



EFFECTO DEL DIAZEPAM Y LA CAFÉINA SOBRE LA ACTIVIDAD LOCOMOTRIZ DE LA RATA WISTAR

Contreras-Cortés Alfonso ^a, Gutiérrez-García Ana G ^{ab}, Guillén-Ruiz Gabriel ^b y Contreras Carlos M ^{bc}

^a Facultad de Psicología, Universidad Veracruzana, alph.c.cortes@gmail.com; angutierrez@uv.mx

^b Laboratorio de Neurofarmacología, Instituto de Neuroetología, Universidad Veracruzana, gguillen@uv.mx

^c Unidad Periférica Xalapa, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, ccontreras@uv.mx

RESUMEN

La evaluación de la actividad locomotriz se aplica frecuentemente para discernir acciones sedantes o estimulantes de los psicofármacos. La combinación de agonistas y antagonistas de receptores específicos con los psicofármacos permite comprender el sustrato neural subyacente. El presente estudio se llevó a cabo para evaluar el efecto de la administración de diazepam (2 mg/kg) y cafeína (15 mg/kg), tanto de forma separada como en combinación, sobre la locomoción en ratas en edad adulta y la posible repercusión de estos fármacos en animales que habían pasado por una sesión de estrés. Se formaron 8 grupos de ratas Wistar evaluadas en una prueba de locomoción de 3 horas de duración. La primera hora corresponde a un proceso de habituación y las siguientes dos, posteriores a la inyección de la sustancia en estudio, son de evaluación. Cuatro de estos grupos fueron sometidos a estrés mediante nado forzado y cuatro de ellos no. La cafeína aumentó significativamente ($p < 0.05$) tres veces la actividad locomotriz, con respecto al grupo control e independientemente de que los animales hubiesen sido sometidos a una sesión de estrés; en cambio, el diazepam no tuvo efecto. La combinación de ambos fármacos, indicó que el diazepam atenuó el aumento de la locomoción producida por la cafeína. El estrés por nado forzado disminuyó la actividad locomotriz ($p < 0.05$), pero los tratamientos farmacológicos carecieron de acciones detectables sobre los animales estresados, ya que la disminución de la actividad llegó a prácticamente niveles de cero, tanto en los grupos tratados como en el control. Se concluye que la evaluación de la actividad locomotriz espontánea a lo largo de tres horas, permite discernir la influencia de un fármaco sobre la locomoción y la duración de su efecto; sin embargo, esta prueba es poco sensible a los efectos de fármacos con acción depresora del sistema nervioso, por ocurrir un efecto de piso.

1. INTRODUCCIÓN

El descubrimiento de fármacos altamente efectivos para el tratamiento de enfermedades psiquiátricas ha estimulado la investigación farmacológica, especialmente en las áreas de la psicofarmacología (López-Rubalcava & Fernández-Guasti, 2004). Los psicofármacos pueden ejercer una gran variedad de acciones en el comportamiento que dependen, entre otros factores, de la interacción fármaco-conducta-ambiente (Torres Bares & Escarabajal Arrieta, 2004).

Uno de los temas que han interesado en la psicofarmacología es el efecto de los fármacos sobre la actividad locomotriz. El término locomotor significa movimiento de un lugar a otro, y en los roedores es un componente importante de la exploración espacial. Su estudio ha sido de gran importancia, ya que contribuye a la comprensión de los efectos que los fármacos tienen sobre la conducta, así como del sustrato neural subyacente (Kelley, 1993) y también es utilizada para evaluar las bases neuronales de los ritmos biológicos y etológicos. Algunos de los factores que pueden influir en la locomoción son el ritmo circadiano, el sexo, la cepa, la edad, las condiciones ambientales, la experiencia previa y la administración de ciertos fármacos (Novak, Burghardt, & Levine, 2012; Reinagel, 2014). En su mayor parte esta prueba se emplea para eliminar una acción de aumento



generalizado de la actividad locomotriz en ciertos casos en los que otras acciones de los fármacos pudiesen quedar enmascaradas por estas acciones. Por ejemplo, los antidepresivos habrán de aumentar ciertas pautas conductuales en otras pruebas como la de nado forzado o la de suspensión del rabo, sin afectar la motilidad, en tal caso se asume que las acciones del fármaco se establecen por acciones sobre la motivación y no sobre la locomoción.

