



**Temerositat en rates heterogènies (N/Nih-HS):  
vers els gens quantitius de l'ansietat i la por**



**Regina López Aumatell**

**Tesi Doctoral dirigida per Albert Fernández Teruel**

**Universitat Autònoma de Barcelona, 2008**

Tesi Doctoral de  
Regina López Aumatell

**Temerositat en rates heterogènies (N/Nih-HS):  
vers els gens quantitius de l'ansietat i la por**

Departament de Biologia Cel·lular, de Fisiologia i d'Immunologia

Facultat de Medicina

Universitat Autònoma de Barcelona

Bellaterra 2008

Aquesta tesi ha estat supervisada pel Dr Albert Fernández-Teruel  
(Departament de Psiquiatria i Medicina Legal -Unitat de Psicologia  
Mèdica-, Universitat Autònoma de Barcelona)

El tutor d'aquesta tesi ha estat el Dr Enric Verdú Navarro (Departament  
de Biologia Cel·lular, de Fisiologia i d'Immunologia, Universitat  
Autònoma de Barcelona)

*Als meus pares*

En l'enorme misteri de la massa humana, l'anècdota és l'única esclatxa de la psicologia real. Tota la resta és cosa de laboratori, de conills i de rates

Josep Pla

## Agraïments

Moltíssimes gràcies a totes les persones que heu col·laborat en aquesta tesi. Sense vosaltres no hagués estat possible!

Gràcies Albert, el meu director: mai oblidaré la felicitat del dia que em vas trucar per dir-me que podia treballar amb vosaltres! Gràcies no només per compartir els teus coneixements infinits sobre ciència, sinó també per ensenyar-me a ser responsable i a tenir paciència. Gràcies per la teva confiança, la teva comprensió i la teva generositat. Grazie capo sobretot per haver estat un model a nivell personal, ja que sempre has demostrat que per a tu el més important és la gent.

La gent, els meus companys, que han esdevingut alguns dels meus millors amics i tot un exemple a seguir. Gràcies per haver-me ensenyat a riure'm de mi mateixa i per algunes de les nits més divertides de la meua vida, per ser uns amics extraordinaris, amb els que es pot comptar sempre, i també prendre el sol, filosofar, dir bajanades, fer el golafre, plorar i, sobretot, riure. Qui ens ho havia de dir, oi, Glòria? El primer dia que et vaig veure vaig pensar que una noia tan mona devia ser una creguda. I mica a mica em vas demostrar que ets fantàstica! Després de fer un pacte de no agressió, d'atacs de riure silenciosos, de cantar com gralles, de passejar un matalàs pel barri de Gràcia, hem acabat compartint totes les hores del món, m'has acollit a casa teua i m'has ensenyat la ciutat que més estimes: Roma! Gràcies Glory-Box. I gràcies Cañas, bueno, Toni, la primera persona amb qui vaig connectar, des d'aquella reunió en que estava com una boja. M'has ensenyat tantes coses (sobre experiments, disseccions, cura d'animals, animalades) que caldria un llibre per explicar-les. Sempre recordaré les confidències del primer estiu quan estàvem sols, a l'inici del projecte. Gràcies per haver estat sempre al meu costat, per haver tingut la paciència d'un sant, pel teu pessimisme realista i per dir-me que miri endavant. Gràcies a tots dos per haver-me deixat formar part del tripartit, per haver-me portat a mar obert cada cop que m'he quedat embarrancada i per no permetre que els contratemps em convertissin en una cínica.

Mercè, la meua primera mestra, moltes gràcies pels teus ensenyaments i sobretot pel teu exemple d'eficiència, constància i superació. Gràcies per la teua paciència infinita, per una amistat sòlida que va quallar mica a mica. Mai deixaré de somniar que tornem a treballar juntes. Marc, gràcies pel teu ajut directe, per haver fet bona part de la feina, per haver-me ensenyat tant sense esperar res a canvi, i sobretot pel teu respecte, fins i tot quan no comparties el meu criteri. Gràcies pels berenars de luxe en sales immenses, amb làmpades d'aranya i parets escrostonades, les caminades i les cançons absurdes, tan gracioses, a Barcelona i a Vienna. Èlia, la meua companya en el projecte, gràcies Peque pel teu ajut inestimable i per tot el que hem compartit. Gràcies per fer-vos càrrec de tots els experiments quan em vaig fer un esquinç al turmell, pel viatge a Edimburgh i Glasgow, pels farts de riure, tot espantant el mal fario. Esther,

gràcies a tu també per la teva col·laboració en els experiments, i sobretot per la teva alegria, la teva simpatia i la teva espontaneïtat. Gràcies Esther-Èlia per ser la combinació més mona del departament. Violante, eres tan majica, la mejor compañera de despacho del mundo. Hemos compartido grandes risotadas y galletas de tesis, y espero que algún día escribiremos “Ya que vas a morir, vive feliz”, lo digo muy en serio. Carne, gràcies per compartir la recta final i fer-la molt més agradable. Gracias Madeleine por ser tan mona, por compartir tantos desayunos y confidencias, por saber escuchar y dar consejos ansiolíticos. Gràcies Montsita per no enfadar-te mai quan et deia Madre i per acompanyar-nos en els nostres pícnicos bizarros. Quins temps!

Gràcies a tots els professors i companys de la Unitat, sobretot a l'Adolf i la Lydia pel vostre ajut inestimable en el projecte. Gràcies també a la Bea, la Yolanda i en Rafa pels consells sobre estadística, en Lluís García-Sevilla per les seves classes colossals, la Margarita, la Sandra, la Marta, l'Adelaida, la Juana, en Miquel Àngel, la Rosa Maria, l'Oscar, en Xavi, la Marta Pladevall, la Maria del Mar, la Jessica, la Miriam, en Vago, en Rui, la Bàrbara, la Mavi, en Santi, en Dung, l'Àlícia, la Paula i l'Helga.

Jonathan, thank you for the opportunity to work in your sci-fi lab and for being an example with your incredible success and incredible modesty. Thank you for your jokes, even when all my marks were black stars. Thanks to all the people in the WTCHG, Binnaz, Polinka, Ruth, Amarjit, Andrew, Amy, James Groves, Sagiv, Stuart, Dave, James Cleak, Carne, Christine, Javier, Antonio: thank you for your patience and your help. Special thanks to Guo-Jen, for teaching me how to dissect septums and amygdalas, and super special thanks to Martina, for your patience, for years answering my boring e-mails and stupid questions, for teaching me how to grab a pipet, and actually, all I know about molecular biology. Thank you for taking care of me when I was a bit lost in Oxford, and, of course, for making *be logical*, *be clever* come to my mind, instead of the bizarre solutions I used to find. Thanks to all the Euratools fellows for lots of fun, Amennai, Pernilla, Margarita, Johan, Jonathan, and Medya: we met in Prague, we shared our languages and now we share a flat in Barcelona!

Gràcies Paco i Teresa per haver-me recolzat sempre en els meus estudis i pels vostres esforços per entendre'm, per l'espai on he escrit bona part d'aquest treball, pels vostres mimos, pel menjar extraordinari del poble i per les vostres pregàries. Gràcies Joan i Judit, per ser els més monos del món, pel vostre suport incondicional i per parar la peli quan venia al vespre feta misto a donar-vos la tabarra. Gràcies Àngela i Paca, les meves àvies, per la il·lusió amb què heu viscut aquesta tesi.

Gràcies Bet i Blanca, les millors amigues de l'univers. Bet, gràcies per haver canviat alhora, per haver estat en el millor i en el pitjor, per fer que la vida semblés molt més fàcil, i pel viatge a Eivissa abans de la tesina. Blanca, gràcies per ser-hi sempre, fins i tot des de la distància, i sobretot per haver-me ajudat a acceptar-me més a mi mateixa amb la teva dissonància cognitiva extrema però increïblement convincent. Gràcies

Lluís, sobretot per compartir el viatge a Oxford. Gràcies Maria, Olivia, Raquel i Sandra, les cotxitas de la universitat, amb qui vaig iniciar aquesta aventura. Gràcies Ricard, Laia, Xitu, Yamile i Laura, els meus estimats amics de Manlleu, per fer-me costat encara que en els últims temps ens hàgim vist tan poc. Gràcies als professors que des de ben petita em van animar a estudiar. Gràcies a les persones de les assemblees contra la precarietat i de tercer cicle que lluiten perquè els becaris tinguem unes condicions millors.

Aquesta tesi no seria res sense les rates que van ser els subjectes experimentals, així que els faig una menció molt especial. Gràcies a les persones que vetllen pels drets dels animals i treballen per trobar alternatives al seu ús.

Durant aquests quatre anys he rebut una beca predoctoral FPI del Ministerio de Educación y Ciencia, i també una beca d'estada breu a l'estranger. El treball aquí contingut ha rebut suport de part del Ministerio de Educación y Ciencia (SAF2003-03480), DGR (2005SGR-00885) i del projecte europeu EURATools (*European Commission Contract* no. LSHG-CT-2005-019015).

## Sumari

En l'estudi de l'ansietat, models animals com ara les soques de rates *Roman High* i *Low-Avoidance* (RHA-I i RLA-I respectivament), seleccionades per llur alta o baixa adquisició de l'evitació activa en dos sentits, han demostrat tenir una gran validesa. A la primera part d'aquest treball es presenta l'avaluació d'aquestes soques a la prova de resposta de sobresalt potenciada per por i a la de condicionament de por clàssic. Tal com seria predictable, en base a la seva conducta en altres proves d'ansietat, les rates RLA-I van mostrar més potenciació per por de la resposta de sobresalt i més condicionament de por, mesurat com a resposta de petrificació.

En la segona part es presenta, per primera vegada, l'avaluació conductual d'una gran mostra de rates genèticament heterogènies N/Nih-HS en una bateria de sis proves d'ansietat incondicionada i condicionada. Les soques genèticament heterogènies són una eina molt valuosa pels estudis de mapeig genètic d'alta resolució de "QTLs" (*Quantitative Trait Loci*), que poden permetre la identificació de gens. L'anàlisi factorial de les dades mostra una estructura multidimensional de les conductes relacionades amb la por i l'ansietat. En tots dos sexes, s'obté ha un primer factor anomenat de "Timidesa" que agrupa totes les variables relacionades amb la por de les proves incondicionades, i un segon factor en el que pesen les mesures de resposta de sobresalt ("Fugida defensiva"). Així, el present treball proporciona evidència de que existeixen relacions entre conductes



d'ansietat incondicionades i d'altres condicionades. Els diferents tipus d'anàlisis estadístiques mostren resultats coherents, proporcionant per tant un cert índex de consistència interna. Els resultats d'aquest treball representen un bon punt de partida per al posterior estudi de marcadors genètics ("QTLs") de la conducta ansiosa en rates. De fet, es presenten dades preliminars que indiquen l'existència d'un QTL per a la conducta ansiosa, obtingut amb mètodes d'alta resolució, a la posició 100 Mb del cromosoma 5 de les rates N/Nih-HS. En la regió cromosòmica definida per aquest QTL es troben menys d'una desena de gens coneguts. Actualment, s'estan portant a terme estudis per avaluar la possible expressió diferencial d'aquests gens en àrees cerebrals vinculades a l'ansietat i la por en les rates RHA-I (poc ansioses) i RLA-I (molt ansioses).

# Índex de continguts

|  |    |
|--|----|
| <b>INTRODUCCIÓ</b> .....   | 19 |
| 1. Temerositat i respostes de defensa específiques de l'espècie: aspectes conductuals i neurobiològics ..... | 19 |
| 1.1. Mesures clàssiques i modernes de la temerositat en rosegadors de laboratori.....                        | 19 |
| 1.2. Sistemes nerviosos conceptuals i circuits neurals mitjancers de l'ansietat i la por.....                | 23 |
| 1.3. Ansietat, por i resposta de sobresalt: disseccionant mecanismes neurals compartits o independents ..... | 32 |
| 2. Psicogenètica de la temerositat.....  | 36 |
| 2.1. Investigació psicogenètica clàssica en rosegadors .....   | 36 |
| 2.2. Estudis en altres espècies i en humans.....   | 43 |
| 2.3. Primers estudis de genètica quantitativa de l'ansietat en rosegadors ...                                | 45 |
| 3. Estudis recents amb soques genèticament heterogènies: "caçant gens de QTLs per l'ansietat" .....          | 51 |
| 3.1. En ratolins.....  | 51 |
| 3.2. En rates .....  | 53 |
| <b>PLANTEJAMENT DEL TREBALL I OBJECTIUS</b> .....  | 55 |
| <b>MATERIALS I MÈTODE</b> .....  | 57 |
| 1. Estudi I (Article I).....   | 57 |
| 2. Estudi II (article II) .....  | 61 |
| <b>SUMARI DELS RESULTATS</b> .....   | 69 |
| 1. Resposta de sobresalt i condicionament de por en rates Roman (article I).....                             | 69 |

|   |     |
|---|-----|
| 2. Temerositat en rates genèticament heterogènies (article II).....   | 69  |
| 3. Resultats addicionals .....  | 70  |
| 3.1. Article III.....   | 70  |
| 3.2. Article IV .....   | 71  |
| 3.3. Anàlisis genètiques (QTLs) preliminars .....   | 72  |
| <b>DISCUSSIÓ</b> .....  | 74  |
| 1. Les soques RHA-I i RLA-I com a model d'ansietat/ temerositat: resposta de sobresalt i condicionament clàssic de por (Article I).....     | 74  |
| 2. Multidimensionalitat de la conducta ansiosa en rates N/Nih-HS .....  | 80  |
| 2.1. Timidesa i fugida defensiva en rates heterogènies: comparació amb les rates Roman (Articles II, III i IV) .....                        | 80  |
| 2.2. Indiquen les relacions entre resposta de sobresalt i aprenentatge d'evitació a la <i>Shuttlebox</i> diferents mecanismes neurals?..... | 90  |
| 3. Vers els gens quantitius de l'ansietat en rates: visió global i futur immediat.....  | 94  |
| <b>CONCLUSIONS</b> .....  | 102 |
| <b>REFERÈNCIES BIBLIOGRÀFIQUES</b> .....  | 105 |
| <b>ANNEXOS</b> .....  | 129 |

## Abreviatures

5-HT: 5-hidroxitriptamina o serotonina

ACT: Activitat en caixa nova automatitzada

ACTH: Corticotropina

BAS: *Behavioural Approach System* (Sistema d'Aproximació Conductual)

BIS: *Behavioural Inhibition System* (Sistema d'Inhibició Conductual)

CBN: Caixa blanca-negra

CRF: Hormona alliberadora de corticotropina

FFFS: *Fight/Freezing/Flight* (Sistema de "luita/petrificació/fugida")

GABA: Àcid gamma-amino-butíric

HAB: Rates de la soca *High anxiety-related behaviour*

LAB: Rates de la soca *Low anxiety-related behaviour*

LZE: Laberint en "zero" elevat

NMDA: N -methyl-D-aspartat

N/Nih-HS: Estoc de rates genèticament heterogènies

QTL: *Quantitative Trait Locus* ("loci" cromosòmics per a trets quantitius)

RHA-I: Rates Roman High-Avoidance consanguínies

RHA: Rates Roman High-Avoidance no consanguínies

RLA-I: Rates Roman Low-Avoidance consanguínies

RLA: Rates Roman Low-Avoidance no consanguínies

SHA: Rates de la soca *Syracuse High-Avoidance*

SHS: Sistema septohipocàmpic

SLA: Rates de la soca *Syracuse Low-Avoidance*

## Introducció

### 1. Temerositat i respostes de defensa específiques de l'espècie: aspectes conductuals i neurobiològics

#### 1.1. Mesures clàssiques i modernes de la temerositat en rosegadors de laboratori

L'ansietat i la por són estats interns subjacents (implícits) que cal inferir, i és per això que per a estudiar-los s'ha recorregut a l'observació i a l'anàlisi de la conducta suposadament associada amb estats emocionals en proves de laboratori en animals, tot partint de la consideració evolutiva que les característiques de la conducta relacionada amb la por estan ben conservades entre espècies (p. ex. Boakes, 1984; Liebsch *et al.*, 1998). Bona part de la recerca es basa en la mesura de respostes arbitràries (p.ex. prémer una palanca, o d'altres respostes manipuladores), però cada vegada més els investigadors es centren en respostes defensives típiques de cada espècie (p.ex. fugida i conducta de petrificació) tant en animals (ocells, rosegadors i primats) com en humans. Aquesta iniciativa d'estudiar repertoris més genuïns prové de la importància que han demostrat tenir determinats substrats biològics en les conductes defensives i relacionades amb la temerositat (Gray, 1987; LeDoux, 1996; Davis *et al.*, 1993).

S'ha fet un progrés enorme en els últims anys en la neurociència conductual de la temerositat i l'ansietat. Per exemple: 1) les bases neurobiològiques d'una forma simple de por apresada, anomenada condicionament clàssic Pavlovà,

s'han delimitat en rates, així com en primats i en humans, utilitzant conducta de petrificació i el reflex de sobresalt com a mesures diana (Fendt i Fanselow, 1999; Lang *et al.*, 2000; LeDoux, 1996; Davis *et al.*, 1993; Davis, 1998); 2) l'anàlisi de la conducta d'evitació activa en dos sentits (així com la fugida) en rates i en gossos entrenats en caixes de vaivé (*Shuttlebox*) constitueix un fonament per a la construcció de les principals teories de por i aprenentatge d'evitació (ex. Levis, 1989; 1991; Mineka, 1979) i fins i tot d'alguns tipus de depressió (representats principalment pel model de "*learned helplessness*" o indefensió apresada; ex. Dalla *et al.*, 2008; Drugan *et al.*, 1997; Maier, 1990; Seligman i Weiss, 1980); i 3) el coneixement actual de les bases genètiques i moleculars de l'ansietat està centrat principalment en mesures de defecació, deambulació/exploració i petrificació en rosegadors sota condicions de novetat, estressants, o de condicionament clàssic aversiu (p.ex. Flint *et al.*, 1995; Solberg *et al.*, 2006; Wehner *et al.*, 1997).

Tant en animals com en humans, el repertori de conductes defensives dóna respostes adaptatives a desafiaments amenaçadors, adaptant-se ràpidament, ja que aquests poden ésser molt variats i complexos. De l'eficàcia d'aquestes respostes sovint en depèn la supervivència, així doncs no és sorprenent que algunes zones del nostre cervell estiguin dedicades al processament especialitzat de les amenaces. Un bon exemple d'aquests sistemes cerebrals és la doble via descrita en base al condicionament de por (Davis, 1997; Davis *et al.*, 1993; LeDoux, 1995; LeDoux, 1996; Phillips i LeDoux 1992). Així s'ha diferenciat un circuit en el que la informació visual sobre un estímul amenaçador és enviada a l'amígdala via tàlem, processant els estímuls de

forma ràpida i provocant una reacció defensiva immediata (p.ex.: sobresalt, tensió muscular, fugida): aquesta via ha estat descrita com a “ràpida i grollera”. El segon circuit comunica el tàlem amb les múltiples capes de l'escorça visual, on els estímuls amenaçadors són processats detalladament, donant-ne una definició precisa. Aquesta informació més elaborada s'envia a l'amígdala per permetre una resposta emocional eficient i ajustada: aquest camí és vist com a “lent i sofisticat” (Davis, 1997; LeDoux, 1996).

En animals, els estats emocionals que acompanyen les conductes de defensa (com per exemple la por i l'ansietat) poden ser distingits en funció de la presència o absència d'estímuls elicitadors (p.ex. Blanchard *et al.*, 1990; 1993; Gray i McNaughton, 2000). Blanchard i col·laboradors (1993) diferencien entre respostes de por i d'ansietat confrontant rates amb depredadors, per exemple un gat anestesià (*Fear/defence test battery: F/DTB*), o bé exposant-les a situacions o olors associades amb aquest depredador (*Anxiety/defence test battery: A/DTB*). Aquests autors han observat que rates salvatges enfrontades a un gat, l'amenaça real, en la F/DTB, exhibeixen quatre varietats de resposta defensiva: fugida, petrificació, amenaça defensiva i atac defensiu. La transició de l'una a l'altra depèn especialment de la distància entre la presa i el depredador, és a dir, la por és més gran com més petita és la distància. La fugida és la resposta predominant quan hi ha una via d'escapada disponible i la distància defensiva està entre 1 i 5 metres. Si la fugida no és possible, la resposta de por predominant és la conducta de petrificació (immobilitat tensa i vigilant, amb tota l'atenció centrada en l'estímul amenaçador). És una resposta molt habitual i adaptativa, ja que el moviment fa que la rata pugui ser detectada

per un depredador més fàcilment (Fendt i Fanselow, 1999). Quan la distància del depredador està entre 0,5 i 1 m les vocalitzacions sòniques i ensenyar les dents serveixen d'amenaça defensiva, per intentar aturar l'atac del depredador. Finalment, les rates fan atac defensiu a distàncies properes al contacte (menys de 0,5 m), que pot ser precedit, a distàncies més grans, per atac de salt orientat al depredador (una possible forma de resposta de sobresalt potenciada per por). En canvi, l'ansietat és provocada en l'A/DTB exposant rates a l'olor de gat, així com posant-les al lloc on prèviament havien vist el gat, ja que hi ha estímuls associats amb el depredador que poden predir finalment la seva presència (amença potencial, que és equivalent a un estímul condicionat aversiu). En aquest cas les rates salvatges fugen immediatament a un lloc protegit, on poden romandre immòbils durant hores o dies. L'ur principal activitat consisteix en mostrar conductes d'avaluació de risc (p.ex. postures d'aproximació), per comprovar si el depredador encara és a prop. En aquestes condicions, conductes no defensives com són menjar, beure o l'activitat sexual són abandonades temporalment (Blanchard *et al.*, 1990; Griebel *et al.*, 1996).

Les troballes farmacològiques recolzen les definicions anteriors de les respostes de por i ansietat. Per exemple, en estudis etofarmacològics, Blanchard i col·laboradors (1993) observaren, utilitzant els sistemes esmentats en el paràgraf anterior, que el patró de conductes que mostren les rates davant d'una amenaça potencial (activitats d'avaluació del risc en el model A/DTB) està afectat per drogues ansiolítiques, mentre que les conductes relacionades amb amenaces reals, com es veuen en la F/DTB, no estan afectades de la mateixa manera per aquests fàrmacs. Com veurem a continuació, l'evidència



neurofisiològica també recolza certes diferenciacions entre respostes d'ansietat i por i el seu processament neural.

## 1.2. Sistemes nerviosos conceptuals i circuits neurals mitjancers de l'ansietat i la por

Com hem vist, Blanchard i col·laboradors argumenten que la por està provocada, sobretot, per estímuls amenaçadors reals, pels que existeix opció d'evitar-los o bé fugir-ne (Figura 1a). D'altra banda, estímuls amenaçadors potencials (també evitables) induïrien maniobres vinculades amb l'ansietat (Figura 1b). La "distància defensiva" (distància del depredador) determinaria el tipus de respostes o conductes defensives que es realitzin (Blanchard *et al.*, 1990; 1993; Griebel *et al.*, 1996).

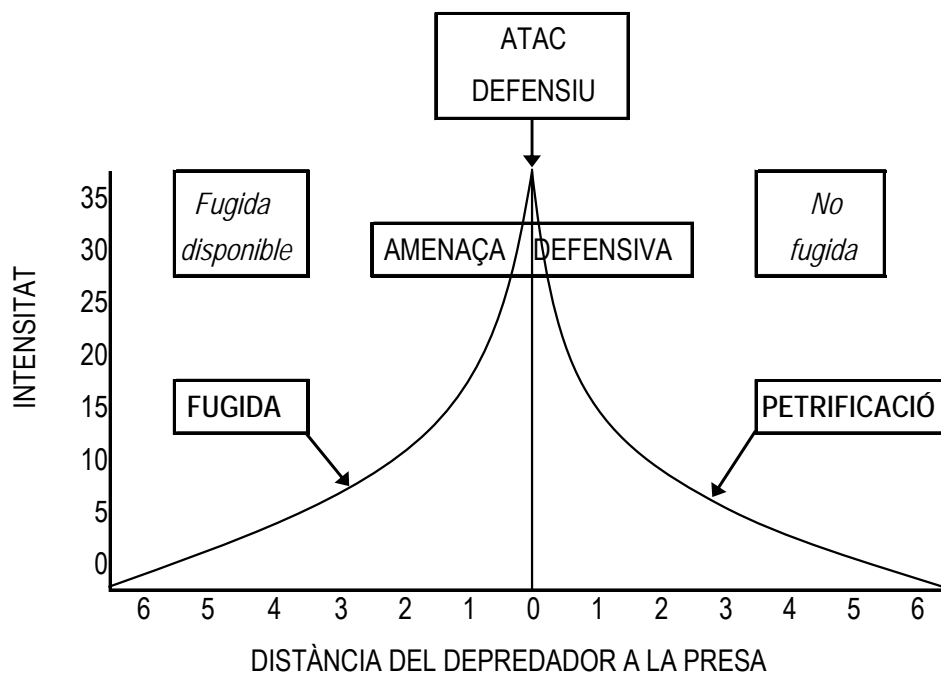


Figura 1a. Evitació defensiva: relació entre distància defensiva i conducta de por (adaptat de McNaughton i Corr, 2004)

Gray i McNaughton (2000; McNaughton i Gray, 2000; vegeu també Gray, 1982) han utilitzat aquestes distincions per a elaborar una teoria neuropsicològica integradora en la que es considera que la por i l'ansietat són molt semblants l'una a l'altra en alguns aspectes (p. ex. porten associada una activació – *arousal*- psicofisiològica semblant) mentre que són essencialment distingibles des d'un punt de vista jeràrquic basat en les estructures cerebrals involucrades. Gray i McNaughton (2000) incorporen, al concepte de distància defensiva, el de “direcció defensiva”: una dimensió categòrica en que l'evitació de l'amenaça (ex: evitació activa) correspondria a la por, i l'aproximació a aquesta (ex: avaluació del risc), a l'ansietat (McNaughton i Corr, 2000) (vegeu Figura 1b i Figura 2).

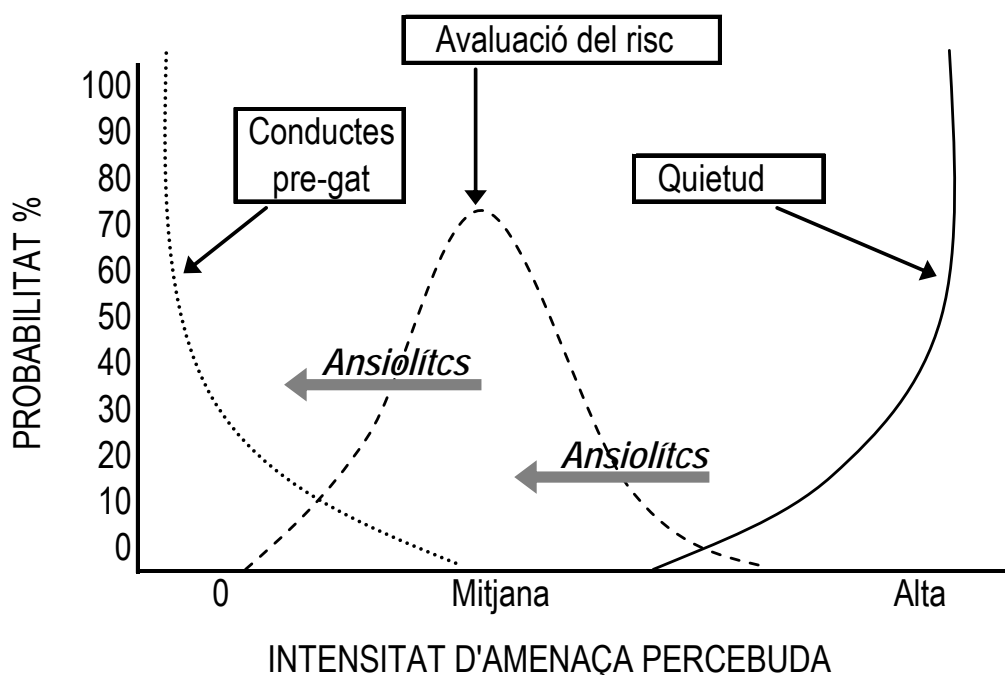


Figura 1b. Aproximació defensiva: relació entre distància defensiva i conducta o resposta d'ansietat (adaptat de McNaughton i Corr, 2004)

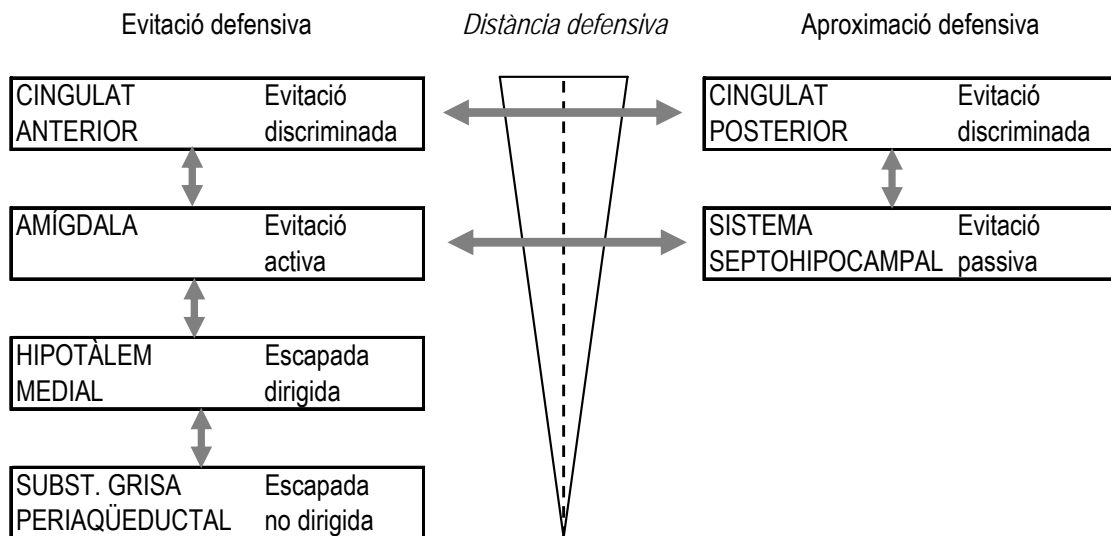


Figura 2. Sistema neural bidimensional de Gray i McNaughton (adaptat de McNaughton i Gray, 2000)

La direcció defensiva determinaria no només el tipus de conductes defensives, sinó també la seva sensibilitat als ansiolítics, ja que aquests redueixen essencialment l'ansietat, i no tant la por. Les conductes relacionades amb la por (p.ex. lluita i/o fugida) són apropiades quan hi ha un perill present, i les relacionades amb l'ansietat ho són quan hi ha incertesa sobre l'existència d'un perill real (p.ex. avaluació del risc). D'acord amb aquests autors (vegeu Figura 2), les dues dimensions psicològiques estan mapejades en dimensions neurals subjacents. La distància defensiva és contínua i està mapejada a un nivell neural en el que les distàncies defensives més curtes impliquen el nivell neural més baix (substància grisa periaquëductal), i les distàncies més llargues, el nivell neural més alt de la jerarquia (escorça prefrontal). La direcció defensiva estaria mapejada en corrents separats i paral·lels que corren a través d'aquests nivells (McNaughton i Corr, 2004) (vegeu Figura 2).

