéphale*, *18*, 655–660.
- Weiss, S. M., Wadsworth, G., Fletcher, A., & Dourish, C. T. (1998). Utility of ethological analysis to overcome locomotor confounds in elevated maze models of anxiety. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, *23*, 265–271.
- Wittchen, H. U., Jacobi, F., Rehm, J., Gustavsson, A., Svensson, M., Jonsson, B., et al. (2011). The size and burden of mental disorders and other disorders of the brain in Europe 2010. *European Neuropsychopharmacology*, *21*, 655–679.
- Yilmazer-Hanke, D. M., Roskoden, T., Zilles, K., & Schwegler, H. (2003). Anxiety-related behavior and densities of glutamate, GABA(A), acetylcholine and serotonin receptors in the amygdala of seven inbred mouse strains. *Behavioural Brain Research*, *145*, 145–159.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

VALIDEZ DEL LABERINTO CIRCULAR ELEVADO COMO MODELO ANIMAL DE ANSIEDAD EN ESTUDIOS TOXICOLÓGICOS

Luis Heredia Santaella

Dipòsit Legal: T.1558-2013

## Parte V

# Discusión

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI  
VALIDEZ DEL LABERINTO CIRCULAR ELEVADO COMO MODELO ANIMAL DE ANSIEDAD EN ESTUDIOS TOXICOLÓGICOS  
Luis Heredia Santaella  
Dipòsit Legal: T.1558-2013

# Discusión

En este trabajo hemos intentado abordar algunos de los principales problemas hallados en la literatura reciente respecto a los modelos animales de ansiedad. La preocupación por ellos se deriva de los resultados obtenidos en un primer estudio prototípico del campo de la neurotoxicología de la conducta. En el primer artículo de esta tesis se analizaron los efectos derivados de la exposición subaguda a BDE-209, un congénere de la familia de los PBDEs. Para ello utilizamos ratones *wild type* con un *background* mixto resultante del cruce de las cepas C57BL6 y SJL en apoyo a los argumentos de algunos autores que sugieren que el uso de ratones con altos niveles de polimorfismo genético hacen más fácil la posterior generalización de los resultados (Koide y cols., 2011). Los resultados obtenidos muestran un retraso en el aprendizaje a partir del análisis de los diferentes ensayos de prueba realizados en el laberinto acuático de Morris. Dicha conclusión podría estar apoyada por hallazgos recientes que muestran una menor disponibilidad de acetilcolina debido a la exposición a BDE-209 en ratones adultos (Liang, Gao y cols., 2010). Los resultados obtenidos en la batería de cribado son de la misma manera congruentes con las primeras observaciones realizadas por Darnerud, Eriksen y cols., (2001) en las que no se observaron graves alteraciones a nivel general.

Sin embargo, la interpretación de los resultados obtenidos en las pruebas de ansiedad resultó más difícil. En los resultados podemos observar una falta de congruencia entre dos tests basados en el mismo paradigma para evaluar los niveles de ansiedad. Dicha incongruencia podría deberse a las diferencias observadas en la línea basal de ansiedad de los animales en las respectivas pruebas (Bouwknicht y Paylor 2008). Mientras que en el laberinto circular elevado los animales pasaron en torno al 6% del tiempo total en las áreas desprotegidas, en la caja luz-oscuridad dicho porcentaje se elevó a nivel basal hasta el 34% aproximadamente. Dicha diferencia dota

## Discusión

---

al laberinto circular elevado de una mayor resolución a la hora de detectar diferencias relacionadas con los efectos ansiolíticos del BDE-209 y además pone de manifiesto la interacción hallada por Mathiasen, Mirza y cols., (2008) entre la cepa y el modelo animal de ansiedad utilizado. En nuestra discusión concluimos que el BDE-209 redujo los niveles de ansiedad de los animales basándonos en los resultados a nivel conductual, apoyándonos en estudios anteriores que muestran que el BDE-209 puede ser metabolizado y reducido a compuestos menos bromados que han demostrado actuar como agonistas parciales de los receptores GABA<sub>A</sub> (Hendriks, Fernandes y cols., 2010). Sin embargo, a nivel conductual dicha conclusión se encuentra afectada por el incremento significativo en el número de entradas observado en el grupo intoxicado con BDE-209 y a la imposibilidad de hallar en la literatura científica un criterio común para interpretarlo como variación en los niveles de ansiedad o en los niveles de actividad.

Con el ánimo de abordar métodos que nos permitieran ajustar los niveles basales de ansiedad y de estudiar la relación existente entre los niveles de actividad horizontal (mediante el número de entradas) y los de ansiedad (a través del tiempo de exposición) se abordó el segundo estudio. Lo abordamos mediante el uso del laberinto circular elevado por haber mostrado una mayor sensibilidad. Continuamos utilizando ratones con *background* genético mixto añadiendo ratones transgénicos del modelo Tg2576. La elección no fue casual y está basada en la amplia experiencia acumulada en nuestro laboratorio trabajando con este modelo y una alteración al alza en los niveles de actividad de estos ratones que ha sido observada de forma consistente en anteriores estudios (Gil-Bea y cols., 2007; Ribes, Colomina y cols., 2008). La presencia de dicha alteración garantizaba la diferencia significativa en los niveles de actividad horizontal y nos permitía obtener datos para nuestro posterior análisis de relación. En lo referente a los procedimientos de modificación de la línea basal de ansiedad de los ratones, se escogieron dos procedimientos sencillos aunque escasamente estudiados en ratones: el amansamiento

## Discusión

---

y el aislamiento social. Dado que los ratones Tg2576 son aislados sistemáticamente debido a sus niveles de agresividad (Moechars y cols., 1998) y son comparados con sus respectivos controles *wild type* que sí pueden ser agrupados, la aplicación de los resultados derivados de este estudio es directa en este modelo genético de animales. Las conclusiones muestran que el aislamiento social de los animales tiene efectos ansiógenos sobre los ratones *wild type* y que estos efectos pueden ser revertidos mediante un sencillo y corto procedimiento de amansamiento. Tanto el efecto ansiógeno del aislamiento social como el efecto protector del amansamiento frente al aislamiento ha sido previamente observado en anteriores estudios (Arndt y cols., 2009; Kwak, Lee y cols., 2009). Sin embargo, el amansamiento no pudo inducir ansiólisis en los animales que se encontraban previamente agrupados. Por otra parte, la alteración al alza en los niveles de actividad horizontal de los ratones Tg2576 quedó claramente evidenciada cómo se esperaba. Mediante un análisis de relación entre el nivel de entradas y el tiempo de exposición se pudo comprobar la existencia de una relación positiva entre ambos parámetros con tendencia hacia la horizontalidad, en niveles de actividad altos, generando una asíntota en torno al límite teórico máximo para el valor del tiempo de exposición. La aplicación de un corrector basado en una función aproximada a la ideal teórica consiguió conservar las diferencias obtenidas en niveles de ansiedad cuando la actividad no estaba significativamente incrementada y corregir los valores en el caso opuesto dando lugar a un nuevo índice denominado '*tiempo por entradas*' (TbE).

A pesar de que algunos autores han relacionado el incremento en el número de entradas con una reducción en los niveles de ansiedad (Bakshi y Kalin 2002; Treit, Engin y cols., 2010), el tipo de relación hallada parece indicar que dicho parámetro es con más probabilidad un índice de actividad. Esta aseveración parece plausible si tomamos como ejemplo un animal que pasa 90 segundos en el área desprotegida realizando 4 entradas y otro que pasa el mismo tiempo realizando 10 entradas. No parece coherente interpretar estos resultados como un



## Discusión

---

menor nivel de ansiedad del segundo dado que, aunque el tiempo de exposición de ambos es equivalente, el primer animal ha conseguido mantener dicha exposición de una manera más continuada. De hecho, que puedan observarse incrementos significativos en el número de entradas tras la exposición a fármacos ansiolíticos solo puede atribuirse a un descenso en los niveles de ansiedad asumiendo que dicho fármaco no altera los niveles de actividad simultáneamente.

El tercer experimento responde a la necesidad derivada de la escasa disponibilidad de estudios de validación farmacológica del laberinto circular elevado en ratones. Tras los resultados obtenidos en el anterior experimento, la intención fue la de realizar el mismo procedimiento de disociación incorporando a la validación nuevas medidas no incluidas en anteriores estudios de caracterización como la distancia recorrida o el tiempo de movimiento entre otras. Adicionalmente se realizó un detallado estudio minuto a minuto de la evolución de los parámetros y se evaluó el grado de acuerdo entre algunas medidas registradas mediante *software* de ordenador y directamente por el experimentador. Para ello se decidió utilizar ratones de la cepa C57BL/6J tras constatar que era una de la más utilizadas en estudios relacionados con la ansiedad y que era recomendada para este propósito a pesar de no contar con estudios de caracterización específicos para algunos modelos animales de ansiedad (Bouwknicht y Paylor 2008; Hart, Bergner y cols., 2010). Revisando la literatura científica disponible se eligieron dos fármacos, un agonista (clordiazepóxido) y un antagonista (picrotoxina) del receptor GABA<sub>A</sub>, que habían sido utilizados previamente en estudios de caracterización farmacológica (Kulkarni, Singh y cols., 2007; Mathiasen, Mirza y cols., 2008). Para producir los incrementos al alza en los niveles de actividad se utilizó el metilfenidato en base a las observaciones realizadas por Niculescu, Ehrlich y cols., (2005) sobre la capacidad de este fármaco para incrementar dichos niveles.

