

MODELOS ANIMALES UTILIZADOS PARA EL ESTUDIO DE LA ANSIEDAD Y EL DESARROLLO DE FÁRMACOS ANSIOLÍTICOS

*Ofir Picazo P.**
*Gabriel Roldán R.***

RESUMEN

El aumento de los padecimientos que cursan con trastornos de ansiedad ha provocado una intensa investigación en este campo, tanto desde el punto de vista básico, como del terapéutico. En este trabajo se presenta un panorama general acerca de los modelos animales que se utilizan con más frecuencia tanto para el estudio de la ansiedad, como para el desarrollo de nuevos fármacos ansiolíticos. Asimismo, se describen los principales requisitos que deben satisfacer estos modelos para ser considerados como herramientas válidas para el estudio de la ansiedad.

Finalmente, el análisis de un fármaco con estas pruebas conductuales puede arrojar resultados diferentes, por lo que se discuten también las posibles causas de estas discrepancias.

INTRODUCCIÓN

El estudio de la fisiología y farmacología de diferentes padecimientos neuropsiquiátricos ha cobrado gran interés a partir de la segunda mitad del presente siglo, no sólo por contar con procedimientos y herramientas para realizar investigaciones en torno a ellos, sino por haberse puesto de manifiesto la diversidad y frecuencia con la que se presentan dichas patologías.²²

Uno de los problemas de salud mental más fre-

cuentes, principalmente en las grandes metrópolis, es el que se refiere a la ansiedad. Aunque actualmente se cuenta con un buen número de sustancias para atenuar este padecimiento, la investigación de fármacos más selectivos continúa. Para esta tarea, el farmacólogo cuenta con distintas herramientas: neurotoxinas que sirven para eliminar circuitos neurales específicos, moléculas (marcadas radiactivamente) que sirven para establecer mapas de receptores, moléculas que facilitan o bloquean la acción de un neurotransmisor en particular, etc. Además, el investigador cuenta con modelos que simulan el fenómeno que está estudiando: en este sentido, los modelos que se usan para el discernimiento de drogas con actividad ansiolítica, frecuentemente utilizan roedores como sujetos experimentales.

* Sección de Estudios de Posgrado e Investigación. Escuela Superior de Medicina, Instituto Politécnico Nacional.

** Departamento de Fisiología. Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México.

Uno de los principales problemas que afronta la evaluación preclínica de psicofármacos es la suposición de que en los animales de laboratorio no se expresan estados psiquiátricos tan característicos en el hombre como la esquizofrenia, manías, depresión, etc. Sin embargo, para el caso de la ansiedad la situación parece menos crítica, pues tanto en el hombre como en los demás animales la incertidumbre de eventos aversivos o novedosos, propia de este estado emocional, produce marcados cambios conductuales.^{2,22} El registro de estas alteraciones del ánimo son la base de los modelos utilizados en el discernimiento de fármacos con actividad ansiolítica.¹⁷

DEFINICIÓN DE ANSIEDAD

La ansiedad se puede definir como un estado emocional de intranquilidad y excitación nerviosa cuya característica fundamental es una gran aprensión hacia los estímulos del entorno que provoca una respuesta exagerada a los mismos.¹ Esta hiperexcitabilidad genera a su vez una serie de reacciones vegetativas como taquicardia, sudoración, aumento en el peristaltismo gastrointestinal, tensión muscular, insomnio, entre otras.¹⁶ En un contexto biológico se considera que la ansiedad es una manifestación natural de alerta, la cual proporciona al organismo un mecanismo de adaptación ante condiciones adversas.^{21,22} Sin embargo, cuando esta respuesta es desmesurada o sostenida durante un tiempo prolongado, se interpreta como un proceso patológico.¹

CLASIFICACIÓN DE LOS MODELOS DE ANSIEDAD

Hasta el momento se conocen una gran cantidad de modelos utilizados para evaluar la ansiedad experimental, muchos de los cuales se han derivado de los utilizados antiguamente en experimentos de aprendizaje asociativo. Dentro de los diversos modelos que se han propuesto para el estudio de la ansiedad se pueden reconocer dos grandes grupos: en el primero, se asocia una conducta innata (filogenéticamente grabada) como la ingesta de agua o alimentos, la exploración y conducta de enterramiento, principalmente; con un estímulo aversivo artificial que generalmente es un choque eléctrico de baja intensidad. El segundo grupo se caracteriza por utilizar es-

tímulos aversivos naturales tales como: espacios abiertos, luminosidad intensa, olores desagradables, la presencia de compañeros desconocidos, y algunos más.^{13,23}

