

Análisis comportamental de ratas expuestas al laberinto en cruz elevado bajo dos horarios de alimentación

Carlos Conde¹, Javier Nieto², Luis Carlos Orozco³

RESUMEN

Introducción: Considerando que el laberinto en cruz elevado (LCE) para roedores es en la actualidad el modelo de ansiedad más ampliamente utilizado en el mundo entero y que el comportamiento de la rata en este modelo es altamente vulnerable a múltiples variables, el presente trabajo estudió los efectos de dos esquemas de alimentación sobre el comportamiento de ratas machos y hembras, estimando la capacidad de discriminación de variables y posibles variables de confusión. **Materiales y métodos:** Se evaluaron 31 animales de ambos géneros y de la misma edad. Desde el día 21 post-natal, un grupo de cada género recibió alimento cotidiano por la mañana y otro grupo durante la tarde. Los animales fueron expuestos individualmente al LCE durante 5 minutos entre las 8 y las 12 de la mañana. Las sesiones fueron filmadas y procesadas con ayuda de un software diseñado para ese fin. **Resultados:** Se encontró que los animales alimentados en el mismo horario de los experimentos, presentaron mayor actividad exploratoria asociada a los brazos cerrados y al centro del LCE. El tiempo de permanencia en estos lugares podrían ser las variables de mejor sensibilidad y especificidad para reconocer tales efectos. No se descartó el efecto sobre los tiempos de permanencia en los brazos abiertos. **Conclusiones y recomendaciones:** El horario de alimentación influye de manera significativa sobre el comportamiento de las ratas en el LCE, por tal motivo se recomienda considerar estos aspectos en los experimentos dirigidos al estudio de la ansiedad. *Salud UIS 2008; 40: 83-91*

Palabras clave: Laberinto en cruz elevado, ansiedad, modelos, esquemas de alimentación

ABSTRACT

Introduction: Considering that the elevated plus maze (EPM) for rodents is, actually, the anxiety model more used in the world, and that, the rat behavior in this model is much vulnerable to multiple variables, the current work studied the behavioral effects of two feeding schedules on rat behavior (males and females), evaluating the variables discrimination capacity and possible confusion variables. **Materials and methods:** Were evaluated 31 animals of both genders and the same age. Since 21 post-natal day, one group per gender received food during the morning and another group, during the afternoon. The animals were individually exposed to the EPM during 5 minutes between 8 and 12 in the morning. The sessions, were filmed and processed using software designed for that objective. **Results:** It was found that the animals feeding in the same schedule of the experiments, presented higher exploratory activity associated to the enclosed arms and to the center of the EPM. The time spent on this places, would be the variables with the best sensitivity and specificity to recognize these effects. It does not discard the effect on the permanence time in the open arms. **Conclusions and recommendations:** The feeding schedule, influence significantly the rat behavior in the EPM, for that reason, it is recommended to consider this aspect in the experiments for anxiety studies. *Salud UIS 2008; 40: 83-91*

Key words: Elevated plus maze, anxiety, models, feeding schedules

-
1. Grupo de Neurociencias y Comportamiento, Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga Colombia.
 2. Grupo de Investigación en Ciencias Animales, Universidad Cooperativa de Colombia, Bucaramanga, Colombia.
 3. Escuela de Enfermería, Centro de Investigaciones Epidemiológicas, Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, Colombia.

Correspondencia: Carlos Conde. Laboratorio de neurociencias, Facultad de Salud, UIS. E-mail: cconde@uis.edu.co

Recibido: Junio 9 de 2008 – **Aceptado:** Agosto 14 de 2008

INTRODUCCIÓN

Desde 1957, Montgomery *et al.*^{1,2} introdujeron el concepto de “conflicto de aproximación-evitación” en ratas expuestas a ambientes donde existiera lugares con diferentes tipos de protección espacial. En los años 60s, Handley y Mithany (3) implementaron una modificación de los protocolos previos y dieron inicio al modelo del llamado “laberinto en cruz elevado” (LCE). Este modelo, hoy considerado como una aproximación eto-experimental⁴ para el estudio de la ansiedad generalizada^{5,6,7}, es quizás el más ampliamente utilizado como bioensayo en la caracterización de fármacos con potencial efecto de tipo ansiolítico o en estudios que buscan aportar a la comprensión de los procesos neurobiológicos asociados a la ansiedad generalizada (para revisión ver referencia 8).