Los resultados obtenidos en este estudio no fueron los esperados en las hipótesis iniciales. En concreto, los valores de los parámetros tradicionales de ansiedad sugirieron como interpretación un aumento

## Discusión

---

en los niveles de ansiedad tras la administración de clordiazepóxido. Sin embargo, los indicadores del nivel de actividad se redujeron drásticamente en las dosis más altas lo que podría deberse a un efecto sedante del fármaco que apoya las conclusiones obtenidas en otro estudio realizado por Mathiasen, Mirza y cols., (2008). Por consiguiente, la corrección de los valores del tiempo no pudo realizarse por la inclusión en los resultados de esta nueva variable. Solamente la dosis más baja del fármaco ansiolítico consiguió alterar los parámetro de ansiedad en la dirección esperada pero con una clara interferencia de los niveles de actividad. A la inversa, se necesitaron altas dosis de picrotoxina para observar un efecto ansiógeno del fármaco que fue acompañado, al igual que en el caso anterior, de una reducción en los niveles de actividad. Este comportamiento paradójico de los ratones de la cepa C57 ha sido observado anteriormente en algunos estudios (Crawley 1996; Tang y cols., 2005). La conclusión evidente es una imposible disociación entre alteraciones en los niveles de ansiedad y de actividad cuando se utiliza esta cepa en el laberinto circular elevado. Sin embargo, en el estudio anterior hemos demostrado que, sin la utilización de agentes químicos dicha disociación es posible utilizando un *background* genético diferente. La explicación a estos resultados puede deberse simplemente a la diferencia genética entre los animales utilizados o a que la disociación es imposible porque el sistema GABAérgico y en concreto los receptores GABA<sub>A</sub> podrían estar relacionados tanto con el nivel de ansiedad como el de actividad.

Los resultados obtenidos con el metilfenidato fueron igualmente inesperados. El fármaco no consiguió modificar al alza los niveles de actividad de los ratones en ninguna de las dosis administradas. Sin embargo, el metilfenidato mostró un claro perfil ansiógeno en los animales modificando parámetros tradicionales de ansiedad sin alterar algunos parámetros de actividad como la distancia total recorrida o el tiempo total que el animal paso en movimiento. Aunque el posible efecto ansiógeno del metilfenidato ha sido observado en algunos estudios realizados en animales, en la actualidad esta cuestión es motivo de discusión (Sanchez-Perez y cols., 2012). Los resultados

## Discusión

---

obtenidos con este fármaco ponen en evidencia que la disociación entre alteraciones en los niveles de ansiedad y de actividad es posible cuando se actúa a través de sistemas de neurotransmisión diferentes al sistema GABAérgico. Sin embargo, dado el amplio espectro de acción del metilfenidato que actúa sobre el sistema dopaminérgico y noradrenérgico y, en menor medida sobre el sistema serotoninérgico (Kuczenski y Segal 1997), resulta imposible relacionar los resultados directamente con un sistema de neurotransmisión concreto. A esto se añade la gran dificultad que supone la implicación de diversos neurotransmisores en los procesos ansiosos y que han sido comentados en la introducción. En cuanto a los datos analizados en fracciones de un minuto los resultados muestran que el tiempo mínimo para observar diferencias significativas fue de 3 minutos.

El presente trabajo se ha centrado en uno de los modelos animales de ansiedad basados en el paradigma de aproximación/evitación disponibles en la actualidad: el laberinto circular elevado. A pesar de ello y como se ha explicado en las correspondientes discusiones de cada artículo, existen diferencias en los resultados obtenidos con diferentes cepas en la misma prueba conductual. De igual manera, difieren los resultados obtenidos con la misma cepa en función del modelo animal de ansiedad utilizado. Mientras que el primer caso puede atribuirse a la influencia de la genética de los animales y, en última instancia, puede ser relacionada con el concepto de ansiedad rasgo en humanos; el segundo caso resulta mucho más preocupante porque cuestiona directamente la validez convergente de los modelos animales basados en este paradigma. Una de las posibles explicaciones a este fenómeno podría ser la pobreza estimular de las diferentes pruebas basadas normalmente en espacios dicotómicos en los que el animal sólo puede elegir entre dos contextos. La inclusión de más zonas que varíen en su capacidad de inducir ansiedad y que doten a los animales de un mayor grado de libertad de elección podría, en consecuencia, ser una posible solución a este problema. De hecho, algunas de las propuestas más recientes para solucionar los problemas de los modelos animales de ansiedad basados en el paradigma de

## Discusión

---

aproximación/evitación poseen esta característica (Ramos, Pereira y cols., 2008; Ennaceur 2012). Sin embargo, la conceptualización teórica que subyace en ellos es muy diferente centrándose en una hipotética multidimensionalidad emotiva que estaría relacionada con cada modelo o en la distinción entre los conceptos de miedo y ansiedad. En lo referente a la distinción entre ansiedad y actividad se hace necesario continuar trabajando para refinar las pruebas conductuales y aumentar los esfuerzos para dilucidar los mecanismos fisiológicos subyacentes en ambos y su posible interacción. La falta de una mayor comprensión de los mismos dificulta la producción científica destinada a dotar a dichos modelos de una validez predictiva aceptable.

A pesar de sus limitaciones, los modelos animales de ansiedad siguen siendo una herramienta indispensable en la investigación. En estudios farmacológicos ayudan a mitigar los enormes costes derivados de los ensayos clínicos que, además, presentan altas tasas de efecto placebo (Lakoff 2002). En estudios toxicológicos ayudan a evaluar los posibles efectos de los compuestos químicos contaminantes a los que estamos diariamente expuestos (en casa y en el trabajo) y que pueden ser causantes de alteraciones relacionadas con la ansiedad. Por último, ayudan en la tarea de descubrir qué mecanismos psicobiológicos subyacen al fenómeno de la ansiedad desde diferentes enfoques como la genética, la neuroanatomía o la neuroquímica. Están por consiguiente justificados todos los esfuerzos destinados a su optimización dado el gran impacto que los trastornos de ansiedad tienen en la calidad de vida de millones de personas alrededor del mundo y de los enormes costes que suponen para el sistema sanitario en los países desarrollados.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI  
VALIDEZ DEL LABERINTO CIRCULAR ELEVADO COMO MODELO ANIMAL DE ANSIEDAD EN ESTUDIOS TOXICOLÓGICOS  
Luis Heredia Santaella  
Dipòsit Legal: T.1558-2013

## Parte VI

# Conclusiones

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI  
VALIDEZ DEL LABERINTO CIRCULAR ELEVADO COMO MODELO ANIMAL DE ANSIEDAD EN ESTUDIOS TOXICOLÓGICOS  
Luis Heredia Santaella  
Dipòsit Legal: T.1558-2013

# Conclusiones

- El BDE-209 produce un retraso en el aprendizaje espacial en ratones adultos con *background* genético mixto.
- El BDE-209 reduce los parámetros relacionados con la ansiedad y aumenta los relacionados con la actividad en ratones adultos con *background* genético mixto.
- El procedimiento de aislamiento social es capaz de incrementar los niveles de ansiedad de ratones *wild type* con *background* genético mixto.
- El procedimiento de amansamiento es capaz de revertir los efectos sobre la ansiedad derivados del aislamiento.
- Los ratones Tg2576 presentan niveles de actividad basal más altos que sus respectivos controles *wild type*.
- El parámetro ‘tiempo por entradas’ (TbE) consigue eliminar la influencia de elevados niveles de actividad sobre el tiempo de exposición al contexto ansiógeno en ratones Tg2576.
- El clordiazepóxido presenta efectos sedantes a dosis 10 mg/kg e incrementa los niveles de actividad a dosis 2,5 mg/kg en ratones C57BL/6J.
- La picrotoxina produce un descenso en los parámetros de actividad a dosis 2 mg/kg en ratones C57BL/6J.
- El metilfenidato produce un aumento en los niveles de ansiedad a dosis 5 y 10 mg/kg en ratones C57BL/6J.
- El tiempo mínimo para observar diferencias significativas en el laberinto circular elevado es de 3 minutos.



## Conclusiones

---

- La concordancia entre los parámetros registrados a través de *software* y los registrados directamente por un experimentador es alta excepto para el parámetro ‘número de entradas’.
- El registro mediante *software* del parámetro ‘número de entradas’ está sobrestimado debido a la presencia de error sistemático en la medida.
- La distinción entre alteraciones en los niveles de ansiedad y de actividad es compleja en ratones C57BL/6J.
- La validez predictiva del laberinto circular elevado depende de la cepa de ratón utilizada en la experimentación.

## Parte VII

# Bibliografía

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI  
VALIDEZ DEL LABERINTO CIRCULAR ELEVADO COMO MODELO ANIMAL DE ANSIEDAD EN ESTUDIOS TOXICOLÓGICOS  
Luis Heredia Santaella  
Dipòsit Legal: T.1558-2013

# Bibliografía

Ahmed, O. M., A. W. El-Gareib, A. M. El-Bakry, S. M. A. Ei-Tawab y R. G. Ahmed (2008). Thyroid hormones states and brain development interactions. *Int. J. Dev. Neurosci.* 26(2): 147-209.

Ali, N., S. Harrad, E. Goosey, H. Neels y A. Covaci (2011). Novel brominated flame retardants in Belgian and UK indoor dust: Implications for human exposure. *Chemosphere* 83(10): 1360-1365.