Para fines de este trabajo, se describirán como representativos del primer grupo, los modelos de: Vogel, Geller-Seifter y el de la conducta de enterramiento defensivo; mientras que como ejemplos del segundo grupo se considerarán: la prueba del laberinto en forma de cruz, el paradigma de la interacción social y la prueba de la conducta exploratoria en dos compartimientos.

En los modelos de Vogel²⁵ y de Geller-Seifter,¹² el choque eléctrico se asocia a la ingesta de agua o de alimentos respectivamente, en animales privados al menos 24 horas antes de la prueba de ansiedad. En ambos modelos, debe haber un entrenamiento previo de uno a tres días para que la rata se familiarice con la caja de prueba. Durante este periodo se restringe fuertemente el acceso al agua o alimentos según el modelo del que se trate. Así, el día del experimento, que dura 10 minutos, las ratas son expuestas a un choque eléctrico de aproximadamente 0.3 mA por cada intento que hacen de satisfacer su ingesta. Como es obvio, con estas condiciones se crea una situación de conflicto motivacional: la expresión de una conducta innata y el castigo asociado a ésta. Este conflicto se resuelve con la administración de sustancias ansiolíticas que permiten al animal realizar más intentos para tomar agua o acceder al alimento que los animales control. En otras palabras, la supresión de la respuesta inducida por el choque eléctrico se puede liberar con el uso de agentes tranquilizantes.^{12,25} Este modelo puede ser útil también para evaluar cómo se modifican los niveles de ansiedad bajo diferentes esquemas experimentales.¹⁰

Otro modelo contemplado en este grupo es la prueba de la conducta de enterramiento defensivo.²⁰ En este modelo la conducta fijada filogenéticamente es la tendencia que muestran los roedores a ocultar un estímulo aversivo que en este caso está representado por un pequeño electrodo a través del cual se administra al animal un choque eléctrico de intensidad similar al de los modelos anteriores.

Este modelo consiste en una jaula transparente de dimensiones similares a las de la jaula hogar donde ha permanecido aislado el animal durante

tres o más días previos al experimento. El piso de esta caja de prueba se encuentra cubierto por una capa de aserrín fino de 2 cm de espesor y el electrodo emerge por una de las paredes frontales a 2 cm por encima del aserrín. Después de que se introduce el animal a esta caja, éste inicia una típica conducta exploratoria hasta que eventualmente toca el electrodo recibiendo una o varias descargas, momentos después se presenta la conducta de enterramiento defensivo, la cual consiste generalmente en movimientos rápidos de las patas anteriores con el objeto de cubrir con el aserrín lo que el animal ha reconocido como aversivo. Durante esta prueba se mide el tiempo que el animal tarda en desplegar la conducta de enterramiento una vez que ha recibido el primer choque eléctrico, a lo que se le denomina latencia de enterramiento, así como el tiempo acumulativo que pasa enterrando el poste electrificado.

Segun D. Treit y J.P.J. Pinel,^{23,24} quienes propusieron este modelo, el aumento en la latencia de enterramiento se interpreta como una disminución de la capacidad de los animales a los estímulos del ambiente, es decir un decremento de su reactividad, mientras que una disminución del tiempo que pasa enterrando es directamente proporcional a su nivel de ansiedad. En otras palabras, a menor tiempo acumulativo de enterramiento mayor efecto ansiolítico. Al igual que en las pruebas mencionadas anteriormente, este experimento dura 10 minutos y en ellas el sujeto experimental sólo pasa una vez, ya que se ha visto que la experiencia involucra procesos de aprendizaje que sesgan los resultados. Una de las características sobresalientes de este modelo es que permite detectar cambios en la capacidad de respuesta de los animales. En la figura 1 se muestra una gráfica obtenida con este modelo.