En este laberinto, generalmente se puede verificar que los animales realizan más entradas y permanecen más tiempo en los llamados brazos cerrados (BC) que en los llamados brazos abiertos (BA)^{6,9}. Estas manifestaciones hacen parte de rasgos comportamentales de las ratas, muy probablemente preservados filogenéticamente^{4,5}. La “evitación” de los lugares abiertos, se ha interpretado como una evitación de peligros potenciales frente a predadores^{4,5}. En ese contexto, se ha observado que incrementos relativos de las entradas y los tiempos de permanencia en los BA ocurren cuando los animales están bajo los efectos de fármacos ansiolíticos clásicos como las benzodiazepinas y no bajo los efectos de otros fármacos. Al mismo tiempo, fármacos que pueden incrementar el estado de ansiedad como el pentilentetrazol, disminuyen la exploración de los BA^{7,9,10,11,12}.

Por otra parte, cuando los animales son confinados a los BA o a los BC, incrementan los niveles de corticosterona comparados con los que no han sido confinados, lo cual ha sido interpretado como respuesta de estrés ante el ambiente novedoso. Sin embargo, en el caso anterior, los animales confinados a los BA presentan niveles de corticosterona superiores a los confinados a los BC, sugiriendo que estos lugares inducirían una mayor respuesta fisiológica de estrés¹³.

Con base en estos resultados, una buena proporción de trabajos publicados con el LCE en los que se busca evaluar efectos de tipo ansiolítico o ansiogénico, utilizan como variables de salida el número de entradas (absolutas y/o porcentuales) y los tiempos de permanencia en los BA, las cuales, al ser comparadas con un grupo control sugerirían efectos o estados de tipo ansiolítico cuando

el grupo experimental presenta mayores valores que el control, y efectos o estados ansiogénicos cuando se presenta lo contrario^{6,7,8,9,10,11,12,13}. Muy pocos autores reportan los resultados comportamentales asociados al centro del laberinto, lo que podría explicarse por la falta de sensibilidad de estas variables frente a los efectos de tipo ansiolítico. El total de entradas a los brazos cerrados, a través de análisis de factores, ha sido interpretado como un indicador de actividad locomotora^{7,14}.

Las revisiones de los experimentos con este modelo, destacan el hecho de que son múltiples los factores que pueden influenciar la actividad exploratoria de las ratas en tal laberinto, algunas como: el género, el peso/edad de los animales, el nivel de iluminación, los esquemas de manipulación, la experiencia previa, entre otros, son varios de estos factores^{15,16,17,18,19,20,21}. En ese sentido, los experimentos que buscan evaluar los efectos de tipo ansiolítico deben tomar en consideración estos aspectos con el fin de evitar la influencia de las posibles variables de confusión o ponderar a través de modelos apropiados, la influencia de tales aspectos sobre las variables de salida registradas.

Tomando en consideración los aspectos antes anotados y considerando que una de las “motivaciones” exploratorias en estos animales podría relacionarse con la búsqueda de alimento o los patrones de alimentación implementados en los bioterios, el presente trabajo se propuso: 1) Evaluar los efectos de dos patrones de alimentación controlados en horario y cantidad sobre el comportamiento exploratorio de ratas hembras y machos en el LCE. 2) Evaluar la sensibilidad y especificidad de las variables “convencionales” frente a las condiciones experimentales de horario de alimentación y género. 3) Evaluar las posibles variables de confusión involucradas en el análisis comportamental realizado.

MATERIALES Y MÉTODOS

Consideraciones éticas: El presente experimento se enmarca en el proyecto identificado con código 5629 de la Vicerrectoría de Investigaciones de la Universidad Industrial de Santander que incluye en su protocolo, la aprobación del manejo de animales según las normas legales vigentes.

Animales

Inicialmente fueron obtenidos 32 animales de experimentación con una edad de 5 semanas post-destete, provenientes del bioterio de la Facultad de Salud de la Universidad Industrial de Santander, de los cuales,

un animal fue descartado por defectos en los registros de filmación de su experimento. Finalmente, los animales incluidos en este trabajo se distribuyeron como lo indica la Tabla 1.

Tabla 1. Distribución del número de animales por grupos experimentales. H: Hembras. M: Machos. AT Suministro de alimento a las 17 horas. AM: Suministro de alimento a las 8 horas.

TTO/GENERO	H	M	TOTAL
AT	8	7	15
AM	8	8	16
TOTAL	16	15	31

Los animales fueron mantenidos bajo ciclos de luz/oscuridad controlada (12 horas c/u, luz encendida a las 7 a.m. y apagada a las 7 p.m.) y en todos los casos se suministraron 15 gramos de alimento/rata. Los animales estuvieron alojados en grupos de 8 por jaula.

Laberinto

Es un dispositivo construido en fórmica con 4 brazos elevados 50 cms sobre el piso, de los cuales, dos de ellos tienen paredes laterales de 40 centímetros de altura (Brazos cerrados, BC) y dos de ellos tienen un borde de acrílico de 2 cms. de altura (Brazos abiertos, BA). Los BA y BC se cruzan en el centro dándole una forma de cruz al laberinto. Este dispositivo estuvo ubicado en una sala de experimentación con un nivel de iluminación de 274 lux en el centro del laberinto. El laberinto está bajo el área de captación de una cámara acoplada a un circuito cerrado de televisión cuya imagen fue monitoreada en un televisor y gravada en un sistema de VHS para posterior registro y análisis de cada experimento.