Alonso, J., M. Petukhova, G. Vilagut, S. Chatterji, S. Heeringa, T. B. Uestuen, A. O. Alhamzawi, M. C. Viana, M. Angermeyer, E. Bromet, R. Bruffaerts, G. de Girolamo, S. Florescu, O. Gureje, J. M. Haro, H. Hinkov, C. y. Hu, E. G. Karam, V. Kovess, D. Levinson, M. E. Medina-Mora, Y. Nakamura, J. Ormel, J. Posada-Villa, R. Sagar, K. M. Scott, A. Tsang, D. R. Williams y R. C. Kessler (2011). Days out of role due to common physical and mental conditions: results from the WHO World Mental Health surveys. *Mol. Psychiatr.* 16(12): 1234-1246.

Andersen, S. L., E. A. Greene-Colozzi y K. C. Sonntag (2010). A Novel, Multiple Symptom Model of Obsessive-Compulsive-Like Behaviors in Animals. *Biol. Psychiatr.* 68(8): 741-747.

Anglada-Figueroa, D. y G. J. Quirk (2005). Lesions of the basal amygdala block expression of conditioned fear but not extinction. *J. Neurosci.* 25(42): 9680-9685.

Arguello, P. A. y J. A. Gogos (2006). Modeling madness in mice: One piece at a time. *Neuron* 52(1): 179-196.

Arndt, S. S., M. Laarakker, R. Sommer, I. Lemmens, X. Fielmich, H. A. Van Lith y F. Ohl (2006). Social housing in male mice: impact on experimental anxiety-related behaviour? *Eur. Neuropsychopharm.* 16: S462-S462.

Arndt, S. S., M. C. Laarakker, H. A. van Lith, F. J. van der Staay, E. Gieling, A. R. Salomons, J. van't Klooster y F. Ohl (2009). Individual housing of mice: Impact on behaviour and stress responses. *Physiol. Behav.* 97(3-4): 385-393.

Bakshi, V. P. y N. H. Kalin (2002). Animal models and endophenotypes of anxiety and stress disorders. *Neuropsychopharmacology: The Fifth Generation of Progress*. Philadelphia, PA, Lippincott Williams and Wilkins: 883900.

## Bibliografía

---

Balbus, J. M., A. B. A. Boxall, R. A. Fenske, T. E. McKone y L. Zeise (2013). Implications of global climate change for the assessment and management of human health risks of chemicals in the natural environment. *Environ. Toxicol. Chem.* 32(1): 62-78.

Barlow, D. H. (2002). *Anxiety and its disorders: The nature and treatment of anxiety and panic*. New York, Guilford Press.

Barsy, B., C. Leveleki, D. Zelena y J. Haller (2010). The context specificity of anxiety responses induced by chronic psychosocial stress in rats: A shift from anxiety to social phobia? *Stress: the International Journal on the Biology of Stress* 13(3): 230-237.

Beck, A. T. y G. Emery (2005). *Anxiety disorders and phobias: A cognitive perspective*. New York, Basic Books.

Belzung, C. y G. Lepape (1994). Comparison of different behavioral test situations used in psychopharmacology for measurement of anxiety. *Physiol. Behav.* 56(3): 623-628.

Bell, C., S. Bhikha, H. Colhoun, F. Carter, C. Frampton y R. Porter (2013). The response to sulpiride in social anxiety disorder: D2 receptor function. *J. Psychopharmacol.* 27(2): 146-151.

Belles, M., V. Alonso, V. Linares, M. L. Albina, J. J. Sirvent, J. L. Domingo y D. J. Sanchez (2010). Behavioral effects and oxidative status in brain regions of adult rats exposed to BDE-99. *Toxicol. Lett.* 194(1-2): 1-7.

Berkowitz, R. L., J. D. Coplan, D. P. Reddy y J. M. Gorman (2007). The human dimension: How the prefrontal, cortex modulates the subcortical fear response. *Rev. Neurosci.* 18(3-4): 191-207.

Besis, A. y C. Samara (2012). Polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) in the indoor and outdoor environments: A review on occurrence and human exposure. *Environ. Pollut.* 169: 217-229.

Blanchard, D. C., R. J. Blanchard, P. Tom y R. J. Rodgers (1990). Diazepam changes risk assessment in an anxiety defense test battery. *Psychopharmacology* 101(4): 511-518.

Boelen, P. A. y A. Reijntjes (2009). Intolerance of uncertainty and social anxiety. *J. Anxiety Disord.* 23(1): 130-135.

## Bibliografia

---

Bourin, M. y M. Hascoet (2003). The mouse light/dark box test. *Eur. J. Pharmacol.* 463(1-3): 55-65.

Bourin, M., B. Petit-Demouliere, B. N. Dhonnchadha y M. Hascoet (2007). Animal models of anxiety in mice. *Fundam. Clin. Pharmacol.* 21(6): 567-574.

Bouwknicht, J. A. y R. Paylor (2008). Pitfalls in the interpretation of genetic and pharmacological effects on anxiety-like behaviour in rodents. *Behav. Pharmacol.* 19(5-6): 385-402.

Branchi, I., E. Alleva y L. G. Costa (2002). Effects of perinatal exposure to a polybrominated diphenyl ether (PBDE 99) on mouse neurobehavioural development. *Neurotoxicology* 23(3): 375-384.

Braun, A. A., M. R. Skelton, C. V. Vorhees y M. T. Williams (2011). Comparison of the elevated plus and elevated zero mazes in treated and untreated male Sprague-Dawley rats: Effects of anxiolytic and anxiogenic agents. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 97(3): 406-415.

BSEF (2009). Bromine science environmental forum. from <http://www.bsef.com>. [19/03/2013]

Butt, C. M., M. L. Diamond, J. Truong, M. G. Ikonomou y A. F. H. Ter Schure (2004). Spatial distribution of polybrominated diphenyl ethers in southern Ontario as measured in indoor and outdoor window organic films. *Environ. Sci. Tech.* 38(3): 724-731.

Caballero, L., J. Bobes, I. Vilardaga y J. Rejas (2009). Clinical prevalence and reason for visit of patients with generalized anxiety disorder seen in the psychiatry out-patient clinics in Spain. Results of the LIGANDO study. *Actas Esp. Psiquiatr.* 37(1): 17-20.

Cachat, J., A. Stewart, L. Grossman, S. Gaikwad, F. Kadri, K. M. Chung, N. Wu, K. Wong, S. Roy, C. Suci, J. Goodspeed, M. Elegante, B. Bartels, S. Elkhayat, D. Tien, J. Tan, A. Denmark, T. Gilder, E. Kyzar, J. DiLeo, K. Frank, K. Chang, E. Utterback, P. Hart y A. V. Kalueff (2010). Measuring behavioral and endocrine responses to novelty stress in adult zebrafish. *Nat. Protocol.* 5(11): 1786-1799.

Canteras, N. S., E. R. Ribeiro-Barbosa y E. Comoli (2001). Tracing from the dorsal preammillary nucleus prosencephalic systems involved in the organization of innate fear responses. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 25(7-8): 661-668.

## Bibliografía

---

Carobrez, A. P. y L. J. Bertoglio (2005). Ethological and temporal analyses of anxiety-like behavior: The elevated plus-maze model 20 years on. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 29(8): 1193-1205.

Castro-Jimenez, J., G. Mariani, I. Vives, H. Skejo, G. Umlauf, J. M. Zaldivar, S. Dueri, G. Messiaen y T. Laugier (2011). Atmospheric concentrations, occurrence and deposition of persistent organic pollutants (POPs) in a Mediterranean coastal site (Etang de Thau, France). *Environ. Pollut.* 159(7): 1948-1956.

Cetin, B. y M. Odabasi (2008). Atmospheric concentrations and phase partitioning of polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) in Izmir, Turkey. *Chemosphere* 71(6): 1067-1078.

Clement, Y. y G. Chapouthier (1998). "Biological bases of anxiety." *Neurosci. Biobehav. Rev.* 22(5): 623-633.

Clement, Y., C. Joubert, C. Kopp, E. M. Lepicard, P. Venault, R. Misslin, M. Cadot y G. Chapouthier (2007). Anxiety in mice: a principal component analysis study. *Neural plast.* 2007: 35457.

Clement, Y., A.-M. Le Guisquet, P. Venault, G. Chapouthier y C. Belzung (2009). Pharmacological Alterations of Anxious Behaviour in Mice Depending on Both Strain and the Behavioural Situation. *Plos One* 4(11): A74-A81.

Cornelis, M. C., N. R. Nugent, A. B. Amstadter y K. C. Koenen (2010). Genetics of Post-Traumatic Stress Disorder: Review and Recommendations for Genome-Wide Association Studies. *Curr. Psychiatr. Rep.* 12(4): 313-326.

Costa, L. G. y G. Giordano (2007). Developmental neurotoxicity of polybrominated diphenyl ether (PBDE) flame retardants. *Neurotoxicology* 28(6): 1047-1067.

Covaci, A., S. Harrad, M. A. E. Abdallah, N. Ali, R. J. Law, D. Herzke y C. A. de Wit (2011). Novel brominated flame retardants: A review of their analysis, environmental fate and behaviour. *Environ. Int.* 37(2): 532-556.

Crawley, J. y F. K. Goodwin (1980). Preliminary report of a simple animal behavior model for the anxiolytic effects of benzodiazepines. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 13(2): 167-170.

Crawley, J. N. (1996). Unusual behavioral phenotypes of inbred mouse

## Bibliografia

---

strains: Commentary. *Trends Neurosci.* 19(5): 181-182.