El segundo grupo de modelos, como se mencionó en un principio, se basa en la aversión que tienen los animales hacia situaciones novedosas y tienen la ventaja de no introducir estímulos artificiales. Una de las pruebas más utilizadas de este grupo es el laberinto en forma de cruz, éste consta de dos brazos perpendiculares de 50 cm de largo por 10 de ancho que se cruzan por el punto medio y se encuentran a una altura de 50 cm sobre el piso. Dos de los brazos están abier-

tos, es decir, constituyen una plataforma larga y estrecha por la que el animal al deambular puede caer, mientras que los otros dos se encuentran cerrados por una pared formando una especie de corredor en el que no existe tal riesgo. En esta prueba, que dura cinco minutos, el animal tiende a evitar los brazos abiertos del laberinto (estímulo aversivo) y permanece más tiempo en los brazos cerrados, de tal suerte que una elevación del tiempo de permanencia en los brazos abiertos se interpreta como un efecto antiaversivo o ansiolítico. Si ocurre lo contrario, es decir, que el roedor permanezca más tiempo en los brazos cerrados se habla de un efecto ansiogénico.¹⁸

De las ventajas de esta prueba se pueden mencionar las siguientes: el animal no necesita ser entrenado previamente, el experimento toma sólo cinco minutos y, además, la frecuencia con que el roedor pasa de un brazo a otro refleja sus capacidades motrices, por lo que no se tienen que realizar experimentos separados para eliminar efectos inespecíficos de la droga (Fig. 2).

En el modelo conocido como "paradigma de interacción social", se mide la conducta socio-sexual que establecen dos roedores cuando se encuentran en situaciones estresantes como espacios abiertos, no familiares e iluminados intensamente.¹¹ En este modelo se colocan dos ratas macho de aproximadamente el mismo peso en una arena circular amplia (al menos de 70 cm de diámetro), bien iluminada y con la cual los animales no han tenido contacto previo. También en este caso los sujetos de experimentación se deben aislar al menos tres días antes. La prueba dura 10 minutos y durante este periodo se registra el tiempo acumulativo en que los sujetos tienen una interacción activa, es decir, que despliegan conductas socio-sexuales como el juego, la persecución, el olfateo, la monta, y otras más, quedando excluidas las conductas pasivas como el permanecer juntos en actitud de descanso.

Normalmente la interacción social tiende a disminuir en estos sitios iluminados y no familiares, interpretándose como una reacción a las características aversivas del lugar, pero si se administra un agente ansiolítico, aumenta el tiempo de interacción social en forma dosis-dependiente hasta igualarse a los registros obtenidos cuando las ratas se encuentran en ambientes

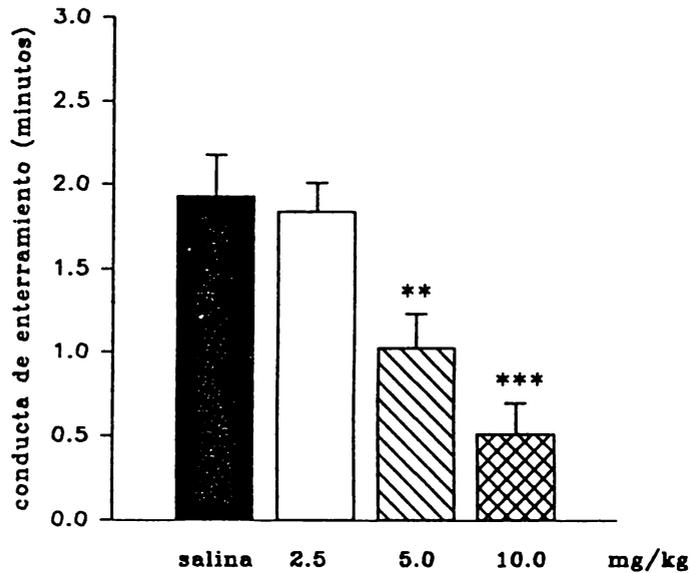


Fig. 1. Efecto de la administración intraperitoneal del agonista serotoninérgico 5-HT_{1A} ipsapirona sobre la conducta defensiva de enterramiento de ratas macho. Cada barra representa el promedio de 8-10 animales \pm el error estándar. Después de un análisis de varianza se hicieron comparaciones pareadas con la prueba *U* de Mann-Whitney. ** $p < 0.02$; *** $p < 0.01$.

