

DIFERENCIAS EN LOS COMPORTAMIENTOS ASOCIADOS CON LA ANSIEDAD DE RATAS MACHO Y HEMBRA EXPUESTAS A UN PROTOCOLO DE ESTRÉS CRÓNICO POR SEPARACIÓN MATERNAL TEMPRANA

DIFFERENCES IN BEHAVIOR ASSOCIATED TO ANXIETY IN MALE AND FEMALE RATS EXPOSED TO A CHRONIC STRESS PROTOCOL: EARLY MATERNAL SEPARATION

Laura Moreno¹
Marisol Lamprea¹
Zulma Duenas²

Universidad Nacional de Colombia - Sede Bogotá

RESUMEN

En mamíferos, durante las primeras etapas de la vida, el medio ambiente y la interacción madre-hijo son esenciales para el normal desarrollo neuronal y comportamental. En efecto, se ha demostrado que la interrupción de esta interacción ejerce efectos tardíos sobre el desarrollo del sistema nervioso central, endocrino, inmune y el comportamiento. El objetivo de este estudio fue determinar el efecto de la Separación Maternal Temprana (SMT) sobre los comportamientos asociados con la ansiedad en machos y hembras adultas utilizando el laberinto en cruz elevado (LCE). El protocolo de SMT se llevó a cabo entre los días posnatales 1 y 21 separando las crías de sus madres dos veces al día (tres horas en la mañana y tres en la tarde). Como grupo control se utilizaron animales de la misma camada que no fueron separados pero que fueron manipulados por un periodo de un minuto en la mañana y en la tarde. En el día posnatal 22 los animales se distribuyeron de acuerdo al sexo y se mantuvieron en el laboratorio sin ninguna manipulación hasta el día posnatal 90, cuando fue llevada a cabo la prueba comportamental en el laberinto en cruz elevado. Fueron evaluados el número de entradas y el tiempo de permanencia en cada brazo y la frecuencia y el tiempo en las conductas de estirarse, agacharse y acicalarse. Nuestros resultados muestran que las hem-

1. Departamento de Psicología, Facultad de Ciencias Humanas

2. Departamento de Ciencias Fisiológicas, Facultad de Medicina

Correspondencia: zjduenasg@unal.edu.co

bras separadas tienen mayor número de entradas y se demoran más tiempo en los brazos abiertos, más agaches y menos acicalamientos comparados con los comportamientos de las hembras control y los machos experimentales y controles. De acuerdo con el perfil ansiolítico que muestran las hembras en el LCE nuestros datos sugieren que utilizando este protocolo, la SMT afecta diferencialmente a las hembras y a los machos adultos.

Palabras clave: Separación maternal temprana, laberinto en cruz elevado, ansiedad, comportamiento defensivo, estrés crónico, rata.

SUMMARY

During the first stages of life, the environment and maternal interactions are essential for normal mammalian neuronal maturity and behavior. In fact, it has been demonstrated that disruption of mother-pup interaction during early life exert long-lasting effects on the development of central nervous, endocrine, and immune systems and behavioral responses. The principal aim of our work was to study the consequences of early maternal separation (EMS) on adult male and female anxiety. The behaviors was evaluated using the Elevated Plus-Maze (EPM). Separation procedure was carried out in postnatal days 1 to 21 twice daily: three hours in the morning and three hours in the afternoon. As a control group we used animals that stayed with the mother but were manipulated daily for one minute in the morning and in the afternoon. In postnatal day 22, animals were distributed by sex and then kept in standard lab conditions. Behavioral testing in the EPM was performed at 90/95 days of age. All subjects were videotaped. Records included number of entries, time spent in each arm, and the frequency and time stretching, deeping, rearing, and grooming. Our results showed that separated females have more open arm entries and spent more time there, and exhibit more deeping and less grooming compared to females in the control group and males of the experimental and control group. Thus, based on the anxiolytic profile that female rat shows in the EPM, these data suggest that EMS affects differentially male and female adult rats.

Key words: Early maternal separation, elevate plus maze, anxiety, self defense behavior, chronic stress, rat.

INTRODUCCIÓN

Las experiencias tempranas afectan el desarrollo cerebral y el comportamiento de los individuos (Giedd et al., 1999; Pascual & Zamora-León, 2007; Salzberg et al., 2007). Diversos estudios clínicos han mostrado que la negligencia, desatención o abandono materno, maltrato o abuso infantil y eventos estresantes durante la vida temprana pueden interferir con el desarrollo neuroanatómico, endocrino y comportamental del niño e incrementar la vulnerabilidad a diversas psicopatologías en particular durante la adolescencia y la edad adulta (Aisa, Tordera, Lasheras, Del Río & Ramírez, 2007; Davidson, Putnam & Larson, 2000; Heim & Nemeroff, 2001; Lorberbaum et al., 1999; Poehlmann & Fiese, 2001).

La Separación Maternal Temprana (SMT) ha sido usada en una variedad de especies animales como modelo experimental de estrés causado por abandono (Dickinson, Leach & Flecknell, 2009; Foscolo, Foscolo, Marubayashi, Reis & Coimbra, 2008; Hall, 1998; Ladd, Owens & Nemeroff, 1996) ya que goza de una importante validez predictiva y permite inferir tendencias de un sujeto a presentar diferentes trastornos y problemas de salud (Greisen, Bolwig, Husum, Nedergaard & Wortwein, 2005; Heim & Nemeroff, 2001; Ploj, Roman & Nylander, 2003). Además es un modelo que contribuye al estudio de la etiología del comportamiento y las disfunciones cerebrales relacionadas con este tipo de estrés (Lehmann, Pryce, Bettschen & Feldon, 1999; Lehmann, Pryce & Feldon, 2000). Para estudiar

los efectos del estrés por SMT sobre diferentes variables existen diversos métodos en los que las respuestas obtenidas pueden ser completamente diferentes dependiendo de factores como la edad de la cría, la duración de la separación (única o repetitiva) y la especie y género de la camada (Joels & de Kloet, 1994). Teniendo en cuenta que el estrés es entendido como el conjunto de cambios fisiológicos y conductuales que se desencadenan en los organismos cuando se enfrentan o someten a situaciones de diversa naturaleza, que amenazan la integridad del mismo y producen una respuesta crucial para la supervivencia y el normal funcionamiento, el estudio del estrés aplicado en edades tempranas permite evaluar los posibles efectos de la experiencia temprana sobre el desarrollo de los individuos. De esta manera, se puede examinar y evaluar el papel de la interacción madre-cría sobre el desarrollo apropiado del individuo; los estudios en animales proveen modelos en los que se puede encontrar evidencia de la separación temprana como factor predisponente para la aparición de problemas de salud (Kikusui, Nakamura, Kakuma & Mori, 2006) o como un elemento que altera estrategias de la especie para asegurar la supervivencia (Andersen, Lyss, Dumont & Teicher, 1999; Macri, Mason & Wurbel, 2004; Stewart, Petrie, Balfour, Matthews & Reid, 2004).