Com s'articulen aquests diferents nivells o jerarquies neurals per determinar, en funció de la distància i direcció defensives (i del nivell de conflicte), el tipus de resposta o *output*? Com es mostra a la Figura 3 (Gray i McNaughton, 2000), les sortides conductuals dependrien de l'actuació de tres sistemes neurals encarregats de processar estímuls de càstig o de reforçament positiu, innats o condicionats, així com també els relacionats amb situacions de novetat.

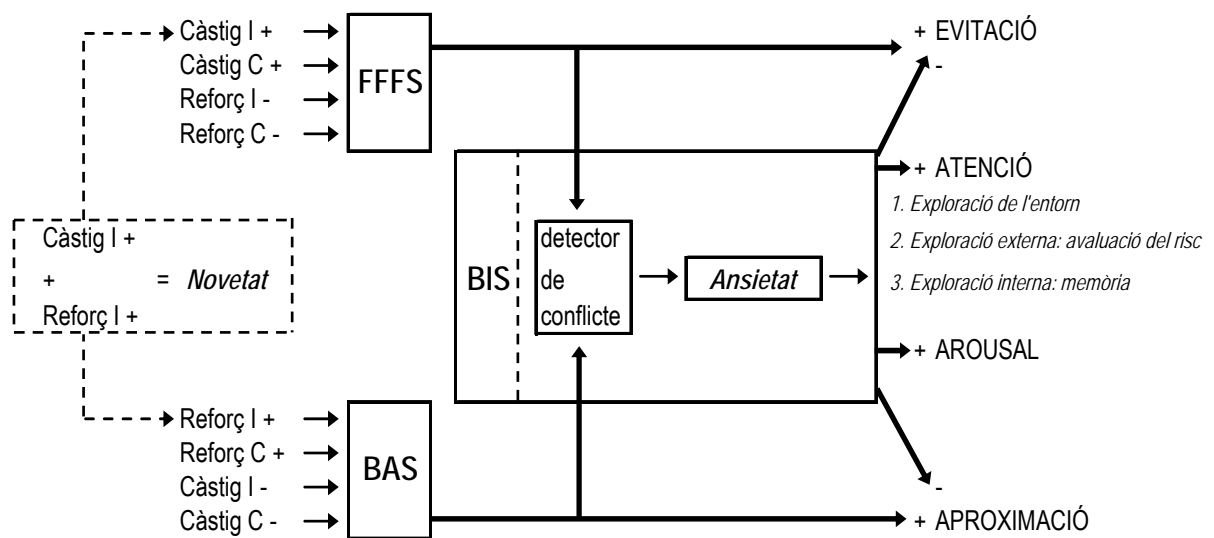


Figura 3. Processament dels diferents tipus d'estímuls pels BAS, FFFS i BIS, i interacció entre aquests sistemes per a generar determinades respostes (adaptat de Gray i McNaughton, 2000; McNaughton i Corr, 2004)

El sistema de "lluita/petrificació/fugida" (*Fight/Freezing/Flight: FFFS*; Figura 3) és subjacent a la fugida, l'agressió defensiva, la conducta de petrificació i l'activitat autonòmica associada. Inclou l'amígdala i l'hipotàlem (Figura 2), i és sensible als opiacis (revisat per Flint, 2004). Mitjança els efectes conductuals del càstig o del no-reforçament incondicionats. El FFFS tracta amb el perill explícit que es pot evitar o del que es pot escapar (McNaughton i Corr, 2004).

Un segon sistema seria el Sistema d'Aproximació Conductual (*Behavioural Approach System: BAS*), del que els sistemes moduladors més probables són el sistema mesolímbic dopaminèrgic a nivell neural, i els opioïds endògens a nivell hormonal. La idea que el nucli accumbens (part del sistema mesolímbic dopaminèrgic) exemplifica el BAS és consistent amb la seva implicació en l'*arousal* apetitiu, la facilitació de processos de reforçament i seqüències de resposta flexibles, incloent aproximació a senyals de seguretat (Gray i McNaughton, 2000). El tercer sistema, el Sistema d'Inhibició Conductual (*Behavioural Inhibition System: BIS*), és subjacent als aspectes cognitius i d'informació del processament de l'ansietat. Inclou la formació hipocampal, l'àrea septal i estructures cortico-límbiques relacionades. És sensible als ansiolítics (benzodiazepines) i la seva principal resposta activadora és el control de l'activitat hipocampal *theta*: els ansiolítics empitjoren aquesta funció, reduint la inhibició, i per tant la conducta ansiosa (McNaughton i Gray, 2000; vegeu Figura 3). El BIS mitjança respostes de por elicitades per estímuls de càstig secundaris (estímuls condicionats aversius) i frustració condicionada. Respon a estímuls nous i a estímuls de por innats. La detecció de conflicte per part del BIS té tres efectes diferents: suprimeix l'aproximació, suprimeix l'evitació i elicitava conducta d'avaluació de risc.

Per tant, el BIS, representat neuralment pel sistema septohipocàmpic (SHS), actua contínuament com un comparador que "resol" conflictes. Així, quan es dona un conflicte entre tendències de resposta, perquè la direcció defensiva és incerta, el subjecte haurà de canviar sovint i ràpidament entre respostes de por (possiblement mitjançades per l'amígdala i estructures relacionades) i

respostes d'ansietat. En general els dos tipus de respostes són oposats i incompatibles, i per tant requereixen un sistema, com el SHS, que resolgui el conflicte entre elles (McNaughton i Corr, 2004). Un exemple pràctic i aclaridor de l'anterior pot ser el paradigma d'adquisició de l'evitació activa en dos sentits. Als estadis inicials d'aquesta tasca, els animals (normalment rates o ratolins), s'enfronten a un conflicte d' "evitació activa/ evitació passiva", és a dir, a una situació en la qual la conducta més adaptativa és creuar al compartiment oposat (en presència de l'estímul condicionat o de l'estímul incondicionat –EI–) en el qual ja han rebut xoc elèctric (EI). Per tant, a la tendència de creuar al compartiment oposat s'oposa la tendència a fer petrificació condicionada (condicionament clàssic aversiu, evitació passiva). És a dir, en els inicis d'aquesta tasca la direcció defensiva és incerta. Durant aquestes fases inicials les rates de laboratori solen mostrar diferents conductes que reflecteixen el conflicte: conducta d'avaluació de risc (treure el cap i part del cos per la porta cap al compartiment oposat i retirar-se sobtadament), creuaments veloços al compartiment oposat en el període de descans entre assaigs, petrificació en el compartiment actual. Els fàrmacs ansiolítics acceleren el procés d'aprenentatge en el sentit de que provoquen que apareguin abans respostes de "pseudo-evitació" (creuaments en el període de descans entre assaigs) i d'evitació activa. Així doncs, els fàrmacs ansiolítics provoquen una desinhibició conductual accelerada, tot permetent que el conflicte "evitació passiva- evitació activa" es resolgui més ràpidament i la "direcció defensiva" esdevingui més clara per a la rata. El resultat és que els animals comencen més aviat a fer creuaments cap al compartiment oposat (en lloc de petrificació) i per tant, aprenen més ràpid la conducta (més adaptativa) de fugida/evitació (ex. Boix *et*

*al.*, 1988; Escorihuela *et al.*, 1993; Fernández-Teruel *et al.*, 1991b; Gray, 1982; Gray i McNaughton 2000; McNaughton i Gray 2000; Prunell *et al.*, 1994a-b).

Segons Gray i McNaughton, tant el FFFS com el BIS explicarien l'ansietat normal així com els trastorns d'ansietat en humans (Figura 4).

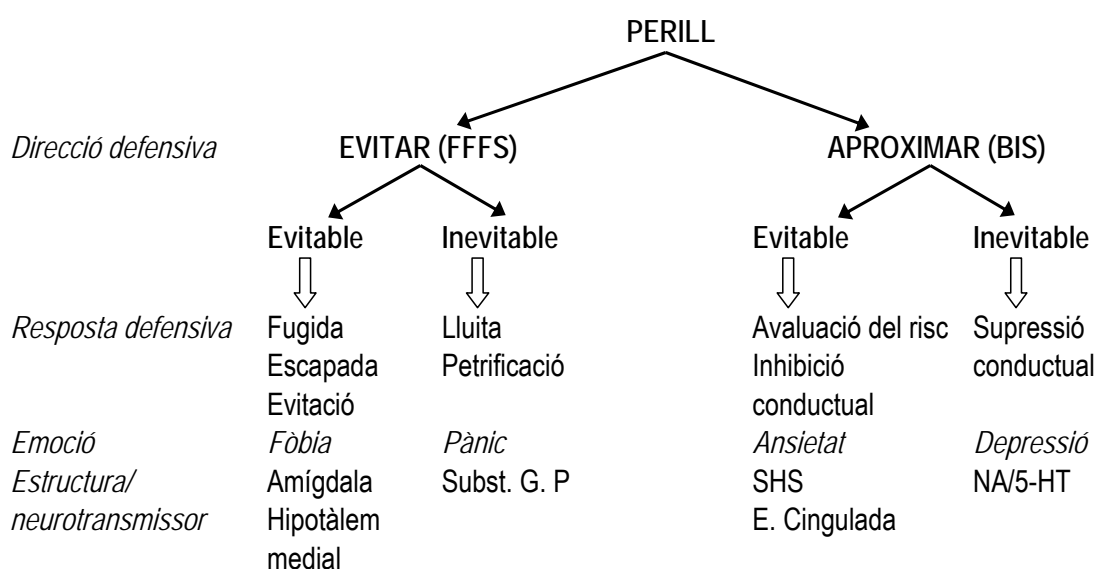


Figura 4. Respostes defensives i emocions (normals i anòmales), en funció de la direcció defensiva i de si l'amenaça és evitable (adaptat de McNaughton i Corr, 2004)

Partint de les concepcions de Gray (1982) s'han desenvolupat instruments per mesurar l'activitat del constructe conceptual del BIS. És oportú recordar aquí que Gray (1982) va reformular la teoria de la personalitat d'Eysenck, proposant que un gir d'aproximadament 30° dels eixos "N" (neuroticisme o estabilitat emocional) i "E" (extraversió) conformaria les dimensions de susceptibilitat al càstig (SC, ansietat) i susceptibilitat al reforçament (SR, impulsivitat i/o percaça de reforçament positiu) (vegeu revisions a Caseras *et al.*, 2003; Torrubia *et al.*, 2001; Torrubia i Tobeña, 1984). El treball de Torrubia i col·laboradors (ex. Àvila

i Parcet, 2000; Torrubia i Tobeña 1984, Torrubia *et al.*, 2001) durant les últimes dues dècades ha donat un suport empíric considerable a les formulacions de Gray (1982) i Gray i McNaughton (2000). Per exemple, Barrós-Loscertales i col·laboradors (2006) van observar que l'activitat del BIS, mesurada amb l'escala de SC, està associada amb un major volum de matèria grisa a l'amígdala i a l'hipocamp ventrals (l'amígdala ventral s'associa amb l'adquisició de respostes de por, i l'hipocamp ventral amb l'ansietat). Congruentment, Caseras i col·laboradors (2006) van observar interacció significativa entre altes o baixes puntuacions a l'escala SC (alta o baixa activitat del BIS) i resposta a imatges de por. En aquest estudi es va comprovar que els participants del grup d'alta activitat BIS mostraven potenciació de la resposta de sobresalt per por, i els del grup de baixa activitat BIS no la mostraven.

En resum, els diferents estudis portats a terme amb la mesura en humans del constructe del BIS (tal i com proposaren Gray, 1982 i Gray i McNaughton, 2000) representada per les puntuacions dels subjectes en l'escala SC permeten concloure que la teoria de les bases neurals de l'ansietat d'aquells autors ha rebut considerable suport empíric, com indiquen els següents resultats: 1) aquesta mesura està altament correlacionada amb altres mesures relacionades amb el BIS ben conegudes (Caseras *et al.*, 2003; Smillie i Jackson, 2005) i també amb símptomes conductuals i cognitius de l'ansietat (Torrubia *et al.*, 2001); 2) pacients amb trastorn obsessiu compulsiu i pacients amb trastorns de la personalitat del *cluster* C obtenen puntuacions altes a l'escala SC, mentre que pacients amb psicopatia primària obtenen puntuacions baixes (Caseras *et al.*, 2001; Fullana *et al.*, 2004; Newman *et al.*, 2005; Pinto-



Meza *et al.*, 2006); 3) els resultats d'estudis conductuals també han donat suport al model de Gray ja que demostren que individus amb puntuacions altes a l'escala de SC aprenen millor en paradigmes d'aprenentatge d'evitació passiva i d'extinció, i a més tenen major tendència a centrar la seva atenció en estímuls amenaçadors (Ávila, 2001; Ávila *et al.*, 1999; Ávila i Parcet, 2002; Ávila i Torrubia, 2006; Torrubia *et al.*, 1995).

Per la seva banda, Blanchard i col·laboradors (2001) van comprovar que conductes defensives (fugir, fer conducta de petrificació, amagar-se, atacar, avaluar el risc) humanes podrien ésser considerades anàlogues a les dels rosegadors. Perkins i Corr (2006) van replicar aquest estudi i van relacionar les conductes defensives amb la personalitat, basant-se en el suggeriment de Gray i McNaughton (2000) que el neuroticisme és un constructe de la personalitat que mesura la percepció de la distància defensiva, independentment de la direcció defensiva. Efectivament, van observar correlació positiva entre por i evitació de l'amenaça, i entre el tret ansietat i orientació cap a l'amenaça. Van observar que les dones responien amb més intensitat defensiva, feien més conducta d'avaluació del risc i que preferien fugir de l'amenaça. Els homes estaven més predisposats a lluitar o fins i tot atacar (Perkins *et al.*, 2007; Perkins i Corr, 2006).

En conclusió, els resultats indiquen que el model de Gray i les aportacions de Blanchard i col·laboradors són aplicables també als fenòmens relacionats amb la por i l'ansietat en humans, cosa que encara fa més rellevant el seu estudi experimental en animals.

### **1.3. Ansietat, por i resposta de sobresalt: disseccionant mecanismes neurals compartits o independents**

La resposta de sobresalt consisteix en la contracció dels músculs, la immobilitat i l'augment de la taxa cardíaca en resposta a un estímul intens i sobtat. Probablement protegeix l'organisme de l'atac de depredadors. La via de la resposta de sobresalt acústic incondicionat (o basal) està mitjançada per un circuit situat en el tronc de l'encèfal (Koch, 1999). De fet, consisteix en tan sols tres sinapsis: a les neurones de l'arrel coclear, a les del nucli reticular pontí caudal i a les motoneurones de la medul·la espinal (Davis, 1998; Figura 5).

El procediment de la resposta de sobresalt permet diverses variacions i mesures que poden, al seu torn, implicar mecanismes neurals diferenciats. Així, Davis i col·legues (p.ex. Boulis i Davis, 1989; Davis, 1989) van desenvolupar el paradigma de sensibilització al xoc en la prova de sobresalt per estudiar el que havia d'ésser una forma de por no apresada en rates, relacionada hipotèticament amb estats d'ansietat generalitzada. Un avantatge important d'aquest procediment era la possibilitat de dissociar les bases neuroanatòmiques de la por i l'ansietat. Contràriament a aquesta hipòtesi s'ha demostrat que la por apresada (condicionament de la por al context) també juga un paper en la sensibilització per xoc de la resposta de sobresalt (p. ex. Richardson, 2000). Així doncs els dos processos (ansietat no apresada i por apresada) podrien explicar una part de l'efecte de potenciació per sensibilització.

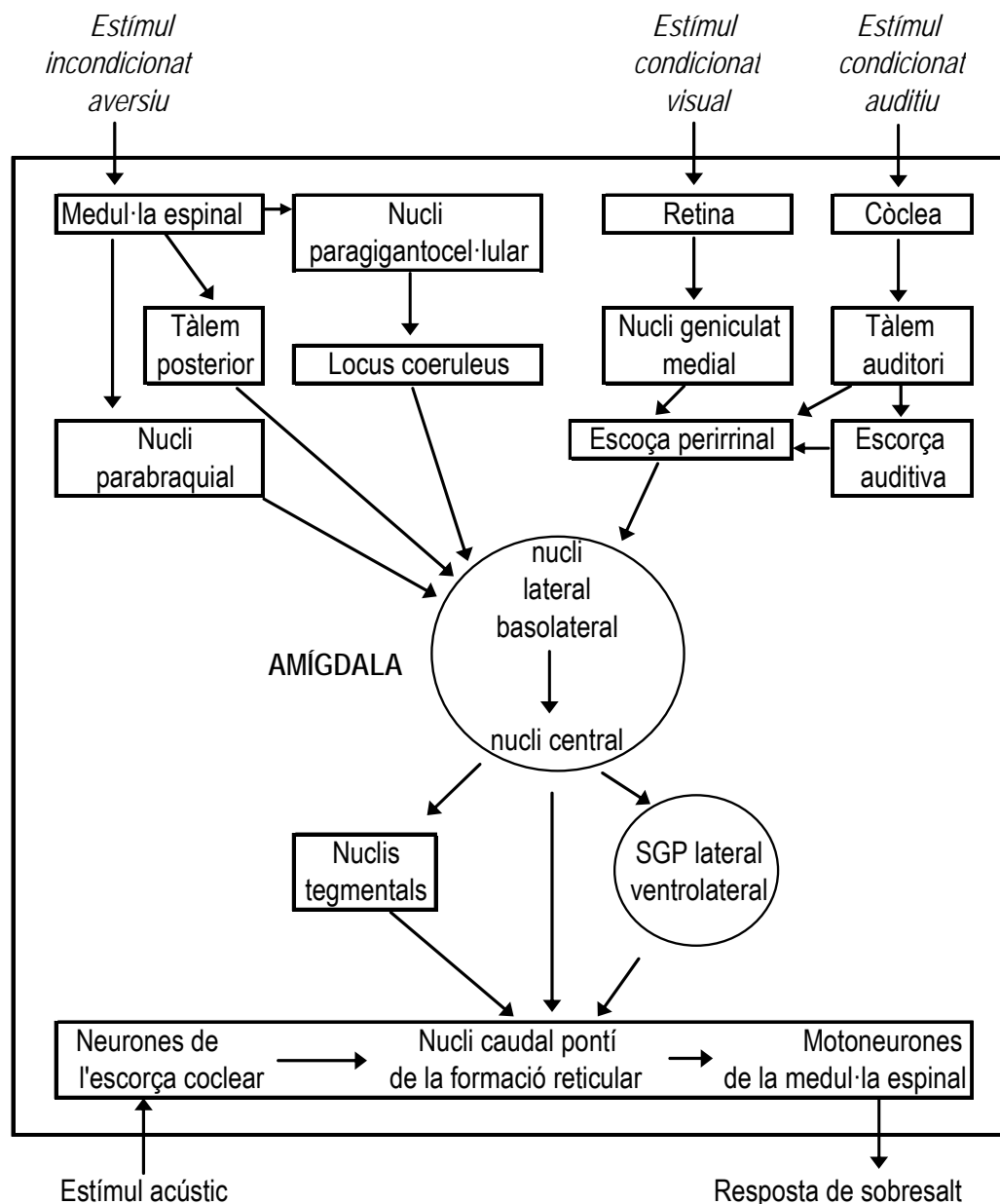


Figura 5. Resposta de sobresalt: circuits cerebrals implicats (adaptat de Fendt i Fanselow, 1999)

Una alternativa interessant ha estat proposada recentment, basada en la premissa que els rosegadors són animals nocturns i que temen la il·luminació intensa. Walker i Davis (1997) van estudiar l'efecte d'un llum brillant en la resposta de sobresalt. Un resultat important utilitzant aquest procediment va ser la dissociació neuroanatòmica de la "potenciació de la resposta de sobresalt per llum" respecte de la "potenciació de la resposta de sobresalt per por

condicionada (a un estímul condicionat discret/fàsic, com ara un to o un llum)". Administrant un antagonista del receptor AMPA, Walker i Davis (1997) van trobar que la resposta de sobresalt potenciada per por (per un estímul discret) sembla dependre críticament del nucli central de l'amígdala, mentre que l'efecte potenciador del llum en la prova de resposta de sobresalt recau en el nucli del llit de l'estria terminal, és a dir, aquest nucli sembla tenir un paper més específic en l'ansietat elicitada per estímuls contextuais no específics (p. ex. Davis, 1998; Koch, 1999; Toufexis, 2007; Walker i Davis, 1997).

La resposta de sobresalt potenciada per por condicionada, en particular, ha demostrat ser un procediment i un fenomen molt útil per a l'anàlisi psicològica d'aspectes relacionats amb la por i l'ansietat, així com per a l'estudi dels mecanismes neurals que hi intervenen. El fet que aquest procediment sigui també aplicable als humans, li dóna una gran validesa i poder heurístic (ex. Caseras *et al.*, 2006; Davis *et al.*, 1993; Grillon, 2002; Lang *et al.* 2000).

L'amígdala intervé de manera crucial en el sobresalt potenciat per por. Així, la convergència d'estímuls condicionats i incondicionats incrementa l'eficàcia de sinapsis que comuniquen la informació de l'EC a l'amígdala lateral (LeDoux, 2000; Walker i Davis, 2000). Com a resultat, les presentacions posteriors de l'EC tot sol evocuen respostes més intenses a l'amígdala lateral i aquesta evoca resposta de por condicionada per les seves projeccions al nucli central de l'amígdala (vegeu Figura 5; p.ex. Fendt *et al.*, 1997; Fendt i Fanselow, 1999). El rol crític de l'amígdala lateral en la formació d'associacions entre to i xoc es basa en que: 1) rep input auditori de la secció medial del nucli geniculat

medial i el nucli intralaminar posterior, que són la diana de les projeccions dels col·licles inferiors; 2) les lesions o la inactivació temporal de l'amígdala lateral durant el condicionament interfereixen en l'adquisició de respostes de por condicionada; 3) les neurones de l'amígdala lateral mostren plasticitat associativa durant el condicionament de por amb latències consistents amb la potenciació dels *inputs* talàmics; 4) la interferència dels mecanismes de senyals moleculars a l'amígdala lateral (p.ex. interferint els receptors NMDA, les protein-kinasas o la síntesi proteica) impedeix la memòria a llarg terme de la por condicionada.

Els estudis amb el procediment de la resposta de sobresalt potenciada per por, especialment des de la dècada de 1980, han estat crucials per incrementar el coneixement sobre els circuits i estructures cerebrals implicats en la temerositat i l'ansietat. De fet, la rellevància dels circuits amigdalins a la primera teoria de l'ansietat de Gray (1982) era molt relativa, mentre que en l'actualitat han adquirit una importància cabdal per a la millor comprensió de certs tipus de respostes defensives i de l'activació psicofisiològica associada (ex. Davis *et al.*, 1993; Gray i McNaughton, 2000; McHugh *et al.*, 2004; McNaughton i Corr, 2003; Walker i Davis, 2002). Al seu torn, la constatació de la rellevància de l'estudi de les respostes de sobresalt i del rol de l'amígdala (i estructures associades, com el nucli del llit de l'estria terminal) han aportat complexitat i especificitat al que sabem sobre la relació entre circuits neurals concrets i respostes defensives concretes. Així, per exemple, la modulació de respostes defensives quan hi ha conflicte entre tendències incompatibles (com ara a l'adquisició de l'evitació activa en dos sentits) és modulada directament pel

SHS (el BIS, descrit per Gray i McNaughton 2000), però aquest no és tan rellevant per a la resposta de sobresalt potenciada per por (en la que la “direcció defensiva” probablement està clara: no hi ha conflicte) (McNaughton i Gray, 2000; McNish *et al.*, 1997; Phillips i LeDoux, 1992; 1994). Un altre exemple el constitueix el fet que alguns tipus de conducta ansiosa espontània (no condicionada), com per exemple la que es mesura al test del laberint en creu elevat, semblen més influïdes per els nuclis lateral i basal de l'amígdala, mentre que la resposta de sobresalt potenciada per por sembla més dependent del nucli central (Davis, 1997; Pesold i Treit, 1995; Yilmazer-Hanke *et al.*, 2004).

En resum, reprenent la discussió sobre les relacions entre circuits neurals i diferents tipus de respostes defensives, Gray i McNaughton (2000) proposen que l'activació de l'hipocamp (però no de l'amígdala) constituiria rumiament ansiós; l'activació de les parts de l'amígdala relacionades amb la por constituïrien por pura, i l'activació de l'hipocamp i de l'amígdala alhora, davant de tendències de resposta conflictives, mitjançarien l'ansietat.

## **2. Psicogenètica de la temerositat**

### **2.1. Investigació psicogenètica clàssica en rosegadors**

Els estudis de psicogenètica evidencien que part de les diferències individuals en temerositat estan basades en la genètica. El mètode de cria selectiva bidireccional n'ha proporcionat exemples excel·lents. El fonament d'aquest mètode és simular, sota condicions de laboratori controlades i d'una manera

accelerada, l'evolució de trets adaptatius en termes de selecció natural, com ara seleccionar individus imposant un criteri específic (p.ex. subjectes amb puntuacions extremes en un tret determinat; selecció artificial), i creuar-los entre ells. Si el tret d'interès està sota algun control genètic es pot esperar que després d'un cert nombre de generacions de cria selectiva, aquestes línies d'individus es diferenciïn els uns dels altres. Diversos programes de cria selectiva utilitzant rates com a subjecte han estat exitosos, prenent com a criteri de selecció diverses conductes emocionals com ara alt o baix nombre de defecacions al camp obert (p.ex. Broadhurst, 1975; Gray, 1987), alta vs baixa execució a la tasca d'evitació activa en dos sentits (Bignami, 1965; Brush, 1991), i més recentment, alt vs baix percentatge de temps en els braços oberts del laberint en creu elevat (Liebsch *et al.*, 1998).

