

Principales procedimientos para evaluar la conducta en estudios de toxicología postnatal avanzada.

Daniel Francisco Arencibia Arrebola^{*}, Luis Alfredo Rosario Fernández^{}, Yulieé López Feria^{*}, Yamilka Soroa Millán^{***}.**

Instituciones:

^{*}Instituto Finlay, Vicepresidencia de Investigaciones, Calle 17 e/ 198 y 200, Atabey, Municipio Playa, Apartado Postal 16017, Ciudad Habana, Cuba.

^{**}Instituto de Farmacia y Alimento (IFAL, U.H), Calle 222 e/ 25 y 27, La Coronela, Municipio La Lisa, Ciudad de la Habana, Cuba.

^{***}Centro de Química Biomolecular (CQB), Avenida 21, esquina a 200, Atabey, Municipio Playa, Apartado Postal 16042, Ciudad de la Habana, Cuba.

Correspondencia a: Daniel Francisco Arencibia Arrebola. Email: darencibia@finlay.edu.cu

Resumen

La conducta constituye uno de los parámetros medibles de mayor importancia en los estudios de toxicología de la reproducción, vinculada sobre todo a la etapa postnatal de la nueva cría en estudios de una sola generación y multigeneracional. En este artículo tuvimos por objetivo brindar los procedimientos para realizar la evaluación de la actividad exploratoria en campo abierto, evitación activa y pasiva en ratones, evaluación del movimiento de orientación en plano inclinado, evaluación de la respuesta a la prueba del plato caliente y por último el procedimiento para la evaluación de la respuesta a la prueba de la varilla rotatoria. El colectivo de autores esperamos que este artículo sea de gran utilidad para los toxicólogos que visitan la revista, ya que en este documento se destacan procedimientos eminentemente de conducta animal, muy útiles en los estudios de toxicología de la reproducción, donde se explica a fondo el principio de cada una de estas pruebas y como realizarla. Solo compete a los investigadores darle una explicación científica a los resultados que obtengan en cada una de estas pruebas al evaluar sus productos.

Palabras claves: Toxicología postnatal, conducta, actividad exploratoria, evitación activa y pasiva, movimiento de orientación en plano inclinado, prueba del plato caliente, prueba de la varilla rotatoria.

Abstract

Main procedures for evaluating the behavior in advanced postnatal toxicology studies.

The behavior constitutes one of the appraisable parameters of more importance in the reproduction toxicology studies, linked mainly to the postnatal stage of the new breeding in one generation and multigenerational studies. In this article we had for objective to offer the procedures to carry out the evaluation of the open field exploratory activity, active and passive avoidance test in mice, evaluation of the orientation movement in inclined plane, evaluation of the response to the hot plate test and lastly the procedure for the evaluation of the response to the rotating rod test. The authors group hopes that this article is since of great utility for the toxicologists that visit the Journal, in this document we highlight the procedures eminently of animal behavior, very useful in the toxicology reproduction studies, where it is thoroughly explained the principle of each one of these tests and as carrying out it. It concerns the researchers to give a scientific explanation to the results that they obtain in each one from these tests when evaluating yours products.

Key words: Postnatal toxicology, behavior, exploratory activity, active and passive avoidance, orientation movement in inclined plane, hot plate test, rotating rod test.

Introducción

La conducta animal constituye el modo de actuación de los diferentes tipos de animales, tema que ha suscitado un enorme interés en los pensadores desde los tiempos de Platón y Aristóteles. Es particularmente enigmática la habilidad de algunas criaturas simples para desarrollar tareas complejas: tejer una telaraña, construir un nido, cantar una canción, encontrar refugio o capturar a su presa; todo ello en el momento justo y con escaso o nulo aprendizaje previo.¹ Tales comportamientos se han estudiado desde dos perspectivas bastante diferentes, de hecho casi opuestas en sus planteamientos, que exponemos a continuación: o bien los animales aprenden todo lo que hacen (enfoque conductista, haciendo hincapié en el aprendizaje), o bien saben instintivamente cómo hacerlo (enfoque etológico, que subraya el papel de la herencia). Ninguno de estos enfoques logra dar una explicación totalmente satisfactoria.²