Por otra parte, el estrés puede inducir ansiedad. La ansiedad generalizada se define como un estado de malestar caracterizado por intranquilidad, expectación aprehensiva y aumento de la vigilancia en ausencia de un estímulo desencadenante. Con frecuencia se manifiestan también reacciones autonómicas, como sudoración, taquicardia, alteraciones gastrointestinales, tensión muscular, tremor e insomnio, entre otras (Kaplan & Sadock, 1991). Asimismo, la ansiedad también puede definirse como uno de los procesos cerebrales directamente involucrados en la sobrevivencia de diferentes especies animales, especialmente de

aquellas que por su naturaleza son víctimas de los depredadores (Kaplan & Sadock, 1991; LeDoux, 1995; Lister, 1990).

En roedores, el estado de ansiedad está directamente asociado con el comportamiento defensivo. Para determinar los efectos de la separación temprana sobre el comportamiento defensivo se han utilizado diferentes instrumentos (Eklund & Arborelius, 2006; Kikusui & Mori, 2009; Zimmerberg, Kim, Davidson & Rosenthal, 2003), siendo los más comunes los paradigmas de miedo, sobre todo los que implican miedo innato (por ejemplo, el campo abierto o el laberinto en Cruz Elevado) y en los cuales el animal es sometido a un estresor natural tal como el espacio abierto, la altura, la luz intensa o espacios novedosos en los que la exploración puede ser peligrosa para el organismo (Estanislau & Morato, 2005; Madruga, Xavier, Achaval, Sanvitto & Lucion, 2006; Stewart et al., 2004).

En este trabajo, el objetivo fue evaluar los efectos del estrés crónico inducido por dos periodos diarios de Separación Maternal Temprana (SMT) durante todo el periodo de lactancia, en machos y hembras adultas, sobre comportamientos asociados con ansiedad. Esos comportamientos se valoraron de acuerdo con las respuestas de los animales en el Laberinto en Cruz Elevado (LCE).

METODO

SUJETOS

Ratas de la cepa Wistar. Todos los animales estuvieron sometidos a ciclo invertido de iluminación luz oscuridad (6:00 a.m. - 6:00 p.m. luces apagadas), y tuvieron acceso *ad libitum* a comida y agua. Las condiciones de alojamiento y temperatura se mantuvieron constantes. Se utilizaron cuatro camadas que se dividieron en una de las dos posibles condiciones: Separación maternal o no separación con manipulación breve. Todos los procedimientos

se realizaron durante el ciclo oscuridad. La evaluación comportamental se desarrolló en horas de la tarde (de 13:00 a 17:00 p.m.), aproximadamente a los 90/95 días de edad de los sujetos.

INSTRUMENTOS Y EQUIPOS

Para evaluar los posibles efectos de la Separación Temprana sobre comportamientos asociados con ansiedad, se empleó el Laberinto en Cruz Elevado. El laberinto consiste en una plataforma de acrílico de color negro, elevada a ochenta centímetros del suelo, cuyos brazos están dispuestos en forma de cruz. Dos de los brazos de este laberinto se encuentran protegidos por paredes de cuarenta centímetros de altura y se encuentran enfrentados, se conocen como brazos cerrados, los otros dos brazos del laberinto no tienen paredes, sino un pequeño borde de aproximadamente un centímetro de alto, éstos son los brazos abiertos del laberinto.

Los registros comportamentales fueron filmados con una cámara ubicada en el techo del cuarto de experimentación y grabados en cinta a través de un VHS Panasonic para su posterior análisis. Para la transcripción de los datos se empleó el programa X-plo Rat® diseñado para este fin en el Laboratorio de Comportamiento Exploratorio de la Universidad de São Paulo (Brasil).

PROCEDIMIENTO DE SEPARACIÓN TEMPRANA

El día del nacimiento de los animales fue considerado como el día posnatal cero. A partir del día 1 y hasta el día 21, los animales experimentales fueron separados diariamente de la madre, durante seis horas divididas en dos periodos: tres horas en la mañana (7:30-10:30) y tres horas en la tarde (13:30-15:30). Para realizar la separación, las crías fueron removidas de la caja de hábitat y al cabo de tres horas éstas regresaban con su madre hasta el siguiente período de separación. Los animales control no fueron separados de sus madres pero fueron brevemente manipulados por la experimentadora durante el período de separación de los otros individuos. Las manipulaciones consis-

tían en levantar cada recién nacido de la caja, revisarlo, tocarlo y luego devolverlo a su caja de hábitat con su madre.

PRUEBA EN EL LCE

El instrumento fue localizado en una sala de experimentación insonorizada en condiciones de penumbra. El ensayo inicia cuando el animal es colocado gentilmente en la plataforma central del laberinto y se le permite explorar libremente durante cinco minutos. Al cabo de este tiempo el animal es retirado del laberinto y llevado de regreso a su caja hábitat. Entre cada sesión, el laberinto fue limpiado cuidadosamente con alcohol al 10% para eliminar rastros odoríferos dejados por los animales.

Fueron evaluados los siguientes indicadores comportamentales: porcentaje de la frecuencia y tiempo de permanencia en los brazos abiertos y cerrados del laberinto y frecuencia y tiempo utilizado por los animales en los comportamientos de agacharse, levantarse y acicalarse. Estos últimos indicadores comportamentales han sido asociados al comportamiento defensivo típico de los roedores en situaciones novedosas y potencialmente aversivas, en especial el comportamiento de agacharse, el cual ha sido interpretado como una estrategia de evaluación de riesgo (Anseloni & Brandao, 1997; Cruz, Frei & Graeff, 1994; Lamprea, Cárdenas, Silveira, Morato & Walsh, 2000).