Un exemple de selecció psicogenètica bidireccional dels més estudiats és el de les rates *Roman* high- i low-avoidance, que han estat seleccionades bidireccionalment per alt (RHA) o baix (RLA) nombre d'evitacions a la prova d'evitació activa en dos sentits a la *Shuttlebox*, utilitzant un estoc de les RHA i RLA originals desenvolupades per Broadhurst i Bignami (1965; Driscoll i Bättig, 1982; Driscoll *et al.*, 1998). Evidència convergent suggereix que dos processos diferents contribueixen a l'adquisició de la tasca de *Shuttlebox* (com ara immobilitat: por condicionada, i creuaments actius entre els compartiments -aprenentatge instrumental-) en els quals el condicionament de por juga un paper important als estadis primerencs d'entrenament (Fernández-Teruel *et al.*, 1991b; Weiss *et al.*, 1968; Wilcock i Fulker, 1973). La selecció bidireccional per aquesta tasca, presumptament, ha afavorit els estils d'afrontament davant

esdeveniments aversius predominants en les rates *Roman*, essent les RLA afrontadores passives, o sigui, propenses a fer conducta de petrificació condicionada, i les RHA afrontadores actives, propenses a fugir, és a dir, a fer evitació condicionada (ex. Steimer *et al.*, 1997). Aquestes diferències tan marcades en tipus de respostes d'afrontament (passiva vs activa, p.ex. petrificació vs fugida) tenen un efecte general en llurs repertoris defensius: les rates RLA són més porugues en diferents situacions aversives que les RHA (per revisions, vegeu Driscoll i Bättig, 1982; Driscoll *et al.*, 1998; Fernández-Teruel *et al.*, 1997). L'extensiva avaluació d'aquestes soques de rates en un ampli rang de situacions inductores de por o ansietat, més les troballes convergents provinents d'experiments neuroendocrins i neurobiològics (i actualment també de genètica molecular), les ha confirmat com un dels millors models de temerositat i susceptibilitat a l'estrès en rates.

Les RLA són més emocionals o porugues que les RHA en la majoria de les tasques d'ansietat, por o frustració, condicionada o incondicionada (p. ex. Driscoll i Bättig, 1982; Driscoll *et al.*, 1998; Escorihuela *et al.*, 1999; Fernández-Teruel *et al.*, 1997; 2002a; Ferre *et al.*, 1995; Maldonado *et al.*, 2007; Rosas *et al.*, 2007; Steimer i Driscoll, 2003; 2005; Torres *et al.*, 2005) i mostren estratègies passives (com ara petrificació) quan s'exposen a situacions molt estressants (Aguilar *et al.*, 2004, Driscoll *et al.*, 1980, Ferre *et al.*, 1995, Steimer i Driscoll, 2003; 2005; Torres *et al.*, 2007). Així doncs les rates RLA es consideren un bon model animal seleccionat genèticament d'ansietat o temerositat. De fet, els ansiolítics són més eficaços en rates RLA que en rates RHA (Corda *et al.*, 1997; Fernández-Teruel *et al.*, 1991c; Martin *et al.*, 1982;



Steimer i Driscoll, 2003; Torres *et al.*, 2007), i les RHA sembla que tenen un to GABAèrgic cerebral més alt (Bentareha *et al.*, 1998; Giorgi *et al.*, 1994). Encara més, hi ha evidència de que altres aspectes conductuals, a més de l'ansietat/temerositat, s'han seleccionat en paral·lel a l'evitació activa en dos sentits. Per exemple, s'ha caracteritzat les rates RHA com a cercadores de novetat/substàncies i com a més susceptibles a l'abús de substàncies i als efectes sensibilitzadors de les drogues (p.ex. Corda *et al.*, 2005; Driscoll *et al.*, 1998; Escorihuela *et al.*, 1999; Fattore *et al.*, 2008; Fernández-Teruel *et al.*, 1992; 1997; 2002a; Giorgi *et al.*, 2005a-b; Giorgi *et al.*, 2007; Guitart-Masip *et al.*, 2006a-b; 2008a-b; Piras *et al.*, 2003; Razafimanalina *et al.*, 1996; Siegel, 1997).

Les rates RLA mostren més activació de l'eix HPA, per exemple més secreció de corticosterona i ACTH que les RHA. La prolactina plasmàtica també és considerablement més alta en les rates RLA sota condicions estressants (Steimer i Driscoll, 2003; 2005). Així mateix s'observa un gran nombre de diferències neuroquímiques, per exemple en sistemes de neurotransmissors, CRF i vasopressina (Aubry *et al.*, 1995). És més, l'exposició perllongada a l'estrès (p.ex. entrenament en evitació activa extensiu) pot induir símptomes de depressió conductual associats a una resposta d'ACTH incrementada davant situació d'estrès agut en les rates RLA, però no en les RHA (Castanon i Mormède, 1994). Una de les principals diferències entre les dues soques, respecte a la secreció d'hormones d'estrès, és l'eficàcia i la rapidesa del control de retroalimentació de l'eix HPA. Estudis previs indicarien que les rates RLA són més sensibles a l'estimulació amb CRF (Walker *et al.*, 1989), tot i que

aquesta diferència podria dependre de l'edat (Castanon *et al.*, 1994). La major part de les conclusions anteriors, respecte l'activitat central i perifèrica en l'eix HPA en les rates *Roman*, s'han vist replicades en un estudi recent en el que ha participat el nostre laboratori (Carrasco *et al.*, 2008).

Les soques *Syracuse High-* i *Low-Avoidance* també es van seleccionar per llur execució de la prova de *Shuttlebox* (Brush, 1991; Brush *et al.*, 1979), en base als següents criteris: resposta limitada al senyal d'avís durant els deu assaigs pretest i alt o baix nombre d'evitacions durant els 60 assaigs d'entrenament a la *Shuttlebox* (Brush *et al.*, 1979). No diferien en la latència de resposta durant el pretest ni en el nombre de creuaments entre assaigs, pel que els autors conclouien que la conducta d'evitació és una característica heretable que pot ser seleccionada independentment del nivell d'activitat (Brush *et al.*, 1979). En congruència, no s'observen diferències en la deambulació horitzontal ni vertical al camp obert entre soques, només entre sexes (les femelles d'ambdues soques són més actives), i les rates de la soca SLA fan més defecacions (Brush *et al.*, 1985).

Es van comprovar diferències consistents en reactivitat emocional, arribant a la conclusió que el baix nombre d'evitacions de les SLA podria ser degut a l'excessiva conducta de petrificació davant l'estímul condicionat o al context de la caixa de *Shuttlebox* (Brush *et al.*, 1988), o bé a una major supressió per xoc en els animals SLA, que d'altra banda tenen capacitat d'aprendre diverses tasques, i no presenten dèficits visuals ni auditius.

La supressió condicionada augmentada en funció de la intensitat del xoc rebut és més alta en les rates de la soca SLA (Brush, 2003). També mostren més aversió condicionada al gust i fan millor la prova d'evitació passiva: sembla que siguin millors que les SHA en els procediments que impliquen supressió de la conducta. Les rates SLA beuen menys alcohol i mostren més analgèsia induïda per estrès (Brush, 2003). La conclusió dels autors és que semblen més responsives emocionalment que les SHA (Brush *et al.*, 1985).

Les rates HAB i LAB, que deriven de la soca Wistar, van ser seleccionades psicogenèticament en funció de llur execució del laberint en creu elevat. Les HAB (High anxiety-related behaviour) mostren una conducta més ansiosa que les LAB (Low anxiety-related behaviour) (Liebsch *et al.*, 1998). Es van crear amb rates de dues línies que havien estat seleccionades a la Universitat de Leipzig, en funció de l'ansietat que mostraven en una tasca de discriminació motivada per xoc, per tal de reforçar la conducta relacionada amb l'ansietat. Les HAB i les LAB mostren una conducta molt diferent en diverses proves d'ansietat (camp obert, discriminació social, i fins i tot al "*forced swim test*") però no en activitat motora (Liebsch *et al.*, 1998).

Es considera que les HAB tenen una alta ansietat tret. Les dues soques també divergeixen en llurs nivells d'activitat de l'eix HPA: les HAB mostren més ACTH i més corticosterona plasmàtiques induïdes per estressors rellevants etològicament (Landgraf *et al.*, 1999). Les HAB mostren un estil d'afrontament passiu i tenen més necessitat de contacte social (Landgraf i Wigger, 2002). No obstant, llurs concentracions basals plasmàtiques d'ACTH i de corticosterona

no difereixen (Landgraf *et al.*, 1999). Les HAB, a part de la ja mencionada hiperreactivitat de l'eix HPA davant l'estrès, mostren un resultat patològic a la prova hormonal combinada "dexametasona/CRF" (Landgraf *et al.*, 1999). En un estudi posterior observaren que el fenotip conductual està correlacionat significativament amb l'expressió del neuropèptid arginina vasopressina (AVP) a nivell del nucli hipotalàmic paraventricular. L'AVP alliberada centralment podria actuar com un neurotransmissor o com un neuromodulador. Aproximacions addicionals a l'antagonista del receptor en rates HAB van confirmar que l'alliberament "intraPVN" d'AVP contribueix probablement a la conducta ansiosa i "pseudodepressiva" d'aquesta soca (Landgraf *et al.*, 2007).

Malgrat que les rates LAB mostren més ansietat en el laberint en creu elevat, tenen una línia base de resposta de sobresalt més baixa i mostren menys potenciació per por d'aquesta resposta. Tot i això no difereixen de les HAB en temps de petrificació en els intervals entre estímuls en l'experiment de resposta de sobresalt, ni tampoc s'observen diferències en el recompte de neurones immunoreactives pel factor alliberador de corticotropina i neuropèptid Y en nuclis amigdalins (Yilmazer-Hanke *et al.*, 2004), a diferència del que s'observa entre les rates RHA i RLA.

Globalment, es pot dir que un dels resultats més rellevants d'aquests experiments de selecció psicogenètica bidireccional és que un grup de fenotips relacionats també és coseleccionat, mostrant que les línies de rates difereixen en varies conductes d'una forma altament predictable. L'emergència d'aquest grup de conductes addicionals (coseleccionades involuntàriament) vinculades

amb el criteri original, suggereix que un tret subjacent (un endofenotip general), com pot ser la temerositat, pot estar a la base d'aquests experiments de cria selectiva, proporcionant evidència indirecta de l'existència d'un tret heretable i complex.

## **2.2. Estudis en altres espècies i en humans**

En altres espècies també s'ha demostrat que diferents variables conductuals covarien i si se n'analitza l'estructura factorial, formen un probable tret de temerositat. Per exemple, Kalin i col·laboradors (2001) van observar que el perfil conductual i fisiològic d'un grup de macacos rhesus (*M. mulatta*) era crònicament poruc o ansiós. Aquests primats són tímids i inhibits conductualment, i mostren intenses respostes de petrificació en la presència d'humans. Fisiològicament, mostren respostes del nivell plasmàtic de cortisol i de factor alliberador de corticotropina (CRF) pronunciades, així com una marcada asimetria dreta en l'activitat elèctrica de l'escorça frontal. En consonància, Suomi (1991) va observar que el 20% de macacos rhesus que viuen en una colònia particular (en semilibertat) mostren un patró de temerositat exagerada, acompanyat d'alteracions fisiològiques i conductuals, en resposta a reptes socials. Els micos infants que nasqueren de pares temerosos/porucs tenen tendència a "heretar" el mateix perfil de resposta psicofisiològica a les amenaces.

Aquestes observacions no es limiten a espècies de mamífers (rates i primats). L'heretabilitat del temperament ansiós ha estat així mateix documentada en ocells, tal com il·lustraren Jones i col·laboradors (1991), que treballaren amb

dues soques de guatlles (*Coturnix coturnix japonica*), seleccionades psicogenèticament en funció de que mostressin períodes d'immobilitat tònica curts o llargs (*STI- Short Tonic Immobility* i *LTI- Long Tonic Immobility*, respectivament) quan l'experimentador les atrapava. Com a resultat d'aquesta selecció, les guatlles LTI mostren respostes de petrificació més intenses, més defecació i menys conducta exploratòria en situacions de novetat, comparades amb les STI; un patró de temerositat augmentada semblant al trobat en rosegadors i primats.

D'aquests estudis es pot concloure que l'agrupació en poblacions extremes d'un conjunt de conductes indicatives d'alta vs baixa temerositat és un fenomen comú en varies espècies. La consistència d'aquests perfils, revelada per diversos experiments de cria selectiva, suggereixen que podrien estar influïts per factors genètics. Basant-nos en aquests fets, sembla raonable assumir que la temerositat hauria d'estar associada amb una tipologia particular del sistema nerviós central.

També s'han observat diferències en la temerositat durant el desenvolupament primerenc, presumptament d'origens genètics, en infants humans. Per exemple, Kagan i col·laboradors (1989; 1991) han observat que infants de 4 mesos d'edat (el 23% d'una mostra de 94 nens) que mostren alta activitat motriu (moviment de les extremitats, protrusió de la llengua, i arquejament de l'esquena) i irritabilitat (inquietaud i plors) com a resposta a estímuls visuals i auditius desconeguts, foren més temerosos quan se'ls va avaluar als 9, 14 i 21 mesos d'edat, que els que tingueren puntuacions baixes en aquelles

conductes. També trobaren que tots dos temperaments, poruc i valent, de nens de 2 anys eren relativament estables al llarg del temps, quan els mesuraren als 9 anys. A més, aquests perfils divergents (etiquetats com a inhibit o desinhibit al no familiar, respectivament) estaven acompanyats d'un grup de característiques físiques i fisiològiques distintives (p.ex. color dels ulls, complexió, susceptibilitat a al·lèrgies atòpiques, freqüència cardíaca, veu, cortisol i dilatació de la pupil·la). Donat que la majoria d'aquestes diferències s'han trobat en estadis primerencs del desenvolupament, quan l'estimulació ambiental encara està començant a modelar el cervell, les possibles arrels biològiques del temperament ansiós en nens fan que l'esforç de cercar bases genètiques simples en animals no humans sigui encara més raonable.

### **2.3. Primers estudis de genètica quantitativa de l'ansietat en rosegadors**

Flint i col·laboradors (1995) foren els primers a trobar candidats moleculars per l'arquitectura genètica de la temerositat en animals de laboratori, utilitzant l'anàlisi de "loci" cromosòmics per a trets quantitativs (anomenats *Quantitative Trait Loci*, QTLs). Van mapejar el genoma de soques consanguínies de ratolí (n=879) derivades d'animals seleccionats per alta i baixa deambulació al test de Camp Obert. Es definiren els ratolins més porucs per ser aquells que defecaven més i deambulaven menys a la prova de camp obert, mostrant puntuacions d'activitat més baixes en un Laberint en "Y", i explorant els braços oberts del laberint en creu elevat menys freqüentment. Els autors esperaven que els efectes potencials dels QTLs en la conducta estarien en la mateixa direcció teòrica, p.ex. un determinat QTL que augmentés la deambulació i la conducta en braços oberts hauria de, per contra, disminuir la defecació.

S'esperaria que aquesta correlació genètica inversa no fos una associació genètica atzarosa (*genetic drift*) durant la selecció, sinó que evidenciés l'existència d'un tret psicològic subjacent. De fet, els resultats mostraren que determinats *loci* continguts en els cromosomes 1, 12 i 15 del ratolí actuaven de la manera prevista i explicaven una part molt significativa de la variància genètica de la temerositat.

Dos anys després d'aquella publicació dos estudis portats a terme per laboratoris independents van mostrar que aquell QTL del cromosoma 1 també estava implicat en diferències individuals en la susceptibilitat al condicionament de por en ratolins (Caldarone *et al.*, 1997; Wehner *et al.*, 1997), suggerint que podria ser especialment important pel tret general de temerositat. Donat que hi ha raons convincents per pensar que les bases genètiques de l'emotivitat són semblants en altres espècies i que podrien afectar el tret psicològic de susceptibilitat a l'ansietat en humans, Flint (1997) conclouïa que "potser aquests estudis explicaran finalment variacions en la por dels nostres propis nens".

Al 1995 el Laboratori Animal de la Unitat de Psicologia Mèdica de la UAB va iniciar un programa de recerca sobre les bases neurogenètiques de l'ansietat en rates en col·laboració amb varis grups líders en aquest àmbit: Jonathan Flint del Wellcome Trust Centre for Human Genetics (Roosevelt Drive, Oxford, Regne Unit), Jeffrey A. Gray de l'Institut de Psiquiatria (DeCrespigny Park, London, Regne Unit), Peter Driscoll de l'Institut Fuer Nutztierwissenschaften (ETH, Schwerzenbach, Suïssa) i Gerard R. Dawson del Merck Sharp i Dohme Research Laboratories (The Neuroscience Research Centre, Terlings Park,



Essex, Regne Unit). L'objectiu del projecte era escanejar el genoma de la rata a la recerca de marcadors genètics (QTLs) per a l'ansietat i la por utilitzant una població F2 derivada d'un entrecreuament de les soques de rates consanguínies "Roman High-" i "Low-Avoidance" (RHA-I i RLA-I, respectivament). Una assumpció essencial d'aquesta aproximació era, novament, que els trets psicològics complexos, que normalment estan distribuïts de forma contínua, depenen de varis gens (o d'uns quants amb acció pleiotròpica) dels que cadascun té efectes petits. Per tal de detectar aquestes petites influències per mitjà de l'anàlisi de QTLs en un creuament entre les dues soques, és imprescindible utilitzar un gran nombre d'animals (Talbot *et al.*, 1999).

Es va utilitzar una bateria de 7 proves conductuals d'ansietat i 800 animals (generació F2 a partir de les rates RHA-I i RLA-I) de tots dos sexes. La bateria consistia en proves incondicionades (camp obert, laberint en creu elevat, "taula de forats", activitat espontània i resposta de sobresalt), condicionament clàssic de por al context i a un estímul discret i adquisició de l'evitació activa en dos sentits a la *Shuttlebox*, i se'n va obtenir més de 50 variables dependents. Els resultats conductuals mostraren una estructura factorial de tres factors independents: un primer factor de "por apresada" en el que saturaven les mesures d'evitació i de condicionament clàssic; un segon factor, anomenat de "reactivitat emocional", era la combinació de quasi totes les variables incondicionades; i un tercer factor, anomenat "por de les alçades", només contenia variables de conducta en els braços oberts del laberint en creu elevat (Aguilar *et al.*, 2002; 2003).

L'anàlisi genètica de l'estudi anterior va mostrar 8 QTLs amb influència significativa sobre diferents conductes d'ansietat/por. En particular, els QTLs dels cromosomes 5, 10 i 15, foren els més rellevants i consistents amb possibles efectes pleiotròpics sobre una varietat de paràmetres conductuals relacionats amb ansietat o por, condicionada o incondicionada. El QTL més important, i amb influència pleiotròpica més clara, va ser el del cromosoma 5: influeix l'adquisició de l'evitació activa en dos sentits, el condicionament de por al context i a estímuls discrets, la conducta al laberint en creu elevat i l'activitat al camp obert, de manera consistent amb com ho farien els fàrmacs ansiolítics (Fernández-Teruel *et al.*, 1991b; 2002b). Aquest QTL, en canvi, no presentà cap influència sobre les respostes de sobresalt basal. El QTL del cromosoma 10 sí que influeix l'adquisició de l'evitació activa en dos sentits alhora que la resposta de sobresalt (Fernández-Teruel, 2002b).

L'estudi anterior va ser el primer, i fins ara, l'únic, en utilitzar una aproximació multitest per intentar mesurar una sèrie de fenotips conductuals en rates, que ens aproximessin a la idea de la mesura del que seria la temerositat o l'ansietat en humans (com podrien ser els trets o dimensions de "neuroticisme" o de "susceptibilitat al càstig- ansietat"). La idea subjacent és que sota aquests trets complexos (o dins dels múltiples fenotips conductuals mesurats en els animals) probablement existeixen diferents manifestacions de l'ansietat/temerositat que, tot i formar part d'un factor o tret, tenen unes característiques pròpies (o parcialment dissociades d'altres tipus de conductes ansioses) que van associades a mecanismes neurals diferenciats i, potser, també a mecanismes genètics distints. L'estudi de Fernández-Teruel i col·laboradors (2002b) va

revelar que, de fet, la descripció anterior s'ajusta força a la realitat dels resultats. Així, com ja hem dit, l'anàlisi factorial de les dades mostrà una estructura i associacions complexes entre les diferents mesures de temerositat/ansietat, fins al punt de que la millor explicació resultant era una estructura de tres factors (Aguilar *et al.*, 2002; 2003). Aquests tres factors mostraven associacions entre conductes de temerositat incondicionada (tal com exploració al camp obert) i respostes condicionades (a la *Shuttlebox*), però també dissociació parcial entre elles (Aguilar *et al.*, 2002; 2003). De forma força congruent, les anàlisis genètiques mostraren, per exemple, un QTL molt important al cromosoma 5 que influïa sobre varies conductes d'ansietat condicionades i incondicionades, però només una part d'aquestes conductes estaven influïdes pel QTL del cromosoma 10. Aquest, al seu torn, presentà influència sobre respostes que no estaven representades al QTL del cromosoma 5 (p.ex. resposta de sobresalt basal). Patrons semblants es van trobar en quant a la influència sobre altres fenotips de temerositat, per part de les QTLs restants als cromosomes 1, 3, 6, 15, 19 i X.

És a dir, tant des del punt de vista de l'anàlisi purament psicològica o conductual, com des del punt de vista de l'anàlisi genètica, el fet de mesurar múltiples fenotips conductuals (condicionats i incondicionats) contribueix a posar de manifest un escenari complex i multidimensional en quant a l'estructura del tret de temerositat i ansietat en rates, així com en quant els seus possibles mecanismes genètics (Aguilar *et al.*, 2002; 2003; Fernández-Teruel *et al.*, 2002b; vegeu també Flint, 2004; Ramos i Mormède, 1998; Willis-Owen i Flint, 2007).

Utilitzant metodologies semblants s'han realitzat estudis de QTLs de respostes hormonals relacionades amb l'estrès. En aquest sentit Solberg i col·laboradors (2006) van conduir una anàlisi de QTLs en una generació F2 derivada de rates Wistar Kyoto i Fischer 344 pels nivells de corticosterona en resposta a l'estrès, que representen la sensibilitat de l'eix HPA en resposta a estrès psicològic o fisiològic agut, i van identificar dos QTLs amb efectes específics pel sexe en aquest creuament, tots dos per la corticosterona basal. El gen candidat (encara no confirmat) més prometedori era el "CBG" (*Cort-binding globulin*), contingut al QTL del cromosoma 6 per a la corticosterona en resposta a l'estrès (Solberg *et al.*, 2006).

Per la seva banda, el grup de Mormède i col·laboradors van realitzar un estudi sobre la hiperactivitat i l'emotivitat en una generació F2 derivada de les rates SHR (hipertensives espontàniament) i les WKY (Wistar Kyoto). Van trobar que un QTL al cromosoma 8 afecta tres trets conductuals, especialment d'activitat motora (Moisan *et al.*, 1996). El mateix grup ha realitzat un mapeig de QTLs per trets associats amb la reactivitat neuroendocrina a l'estrès. Van trobar QTLs amb influència significativa sobre varis paràmetres neuroendocrins (renina, aldosterona, timus) als cromosomes 2, 3, 5, 8, 10, 16 i 19 (Llamas *et al.*, 2005).

En general, aquest tipus d'estudis de QTLs amb generacions F2 permet definir distàncies cromosòmiques d'aproximadament 10-40 cM, i aquests són intervals massa grans com per permetre la identificació de gens, ja que poden contenir diversos centenars, fins i tot més de mil gens. Per tant, era necessària una evolució de la metodologia i les tècniques genètiques que permetés identificar

QTLs a intervals més estrets, que continguessin un nombre de gens prou baix com per fer possible la seva identificació.

### **3. Estudis recents amb soques genèticament heterogènies: “caçant gens de QTLs per l’ansietat”**

#### **3.1. En ratolins**

El grup de Jonathan Flint i col·laboradors ha desenvolupat en els últims anys metodologies que permeten el mapeig fi de QTLs a alta resolució (reduint les regions cromosòmiques fins a intervals al voltant d’1-2 cM). Això s’ha pogut aconseguir en part mitjançant l’evolució i el refinament de les eines estadístiques aplicades a l’anàlisi genètica que aquest grup ha desenvolupat (Flint, 2004; Mott *et al.*, 2000; Talbot *et al.*, 1999; 2003), i també gràcies a l’ús d’una soca de ratolins heterogenis genèticament. L’avantatge d’aquesta soca és que deriva del creuament de vuit soques progenitores i no s’anàlitz genèticament fins després de moltes generacions (normalment més de 40), pel que, degut al gran nombre de recombinacions que s’han produït, permet el mapeig genètic fi de QTLs i fa realment probable la identificació de gens “quantitatius” (Figura 6). Aquests autors van desenvolupar un mètode de programació dinàmica (*dynamic programming*) per calcular la probabilitat de que un al·lel descendís de cada progenitor i van mostrar, utilitzant l’activitat al camp obert com a fenotip, que amb aquest mètode es pot mapejar amb alta resolució: van intentar esbrinar si un locus del cromosoma 1 conté un QTL pleiotròpic, ja que estudis anteriors, en que es van mesurar variables condicionades i incondicionades, van permetre identificar un locus en aquest

cromosoma que influeix l'emocionalitat. Flint i col·laboradors, en l'estudi amb ratolins HS van mostrar que dos pics indiquen localitzacions de QTL que influeixen l'activitat al camp obert, envoltant un pic de QTL de por condicionada (vegeu Flint, 2004).

Per tant, la utilització d'estocs de ratolins genèticament heterogenis s'ha revelat com una eina única i crucial per poder portar a terme el mapeig fi amb alta resolució de QTLs per caràcters complexos, permetent determinar influències genètiques molt petites sobre fenotips continus, tant biològics com conductuals (Flint, 2004; Mott i Flint, 2002; Mott *et al.*, 2000), així com fent possible la identificació efectiva de gens quantitius que influeixen sobre els fenotips (Yalcin *et al.*, 2004) i l'avaluació d'interaccions epistàtiques i de "gens x ambient" (Valdar *et al.*, 2006a-b). No hi ha, en principi, cap raó per pensar que una aproximació semblant amb rates genèticament heterogènies no pugui permetre avenços semblants.

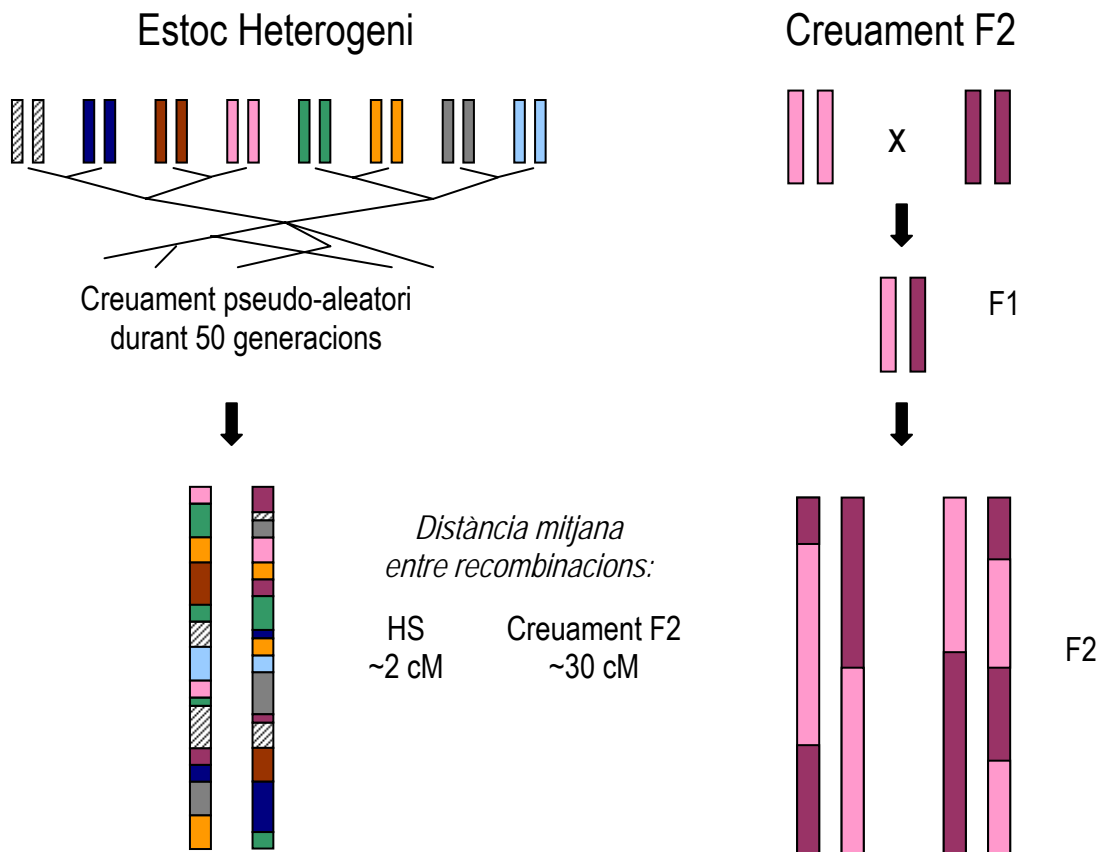


Figura 6. Comparació dels patrons de recombinació gènica de les rates d'un estoc heterogeni i d'un creuament F2

### 3.2. En rates

Sembla que molts, potser la majoria, dels estocs de rates no consanguínies disponibles provindrien, almenys en part, d'un estoc que es mantenia a l'Institut Wistar de Filadèlfia per un període que comprenia des d'abans de la primera guerra mundial fins els anys 50. Aquesta colònia Wistar, al seu torn, derivava d'un grup petit de rates que es va establir a Europa cap al 1900 (per revisió vegeu Hansen i Spuhler, 1984). Els estocs de rates Sprague-Dawley i Long-Evans també provenen d'un nombre molt petit de parelles, ja que cadascun d'ells, presumptament, derivava d'una sola parella de femella Wistar i mascles de diferents orígens, incloent-ne de tipus salvatge (Hansen i Spuhler, 1984).