A su vez, el estrés también puede afectar la locomoción, un caso típico es la prueba de nado forzado (Borsoi et al., 2015; Sequeira-Cordero, Mora-Gallegos, Cuenca-Berger, & Fornaguera-Trías, 2014). En esta prueba regularmente roedores son introducidos en un estanque con las paredes suficientemente altas como para impedir la salida de los animales. El roedor se ve forzado a mantenerse a flote y desplazarse continuamente, para en apariencia, encontrar una salida. Actualmente nuestro grupo de trabajo evalúa la actividad locomotriz del animal en un protocolo con una duración de tres horas de acuerdo con Pierce & Kalivas (2007). Brindando de esta manera un *screening* inicial para los efectos farmacológicos predictivos de la eficacia terapéutica de un fármaco (Pierce & Kalivas, 2007).

Dentro de los fármacos más utilizados para evaluar su efecto en la locomoción se encuentran la cafeína y el diazepam. La cafeína (1,3,7-trimetilxantina) es miembro de la clase de los alcaloides de metilxantinas, es la droga psicoactiva más consumida por el hombre (Hughes, Hancock, Henwood, & Rapley, 2014; Moratalla, 2008) y es un estimulante del sistema nervioso central. La capacidad de la cafeína para aumentar la actividad locomotriz en animales de experimentación es bien conocida (Fredholm, Bättig, Holmén, Nehlig, & Zwartau, 1999; Simola, Cauli, & Morelli, 2006). Por otro lado, el diazepam es un depresor del sistema nervioso central con acciones ansiolíticas clínicamente bien identificadas. Algunos fármacos con propiedades ansiolíticas reducen la actividad locomotriz espontánea, lo que puede influir en los resultados obtenidos en otras pruebas de ansiedad como el laberinto de brazos elevados (Walf & Frye, 2007). En síntesis, la prueba de actividad locomotriz también, permite detectar sustancias con efectos estimulantes o depresores del sistema nervioso central. Por lo tanto, el objetivo del presente estudio consistió en evaluar el efecto de la administración de diazepam (2 mg/kg) y cafeína (15 mg/kg), tanto de forma separada como en combinación, sobre la locomoción en ratas en edad adulta y la posible repercusión de estos fármacos en animales que habían pasado por una sesión de estrés por nado forzado.

2. PARTE EXPERIMENTAL

Sujetos experimentales

Se utilizaron 48 ratas macho de la cepa Wistar con un peso de 300-400 g, proporcionadas por el Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México. Fueron alojadas en cajas de acrílico traslúcidas (44 x 33 cm de base, 20 cm de altura, en grupos de 4) en el bioterio de estancia del Instituto de Neuroetología de la Universidad Veracruzana a temperatura ambiente, con un ciclo de luz-oscuridad de 12 h/12 h (7:00 AM a 7:00 PM), con acceso libre a agua y alimento (Harlan 2018S Teklad Global Rodent Diet). Todos los experimentos se llevaron a cabo durante el período de luz, en un horario comprendido entre las 8:00 a 15:00 h. Se siguió de forma estricta el Manual de Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM.

Pruebas conductuales

Actividad locomotriz

Cada rata fue colocada en el dispositivo de actividad motriz (Leticamodel LE 8811®, Panlab, España) formado por una base de Perspex negro de 44 X 45 cm, rodeada de cuatro paredes de Perspex transparente de 36 cm de altura, rodeada por dos marcos con 32 rayos infrarrojos conectados a una interfase (LE 8811®, IR motor activity monitor, LSI Leticia Scientific Instrument,



Barcelona, España) y a una computadora en la cual se recolectan y analizan los datos por medio del software (Actitrack v2.7.10 Panlab, S.L., Barcelona, España).