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Fueron determinadas las medidas de tendencia central (media) y de dispersión (error promedio) para cada comportamiento en cada grupo con la ayuda del programa Excel. Para la realización de los análisis estadísticos inferenciales se utilizó el programa SIGMA STAT 3.11. Para las comparaciones de medias, cuando los criterios de homogeneidad y normalidad estadísticas se cumplían se aplicó la prueba *t* de Student, mientras que, si las muestras no cumplían alguno de los dos criterios se aplicó la prueba *U* de Mann Whitney.

CONSIDERACIONES ÉTICAS

Todos los procedimientos se realizaron siguiendo las normativas nacionales e internacionales pertinentes: Resolución N° 008430 de 1993 del Ministerio de Salud y Ley 84 del 27 de diciembre de 1989. También se observaron los procedimientos para el manejo y cuidado de animales de laboratorio recomendados por la normativa de la Unión Europea (8616091EU) y del Instituto Nacional de Salud de los Estados Unidos de América (National Research Council, 1996).

RESULTADOS

EFEECTO DE LA SMT SOBRE EL PORCENTAJE DE ENTRADAS Y TIEMPO DE PERMANENCIA DE LAS RATAS HEMBRA EN LOS BRAZOS ABIERTOS

La figura 1 muestra el porcentaje de entradas y el tiempo de permanencia en el brazo abierto del laberinto. En la parte A) de la gráfica se observa que las ratas adultas que durante la lactancia fueron sometidas a estrés por

SMT, muestran un incremento estadísticamente significativo en el porcentaje de entradas al brazo abierto, comparadas con su grupo control (Prueba t ; $t=-2.67$, $p=0.017$). En la parte B) se grafica el tiempo de permanencia en el brazo abierto; al aplicar una U de Mann Whitney se encuentra un aumento estadísticamente significativo ($U=44.000$, $p=0.005$) de este comportamiento en el grupo adulto que en edades tempranas fue sometido a separación, en comparación con el grupo control.

El efecto contrario ocurre con respecto a las mismas variables medidas en los brazos cerrados (datos no mostrados). Al analizar el porcentaje de entradas al brazo cerrado, se ve una disminución significativa (Prueba t ; $t=-2.67$, $p=0.017$), de dicho porcentaje por parte de las hembras separadas en comparación con las hembras control. Asimismo, al analizar el tiempo de permanencia en el brazo cerrado se observa que las hembras separadas permanecen significativamente menos tiempo que las hembras control en dicho brazo, ($U=106.000$; $p=0.017$)

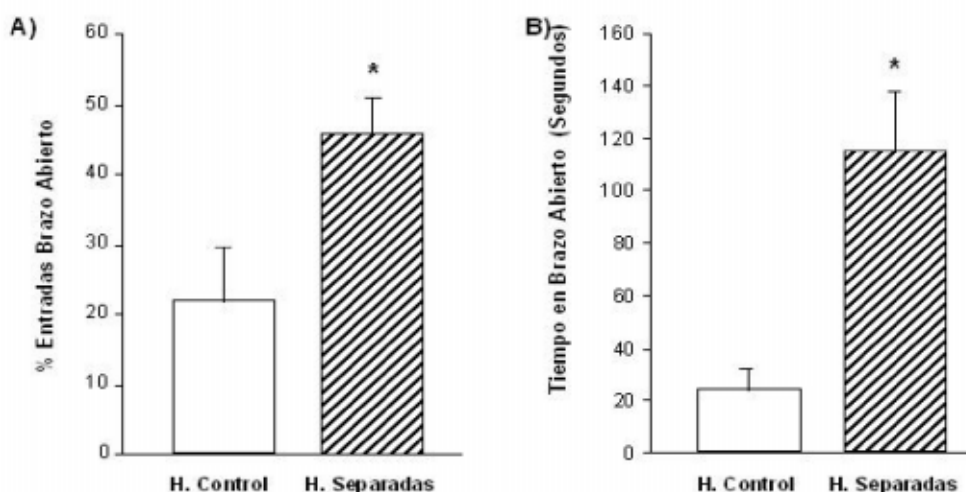




Figura 1: Laberinto en Cruz Elevado: Brazo Abierto. Hembras: control  (n=8) y separadas  (n=10). A) Porcentaje de Entradas al Brazo Abierto: Se encuentra un aumento significativo de la entrada a los brazos abiertos para las hembras separadas con una $p = 0.017$, aplicando una Prueba t ; B) Tiempo en Brazo Abierto: Las hembras separadas permanecen más tiempo que las hembras control en los brazos abiertos con una significancia de $p = 0.005$ (U de Mann Whitney)

EFFECTO DE LA SMT SOBRE EL PORCENTAJE DE ENTRADAS Y TIEMPO DE PERMANENCIA DE LAS RATAS MACHO EN LOS BRAZOS ABIERTOS

En la figura 2, se presentan los datos de porcentaje de entradas y tiempo de permanencia en los brazos abiertos para machos control y separados. La parte A) muestra que en términos de porcentaje de entradas al brazo abierto ninguno de los dos grupos presenta diferencias significativas al realizarse una comparación de medias (Prueba *t*; $t=0.286$; $p=0.781$). En la sección B) de

la gráfica se compara tiempo de permanencia en el brazo abierto y tampoco se observan diferencias estadísticamente significativas para esta medida al comparar los dos grupos control y experimental (Prueba *t*; $t=0.306$; $p=0.766$).

Con respecto a las entradas al brazo cerrado, tampoco se observaron diferencias estadísticas ni con relación al porcentaje de entradas (Prueba *t*; $t=0.286$; $p=0.781$), ni al tiempo de permanencia en los brazos cerrados (Prueba *t*; $t=0.384$; $p=0.709$).