Per això Hansen i Spuhler van desenvolupar un estoc de rates genèticament heterogènies que pugués mostrar un ampli repertori de respostes a condicions experimentals i pugués servir com a població de base per estudis de selecció. Les vuit soques parentals eren les MR/N, WN/N i WKY/N, derivades de l'estoc original de Wistar; les M520/N i les F344/N, d'origen desconegut; les ACI/N, híbrides de les soques August i Copenhagen; les BN/SsN, derivades de mutants pel color d'un estoc de rates salvatges mantingudes a l'Institut Wistar; i la soca BUF/N. La diferència essencial entre una soca consanguínia i una no consanguínia són les distribucions de freqüències dels gens en la colònia: en el cas de les soques consanguínia, la freqüència sempre és molt propera a 0 o a 1, pel que els animals de la soca són essencialment homozigots. Per contra, la de les no consanguínies poden tenir qualsevol valor entre 0 i 1 (Hansen i Spuhler, 1984). Durant més de 60 generacions l'estoc de rates heterogènies ha mantingut el seu alt nivell de recombinació i heterogeneïtat genètica. En un estudi sobre trets relacionats amb l'etanol, els valors de les rates de l'estoc heterogeni (a partir d'ara N/Nih-HS) estaven compresos dins del rang de valors de les soques parentals (Spuhler i Dietrich, 1984). Així mateix s'han fet estudis de selecció psicogenètica a partir de l'estoc N/Nih-HS obtenint línies de rates divergents, en base a llurs valors extrems en sensibilitat a l'alcohol agut (Draski *et al.*, 1992), capacitat aeròbica (Koch i Britton, 2001) i sensibilitat del receptor de serotonina 1A central (Overstreet *et al.*, 1994).

En canvi, fins ara, les rates N/Nih-HS mai havien estat caracteritzades en una bateria de proves conductuals d'ansietat condicionada i incondicionada abans del treball present.



## Plantejament del treball i objectius

Donat que la temerositat (podria considerar-se un equivalent del Neuroticisme en humans, Flint 2004), l'ansietat (en humans, Susceptibilitat al Càstig; Barrós-Loscertales *et al.*, 2006; Torrubia i Tobeña, 1984), la por i la susceptibilitat a l'estrès són trets complexos, l'objectiu al plantejar una investigació sobre els seus mecanismes genètics en animals no ha de ser únicament mesurar fenotips individuals i simples, com per exemple l'exploració d'un espai obert i nou. Això ens allunyaria, probablement, de la realitat humana. En canvi, sembla un objectiu molt més apropiat abordar l'estudi genètic de fenotips complexos i quantitius que presentin el màxim de validesa aparent respecte a aquells trets humans. Per això és necessari intentar buscar el nombre màxim de bons fenotips conductuals a mesurar, en el sentit que puguin representar el millor possible la complexitat de les dimensions o trets humans que pretenen modelar (Flint, 2004; Willis-Owen i Flint, 2007).

Per tant, en el present treball es va plantejar amb els següents objectius:

1. Donat que les soques de rates *Roman* han estat crucials en els primers estudis de genètica quantitativa de la temerositat/ansietat (Fernández-Teruel *et al.*, 2002b), ens plantejarem avaluar les diferències entre les soques RHA-I i RLA-I en la resposta de sobresalt i el condicionament clàssic de por (petrificació).
2. L'estudi anterior havia de servir, a més de reforçar la validesa de les rates RHA-I/RLA-I com a model d'ansietat/por, per a seleccionar un

procediment de resposta de sobresalt potenciada per por que es pogués utilitzar per al fenotipat de les rates N/Nih-HS

3. Caracteritzar una àmplia mostra de rates genèticament heterogènies N/Nih-HS en una varietat suficient de proves/mesures d'ansietat o por, condicionades i incondicionades, a fi de obtenir el perfil de temerositat més complet possible d'aquestes rates i de poder estudiar les relacions entre els diferents tipus de respostes defensives.
4. Escanejar genèticament la mostra anterior de rates heterogènies per fer un mapeig fi a alta resolució de QTLs amb influència sobre els fenotips conductuals mesurats.

## Materials i mètode

### 1. Estudi I (Article I)

#### **Subjectes**

Els animals utilitzats van ser mascles (experiments 1, 2 i 3) i femelles (només per l'experiment 3) de les soques de rates consanguínies Roman High- (RHA-I) i Low-Avoidance (RLA-I), mantingudes al nostre laboratori. Tenien aproximadament 5 mesos d'edat (pes 300-400 g) i eren establades de dues en dues (companys del mateix sexe) en gàbies estàndards de macrolon (50 x 25 x 14 cm). El cicle de llum/foscor era de 12 hores, amb inici del llum a les 08:00h. La temperatura es mantenia constant a  $22 \pm 2^\circ\text{C}$  i la humitat a 50-70%, i les rates tenien accés *ad libitum* a menjar i a aigua. Els experiments es van portar a terme entre les 9:00 i les 18:00h.

Es van utilitzar 40 rates (20 de cada soca) per l'estudi inicial de línia base de resposta de sobresalt en l'experiment 1. Les mitjanes i la desviació estàndard eren  $204,9 \pm 140,8$  (ES= 34,2) per les rates RHA-I, i  $623,3 \pm 352,6$  (ES=78,2) per les rates RLA-I. Després d'un procés de selecció en funció de la similitud de resposta, és a dir, seleccionant els valors de resposta de sobresalt més alts del grup de RHA-I i els més baixos del grup de RLA-I, es van obtenir dos grups per soca (n=8/grup) amb valors semblants per a la línia base de resposta de sobresalt. Es van utilitzar 16 rates (8/soca) per l'experiment 2, i 35 (17-18/soca) per l'experiment 3.

## ***Procediment i aparells***

### **Experiments 1 i 2:**

Sessió 1 de línia base d' resposta de sobresalt: (Sr-Lab Resposta de sobresalt Response System, San Diego Inst.). L'aparell consisteix en una capsa de plexiglas (28x15x17 cm) col·locada en una plataforma amb un sensor a la base que detecta el moviment de l'animal. El moviment és mesurat com a amplitud de resposta de sobresalt, transmesa amb un acceleròmetre, recollida i digitalitzada. L'aparell és dins d'una capsa d'insonorització amb un altaveu que produeix un soroll blanc i constant de 55 dB.

La sessió consta de 5 minuts d'aclimatació seguits de 30 assaigs (presentació d'un to de 105 dB i 50 ms de durada), amb un interval interestímuls de 30 segons. Aquesta sessió és la línia base de resposta de sobresalt a un estímul acústic.

### Potenciació de la resposta de sobresalt per por:

Condicionament: Es presenta un estímul de 70 dB (estímul condicionat) de 3,7 segons de durada que precedeix a un xoc elèctric de 0,5 ms i 0,6 mA d'intensitat (estímul incondicionat), durant 10 assaigs. L'interval interestímuls és de 30 segons.

En l'experiment 1, els animals van ser seleccionats i al cap d'una setmana se'ls va administrar dues sessions de condicionament de 10 assaigs (separades 24 hores).

En l'experiment 2, els animals van rebre una sola sessió de condicionament, administrada immediatament després de la sessió de línia base de resposta de sobresalt.

Sessió de resposta de sobresalt potenciada per por: S'administrà 24 hores després de l'última sessió de condicionament. Després dels 5 minuts d'aclimatació es presenten 40 assaigs de l'estímul acústic de 105 dB i 50 milisegons de durada, amb un interval interestímuls de 30 segons, per habituar-los parcialment (aquesta part de la sessió conforma la segona línia base). Seguidament s'administren en ordre pseudoaleatori 20 estímuls acústics de 105 dB i 50 milisegons, i 20 estímuls acústics de 105 dB i 50 milisegons precedits per l'estímul condicionat de 70 dB (aquesta part de la sessió és la resposta de sobresalt potenciada per por com a tal). (Per procediment i referències vegeu Davis *et al.*, 1993)

### Experiment 1

| <i>Dia 1: 20 rates/soca</i><br>1a sessió de Línia base resposta de sobresalt         | <i>Dia 8: 8 rates/soca</i><br>1a sessió de Condicionament | <i>Dia 9: 8 rates/soca</i><br>2a sessió de Condicionament | <i>Dia 10: 8 rates/soca</i><br>2a sessió de Línia base i mesura de sobresalt potenciada  |
|--|---|---|--|
| 30 assaigs, E (acústic) 105dB 50ms<br>↓<br>Matching<br>↓<br>Selecció de 8 rates/soca | EC 70dB 3,7s<br>EI 0,6mA 0,5s                             | EC 70dB 3,7s<br>EI 0,6mA 0,5s                             | 30 assaigs, E acústic 105dB 50ms<br><i>i immediatament després</i> ↓<br>Resposta de sobresalt potenciada per por<br>20 a. E acústic 105dB 50ms<br>20 a. E acústic 105dB 50ms precedits per l'EC<br><i>(presentats aleatòriament)</i> |

### Experiment 2

| <i>Dia 1: 8 rates/soca</i><br>1a sessió de Línia base resposta de sobresalt   | <i>Dia 2: 8 rates/soca</i><br>2a sessió de Línia base i mesura de sobresalt potenciada   |
|---|--|
| 30 assaigs, E acústic 105dB 50ms<br><i>immediatament després</i> ↓<br>Condicionament:<br>10 assaigs d'aparellament (EC+EI)<br>EC 70dB 3,7s<br>EI 0,6mA 0,5s | 30 assaigs, E acústic 105dB 50ms<br><i>immediatament després</i> ↓<br>Resposta de sobresalt potenciada per por<br>20 a. E acústic 105dB 50ms<br>20 a. E acústic 105dB 50ms precedits per l'EC<br><i>(presentats aleatòriament)</i> |

**Experiment 3:**

Condicionament clàssic de por: L'aparell és una cambra blanca dividida en dos compartiments iguals (23x12x20 cm). A terra hi ha una graella per la que s'administra xoc elèctric (estímul incondicionat, 1 mA, 0,5 ms). L'estímul condicionat consisteix en el llum d'una bombeta de 20 W que s'encén durant 15 segons i està situada al sostre de la caixa. L'entrenament consisteix en 5 aparellaments d'EI- estímul condicionat, i comença amb l'inici del llum (els dos estímuls acaben alhora). L'interval entre assaigs dura 120 s de mitjana (la durada és aleatòria). Després de 24 hores, les rates eren col·locades a la cambra d'entrenament i la conducta de petrificació es monitoritzava durant 10 minuts. El llum s'encenia durant 5 minuts, per tal de mesurar el condicionament de por a l'EC.

*Experiment 3*

|                                |   |
|--------------------------------|---|
| <i>Dia 1: 17-18 rates/soca</i> | <i>Dia 2: 17-18 rates/soca</i>                                |
| Condicionament                 | Conducta de petrificació al context                           |
| 5 assaigs aparellament EC+EI   | (mesurada durant 10 minuts)                                   |
| EC 20W 15s                     | <i>immediatament després</i> ↓                                |
| EI 1mA 0,5s                    | Conducta de petrificació a l'EC<br>(mesurada durant 5 minuts) |

Anàlisi estadística

Es va aplicar anàlisi multivariat de la variància (MANOVA) a les dades de les sessions de les dues línies base (els factors: 2 "soques" per 3 o 4 blocs d'assaigs). Es van aplicar proves t d'Student a les dades de 10 blocs d'assaigs diferents a aquestes fases, així com la mitjana de la diferència entre els 20 assaigs "potenciats" i els 20 de "to sol" de la sessió de resposta de sobresalt

potenciada per por. També es va aplicar anàlisi de covariància (amb valors de la 2a línia base com a covariants) per comprovar si les diferències en resposta de sobresalt potenciada per por de les dues soques estaven influïdes per mesures de la línia base.

Es van aplicar anàlisis d'ANOVA amb mesures repetides (MANOVA, amb 2 "soques" per 2 "fases") i proves t d'Student a les dades de petrificació condicionada al context o a l'EC. Hi havia aproximadament el mateix nombre de rates de cada sexe per cada soca en aquest experiment, però es van ajuntar els resultats de mascles i femelles perquè l'ANOVA no va mostrar cap efecte de "sexe" ni cap interacció "sexe per soca".

## **2. Estudi II (article II)**

### ***Subjectes***

Els animals utilitzats en aquest treball van ser 787 rates N/Nih HS ("National Institutes of Health Genetically Heterogeneous Rat Stock", Chicago; Hansen i Spuhler, 1984), la meitat de cada sexe. En iniciar-se la tanda experimental tenien aproximadament 3 mesos d'edat (pes: 250-350 g), i eren establades de dues en dues (companys del mateix sexe) en capsos estàndards de macrolon (50 x 25 x 14 cm). Les condicions ambientals eren d'un cicle de llum/fosc de 12 hores, amb inici del llum a les 08:00h. La temperatura es mantenia constant a  $22 \pm 2$  °C i la humitat a 50-70 %, i les rates tenien accés ad libitum a menjar i a aigua.

### ***Procediment i aparells***

Els experiments es van realitzar en la fase de llum del cicle, de 9:30h a 19:00h. Es van administrar sis proves conductuals, espaiades de 2 a 4 setmanes entre elles. La seqüència d'administració de les proves i llurs característiques principals eren:

Caixa Blanca-Negra (CBN): (Panlab). És una caixa amb dos compartiments, un de negre (27x18x27 cm) i un de blanc, il·luminat tènuement (27x27x27 cm), separats per una paret de 47 cm d'alçada que té una obertura (70x70 cm) a la seva base, per la que el subjecte pot passar d'un compartiment a l'altre. L'animal es col·loca en el compartiment negre,

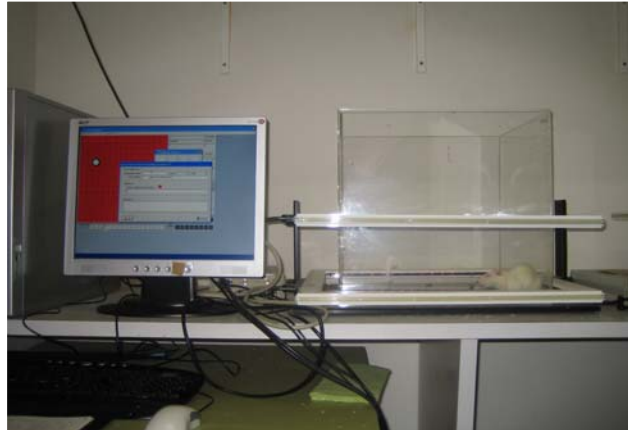


d'esquenes a l'obertura. L'aparell està situat en una sala negra il·luminada amb llum vermell, amb una càmera al sostre que grava la conducta i permet mesurar-la des de fora. Durant 5 minuts s'anoten les mesures de latència de sortida del compartiment negre, temps passat en el compartiment blanc, nombre d'entrades al compartiment blanc, i nombre de mitges entrades o postures d'aproximació al compartiment blanc (quan treu el cap i les orelles, fins a gran part del cos però no arriba a entrar, "stretched attend postures"). (Per procediment i referències vegeu Chaouloff *et al.*, 1997; Crawley, 1981; Steimer and Driscoll, 2003).



Activitat en caixa nova automatitzada (ACT): (Panlab).

L'aparell consisteix en una planxa horitzontal dividida per dos quadres amb cèl·lules fotoelèctriques que detecten



moviment i permeten mesurar-lo automàticament, amb gàbies de plexiglas transparent (40x40x40 cm) a dins, on es col·loquen els subjectes. Estan situades en una sala blanca il·luminada. La mesura de l'activitat espontània horitzontal dura 30 minuts. Aquesta prova s'analitza per blocs de 5 minuts (per procediment i referències vegeu Aguilar *et al.*, 2002).

Laberint en "Zero" Elevat (LZE): És una plataforma circular de 10 cm d'ample i 105 cm de diàmetre amb dos sectors oberts i dos de tancats (amb parets de 40

cm d'alçada). El subjecte es col·loca en un dels sectors tancats mirant cap a dins d'aquest. L'aparell està situat en una sala negra il·luminada amb llum vermell amb una càmera al sostre que grava la conducta i permet mesurar-la des de fora. Durant 5 minuts s'anoten les mesures de latència de sortida del sector tancat on ha estat col·locat,



*Construït per Antonio Fernández i David Soto*

temps passat en els sectors oberts, nombre d'entrades als sectors oberts, nombre de mitges entrades o postures d'aproximació als sectors oberts (quan

treu el cap i les orelles, fins a gran part del cos però no arriba a entrar, “stretched attend postures”), nombre de creuaments, nombre de “head dips” (quan acota el cap fins a l’alçada de les orelles per la vorera del laberint) i nombre de defecacions. (Per procediment i referències vegeu Pähkla *et al.*, 2000; Shepherd *et al.*, 1994).

Línia base de la resposta de sobresalt a un estímul acústic i resposta de sobresalt potenciada per por: (Sr-Lab

Resposta de sobresalt Response System, San Diego Inst.). L’aparell és una capsa de plexiglas (28x15x17 cm) col·locada en una plataforma amb un sensor a la base que detecta el moviment de l’animal. El moviment és mesurat com a amplitud de resposta d’ensurt, transmesa amb un



acceleròmetre, recollida i digitalitzada. L’aparell és dins d’una capsa d’insonorització amb un altaveu que produeix un soroll blanc constant de 55 dB.

1a sessió: Consta de 5 minuts d’aclimatació i 30 assaigs de presentació d’un to de 105 dB i 50 milisegons de durada, amb un interval inter-estímuls de 30 segons. Aquesta sessió és la línia base de resposta de sobresalt a l’ estímul acústic. Seguidament es procedeix al condicionament (10 assaigs), presentant un estímul de 70 dB (estímul condicionat) de 3,7 segons. Els últims 0,5 segons es solapen amb un xoc elèctric de 0,6 mA (estímul incondicionat).

2<sup>a</sup> sessió (24 hores després): després de 5 minuts d'aclimatació es presenten 35 assaigs de l'estímul acústic de 105 dB i 50 milisegons de durada, amb un interval interestímuls de 30 segons, per habituar-los parcialment. Immediatament, s'administren en ordre pseudoaleatori 20 estímul acústics de 105 dB i 50 milisegons, i 20 estímul acústics de 105 dB i 50 milisegons precedits per l'estímul condicionat de 70 dB (aquesta part de la sessió és la resposta de sobresalt potenciada per por com a tal). (Per procediment i referències vegeu Davis *et al.*, 1993).

Adquisició de la resposta d'evitació activa en dos sentits a la Shuttlebox:

(Letica). L'aparell és una caixa rectangular amb dos compartiments iguals (25x25x28 cm), amb una porta entremig de 8x10 cm, i una graella a terra per la que es pot administrar xoc elèctric. Està col·locada dins d'una capsa insonoritzada de fusta. El període d'habitució és de 4 minuts, i seguidament es presenten assaigs d'un to (63 dB)



juntament amb un llum (7 W), durant 10 segons (estímul condicionats), seguits d'un xoc de 0.7 mA (estímul incondicionat) de 20 segons, i l'animal ha d'aprendre a evitar el xoc passant a l'altre compartiment quan se li presenten els estímul condicionats. L'interval interestímuls és de 60 segons (fixat). Les variables obtingudes, totals (pels 40 assaigs de la sessió) i per blocs d'assaigs, són el nombre d'evitacions, el nombre de creuaments entre assaigs i les

latències de canvi de compartiment. (Per procediment i referències vegeu Fernández-Teruel *et al.*, 1991).

### Representació esquemàtica

|                     |                      |                      |  |  |  |
|---------------------|----------------------|----------------------|--|--|--|
| <i>Dia 1</i><br>CBN | <i>Dia 11</i><br>ACT | <i>Dia 21</i><br>LZE | <i>Dia 31</i><br>1a sessió de Línia base resposta de sobresalt | <i>Dia 32</i><br>2a sessió de Línia base i mesura de sobresalt potenciat | <i>Dia 61</i><br>Adquisició de l'evitació activa en dos sentits        |
|                     |                      |                      | <i>Vegeu taula experiment 2</i>                                | <i>Vegeu taula experiment 2</i>  | 40 assaigs<br>EC: 10s (to 63dB + llum 7Ws)<br>EI: 0,7mA (20s) ITI: 60s |

### Anàlisi estadística

Es va utilitzar la prova t d'Student ("t test") de comparació de mitjanes independents per a l'anàlisi de diferències entre sexes en les rates N/Nih-HS.

Es va utilitzar la prova de correlació (coeficient de correlació "rho" de Pearson) i de regressió múltiple (mètode *stepwise*). Per a cada prova conductual es va fer l'anàlisi factorial amb rotació Varimax (ortogonal), per tal de seleccionar les variables més representatives i menys redundants de cadascuna de les proves. Per l'anàlisi factorial de totes les proves es va utilitzar rotació Oblimin directe (oblíqua). Per reduir el nombre de factors es va aplicar el *Cattell's Scree Test*.

L'anàlisi factorial, per simplificar les matrius de correlacions es basa en els mateixos principis del treball d'Aguilar i col·laboradors (2002): el primer pas consisteix en fer una anàlisi factorial amb rotació ortogonal per cada test conductual, per identificar les variables principals que pesen en cadascun dels factors independents. Les variables es seleccionen evitant la redundància,

entre mesures o entre tests, i tenint en compte la literatura prèvia. Posteriorment s'aplica una anàlisi factorial exploratòria (amb rotació oblíqua) a totes les mesures seleccionades en el pas previ. Finalment, en funció del *Cattell's Scree Test*, es redueix el nombre de factors.

## **Sumari dels resultats**

### **1. Resposta de sobresalt i condicionament de por en rates *Roman* (article I)**

Les rates RLA-I mostraren una línia base de resposta de sobresalt a un estímul acústic incondicionat més alta que les RHA-I, tant en la primera sessió com en la segona, i en els experiments 1 i 2. Així mateix, les rates RLA-I mostraren una resposta de sobresalt clara potenciada per por, respecte a les rates RHA-I, també en els dos experiments. En consonància amb aquests resultats, les rates RLA-I demostraren més resposta de por a l'experiment 3 (estudi de condicionament de por), és a dir, més conducta de petrificació a la fase contextual i també durant la presència de l'EC. Les diferències entre soques en aquestes proves conductuals són un punt de partida són un requisit important per estudis comparatius morfològics i funcionals de l'amígdala i d'altres estructures o circuits implicats en l'ansietat o la por.

### **2. Temerositat en rates genèticament heterogènies (article II)**

Les femelles de l'estoc de rates N/Nih-HS mostren menys signes d'ansietat en quasi totes les variables d'ansietat o por, excepte a la prova de resposta de sobresalt potenciada per por i a l'activitat durant els minuts 6-30 (activitat habituada).

S'observen correlacions significatives entre les proves amb el sentit previsible, però no són gaire altes. L'anàlisi factorial mostra una estructura multidimensional de les conductes relacionades amb la por i l'ansietat. En tots dos sexes, hi ha un primer factor anomenat de "timidesa" que agrupa totes les variables relacionades amb la por de les proves incondicionades, i un segon factor en que pesen les mesures d'respuesta de sobresalt i de l'adquisició de l'evitació activa en dos sentits ("fugida defensiva"). En el cas dels mascles, les mesures de l'adquisició de la resposta d'evitació activa en dos sentits pesen en tots dos factors, mentre que en el cas de les femelles, només es relaciona amb les mesures d'respuesta de sobresalt, en el sentit (gens previsible) que a més resposta de sobresalt, més bona adquisició de la resposta d'evitació en dos sentits.

### **3. Resultats addicionals**

#### **3.1. Article III**

Les rates RLA-I mostren més ansietat que les RHA-I a la prova de laberint en "zero2 elevat: triguen més a entrar a les seccions obertes, fan menys nombre d'entrades totals i hi passen menys temps. Les rates N/Nih-HS tenen valors intermitjos i són significativament diferents de les RHA-I només en la variable d'entrades. A la prova d'adquisició de la resposta d'evitació activa en dos sentits a la *Shuttlebox* les rates RHA-I realitzen més respostes d'evitació, tenen menor latència de resposta, fan més creuaments entre assaigs i menys temps de conducta de petrificació condicionada que les rates RLA-I. Les rates N/Nih-

HS tenen un patró de conducta molt més semblant a les RLA-I, ja que només difereixen d'aquestes en la variable latència mitjana de resposta.

Si seleccionem les rates N/Nih-HS en dos grups extrems en funció de la seva adquisició de la resposta d'evitació activa en dos sentits, observem que les bones evitadores són menys ansioses: fan més entrades a les proves caixa blanca-negra i laberint en "zero" elevat, passen més temps a les seccions obertes de la prova de laberint en "zero" elevat i menys temps de conducta de petrificació condicionada al context. Si es fa la selecció per percentatge de temps passat en seccions obertes del laberint en "zero" elevat, les rates que en passen més també fan més evitacions (pel que es pot extrapolar que són menys ansioses).

Pel que fa a les correlacions, les més altes s'observen entre les dues proves incondicionades, i s'observen correlacions baixes però significatives entre les variables del laberint en "zero" elevat i l'adquisició de la resposta d'evitació activa en dos sentits, sobretot als primers assaigs. La regressió múltiple indica que les variables del laberint en "zero" elevat són predictores de les respostes d'evitació.

### **3.2. Article IV**

Els grups van ser seleccionats per presentar una desviació estàndard per sobre o per sota de la mitjana de tot el grup. Els grups extrems en nombre d'entrades al laberint en "zero" elevat difereixen en la distància recorreguda als primers 5 minuts d'exposició a la caixa nova, també en resposta de sobresalt potenciada per por, evitacions i creuaments entre assaigs a la *Shuttlebox*. Els grups



extrems en distància recorreguda als primers 5 minuts d'exposició a la caixa nova difereixen molt significativament en nombre d'entrades al laberint en "zero" elevat, així com en evitacions i creuaments entre assaigs a la *Shuttlebox*, encara que en els dos darrers menys significativament. No difereixen en resposta de sobresalt potenciada per por. Pel que fa als grups extrems en resposta de sobresalt potenciada per por, no s'observen diferències significatives en cap de les proves. Finalment, els grups extrems en resposta de sobresalt basal difereixen significativament en resposta de sobresalt potenciada per por, i també en el nombre d'evitacions a la *Shuttlebox* i en els creuaments entre assaigs en aquesta prova.

Les correlacions tenen el signe i la significació previsible en el cas de les proves incondicionades i fins i tot de la *Shuttlebox*, però la prova de sobresalt potenciat per por no es relaciona de la manera que es podria preveure a partir d'hipòtesis basades en la literatura.

### **3.3. Anàlisis genètiques (QTLs) preliminars**

Es van seleccionar i genotipar 83 marcadors al cromosoma 5, i 27 al cromosoma 15, utilitzant la base de dades de SNP (*single nucleotide polymorphism*). Així es va obtenir un interval mitjà entre marcadors d'aproximadament 350 kilobases. Es va calcular el desequilibri de lligament (*linkage disequilibrium*, utilitzant el software "fugue d'Abecasis"; Abecasis *et al.*, 2002) tenint en compte les relacions familiars. Els resultats indiquen que el desequilibri de lligament decau a nivells no significatius en 3 Mb, i això és consistent amb la hipòtesi que les rates N/Nih-HS poden aportar un nivell de

precisió que permeti el mapeig d'alta resolució, en congruència amb les dades de l'experiment amb ratolins HS (Valdar *et al.*, 2006). No es va observar correlació significativa entre marcadors en diferents cromosomes. Es va mapejar la variació en el nombre d'evitacions a la *Shuttlebox* utilitzant els genotips del cromosoma 5. Es va detectar un sol QTL amb un interval de confiança del 95% (Figura 7) de 93.37 a 106.16 Mb, col·locant-lo en el centre del QTL que es va trobar en l'estudi amb F2 (Fernández-Teruel *et al.*, 2002). S'estima que el locus explica el 6.9% de la variància fenotípica (per procediment i ampliació dels resultats, vegeu Johannesson *et al.*, 2008, enviat).