Procedimientos

Los animales fueron manipulados únicamente de acuerdo a los protocolos de evaluación de peso semanal y limpieza de su jaula vivero. Al comienzo de una sesión experimental, cada rata fue colocada en el centro del laberinto con la cabeza orientada hacia uno de los brazos cerrados, permitiendo su exploración libre durante 5 minutos. Todos los experimentos fueron realizados entre las 9 y las 12 a.m. y al momento de las sesiones en el laberinto, ningún animal había recibido alimento desde el día anterior. Posteriormente, sobre las películas de filmación de cada experimento, se realizaron los registros y parte de los análisis comportamentales utilizando un software (PROSTCOM²²) diseñado para tal fin. Adicionalmente, se utilizaron los recursos de

planillas de Excel (Microsoft) y el Stata 10.0 para los análisis estadísticos.

Variables y análisis estadístico

Se realizó un abordaje comportamental asociado a lugares de ubicación de los animales de lo cuál se exploraron las variables “convencionales” como: Número de entradas a los brazos abiertos (EBA), a los brazos cerrados (EBC) y en el centro (EC), en valores absolutos y porcentuales; tiempo en los brazos abiertos (TBA), en los brazos cerrados (TBC) y centro (TC), cruzamientos (CRUZ) y distancia deambulada (Distancia).

Para comparar las entradas y los tiempos de los brazos abiertos con los correspondientes de los brazos cerrados se realizaron pruebas t pareadas. Con el fin de evaluar la capacidad de discriminación de las variables se realizó un análisis del área bajo la curva ROC (*Receiver Operator Characteristic Curve Data*)^{23,24}, posteriormente, se realizaron ANOVAS de dos factores (Horario de alimentación y Género) seguidos de pruebas de Bonferroni (*post hoc*) sobre cada variable. Finalmente, se realizaron regresiones múltiples con el fin de evaluar las posibles variables de confusión. El nivel de significancia fijado para las pruebas estadísticas utilizadas fue de 0,05. Se utilizaron los recursos de planillas de Excel (Microsoft) y el Stata 10.0²⁴ para los análisis estadísticos.

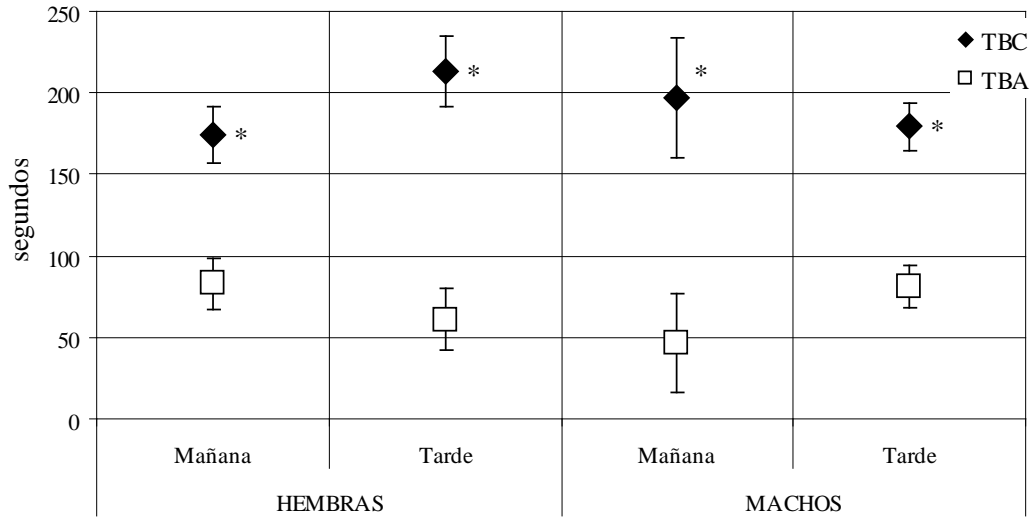
RESULTADOS

El primer abordaje pretendió verificar si la preferencia por los brazos cerrados, dado por las entradas y los tiempos de permanencia en este lugar, fueron significativamente mayores que los correspondientes en los brazos abiertos.

Un análisis con la prueba *t* pareada comparando las entradas a los BA con las entradas a BC, solamente evidenció diferencias significativas (EBC>EBA) para el grupo de los machos alimentados en la mañana ($t=4.65$, $p=0,002$). En contraste, el mismo tipo de análisis para la comparación de los tiempos de permanencia en los BA con el correspondiente en los BC sí mostró diferencias en todos los grupos, donde el TBC fue mayor que el TBA. (Figura 1).