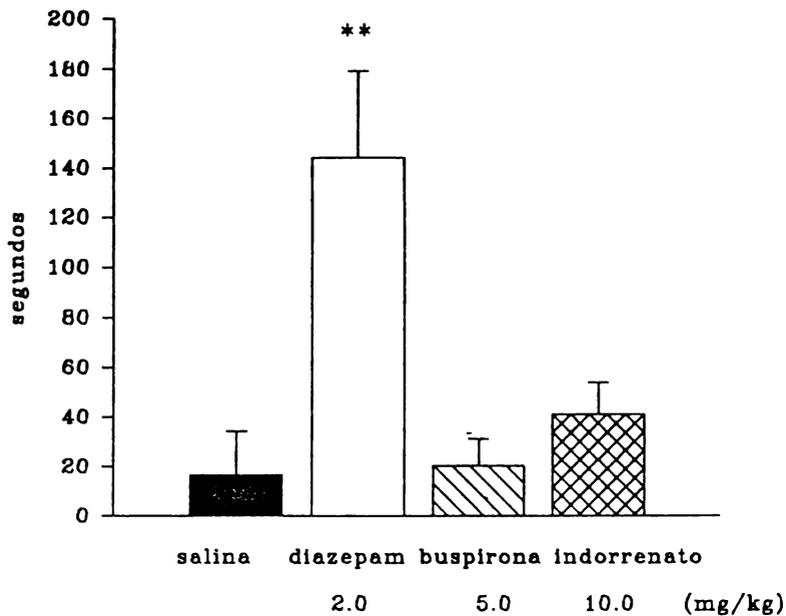


Fig. 2. Tiempo de permanencia en los brazos abiertos del laberinto en forma de cruz después de la administración de diazepam y dos compuestos serotoninérgicos con su-puesta actividad ansiolítica. Cada barra representa el promedio \pm el error estándar de los registros obtenidos con al menos ocho ratas. Se hicieron comparaciones con la prueba *U* de Mann-Whitney. ** $p < 0.02$.

familiares (Fig. 3). Una de las ventajas de este modelo es que se pueden hacer una o dos observaciones a la vez en función del tratamiento que haya recibido cada rata.

Para terminar con la descripción de estas herramientas para medir la ansiedad experimental, se mencionará que en la prueba de la conducta exploratoria en dos compartimientos, se utiliza una caja dividida en dos secciones comunicadas por una pequeña puerta por donde el animal puede pasar una de las secciones tiene paredes transparentes y su techo está intensamente iluminado; contrariamente, la otra sección está cubierta y oscurecida. Al inicio de la prueba, que dura 10 minutos, se coloca al animal en la zona iluminada y se cuenta el número de transiciones de un compartimiento al otro.⁴ Así, la administración de fármacos ansiolíticos abate la aversión que manifiesta el roedor hacia la zona abierta e iluminada, lo cual se detecta como un aumento en el número de transiciones (Fig. 4). Una de las ventajas de este modelo es que en él se puede probar un animal más de una vez, ya que se ha demostrado que no hay cruzamiento del efecto ansiolítico con el aprendizaje. Sin embargo, su uso se ha restringido sólo a ratones y hamsters.

Se ha visto que la administración de dosis elevadas de algunos ansiolíticos como las benzodiazepinas y la buspirona, puede modificar la función muscular y de este modo dar falsos positivos sobre todo en los paradigmas donde se evalúa una conducta pasiva. Estos hallazgos obligan entonces a que, paralelamente a la evaluación de un compuesto en cualquiera de estos modelos conductuales, se realicen también pruebas de coordinación y actividad locomotriz utilizando para ello rodillos giratorios y contadores de actividad espontánea.