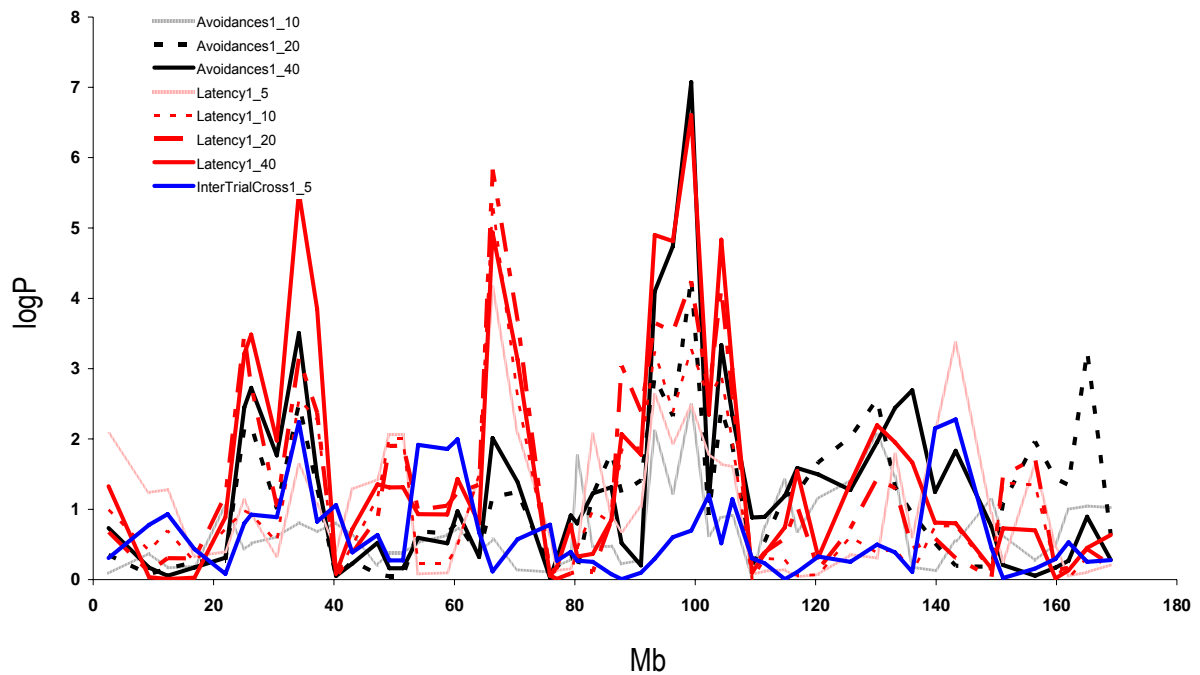


Figura 7. Resultats preliminars de l'anàlisi genètica de QTLs per les variables de la prova d'aprenentatge d'evitació a la *Shuttlebox*. El pic més alt (negre), a la posició 100, representa el QTL pel nombre d'evitacions totals a la sessió de 40 assaigs (Avoidances 1\_40 a la figura).

## Discussió

### **1. Les soques RHA-I i RLA-I com a model d'ansietat/ temerositat: resposta de sobresalt i condicionament clàssic de por (Article I)**

Com hem vist a la introducció d'aquest treball, les diferències conductuals i neuroendocrines entre les dues soques/línies de rates *Roman* (a partir d'ara, ens referirem a RHA o RLA per indicar quan són no consanguínies o "outbred") fan que aquestes es puguin proposar com un bon model psicogenètic per a l'estudi de l'ansietat, la por i la susceptibilitat a l'estrès. L'evidència següent és consistent amb aquesta idea: 1) comparades amb les RHA, les RLA mostren respostes de por i d'ansietat sistemàticament més elevades en diferents tests (condicionats i incondicionats) validats per a la mesura de l'ansietat i la por (ex: Driscoll *et al.*, 1998; Escorihuela *et al.*, 1997; 1999; Fernández-Teruel *et al.*, 1992; 1997; 2002a; Ferré *et al.*, 1995; Torres *et al.*, 2005); 2) les respostes hormonals en situacions d'estrès (ex: elevació dels nivells d'ACTH, corticosterona i prolactina) són superiors en les RLA, i, això és consistent amb que aquesta soca presenti també nivells superiors d'expressió gènica de CRF al nucli del llit de l'estria terminal i al nucli paraventricular de l'hipotàlem (Carrasco *et al.*, 2008); 3) les diferències en la funcionalitat del complex GABA/Bz/Cl<sup>-</sup> (més funcional en la soca RHA; Bentareha *et al.*, 1998; Giorgi *et al.*, 1994) i dels sistemes serotoninèrgics centrals (les RHA tenen més serotonina disponible i més receptors de recaptació de 5-HT; Charnay *et al.*,

1995; Giorgi *et al.*, 2003) també són congruents amb les respostes d'ansietat reduïdes en les rates RHA.

L'article I del present treball amb rates *Roman* dona suport a la idea que són un model d'ansietat consistent i aporta noves dades en reforç de la seva validesa. Així, les RLA-I mostren una línia base de la resposta de sobresalt més alta que les RHA-I (en coherència amb Aguilar *et al.*, 2002; Yilmazer-Hanke, 2002), així com una resposta de sobresalt potenciada per por també més alta, en tots dos experiments. Congruentment, en l'estudi de condicionament clàssic de por les RLA-I també mostren respostes de por (conducta de petrificació al context i davant l'estímul condicionat) més elevades que les RHA-I. Aquestes diferències en condicionament clàssic de por són pràcticament un prerequisite per abordar estudis comparatius morfològics i funcionals de l'amígdala, ja que les dues proves utilitzades, la resposta de sobresalt (basal i potenciada per por) i el condicionament clàssic de por han estat essencials per avançar en l'estudi i coneixement de les bases neurals de la por (ex. Davis *et al.*, 1993; Gray i McNaughton, 2000; LeDoux, 1996; vegeu "Introducció"). En aquest sentit, els estudis funcionals i morfològics de l'amígdala (i estructures associades, com el nucli del llit de l'estria terminal) fets comparant les soques/línies de rates RHA i RLA mostren una varietat de diferències entre elles que, en general tendeixen a ser consistents amb l'idea que els circuits amigdalins serien més actius a les rates RLA (o RLA-I), el que sembla congruent amb les seves respostes de por/ansietat més marcades. Així, s'ha observat que: 1) la injecció de dosis baixes d'arginina-8-vasopressina a l'amígdala central van incrementar la bradicàrdia i petrificació induïda per contextes associats a xoc elèctric de

manera més marcada a la línia de rates RLA (Roozendaal *et al.*, 1992); 2) altres diferències, menys clarament interpretables, entre les dues línies de rates han aparegut quan s'ha injectat CRF o NA en l'amígdala central (Roozendaal *et al.*, 1993; Wiersma *et al.*, 1998); 3) la soca RLA-I presenta un major nombre de neurones que expressen CRF al nucli central de l'amígdala, comparant-la amb les rates RHA-I (Yilmazer-Hanke *et al.*, 2002); 4) les rates RLA-I també tenen un nombre de neurones GABAèrgiques que expressen PARV (parvalbúmina) i del neuropèptid "ansiolític" NPY (neuropèptid Y) augmentat en el complex basolateral de l'amígdala (Yilmazer-Hanke *et al.*, 2002); 5) recentment s'ha trobat al nostre laboratori que la densitat neuronal total a l'amígdala basolateral és més alta en les RLA-I que en les RHA-I i, a més a més, correlaciona amb l'adquisició d'una tasca d'evitació activa en un sentit (Gomez *et al.*, 2008 *sotmès*); 6) el NGFI-A, que s'indueix a l'amígdala com a conseqüència de la por, és fortament activat per administració aguda d'amfetamina en el nucli central de l'amígdala en les rates RLA-I però no en les RHA-I (Guitart-Masip *et al.*, 2008a); i, 7) com hem mencionat a l'inici d'aquest apartat, s'ha observat que les rates RLA-I també mostren augment de mRNA per CRF en la part dorsal del nucli del llit de l'estria terminal (Carrasco *et al.*, 2008).

Els estudis anteriors mostren, per tant, un escenari força coherent entre dades neuromorfològiques/funcionals relatives a l'amígdala (i circuits associats), dades neuroendocrines en resposta a l'estrès i dades conductuals (en models animals d'ansietat i por, apresada i no apresada), tot indicant que el model de rates RHA i RLA presenta una bona validesa de constructe.

Si comparem aquestes soques amb un altre model psicogenètic d'ansietat, les rates HAB i LAB (seleccionades per llur conducta divergent al laberint en creu elevat; ex. Landgraf i Wigger, 2002; 2003), observem paral·lelismes entre les soques més ansioses (les HAB i les RLA), quan se les compara amb les corresponents soques menys ansioses (RHA i LAB): per exemple, les HAB/RLA mostren menys exploració d'espais oberts o il·luminats (camp obert, caixa blanca-negra) i de la taula de forats, mostren nivells elevats de prolactina, ACTH i corticosterona plasmàtiques induïts per estrès, major expressió d'AVP al nucli PVN hipotalàmic (Landgraff i Wigger, 2002; però vegeu Aubry *et al.*, 1995 i Carrasco *et al.*, 2008) i una resposta elevada de corticosterona en el test de dexametasona/CRF (Keck *et al.*, 2002; Steimer *et al.*, 2007). No obstant, les diferències neuromorfològiques trobades en les neurones de projecció de CRF en l'amígdala central de les RHA-I i les RLA-I no s'han observat mai entre les HAB i les LAB (Yilmazer-Hanke *et al.*, 2002; 2004). És més, en contra del que seria previsible per hipòtesi, i que s'ha observat entre les soques *Roman* (Aguilar *et al.*, 2000; Schwegler *et al.*, 1997; Yilmazer-Hanke *et al.*, 2002), les LAB mostren més resposta de sobresalt basal i potenciada per por que les HAB (Yilmazer-Hanke *et al.*, 2004).

Uvnäs-Moberg i col·laboradors (1999) van portar a terme un estudi amb rates Sprague-Dawley que, espontàniament (simplement procedien de dos animalaris propers però en edificis diferents), aprenien molt fàcilment (Stock A) o amb molta dificultat (Stock B) la conducta d'evitació activa en dos sentits, sense haver estat voluntàriament seleccionades per cap prova conductual. No mostraven diferències en llur activitat mesurada en un camp obert en

condicions de foscor, però sí en la resposta de sobresalt basal: les rates de l'estoc B eren més reactives, mostrant més amplitud de resposta de sobresalt i temps de reacció a l'estimulació auditiva més curt. Encara que aquests autors no han mesurat la resposta de sobresalt potenciada per por, les seves observacions són consistents amb les troballes ja descrites en rates *Roman* (Aguilar *et al.*, 2000; Schwegler *et al.*, 1997; Yilmazer-Hanke *et al.*, 2002). Els animals de l'estoc B mostraren uns canvis hormonals indicatius de reacció submissiva-defensiva (semblant al perfil de les rates RLA-I): nivells de corticosterona elevats i nivells baixos d'oxitocina. L'oxitocina disminueix l'ansietat i augmenta el nombre d'evitacions a la prova de *Shuttlebox* (Uvnäs-Moberg *et al.*, 1999). Si s'administra oxitocina durant cinc dies abans de l'aprenentatge d'evitació a la *Shuttlebox*, els animals de l'estoc B (poc evitadors, aparentment més ansiosos) milloren significativament la seva execució, mentre que aquest tractament no afecta els animals de l'estoc A (Uvnäs-Moberg *et al.*, 2000). Aquest darrer efecte mostra certa semblança amb el fet que el condicionament de por al context en les rates RLA (que donava lloc a bradicàrdia i increment de conducta de petrificació) fos atenuat per l'administració d'oxitocina (Rooszendaal *et al.*, 1982; per revisió vegeu Driscoll *et al.*, 2008).

De la comparació dels tres parells de soques o estocs esmentats, bidireccionalment seleccionades per criteris conductuals diferents però relacionats amb l'ansietat, podem extrapolar la conclusió de que diferents característiques conductuals i neuroendocrines poden cosegregar-se (ser coseleccionades al llarg del procés de selecció psicogenètica –cas de les

HAB/LAB i les RHA/RLA- o espontàniament, com en el cas de les rates d'Uvnäs-Moberg i col·laboradors) de manera aparentment coherent amb les conductes o respostes que constitueixen el criteri inicial de selecció. És a dir, no semblaria, *a priori*, teòricament incoherent esperar que rates considerades més ansioses pel criteri de la conducta al laberint en creu elevat mostressin més respostes de por en la prova de sobresalt, com s'observa en el cas de les rates considerades més ansioses per la seva pobra adquisició de l'evitació activa en dos sentits. En canvi, no sembla que aquest hagi de ser el cas sempre ja que processos o respostes que hipotèticament s'haurien de coseleccionar en un determinat sentit, com la resposta de sobresalt potenciada per por, tal com hem vist, es mostren com a relativament independents d'altres mesures. Els resultats mostren clarament la possibilitat de que aquests exemples de selecció psicogenètica (cas de les HAB/LAB i les RHA/RLA) estiguin il·lustrant el fet que diferents proves/respostes d'ansietat o por (aprenentatge d'evitació a la *Shuttlebox* vs resposta de sobresalt i conducta al laberint en creu elevat vs resposta de sobresalt) reposin sobre mecanismes neurobiològics distints, tal com ha estat suggerit per Gray i McNaughton (2000).

L'anterior, és a dir, la relativa independència o relació (només) parcial entre diferents respostes d'ansietat o por, fa encara més apropiat incloure proves de característiques molt diferents (ex. condicionades vs. incondicionades, que impliquin o no conflicte entre tendències - o direcció defensiva-), si el que es pretén és obtenir una varietat de fenotips de temerositat suficient i prou representativa del que podria ésser un símil del neuroticisme o el tret d'ansietat en humans.



## **2. Multidimensionalitat de la conducta ansiosa en rates N/Nih-HS**

### **2.1. Timidesa i fugida defensiva en rates heterogènies: comparació amb les rates Roman (Articles II, III i IV)**

El present és el primer treball fins al moment d'avaluació extensiva de les rates N/Nih-HS en una bateria de proves de conducta per a mesurar ansietat/temerositat. Les diferències observades entre sexes estan majoritàriament en congruència amb evidència prèvia (p. ex. Aguilar *et al.*, 2002; 2003; Fernandes *et al.*, 1999; Lehmann *et al.*, 1999), és a dir, hem observat que les femelles són menys ansioses o porugues que els mascles. L'excepció a aquesta tendència és la resposta de sobresalt potenciada per por, en que no apareixen diferències relacionades amb el sexe. Això no pot ésser considerat com un resultat del tot incongruent ja que en alguns estudis previs amb altres soques de rates tampoc s'han trobat diferències entre sexes. Fins i tot en alguns s'ha observat que les femelles són més ansioses que els mascles en algunes proves d'ansietat condicionada (p. ex. petrificació condicionada al context o a un estímul discret; paradigma de resposta emocional condicionada; prova de supressió de beguda de Vogel; vegeu Aguilar *et al.*, 2003; Brush *et al.*, 1988; Johnston *et al.*, 1991; Lehmann *et al.*, 1999).

Els resultats de l'estudi present són així mateix consistents amb estudis multitest previs sobre temerositat en rosegadors (per revisions vegeu Aguilar *et al.*, 2002; 2003; Ramos i Mormède, 1998): existeixen correlacions significatives entre les proves, però generalment no són d'una magnitud gaire alta. L'anàlisi factorial mostra una estructura multidimensional de conductes relacionades amb l'ansietat o la por en la nostra mostra de rates (vegeu més endavant). Tot i

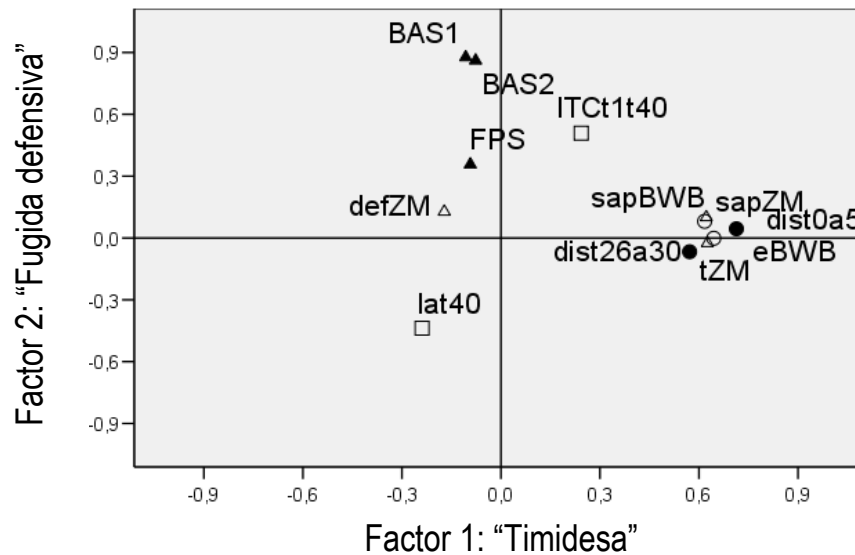
això, malgrat aquest patró de correlacions baixes, és remarcable que realment semblen consistents i tenen el signe que seria previsible, basant-nos en la hipòtesi que aquestes mesures de temerositat haurien de compartir algun component (amb l'excepció d'entre els paràmetres de resposta de sobresalt i de *Shuttlebox*; vegeu més endavant).

Els resultats de l'anàlisi factorial de les 12 variables seleccionades es pot resumir com segueix (vegeu Figura 8): 1) en tots dos sexes hi ha un primer factor que agrupa les variables relacionades amb la temerositat de les proves incondicionades (factor de "Timidesa") i un segon factor en el que els pesos principals són per les mesures d'startle (factor de "Fugida defensiva"); 2) en mascles, les mesures d'adquisició d'evitació activa en dos sentits pesen en tots dos factors (sembla que estiguin associades tant amb la por incondicionada – proves de CBN, ACT i LZ- com amb la línia base de la resposta de sobresalt potenciada per por), tot i que preferiblement al segon; 3) en femelles, l'adquisició de la tasca de *Shuttlebox* només s'associa amb les mesures d'startle (factor 2). Aquestes solucions factorials i les correlacions entre factors mostren que els factors emergents són independents, i que són alguna cosa més que el mer reflex dels tests emprats (Figura 8).

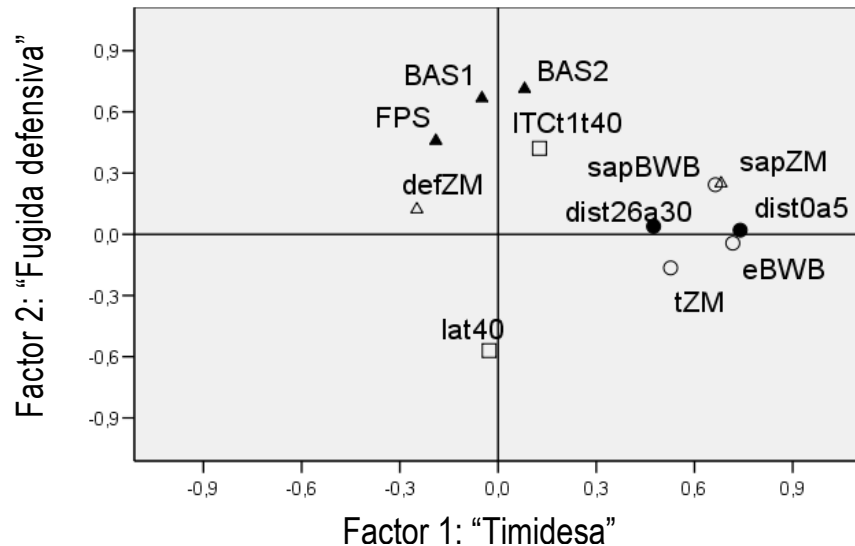
La comparació amb estudis factorials previs que també van utilitzar un ampli grup de mesures de por o ansietat, apresada i no apresada, és difícil degut a les diferències entre tests (p.ex. laberint en creu elevat i petrificació condicionada "Pavlovianament" en l'estudi d'Aguilar *et al.*, 2002; 2003 vs laberint en "zero"

elevat i resposta de sobresalt potenciada per por en l'estudi present) i en el

A)



B)



**Figura 8.** Representació gràfica de l'estructura factorial (rotació obliqua) de les mesures d'ansietat i por per les mostres de mascles (A) i femelles (B) de rates N/Nih-HS. Els símbols corresponen a: "eBWB", entrades al compartiment blanc (n) a la caixa Blanca-negra; "sapBWB", postures d'aproximació (n); "dist0a5", distància (cm) recorreguda durant els primers cinc minuts a l'actimetria; "dist26a30", distància (cm) recorreguda durant els últims cinc minuts a l'actimetria; "tZM", temps passat (s) en seccions obertes del Laberint en Zero Elevat; "sapZM", postures d'aproximació (n); "defZM", defecacions (n); "BAS1", línia base de la resposta de sobresalt basal (sessió 1) (mV); "BAS2", línia base de la resposta de sobresalt basal (sessió 2) (mV); "FPS", resposta de sobresalt potenciada per por (mV); "lat40", latència mitjana de resposta a la *Shuttlebox* (s); "ITCt1t40", intertrial crossings (n) a la *Shuttlebox*.

tipus de subjectes utilitzat (mostra F2 de rates derivada de les soques de rates de rates *Roman* i rates genèticament heterogènies N/Nih-HS, respectivament). Tot i això, com en l'estudi d'Aguilar i col·laboradors (2002), l'aprenentatge d'evitació a la *Shuttlebox* està associat a mesures incondicionades de temerositat.

Tanmateix, d'entre les associacions mencionades, aquelles observades entre les respostes de sobresalt i les de l'aprenentatge d'evitació a la *Shuttlebox* són relativament inesperades, especialment perquè tendeixen a indicar (especialment en femelles) que com més altes són les respostes de sobresalt, millor és l'aprenentatge d'evitació a la *Shuttlebox*. Cal dir, però, que fins avui l'aprenentatge d'evitació a la *Shuttlebox* només s'havia avaluat respecte a la petrificació condicionada Pavloviana, i no respecte a altres tests de por condicionada, com seria el de la resposta de sobresalt. En aquest sentit, hem observat associacions negatives entre petrificació (por) al context i a estímuls discrets (aquesta mesurada en contextos diferents de la *Shuttlebox*) i l'eficiència de l'adquisició de l'evitació activa en dos sentits (Aguilar *et al.*, 2002; 2003; i resultats no publicats del nostre laboratori). Encara més, en una mostra diferent de rates N/Nih-HS hem observat que la petrificació o la por condicionada al context observada als cinc primers intervals entre assaigs de la sessió de *Shuttlebox*, està correlacionada negativament ( $r = -0,43$ ,  $p < 0,01$ ,  $n = 143$ , vegeu article 3) amb l'execució a la sessió de 40 assaigs de *Shuttlebox*. Per tant, sembla clar que la petrificació condicionada al context al principi de la tasca d'evitació en dos sentits està relacionada negativament amb l'eficiència de l'adquisició.

A més a més, els resultats de dos estudis amb mostres independents de rates N/Nih-HS, comparades amb les rates *Roman* (articles III i IV), indiquen conjuntament que a les proves d'ansietat/temerositat incondicionada (essencialment l'activitat a una caixa nova, el laberint en "zero" elevat, resposta de sobresalt basal), les rates N/Nih-HS no presenten un perfil que indiqui de manera definitiva que són més ansioses o menys que alguna de les dues soques consanguínies de comparació (les relativament molt ansioses RLA-I i les relativament poc ansioses RHA-I), tot i que els seus valors en les variables rellevants d'aquelles proves cauen entre els valors de les mitjanes mostrades per les soques *Roman* (vegeu Figura 1 de l'article III i Taula 1 de l'article IV). En canvi, respecte als nivells de por condicionada al context (petrificació durant els cinc primers intervals entre assaigs, això és, condicionament clàssic de por) està clar que les rates N/Nih-HS mostren perfils "defensius" (en terminologia de Blanchard *et al.*, 1990; 1993; Gray i McNaughton, 2000; Griebel i *et al.*, 1996; McNaughton i Gray 2000) que en bona part s'assemblen a les rates RLA-I (article III). En línia amb aquest perfil defensiu, de tipus predominantment "petrificador" davant de situacions condicionades de conflicte (com és l'inici de l'entrenament a la *Shuttlebox*, un conflicte d'"evitació passiva/evitació activa"), les rates N/Nih-HS clarament presenten poca habilitat per a l'adquisició de l'evitació activa en dos sentits, que es manifesta en les respostes d'evitació totals i, indirectament, en el número de creuaments entre assaigs (conducta "pseudocondicionada" que està relacionada amb l'aprenentatge eficaç d'aquesta tasca; ex. Aguilar *et al.*, 2004 i referències). En aquesta última variable, les rates N/Nih-HS i les RLA-I presenten valors mitjans d'aproximadament 20 creuaments per uns aproximadament > 100 que

presenten les RHA-I (vegeu Taula 1 de l'article IV). Per tant, malgrat que seran necessaris més estudis comparatius entre les rates N/Nih-HS i altres soques (com per exemple les *Roman*) en tasques d'ansietat incondicionada, per les tasques que impliquen condicionament (així com per la resposta de sobresalt basal) sembla clar que les rates heterogènies N/Nih-HS presenten algunes característiques conductuals que les acosten més al perfil de la soca ansiosa RLA-I que al de les rates RHA-I (poc ansioses; vegeu referències en seccions anteriors).

Alguns treballs previs han estudiat, en rates no seleccionades (ex. Wistar, Sprague-Dawley) la relació entre ansietat incondicionada i condicionada, utilitzant el test d'ansietat del laberint en creu elevat i avaluant si una menor ansietat mesurada en aquest test (més exploració dels braços oberts) prediu que els animals adquiriran l'evitació activa en dos sentits més ràpidament. Els resultats d'aquests estudis no han estat concloents, ja que en algun cas han trobat aquesta relació hipotètica (Ho *et al.*, 2002; Prunell *et al.*, 1994b) i en altres casos aquesta associació no ha aparegut (Ribeiro *et al.*, 1999). A part d'utilitzar diferents soques de rates i diferents procediments en els tests conductuals emprats, en general aquests treballs s'han realitzat amb un número d'animals relativament petit ( $n < 50$ ).

En canvi, el present estudi representa la primera ocasió en que en rates genèticament heterogènies (probablement les més heterogènies que existeixen; Flint *et al.*, resultats no publicats, comunicats per Johannesson *et al.* en el "*Rat Genomics & Models meeting*", Cold Spring Harbor, USA 2007), i en

dues mostres grans d'aquestes ( $n=143$ , article III; i  $n=277$ , article IV), s'avalua la relació entre conductes d'ansietat no apreses i respostes apreses (condicionades) de por. Això s'ha portat a terme amb dos procediments que es complementen: 1) l'anàlisi de les correlacions entre les variables dels diferents tests en tota la mostra; i, 2) la selecció de submostres d'animals amb valors extrems en les variables conductuals d'interès per observar com això prediu els valors que tindran altres variables d'ansietat.

La comparació d'aquests subgrups de rates N/Nih-HS amb valors extrems en variables representatives d'ansietat/por mostra resultats força interessants i complementaris dels que ja s'han esmentat, que es podrien resumir així: 1) els subgrups amb puntuacions extremes en les variables d'ansietat/temerositat incondicionada (les més rellevants: entrades en seccions obertes del laberint en "zero" elevat i temps passat en aquestes seccions; distància recorreguda als 5 primers minuts d'exposició a la caixa nova), mostren que els valors d'aquestes variables són predictius els uns respecte dels altres (exemple: valors alts d'entrades o de temps en les seccions obertes del laberint en "zero" elevat determinen valors alts en distància recorreguda en 5 minuts a la caixa nova, i viceversa); 2) els valors d'aquestes mateixes variables incondicionades prediuen l'eficàcia en l'adquisició de l'evitació activa en dos sentits (vegeu Figura 1, 2 i 3 de l'article IV); 3) de les variables incondicionades esmentades, únicament valors extrems en entrades en seccions obertes del laberint en "zero" elevat prediuen la intensitat de la resposta de sobresalt potenciada per por, en el sentit que els animals que fan més conducta a les seccions obertes presenten resposta de sobresalt disminuïda (vegeu Figura 1 de l'article IV); 4)

en canvi, la selecció per valors extrems en resposta de sobresalt potenciada per por no prediu la conducta dels animals N/Nih-HS en els tests incondicionats ni a la *Shuttlebox* (vegeu Figura 4 de l'article IV).

Per tant, també l'anàlisi per subgrups amb valors extrems en diferents variables d'ansietat/por, confirma en general la relativa dissociació entre resposta de sobresalt i adquisició de l'evitació activa en dos sentits a la *Shuttlebox*, tal com s'ha comentat anteriorment a partir d'altres anàlisis i de les dades de l'article II. Així mateix, es confirma l'aparent manca d'associació entre la resposta de sobresalt i les variables de les proves incondicionades d'ansietat o temerositat.