Como una primera aproximación al análisis de datos, buscando ponderar la capacidad de discriminación de las variables analizadas se realizaron análisis ROC. La siguiente tabla presenta los resultados de aquellas variables cuyo valor de ROC fue superior a 0,7. El análisis aplicado a las ratas machos mostró que el

Comparación de los tiempos de permanencia en los brazos del laberinto



Comparación de entradas a los brazos del laberinto

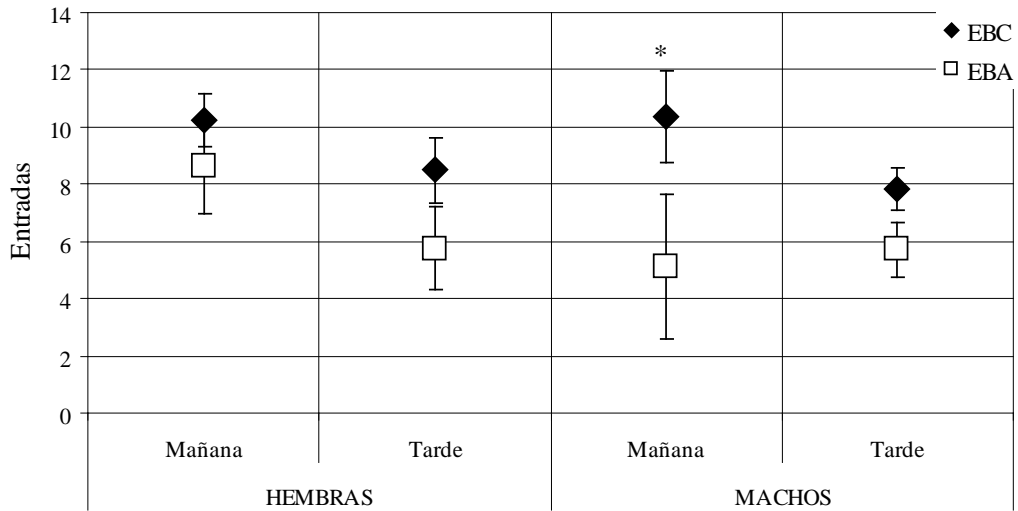


Figura 1. Promedios ± EEM de los tiempos (figura superior) y las entradas (figura inferior) a los brazos abiertos y cerrados. * Diferencias entre brazos abiertos y cerrados del mismo grupo (t pareada, $p < 0,05$).

peso de los animales, el TC, el TBA y las EBA fueron variables que podrían discriminar razonablemente bien los animales por el horario de alimentación. De manera semejante, dentro de las hembras, las variables: Distancia, TBC y TC, también discriminarían los

animales según el horario de alimentación. Cuando se incluyeron todos los animales en el análisis (Hembras y machos), las variables EBC y TC, podrían discriminar los dos grupos antes anotados (Tabla 2).

Tabla 2. Resultados del análisis ROC: La tabla presenta los valores de los índices ROC, los mejores valores de corte para cada variable de acuerdo al mayor número de animales bien clasificados por el valor descrito. Se incluyen los valores de sensibilidad (S), especificidad (E), Valores predictivos positivos (VPP) y negativos (VPN), el porcentaje de animales bien clasificados y el tamaño de la muestra para cada análisis.

GRUPO	VARIABLE	ROC	Según el mayor número de casos bien clasificados										n DATOS	
			VC.Menor	S	E	VPP	VPN	VC.Mayor	S	E	VPP	VPN		% Bien clasif
MACHOS	PESO S5	0,76	233,00	0,88	0,57	0,70	0,80	240,00	0,63	0,86	0,83	0,67	73,33	15
	TC	0,77	36,01	1,00	0,57	0,73	1,00	36,01	1,00	0,57	0,73	1,00	80,00	15
	TBA	0,79	97,23	0,57	1,00	1,00	0,73	97,23	0,57	1,00	1,00	0,73	80,00	15
	EBC	0,87	10,00	0,75	0,86	0,86	0,75	10,00	0,75	0,86	0,86	0,75	80,00	15
HEMBRAS	Distancia	0,73	11,00	1,00	0,38	0,62	1,00	23,00	0,38	1,00	1,00	0,62	68,75	16
	TBC	0,73	199,71	0,75	0,75	0,75	0,75	246,20	0,50	1,00	1,00	0,67	75,00	16
	TC	0,83	31,30	1,00	0,63	0,73	1,00	31,30	1,00	0,63	0,73	1,00	81,25	16
TODOS	EBC	0,74	10,00	0,63	0,80	0,77	0,67	10,00	0,63	0,80	0,77	0,67	70,97	31
	TC	0,80	34,55	0,94	0,60	0,71	0,90	34,80	0,88	0,67	0,74	0,83	77,42	31

Evaluación a Partir de Variables y Abordajes “Convencionales”

El abordaje “convencional” se refiere al tipo de análisis usualmente utilizado en quizás la mayoría de artículos relacionados, donde utilizan pruebas como ANOVA de uno o de dos factores y comparaciones múltiples repetidas.