Protocolo

De acuerdo con Pierce y Kalivas (2007), este protocolo permite evaluar la influencia de un fármaco sobre la actividad motriz del animal, así como la duración del efecto, permitiendo que el sujeto se habitúe al entorno, descartando cambios ocasionados por la exposición a un ambiente novedoso y brindando únicamente cambios producidos por la sustancia administrada. Cada prueba tuvo una duración total de 3 horas. En la primera hora se colocó a la rata en el dispositivo de actividad permitiendo que se habitúe al aparato, esto minimiza el congelamiento inducido por la novedad del entorno y la exploración (Pierce & Kalivas, 2007). Al finalizar la hora de habituación se administró el tratamiento farmacológico correspondiente y la rata fue devuelta a la arena del dispositivo durante 2 horas más. El tiempo de análisis se dividió en intervalos de 20 minutos [-60, -40, -20, 20, 40, 60, 80, 100 y 120 min), durante los cuales se registró automáticamente la distancia (distancia total recorrida por el animal (cm), durante la prueba).

Grupos experimentales

Grupos control: Los sujetos de estos grupos experimentales (VEH, n= 6) recibieron una sola administración del vehículo: solución salina (SSB PISA®) en un volumen de 0.3 mL vía intraperitoneal (i.p).

Grupos de diazepam: Los sujetos asignados a estos grupos, inmediatamente recibieron por vía intraperitoneal (i.p) la dosis de 2.0 mg/Kg de diazepam (Valium 10, Hoffman-Roche, Basel, Suiza; DZP 2 mg/Kg, n= 6) en un volumen de 0.3 mL.

Grupos de cafeína: las ratas de estos grupos, posterior a la sesión de habituación, recibieron una administración vía intraperitoneal (i.p) de 15 mg/Kg de cafeína (Cafeína, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA; Caf 15 mg/Kg, n= 6) en un volumen de 0.3 mL. Esta dosis fue escogida como control positivo, puesto que incrementa la actividad locomotriz (Pham & Romeo, 2012).

Inductor de estrés

La prueba de nado forzado es un modelo usado generalmente para evaluar la potencia de los antidepresivos (Porsolt, Anton, Blavet, & Jalfre, 1978; Porsolt, Pichon, & Jalfre, 1977), y en varias investigaciones esta prueba se utiliza para inducir estrés en el animal (Habr, Macrini, Florio, & Bernardi, 2014; Pitychoutis et al., 2014; Shamsizadeh, Soliemani, Mohammad-zadeh, & Azhdari, 2013). La prueba de nado forzado consistió en colocar cada rata en un recipiente rectangular (30 X 50 cm de base, 60 cm de alto) con agua de 25 ± 1 °C y con 25 cm de profundidad. En la primera sesión (preprueba), el animal fue sometido al nado forzado por 15 minutos. Veinticuatro horas después, el animal fue sometido a las mismas condiciones de nado por 5 minutos (sesión de prueba, de acuerdo a Porsolt et al., 1977). No se cuantificó ninguna de las variables que generalmente son evaluadas en la prueba debido a que el objetivo de ésta era sólo inducir estrés en la rata.

Análisis estadístico

Se empleó el programa SigmaStat 12. Se utilizó un análisis de varianza (ANOVA) de 3 vías para muestras repetidas, teniendo como Factor A: los tratamientos (vehículo, diazepam y cafeína); como factor B: el tiempo (-60, -40, -20, 20, 40, 60, 80, 100 y 120 min) y como factor C: el estrés (sin nado forzado, con nado forzado). Sólo se aceptaron como diferencias significativas cuando se obtuvo una $p \leq 0.05$, en cuyo caso se utilizó como prueba *post hoc* el método de Holm-Sidak (HM). Los datos se representan como la media \pm el error estándar.