VALIDACIÓN DE LOS MODELOS QUE SE UTILIZAN PARA ESTUDIAR LA ANSIEDAD

Si bien la regulación neurofisiológica de la ansiedad dista mucho de ser comprendida, la farmacología de esta alteración emocional ha avanzado en forma relativamente rápida, y en la actualidad se cuenta con una amplia gama de compuestos y fármacos que pueden modificarla. En la investigación básica se han utilizado estas sustancias para el desarrollo y validación de mode-

los animales y por tal motivo, dichos modelos están basados casi exclusivamente en criterios farmacológicos.^{14,17,18,23} De este modo, para la caracterización de un modelo de ansiedad en animales es necesario demostrar que una variedad de drogas con propiedades ansiolíticas son capaces de modificar una reacción o una conducta que se supone, se da en respuesta a ella.

Treit²³ propuso tres criterios para considerar a un modelo como indicador específico de estados de ansiedad; estos criterios son el de correlación farmacológica, isomorfismo y homología. El primero y más importante depende del cumplimiento de al menos tres condiciones:

1. El modelo debe ser sensible a dosis pequeñas del fármaco, equiparable a las que posteriormente se emplearán en la práctica clínica.
2. El modelo debe ser selectivo, es decir, debe ser capaz de distinguir entre compuestos con actividad ansiolítica y otros que carezcan de esta propiedad, lo que evita la introducción de falsos positivos.
3. Es necesario que se presente una relación dosis-respuesta del efecto ansiolítico tanto en el modelo como en la práctica clínica.

Aunque es difícil comparar la ansiedad en animales con la humana, es posible establecer algunos elementos comunes y suponer, al menos tentativamente, que ambas están reguladas de manera análoga. Así, el criterio de isomorfismo se refiere a las causas que desencadenan el establecimiento del estado ansioso, mientras que un modelo isomórfico supone que las bases neurales que subyacen al fenómeno de la ansiedad son iguales entre el sujeto experimental y el hombre.²³ Puesto que todos los modelos conocidos actualmente tienen deficiencias que otros pueden remediar en algún grado, la estrategia actual para el discernimiento de drogas ansiolíticas es utilizar el mayor número de modelos animales, antes de realizar evaluaciones clínicas.

CONSIDERACIONES FINALES

A pesar de que estos modelos para evaluar la ansiedad han sido ampliamente validados farmacológicamente,^{14,18,23} el ensayo de una misma

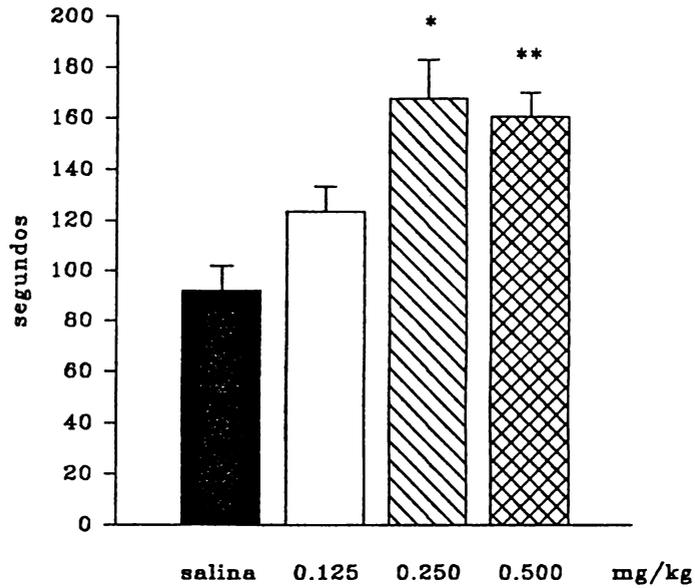


Fig. 3. Aumento de la conducta de interacción social de ratas macho tratadas con el agonista serotoninérgico 5-HT_{1A} 8-OH-DPAT. Las barras representan el promedio \pm el error estándar de 8-10 ratas. Prueba *U* de Mann-Whitney: * $p < 0.05$; ** $p < 0.02$.