Crestani, F., M. Lorez, K. Baer, C. Essrich, D. Benke, J. P. Laurent, C. Belzung, J. M. Fritschy, B. Luscher y H. Mohler (1999). Decreased GABA(A) receptor clustering results in enhanced anxiety and a bias for threat cues. *Nat. Neurosci.* 2(9): 833-839.

Cryan, J. F. y A. Holmes (2005). The ascent of mouse: Advances in modelling human depression and anxiety. *Nat. Rev. Drug Discov.* 4(9): 775-790.

Cryan, J. F. y K. Kaupmann (2005). Don't worry 'B' happy!: a role for GABA(B) receptors in anxiety and depression. *Trends Pharmacol. Sci.* 26(1): 36-43.

Cryan, J. F. y D. A. Slattery (2007). Animal models of mood disorders: recent developments. *Curr. Opin. Psychiatr.* 20(1): 1-7.

Cryan, J. F. y F. F. Sweeney (2011). The age of anxiety: role of animal models of anxiolytic action in drug discovery. *Br. J. Pharmacol.* 164(4): 1129-1161.

Darnerud, P. O., G. S. Eriksen, T. Johannesson, P. B. Larsen y M. Viluksela (2001). Polybrominated diphenyl ethers: Occurrence, dietary exposure, and toxicology. *Environ. Health Perspect.* 109: 49-68.

Dawson, G. R., S. P. Crawford, N. Collinson, S. D. Iversen y M. D. Tricklebank (1995). Evidence that the anxiolytic-like effects of chlordiazepoxide on the elevated plus-maze are confounded by increases in locomotor-activity. *Psychopharmacology* 118(3): 316-323.

Dawson, G. R. y M. D. Tricklebank (1995). Use of the elevated plus-maze in the search for novel anxiolytic agents. *Trends Pharmacol. Sci.* 16(2): 33-36.

de Haas, S. L., S. J. de Visser, J. P. van der Post, R. C. Schoemaker, K. van Dyck, M. G. Murphy, M. de Smet, L. K. Vessey, R. Ramakrishnan, L. Xue, A. F. Cohen y J. M. A. van Gerven (2008). Pharmacodynamic and pharmacokinetic effects of MK-0343, a GABA(A) alpha(2,3) subtype selective agonist, compared to lorazepam and placebo in healthy male volunteers. *J. Psychopharmacol.* 22(1): 24-32.

de Haas, S. L., K. L. Franson, J. A. J. Schmitt, A. F. Cohen, J. B. Fau, C. Dubruc y J. M. A. van Gerven (2009). The pharmacokinetic and pharmacodynamic effects of SL65.1498, a GABA-A alpha(2,3) selective agonist, in



## Bibliografia

---

comparison with lorazepam in healthy volunteers. *J. Psychopharmacol.* 23(6): 625-632.

de Haas, S. L., R. C. Schoemaker, J. M. A. van Gerven, P. Hoever, A. F. Cohen y J. Dingemans (2010). Pharmacokinetics, pharmacodynamics and the pharmacokinetic/pharmacodynamic relationship of zolpidem in healthy subjects. *J. Psychopharmacol.* 24(11): 1619-1629.

Deckert, J., M. M. Nothen, P. Franke, C. Delmo, J. Fritze, M. Knapp, W. Maier, H. Beckmann y P. Propping (1998). Systematic mutation screening and association study of the A(1) and A(2a) adenosine receptor genes in panic disorder suggest a contribution of the A(2a) gene to the development of disease. *Mol. Psychiatr.* 3(1): 81-85.

Dell'Osso, B., M. Buoli, D. S. Baldwin y A. C. Altamura (2010). Serotonin norepinephrine reuptake inhibitors (SNRIs) in anxiety disorders: a comprehensive review of their clinical efficacy. *Hum. Psychopharmacol. Clin. Exp.* 25(1): 17-29.

Domingo, J. L. (2012). Polybrominated diphenyl ethers in food and human dietary exposure: A review of the recent scientific literature. *Food Chem. Toxicol.* 50(2): 238-249.

Domingo, J. L., R. Marti-Cid, V. Castell y J. M. Llobet (2008). Human exposure to PBDEs through the diet in Catalonia, Spain: Temporal trend: A review of recent literature on dietary PBDE intake. *Toxicology* 248(1): 25-32.

Domschke, K. y J. Deckert (2012). Genetics of Anxiety Disorders: Status Quo and Quo Vadis. *Curr. Pharmaceut. Des.* 18(35): 5691-5698.

Dowben, J. S., J. S. Grant y N. L. Keltner (2011). Clonidine: Diverse Use in Pharmacologic Management. *Psychiatr. Care* 47(2): 105-108.

Driscoll, L. L., A. Gibson y F. Cheteni (2006). Chronic postnatal DE-71 exposure: suppression of serum thyroxine (T4), but no effects on learning, attention, or cholinergic challenge. *Neurotoxicol. Teratol.* 28(3): 419-420.

Ennaceur, A. (2012). Open space anxiety test in rodents: the elevated platform with steep slopes. *Meth. Mol. Biol.* 829: 177-191.

Eser, D., T. C. Baghai y H. J. Moller (2007). Evidence of agomelatine's antidepressant efficacy: the key points. *Int. Clin. Psychopharmacol.* 22: 15-19.

## Bibliografia

---

Etkin, A., K. E. Prater, A. F. Schatzberg, V. Menon y M. D. Greicius (2009). Disrupted amygdalar subregion functional connectivity and evidence of a compensatory network in generalized anxiety disorder. *Arch. Gen. Psychiatr.* 66(12): 1361-1372.

Etkin, A. y T. D. Wager (2007). Functional Neuroimaging of Anxiety: A Meta-Analysis of Emotional Processing in PTSD, Social Anxiety Disorder, and Specific Phobia. *Am. J. Psychiatr.* 164: 1476-1488.

Eysenck, H. J. (1991). Neuroticism, anxiety and depression. *Psychol. Inq.* 2: 75-76.

Farach, F. J., L. D. Pruitt, J. J. Jun, A. B. Jerud, L. A. Zoellner y P. P. Roy-Byrne (2012). Pharmacological treatment of anxiety disorders: Current treatments and future directions. *J. Anxiety Disord.* 26(8): 833-843.

Feng, C. L., Y. P. Xu, G. F. Zhao, J. M. Zha, F. C. Wu y Z. J. Wang (2012). Relationship between BDE 209 metabolites and thyroid hormone levels in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquat. Toxicol.* 122: 28-35.

Franco-Pons, N., M. Torrente, M. T. Colomina y E. Vilella (2007). Behavioral deficits in the cuprizone-induced murine model of demyelination/remyelination. *Toxicol. Lett.* 169(3): 205-213.

Gale, G. D., S. G. Anagnostaras, B. P. Godsil, S. Mitchell, T. Nozawa, J. R. Sage, B. Wiltgen y M. S. Fanselow (2004). Role of the basolateral amygdala in the storage of fear memories across the adult lifetime of rats. *J. Neurosci.* 24(15): 3810-3815.

Gee, J. R. y V. C. Moser (2008). Acute postnatal exposure to brominated diphenylether 47 delays neuromotor ontogeny and alters motor activity in mice. *Neurotoxicol. Teratol.* 30(2): 79-87.

Gentil, V., S. Tavares, C. Gorenstein, C. Bello, L. Mathias, G. Gronich y J. Singer (1990). Acute reversal of flunitrazepam effects by Ro 15-1788 and Ro 15-3505: inverse agonism, tolerance, and rebound. *Psychopharmacology (Berl)* 100(1): 54-59.

George, D. T., D. J. Nutt, R. R. Rawlings, M. J. M. Phillips, M. J. Eckardt, W. Z. Potter y M. Linnoila (1995). Behavioral and endocrine responses to clomipramine in panic disorder patients with or without alcoholism. *Biol. Psychiat.* 37(2): 112-119.

## Bibliografía

---

- Geyer, M. A. y A. Markou (2002). The role of preclinical models in the development of psychotropic drugs. *Neuropsychopharmacology: The Fifth Generation of Progress*. New York, Lippincott Williams and Wilkins: 445.
- Gil-Bea, F. J., B. Aisa, R. Schliebs y M. J. Ramirez (2007). Increase of locomotor activity underlying the behavioral disinhibition in Tg2576 mice. *Behav. Neurosci.* 121(2): 340-344.
- Gili, M., M. Roca, S. Basu, M. McKee y D. Stuckler (2013). The mental health risks of economic crisis in Spain: evidence from primary care centres, 2006 and 2010. *Eur. J. Publ. Health* 23(1): 103-108.
- Golub, M. S., S. L. Germann y K. C. K. Lloyd (2004). Behavioral characteristics of a nervous system-specific erbB4 knock-out mouse. *Behav. Brain Res.* 153(1): 159-170.
- Goodman, J. E. (2009). Neurodevelopmental effects of decabromodiphenyl ether (BDE-209) and implications for the Reference Dose. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 54(1): 91-104.
- Gray, J. A. (1982). The neuropsychology of anxiety: An inquiry into the functions of the septo-hippocampal system. *Behav. Brain Sci.* 5(3): 469-484.
- Grillon, C., D. S. Pine, S. Lissek, S. Rabin, O. Bonne y M. Vythilingam (2009). Increased Anxiety During Anticipation of Unpredictable Aversive Stimuli in Posttraumatic Stress Disorder but not in Generalized Anxiety Disorder. *Biol. Psychiat.* 66(1): 47-53.
- Guerra, P., M. Alae, B. Jimenez, G. Pacepavicius, C. Marvin, G. MacInnis, E. Eljarrat, D. Barcelo, L. Champoux y K. Fernie (2012). Emerging and historical brominated flame retardants in peregrine falcon (*Falco peregrinus*) eggs from Canada and Spain. *Environ. Int.* 40: 179-186.
- Hagenbuch, N., J. Feldon y B. K. Yee (2006). Use of the elevated plus-maze test with opaque or transparent walls in the detection of mouse strain differences and the anxiolytic effects of diazepam. *Behav. Pharmacol.* 17(1): 31-41.
- Hall, C. S. (1936). Emotional behavior in the rat III The relationship between emotionality and ambulatory activity. *J. Comp. Psychol.* 22(3): 345-352.
- Haller, J. y M. Alicki (2012). Current animal models of anxiety, anxiety disorders, and anxiolytic drugs. *Curr. Opin. Psychiatry* 25(1): 59-64.