La impronta, en consecuencia, tiene cuatro características básicas que la diferencian del aprendizaje normal: primero, un periodo de tiempo específico, o periodo crítico, en el que el aprendizaje ha de tener lugar; segundo, un contexto específico, normalmente definido por la presencia de un estímulo señal específico; tercero, una restricción en el aprendizaje para que el animal recuerde sólo un estímulo específico, como el olor, e ignore otros que a priori parecerían más relevantes; y cuarto, no hace falta ningún tipo de premio o recompensa (refuerzo positivo), para que el animal aprenda y recuerde lo aprendido.^{3,4}

Estas cualidades son evidentes en muchos tipos de aprendizaje, y hoy somos capaces de comprender el valor que tiene el aprendizaje innato: en un mundo lleno de estímulos, permiten al animal orientarse sobre qué debe saber y qué debe ignorar. Por razones de economía adaptativa, los animales deben recoger solamente el mínimo de información necesaria que les resuelva una situación.⁴

Conociendo de forma bastante profunda la conducta animal, se crearon diferentes ensayos o técnicas que permiten recopilar información necesaria sobre determinados aspectos puntuales de esta rama, las cuales están integradas en los estudios de farmacología como modelos para evaluar el efecto de determinados fármacos, productos naturales y otros en este sistema en etapas postnatales. Dentro de ellos se encuentran la evaluación de la actividad

exploratoria en campo abierto, evitación activa y pasiva en ratones, evaluación del movimiento de orientación en plano inclinado, evaluación de la respuesta a la prueba del plato caliente y por último el procedimiento para la evaluación de la respuesta a la prueba de la varilla rotatoria.

Por tanto nos planteamos como objetivo fundamental de este trabajo de revisión brindar los procedimientos de estas 4 técnicas. El colectivo de autores esperamos que este artículo sea de gran utilidad para los toxicólogos que visitan la revista, ya que en este documento se destacan procedimientos eminentemente de conducta animal, muy útiles en los estudios de toxicología de la reproducción, donde se explica a fondo el principio de cada una de estas pruebas y como realizarla. Solo compete a los investigadores darle una explicación científica a los resultados que obtengan en cada una de estas pruebas al evaluar sus productos.

Desarrollo

1. Procedimiento para la evaluación de la actividad exploratoria en campo abierto.

Evaluar la actividad exploratoria del animal, fundamentalmente esta prueba se realiza en ratones.

Procedimiento:

Es recomendable realizar la prueba en un lugar cerrado para evitar ruidos y se debe guardar silencio para no distraer al animal.⁵

Para su realización se cuenta con un dispositivo circular con paredes de 15 cm de altura y diámetro de 30 cm, en cuyo piso se dibuja un círculo concéntrico de $d=10$ cm.

1. Coloque el dispositivo sobre una superficie lisa
2. Anote la fecha, código del animal, código del tratamiento y el tiempo que llevan de tratamiento los animales.
3. Introduzca el animal en el centro del círculo concéntrico y anote la latencia de salida del mismo. Ubíquese de tal forma que pueda observar su conducta. El tiempo de observación es de 6 minutos.⁶

4. En la casilla correspondiente a Paradas (P) registre el número de veces que el animal se para sobre las patas traseras, con o sin apoyo, haciendo tantas rayas verticales como veces que se pare. El total anótelos en la casilla contigua.
5. De la misma forma, en la casilla correspondiente a Cruces (C), registre el número de veces que con sus patas delanteras cruza sobre el círculo central.
6. En la casilla de observaciones anote si el animal orina, defeca, salta, se acicala o algún otro dato de interés.
7. La actividad total se registra como P + C.
8. La evaluación de los resultados de la actividad total, y de las variables P y C de manera independiente, se realiza por comparación de los grupos tratados con el control usando para ello el test no paramétrico de la U de Mann Whitney.⁷

2. Prueba de evitación activa (active avoidance test) en ratones.

Evaluar el aprendizaje y la memoria en ratones.