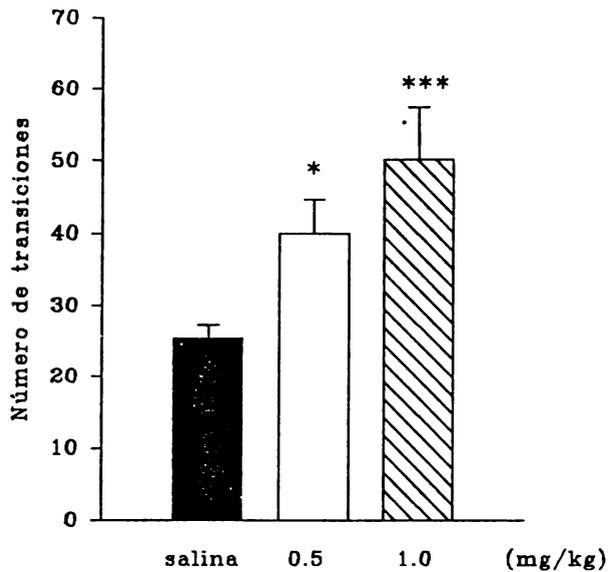


Fig. 4. Efecto de dos dosis de diazepam sobre el número de transiciones en la prueba de la conducta exploratoria en dos compartimentos. Cada barra representa el promedio \pm el error estándar de los datos obtenidos con 10 ratas. Las comparaciones estadísticas se hicieron con la prueba *U* de Mann-Whitney. ** $p < 0.02$.

sustancia en cada uno de estos modelos ha producido resultados diferentes e incluso contradictorios.^{7,11,14} (Fig. 2.) A continuación se enlistan las causas más frecuentes de estas variaciones lo que, dicho sea de paso, dificultan mucho la comparación de los resultados.

- Rango de dosis empleadas y vía de administración, lo cual se relaciona con la circunstancia de que en algunos casos son los metabolitos de la sustancia que se está analizando los responsables del efecto ansiolítico.^{15,19}
- Diferencias en el tamaño de las cajas de prueba, la intensidad de los estímulos aversivos, la duración de la prueba, etcétera.
- Se sabe que hay distintos estados ansiosos, de manera que los diferentes modelos de ansiedad pueden estar reflejando distintos tipos de ansiedad.¹³
- Diferencias en los animales de experimentación. Al respecto se ha confirmado que tanto la especie como la cepa, sexo, edad y estado endócrino de los sujetos son factores que influyen sobre la acción de los fármacos en general.^{5,9}
- Mecanismo de acción a nivel presináptico o postsináptico. Existen drogas cuyas acciones son mediadas preferentemente por receptores presinápticos o por postsinápticos. Este hecho constituye una variable fundamental en la interpretación de los datos, ya que la estimulación pre o postsináptica puede inducir la expresión de diferentes conductas.^{6,8,19}

Actualmente se siguen proponiendo más modelos, muchos de los cuales son simplemente variaciones de los aquí descritos, todo esto con el fin de encontrar pruebas más representativas de los distintos tipos de ansiedad que se han reconocido en la clínica. A pesar de las deficiencias de cada una de estas herramientas conductuales, su uso es muy común en la búsqueda de nuevos agentes ansiolíticos. Uno de los productos más recientes de esta investigación lo constituye la buspirona, así como otros compuestos en fase

de investigación clínica como la ipsapirona y la gepirona.

SUMMARY

The increment of anxiety-related illness has encouraged an intensive scientific investigation in this field, both from the basic and therapeutic points of view. In this work, a general overview of the most used animal models for studying the physiological basis of anxiety as well as for development of new anxiolytic drugs is presented. The main criteria necessary for validation of these models as useful tools in anxiety research are also reviewed. Finally it is discussed the possible causes of discrepancy when analyzing anxiolytics in different behavioral models.