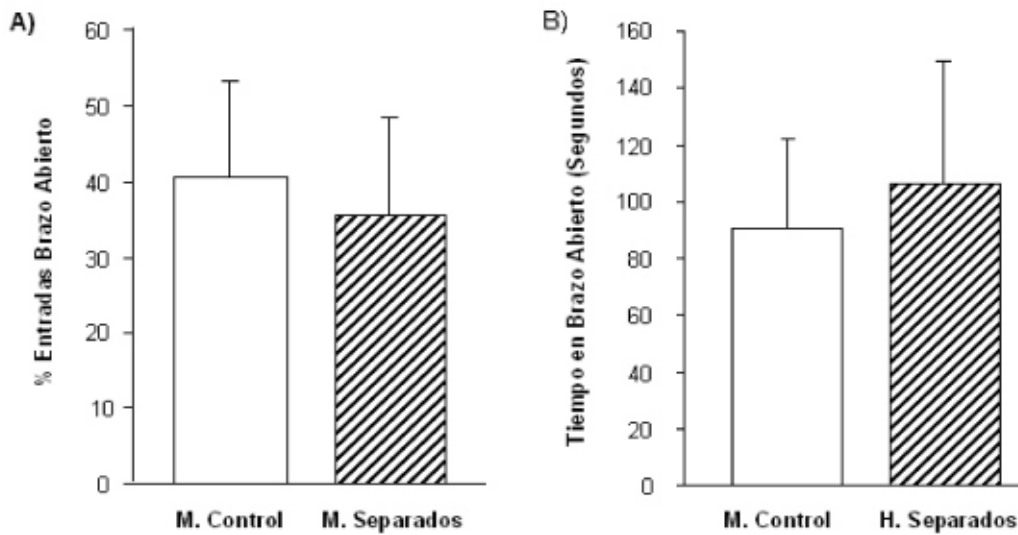


Figura 2: Laberinto en Cruz Elevado: Entradas a Brazo Abierto. Machos: Control (n=7) y Separados (n=5). A) Porcentaje Entradas Brazo Abierto: No se encuentran diferencias significativas $p=0.781$ (Prueba T); B) Tiempo en Brazo Abierto: No se detectan diferencias significativas $p=0.766$ (Prueba T)

EFFECTO DE LA SMT SOBRE LA EJECUCIÓN DE AGACHES: DEEPING POR LAS RATAS HEMBRA SEPARADAS EN COMPARACIÓN CON EL GRUPO CONTROL

En términos de la ejecución de agaches o *deeping*, considerado como una medida de evaluación de riesgo, se aprecia un aumento significativo en la frecuencia y el tiempo de ejecución de este comportamiento al comparar las hembras separadas con su grupo control (figura 3). En la sección A)

se presenta la frecuencia de ejecución de *deeping* de hembras control y separadas y se encuentra que estas últimas tienen un aumento significativo en la cantidad de veces que realizan este comportamiento con relación a sus controles ($U=49.000$; $p=0.018$). En la parte B) se ve que las hembras del grupo separado permanecen significativamente más tiempo en la ejecución de *deeping* que las hembras del grupo control ($U=49.500$; $p=0.021$).

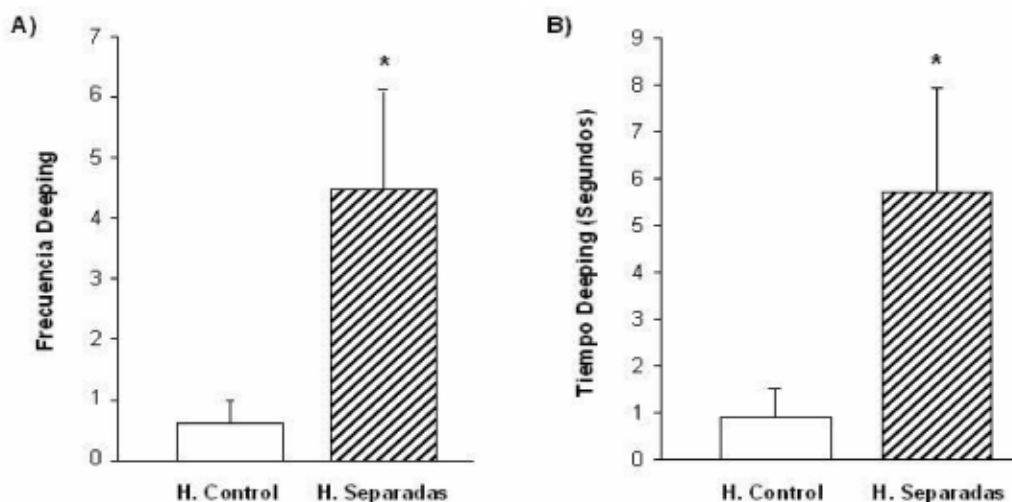




Figura 3: Laberinto en Cruz Elevado: Deeping. Hembras: Control  (n=8) **y Separadas**  (n=10). **A) Frecuencia Deeping:** Se encuentran diferencias significativas al aplicar una prueba U de Mann Whitney $p = 0.018$; **B) Tiempo Deeping:** Se detectan diferencias significativas para el tiempo con una prueba T, $p = 0.021$

EFECTO DE LA SMT SOBRE LA EJECUCIÓN DE ESTIRAMIENTOS HACIA DELANTE, HACIA ARRIBA (LEVANTES) Y ACICALAMIENTOS (*GROOMING*) EN LAS RATAS ADULTAS MACHOS Y HEMBRAS COMPARADAS CON LOS GRUPOS CONTROLES RESPECTIVOS.

En la tabla anexa se anotan los valores de las medias correspondientes a cada comportamiento

y sus respectivos errores y prueba estadística aplicada tanto para los grupos control como para los grupos experimentales que corresponden a los adultos machos y hembras que fueron separados tempranamente de sus madres.

TABLA 1. Datos obtenidos de los comportamientos evaluados en el LCE a ratas adultas machos y hembras que fueron sometidas a estrés por SMT. Se presentan las medias con sus respectivos errores estándar y las pruebas estadísticas aplicadas en cada caso.