## Bibliografía

---

Haro, J. M., C. Palacin, G. Vilagut, M. Martinez, M. Bernal, I. Luque, M. Codony, M. Dolz, J. Alonso y E. E. Grupo (2006). Prevalence of mental disorders and associated factors: results from the ESEMeD-Spain study. *Med. Clin.* 126(12): 445-451.

Hart, P. C., C. L. Bergner, A. N. Smolinsky, B. D. Dufour, R. J. Egan, J. L. Laporte y A. V. Kalueff (2010). Experimental models of anxiety for drug discovery and brain research. *Methods Mol. Biol.* 602: 299-321.

Hascoet, M. y M. Bourin (1998). A new approach to the light/dark test procedure in mice. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 60(3): 645-653.

Hendriks, H. S., E. C. A. Fernandes, A. Bergman, M. van den Berg y R. H. S. Westerink (2010). PCB-47, PBDE-47, and 6-OH-PBDE-47 Differentially Modulate Human GABA(A) and alpha(4)beta(2) Nicotinic Acetylcholine Receptors. *Toxicol. Sci.* 118(2): 635-642.

Herry, C., D. R. Bach, F. Esposito, F. Di Salle, W. J. Perrig, K. Schefler, A. Lüthi y E. Seifritz (2007). Processing of Temporal Unpredictability in Human and Animal Amygdala. *J. Neurosci.* 27(22): 5958-5966.

Hettema, J. M., M. C. Neale y K. S. Kendler (2001). A review and meta-analysis of the genetic epidemiology of anxiety disorders. *American Journal of Psychiatry* 158(10): 1568-1578.

Hollander, E. y D. Simeon (2008). Anxiety disorders. *Textbook of Psychiatry*. Washington, DC, American Psychiatric Publishing: 505-607.

Jinks, A. L. y I. S. McGregor (1997). Modulation of anxiety-related behaviours following lesions of the prelimbic or infralimbic cortex in the rat. *Brain Res.* 772(1-2): 181-190.

Johansson, N., H. Viberg, A. Fredriksson y P. Eriksson (2008). Neonatal exposure to deca-brominated diphenyl ether (PBDE 209) causes dose-response changes in spontaneous behaviour and cholinergic susceptibility in adult mice. *Neurotoxicology* 29(6): 911-919.

Johnson, M. R., R. B. Lydiard, J. J. Zealberg, M. D. Fossey y J. C. Ballenger (1994). Plasma and CSF HVA levels in panic patients with comorbid social phobia. *Biol. Psychiat.* 36(6): 425-427.

Johnson, P. I., H. M. Stapleton, B. Mukherjee, R. Hauser y J. D. Meeker (2013). Associations between brominated flame retardants in house dust and

## Bibliografía

---

hormone levels in men. *Sci. Total Environ.* 445-446: 177-184.

Jorm, A. F. (2000). Does old age reduce the risk of anxiety and depression? A review of epidemiological studies across the adult life span. *Psychol. Med.* 30(1): 11-22.

Kawakami, N., E. A. Abdulghani, J. Alonso, E. J. Bromet, R. Bruffaerts, J. M. Caldas-de-Almeida, W. T. Chiu, G. de Girolamo, R. de Graaf, J. Fayyad, F. Ferry, S. Florescu, O. Gureje, C. Hu, M. D. Lakoma, W. LeBlanc, S. Lee, D. Levinson, S. Malhotra, H. Matschinger, M. Elena Medina-Mora, Y. Nakamura, M. A. O. Browne, M. Okoliyski, J. Posada-Villa, N. A. Sampson, M. C. Viana y R. C. Kessler (2012). Early-Life Mental Disorders and Adult Household Income in the World Mental Health Surveys. *Biol. Psychiat.* 72(3): 228-237.

Kendler, K. S., L. M. Karkowski y C. A. Prescott (1999). Fears and phobias: reliability and heritability. *Psychol. Med.* 29(3): 539-553.

Kessler, R. C., S. Avenevoli, E. J. Costello, K. Georgiades, J. G. Green, M. J. Gruber, J. P. He, D. Koretz, K. A. McLaughlin, M. Petukhova, N. A. Sampson, A. M. Zaslavsky y K. R. Merikangas (2012). Prevalence, Persistence, and Sociodemographic Correlates of DSM-IV Disorders in the National Comorbidity Survey Replication Adolescent Supplement. *Arch. Gen. Psychiat.* 69(4): 372-380.

Kessler, R. C. y P. S. Wang (2008). The descriptive epidemiology of commonly occurring mental disorders in the United States. *Annu. Rev. Public Health* 29: 115-129.

Kierkegaard, A., L. Asplund, C. A. de Wit, M. S. McLachlan, G. O. Thomas, A. J. Sweetman y K. C. Jones (2007). Fate of higher brominated PBDEs in lactating cows. *Environ. Sci. Technol.* 41(2): 417-423.

Klein, S., L. B. Nicolas, C. Lopez-Lopez, L. H. Jacobson, S. G. McArthur, C. Grundschober y E. P. Prinszen (2010). Examining face and construct validity of a noninvasive model of panic disorder in Lister-hooded rats. *Psychopharmacology* 211(2): 197-208.

Koide, T., K. Ikeda, M. Ogasawara, T. Shiroishi, K. Moriwaki y A. Takahashi (2011). A New Twist on Behavioral Genetics by Incorporating Wild-Derived Mouse Strains. *Exp. Anim.* 60(4): 347-354.

Kuczenski, R. y D. S. Segal (1997). Effects of methylphenidate on extracellular dopamine, serotonin, and norepinephrine: Comparison with amphetamine. *J. Neurochem.* 69(3): 1332-1332.

## Bibliografia

---

- Kulig, B. M. (1996). Comprehensive neurotoxicity assessment. *Environ. Health Perspect.* 104: 317-322.
- Kulkarni, S. K., K. Singh y M. Bishnoi (2007). Elevated zero maze: A paradigm to evaluate antianxiety effects of drugs. *Method. Find. Exp. Clin.* 29(5): 343-348.
- Kwak, C., S.-H. Lee y B.-K. Kaang (2009). Social Isolation Selectively Increases Anxiety in Mice without Affecting Depression-like Behavior. *Korean J. Physiol. Pharmacol.* 13(5): 357-360.
- Lakoff, A. (2002). The mousetrap: managing the placebo effect in antidepressant trials. *Mol. Interv.* 2(2): 72-76.
- Lang, P. J., M. Davis y A. Ohman (2000). Fear and anxiety: animal models and human cognitive psychophysiology. *J. Affect. Disord.* 61(3): 137-159.
- Lanteaume, L., S. Khalifa, J. Régis, P. Marquis, P. Chauvel y F. Bartolomei (2007). Emotion Induction After Direct Intracerebral Stimulations of Human Amygdala. *Cereb. Cortex* 17(6): 1307-1313.
- LeDoux, J. E. (2000). Emotion circuits in the brain. *Annu. Rev. Neurosci.* 23: 155-184.
- LeDoux, J. E. (2012). Evolution of human emotion: A view through fear. *Evolution of the Primate Brain: From Neuron to Behavior*. M. A. Hofman y D. Falk. Amsterdam, Elsevier Science Bv. 195: 431-442.
- Lee, C. y R. J. Rodgers (1990). Antinociceptive effects of elevated plus-maze exposure: Influence of opiate receptor manipulations. *Psychopharmacology* 102(4): 507-513.
- Leijts, M. M., G. W. ten Tusscher, K. Olie, T. van Teunenbroek, W. M. van Aalderen, P. de Voogt, T. Vulsma, A. Bartonova, M. K. von Krauss, C. Mosoiu, H. Riojas-Rodriguez, G. Calamandrei y J. G. Koppe (2012). Thyroid hormone metabolism and environmental chemical exposure. *Environmental Health* 11(1).
- Liang, S.-x., H.-x. Gao, Y.-y. Zhao, X.-m. Ma y H.-w. Sun (2010). Effects of repeated exposure to decabrominated diphenyl ether (BDE-209) on mice nervous system and its self repair. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 29(3): 297-301.

## Bibliografía

---

Lister, R. G. (1987). The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. *Psychopharmacology* 92(2): 180-185.

López-Muñoz, F., C. Alamo y P. García-García (2011). The discovery of chlordiazepoxide and the clinical introduction of benzodiazepines: half a century of anxiolytic drugs. *J Anxiety Disord* 25(4): 554-562. Lorber, M. (2008). Exposure of Americans to polybrominated diphenyl ethers. *J. Expo. Sci. Environ. Epidemiol.* 18(1): 2-19.

Maes, M., A. Van Gastel, L. Delmeire, G. Kenis, E. Bosmans y C. Song (2002). Platelet alpha 2-adrenoceptor density in humans: relationships to stress-induced anxiety, psychasthenic constitution, gender and stress-induced changes in the inflammatory response system. *Psychol. Med.* 32(5): 919-928.