BIBLIOGRAFÍA

1. American Psychiatric Association. *Diagnosis and statistical manual of mental disorders*. 4a. ed. Rev. American Psychiatric Press. Washington, D.C. 1994.
2. Brain, P.S., N. Kusumorini & D. Benton. 1991. "Anxiety in the laboratory rodents: a brief review of some recent behavioural developments". *Behav. Proc.*, 25:71-80.
3. Broekkamp, C., H. Berendsen, F. Jenck & A. Van Delft. 1989. "Animal models of anxiety and response to serotonergic drugs." *Psychopathology*, 22 (suppl 1):2-12.
4. Crawley, J.N. & F.K. Goodwin. 1980. "Preliminary report of a simple animal behavior model for anxiolytic effects of benzodiazepines". *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 13:167-170.
5. Fernández-Guasti, A., C. López-Rubalcava & O. Picazo. 1996. "Cambios en el efecto ansiolítico de los agonistas 5-HT_{1A} de acuerdo con la especie, la edad, el género y el estado endócrino del individuo". *Salud Mental*, 19:36-41.
6. Fernández-Guasti, A. & C. López-Rubalcava. 1990. "Evidence for the involvement of the 5-HT_{1A} receptor in the anxiolytic action of indorenate and ipsapirone". *Psychopharmacology*, 101:354-358.
7. ————. 1995. "Action of ipsapirone and 8-OH-DPAT on exploratory behavior in hamsters (*Mesocricetus auratus*): effects of antagonists and p-CPA". *Pharmacol. Biochem. Behav.*
8. Fernández-Guasti, A., C. López-Rubalcava, C. Pérez-Urizar & G. Castañeda-Hernández. 1992.

- “Evidence for a postsynaptic action of the serotonergic anxiolytics: ipsapirone, indorenate and buspirone”. *Brain Res. Bull.*, **28**:497-501.
9. Fernández-Guasti, A. & O. Picazo. 1990. “The actions of diazepam and serotonergic anxiolytics vary according to the gender and the estrous cycle phase”. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, **37**:77-81.
 10. Ferreira, A., S. Hansen, M., Nielsen, T. Archer & B.G. Minor. 1989. “Behavior of mother rats in conflict tests sensitive to anti-anxiety agents”. *Behav. Neurosci.*, **103**:193-201.
 11. File, S.E. 1980. “The use of social interaction as a method for detecting anxiolytic activity of chlordiazepoxide-like drugs”. *J. Neurosci. Methods*, **2**:219-238.
 12. Geller, I. & J. Seifter. 1960. “The effects of meprobamate, barbiturates, d-amphetamine and promazine on experimentally induced conflict in the rat”. *Psychopharmacology*, **1**:482-492.
 13. Gyertyan, I. 1992. “Animal models of anxiety: a critical review”. *Acta Physiol. Hungar.* **79**: 369-379.
 14. Hogg, S. 1996. “A review of the validity and variability of the elevated plus-maze as an animal model of anxiety”. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, **54**:21-30.
 15. Jajoo, H.K., R.F. Mayol, J.A. LaBude & I.A. Blair. 1989. “Metabolism of the antianxiety drug buspirone in the rat”. *Drug Metab. Disp.*, **47**: 625-633.
 16. Klain, F. & J. Rabkin. *Anxiety. New research and changing concepts*. Raven Press. New York. 1981.
 17. Lister, R.G. 1990. “Ethologically-based animal models of anxiety disorders”. *Pharmacol. Ther.*, **46**:321-340.
 18. Pellow, S.P., Chopin, S.E. File & M. Briley. 1985. “Validation of open: closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat”. *J. Neurosci. Methods*, **14**:149-167.
 19. Picazo, O., C. López-Rubalcava & A. Fernández-Guasti. 1995. “Anxiolytic effect of the 5-HT_{1A} compounds 8-hydroxy-2(di-n-propylamino) tetralin and ipsapirone in the social interaction paradigm: evidence of a presynaptic action”. *Brain Res. Bull.*, **37**:169-175.
 20. Pinel, J.P.J. & D. Treit. 1978. “Burying as a defensive response in rats”. *J. Comp. Physiol. Psychol.*, **92**:708-712.
 21. Spielberg, C. *Anxiety and behavior*. Academic Press. New York, 1976.
 22. Tallman, J., S. Paul, P. Skolnick & D. Gallagher. 1980. “Receptors for the age of anxiety: pharmacology of the benzodiazepines”. *Science*, **207**:274-281.
 23. Treit, D. 1985. “Animal models for the study of anti-anxiety agents: a review”. *Neurosci. Behav. Rev.*, **9**:203-222.
 24. Treit, D., J.P.J. Pinel & H.C. Fibiger. 1981. “Conditioned defensive burying: a new paradigm for the study of anxiolytic agents”. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, **15**:619-626.
 25. Vogel, J.R., B. Beer & Clody D.E. 1971. “A simple and reliable conflict procedure for testing anti-anxiety agents”. *Psychopharmacology*, **21**:1-7.