Procedimiento:

Entrenamiento.⁸

1. El entrenamiento consta de 1 sesión diaria durante 10 días.
2. Se realiza en una caja plástica dividida en dos compartimentos con piso de rejilla metálica.
3. El ratón se coloca en uno de los compartimentos y se emite un sonido y a continuación un shock eléctrico de 0.5 mA a través de la rejilla metálica del piso de la caja.
4. Esto constituye un estímulo adverso para el animal y lo induce a saltar al otro compartimento.
5. Con el entrenamiento el animal debe aprender que al recibir la estimulación sonora, sino cambia de posición recibirá la estimulación eléctrica.
6. Pasados 10 días solo aquellos que aprendieron podrán ser utilizados en el experimento.

Prueba de evitación activa.

1. El tiempo de tratamiento debe quedar especificado en el protocolo.
2. Los animales entrenados son sometidos a la prueba.
7. El ratón se coloca en uno de los compartimentos y se emite un sonido y a continuación el shock eléctrico.^{8,9}

8. Se evalúa el tiempo de latencia, o tiempo que demora el animal para saltar al otro compartimento.^{8,10}
9. Se comparan los tiempos de latencia de los animales que saltan de los tratados y los no tratados (controles).
10. Se evalúa el porcentaje de retención como la cantidad de animales de cada grupo que no salta.¹¹

3. Prueba de evitación pasiva (*passive avoidance test*) en ratones.

Evaluar la retención de una tarea de evitación pasiva.

Procedimiento:

1. Anotar la fecha, código del animal y del tratamiento que recibió el animal, período de administración así como los datos de la prueba.
2. El experimento se realiza en una caja plástica iluminada (20 x 20 x 20 cm) conectada a una caja oscura más pequeña (10 x 10 x 10 cm) por una puerta de guillotina. El compartimento oscuro tiene una rejilla electrificada en el piso y la corriente se suministra por una fuente de corriente constante.¹²
3. El ratón se coloca en el compartimento iluminado y se anota la latencia de entrada al compartimento oscuro usualmente ocurre dentro del primer minuto. Inmediatamente se baja la puerta de la guillotina y el animal recibe un shock eléctrico de 0.5 mA durante 3 segundos. A continuación se sube la puerta y el ratón debe abandonar el compartimento donde recibió el estímulo negativo.
4. Transcurridas 24 horas del entrenamiento, el mismo animal es colocado en la caja iluminada (sesión de prueba) y se anota el tiempo de latencia de entrada al compartimento oscuro.¹³
5. Los animales que permanecen por más de 60 segundos en el compartimento claro se recoge como tiempo de latencia de entrada 60 segundos y se da por culminada la prueba.¹⁴
6. Se cuantifica la retención como el porcentaje de animales que evitan el compartimento oscuro.

4. Evaluación del movimiento de orientación en plano inclinado.

Observar si el animal asciende en el plano inclinado como su conducta normal.

Procedimiento:

1. Registre los datos del ensayo, la fecha, código del animal, código del tratamiento y el tiempo que lleva cada animal de tratamiento.
2. Coloque el animal en una rejilla inclinada en un ángulo de aproximadamente 45° en posición descendente (cabeza hacia la parte más baja).
3. El animal en condiciones normales tenderá a enderezarse completamente y ascender por la rejilla.¹⁵
4. Registre el tiempo en que cada animal se coloca en posición vertical, con la cabeza hacia arriba en el transcurso de un minuto.
5. El ensayo se considera terminado cuando el animal no realiza esta operación en el tiempo señalado y se registra en la planilla 60 segundos para ese animal.¹⁵
6. En el análisis se comparará el % de animales que se enderezan o no por grupo, para lo cual se usará el test de la Probabilidad Exacta de Fischer.⁷
7. Además se comparará el tiempo de latencia en la respuesta de enderezamiento en los grupos tratados y control, usando el test no paramétrico de la U de Mann Whitney.⁷

5. Procedimiento para la evaluación de la respuesta a la prueba del plato caliente.

Establecer la respuesta a estímulos nociceptivos a través de la latencia de respuestas al dolor por el estímulo doloroso causado por el calor.