Seguint la conceptualització de Blanchard i col·laboradors sobre les conductes defensives de les rates en condicions semi naturals ("*Visible Burrow System, VBS*", Blanchard *et al.*, 1990; 1993), i la seva definició de "distància defensiva", les rates N/Nih-HS poden ésser vistes com propenses a fer conducta de petrificació (semblants a les RLA-I, perquè les RHA-I tendeixen a fugir; vegeu Figura 9) quan la distància és molt curta i la direcció defensiva (segons el concepte de Gray i McNaughton, 2000) no està clara perquè la situació implica un conflicte entre dos objectius o tendències incompatibles. Aquest és el cas dels estadis inicials a l'adquisició de l'evitació activa en dos sentits a la *Shuttlebox*, que impliquen ansietat degut a la incompatibilitat de les tendències a, 1) entrar en una situació perillosa (com evitació o escapada: fugir al compartiment oposat, on la rata ha rebut un xoc prèviament), o 2) romandre (fer conducta de petrificació: evitació passiva) en el compartiment actual, que és igualment amenaçador per la rata, ja que també hi ha rebut xoc. Per tant,



almenys al principi de la tasca d'evitació a la *Shuttlebox* la distància defensiva és molt curta i la direcció defensiva és poc clara pel subjecte (seguint les definicions anteriors, vegeu Blanchard *et al.*, 1990; 1993; Gray i McNaughton, 2000), així que les rates N/Nih-HS i les RLA-I mostren una gran tendència a fer conducta de petrificació (Figura 9). A mesura que avança la sessió

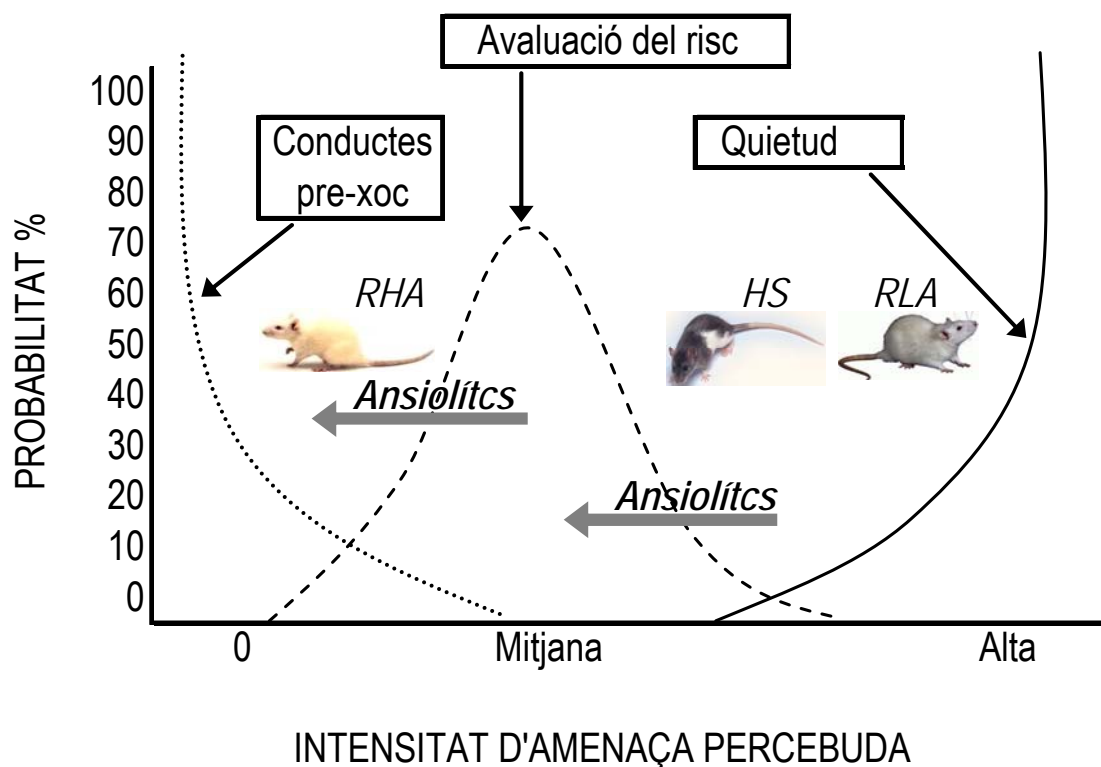


Figura 9. Relació hipotètica, basada en els presents resultats, entre intensitat d'amenaça percebuda i execució a la prova de *Shuttlebox* en les rates RHA, RLA i N/Nih-HS (adaptació de la figura de McNaughton i Corr, 2004).

d'entrenament s'estableix una ruta d'escapada i una conducta dirigida a aquest objectiu (la direcció defensiva esdevé més clara). Encara més, d'acord amb les definicions de l'ansietat de Gray i McNaughton i de Blanchard i col·laboradors, les drogues ansiolítiques milloren l'adquisició de l'evitació activa en dos sentits a la *Shuttlebox* reduint la conducta de petrificació condicionada, especialment durant els conflictius assaigs inicials (quan encara no s'ha adquirit

consistentment una resposta d'escapada dirgida i la conducta de petrificació és molt prominent), però no en fases d'adquisició més avançades (p. ex. Boix *et al.*, 1988; Escorihuela *et al.*, 1993; Fernandez-Teruel *et al.*, 1991a-c; Gray, 1982; 2000; Prunell, 1994b). En canvi, en els diferents procediments de mesura de resposta de sobresalt, en que no hi ha conflicte (la direcció defensiva és clara), les rates N/Nih-HS mostren valors intermitjos entre els de les rates RHA-I i RLA-I (Taula 1 de l'article IV).

Les associacions observades entre conductes d'avaluació del risc (de les proves CBN i LZ) i l'adquisició de l'evitació activa en dos sentits són una altra nova troballa. Aquestes conductes d'aproximació-evitació/fugida (quan la rata estira el cos cap a una secció oberta o associada a un estímul amenaçador sense entrar-hi) es conceptualitzen com a conductes d'avaluació del risc i són sensibles a les drogues ansiolítiques (Blanchard *et al.*, 1990; 1993; Ribeiro-Barbosa *et al.*, 2006). És notable, doncs, que el nombre de postures d'aproximació en el laberint en "zero" elevat mostren associacions significatives amb les mitjanes de latència de resposta en varis blocs de 10 assaigs de l'adquisició de l'evitació activa en dos sentits. Aquesta relació també és dependent del sexe i, contràriament a les associacions entre resposta de sobresalt i adquisició d'evitació, és molt més marcada en mascles que en femelles (vegeu anàlisi de regressió a la Taula 6 de l'article II).

Tenint en compte que les rates N/Nih-HS són aparentment les més genèticament heterogènies que existeixen (Flint, comunicació personal) les dades presents poden servir com una referència potencial per estudis futurs

amb aquest o altres estocs de rates. Seria rellevant científicament, sens dubte, avaluar el perfil defensiu de les rates N/Nih-HS en condicions més etològiques, com en el *Visible Burrow System* (sistema de lloriguera visible) dels Blanchard. Amb aquesta informació, i comparant-les amb altres soques de rates de laboratori, podria ser possible establir si els perfils temerosos de l'estoc de rates heterogènies es poden generalitzar a situacions semi-naturals o més etològiques, i saber llur posició relativa respecte als perfils defensius d'altres soques de rates.

## **2.2. Indiquen les relacions entre resposta de sobresalt i aprenentatge d'evitació a la *Shuttlebox* diferents mecanismes neurals?**

Les troballes següents recolzen divergències, fins i tot independència, entre entre els mecanismes neurals que guien aquestes dues respostes relacionades amb el condicionament de por: 1) les lesions septohipocàmiques milloren l'evitació activa en dos sentits, tot atenuant la petrificació condicionada al context (per revisió vegeu Gray i McNaughton, 2000), però no afecten la resposta de sobresalt potenciada per por (Davis *et al.*, 1993; McNish *et al.*, 1997; Phillips i LeDoux, 1992; 1994; Savonenko *et al.*, 1999; 2003; Werka, 1997; Werka i Zielinski, 1998); 2) les lesions o inactivació (amb injeccions d'antagonistes de NMDA [N -methyl-D-aspartat]) de l'amígdala basolateral o central empitjoren l'aprenentatge d'evitació activa en dos sentits a la *Shuttlebox* i el de la resposta de sobresalt potenciat per por. S'ha observat que aquestes interrupcions de la funció de l'amígdala empitjoren l'aprenentatge d'evitació a la *Shuttlebox*, perquè deterioren la direccionalitat de les respostes d'escapada i les reaccions atencionals cap a l'estímul condicionat. Però el tractament no

afecta la por al context (aquesta mesurada com a resposta de petrificació al context durant els intervals entre assaigs a l'entrenament a la *Shuttlebox*) (Savonenko *et al.*, 2003; Werka, 1997; Werka i Zielinski, 1998).

No obstant, aquestes aportacions no exclouen que quan la por o conducta de petrificació implicada en el conflicte inicial d' "evitació activa/evitació passiva" (de l'aprenentatge d'evitació a la *Shuttlebox*) comença a perdre intensitat, en paral·lel amb l'establiment de respostes d'escapada consistents, la resposta de sobresalt condicionada a un estímul discret i relacionada amb l'amígdala (com en la resposta de sobresalt potenciada per por), pot jugar un paper facilitador en les respostes de l'animal a l'estímul condicionat. Per tant l'evidència que hem presentat suggereix que la resposta de sobresalt i l'aprenentatge d'evitació activa en dos sentits a la *Shuttlebox*, especialment en els estadis inicials, podrien estar sota control neural primari diferent, tot i que podrien, d'alguna forma, coexistir o operar conjuntament en fases posteriors d'aquest aprenentatge.

Quan hi ha conflicte entre tendències de resposta, com al començament de l'aprenentatge d'evitació activa en dos sentits a la *Shuttlebox*, els animals han d'alternar molt ràpidament entre conductes relacionades amb la por i conductes relacionades amb l'ansietat (p.ex. fugir vs fer conducta de petrificació, evitació activa vs evitació passiva), i els mecanismes neurals que operen en la resolució d'aquest conflicte semblen estar controlats preferentment pel sistema septohipocàmpic i el cingulat posterior, tot i que l'activació de l'amígdala també és necessària en fases com aquesta (per mantenir el nivell d'activació

autonòmic al llarg del procés, Gray i McNaughton, 2000; McNaughton i Gray, 2000; McNaughton i Corr, 2004). D'acord amb aquest punt de vista, la resposta de fugida elicitada per l'estímul condicionat o la por, com escapar cap al compartiment oposat de la *Shuttlebox*, que apareix quan es comença a superar el conflicte inicial, estaria controlada, més aviat, per l'amígdala, i així l'associació positiva entre respondre activament a la *Shuttlebox* i la resposta de sobresalt semblaria més clara a mesura que avança la sessió d'aprenentatge. De fet, el patró de correlacions i les anàlisis de regressió múltiple que sorgeixen en la mostra de rates N/Nih-HS (vegeu article II) aporta cert suport a aquesta interpretació, ja que la mesura de resposta de sobresalt potenciada per por presenta les correlacions més altes (essencialment en femelles) amb l'execució a la *Shuttlebox* (mitjana de latència per blocs d'assaigs) en els blocs de 21 a 30 i en el de 31 a 40 ( $r \geq -.17$   $p < .01$  en tots dos casos) mentre que no s'observa correlació significativa en els 10 primers assaigs. Congruentment, la regressió múltiple amb les dades de les femelles mostra que la resposta de sobresalt potenciada per por (juntament amb mesures d'avaluació del risc), prediu l'adquisició d'evitació activa en dos sentits a la *Shuttlebox* (mitjana de latència de resposta) en els blocs d'assaigs d'11-20, 21-30 i 31-40. En mascles, l'anàlisi de regressió indica que la resposta de sobresalt basal a la segona sessió condicionada al context, amb la conducta d'avaluació del risc (com les postures d'aproximació en la prova de caixa blanca-negra), influeixen significativament en l'execució durant els assaigs 21-30 i 31-40 de la sessió d'evitació en dos sentits.

És la primera vegada que s'observen associacions que indiquen que la resposta de sobresalt està relacionada positivament amb l'eficiència en algunes fases intermèdies i finals d'una primera sessió d'adquisició de l'evitació activa en dos sentits, mentre que no afecta o és relativament independent de l'execució en les fases més inicials (els 10 primers assaigs) de la tasca, aquelles en les que la conducta de petrificació predomina, degut a la por condicionada al context i al conflicte, i dificulta l'aparició de respostes de fugida activa.

A més de la implicació de la mencionada circuiteria septohipocàmpica i amigdalina en l'adquisició de l'evitació activa en dos sentits i de la resposta de sobresalt potenciada per por, la circuiteria dopaminèrgica mesocorticolímbica (el circuit anomenat "de la motivació") també podria tenir un paper en aquests paradigmes (Schultz, 2002; Stark *et al.*, 2003). En aquest sentit, l'activació de la transmissió dopaminèrgica mesocortical sembla que té un paper crític en la formació d'associacions per a estratègies conductuals noves, tal com suggereixen estudis d'evitació activa en dos sentits en gèrbids (*meriones unguiculatus*; Stark *et al.*, 2003). Congruentment, l'administració sistèmica d'apomorfina (agonista dopaminèrgic) a dosis que mostren efectes semblants als ansiolítics en altres tests conductuals, millora l'adquisició de l'evitació activa en dos sentits en rates, mentre que els antagonistes dopaminèrgics l'empitjoren (p.ex. Reis *et al.*, 2004). No obstant, i d'acord amb els possibles mecanismes neurals diferencials implicats en el paradigma de l'evitació activa en dos sentits i en el de la resposta de sobresalt potenciada per por, s'ha mostrat que l'administració sistèmica d'agonistes dopaminèrgics o manipulacions funcionals

del nucli accumbens (una part crucial del circuit dopaminèrgic mesocorticolímbic) no sembla que estiguin críticament implicats en l'adquisició de la resposta de sobresalt potenciada per por (Josselyn *et al.*, 2005; Oliveira *et al.*, 2006). Així doncs, la recerca de la implicació de la circuiteria mesocortical dopaminèrgica en l'adquisició de l'evitació activa en dos sentits i de la resposta de sobresalt potenciada per por recolza la hipòtesi que tot dos tipus de respostes mitjançades per por estan sota control neural diferent, almenys parcialment. Els resultats conductuals del present treball (articles II i IV) donen també suport a aquesta hipòtesi.

### **3. Vers els gens quantitius de l'ansietat en rates: visió global i futur immediat**

El projecte en el que s'emmarca el present treball té com a objectiu principal l'avenç en la recerca de mecanismes genètics (QTLs, gens, i processos dependents d'ells) de l'ansietat i la temerositat en rates, tot assumint que la informació o troballes que s'obtinguin seran aportacions importants per a la recerca de les bases genètiques d'aquells trets en humans (vegeu p. ex. Flint 2004; Willis-Owen i Flint 2007).

El mapeig genètic dels trets psicològics i els trastorns psiquiàtrics en humans s'ha revelat com a una tasca força més difícil del que es pensava inicialment. La baixa heretabilitat, la pobra caracterització dels fenotips, les complexitats de les interaccions "genotip-fenotip" i la més que probable herència poligènica són factors que es combinen per a convertir la "dissecció" molecular d'aquells trets (humans) en un problema de gran complexitat. En canvi, l'estudi i el

mapeig genètic de la conducta d'animals de laboratori ha aportat evidència d'associació (“*linkage*”) genètica, ja que s'ha trobat relació entre diverses conductes (que modelen l'ansietat i la por, entre d'altres) o d'altres caràcters biològics complexos i una varietat de regions cromosòmiques (ex. Aitman *et al.* 2008; Doerge, 2002; Flint, 2004; Flint i Mott, 2001; Jacob i Kwitek, 2001). A més a més, i també en contrast amb els estudis genètics en humans, la replicació dels resultats de mapeig genètic en animals (en associació amb fenotips complexos) ha estat bastant més consistent (vegeu com a exemples Caldarone *et al.*, 1997; Flint 2004; Flint *et al.* 1995; 2005; Wehner *et al.*, 1997), fent que la caracterització addicional dels loci cromosòmics ens pugui aportar informació sobre les bases moleculars dels fenotips (i, pel que a nosaltres ens interessa, de la conducta ansiosa).

Existeixen, no obstant, dos inconvenients principals en l'ús de models animals: 1) la rellevància (validesa) d'un determinat model per al tret humà, ja que els fenotips observats no sempre són equivalents als aspectes humans que es pretenen modelar (imitar); i, 2) la necessitat de localitzar i mapejar els *loci* genètics amb prou resolució com per permetre la identificació de les variants moleculars. El treball aquí presentat, i el projecte en que s'integra, pretén abordar els dos aspectes esmentats.

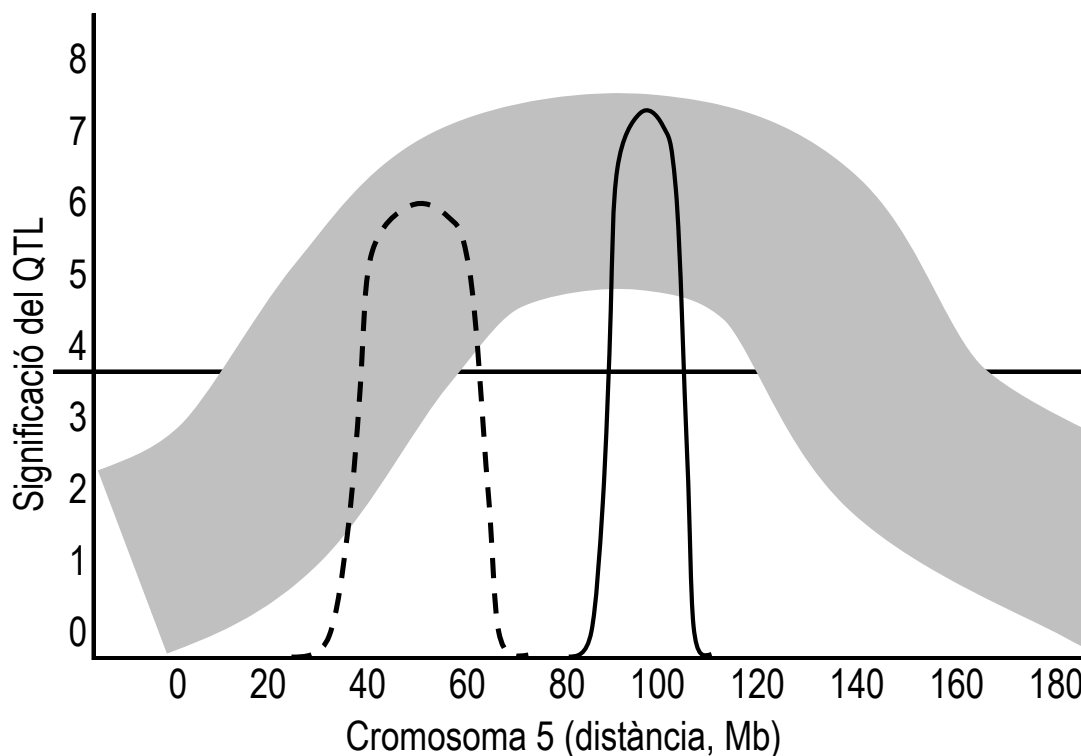
En relació al primer d'aquests aspectes, les soques de rates *Roman* RLA-I/Verh i RHA-I/Verh van ser el nostre model d'elecció des d'un principi per a la realització dels primers estudis de QTLs de l'ansietat (Fernández-Teruel *et al.* 2002), doncs constituïen i continuen representant un dels models animals



(psicogenètic) de susceptibilitat a l'ansietat i la por més ben validats i més consistents en mesures conductuals, neuroquímiques i neuroendocrines (vegeu "Introducció" i apartats anteriors de la present "Discussió"; per revisions vegeu Carrasco *et al.* 2008; Driscoll *et al.* 1998, 2008 en premsa; Fernández-Teruel *et al.* 1997; vegeu també el número especial Fernández-Teruel i Escorihuela, "Special Issue on the Roman rats". *Behavior Genetics*, 27: 499-582, 1997). Fins i tot, en aquesta tesi hem presentat evidència nova que dóna més validesa al model ja que la soca més ansiosa i susceptible a l'estrès, la RLA-I, presenta nivells de resposta de sobresalt basal i potenciada per por marcadament superiors a la soca RHA-I (relativament poc ansiosa), i també hem trobat diferències en el mateix sentit en el procediment de condicionament clàssic de por (o conducta de petrificació condicionada). Com veurem més endavant, aquestes dues soques de rates continuen essent molt valuoses com a model animal de base per a l'estudi dels mecanismes genètics de l'ansietat en el que ens trobem involucrats.

El segon inconvenient esmentat, l'obtenció del nivell necessari de resolució en el mapeig genètic que faci possible la identificació de les variants moleculars (gens) que contribueixen a les variabilitat dels fenotips complexos, ha mostrat ser un repte de gran dificultat. El principal problema rau al fet que la majoria de les estratègies de mapeig genètic disponibles (p. ex. creuaments F2) en animals presenten una baixa resolució. Això és degut, en essència, a que fins i tot en el cas que la contribució genètica total a la variació d'un tret sigui gran, la proporció de variància explicada per un únic *locus* és quasi sempre petita (normalment menys d'un 10% del total). Està calculat que, per aconseguir la

identificació o mapeig de QTLs en una població de rates F2 fins al nivell de precisió que permetés la caracterització molecular, caldrien fins i tot desenes



- Indica QTL significatiu (distància aproximada >50Mb) per evitació activa en dos sentits, condicionament clàssic de por (petrificació) i ansietat al laberint en creu elevat (amb rates F2; Fernández-Teruel *et al.*, 2002)
- Indica QTL, mapejada a alta resolució (distància aproximada ≤5Mb), per a l'evitació activa en dos sentits
- - Indica QTL "suggestiu" també mapejada a alta resolució, per conductes d'ansietat a la caixa blanca-negra i al laberint en "zero" elevat

Figura 10. Representació gràfica, aproximada i il·lustrativa del QTL per varis fenotips d'ansietat i por (condicionats i incondicionats) obtinguts amb la mostra de rates F2 (Fernández-Teruel *et al.*, 2002; franja grisa), i dels QTLs obtinguts amb alta resolució per l'adquisició de l'evitació activa en dos sentits (posició 100 Mb; línia contínua) i per les conductes d'ansietat incondicionada (QTL "suggestiu", encara per confirmar; posició aproximada 70 Mb; línia discontinua). La línia contínua horitzontal simbolitza el llindar aproximat de significació (a prop del valor 4).

de milers d'animals (ex. Flint i Mott, 2001; Mott i Flint, 2002; Mott *et al.*, 2000).

No obstant, l'ús d'animals híbrids F2 s'ha mostrat útil com a estratègia inicial

per localitzar influències genètiques en cromosomes particulars (encara que els intervals siguin massa grans, 10-40 cM) i guiar els estudis posteriors enfocats al mapeig fi (amb alta resolució) d'aquelles regions cromosòmiques o QTLs. Aquest és el cas del treball previ del nostre laboratori (Fernández-Teruel *et al.* 2002b), en el que es van identificar varis QTLs amb influència sobre diverses conductes d'ansietat i por en rates F2 (derivades de les soques RHA-I i RLA-I), tot destacant un QTL al cromosoma 5 amb acció pleiotròpica (sobre varies conductes d'ansietat en diferents tests) i que es situa a una regió homòloga a la del QTL per a l'ansietat i pel tret de "Neuroticisme" trobats, respectivament, al cromosoma 1 de ratolins i d'humans (vegeu Fullerton *et al.* 2003; Willis-Owen i Flint 2007).

Com ja hem vist en seccions prèvies, una estratègia per augmentar la resolució del mapeig genètic (fins a  $< 2$  cM, o menys de 5 Mb) és utilitzar animals de soques genèticament heterogènies. Llurs cromosomes són un mosaic de les 8 soques consanguínies progenitores (Figura 6) i es poden inferir els haplotips dels progenitors en cada cromosoma amb el mètode "*Dynamic Programming*" desenvolupat pels nostres col·laboradors de la Universitat de Oxford (ex. Mott *et al.*, 2000). Així, en col·laboració amb el grup d'en Jonathan Flint (Martina Johannesson, William Valdar, Richard Mott i d'altres), hem pogut aconseguir el mapeig fi i a alta resolució (al voltant de 4 Mb) de QTLs del cromosoma 5 de rata (rates heterogènies N/Nih-HS) que influeixen significativament sobre conductes d'ansietat i temerositat, en especial sobre l'adquisició d'evitació activa en dos sentits (posició 100 Mb; vegeu "Resultats" i Figura 10; vegeu també Figura 7) tot i que també hi ha QTL "suggestius" al voltant de la posició

70 Mb per a fenotips d'ansietat incondicionada (caixa blanca-negra i laberint en "zero" elevat; Figura 10). És important remarcar, en aquest punt, que un altre cop (com ja hem discutit al llarg d'aquest treball) la resposta de sobresalt basal i potenciada per por no es mostra influïda per cap QTL del cromosoma 5 (vegeu també Fernández-Teruel *et al.*, 2002b). És a dir, guardant certa coherència amb la dissociació neural i conductual (resultats de l'article 2 i de l'article 4) que ja hem discutit, també a nivell genètic les respostes de sobresalt semblen influïdes per mecanismes (QTLs o gens) que possiblement siguin diferents dels que influeixen respostes en situació de conflicte condicionat com ara l'evitació activa en dos sentits.

Tornant al mapeig fi del cromosoma 5, en l'interval del QTL principal, que està a la posició 100 Mb (al centre del QTL identificat a Fernández-Teruel *et al.*, 2002b), hi ha 7 gens: *Tyrp1*, *Mpdz*, *Zdhhc21*, RGD1561090 (gen predit), RGD1308059, RGD1565987 (gen predit) i *Bat2d*. El proper pas, que ja està en curs, és valorar si algun d'aquests gens es relaciona amb la temerositat i influeix significativament els fenotips d'ansietat mesurats. Per això, i com a primera passa necessària, estem en aquests moments valorant (amb PCR quantitativa en temps real, amb Flint i col·laboradors) si algun dels gens esmentats es troba diferencialment expressat en les rates RHA-I i RLA-I en àrees cerebrals relacionades amb l'ansietat (ex. amígdala, hipocamp, escorça cingulada).

Com hem dit, fins ara només hem portat a terme el mapeig a alta resolució del QTL del cromosoma 5 en les rates heterogènies N/Nih-HS. Però la participació

en el projecte europeu “EURATools” (amb 17 laboratoris europeus), que ja té 2 anys de vigència, permetrà el mapeig amb alta resolució de tot el genoma d’unes 1500-2000 rates heterogènies (vegeu p.ex. Aitman *et al.*, 2008) en el termini d’un any. Això permetrà estudiar la transcripció gènica en totes les regions de QTLs mapejades utilitzant regions cerebrals implicades en la regulació de l’ansietat. Pels gens que presentin una associació més significativa amb els fenotips ansiosos i siguin els candidats més plausibles es realitzaran experiments de manipulació genètica en les rates (en col·laboració amb el Dr. Ignacio Anegón, INSERM, Nantes, França), per exemple de transferència de gens en el cervell (ex. injecció de ARN d’interferència) i de transgènesi (mitjançant lentivirus) per modificar-ne l’expressió i confirmar *in vivo* el seu rol en els fenotips d’interès. Aquests experiments es portaran a terme en les soques de rates RHA-I (poc ansioses) i RLA-I (molt ansioses), amb l’objectiu d’avaluar si la hipoexpressió (rates “*knock down*” ) o la sobreexpressió (rates transgèniques), segons convingui, d’un gen candidat (derivat dels estudis d’expressió) produeix els canvis pronosticables en els trets fenotípics d’ansietat o temerositat.

L’objectiu final i global que es persegueix, i del que el present treball representa només l’inici, és el d’identificar gens, i processos dependents d’ells, que es trobin implicats en la regulació de l’ansietat i la temerositat (i, possiblement, de fenòmens associats, com la susceptibilitat a l’estrès o la depressió) en rates. Sembla que no estem gaire lluny de la fita de trobar algun gen quantitatiu per aquells trets (com ja s’ha trobat a ratolins; vegeu Yalcin *et al.*, 2004) per primer cop a la rata. De moment estem investigant els 7 gens que hi han a l’esmentat

QTL del cromosoma 5 per a l'ansietat. Si per a algun d'ells, o per algun procés derivat, trobéssim que intervé a la regulació de la conducta ansiosa, probablement això sol ja representaria un avenç científic de considerable rellevància.

## Conclusions

1. Les rates *Roman* presenten una bona consistència com a un model de temerositat, ja que les rates de la soca RLA-I, més ansioses en proves d'ansietat condicionades i incondicionades, mostren major resposta de sobresalt, basal i també potenciada per por, així com més condicionament de por al context i a un estímul condicionat.
2. Els resultats de l'estudi anterior (article I) mostren que es pot obtenir potenciació per por de la resposta de sobresalt amb tan sols dues sessions de procediment.
3. L'estructura factorial d'una àmplia varietat de mesures/respostes d'ansietat i por en una mostra gran de rates genèticament heterogènies (N/Nih-HS) revela dues dimensions o factors principals independents: "Timidesa" i "Fugida defensiva".
4. D'acord amb la major part d'estudis previs, les femelles N/Nih-HS mostren menys ansietat o temerositat que els mascles.
5. Especialment interessants i noves són les associacions observades entre resposta de sobresalt (basal o potenciada per por) i l'adquisició de l'evitació activa en dos sentits, tot indicant que la resposta de sobresalt tendria a relacionar-se positivament amb l'aprenentatge d'evitació a la

- Suttlebox*, especialment en fases intermitges (però no en els primers assaigs, en els que la conducta de petrificació condicionada predomina).
6. Els estudis addicionals (articles III i IV) indiquen que, efectivament, l'execució final a la sessió d'evitació activa en dos sentits, és força independent de les respostes de sobresalt. En canvi les mesures d'ansietat incondicionada mostren certa capacitat de predicció sobre l'execució a la sessió d'evitació activa en dos sentits.
  7. Globalment, les anàlisis conductuals presentats suggereixen que la resposta de sobresalt i l'adquisició de l'evitació activa en dos sentits en les seves fases més primerenques (quan el conflicte és més intens), podrien estar sota control neural diferent.
  8. Les anàlisis genètiques amb alta resolució indiquen que el cromosoma 5 de les rates N/Nih-HS conté un QTL molt significatiu per a l'adquisició de l'evitació activa en dos sentits, però no per a la resposta de sobresalt. A més a més, en una posició diferent del mateix cromosoma, sembla trobar-se un altre (o més d'un) probable QTL per respostes incondicionades d'ansietat.
  9. Al QTL del cromosoma 5 per a l'adquisició de l'evitació activa en dos sentits es troben set gens coneguts de la rata, el que permet estudiar, tant en les rates heterogènies com en les *Roman*, si algun d'ells



constitueix un bon candidat com a gen quantitatiu amb influència sobre les respostes d'ansietat i temerositat.