Maier, W., D. Lichtermann, J. Minges, A. Oehrlein y P. Franke (1993). A controlled family study in panic disorder. *J. Psychiatr. Res.* 27: 79-87.

Mathiasen, L. S., N. R. Mirza y R. J. Rodgers (2008). Strain- and model-dependent effects of chlordiazepoxide, L-838,417 and zolpidem on anxiety-like behaviours in laboratory mice. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 90(1): 19-36.

McNaughton, N. y J. A. Gray (2000). Anxiolytic action on the behavioural inhibition system implies multiple types of arousal contribute to anxiety. *J. Affect. Dis.* 61(3): 161-176.

Michalikova, S., R. van Rensburg, P. L. Chazot y A. Ennaceur (2010). "Anxiety responses in Balb/c, c57 and CD-1 mice exposed to a novel open space test." *Behav. Brain Res.* 207(2): 402-417.

Milad, M. R. y S. L. Rauch (2007). The role of the orbitofrontal cortex in anxiety disorders. *Linking Affect to Action: Critical Contributions of the Orbitofrontal Cortex.* G. Schoenbaum, J. A. Gottfried, E. A. Murray y S. J. Ramus. 1121: 546-561.

Milner, L. C. y J. C. Crabbe (2008). Three murine anxiety models: results from multiple inbred strain comparisons. *Genes Brain Behav.* 7(4): 496-505.

Millan, M. J. (2005). Serotonin 5-HT<sub>2C</sub> receptors as a target for the treatment of depressive and anxious states: Focus on novel therapeutic strategies. *Therapie* 60(5): 441-460.

Moechars, D., M. Gilis, C. Kuiperi, I. Laenen y F. Van Leuven (1998). Aggressive behaviour in transgenic mice expressing APP is alleviated by

## Bibliografia

---

- serotonergic drugs. *Neuroreport* 9(16): 3561-3564.
- Mombereau, C., L. Lhuillier, K. Kaupmann y J. F. Cryan (2007). GABA(B) receptor-positive modulation-induced blockade of the rewarding properties of nicotine is associated with a reduction in nucleus accumbens Delta FosB accumulation. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 321(1): 172-177.
- Monk, C. S., E. H. Telzer, K. Mogg, B. P. Bradley, X. Mai, H. M. Louro, G. Chen, E. B. McClure-Tone, M. Ernst y D. S. Pine (2008). Amygdala and ventrolateral prefrontal cortex activation to masked angry faces in children and adolescents with generalized anxiety disorder. *Arch. Gen. Psychiatry* 65(5): 568-576.
- Montgomery, K. C. y J. A. Monkman (1955). The relation between fear and exploratory behavior. *J. Comp. Physiol. Psychol.* 48(2): 132-136.
- Morris, R. (1984). Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *J. Neurosci. Methods* 11(1): 47-60.
- Moser, V. C. (2000). The functional observational battery in adult and developing rats. *Neurotoxicology* 21(6): 989-996.
- Moser, V. C. (2011). Functional Assays for Neurotoxicity Testing. *Toxicol. Pathol.* 39(1): 36-45.
- Moser, V. C., M. Aschner, R. J. Richardson y M. A. Philbert (2008). Toxic responses of the nervous system. *The basic science of poisons*. New York, McGraw-Hill: 631-664.
- Nascimento Hackl, L. P. y A. P. Carobrez (2007). Distinct ventral and dorsal hippocampus AP5 anxiolytic effects revealed in the elevated plus-maze task in rats. *Neurobiol. Learn. Mem.* 88(2): 177-185.
- Niculescu, M., M. E. Ehrlich y E. M. Unterwald (2005). Age-specific behavioral responses to psychostimulants in mice. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 82(2): 280-288.
- Nitschke, J. B., W. Heller, P. A. Palmieri y G. A. Miller (2000). Anxiety, stress, and cortical brain function. *The Neuropsychology of Emotion*. Oxford, Oxford University Press: 298-319.
- Norris, J. M., R. J. Kociba, B. A. Schwetz, J. Q. Rose, C. G. Humiston, G. L. Jewett, P. J. Gehring y J. B. Mailhes (1975). *Toxicology of octabro-*



## Bibliografía

---

mobiphenyl and decabromodiphenyl oxide. *Environ. Health Perspect.* 11: 153-161.

Noyes, P. D., D. E. Hinton y H. M. Stapleton (2011). Accumulation and Debromination of Decabromodiphenyl Ether (BDE-209) in Juvenile Fathead Minnows (*Pimephales promelas*) Induces Thyroid Disruption and Liver Alterations. *Toxicol. Sci.* 122(2): 265-274.

Nutt, D. (2006). GABAA receptors: subtypes, regional distribution and function. *J. Clin. Sleep Med.* 2(2): 7-11.

Nutt, D. J. (1990). The pharmacology of human anxiety. *Pharmacol. Ther.* 47(2): 233-266.

Ohl, F. (2005). Animal models of anxiety. *Handb. Exp. Pharmacol.*(169): 35-69.

Öhman, A. (1993). Fear and anxiety as emotional phenomena: clinical phenomenology, evolutionary perspectives, and information processing mechanisms. *Handbook of emotions.* New York, Guilford: 511-536.

Öhman, A. (2008). Fear and anxiety: Overlaps and dissociations. *Handbook of emotions.* New York, Guilford Press: 709-729.

OJL271/48 (15.10.2005). COMMISSION DECISION of 13 October 2005 amending for the purposes of adapting to the technical progress the Annex to Directive 2002/95/EC of the European Parliament and fo the Council on the restriction of the use of certain hazardous substances in electrical and electronic equipment: p.1.

Ormel, J., M. Petukhova, S. Chatterji, S. Aguilar-Gaxiola, J. Alonso, M. C. Angermeyer, E. J. Bromet, H. Burger, K. Demyttenaere, G. de Girolamo, J. Maria Haro, I. Hwang, E. Karam, N. Kawakami, J. P. Lepine, M. Elena Medina-Mora, J. Posada-Villa, N. Sampson, K. Scott, T. B. Uestuen, M. Von Korff, D. R. Williams, M. Zhang y R. C. Kessler (2008). Disability and treatment of specific mental and physical disorders across the world. *Br. J. Psychiatry* 192(5): 368-375.

Oros, D. R., D. Hoover, F. Rodigari, D. Crane y J. Sericano (2005). Levels and distribution of polybrominated diphenyl ethers in water, surface sediments, and bivalves from the San Francisco Estuary. *Environ. Sci. Tech.* 39(1): 33-41.

Park, J.-s., J. She, A. Holden, M. Sharp, R. Gephartg, G. Souders-Mason, V. Zhang, J. Chow, B. Leslie y K. Hooper (2011). High Postnatal Exposures

## Bibliografia

---

to Polybrominated Diphenyl Ethers (PBDEs) and Polychlorinated Biphenyls (PCBs) via Breast Milk in California: Does BDE-209 Transfer to Breast Milk? *Environ. Sci. Tech.* 45(10): 4579-4585.

Pellow, S., P. Chopin, S. E. File y M. Briley (1985). Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *J. Neurosci. Meth.* 14(3): 149-167.

Perry, W., A. Minassian, M. P. Paulus, J. W. Young, M. J. Kincaid, E. J. Ferguson, B. L. Henry, X. Zhuang, V. L. Masten, R. F. Sharp y M. A. Geyer (2009). A Reverse-Translational Study of Dysfunctional Exploration in Psychiatric Disorders From Mice to Men. *Arch. Gen. Psychiatr.* 66(10): 1072-1080.

Pillay, N. S. y D. J. Stein (2007). Emerging anxiolytics. *Expert Opin. Emerg. Drugs* 12(4): 541-554.

Prina, A. M., C. P. Ferri, M. Guerra, C. Brayne y M. Prince (2011). Prevalence of anxiety and its correlates among older adults in Latin America, India and China: cross-cultural study. *Br. J. Pharmacol.* 199(6): 485-491.

Qu, W., X. Bi, G. Sheng, S. Lu, H. Fu, J. Yuan y L. Li (2007). Exposure to polybrominated diphenyl ethers among workers at an electronic waste dismantling region in Guangdong, China. *Environ. Int.* 33(8): 1029-1034.

Quirk, G. J. y D. Mueller (2008). Neural mechanisms of extinction learning and retrieval. *Neuropsychopharmacology* 33(1): 56-72.

Ramos, A. (2008). Animal models of anxiety: do I need multiple tests? *Trends Pharmacol. Sci.* 29(10): 493-498.

Ramos, A., E. Pereira, G. C. Martins, T. D. Wehrmeister y G. S. Izidio (2008). Integrating the open field, elevated plus maze and light/dark box to assess different types of emotional behaviors in one single trial. *Behav. Brain Res.* 193(2): 277-288.

Rauch, S. L., L. M. Shin y E. A. Phelps (2006). Neurocircuitry models of posttraumatic stress disorder and extinction: Human neuroimaging research - Past, present, and future. *Biol. Psychiatr.* 60(4): 376-382.

Ravindran, L. N. y M. B. Stein (2010). The Pharmacologic Treatment of Anxiety Disorders: A Review of Progress. *J. Clin. Psychiatry* 71(7): 839-854.

## Bibliografía

---

Ribes, D., M. T. Colomina, P. Vicens y J. L. Domingo (2008). Effects of oral aluminum exposure on behavior and neurogenesis in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Exp. Neurol.* 214(2): 293-300.