Procedimiento: ¹⁶⁻¹⁸

Se cuenta con un dispositivo transparente, hueco y resistente al calor, cuyas dimensiones varían en dependencia de la especie, que se coloca sobre una plancha de calentamiento a 57±2 °C.

1. Anote los datos necesarios, la fecha, código del animal, código del tratamiento y el tiempo de administración a que se han sometido los animales. La planilla tiene espacio para realizar esta prueba en tres tiempos diferentes de administración a los mismos animales.¹⁹
2. Introduzca el animal en el dispositivo sobre la plancha y observe.

3. El tiempo máximo de duración de la prueba será 1 minuto. En ese tiempo se anotará en la planilla el tiempo transcurrido desde que se coloca el animal en la plancha hasta que:²⁰

- Se lame las patas.
- Salta.

Si el animal salta sin lamerse, se anotará dicho tiempo tanto para salto como para lamido.

Si el animal se lame pero no salta en un minuto, se registra el tiempo de lamido y se considera tiempo de salto 60 segundos.

Si el animal ni se lame las patas ni salta en un minuto, ambos tiempos se considerarán 60 segundos.

4. El tiempo en que el animal se lame las patas se registra, pero no implica dar por concluido el ensayo. Esto se hace solo una vez que el animal salta o al transcurrir 60 segundos sin que lo haga.²¹

5. En este ensayo se comparará el tiempo de latencia en el plato de los grupos tratados y el control, usando para ello el test no paramétrico de la U de Mann Whitney.⁷

6. Procedimiento para la evaluación de la respuesta a la prueba de la varilla rotatoria.

Evaluación de la capacidad de sujeción y ejecución motora en varilla rotatoria.

Procedimiento: ²²

Para su realización se necesita un equipo de varilla rotatoria.

1. Anote la fecha, código del animal, código del tratamiento y el tiempo que llevan de administración los animales. La planilla deberá tener espacio para realizar esta prueba en tres tiempos diferentes de administración a los mismos animales. ²³
2. La prueba consiste en colocar al animal sobre una rejilla horizontal al plano de la tierra y hacerla girar 180°, de forma tal que el animal quede suspendido de la rejilla en lugar de sobre la rejilla.
3. En la prueba se registra si el animal se cae, pasa o no pasa al otro lado de la rejilla buscando enderezarse en el transcurso de 1 minuto.
4. Antes de realizar la experiencia todos los animales se evaluarán en este test para descartar los que presenten posibles afectaciones que le impidan ejecutar esta maniobra.

5. En este test se compara el % de animales que caen y % de animales que no pasan al otro lado de la rejilla de los tratados con los del grupo control usando para ello el test de la Probabilidad Exacta de Fischer de doble cola.^{7,24}

Conclusiones

El colectivo de autores esperamos que este artículo sea de gran utilidad para los toxicólogos que visitan la revista, ya que en este documento se destacan procedimientos eminentemente de conducta animal, muy útiles en los estudios de toxicología de la reproducción, donde se explica a fondo el principio de cada una de estas pruebas y como realizarla, solo compete a los investigadores darle una explicación científica a los resultados que obtengan en cada una de estas pruebas al evaluar sus productos. Quisiéramos sino es mucho pedir que de existir alguna interrogante no dudaran en comunicarse con nosotros para poder ayudarlos, o se comunicaran con el cuerpo editorial de la revista el cual pudiera ayudar en la comunicación eficiente con los autores principales de este trabajo, así como agradeceríamos que de ser útil para ustedes también no los hicieran llegar.

Atentamente Colectivo de Autores.