Comportamiento	Media Controles ±SE	Media Separados ±SE	Prueba estadística	Nivel de Significancia
Frecuencia Estirarse Machos	26.000±6.880	28.800±7.259	$t=0.680$	$p=0.512$
Frecuencia Estirarse Hembras	18.625±5.854	21.500±9.606	$t=0.741$	$p=0.469$
Tiempo Estirarse Machos	97.857±15.323	107.400±32.207	$t=-0.691$	$p=0.505$
Tiempo Estirarse Hembras	100.250±36.503	83.600±27.403	$t=1.107$	$p=0.285$
Frecuencia Levantarse Machos	10.000±9.250	8.000±7.750	$U=21.000$	$p=0.073$
Frecuencia Levantarse Hembras	11.500±3.817	13.300±5.539	$t=-0.781$	$p=0.446$
Tiempo Levantarse Machos	18.286±10.843	12.800±6.979	$t=0.987$	$p=0.347$
Tiempo Levantarse Hembras	23.500±5.757	18.800±8.715	$t=1.310$	$p=0.209$
Frecuencia Grooming Machos	0.000±0.000	0.000±0.000	$U=31.000$	$p=0.876$
Frecuencia Grooming Hembras	0.500±0.000	0.500±0.000	$U=82.500$	$p=0.593$
Tiempo Grooming Machos	0.000±0.000	0.000±0.000	$U=31.500$	$p=0.876$
Tiempo Grooming Hembras	1.500±0.000	0.500±0.000	$U=81.500$	$P=0.656$

DISCUSIÓN

El presente estudio tuvo como objetivo determinar los efectos de la inducción de estrés a través de la separación maternal temprana sobre la expresión de comportamientos asociados a la ansiedad en el laberinto en cruz elevado considerando separadamente los efectos en los machos y las hembras expuestos a cada condición (SMT o control).

Este protocolo ofrece múltiples ventajas en términos de calidad de resultados y procedimientos en la manipulación de los animales; por ejemplo, aunque las separaciones de seis horas continuas se utilizan como protocolo de separación (Jiménez-Vásquez, Mathe, Thomas, Riley & Ehlers, 2001; Rhees, Lephart & Eliason, 2001; Troakes & Ingram, 2008) las separaciones de seis horas divididas en dos intervalos son relativamente novedosas y resultan apropiadas para disminuir posibles sesgos por déficits de nutrición en los individuos (Eklund & Arborelius, 2006), por consiguiente, en este trabajo se adoptaron las del segundo para evitar las posibles complicaciones arriba mencionadas.

Nuestros animales no presentaron alteraciones de peso con respecto a los controles, pues en general, el promedio de peso en las pruebas, se mantuvo. Este dato difiere de lo reportado por Cirulli, Micera, Alleva y Aloe (1998) y Lehmann et al. (1999), quienes en procedimientos de separación temprana de 24 horas continuas encuentran que los sujetos separados presentan una baja de peso durante la infancia al momento del destete, que no se mantiene en la edad adulta; por el contrario, las diferencias comportamentales sí se mantienen aún cuando los sujetos han igualado su peso al del grupo control. Cabe anotar que un periodo de separación de 24 horas afecta el proceso nutricional y que ello puede modificar no sólo la ganancia de peso sino alterar el desarrollo normal del individuo en otros niveles fisiológicos.

En este trabajo, todas las pruebas fueron realizadas en el periodo de oscuridad teniendo en cuenta que la actividad de este tipo de ani-

males es nocturna Munn, (1950). El uso de un protocolo en el que el ciclo lumínico del bioterio está invertido, es decir, luces apagadas durante el día y luces encendidas en la noche, permite asumir un nivel apropiado de activación conductual de los animales ya que, según lo descrito por Munn (1950), ratas con ciclos lumínicos extendidos presentan períodos más extendidos de actividad. Por otro lado, al realizar las separaciones durante el período de oscuridad se puede inferir que tanto las crías como la madre pueden “percatarse” de la separación debido a esa misma activación comportamental. Asimismo, el realizar las pruebas comportamentales en completa oscuridad permite asumir los cambios observados en el comportamiento de los animales como efectos del tratamiento y no como resultado de otras variables ambientales tales como la luz, que pueden en algún caso tener más efecto sobre el comportamiento que el tratamiento mismo, en la medida en la que la luz resulta aversiva para este tipo de ratas (Munn, 1950).

En términos de control experimental, es posible mencionar que nuestros animales disponían de un bioterio exclusivo para su crianza, al que sólo entraba un experimentador; el control de las situaciones experimentales y de vivienda se mantuvieron constantes, de forma que temperatura, iluminación y ruido fueron aislados para controlar algunas fuentes externas de variación de modo que se pudiera asegurar la fiabilidad de los datos.

El haber evaluado machos y hembras también ofrece ventajas en términos de la generación de conocimiento en este tema, porque aunque existen experimentos de separación en los que se incluyen ratas de ambos sexos, en este trabajo se evalúa comportamiento de tipo ansioso en machos y hembras, mostrando diferencias que no se habían registrado previamente y que permiten comprender de forma más amplia el concepto de comportamiento de tipo ansioso, dejando en evidencia la respuesta diferencial al estrés en ambos sexos, (Kosten, Lee &

Kim, 2007) y asimismo que estos comportamientos están dados por diferencias que pueden abarcar desde la anatomía cerebral hasta las distintas etapas del ciclo hormonal. Al incluir hembras en el estudio se ofrece una visión integral del fenómeno debido a que machos y hembras presentan repertorios comportamentales distintos que están implicados en respuestas a cambios ambientales o sociales. Al respecto, Palanza, Gioiosa y Parmigiani (2001) describen a las hembras como susceptibles al estrés social y a los machos como insensibles a este tipo de estresor; nuestros resultados son contradictorios con este hallazgo, pero es de resaltar que existen reportes de una reacción dependiente del sexo. Palanza et al. (2001), señalan que las hembras son más vulnerables a desarrollar comportamientos defensivos o asociados a ansiedad, encontrando que las hembras que son aisladas son menos tendientes a la exploración y que en general presentan menos índices de interacción y mayores de temor, en comparación con las hembras que no lo han sido. Respecto a los machos agrupados, afirma que éstos presentan más comportamientos asociados con ansiedad que los que fueron almacenados individualmente, lo que hace pensar que los machos son “insensibles” a estresores sociales (de aislamiento específicamente). Nuestros resultados, sin embargo, muestran que las hembras separadas presentan un perfil ansiolítico en comparación con su grupo control y con los grupos de machos. Es importante sin embargo, notar que el tipo de estresor utilizado en el presente estudio es diferente al utilizado por Palanza, lo cual podría dar cuenta de la diferencia en los efectos observados en ambos trabajos.