Richardson, V. M., D. F. Staskal, D. G. Ross, J. J. Diliberto, M. J. DeVito y L. S. Bimbaum (2008). Possible mechanisms of thyroid hormone disruption in mice by BDE 47, a major polybrominated diphenyl ether congener. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 226(3): 244-250.

Rodgers, R. J., B. J. Cao, A. Dalvi y A. Holmes (1997). Animal models of anxiety: An ethological perspective. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 30(3): 289-304.

Rodgers, R. J. y N. J. T. Johnson (1995). Factor analysis of spatiotemporal and ethological measures in the murine elevated plus-maze test of anxiety. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 52(2): 297-303.

Rodgers, R. J., C. Lee y J. K. Shepherd (1992). Effects of diazepam on behavioral and antinociceptive responses to the elevated plus-maze in male mice depend upon treatment regimen and prior maze experience. *Psychopharmacology* 106(1): 102-110.

Rotander, A., B. van Bavel, A. Polder, F. Riget, G. A. Audunsson, G. W. Gabrielsen, G. Vikingsson, D. Bloch y M. Dam (2012). Polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) in marine mammals from Arctic and North Atlantic regions, 1986-2009. *Environ. Int.* 40: 102-109.

Rowe, D. C., C. Stever, J. M. C. Gard, H. H. Cleveland, M. L. Sanders, A. Abramowitz, S. T. Kozol, J. H. Mohr, S. L. Sherman y I. D. Waldman (1998). The relation of the dopamine transporter gene (DAT1) to symptoms of internalizing disorders in children. *Behav. Genet.* 28(3): 215-225.

Ruddick, J. P., A. K. Evans, D. J. Nutt, S. L. Lightman, G. A. W. Rook y C. A. Lowry (2006). Tryptophan metabolism in the central nervous system: medical implications. *Expert Rev. Mol. Med.* 8(20): 1-27.

Samochowiec, J., A. Hajduk, A. Samochowiec, J. Horodnicki, G. Stepień, A. Grzywacz y J. Kucharska-Mazur (2004). Association studies of MAO-A, COMT, and 5-HTT genes polymorphisms in patients with anxiety disorders of the phobic spectrum. *Psychiatry Research* 128(1): 21-26.

Sanchez-Perez, A. M., A. Garcia-Aviles, H. Albert Gasco, J. Sanjuan y F. E. Olucha-Bordonau (2012). Effects of methylphenidate on anxiety. *Rev. Neurol.* 55(8): 499-506.

## Bibliografia

---

Schecter, A., J. A. Colacino, T. R. Harris, N. Shah y S. I. Brummitt (2009). A Newly Recognized Occupational Hazard for US Electronic Recycling Facility Workers: Polybrominated Diphenyl Ethers. *J. Occup. Environ. Med.* 51(4): 435-440.

Schecter, A., O. Papke, J. E. Joseph y K. C. Tung (2005). Polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) in US computers and domestic carpet vacuuming: Possible sources of human exposure. *J. Toxicol. Environ. Health. A* 68(7): 501-513.

Schneier, F. R., D. Martinez, A. Abi-Dargham, Y. Zea-Ponce, H. B. Simpson, M. R. Liebowitz y M. Laruelle (2008). Striatal dopamine D-2 receptor availability in OCD with and without comorbid social anxiety disorder: Preliminary findings. *Depress. Anxiety* 25(1): 1-7.

Segman, R. H. y A. Y. Shalev (2003). Genetics of posttraumatic stress disorder. *Cns Spectrums* 8(9): 693-698.

Shepherd, J. K., S. S. Grewal, A. Fletcher, D. J. Bill y C. T. Dourish (1994). Behavioural and pharmacological characterisation of the elevated "zero-maze" as an animal model of anxiety. *Psychopharmacology* 116(1): 56-64.

Shrout, P. E. y J. L. Fleiss (1979). Intraclass correlations: Uses in assessing rater reliability. *Psychol. Bull.* 86(2): 420-428.

Sieghart, W. (2006). Structure, pharmacology, and function of GABAA receptor subtypes. *Adv. Pharmacol.* 54: 231-263.

Sills, R. C., W. M. Valentine, V. Moser, D. G. Graham y D. L. Morgan (2000). Characterization of carbon disulfide neurotoxicity in C57BL6 mice: Behavioral, morphologic, and molecular effects. *Toxicol. Pathol.* 28(1): 142-148.

Simpson, J., C. Ryan, A. Curley, J. Mulcaire y J. P. Kelly (2012). Sex differences in baseline and drug-induced behavioural responses in classical behavioural tests. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 37(2): 227-236.

Sinclair, L. I., D. M. Christmas, S. D. Hood, J. P. Potokar, A. Robertson, A. Isaac, S. Srivastava, D. J. Nutt y S. J. C. Davies (2009). Antidepressant-induced jitteriness/anxiety syndrome: systematic review. *Br. J. Pharmacol.* 194(6): 483-490.

Smoller, J. W., E. Gardner-Schuster y J. Covino (2008). The genetic basis of panic and phobic anxiety disorders. *Am. J. Med. Genet. C Semin. Med. Genet.* 148C(2): 118-126.

## Bibliografia

---

Spielberger, C. D. (1983). *Manual for the Strate-Trait Anxiety Inventory (Form Y)*. Palo Alto, CA, Consulting Psychologists Press.

Stapleton, H. M., B. Brazil, R. D. Holbrook, C. L. Mitchelmore, R. Benedict, A. Konstantinov y D. Potter (2006). In vivo and in vitro debromination of decabromodiphenyl ether (BDE 209) by juvenile rainbow trout and common carp. *Environ. Sci. Tech.* 40(15): 4653-4658.

Stapleton, H. M., S. M. Kelly, R. Pei, R. J. Letcher y C. Gunsch (2009). Metabolism of Polybrominated Diphenyl Ethers (PBDEs) by Human Hepatocytes in Vitro. *Environ. Health Perspect.* 117(2): 197-202.

Stein, M. B., N. J. Schork y J. Gelernter (2008). Gene-by-environment (serotonin transporter and childhood maltreatment) interaction for anxiety sensitivity, an intermediate phenotype for anxiety disorders. *Neuropsychopharmacology* 33(2): 312-319.

Sullivan, H. S. (1956). *Clinical studies in Psychiatry*. New York, Norton.

Talsness, C. E. (2008). Overview of toxicological aspects of polybrominated diphenyl ethers: A flame-retardant additive in several consumer products. *Environ. Res.* 108(2): 158-167.

Tambs, K., N. Czajkowsky, E. Roysamb, M. C. Neale, T. Reichborn-Kjennerud, S. H. Aggen, J. R. Harris, R. E. Orstavik y K. S. Kendler (2009). Structure of genetic and environmental risk factors for dimensional representations of DSM-IV anxiety disorders. *Br. J. Psychiatry* 195(4): 301-307.

Tancer, M. E., R. B. Mailman, M. B. Stein, G. A. Mason, S. W. Carson y R. N. Golden (1994). Neuroendocrine responsivity to monoaminergic system probes in generalized social phobia. *Anxiety* 1(5): 216-223.

Tang, X. D., J. H. Xiao, B. S. Parris, J. D. Fang y L. D. Sanford (2005). Differential effects of two types of environmental novelty on activity and sleep in BALB/cJ and C57BL/6J mice. *Physiol. Behav.* 85(4): 419-429.

Tilson, H. A. (1990). Behavioral indexes of neurotoxicity. *Toxicol. Pathol.* 18(1): 96-104.

Treit, D., E. Engin y K. McEown (2010). Animal models of anxiety and anxiolytic drug action. *Curr. Top. Behav. Neurosci.* 2: 121-160.

## Bibliografía

---

Trendelenburg, A. U., K. Starke y N. Limberger (1994). Presynaptic alpha(2A) adrenoceptors inhibit the release of endogenous dopamine in rabbit caudate nucleus slices. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 350(5): 473-481.

Trendelenburg, A. U., M. Trendelenburg, K. Starke y N. Limberger (1994). Release inhibiting alpha(2) adrenoceptors at serotonergic axons in rat and rabbit brain cortex: Evidence for pharmacological identity with alpha(2) autoreceptors. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 349(1): 25-33.

Ueno, D., N. Kajiwara, H. Tanaka, A. Subramanian, G. Fillmann, P. K. S. Lam, G. J. Zheng, M. Muchitar, H. Razak, M. Prudente, K. H. Chung y S. Tanabe (2004). Global pollution monitoring of polybrominated diphenyl ethers using skipjack tuna as a bioindicator. *Environ. Sci. Tech.* 38(8): 2312-2316.

Viberg, H. (2009). Neonatal ontogeny and neurotoxic effect of decabrominated diphenyl ether (PBDE 209) on levels of synaptophysin and tau. *Int. J. Dev. Neurosci.* 27(5): 423-429.

Viberg, H., N. Johansson, A. Fredriksson, J. Eriksson, G. Marsh y P. Eriksson (2006). Neonatal exposure to higher brominated diphenyl ethers, hepta-, octa-, or nonabromodiphenyl ether, impairs spontaneous behavior and learning and memory functions of adult mice. *Toxicol. Sci.* 92(1): 211-218.

Vicens, P., M. d. C. Carrasco y R. Redolat (2003). Aprendizaje espacial y laberinto de agua: metodología y aplicaciones. *Psicothema* 15: 539-544.

Vieland, V. J., D. W. Goodman, T. Chapman y A. J. Fyer (1996). New segregation analysis of panic disorder. *Am. J. Med. Genet. C. Semin. Med. Genet.* 67(2): 147-153.