Con la intención de evaluar la influencia del horario de alimentación y el género de los animales, se realizaron ANOVAS de dos factores (Horario y género) sobre los valores de cada una de las variables. Los resultados reportados en la Tabla 3, muestran cómo las variables EBC, TC, CRUZ y Distancia, son significativamente diferentes para el horario de suministro de alimento, siendo que los animales que recibieron alimento en la mañana, presentaron mayores valores de estas variables

que los alimentados por la tarde. Adicionalmente, la variable TC también mostró diferencias atribuibles a género, donde los machos permanecieron más tiempo en el centro que las hembras. No se encontraron interacciones significativas entre los dos factores para ninguna de las variables analizadas, probablemente por el bajo poder de la prueba dado por un pequeño tamaño de muestra. Los pesos de las ratas hembras, fueron significativamente menores que los de los machos.

Tomando en consideración que los resultados anteriores muestran que diferentes variables apuntan a diferencias asociadas al horario de alimentación y al género de las ratas, se procedió a estimar en qué medida las variables están relacionadas y posteriormente, ponderar cuantitativamente, en qué medida algunas de las variables influyen en los resultados de las otras y por tanto en qué

Tabla 3. Valores significancia estadística ante un ANOVA de dos factores (Hora de alimento y Género) sobre las variables “convencionales”. EBA: Entradas a los brazos abiertos. TBA: Tiempo en los brazos abiertos. TBC: Tiempo en los brazos cerrados. EBC: Entradas en los brazos cerrados. EC: Entradas en el centro. TC: Tiempo en el centro. CRUZ: Número de cruzamientos (EBA+EBC). Distancia: Distancia recorrida por los animales. M: Alimento en horario de la mañana. T: Alimento en horario de la tarde. Ma: Ratas machos. H: Ratas hembras.

Anova dos factores (Horario de alimento y Género)										
FACTORES / VARIABLES	PESO S5	EBC	EBA	%EBA	TBC	TBA	TC	Distancia	CRUZ	
Horario de Alimentación	0,056	0,022*	0,384	0,86	0,544	0,693	0,002*	0,039*	0,256	
Género	<0,001*	0,77	0,182	0,339	0,745	0,586	0,007*	0,200	0,206	
Interacciones	0,634	0,665	0,191	0,14	0,111	0,075	0,969	0,398	0,272	
Bonferroni	Ma>H	M>T					M>T Ma>H	M>T		

medida, algunas de ellas podrían constituirse en variables de confusión para las conclusiones relacionadas con género y horario de alimentación. Para esto se procedió a la construcción de modelos mediante regresiones múltiples una vez que se verificó la distribución normal de las variables.

Correlaciones y Regresiones

Inicialmente, se realizó un análisis de correlación entre todas las variables estudiadas utilizando todos los animales del experimento. Este análisis pretendió

mostrar la evidencia de las correlaciones entre las variables lo cual justifica los análisis de las regresiones múltiples orientadas a estimar la magnitud real que tendrían las variables “Horario de alimentación y Género” sobre cada una de ellas una vez corregidas por la ponderación de la confusión. Los resultados se presentan en la Tabla 4.

La Tabla 5 incluye los resultados de la regresión múltiple utilizando como variables dos modelos de variables explicatorias y utilizando como variable dependiente, cada una de las allí informadas. Los resultados sobre las

Tabla 4. Matriz de correlación de las variables estudiadas. La tabla incluye los valores de significancia. Las áreas sombreadas indican las correlaciones significativas (p<0.05).

	H o r a alim	genero	P E S O S5	EBC	EBA	%EBA	TBC	TBA	TC	Distancia	CRUZ	ebc-eba
H o r a alim	1,00											
genero	-0,03	1,00										
PESO S5	-0,26	0,75	1,00									
EBC	-0,42	-0,03	0,04	1,00								
EBA	-0,16	-0,25	-0,18	0,18	1,00							
%EBA	0,03	-0,19	-0,15	-0,26	0,85	1,00						
TBC	0,12	-0,05	-0,04	-0,20	-0,88	-0,75	1,00					
TBA	0,06	-0,11	-0,14	0,08	0,90	0,83	-0,94	1,00				
TC	-0,51	0,44	0,48	0,37	0,20	0,03	-0,46	0,12	1,00			
Distancia	-0,37	-0,22	-0,10	0,68	0,82	0,49	-0,74	0,69	0,36	1,00		
CRUZ	-0,21	-0,23	-0,18	0,65	0,79	0,46	-0,73	0,72	0,23	0,92	1,00	
ebc-eba	-0,12	0,20	0,19	0,46	-0,79	-0,93	0,67	-0,76	0,05	-0,31	-0,30	1,00
tbc-tba	0,04	0,03	0,05	-0,14	-0,90	-0,80	0,99	-0,98	-0,30	-0,73	-0,74	0,72

otras variables comportamentales no mostraron ajustes significativos.