## Referències bibliogràfiques

- Abecasis GR, Cherny SS, Cookson WO, Cardon LR (2002) Merlin-rapid analysis of dense genetic maps using sparse gene flow trees. *Nat Genet* 30: 97-101
- Aitman TJ, Critser JK, Cuppen E, Dominiczak A, Fernandez-Suarez XM, Flint J, Gauguier D, Geurts AM, Gould M, Harris PC, Holmdahl R, Hubner N, Izsvák Z, Jacob HJ, Kuramoto T, Kwitek AE, Marrone A, Mashimo T, Moreno C, Mullins J, Mullins L, Olsson T, Pravenec M, Riley L, Saar K, Serikawa T, Shull JD, Szpirer C, Twigger SN, Voigt B, Worley K (2008) Progress and prospects in rat genetics: a community view. *Nat Genet* 40: 516-522
- Aguilar R, Gil L, Fernández-Teruel A, Tobeña A (2004) Genetically-based behavioral traits influence the effects of shuttle box avoidance overtraining and extinction upon intertrial responding: a study with the Roman rat strains. *Behav Process* 66: 63-72
- Aguilar R, Gil L, Flint J, Gray JA, Dawson GR, Driscoll P, Gimenez-Llort L, Escorihuela RM, Fernández-Teruel A, Tobeña A (2002) Learned fear, emotional reactivity and fear of heights: a factor analytic map from a large F2 intercross of Roman rat strains. *Brain Res Bull* 57: 17-26
- Aguilar R, Gil L, Gray JA, Driscoll P, Flint J, Dawson GR, Gimenez-Llort L, Escorihuela RM, Fernández-Teruel A, Tobeña A (2003) Fearfulness and sex in F2 Roman rats: males display more fear though both sexes share the same fearfulness traits. *Physiol Behav* 78: 723-732
- Aguilar R, Gil L, Tobeña A, Escorihuela RM, Fernández-Teruel A (2000) Differential effects of cohort removal stress on the acoustic startle response of the Roman/Verh rat strains. *Behav Genet* 30: 71-75

- Aubry JM, Bartanusz V, Driscoll P, Schulz P, Steimer T, Kiss JZ (1995) Corticotropin-releasing factor and vasopressin mRNA levels in Roman high- and low-avoidance rats: response to open-field exposure. *Neuroendocrinology* 61: 89-97
- Ávila C (2001) Distinguishing BIS-mediated and BAS-mediated disinhibition mechanisms: a comparison of disinhibition models of Gray and Patterson and Newman. *J Pers Soc Psychol* 80: 311-324
- Ávila C, Parcet MA (2000) The role of Gray's impulsivity in anxiety-mediated differences in resistance to extinction. *Eur J Pers* 14: 185-198
- Ávila C, Parcet MA (2002) The role of attentional anterior network on threat-related attentional biases in anxiety. *Pers Individ Dif* 32: 715-728
- Ávila C, Parcet MA, Ibañez MI, Ortet G (1999) The role of the behavioral inhibition system in the ability to associate aversive stimuli with future rewards. *Pers Individ Dif* 27: 1209-1219
- Ávila C, Torrubia R (2006) Personality differences in suppression of behavior as a function of the probability of punishment. *Pers Individ Dif* 41: 249-260
- Barrós-Loscertales A, Meseguer V, Sanjuan A, Belloch V, Parcet MA, Torrubia R, Avila C (2006) Behavioral inhibition system activity is associated with increased amygdala and hippocampal gray matter volume: a voxel-based morphometry study. *Neuroimage* 33: 1011-1015
- Bentareha R, Araujo F, Ruano D, Driscoll P, Escorihuela RM, Tobeña A, Fernández-Teruel A, Vitorica J (1998) Pharmacological properties of the GABA(A) receptor complex from brain regions of (hypoemotional) Roman high- and (hyperemotional) low-avoidance rats. *Eur J Pharmacol*. 1998 Jul 31;354(1): 91-7
- Bignami G (1965) Selection for high rates and low rates of avoidance conditioning in the rat. *Anim Behav* 13: 221-227
- Blanchard RJ, Blanchard DC, Rodgers J, Weiss SM (1990) The characterization and modeling of antipredator defensive behavior. *Neurosci Biobehav Rev* 14: 463-472

- Blanchard DC, Hynd AL, Minke KA, Minemoto T, Blanchard RJ (2001) Human defensive behaviors to threat scenarios show parallels to fear- and anxiety-related defense patterns of non-human animals. *Neurosci Biobehav Rev* 25: 761-770
- Blanchard RJ, Yudko EB, Rodgers J, Blanchard DC (1993) Defense system psychopharmacology: an ethological approach to the pharmacology of fear and anxiety. *Behav Brain Res* 58: 155-165
- Boakes RA (1984) *From Darwin to behaviourism: psychology and the minds of animals*. London: Cambridge University Press
- Boix F, Fernández-Teruel A, Tobeña A (1988) The anxiolytic action of benzodiazepines is not present in handling-habituated rats. *Pharmacol Biochem Behav* 31: 541-546
- Boulis NM, Davis M (1989) Footshock-induced sensitization of electrically elicited startle reflexes. *Behav Neurosci* 103, 504-508
- Broadhurst PL (1975) The Maudsley reactive and nonreactive strains of rats: a survey. *Behav Genet* 5: 299-319
- Broadhurst PL, Bignami G (1965) Correlative effects of psychogenetic selection: a study of the Roman high and low avoidance strains of rats. *Behav Res Ther* 2: 273-280
- Brush FR (1991) Genetic determinants of individual differences in avoidance learning: behavioral and endocrine characteristics. *Experientia* 47: 1039-1050
- Brush FR (2003) Selection for differences in avoidance learning: the Syracuse strains differ in anxiety, not learning ability. *Behav Genet* 33: 677-696
- Brush FR, Baron S, Froehlich JC, Ison JR, Pellegrino LJ, Phillips DS, Sakellaris PC, Williams VN (1985) Genetic differences in avoidance learning by *Rattus norvegicus*: escape/avoidance responding, sensitivity to electric shock, discrimination learning, and open-field behavior. *J Comp Psychol* 99: 60-73

- Brush FR, Del Paine SL, Pellegrino LJ, Rykaszewski IM, Dess NK, Collins P (1988) CER supression, passive-avoidance learning, and stress-supression of drinking in the Syracuse High- and Low-Avoidance strains of rats (*Rattus norvergicus*). J Comp Psychol 102: 337-339
- Brush FR, Froehlich JC, Sakellaris PC (1979) Genetic selection for avoidance behavior in the rat. Behav Genet 9: 309-316
- Caldarone B, Saavedra C, Tartaglia K, Wehner JM, Dudeck DB, Flaherty L (1997) Quantitative trait loci analysis affecting contextual conditioning in mice. Nat Genet 17: 335-337
- Carrasco J, Márquez C, Nadal R, Tobeña A, Fernández-Teruel A, Armario A (2008) Characterization of central and peripheral components of the hypothalamus-pituitary-adrenal axis in the inbred Roman rat strains. Psychoneuroendocrinology 33: 437-45
- Caseras X, Ávila C, Torrubia R (2003) The measurement of individual differences in behavioural inhibition and behavioural activation systems: a comparison of personality scales. Pers Individ Dif 34: 999-1013
- Caseras FX, Fullana MA, Riba J, Barbanoj MJ, Aluja A, Torrubia R (2006) Influence of individual differences in the Behavioral Inhibition System and stimulus content (fear versus blood-disgust) on affective startle reflex modulation. Biol Psychol 72: 251-256
- Caseras X, Torrubia R, Farré JM (2001) Is the behavioural inhibition system the core vulnerability for cluster C personality disorders? Pers Individ Dif 31: 349–359
- Castanon N, Dulluc J, Le Moal M, Mormède P (1994) Maturation of the behavioral and neuroendocrine differences between the Roman rat lines. Physiol Behav 55: 775-82
- Castanon N, Mormède P (1994) Psychobiogenetics: adapted tools for the study of the coupling between behavioral and neuroendocrine traits of emotional reactivity. Psychoneuroendocrinology 19: 257-82

- Charnay Y, Steimer T, Huguenin C, Driscoll P (1995) [<sup>3</sup>H] Paroxetine binding sites: brain regional differences between two psychogenetically selected lines of rats. *Neurosci Res Comm* 16: 29-35
- Chaouloff F, Durand M, Mormède P (1997) Anxiety- and activity-related effects of diazepam and chlordiazepoxide in the rat light/dark and dark/light tests. *Behav Brain Res* 85: 27-35
- Corda MG, Lecca D, Piras G, Di Chiara G, Giorgi O (1997) Biochemical parameters of dopaminergic and GABAergic neurotransmission in the CNS of Roman high-avoidance and Roman low-avoidance rats. *Behav Genet* 27: 527-536
- Corda MG, Piras G, Lecca D, Fernández-Teruel A, Driscoll P, Giorgi O (2005) The psychogenetically selected Roman rat lines differ in the susceptibility to develop amphetamine sensitisation. *Behav Brain Res* 157: 147-156
- Crawley JN, Hays SE, O'Donohue TL, Paul SM, Goodwin FK (1981) Neuropeptide modulation of social and exploratory behaviors in laboratory rodents. *Peptides* 2: 123-129
- Dalla C, Edgecomb C, Whetstone AS, Shors TJ (2008) Females do not express learned helplessness like males do. *Neuropsychopharmacology* 33: 1559-1569
- Davis M (1986) Pharmacological and Anatomical Analysis of Fear Conditioning Using the Fear-Potentiated Startle Paradigm. *Behav Neurosci* 100: 814- 824
- Davis M (1989) Sensitization of the acoustic startle reflex by footshock. *Behav Neurosci* 103: 495-503
- Davis M (1997) Neurobiology of fear responses: the role of the amygdala. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci* 9: 382-402
- Davis M (1998) Are different parts of the extended amygdala involved in fear versus anxiety? *Biol Psychiatry* 44: 1239-1247
- Davis M, Falls WA, Campeau S, Kim M (1993) Fear-potentiated startle: a neural and pharmacological analysis. *Behav Brain Res* 58: 175-198

- Doerge RW (2002) Mapping and analysis of quantitative trait loci in experimental populations. *Nat Rev Genet* 3: 43-52
- Draski LJ, Spuhler KP, Erwin VG, Baker RC, Deitrich RA (1992) Selective breeding of rats differing in sensitivity to the effects of acute ethanol administration. *Alcohol Clin Exp Res* 16: 48-54
- Driscoll P, Bättig K (1982) Behavioral, emotional and neurochemical profiles of rats selected for extreme differences in active, two-way avoidance performance. En Lieblich I (Ed) *Genetics of the brain*, Amsterdam: Elsevier Biomedical Press: 95-123
- Driscoll P, Escorihuela RM, Fernández-Teruel A, Giorgi O, Schwegler H, Steimer T, Wiersma A, Corda MG, Flint J, Koolhaas JM, Langhans W, Schulz PE, Siegel J, Tobeña A (1998) Genetic selection and differential stress responses. The Roman lines/strains of rats. *Ann NY Acad Sci* 851: 501-510
- Driscoll P, Fernández-Teruel A, Corda MG, Giorgi O, Steimer T (2008) Some guidelines for defining personality differences in rats. En YK Kim (Ed) *Handbook of Behavior Genetics*. New York: Springer: *en premsa*
- Driscoll P, Woodson P, Fuemm H, Baettig K (1980) Selection for two-way avoidance deficit inhibits shock-induced fighting in the rat. *Physiol Behav* 24: 793-795
- Drugan RC, Basile AS, Ha JH, Healy D, Ferland RJ (1997) Analysis of the importance of controllable versus uncontrollable stress on subsequent behavioral and physiological functioning. *Brain Res Protoc* 2: 69-74
- Escorihuela RM, Fernández-Teruel A, Gil L, Aguilar R, Tobeña A, Driscoll P (1999) Inbred Roman high- and low-avoidance rats: differences in anxiety, novelty seeking and shuttle box behaviors. *Physiol Behav* 67: 19-26
- Escorihuela RM, Fernández-Teruel A, Tobeña A, Langhans W, Bättig K, Driscoll P (1997) Labyrinth exploration, emotional reactivity, and conditioned fear in young Roman/verh ingred rats. *Behav Genet* 27: 573-578.

- Escorihuela RM, Fernández-Teruel A, Zapata A, Nuñez JF, Tobeña A (1993) Flumazenil prevents the anxiolytic effects diazepam, alprazolam and adinazolam on the early acquisition of two-way active avoidance. *Pharmacol Res* 28: 53-58
- Fattore L, Piras G, Corda MG, Giorgi O (2008) The Roman high- and low-avoidance rat lines differ in the acquisition, maintenance, extinction, and reinstatement of intravenous cocaine self-administration. *Neuropsychopharmacology (publicat on line)*
- Fendt M, Fanselow MS (1999) The neuroanatomical and neurochemical basis of conditioned fear. *Neurosci Biobehav Rev* 67: 19-26
- Fendt M, Koch M, Schnitzler HU (1997) Corticotropin-releasing factor in the caudal pontine reticular nucleus mediates the expression of fear-potentiated startle in the rat. *Eur J Neurosci* 9: 299-305
- Fernandes C, Gonzalez MI, Wilson C, File SE (1999) Factor analysis shows that female rat behavior is characterized primarily by activity, male rats are driven by sex and anxiety. *Pharmacol Biochem Behav* 64: 731-738
- Fernández-Teruel A, Escorihuela RM (Ed) (1997) *Special issue on the Roman Rat*. New York: Plenum Press (Behav Genet, 27: 499-582)
- Fernández-Teruel A, Escorihuela RM, Boix F, Tobeña A (1991a) Effects of different handling-stimulation procedures and benzodiazepines on two-way active avoidance acquisition in rats. *Pharmacol Res* 24: 273-282
- Fernández-Teruel A, Escorihuela RM, Castellano B, Gonzalez B, Tobeña A (1997) Neonatal handling and environmental enrichment effects on emotionality, novelty/reward seeking, and age-related cognitive and hippocampal impairments: focus on the Roman rat lines. *Behav Genet* 6: 513-526
- Fernández-Teruel A, Escorihuela RM, Gray JA, Aguilar R, Gil L, Gimenez-Llort L, Tobeña A, Bhomra A, Nicod A, Mott R, Driscoll P, Dawson GR, Flint J (2002b) A quantitative trait locus influencing anxiety in the laboratory rat. *Genome Res*, 12: 618-626



- Fernández-Teruel A, Escorihuela RM, Nuñez JF, Zapata A, Boix F, Salazar W, Tobeña A (1991b) The early acquisition of two-way (shuttle-box) avoidance as an anxiety-mediated behaviour: psychopharmacological validation. *Brain Res Bull* 26: 173-176
- Fernández-Teruel A, Escorihuela RM, Núñez JF, Gomà M, Driscoll P, Tobeña A (1992) Early stimulation effects on novelty-induced behavior in two psychogenetically-selected rat lines with divergent emotionality profiles. *Neurosci Lett* 137: 185-8
- Fernández-Teruel A, Escorihuela RM, Tobeña A, Driscoll P (1991c) Stress and putative endogenous ligands for benzodiazepine receptors: The importance of characteristics of the aversive situation and of differential emotionality in experimental animals. *Experientia* 47: 1051-1056
- Fernández-Teruel A, Gimenez-Llort L, Escorihuela RM, Gil L, Aguilar R, Steimer T, Tobeña A, (2002a) Early-life handling stimulation and environmental enrichment: are some of their effects mediated by similar neural mechanisms? *Pharmacol Biochem Behav* 73: 233-245
- Ferré P, Fernández-Teruel A, Escorihuela RM, Driscoll P, Corda MG, Giorgi O, Tobeña A (1995) Behavior of the Roman/Verh high- and low-avoidance rat lines in anxiety tests: relationship with defecation and self-grooming. *Physiol Behav* 58: 1209-1213
- Flint J (1997) Freeze! *Nat Genet* 17: 250-251
- Flint J (2004) The genetic basis of neuroticism. *Neurosci Biobehav Rev* 28: 307-316
- Flint J, Corley R, DeFries JC, Fulker DW, Gray JA, Miller S, Collins AC (1995) A Simple Genetic Basis for a Complex Psychological Trait in Laboratory Mice. *Science* 269: 1432-1435
- Flint J, Mott R (2001) Finding the molecular basis of quantitative traits: successes and pitfalls. *Nat Rev Genet* 6: 437-45
- Flint J, Valdar W, Shifman S, Mott R (2005) Strategies for mapping and cloning quantitative trait genes in rodents. *Nat Rev Genet* 6: 271-286

- Fullana MA, Mataix-Cols D, Trujillo JL, Caseras Per, Serrano F, Alonso P, Menchon JM, Vallejo J, Torrubia R (2004) Personality characteristics in obsessive-compulsive problems. *Br J Clin Psychol* 43: 387-398
- Fullerton J, Cubin M, Tiwari H, Wang C, Bomhra A, Davidson S, Miller S, Fairburn C, Goodwin G, Neale MC, Fiddy S, Mott R, Allison DB, Flint J (2003) Linkage analysis of extremely discordant and concordant sibling pairs identifies quantitative-trait loci that influence variation in the human personality trait neuroticism. *Am J Hum Genet* 72: 879-890
- Giorgi O, Orlandi M, Escorihuela RM, Driscoll P, Lecca D, Corda MG (1994) GABAergic and dopaminergic transmission in the brain of Roman high-avoidance and Roman low-avoidance rats. *Brain Res* 638: 133-138
- Giorgi O, Piras G, Corda MG (2007) The psychogenetically selected Roman high- and low-avoidance rat lines: a model to study the individual vulnerability to drug addiction. *Neurosci Biobehav Rev* 31: 148-163
- Giorgi O, Piras G, Lecca D, Corda MG (2005a) Behavioural effects of acute and repeated cocaine treatments: a comparative study in sensitisation-prone RHA rats and their sensitisation-resistant RLA counterparts. *Psychopharmacology* 180: 530-538
- Giorgi O, Piras G, Lecca D, Corda MG (2005b) Differential activation of dopamine release in the nucleus accumbens core and shell after acute or repeated amphetamine injections: a comparative study in the Roman high- and low-avoidance rat lines. *Neuroscience* 135: 987-998
- Giorgi O, Piras G, Lecca D, Hansson S, Driscoll P, Corda MG (2003) Differential neurochemical properties of central serotonergic transmission in Roman high- and low-avoidance rats. *J Neurochem* 86: 422-431
- Gray JA (1982) *The neuropsychology of anxiety: an enquiry into the functions of the septo-hippocampal system*. Oxford: Oxford University Press

- Gray JA (1987) The psychology of fear and stress. London: Cambridge University Press
- Gray JA, McNaughton N (2000) The neuropsychology of anxiety. Oxford: Oxford University Press
- Griebel G, Blanchard DC, Blanchard RJ (1996) Evidence that the behaviors in the Mouse Defense Test Battery relate to different emotional states: a factor analytic study. *Physiol Behav* 60: 1255-1260
- Grillon C (2002) Startle reactivity and anxiety disorders. Aversive conditioning, context, and neurobiology. *Biol Psychiatry* 52: 958-975
- Guitart-Masip M, Giménez-Llort L, Fernández-Teruel A, Cañete T, Tobeña A, Ogren SO, Terenius L, Johansson B (2006a) Reduced ethanol response in the alcohol-preferring RHA rats and neuropeptide mRNAs in relevant structures. *Eur J Neurosci* 23: 531-40
- Guitart-Masip M, Johansson B, Cañete T, Fernández-Teruel A, Tobeña A, Terenius L, Giménez-Llort L (2008a) Regional adaptations in PSD-95, NGFI-A and secretogranin gene transcripts related to vulnerability to behavioral sensitization to amphetamine in the Roman rat strains. *Neuroscience* 151: 195-208
- Guitart-Masip M, Johansson B, Fernández-Teruel A, Cañete T, Tobeña A, Terenius L, Giménez-Llort L (2006b) Divergent anatomical pattern of D1 and D3 binding and dopamine- and cyclic AMP-regulated phosphoprotein of 32 kDa mRNA expression in the Roman rat strains: Implications for drug addiction. *Neuroscience* 142: 1231-43
- Guitart-Masip M, Johansson B, Fernández-Teruel A, Tobeña A, Giménez-Llort L (2008b) Divergent effect of the selective D3 receptor agonist pd-128,907 on locomotor activity in Roman high- and low-avoidance rats: relationship to NGFI-A gene expression in the Calleja islands. *Psychopharmacology* 196: 39-49
- Hansen C, Spuhler K (1984) Development of the National Institutes of Health genetically heterogeneous rat stock. *Alcohol Clin Exp Res* 8: 477-479

- Ho YJ, Eichendorff J, Schwarting RK (2002) Individual response profiles of male Wistar rats in animal models for anxiety and depression. *Behav Brain Res* 136: 1-12
- Jacob HJ, Kwitek AE (2002) Rat genetics: attaching physiology and pharmacology to the genome. *Nat Rev Genet* 3: 33-42
- Johannesson M, Lopez-Aumatell R, Strid P, Diez M, Tuncel J, Blazquez G, Martinez E, Cañete T, Vicens-Costa E, Graham D, Hernandez-Pliego P, Beyeen A, Ockinger J, Fernandez C, Guitart-Masip M, Gimenez-Llort L, Tobeña A, Dominiczak A, Holmdahl R, Gauguier D, Olsson T, Mott R, Valdar W, Fernandez-Teruel A, Flint J (2008) A resource for the simultaneous high-resolution mapping of multiple quantitative trait loci in rats: the NIH heterogeneous stock. *Sotmès*
- Johnston AL, File SE (1991) Sex differences in animal tests of anxiety. *Physiol Behav* 49: 245-250
- Jones RB, Mills AD, Faure JM (1991) Genetic and experiential manipulation of fear-related behavior in Japanese quail chicks (*Coturnix coturnix japonica*). *J Comp Psychol* 195: 15-24
- Josselyn SA, Falls WA, Gewirtz JC, Pistell P, Davis M (2005) The nucleus accumbens is not critically involved in mediating the effects of a safety signal on behavior. *Neuropsychopharmacology* 30:17-26
- Kagan J (1991) Temperamental factors in human development. *Am Psychol* 46: 856-862
- Kagan J, Snidman N, Reznick S (1989) the constructs of inhibition and lack of inhibition to unfamiliarity. En DS Palermo (Ed) *Coping with uncertainty: behavioral and developmental perspectives*. New Jersey: Lawrence Erlbaum Associates
- Kalin NH, Shelton SE, Davidson RJ, Kelley AE (2001) The primate amygdala mediates acute fear but not the behavioral and physiological components of anxious temperament. *J Neurosci* 21: 2067-2074
- Keck ME, Wigger A, Welt T, Müller MB, Gesing A, Reul JM, Holsboer F, Landgraf R, Neumann ID (2002) Vasopressin mediates the response of the combined

- dexamethasone/CRH test in hyper-anxious rats: implications for pathogenesis of affective disorders. *Neuropsychopharmacology* 26: 94-105
- Koch M (1999) The neurobiology of startle. *Progress in Neurobiology* 59: 107-128
- Koch LG, Britton SL (2001) Artificial selection for intrinsic aerobic endurance running capacity in rats. *Physiol Genomics* 5: 45-52
- Landgraf R, Keßler MS, Bunck M, Murgatroyd C, Spengler D, Zimbelmann M, Nußbaumer M, Czibere L, Turck CW, Singewald N, Rujescu D, Frank E (2007) Candidate genes of anxiety-related behavior in HAB/LAB rats and mice: focus on vasopressin and glyoxalase-I. *Neurosci Biobehav Rev* 31: 89-102
- Landgraf R, Wigger A (2002) High vs low anxiety-related behavior rats: an animal model of extremes in trait anxiety. *Behav Genet* 32: 301-314
- Landgraf R, Wigger A (2003) Born to be anxious: neuroendocrine and genetic correlates of trait anxiety in HAB rats. *Stress* 6: 111-119
- Landgraf R, Wigger A, Holsboer F, Neumann ID (1999) Hyper-reactive hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis in rats bred for high anxiety-related behaviour. *J Neuroendocrinol* 11: 405-407
- Lang PJ, Davis M, Öhman A (2000) Fear and anxiety: animal models and human cognitive psychophysiology. *J Aff Dis* 61: 137-159
- LeDoux JE (1995) Emotion: clues from the brain. *Annu Rev Psychol* 46: 209-235
- LeDoux JE (1996) *The emotional brain*. New York: Simon and Schuster
- LeDoux JE (2000) Emotion circuits in the brain. *Annu Rev Neurosci* 23: 155-84
- Lehmann J, Pryce CR, Feldon J (1999) Sex differences in the acoustic startle response and prepulse inhibition in Wistar rats. *Behav Brain Res* 104: 113-117
- Levis DJ (1989) The case for a return to a two-factor theory of avoidance: the failure of non-fear interpretations. En SB Klein i RR Mowrer (Eds) *Contemporary learning theories: pavlovian conditioning and the status of tradition*. Vol I. Hillsdale, NJ: Lawrence Erlbaum Associates

- Levis DJ (1991) A clinician's plea for a return to the development of nonhuman models of psychopathology: new clinical observations in need of laboratory study. In MR Denny (Ed) *Fear, avoidance, and phobias: a fundamental analysis*. Hillsdale, NJ: Lawrence Erlbaum Associates: pp 395-427
- Liebsch G, Montkowski A, Holsboer F, Landgraf R (1998) Behavioural profiles of two Wistar rat lines selectively bred for high or low anxiety-related behaviour. *Behav Brain Res* 94. 301-310
- Llamas B, Contesse V, Guyonnet-Duperat V, Vaudry H, Mormède P, Moisan MP (2005) QTL mapping for traits associated with stress neuroendocrine reactivity in rats. *Mamm Genome* 16: 505-515
- Maier SF (1990) Role of fear in mediating shuttle escape learning deficit produced by inescapable shock. *J Exp Psychol* 16: 132-149
- Maldonado A, Torres C, Escarabajal MD, Cándido A, de la Torre L, Gómez MJ, Tobeña A, Fernández-Teruel A (2007) Successive positive contrast in one-way avoidance behavior with Roman low-avoidance rats. *Physiol Behav* 90: 803-808
- Martin JR, Oettinger R, Driscoll P, Buzzi R, Bättig K (1982) Effects of chlordiazepoxide and imipramine on maze patrolling within two different maze configurations by psychogenetically selected lines of rats. *Psychopharmacology* 78: 58-62
- McHugh SB, Deacon RMJ, Rawlins JNP, Bannerman DM (2004) Amygdala and ventral hippocampus contribute differentially to mechanisms of fear and anxiety. *Behav Neurosci* 118: 63-78
- McNaughton N, Corr PJ (2004) A two-dimensional neuropsychology of defense: fear/anxiety and defensive distance. *Neurosci Biobehav Rev* 28: 285-305
- McNaughton N, Gray JA (2000) Anxiolytic action on the behavioural inhibition system implies multiple types of arousal contribute to anxiety. *J Affect Dis* 61: 161-176
- McNish KA, Gewirtz JC, Davis M (1997) Evidence of contextual fear after lesions of the hippocampus: a disruption of freezing but not fear-potentiated startle. *J Neurosci* 17: 9353-9360