Voikar, V., A. Polus, E. Vasar y H. Rauvala (2005). Long-term individual housing in C57BL/6J and DBA/2 mice: assessment of behavioral consequences. *Genes Brain Behav.* 4(4): 240-252.

Wager, T. D., K. L. Phan, I. Liberzon y S. F. Taylor (2003). Valence, gender, and lateralization of functional brain anatomy in emotion: a meta-analysis of findings from neuroimaging. *Neuroimage* 19(3): 513-531.

Walf, A. A. y C. A. Frye (2007). The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents. *Nat. Protoc.* 2(2): 322-328.

Wall, P. M. y C. Messier (2000). Ethological confirmatory factor analysis of anxiety-like behaviour in the murine elevated plus-maze. *Behav. Brain Res.*

## Bibliografía

---

114(1-2): 199-212.

Weiss, S. M., G. Wadsworth, A. Fletcher y C. T. Dourish (1998). Utility of ethological analysis to overcome locomotor confounds in elevated maze models of anxiety. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 23(2): 265-271.

Wilford, B. H., T. Harner, J. P. Zhu, M. Shoeib y K. C. Jones (2004). Passive sampling survey of polybrominated diphenyl ether flame retardants in indoor and outdoor air in Ottawa, Canada: Implications for sources and exposure. *Environ. Sci. Tech.* 38(20): 5312-5318.

Wittchen, H. U., F. Jacobi, J. Rehm, A. Gustavsson, M. Svensson, B. Jonsson, J. Olesen, C. Allgulander, J. Alonso, C. Faravelli, L. Fratiglioni, P. Jennum, R. Lieb, A. Maercker, J. van Os, M. Preisig, L. Salvador-Carulla, R. Simon y H. C. Steinhausen (2011). The size and burden of mental disorders and other disorders of the brain in Europe 2010. *Eur. Neuropsychopharm.* 21(9): 655-679.

Yehuda, R., A. Bell, L. M. Bierer y J. Schmeidler (2008). Maternal, not paternal, PTSD is related to increased risk for PTSD in offspring of Holocaust survivors. *J. Psychiatr. Res.* 42(13): 1104-1111.

Yuan, J., L. Chen, D. Chen, H. Guo, X. Bi, Y. Ju, P. Jiang, J. Shi, Z. Yu, J. Yang, L. Li, Q. Jiang, G. Sheng, J. Fu, T. Wu y X. Chen (2008). Elevated serum polybrominated diphenyl ethers and thyroid-stimulating hormone associated with lymphocytic micronuclei in Chinese workers from an e-waste dismantling site. *Environ. Sci. Tech.* 42(6): 2195-2200.

Zala, S. M. y D. J. Penn (2004). Abnormal behaviours induced by chemical pollution: a review of the evidence and new challenges. *Anim. Behav.* 68: 649-664.

## Parte VIII

### Anexos



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI  
VALIDEZ DEL LABERINTO CIRCULAR ELEVADO COMO MODELO ANIMAL DE ANSIEDAD EN ESTUDIOS TOXICOLÓGICOS  
Luis Heredia Santaella  
Dipòsit Legal: T.1558-2013

## Batería de observación funcional (FOB)

La exploración en la jaula comienza sin tocar al animal del rack del estabulario y continua en la sala de exploración.

### JAULA (2 minutos)

Postura inicial:

1. Sentado o de pie a cuatro patas, normalmente, rearing (a dos patas) o durmiendo.
2. Acurrucado o acostado.
3. Ligero balanceo en posición de pie.
4. Balanceo exagerado o caída de la cabeza a pesar de estar en posición de pie.
5. Acostado plano con las extremidades abiertas.
6. Estirado de lado, con las extremidades estiradas.

Arousal (estado de vigilancia):

1. Muy bajo (coma estupor).
2. Bajo, algún movimiento de la cabeza o corporal presente.
3. Bajo de alguna manera, algún movimiento de la cabeza o corporal presente con periodos de inmovilidad.
4. Normal.
5. Alto de alguna manera (excitado, tenso).
6. Muy alto (hiperalerta, muy excitado, movimientos bruscos).

### OBSERVACIONES AL MANIPULARLO

Respuesta inicial (al introducir la mano en la jaula para cogerlo):

1. Muy fácil, letárgico (el animal está quieto y permite que lo cojas)
2. Fácil, normal (no presenta mucha resistencia).
3. Moderadamente difícil (se levanta a dos patas, sigue la mano del investigador).
4. Huye (retrocede, se acurruca con o sin vocalizaciones)
5. Difícil (Corre alrededor del perímetro, difícil de coger).

**Reacción a la mano:**

1. Baja (fácil de manipular, poca resistencia a la manipulación).
2. Moderadamente baja (alguna resistencia con o sin vocalizaciones).
3. Moderadamente alta (experimenta temblores o está rígido en la mano con o sin vocalizaciones).
4. Alta (intenta moder, trepar).

**Salivación:**

1. No, ausencia (seco alrededor de la boca).
2. Leve (un poco).
3. Severa.

**Lagrimeo:**

1. No, ausencia (seco alrededor de los ojos).
2. Leve (un poco).
3. Severa.

**Piloerección:**

0. Ausencia.
1. Presencia (no se le aplana el pelo).

**Falta de pelo por grooming:**

0. Ausencia.
1. Presencia (zonas calvas).

**Cierre parpebral:**

1. Ojos abiertos.
2. Párpados un poco caídos.
3. Ojos medio cerrados.
4. Ojos cerrados.

**OBSERVACIONES EN EL CAMPO ABIERTO (2 minutos)****Marcha:**

1. Marcha normal.
2. Ataxia (excesivo balanceo).

3. Las extremidades posteriores muestran movimientos exagerados, son arrastradas.
4. Pies marcadamente fuera del cuerpo.
5. Las extremidades anteriores estan extendidas o son incapaces de soportar el peso corporal.
6. Camina de puntillas.
7. Jorobado (espalda curvada) o acurrucado.
8. Arrastra el cuerpo o el cuerpo está plano sobre la superficie.

#### Anormalidades de la marcha:

1. Normal.
2. Ligeramente anormal.
3. Moderadamente anormal.
4. Severamente anormal.

#### Mobilidad:

1. Normal (habilidad para moverse).
2. Ligeramente empeorada.
3. Moderadamente empeorada.
4. Totalmente empeorada.

#### Arousal (estado de vigilancia):

1. Muy bajo (coma estupor).
2. Bajo, algún movimiento de la cabeza o corporal presente.
3. Bajo de alguna manera, algún movimiento de la cabeza o corporal presente con periodos de inmovilidad.
4. Normal.
5. Alto de alguna manera (excitado, tenso).
6. Muy alto (hiperalerta, muy excitado, movimientos bruscos).

#### Movimientos tónicos:

1. Normal (no presencia).
2. Contracción de los extensores (extremidades rígidas y estiradas).
3. Opistótonos (cuerpo arqueado hacia la espalda).
4. Emprostótonos (cuerpo arqueado hacia abajo).
5. Saltos explosivos (las cuatro patas no tocan la superficie).
6. Convulsiones tónico-clónicas que sobrevienen en dispnea o muerte.

### Movimientos clónicos:

1. Normal (no existen).
2. Temblores en las extremidades, orejas, cabeza o piel.
3. Movimientos repetitivos de la boca o mandíbulas.
4. Temblores ligeros.
5. Temblores severos de todo el cuerpo.
6. Sacudidas secas.
7. Sacudidas mioclónicas.
8. Convulsiones clónicas.

### Posición de la cola:

1. Arrastrándola por la superficie, floja.
2. Rígida, se mantiene baja cerca de la superficie.
3. Rígida, alta y elevada.

### Vocalizaciones:

0. No, vocalizaciones espontáneas.
1. Sí, vocalizaciones espontáneas.

## RESPUESTA A LA MANIPULACIÓN

### Respuesta a la aproximación (un bolígrafo por la parte de delante):

1. Sin reacción
2. Se aproxima lentamente o lo huele y se gira.
3. Frezzing.
4. Una respuesta más enérgica que la 2 o la 3.
5. Exagerada (salta, muerde, ataca).

### Respuesta al contacto:

1. Sin reacción
2. Se gira lentamente o se marcha (vocaliza un poco o ningún movimiento), ligera reacción.
3. Frezzing, el cuerpo entero reacciona (se asusta).
4. Una respuesta más enérgica que la 2 o la 3.
5. Exagerada (salta, muerde, ataca).

Respuesta al click (sonido producido encima de él):

1. Sin reacción.
2. Ligera reacción (alguna evidencia que ha escuchado el sonido).
3. Freezing, el cuerpo entero reacciona (se asusta).
4. Una respuesta más enérgica que la 2 o la 3.
5. Exagerada (salta, muerde, ataca).

Pantalla invertida (escalar una tela metálica):

1. Cae o se mantiene al final de la pantalla mirando hacia abajo.
2. Se gira hacia arriba pero no sube hasta el final.
3. Sube hasta el final en 20 segundos o menos.

Darse la vuelta (righting, colocado con el vientre hacia arriba):

1. Normal.
2. Lento, en 2 segundos.
3. Muy lento, tarda más de 2 segundos.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI  
VALIDEZ DEL LABERINTO CIRCULAR ELEVADO COMO MODELO ANIMAL DE ANSIEDAD EN ESTUDIOS TOXICOLÓGICOS  
Luis Heredia Santaella  
Dipòsit Legal: T.1558-2013



Departamento de Psicología  
**Universitat Rovira i Virgili**