Estos resultados ilustran cómo las diferencias de peso podrían explicarse en un 59% debido a las interacciones entre Horario de alimentación y género. De manera semejante, el tiempo en el centro del laberinto podría explicarse en 40% por la interacción de las mismas variables explicatorias. A pesar de la baja proporción explicatoria sobre las variables “Distancia” y EBC, se puede apreciar que el coeficiente β para estas variables fue estadísticamente significativo. Basados en esto y considerando que el peso de los animales podría constituirse en una variable de confusión, se procedió a incluirla como variable explicatoria. Esta inclusión muestra cómo los coeficientes β asociados a género,

tienen incrementos mayores al 10%, criterio útil para tomar en consideración este nuevo modelo de regresión con 3 variables explicatorias para explicar los cambios en los comportamientos denominados “Distancia”, TC y EBC. Contrasta el hecho de que los coeficientes β asociados a la variable “horario de alimentación”, no presentan cambios mayores del 10% (4,21% para EBC y 4,6 para TC) al incluir el peso de los animales como variable explicatoria.

Por su parte, la inclusión de esta variable explicatoria (peso), modifica sensiblemente el r^2 ajustado de las variables EBC y “Distancia” aunque en valor crudo, los aportes a la explicación de la varianza no superan el 13% aunque sí modifica sensiblemente el β asociado a la variable género.

Tabla 5. Resultados de la regresión múltiple con las variables de salida evaluadas con las respectivas variables explicatorias. Se informa sobre la magnitud del cambio porcentual de los coeficientes β de manera que valores negativos implican disminuciones y valores positivos indican incrementos. * Nivel de significancia $p < 0,05$.

Variabes Explicatorias	β género	β alimento	R ²
		EBC	
Género y Alimentación	-0,25	-2,12*	0,12
Género y Alimentación y peso	0,034	-2,21	0,09
Magnitud y dirección porcentual del cambio	-23,6	4,07	
		TC	
Género y Alimentación	14,02*	-16,61*	0,4
Género y Alimentación y peso	11,63	-15,84*	0,38
Magnitud y dirección porcentual del cambio	-17,05	-4,64	5,00
		Distancia	
Género y Alimentación	-2,16	-3,54*	0,13
Género y Alimentación y peso	-1,66	-3,70*	0,10
Magnitud y dirección porcentual del cambio	-23,15	4,52	-23,08
		PESO	
Género y Alimentación	26,04*	-8,33	0,59
Género y Alimentación y peso			
Magnitud y dirección porcentual del cambio			

DISCUSIÓN

Tomando en consideración que el comportamiento en LCE es considerado un modelo etológicamente fundamentado^{5,6,7,8,9,10,12,14} y que tal fundamento se basa en la evitación de los “espacios abiertos” en contraste con la preferencia por los cerrados, la primera evaluación del actual experimento fue orientada hacia estos aspectos. Como se puede apreciar en los resultados, al igual que en otros artículos producto de investigaciones en otras partes del mundo, la “preferencia” por los lugares cerrados se aborda de manera quizás complementaria, mediante las variables, entradas y tiempos de permanencia en los brazos abiertos Vs cerrados. Es casi inevitable encontrar la pobre o ausente discusión acerca del significado de las entradas comparado con los tiempos de permanencia. En general, se suele encontrar una buena correlación positiva entre el número de entradas y los tiempos de permanencia asociados a un determinado ambiente^(11,19), sin embargo, esto no es matemáticamente obligatorio, en el sentido de que podría haber un incremento en el número de entradas a un lugar pero por tiempos muy cortos, mientras que pocas entradas podrían darse por períodos de estancia prolongados. Podría darse el caso de muchas entradas pero con corto tiempo de permanencia acumulado. Desde el punto de vista operacional, el análisis comportamental permite evidenciar que el entrar a un lugar implica la “toma de decisión” de ingresar a dicho lugar y esto podría ocurrir por múltiples motivaciones (búsqueda de objetos, exploración del

lugar, huida de otro lugar etc.)^{4,5,8,10}. La permanencia en el lugar evidencia el tiempo que el animal “decide” permanecer en él y esto también puede ocurrir por múltiples motivaciones (exploratorias, evitación de otro lugar, fatiga, etc.). En ese contexto, la decisión de entrar a un lugar o permanecer en el de origen, debería ser un reflejo del conflicto aproximación – evitación^{1,2}. El contraste entre estos parámetros asociados a los brazos abiertos o cerrados, deben necesariamente ser resultado del balance de todas las motivaciones implicadas en el animal durante su permanencia en el LCE. En consecuencia, lo único objetivo que debe afirmarse en relación a la comparación de las entradas a los BA y BC es que hubo o no hubo una mayor toma de decisiones de ingresar a alguno de los lugares.