En general, se encuentra que los hallazgos de este estudio coinciden con otros en los cuales son descritas diferencias de sexo en el desempeño relacionado con ciertas pruebas comportamentales y en algunas medidas fisiológicas. Por ejemplo, Eklund y Arborelius (2006) encontraron que las hembras se muestran me-

nos vulnerables en pruebas comportamentales de miedo innato o aprendido en comparación con los machos. Asimismo, Camp, Robinson y Becker (1984) y Palanza et al. (2001) describen que las hembras presentan niveles incrementados de exploración y locomoción en comparación con los machos cuando no han sido sometidos a tratamiento alguno, poniendo de relieve diferencias de sexo que incluyen comportamientos que parecen estar especificados de forma natural más que alterados por manipulaciones en situaciones de laboratorio.

Es interesante notar que las hembras separadas presentaron consistentemente más entradas en el brazo abierto y mayor tiempo de permanencia en el mismo con respecto a las hembras control, mas no comparadas con los machos, lo cual no difiere de lo encontrado en otros experimentos en los que se emplean animales no sometidos a separación. ¿Podría pensarse en un mecanismo compensatorio de la madre hacia sus crías, en el que ésta presenta cuidado incrementado hacia las mismas al término de los periodos de separación? Al respecto, un estudio realizado por Zimmerberg y colaboradores, muestra que las madres de camadas en las que una parte de las crías permaneció con ella ininterrumpidamente y la otra parte fue sometida a periodos de separación, tienden a responder preferencialmente a los llamados de las crías que fueron separadas de ellas aún cuando se presenta al mismo tiempo un llamado de una de las crías no separadas (Zimmerberg et al., 2003). Por otro lado, Caldji, Diorio y Meaney (2003), muestran que las camadas provenientes de ratas con elevados índices de cuidado maternal presentan niveles aumentados de receptores GABAA y presentan menos comportamientos de miedo en comparación con animales con madres con niveles menos intensos de comportamiento maternal. Es posible pensar que la madre tiende a “compensar” el cuidado maternal del que se ha privado a su cría durante el período de separación y que sea esto lo que constituya un

factor protector en términos de la respuesta al estrés. Roman, Gustafsson, Berg y Nylander (2006) mostraron que en pruebas en las que se combinan dos tipos de miedo (innato y aprendido) y motricidad, las hembras presentan un perfil ansiogénico con relación a los machos. Sin embargo, los mismos autores describen que las hembras obtienen perfiles comportamentales menos asociados a ansiedad en pruebas comportamentales de exploración, pues al parecer, las hembras tienen una tendencia natural a explorar y a moverse con mayor libertad en espacios nuevos con relación a los machos.

Para las ratas, los espacios abiertos (al igual que los novedosos) resultan aversivos, pero aparentemente, este tipo de espacios resulta más aversivo para los machos que para las hembras; la hipótesis de que los machos son más sensibles al riesgo que las hembras no es nueva: Lehmann y colaboradores encontraron que en paradigmas de miedo innato y aprendido los machos eran más susceptibles al miedo que las hembras (Lehmann et al., 1999). Según estos autores los machos (incluso en condiciones de no manipulación) tienden a presentar más respuestas de miedo que las hembras; se pensaría que esta condición natural puede hacerlos más vulnerables ante los cambios en el ambiente temprano, tales como la separación maternal. En contraste, las hembras presentan un comportamiento más propenso a la exploración, presentando menos indicadores de miedo (p.ej., congelamientos o *freezing*); la “mejora” encontrada por estos autores se presenta en el desempeño de las hembras y se describe en términos de mayor actividad y exploración en distintas pruebas y protocolos de separación. Se encuentran de nuevo reportes de diferencias naturales entre machos y hembras. En nuestro experimento, sin embargo, no hay diferencias significativas entre el grupo de hembras control y el grupo de machos control en el porcentaje de exploración ni en el de locomoción general, lo cual no es consistente con lo propuesto con Lehmann y

colaboradores, (Lehmann et al., 1999), ya que se esperaría que estas medidas fueran diferentes; asumiendo como los autores, que las hembras presentan naturalmente más tendencia a la exploración, puede pensarse que esta ausencia de diferencia se debió a efectos de la manipulación y no a la ausencia de diferencias de sexo o a posibles interacciones no evaluadas en este trabajo, entre separación y género.

En términos de lo anterior, puede resultar importante definir cómo el manejo de los grupos afecta el posterior desempeño de los animales. En nuestro protocolo, el grupo control no permaneció todo el tiempo con la madre sino que fue sometido a manipulación breve, un procedimiento que consiste en remover a la madre de la caja de hábitat y tomar una a una cada cría, tocándola y estimulándola por aproximadamente 1 minuto. Se realizó esta manipulación porque en un ambiente normal la madre no permanece todo el tiempo con sus crías, sino que eventualmente abandona el nido por períodos cortos; adicionalmente, es importante habituar a los animales a la manipulación para que en el momento de los experimentos el contacto con el experimentador no resulte estresante por su novedad.

Camp et al. (1984) afirman que las manipulaciones tempranas alteran química y simetría cerebral, presentando repercusiones a nivel conductual que son evidentes en el desarrollo posterior. Actualmente estamos examinando si nuestros animales presentaron cambios en términos de desarrollo cerebral, particularmente en la expresión de receptores GABA y cambios a nivel neuromorfológico, para determinar si las diferencias observadas entre los grupos de hembras control y separado están asociados a cambios estructurales en el cerebro de nuestros sujetos y asimismo ver si las diferencias que no se descubrieron entre los machos son cambios tan discretos a nivel cerebral que no tienen un correlato comportamental visible.

La evaluación del comportamiento de agacharse, que es considerado un indicador de eva-

luación del riesgo en ratas (Anseloni & Brandao, 1997; Cruz et al., 1994; Lamprea et al., 2000), mostró diferencias significativas entre las hembras del grupo control y separado, pero no entre machos. Finalmente, al analizar otros comportamientos tales como levantarse en dos patas, acicalarse y estirarse no encontramos diferencias significativas entre los grupos, lo que nos permite sugerir que los cambios comportamentales no son generalizados a todo el comportamiento, sino que pueden darse sólo en ciertos casos o para ciertas medidas.