Referencias Bibliográficas

1. Insel TR, Young LJ. The neurobiology of attachment. *Nature Rev* 2001; 2:129-134.
2. Slotnick BM. Disturbances of maternal behavior in the rat following lesions of the cingulate cortex. *Behaviour* 1967; 29:204-236.
3. Hall FC. Social deprivation on neonatal, adolescent, and adult rats has distinct neurochemical and behavioral consequences. *Crit Rev Neurobiol* 1998; 12:129-162.
4. McKinney WT. Overview of the past contributions of animal models and their changing place in psychiatry. *Semin Clin Neuropsychiatry* 2001; 6:68-78.
5. Ennaceur A, Michalikova S, Bradford A, Ahmed S. Detailed analysis of the behavior of Lister and Wistar rats in anxiety, object recognition and object location tasks. *Behav Brain Res* 2005; 159(2):247-266.
6. World Health Organization. General guidelines for methodologies on research and evaluation of traditional medicine, Ginebra: World Health Organization; 2000.p.37-49.
7. Piegorsch WW, Haseman JK. Statistical methods for analyzing developmental toxicity data. *Teratogenesis Carcinogenesis and Mutagenesis* 1991; 11:115-133.
8. Slavcheva D, Peteva D. Effects of Galantamine and Donepezil on Active and Passive Avoidance Tests in Rats With Induced Hypoxia. *Journ of Pharma Sciences* 2006; 101(3):199-204.
9. Annau Z. Neurobehavioral toxicology. Baltimore: The Johns Hopkins University Press.; 1986.p.347-386.
10. Moreau JL. Validation of an animal model of anhedonia, a major symptom of depression and activation. *Encephale* 1997; 23:280-289.
11. Willner P. Animal models as simulations of depression. *Trends Pharmacol Sci* 1991; 12:131-142.
12. Crawley JN. Learning and memory. What's wrong with my mouse?: behavioral phenotyping of transgenic and knockout mice. Wiley-Liss Edition; 2000.p.83-129.
13. Divya SN, Pal KK, Pilla I. Effect of locomotor activity on the passive avoidance test for the evaluation of cognitive function. *Indian Journal of Pharmacology* 2000; 32:242-245.

14. Minoru T, Hiroshi T, Teruhiko M. Modulation of Passive Avoidance in Mice by the 5-HT_{1A} Receptor Agonist Flesinoxan: Comparison with the Benzodiazepine Receptor Agonist Diazepam. *Neuropsychopharmacology* 2003; 28:664-674.
15. ICH Harmonised Tripartite Guideline. S7A: Safety Pharmacology Studies for Human Pharmaceuticals. Rockville, MD: International Council on Harmonization; 2000.p.35-37.
16. Chiba S, Nishiyama T, Yoshikawa M, Yamada Y. The Antinociceptive Effects of Midazolam on Three Different Types of Nociception in Mice. *J Pharmacol Sci.* 2009; 109:71-77.
17. Stepanovic MA, Vuckovic SM, Paranos S, Ugresic ND, Prostran MS. The antinociceptive effects of anticonvulsants in a Mouse visceral pain model. *Anesth Analg.* 2008; 106:1897-1903.
18. Fenández L, Fernández JC, Más R, Hernández C. Effects of D-002 on behavioral patterns in mice. *Rev CENIC Cienc Biol.* 2008; 39(3):143-147.
19. Fernández L, Más R, Fernández JC, Hernández C. Efectos del extracto de alcoholes purificados de la cera de abejas (*Apis mellifera*) en dos modelos de analgesia. *Rev Cub de Farm* 2010; 44(2):205-212.
20. MacPhail RC, Peele DB, Crofton KM. Motor activity and screening for neurotoxicity. *J. Am. Coll. Toxicol* 1989; (8):117-125.
21. Mark DJ, Semler DE, Shayne CG. Animal Models in toxicology. Chapter 3, The Rat. Toxicology. Second edition. New York (U.S.A): Published by Shayne C. Gad and Taylor & Francis Group, LLC; 2007.p.180-183.
22. Carbajal D, Molina V, Arruzazabala L. Interacción del D-003 con el Diazepan y la Aminofilina en roedores. *Rev CENIC Cienc Biol.* 2008; 39(2):92-96.
23. Organization for Economic Cooperation and Development. Guideline for the Testing of Chemicals No. 424: Neurotoxicity study in rodents. Paris: OECD; 1997.p.26-34.
24. Wier PJ, Ventre JR. Statistical analyses of reproductive and developmental toxicology studies. *Drug Information Journal* 1990; 24:395-405.

Recibido: 03/05/10

Aceptado: 05/05/10