En ese sentido, los resultados del actual experimento demuestran que el mayor número de entradas a los BC sobre los BA sólo se pudo evidenciar bajo dos condiciones: primero, cuando se contemplaron todos los animales del experimento (ANOVA de dos factores, efecto del factor horario de alimentación) y segundo, cuando se realizó análisis pareado en el grupo de machos alimentados en la mañana. Esto ya sugiere que esta variable sería poco sensible para discriminar posibles motivaciones atribuibles al ambiente del laberinto (se requieren tamaños de muestra grandes). Lo anterior resulta coherente con el hecho de que fue en los machos alimentados en la mañana donde a pesar de la posible motivación de la búsqueda del

alimento en horario experimental semejante al de la rutina de alimentación, los animales entraron menos veces a los BA que a los BC.

Se encuentran en la literatura varios trabajos previos que han sugerido que los cruzamientos y/o las entradas a los brazos cerrados pueden pesar, dentro de un análisis factorial, hacia un componente de tendencia exploratoria^{7,10}. Esto podría considerarse consistente con los hallazgos del presente trabajo en el sentido de que cuando se tomaron todos los animales en conjunto, el ANOVA de dos factores (horario de alimentación y género) sobre las variables EBC y distancia recorrida, se aprecia que los animales que recibieron alimentación en la mañana (horario en el que también fueron ejecutados los experimentos), presentaron mayores valores que los animales que recibieron alimentación a las 5 de la tarde. Consistente con estos resultados, el análisis ROC y a las regresiones múltiples que mostraron que las variables que mejor discriminarían entre los dos esquemas de alimentación estarían asociadas a las exploraciones de los brazos cerrados y al centro pero no a la exploración de los abiertos. Esto apunta a que la evaluación de la exploración a los brazos abiertos, resulta razonablemente sólida y “resistente” a perturbaciones como el horario de alimentación al que han sido sometidos los animales. Sin embargo, se recomienda realizar los análisis de manera cuidadosa por cuanto a pesar de no haber encontrado diferencias significativas relacionadas con las variables de los brazos abiertos, el TBA en el ANOVA de dos factores, mostró un nivel de significancia de 0.08 pero asociado a un bajo poder de prueba, probablemente por el bajo número de animales de la muestra. En ese mismo sentido y con la misma variable, el análisis ROC sí sugirió que podría ser una variable discriminadora de los dos esquemas de alimentación en los machos. Esto es, no se descarta la posibilidad de que un mayor tamaño de muestra en los machos, hubiera permitido encontrar diferencias significativas asociadas a esta variable. Por otro lado, los resultados de las regresiones múltiples no sólo permiten evidenciar el efecto de los horarios de alimentación sobre las variables TBC, TC y Distancia, sino que indicaron que el género está más asociado a la variable “Peso” puesto que no hubo correlación significativa con EBC y la correlación significativa con el TC, desaparece cuando se corrige por el peso de los animales. Después de “corregir” por la variable peso, es decir, al adicionar al horario de alimentación y al género este parámetro como variable explicatoria, aún persiste la correlación significativa entre horario de alimentación y las variables TBC, TC y Distancia, desapareciendo la influencia significativa del género y el peso sobre las variables anteriores.

A manera de conclusiones: 1) el horario de alimentación resulta claramente determinante para la actividad exploratoria asociada a EBC, TC y distancia, de manera que los animales alimentados en el mismo horario de la experimentación (horas de la mañana), exploraron más que los alimentados en la tarde. Esta actividad podría estar relacionada con la búsqueda del alimento. 2) La actividad exploratoria general podría estar relacionada significativamente con el género de los animales sólo en la medida de que las hembras presenten menor peso que los machos, sin embargo, en este caso sería el peso de los animales la variable asociada a tal actividad. 3) Se recomienda unificar el esquema de horario de alimentación para los animales de un dado experimento por cuanto esto podría considerarse una variable confusora en los resultados obtenidos en el LCE.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a: Proyecto 5629 de la Vicerrectoría de Investigaciones y Extensión de la Universidad Industrial de Santander por el apoyo administrativo y financiero y al Señor Jesús Rodríguez, bioterista de la Facultad de Salud UIS, por su colaboración atenta, acertada y profesional.

CONFLICTOS DE INTERESES

Los autores manifiestan no tener ningún conflicto de intereses al realizar este trabajo.