Al evaluar los resultados es posible decir que este estudio muestra que tras la separación temprana las hembras presentan comportamientos asociados a un perfil ansiolítico; sin embargo, vale la pena resaltar cuál es el valor del comportamiento asociado a ansiedad en el medio natural, si el cambio observado resulta útil para los sujetos en términos comportamentales o si por el contrario resulta en un riesgo para la especie en la medida que aumenta la posibilidad de ser predado o sufrir daño significativo. La respuesta al estrés es útil en la medida que provee estrategias apropiadas para responder a un entorno hostil. ¿Hasta qué punto la separación temprana afecta el “correcto” desarrollo del comportamiento en un individuo? ¿Hasta qué punto se puede determinar qué es el “correcto” desarrollo en un individuo animal? ¿Qué tan posible es una extrapolación de este tipo de comportamientos a un organismo humano? La respuesta a todas las preguntas anteriores se relaciona con lo que se busca determinar con el estudio: se busca determinar si la separación temprana altera el desarrollo normal haciendo que animales “normales” presenten trastornos del comportamiento “asociados a ansiedad”, los cuales alteran de manera excesiva la vida de los individuos, resultados como los nuestros en los cuales la separación aumenta en las hembras la “toma de riesgos” (entradas al brazo abierto), pueden sugerir que la separación es un modelo en el que se disminuye la respuesta ansiosa de los animales y por consiguiente “mejora” su de-

sarrollo. Sin embargo, el correcto desarrollo de un individuo posiblemente no está determinado por el investigador, sino por el repertorio conductual del individuo en condiciones naturales.

De la misma manera, hay que tener en cuenta que el nivel de extrapolación depende del interés de la investigación, ya que, no es lo mismo tratar de determinar cuál es la alteración comportamental producida por estresores naturales, en comparación con estresores de laboratorio que aunque generan la respuesta al estrés posiblemente no presentan el mismo valor adaptativo en términos comportamentales. Igualmente, no es lo mismo evaluar el comportamiento de tipo ansioso en una rata enfrentada a un laberinto, a intentar determinar que eso es lo que ocurre en un organismo humano cuando presenta temor al contacto social. Los mecanismos biológicos funcionan de una manera similar, pero las respuestas y el entorno no lo son.

Por otro lado, es pertinente mencionar que Kosten et al, (2007) afirman que uno de los factores que puede influir sobre los efectos de la separación es la cepa de la que provienen los individuos, esto explicaría las múltiples variaciones de los resultados encontradas en diversos laboratorios. Al sumar todos estos factores de variación, puede verse cuán importante es la descripción y la determinación de un protocolo experimental apropiado que contemple este tipo de modificaciones y además describa claramente la forma en la que se propuso y se desarrolló el estudio, de modo que al replicarlo y analizarlo, se pueda llegar a conclusiones válidas a través de su realización.

En general, este trabajo plantea múltiples interrogantes sobre el estudio del comportamiento ansioso, sobre todo en términos de las diferencias en la respuesta al estrés tanto de machos como de hembras; adicionalmente plantea la necesidad de estudiar la separación y sus efectos sobre el desarrollo, ya que vale la pena notar que lo interesante de estudiar efectos de tratamientos de estrés crónico tales como la

separación, se encuentra justamente en la posibilidad de que el repertorio comportamental natural sea alterado en períodos tempranos del desarrollo, a través de manipulaciones de la interacción madre-cría, pues este tipo de relación resulta crucial para los sujetos. Esto permite pensar que el resultado de tales cambios en el ambiente temprano genera alteraciones notorias y duraderas en la edad adulta, tales como la respuesta de tipo ansioso.

NOTA:

Los resultados aquí mostrados fueron presentados como poster en el *Annual Meeting of Neurosciences* que se llevó a cabo en San Diego C.A., USA. Del 3-7 de noviembre de 2007.

REFERENCIAS

- Aisa, B., Tordera, R., Lasheras, B., Del Rio, J. & Ramírez, M. J. (2007). Cognitive impairment associated to HPA axis hyperactivity after maternal separation in rats. *Psychoneuroendocrinology*, 32(3), 256-266.
- Andersen, S. L., Lyss, P. J., Dumont, N. L. & Teicher, M. H. (1999). Enduring neurochemical effects of early maternal separation on limbic structures. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 877, 756-759.
- Anseloni, V. Z. & Brandao, M. L. (1997). Ethopharmacological analysis of behaviour of rats using variations of the elevated plus-maze. *Behavioral Pharmacology*, 8(6-7), 533-540.
- Caldji, C., Diorio, J. & Meaney, M. J. (2003). Variations in maternal care alter GABA(A) receptor subunit expression in brain regions associated with fear. *Neuropsychopharmacology*, 28(11), 1950-1959.
- Camp, D. M., Robinson, T. E. & Becker, J. B. (1984). Sex differences in the effects of early experience on the development of behavioral and brain asymmetries in rats. *Physiology and Behavior*, 33(3), 433-439.
- Cirulli, F., Micera, A., Alleva, E. & Aloe, L. (1998). Early maternal separation increases NGF expression in the developing rat hippocampus. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 59(4), 853-858.
- Cruz, A. P., Frei, F. & Graeff, F. G. (1994). Ethopharmacological analysis of rat behavior on the elevated plus-maze. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 49(1), 171-176.
- Davidson, R. J., Putnam, K. M. & Larson, C. L. (2000). Dysfunction in the neural circuitry of emotion regulation—a possible prelude to violence. *Science*, 289(5479), 591-594.
- Dickinson, A. L., Leach, M. C. & Flecknell, P. A. (2009). Influence of early neonatal experience on nociceptive responses and analgesic effects in rats. *Laboratory Animals*, 43(1), 11-16.
- Eklund, M. B. & Arborelius, L. (2006). Twice daily long maternal separations in Wistar rats decreases anxiety-like behaviour in females but does not affect males. *Behavioural Brain Research*, 172(2), 278-285.
- Estanislau, C. & Morato, S. (2005). Prenatal stress produces more behavioral alterations than maternal separation in the elevated plus-maze and in the elevated T-maze. *Behavioural Brain Research*, 163(1), 70-77.
- Foscolo, D. R., Foscolo, R. B., Marubayashi, U., Reis, A. M. & Coimbra, C. C. (2008). Neonatal maternal separation affects endocrine and metabolic stress responses to ether exposure but not to restraint exposure in adult rats. *Metabolic Brain Disease*, 23(4), 375-385.
- Giedd, J. N., Blumenthal, J., Jeffries, N. O., Castellanos, F. X., Liu, H., Zijdenbos, A., et al. (1999). Brain development during childhood and adolescence: a longitudinal MRI study. *Nature Neuroscience*, 2(10), 861-863.
- Greisen, M. H., Bolwig, T. G., Husum, H., Nedergaard, P. & Wörtwein, G. (2005). Maternal separation affects male rat copulatory behaviour and hypothalamic corticotropin releasing factor in concert. *Behavioural Brain Research*, 158(2), 367-375.
- Hall, F. S. (1998). Social deprivation of neonatal, adolescent, and adult rats has distinct neurochemical and behavioral consequences. *Critical Reviews in Neurobiology*, 12(1-2), 129-162.
- Heim, C. & Nemeroff, C. B. (2001). The role of childhood trauma in the neurobiology of mood and anxiety disorders: preclinical and clinical studies. *Biological Psychiatry*, 49(12), 1023-1039.
- Jimenez-Vasquez, P. A., Mathe, A. A., Thomas, J. D., Riley, E. P. & Ehlers, C. L. (2001). Early maternal separation alters neuropeptide Y concentrations in selected brain regions in adult rats. *Brain research. Developmental Brain research*, 131(1-2), 149-152.
- Joels, M. & de Kloet, E. R. (1994). Mineralocorticoid and glucocorticoid receptors in the brain. Implications for ion permeability and transmitter systems. *Progress in Neurobiology*, 43(1), 1-36.
- Kaplan, H. I. & Sadock, B. J. (1991). *Synopsis of psychiatry: behavioral sciences/clinical psychiatry* (6 ed.). Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins.
- Kikusui, T., Nakamura, K., Kakuma, Y. & Mori, Y. (2006). Early weaning augments neuroendocrine stress responses in mice. *Behavioural Brain Research*, 175(1), 96-103.
- Kosten, T. A., Lee, H. J. & Kim, J. J. (2007). Neonatal handling alters learning in adult male and female rats in a task-specific manner. *Brain Research*, 1154, 144-153.
- Ladd, C. O., Owens, M. J. & Nemeroff, C. B. (1996). Persistent changes in corticotropin-releasing factor neuronal systems induced by maternal deprivation. *Endocrinology*, 137(4), 1212-1218.
- Lamprea, M. R., Cardenas, F. P., Silveira, R., Morato, S. & Walsh, T. J. (2000). Dissociation of memory and anxiety in a repeated elevated plus maze paradigm: forebrain cholinergic mechanisms. *Behavioural Brain Research*, 117(1-2), 97-105.
- LeDoux, J. E. (1995). Emotion: clues from the brain. *Annual Review of Psychology*, 46, 209-235.