3. RESULTADOS

El análisis de la distancia total recorrida por el animal (cm) durante la prueba indicó lo siguiente. En el factor tratamiento (factor A), el ANOVA de tres vías indicó diferencias significativas entre los tratamientos [$F_{(3,360)} = 54.061, p < 0.001$]. La cafeína (CAF, 3234.5 ± 302.57) aumentó significativamente ($p < 0.05$, *post hoc* HM) la distancia recorrida con respecto a los tratamientos control (CTRL, 959.49 ± 161.82) y diazepam (DZ, 666.57 ± 106.56). Sin embargo, aunque la combinación de cafeína más diazepam (CAF+DZ, 1750.5 ± 143.65) atenuó el incremento inducido por la sola administración de cafeína, siguió siendo mayor la actividad locomotriz ($p < 0.05$) de los animales de este grupo con respecto a los tratamientos CTRL y DZ. Con respecto al Factor tiempo (factor B), también se encontraron diferencias significativas [$F_{(8,360)} = 17.906, p < 0.001$]. El análisis *post hoc* indicó que después de la administración, independientemente del tratamiento farmacológico, la actividad locomotriz disminuyó gradualmente durante los 120 minutos de registro. Con respecto al factor estrés (factor C), también se encontraron diferencias significativas [$F_{(1,360)} = 10.669, p < 0.001$]. La actividad locomotriz de los animales forzados a nadar, fue significativamente menor ($p < 0.05$) en comparación con las ratas que no nadaron. La interacción entre los tres factores A X B X C no fue significativa [$F_{(24,360)} = 0.464, p = 0.987$].

4. CONCLUSIONES

El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de la administración de diazepam y cafeína, tanto de forma separada como en combinación, sobre la locomoción en ratas en edad adulta y la posible repercusión de estos fármacos en animales que habían pasado por una sesión de estrés por nado forzado. Los resultados indicaron: a) la cafeína aumentó tres veces la actividad locomotriz, independientemente del estrés; el diazepam no tuvo efecto; b) la combinación de ambos fármacos, indicó que el diazepam atenuó el aumento de la locomoción producida por la cafeína; c) independientemente del tratamiento, la actividad locomotriz en un protocolo de duración larga, disminuye gradualmente; d) el estrés por nado forzado disminuye la actividad motriz de las ratas. No se encontraron interacciones entre los factores analizados, por lo que es posible también concluir que los tratamientos farmacológicos carecieron de acciones detectables sobre los animales estresados; y e) en los grupos no tratados y en el tratado con diazepam la actividad locomotriz rápidamente se redujo a prácticamente niveles de cero. Por tanto, el evaluar la actividad locomotriz espontánea a lo largo de tres horas, puede ser un modelo útil para discernir la influencia de un fármaco estimulante del sistema nervioso sobre la locomoción (Pierce & Kalivas, 2007), como es el caso de la cafeína; sin embargo, esta prueba es poco sensible a los efectos de fármacos con acción depresora del sistema nervioso, ya que se constituye un efecto de piso.

BIBLIOGRAFÍA

1. Borsoi, M., Antonio, C. B., Viana, A. F., Nardin, P., Gonçalves, C.-A., & Rates, S. M. K. (2015). Immobility behavior during the forced swim test correlates with BDNF levels in the frontal cortex, but not with cognitive impairments. *Physiology & Behavior*, *140*, 79–88. doi:10.1016/j.physbeh.2014.12.024
2. Fredholm, B. B., Bättig, K., Holmén, J., Nehlig, A., & Zvartau, E. E. (1999). Actions of Caffeine in the Brain with Special Reference to Factors That Contribute to Its Widespread Use. *Pharmacological Reviews*, *51*(1), 83–133.
3. Habr, S. F., Macrini, D. J., Florio, J. C., & Bernardi, M. M. (2014). Repeated forced swim stress has additive effects in anxiety behavior and in catecholamine levels of adult rats exposed to deltamethrin. *Neurotoxicology and Teratology*, *46*, 57–61. doi:10.1016/j.ntt.2014.10.001
4. Hughes, R. N., Hancock, N. J., Henwood, G. A., & Rapley, S. A. (2014). Evidence for anxiolytic effects of acute caffeine on anxiety-related behavior in male and female rats