REFERENCIAS

1. Montgomery KC. The relation between fear induced by novel stimulation and exploratory behavior. *The Journal of Comparative and Physiol Psychol.* 1955a; 48:254-60.
2. Montgomery KC, Monkman JA. The relation between fear and exploratory behavior. *The Journal of Comparative and Physiol Psychol.* 1955b; 48:132-6.
3. Handely SL, Mithani S. Effects of alpha-adrenoceptor agonist and antagonist in a maze-exploration model of “fear”-motivated behaviour. *Arch of Pharmacology.* 1984; 327:1-5.
4. Blanchard DC, Blanchard RJ. Ethoexperimental approaches to the biology of emotion. *Ann Rev of Psychol.* 1988; 43-68.
5. Blanchard RJ, Blanchard DC. An ethoexperimental analysis of defense, fear and anxiety. In N. McNaughton and G. Andrews (Eds.). *Anxiety*, University of Otago Press. 1990; 124-33.
6. Pellow S, Chopin P, File SE, Briley YM. Validation of open-closed arm entries in an elevated plus-maze

- as a measure of anxiety in the rat. *Journal of Neurosc Methods*. 1985;. 14:149-67.
7. File SE. The interplay of learning and anxiety in the elevated plus-maze. *Behav Brain Res*. 1993; 58:199-202.
 8. Carobrez AP, Bertoglio LJ. Ethological and temporal analyses of anxiety-like behavior: the elevated plus-maze model 20 years on. *Neurosc and Biochem Rev*. 2005; 29:1193-205.
 9. Rodgers RJ, Cole JC. The elevated plus-maze: pharmacology, methodology and ethology. In *Ethology and Psychopharmacology*, Jhon Wiley & Sons Ltd. 1994;10-44.
 10. Cruz APM, Frei F, Graeff FG. Ethopharmacological analysis of rat behavior on the elevated plus-maze. *Pharm Biochem and Behav*. 1994; 49:171-6.
 11. DaCunha C, Levi M, Wolfman C, Koya R, Izquierdo I, Medina JH. Effect of various training procedures on performance in an elevated plus-maze: possible relation with brain regional levels of benzodiazepine-like molecules. *Pharm Biochem and Behav*. 1992; 43:677-81.
 12. Rodgers RJ, Cole JC. The elevated plus-maze: pharmacology, methodology and ethology. In *Ethology and Psychopharmacology*, Jhon Wiley & Sons Ltd. 1994; 10-44.
 13. File SE, Zangrossi H, Sanders FI and Mabutt PS. Raised corticosterones in the rat after exposure to the elevated plus-maze. *Psychopharmacology*. 1994; 113:543-6.
 14. Cruz APM, Frei F, Graeff FG. Ethopharmacological analysis of rat behavior on the elevated plus-maze. *Pharm Biochem and Behav*. 1994; 49:171-6.
 15. Treit D, Menard J, Royan C. Anxiogenic stimuli in the elevated plus-maze. *Pharm Biochem and Behav*. 1993; 44:463-9.
 16. Conde CA, Ayala JO, Botelho S, Herrera AB, Velásquez MC. La vía visual puede ser el disparador de ansiogenesidad en el modelo del laberinto en cruz elevado. *Salud UIS*. 2001 a; 33:191-6.
 17. File SE, Andrews N, Wu PY, Zharkovsky A, Zangrossi JH. Modification of chlordiazepoxide's behavioural and neurochemical effects by handling and plus-maze experience. *Eur J. of Pharm*. 1992; 218:9-14.
 18. Martinez JC, Cardenas F, Lamprea M, Morato S. The role of vision and proprioception in the aversion of rats to the open arms of an elevated plus-maze. *Behav Processes*. 2002; 60:1-12.
 19. Morato S, Castrechini P. Effects of floor surface and environmental illumination on exploratory activity in the elevated plus-maze. *Braz J. of Med and Biol Res*. 1989; 22:707-10.
 20. Becerra AM, Parra F, Morato S. Effect of different illumination levels on rat behavior in the elevated plus-maze. *Physiol and Behav*. 2005; 85:265 – 70.
 21. Griebel G, Moreau J, Jenk F, Martin RJ, Misslin R. Some critical determinants of the behavior of rats in the elevated plus-maze. *Behav Processes*. 1993; 29:37-48.
 22. Conde CA, Costa V, Tomaz, C. Prostcom: Un conjunto de programas para registro y procesamiento de datos comportamentales en investigación de fisiología y farmacología. *Biotemas*. 2000; 13(1):145-59.
 23. Obuchowski NA. An ROC-type measure of diagnostic accuracy when the gold standad is continuous-scale. *Statis. Med*. 2006; 25:481-93
 24. Hanley JA, McNeil BJ. The meaning and use of the area under a Receiver Operating Characteristic (ROC) curve. *Radiology*. 1982; 43:29-36
 25. StataCorp 2007. *Stata Statistical Software: Release 10*. College Station, TX: StataCorp LP.