- Lehmann, J., Pryce, C. R., Bettschen, D. & Feldon, J. (1999). The maternal separation paradigm and adult emotionality and cognition in male and female Wistar rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 64(4), 705-715.
- Lehmann, J., Pryce, C. R. & Feldon, J. (2000). Lack of effect of an early stressful life event on sensorimotor gating in adult rats. *Schizophrenia research*, 41(2), 365-371.
- Lister, R. G. (1990). Ethologically-based animal models of anxiety disorders. *Pharmacology and therapeutics*, 46(3), 321-340.
- Lorberbaum, J. P., Newman, J. D., Dubno, J. R., Horwitz, A. R., Nahas, Z., Teneback, C. C., et al. (1999). Feasibility of using fMRI to study mothers responding to infant cries. *Depression and Anxiety*, 10(3), 99-104.
- Macri, S., Mason, G. J. & Wurbel, H. (2004). Dissociation in the effects of neonatal maternal separations on maternal care and the offspring's HPA and fear responses in rats. *European Journal of Neuroscience*, 20(4), 1017-1024.
- Madrugá, C., Xavier, L. L., Achaval, M., Sanvitto, G. L. & Lucion, A. B. (2006). Early handling, but not maternal separation, decreases emotional responses in two paradigms of fear without changes in mesolimbic dopamine. *Behavioural Brain Research*, 166(2), 241-246.
- Munn, N. L. (1950). *Handbook of psychological research on the rat; an introduction to animal psychology*. Boston: Houghton Mifflin Company.
- Palanza, P., Gioiosa, L. & Parmigiani, S. (2001). Social stress in mice: gender differences and effects of estrous cycle and social dominance. *Physiology and Behavior*, 73(3), 411-420.
- Pascual, R. & Zamora-Leon, S. P. (2007). Effects of neonatal maternal deprivation and postweaning environmental complexity on dendritic morphology of prefrontal pyramidal neurons in the rat. *Acta Neurobiologiae Experimentalis*, 67(4), 471-479.
- Ploj, K., Roman, E. & Nylander, I. (2003). Long-term effects of short and long periods of maternal separation on brain opioid peptide levels in male Wistar rats. *Neuropeptides*, 37(3), 149-156.
- Poehlmann, J. & Fiese, B. H. (2001). The interaction of maternal and infant vulnerabilities on developing attachment relationships. *Development and Psychopathology*, 13(1), 1-11.
- Rhees, R. W., Lephart, E. D. & Eliason, D. (2001). Effects of maternal separation during early postnatal development on male sexual behavior and female reproductive function. *Behavioural Brain Research*, 123(1), 1-10.
- Roman, E., Gustafsson, L., Berg, M. & Nylander, I. (2006). Behavioral profiles and stress-induced corticosteroid secretion in male Wistar rats subjected to short and prolonged periods of maternal separation. *Hormones and Behavior*, 50(5), 736-747.
- Salzberg, M., Kumar, G., Supit, L., Jones, N. C., Morris, M. J., Rees, S., et al. (2007). Early postnatal stress confers enduring vulnerability to limbic epileptogenesis. *Epilepsia*, 48(11), 2079-2085.
- Stewart, C. A., Petrie, R. X., Balfour, D. J., Matthews, K. & Reid, I. C. (2004). Enhanced evoked responses after early adversity and repeated platform exposure: the neurobiology of vulnerability? *Biological psychiatry*, 55(8), 868-870.
- Troakes, C. & Ingram, C. D. (2008). Anxiety behaviour of the male rat on the elevated plus maze: associated regional increase in c-fos mRNA expression and modulation by early maternal separation. *Stress*, 1.
- Zimmerberg, B., Kim, J. H., Davidson, A. N. & Rosenthal, A. J. (2003). Early deprivation alters the vocalization behavior of neonates directing maternal attention in a rat model of child neglect. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1008, 308-313.

Fecha de envío: 19 de abril de 2009

Fecha de aceptación: 7 de mayo de 2009