- tested with and without bright light. *Behavioural Brain Research*, 271, 7–15.
doi:10.1016/j.bbr.2014.05.038
5. Kelley, A. (1993). Locomotor activity and exploration. In A. Sahgal (Ed.), *Behavioural Neuroscience* (pp. 1–21). New York, NY: Series Editors.
 6. López-Rubalcava, C., & Fernández-Guasti, A. (2004). Farmacología básica. In M. Corsi (Ed.), *Aproximaciones de las neurociencias a la conducta* (Segunda ed., pp. 199–207). México, DF.: Manual Moderno.
 7. Moratalla, R. (2008). Neurobiología de las metilxantinas. *Trastornos Adictivos*, 10(3), 201–207. doi:10.1016/S1575-0973(08)76368-2
 8. Novak, C. M., Burghardt, P. R., & Levine, J. a. (2012). The use of a running wheel to measure activity in rodents: relationship to energy balance, general activity, and reward. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 36(3), 1001–14. doi:10.1016/j.neubiorev.2011.12.012
 9. Pham, K., & Romeo, R. D. (2012). An Undergraduate Laboratory Exercise Examining the Psychomotor Stimulant Effects of Caffeine in Laboratory Rats. *The Journal of Undergraduate Neuroscience Education (JUNE)*, 10(2), A132–A139. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3598093/>
 10. Pierce, R. C., & Kalivas, P. W. (2007). Locomotor behavior. *Current Protocols in Neuroscience / Editorial Board, Jacqueline N. Crawley ... [et Al.]*, Chapter 8(July), Unit 8.1. doi:10.1002/0471142301.ns0801s40
 11. Pitychoutis, P. M., Sanoudou, D., Papandreou, M., Nasias, D., Kouskou, M., Tomlinson, C. R., ... Papadopoulou-Daifoti, Z. (2014). Forced swim test induces divergent global transcriptomic alterations in the hippocampus of high versus low novelty-seeker rats. *Human Genomics*, 8(4), 1–13. doi:10.1186/1479-7364-8-4
 12. Porsolt, R. D., Anton, G., Blavet, N., & Jalfre, M. (1978). Behavioral despair in rats: a new model sensitive to antidepressant treatment. *European Journal of Pharmacology*, 47, 379–391.
 13. Porsolt, R. D., Pichon, M. L., & Jalfre, M. (1977). Depression : a new model sensitive to the antidepressant treatment. *Nature*, 266, 730–732.
 14. Reinagel, P. (2014). Using rats for vision research. *Neuroscience*, 1–5. doi:10.1016/j.neuroscience.2014.12.025
 15. Sequeira-Cordero, A., Mora-Gallegos, A., Cuenca-Berger, P., & Fornaguera-Trías, J. (2014). Individual differences in the forced swimming test and neurochemical kinetics in the rat brain. *Physiology and Behavior*, 128, 6069. doi:10.1016/j.physbeh.2014.01.037
 16. Shamsizadeh, A., Soliemani, N., Mohammad-zadeh, M., & Azhdari, H. (2013). Permanent lesion in rostral ventromedial medulla potentiates swim stress-induced analgesia in formalin test. *Iran J Basic Med Sci*, 17(3), 209–215.
 17. Simola, N., Cauli, O., & Morelli, M. (2006). Sensitization to caffeine and cross-sensitization to amphetamine: Influence of individual response to caffeine. *Behavioural Brain Research*, 172, 72–79. doi:10.1016/j.bbr.2006.04.019
 18. Torres Bares, C., & Escarabajal Arrieta, M. D. (2004). Psicofarmacología: un enfoque psicobiológico. *Psiquiatría Biológica*, 11(5), 186–195.