- Mineka S (1979) The role of fear in theories of avoidance learning, flooding and extinction. *Psychol Bull* 86: 985-1010
- Moisan MP, Courvoisier H, Bihoreau MT, Gauguier D, Hendley ED, Lathrop M, James MR, Mormède P (1996) A major quantitative trait locus influences hyperactivity in the WKHA rat. *Nat Genet* 14: 471-473
- Mott R, Flint J (2002) Simultaneous detection and fine mapping of quantitative trait loci using heterogeneous stocks. *Genetics* 2002: 4609-1618
- Mott R, Talbot CJ, Turri MG, Collins AC, Flint J (2000) A method for fine mapping quantitative trait loci in outbred animal stocks. *PNAS* 97: 12649-12654
- Newman JP, MacCoon DG, Vaughan LJ, Sadeh N (2005) Validating a distinction between primary and secondary psychopathy with measures of Gray's (1987). *J Abnorm Psychol* 114: 319-323
- Oliveira AR, Reimer AE, Brandao ML (2006) Dopamine D2 receptor mechanisms in the expression of conditioned fear. *Pharmacol Biochem Behav* 84: 102-111
- Overstreet DH, Rezvani AH, Pucilowski O, Gause L, Janowsky DS (1994) Rapid selection for serotonin-1A sensitivity in rats. *Psychiatr Genet* 4: 57-62
- Pähkla R, Kask A, Rägo L (2000) Differential effects of beta-carbolines and antidepressants on rat exploratory activity in the elevated zero-maze. *Pharmacol Biochem Behav* 65: 737-742
- Perkins AM, Corr PJ (2006) Reactions to threat and personality: psychometric differentiation of intensity and direction dimensions of human defensive behaviour. *Behav Brain Res* 169: 21-28
- Perkins AM, Kemp SE, Corr PJ (2007) Fear and anxiety as separable emotions: an investigation of the revised reinforcement sensitivity theory of personality. *Emotion* 2: 252-261
- Pesold C, Treit D (1995) The central and basolateral amygdala differentially mediate the anxiolytic effects of benzodiazepines. *Brain Res* 671: 213-21

- Phillips RG, LeDoux JE (1992) Differential contribution of amygdala and hippocampus to cued and contextual fear conditioning. *Behav Neurosci* 106: 274-285
- Phillips RG, LeDoux JE (1994) Lesions of the dorsal hippocampal formation interfere with background but not foreground contextual fear conditioning. *Learn Mem* 1: 34-44
- Pinto-Meza A, Caseras X, Soler J, Puigdemont D, Pérez V, Torrubia R (2006) Behavioural inhibition and behavioural activation systems in current and recovered major depression participants. *Pers Individ Dif* 40: 215-226
- Piras G, Lecca D, Corda MG, Giorgi O (2003) Repeated morphine injections induce behavioural sensitization in Roman high- but not in Roman low-avoidance rats. *Neuroreport* 14: 2433-2438
- Prunell M, Escorihuela RM, Fernández-Teruel A, Nuñez JF, Tobeña A (1994a) Differential interactions between ethanol and Ro 15-4513 on two anxiety tests in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 47: 147-151
- Prunell M, Escorihuela RM, Fernández-Teruel A, Nuñez JF, Tobeña A (1994b) Anxiolytic profiles of alprazolam and ethanol in the elevated plus-maze test and the early acquisition of *Shuttlebox* avoidance. *Pharmacol Res* 29: 37-45
- Ramos A, Mormede P (1998) Stress and emotionality: a multidimensional and genetic approach. *Neurosci Biobehav Rev* 22: 33-57
- Razafimanalina R, Mormède P, Velley L (1996) Gustatory preference-aversion profiles for saccharin, quinine and alcohol in Roman high- and low-avoidance lines. *Behav Pharmacol* 7: 78-84
- Reis FLV, Masson M, Oliveira AR, Brandao ML (2004) Dopaminergic mechanisms in the conditioned and unconditioned fear as assessed by the two-way avoidance and switch-off tests. *Pharmacol Biochem Behav* 79: 359-365
- Ribeiro RL, Andreatini R, Wolfman C, Viola H, Medina JH, Da Cunha C (1999) The "anxiety state" and its relation with rat models of memory and habituation. *Neurobiol Learn Mem* 72: 78-94



- Ribeiro-Barbosa ER, Canteras NS, Cezario AF, Blanchard RJ, Blanchard DC (2006) An alternative experimental procedure for studying predator-related defensive responses. *Neurosci Biobehav Rev* 79: 359- 365
- Richardson R (2000) Shock sensitization of startle: learned or unlearned fear. *Behav Brain Res* 110: 109-117
- Roozendaal B, Koolhaas JM, Bohus B (1993) Post-training norepinephrine infusion into the central amygdala differentially enhances later retention in Roman high-avoidance and low-avoidance rats. *Behav Neurosci* 107: 575-579
- Roozendaal B, Wiersma A, Driscoll P, Koolhaas JM, Bohus B (1992) Vasopressinergic modulation of stress responses in the central amygdala of the Roman high-avoidance and low-avoidance rat. *Brain Res* 596: 33-40
- Rosas JM, Callejas-Aguilera JE, Escarabajal MD, Gómez MJ, de la Torre L, Agüero A, Tobeña A, Fernández-Teruel A, Torres C (2007) Successive negative contrast effect in instrumental runway behaviour: a study with Roman high- (RHA) and Roman low- (RLA) avoidance rats. *Behav Brain Res* 185: 1-8
- Savonenko A, Filipkowski RK, Werka T, Zielinski K, Kaczmarek L (1999) Defensive conditioning-related functional heterogeneity among nuclei of the rat amygdala revealed by c-Fos mapping. *Neuroscience* 94: 723-733
- Savonenko A, Werka T, Nikolaev E, Zielinski K, Kaczmarek L (2003) Complex effects of NMDA receptor antagonist AVP in the basolateral amygdala on acquisition of two-way avoidance reaction and long-term fear memory. *Learn Mem* 10: 293-303
- Schultz W (2002) Getting formal with dopamine and reward. *Neuron* 36: 241-263
- Schwegler H, Pilz PKD, Koch M, Fendt M, Linke R, Driscoll P (1997) The acoustic startle response in inbred Roman High- and Low-Avoidance rats. *Behav Genet* 27: 579-582
- Seligman ME, Weiss J (1980) Coping behavior: learned helplessness, physiological change and learned inactivity. *Behavior Res Ther* 18: 459-512

- Shepherd JK, Grewal SS, Fletcher A, Bill DJ, Dourish CT (1994) Behavioural and pharmacological characterisation of the elevated "zero-maze" as an animal model of anxiety. *Psychopharmacology* 116: 56-64
- Siegel J (1997) Augmenting and reducing of visual evoked potentials in high- and low-sensation seeking humans, cats and rats. *Behav Genet* 27: 557-563
- Smillie LD, Jackson C (2005) The appetitive motivation scale and other BAS measures in the prediction of approach and active avoidance. *Pers Individ Dif* 38: 981-999
- Solberg LC, Valdar W, Gauguier D, Nunez G, Taylor A, Burnett S, Arboledas-Hita C, Hernandez-Pliego P, Davidson P, Burns P, Battacharya S, Hough T, Higgs D, Klenerman P, Cookson WO, Zhang Y, Deacon RM, Rawlins JNP, Mott R, Flint J (2006) A protocol for high-throughput phenotyping, suitable for quantitative trait analysis in mice. *Mamm Genome* 17: 129-146
- Spuhler K, Dietrich RA (1984) Correlative analysis of ethanol-related phenotypes in rat inbred strains. *Alcohol Clin Exp Res* 8: 480-484
- Stark H, Rothe T, Wagner T, Scheich H (2003) Learning a new behavioral strategy in the shuttle-box increases prefrontal dopamine. *Neuroscience* 126: 21-29
- Steimer T, Driscoll P (2003) Divergent stress responses and coping styles in psychogenetically selected Roman high-(RHA) and low-(RLA) avoidance rats: behavioural, neuroendocrine and developmental aspects. *Stress* 6: 87-100
- Steimer T, Driscoll P (2005) Inter-individual vs line/strain differences in psychogenetically selected Roman High-(RHA) and Low-(RLA) Avoidance rats: neuroendocrine and behavioural aspects. *Neurosci Biobehav Rev* 29: 99-112
- Steimer T, LaFleur S, Schulz PE (1997) Neuroendocrine correlates of emotional reactivity and coping in male rats from the Roman high (RHA-I/Verh)- and low (RLA-I/Verh)-avoidance lines. *Behav Genet* 27: 503-512
- Steimer T, Python A, Schulz PE, Aubry JM (2007) Plasma corticosterone, dexamethasone (DEX) suppression and DEX/CRH tests in a rat model of genetic vulnerability to depression. *Psychoneuroendocrinology* 32: 575-579

- Suomi SJ, (1991) Uptight and laid-back monkeys: individual differences in response to social response to social challenges. En SE Brauth, WS Hall i RJ Dooling (Eds), *Plasticity of development*, London: The MIT press
- Talbot CJ, Nicod A, Cherny SS, Fulker DW, Collins AC, Flint J (1999). High-resolution mapping of quantitative trait loci in outbred mice. *Nat Genet* 21: 305-308
- Talbot CJ, Radcliffe RA, Fullerton J, Hitzemann R, Wehner JM, Flint J (2003). Fine scale mapping of a genetic locus for conditioned fear. *Mamm Genome* 14: 223-230
- Torres C, Cándido A, Escarabajal MD, de la Torre L, Maldonado A, Tobeña A, Fernández-Teruel A (2005) Successive negative contrast in one-way avoidance learning in female Roman rats. *Physiol Behav* 85: 377-82
- Torres C, Escarabajal MD, Cándido A, de la Torre L, Gomez MJ, Maldonado A, Tobeña A, Fernández-Teruel A (2007) One-way avoidance learning and diazepam in female Roman high-avoidance and low-avoidance rats. *Behav Pharmacol* 18: 251-253
- Torrubia R, Ávila C, Moltó J, Caseras X (2001) The Sensitivity to Punishment and the Sensitivity to Reward Questionnaire (SPSRQ) as a measure of Gray's anxiety and impulsivity dimensions. *Pers Individ Dif* 31: 837-862
- Torrubia R, Ávila C, Moltó I, Grande I (1995) Testing for stress and happiness: the role of the behavioral inhibition system. In: Spielberger CD, Sarason IG, Brebner JB, Greenglass E, Laingani P, O'Roark AM (Eds.), *Stress and Emotion. Anxiety, Anger, and Curiosity*, vol 15. Washington, DC : Taylor
- Torrubia R, Tobeña A (1984) A scale for the assessment of "susceptibility to punishment" as a measure of anxiety: preliminary results. *Person Individ Dif* 5: 371-375
- Toufexis D (2007) Region- and sex-specific modulation of anxiety behaviours in the rat. *J Neuroendocrinol* 19: 461-473

- Uvnäs-Moberg K, Björkstrand E, Salmi P, Johansson C, Åstrand M, Ahlenius S (1999) Endocrine and behavioral traits in low-avoidance Sprague- Dawley rats. *Regul Pept* 80: 75-82
- Uvnäs-Moberg K, Eklund M, Hillegaard V, Ahlenius S (2000) Improved conditioned avoidance learning by oxytocin administration in high-emotional male Sprague-Dawley rats. *Regul Pept* 88: 27-32
- Valdar W, Solberg LC, Gauguier D, Burnett S, Klenerman P, Cookson WO, Taylor MS, Rawlins JNP, Mott R, Flint J (2006a) Genome-wide genetic association of complex traits in heterogeneous stock mice. *Nat Genet* 38: 879-887
- Valdar W, Solberg LC, Gauguier D, Cookson WO, Rawlins JNP, Mott R, Flint J (2006b) Genetic and environmental effects on complex traits in mice. *Genetics* 174: 959-984
- Walker DL, Davis M (1997) Double dissociation between the involvement of the bed nucleus of the stria terminalis and the central nucleus of the amygdala in startle increases produced by conditioned versus unconditioned fear. *J Neurosci* 17: 9375-9383
- Walker DL, Davis M (2000) Involvement of NMDA receptors within the amygdala in short- versus long-term memory for fear conditioning as assessed with fear-potentiated startle. *Behav Neurosci* 114: 1019-1033
- Walker DL, Davis M (2002) Light-enhanced startle: further pharmacological and behavioral characterization. *Psychopharmacology* 159: 304-310
- Walker CD, Rivest RW, Meaney MJ, Aubert ML (1989) Differential activation of the pituitary-adrenocortical axis after stress in the rat: use of two genetically selected lines (Roman low- and high-avoidance rats) as a model. *J Endocrinol* 123: 477-485

- Wehner JN, Radcliffe RA, Rosmann ST, Christensen SC, Rasmussen DL, Fulker DW, Wiles M (1997) Quantitative trait locus analysis of contextual fear conditioning in mice. *Nat Genet* 17: 331-334
- Weiss JM, Kriekhaus EE, Conte R (1968) Effects of fear conditioning on subsequent avoidance behavior and movement. *J Comp Physiol Psychol* 65: 413-421
- Werka T (1997) The effects of the medial and cortical amygdala lesions on post-stress analgesia in rats. *Behav Brain Res* 86: 59-65
- Werka T, Zielinski K (1998) CS modality transfer of two-way avoidance in rats with central and basolateral amygdala lesions. *Behav Brain Res* 93: 11-24
- Wiersma A, Kopsman JP, Knollema S, Bohus B, Koolhaas JM (1998) Differential effects of CRH infusion into the central nucleus of the amygdala in the Roman high-avoidance and low-avoidance rats. *Psychoneuroendocrinology* 23: 261-274
- Wilcock J, Fulker DW (1973) Avoidance learning in rats: genetic evidence for two distinct behavioral processes in the shuttle-box. *J Comp Physiol Psychol* 82: 247-253
- Willis-Owen SAG, Flint J (2007) Identifying the genetic determinants of emotionality in humans; insights from rodents. *Neurosci Biobehav Rev* 31: 115-124
- Yalcin B, Gillis-Owen SAG, Fullerton J, Meesaq A, Deacon RM, Rawlins JNP, Copley RR, Morris AP, Flint J, Mott R (2004) Genetic dissection of a behavioral quantitative trait locus shows that *Rgs2* modulates anxiety in mice. *Nat Genet* 36: 1197-1202
- Yilmazer-Hanke DM, Faber-Zuschratter, Linke R, Schwegler H (2002) Contribution of amygdala neurons containing peptides and calcium-binding proteins to fear-potentiated startle and exploration-related anxiety in inbred Roman high- and low- avoidance rats. *Eur J Neurosci* 15: 1206-1218
- Yilmazer-Hanke DM, Wigger A, Linke R, Landgraf R, Schwegler H (2004) Two Wistar rat lines selectively bred for anxiety-related behavior show opposite reactions in

elevated plus maze and fear-sensitized acoustic startle tests. Behav Genet 34:  
309-318

## **Annexos**

### **Article I**

López-Aumatell R, Blázquez G, Gil R, Aguilar R, Cañete T, Gimenez-Llort L, Tobeña A, Fernández-Teruel A

The Roman High- and Low-Avoidance rat strains differ in fear-potentiated startle and fear conditioning to cues and contexts

Psicothema, *en premsa*

### **Article II**

López-Aumatell R, Guitart-Masip M, Vicens-Costa E, Gimenez-Llort L, Valdar W, Johannesson M, Flint J, Tobeña A, Fernández-Teruel A (2008)

Fearfulness in a large N/Nih-HS genetically heterogeneous rat stock: differential profiles of timidity and defensive flight in males and females.

Behavioural Brain Research 188, 41-55

### **Article III (“Resultats addicionals”)**

López-Aumatell R, Vicens-Costa E, Guitart-Masip M, Martínez-Membrives E, Valdar W, Johannesson M, Blázquez G, Cañete T, Gimenez-Llort L, Flint J, Tobeña A, Fernández-Teruel A (2008)

Ansiedad en ratas genéticamente heterogéneas: hacia la identificación de genes para caracteres conductuales cuantitativos.

Ansiedad y estrés, 14 (en premsa)

**Article IV (“Resultats addicionals”)**

López-Aumatell R, Vicens-Costa E, Guitart-Masip M, Martínez-Membrives E, Valdar W, Johannesson M, Cañete T, Blázquez G, Gimenez-Llort L, Driscoll P, Flint J, Tobeña A, Fernández-Teruel A

Unlearned anxiety predicts learned fear: a study with heterogeneous rats as compared with the Roman rat strains

*Manuscript en preparació*



## **Article I**

**THE ROMAN HIGH- AND LOW-AVOIDANCE RAT STRAINS DIFFER IN  
FEAR-  
POTENTIATED STARTLE AND FEAR CONDITIONING TO CUES AND  
CONTEXTS**

**R. López-Aumatell, G. Blázquez, L. Gil, R. Aguilar\*, T. Cañete, L. Giménez-Llort,**

**A. Tobeña, A. Fernández- Teruel**

Medical Psychology Unit, Department of Psychiatry & Forensic Medicine, Institute of Neurosciences, School of Medicine, Autonomous University of Barcelona, 08193-Bellaterra, Barcelona, Spain. \* Dept. of Basic Psychology, School of Psychology, University of Malaga, 29071-Malaga, Spain

**Correspondence:** Alberto Fernández-Teruel. E-mail: [albert.Fernández.teruel@uab.es](mailto:albert.Fernández.teruel@uab.es)

**ABSTRACT**

The Swiss sublines of Roman High-(RHA/Verh) and Low-(RLA/Verh) Avoidance rats have been genetically selected (and outbred) for good vs extremely poor acquisition of two-way, active avoidance since 1972. Inbred strains (RHA-I and RLA-I), derived from those two lines, have been maintained at our laboratory since 1997. The RLA line/strain shows increased stress-induced responses (e.g. ACTH, corticosterone, prolactin secretion, and freezing behavior) and enhanced anxiety/fearfulness in a variety of unconditioned behavioural variables and tests (e.g. self-grooming behavior, light/dark test, light-dark tunnel maze, elevated plus-maze, baseline acoustic startle response, sensitised startle response). Thus far, however, the Roman rat strains have not been compared in procedures involving classical fear conditioning to cues or contexts. Therefore, the present work was aimed at comparing RHA-I and RLA-I rats in 1) two different procedures of fear-potentiated startle and 2) in a classical fear conditioning (i.e. conditioned freezing) paradigm. The results indicate that, compared to RHA-I rats, RLA-I animals display higher levels of conditioned fear (as measured either by startle responses or freezing behavior) across those different tasks, thus reinforcing the differential anxiety/emotionality profiles of the two strains and their usefulness for neurobiological and neuropharmacological studies of fearfulness.

**INTRODUCTION**

The Swiss sublines of Roman High- (RHA/Verh) and Low- (RLA/Verh) Avoidance rats, derived from the original Roman stock (Bignami, 1965), have been psychogenetically selected (and outbred) for good vs extremely poor acquisition of two-way active avoidance since 1972 (Driscoll *et al.* 1998; Driscoll and Bättig, 1982; Steimer and Driscoll, 2005). Inbred strains (RHA-I and RLA-I), derived from the Swiss sublines have been

maintained and bred, and periodically phenotyped for two-way avoidance at our laboratory since 1997 (Aguilar *et al.* 2002; Aguilar, Gil, Fernández-Teruel and Tobeña, 2004; Driscoll *et al.* 1998; Escorihuela, Fernández-Teruel, Gil, Aguilar, Tobeña and Driscoll, 1999).

A large body of neurobehavioral evidence indicates that the Roman lines/strains differ in their responsiveness to rewarding and aversive stimuli. Thus, compared to the RLA line/strain, RHA rats have consistently shown a profile of enhanced novelty/substance-seeking behavior

and impulsivity (Corda, Lecca, Piras, Viola, Medina and Giorgi, 2001; Driscoll, Cohen, Fackelman and Bättig, 1990; Escorihuela *et al.* 1999; Fernández-Teruel, Driscoll, Gil, Aguilar, Tobeña and Escorihuela, 2002a; Fernández-Teruel, Escorihuela, Castellano, Gonzalez and Tobeña, 1997; Fernández-Teruel, Escorihuela, Nuñez, Goma, Driscoll and Tobeña, 1992a; Pisula, 2003; Razaflimanalina, Mormede and Velley, 1996; Siegel, 1997; Siegel, Gayle, Sharma and Driscoll, 1996; Siegel, Sisson and Driscoll, 1993; Zeier, Bättig and Driscoll, 1978), as well as higher locomotor sensitization and meso-telencephalic DAergic activation following repeated treatment with morphine, cocaine and amphetamine (Corda, Piras, Lecca, Fernández-Teruel, Driscoll and Giorgi, 2005; Giorgi, Piras, Lecca and Corda, 2005a; Giorgi, Piras, Lecca and Corda, 2005b; Giorgi, Piras and Corda, 2007; Guitart-Masip *et al.* 2008; Piras, Lecca, Corda and Giorgi, 2003). In contrast, as concerns to responses to aversive stimuli, RLA rats have shown increased hormonal (ACTH, corticosterone, prolactin) and behavioural stress-induced responses (Carrasco, Marquez, Nadal, Tobeña, Fernández-Teruel and Armario, 2008; Castanon *et al.* 1992, 1994, 1995; Driscoll *et al.* 1998; Fernández-Teruel *et al.* 1997; Steimer and Driscoll, 2003; Steimer and Driscoll, 2005; Steimer, Escorihuela, Fernández-Teruel and Driscoll, 1998; Steimer, La Fleur and Schulz, 1997), as well as enhanced anxiety/fear responses in a variety of anxiety laboratory models as, for instance, various light/dark testing procedures (i.e. either two-compartment light-dark boxes or complex light-dark tunnel labyrinths; Escorihuela, Fernández-Teruel, Tobeña, Langhans, Bättig and Driscoll, 1997; Fernández-Teruel *et al.* 2002b; Fernández-Teruel, Escorihuela, Driscoll, Tobeña and Bättig, 1991a; Fernández-Teruel, Escorihuela, Driscoll, Tobeña and Bättig, 1992b; Steimer and Driscoll, 2005; Steimer *et al.* 1998;), the Vogel's punishment test (Corda, Piras, Valentini, Scano and Giorgi, 1998; Ferré *et al.* 1995), hyponeophagia tests (Escorihuela *et al.* 1999; Ferré *et al.* 1995; Steimer *et al.* 1998), baseline and stress-enhanced acoustic startle response (Aguilar, Gil, Tobeña, Escorihuela and Fernández-Teruel, 2000; Yilmazer-Hanke, Faber-Zuschratter, Linke and Schwegler, 2002), the successive negative and positive contrast models of anxiety (Maldonado *et al.* 2007; Rosas *et al.* 2007; Torres *et al.* 2005), and most studies dealing with the elevated plus-maze (Chaouloff, Castanon and Mormede, 1994; Driscoll, *et al.* 1998; Escorihuela *et al.* 1999; Fernández-Teruel, Escorihuela, Castellano, González and Tobeña, 1997; Steimer and Driscoll, 2003; Yilmazer-Hanke *et al.* 2002) and elevated zero-maze test of anxiety (López-Aumatell *et al.* 2007; Shepherd, Grewal, Fletcher, Bill and Dourish, 1994; and manuscript submitted for publication).

However, although enhanced (i.e. sensitized) acoustic startle responses and increased number of defecations have been reported in inbred RLA-I rats when tested in a context where they had just received footshocks (Escorihuela *et al.* 1997; Schwegler, Pilz, Koch, Fendt, Linke and Driscoll 1997; Yilmazer-Hanke *et al.* 2002), a systematic between-strain comparison of the levels of

fear-conditioning to cues or contexts (i.e. fear conditioning to conditioned stimuli –CS–), either measuring increases of startle or freezing responses, has not been carried out thus far. Therefore, with the aim of further characterizing the RHA-I and RLA-I rat strains in regard to their respective proneness for fear conditioning, we have evaluated their performance in both the acoustic fear-potentiated startle (FPS) and in a classical (i.e. pavlovian) fear conditioning (CFC) test in which the main behavioural measure is the amount of conditioned freezing shown by the animals. These models have been considered essential to disentangle the detailed neuroanatomy of anxiety and fear, particularly the role of amygdala regions and its related limbic circuitry (e.g. Davis, Falls, Campeau and Kim, 1993; Gray and McNaughton, 2000; LeDoux, 1996). Differences in functional and morphological parameters at the level of the amygdala have been reported between the RHA and RLA lines/strains (e.g. Roozendaal, Wiersma, Driscoll, Koolhaas and Bohus, 1992; Yilmazer-Hanke *et al.* 2002) which appear to underly their differential fearfulness, and which provided a further impetus to evaluate the behavior of RHA-I and RLA-I rats in the FPS and CFC procedures.

## MATERIALS AND METHODS

### *Subjects*

The animals used in the present experiments were males (Exps. 1, 2 and 3) and females (only in Exp. 3) of the inbred Roman High- (RHA-I) and Low-Avoidance (RLA-I) rat strains maintained at our laboratory. They were approximately 5 months old (weight 300-400 g), and were housed in same-sexed pairs in standard (50 x 25 x 14 cm) macrolon cages. They were maintained under a 12:12h light-dark cycle (lights on at 08:00 a.m.), with controlled temperature ( $22 \pm 2$  °C) and humidity (50-70 %) and with free access to food and water. Rats from each experimental group belonged to at least 8 different litters.

Forty rats (20/strain) were initially used for baseline acoustic startle testing (according to the procedure described below) in Exp. 1. Mean  $\pm$  SD values were  $204.9 \pm 140.8$  (SE=34.2) for RHA-I rats and  $623.3 \pm 352.6$  (SE=78.2) for RLA-I rats. After a matching process for similarity of response (selecting those with the highest startle values from the RHA-I strain and those with the lowest values from the RLA-I strain) two strain groups (n=8 rats/group) with similar baseline ASR-I values were obtained, as shown in Fig. 1-A .

Sixteen rats (8/strain) were used for experiment 2, and 35 rats (n = 17-18 / strain) were used for experiment 3.

The experiments were performed from 9:00 to 18:00 h. and in accordance with the Spanish legislation on "Protection of Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes" and the European Communities Council Directive (86/609/EEC) on that subject.

### *Baseline acoustic startle response (Habituation –ASR-I session): Experiments 1-2*

Two sound-attenuated boxes (San Diego Instruments, USA) were used and each box housed a plexiglas

cylinder with a grid placed in the bottom. For any test session each animal was placed in the cylinder, and movements of the cylinder resulting from startle responses were transduced by an accelerometer into a voltage which was amplified, digitized and served into a computer for analysis. A white noise generator provided background noise of 55 dB in the unlit chambers. For the ASR-1 session (i.e. baseline startle), and after 5 min of familiarization to the startle chamber, each rat was exposed to 30 acoustic stimuli of 105 dB (50 ms duration) with a 30-s intertrial interval (ITI).

***Fear-potentiated startle (FPS): Experiments 1-2***

The procedure involved 1-2 conditioning sessions (depending on the experiment; see below), followed by an ASR-2 phase (i.e. measurement of acoustic startle in absence of the CS but in the context where the rats were conditioned) and by a FPS test phase (see below). Each of these sessions was always preceded by 5 min of familiarization to the startle chambers.

***Conditioning sessions.-***

Following ASR-1 measurement, each animal was given 10 conditioning, each of which consisted of presentation of an acoustic stimulus (70 dB; conditioned stimulus – CS-) of 3.2 s after which a 0.6-mA shock was delivered through the grid, which continued with the acoustic stimulus for a further 0.5 s. Every 2 consecutive trials were separated by a 30-s ITI.

In *Experiment 1* the animals were first matched (see ASR-1 session of Exp. 1, Fig. 1-A) and given two 10-trial conditioning sessions (spaced 24h apart), the first one being administered one week after the ASR-1 session.

In *Experiment 2* the animals received only one 10-trial conditioning session which was administered immediately following the ASR-1 session.

***FPS test session.-***

In the FPS test session, administered 24 h after the last conditioning session, the rats were placed in the boxes and after a 5 min acclimatization period they received 40 acoustic stimuli of 105 dB (50 ms) to habituate them partially (ASR-2 phase). This phase was immediately followed by administration, in a pseudorandom order, of 20 acoustic stimuli (105 dB, 50 ms) alone and 20 of these stimuli preceded by the CS (70 dB, 3.7 s). ITI was 30 s during the whole FPS test session.

The average response difference between those 20 “alone” trials and those 20 trials preceded by the CS is considered the measure of cue-conditioned fear-potentiated startle.

***Classical fear conditioning (CFC): Experiment 3***

The apparatus was a white chamber divided into two equal compartments (23 x 12 x 20 cm). A 1-mA scrambled electric footshock (0.5 s; unconditioned stimulus, US) was administered through the grid floor (Shocker Letica, LI 100-26). A 15-s duration light from a 20-W bulb in the upper part of a wall was the conditioned stimulus (CS). Training consisted of five CS-US pairings

and started with the onset of the CS. US and CS terminated simultaneously. A 120-s (mean) pseudorandom ITI was used. After 24 h, the rats were placed in the training chamber and freezing behaviour was monitored for 10 min. For the first 5-min period the light was absent (to evaluate contextual fear conditioning). The light was then switched on for 5 min to measure fear conditioning to the CS.

There were (approximately) equal numbers of rats from each sex for each strain in Exp. 3, but sexes were pooled for analysis because ANOVA did not show any significant “sex” or “sex X strain” interaction effects.

***Statistical analysis***

Multivariate analyses of variance (MANOVA) were first applied to data from ASR-1 and ASR-2 sessions (factors: 2 “strain” x 3 or 4 “trial blocks”). Student’s t-tests were then applied to data of different 10-trial blocks of those to phases, as well as to the averaged difference between the 20 “potentiated” and the 20 “startle alone” trials of the FPS testing session. Covariance analysis (with ASR-2 values as covariates) were also applied to test whether or not between-strain FPS scores and differences were influenced by baseline (ASR-2) measures.

Repeated measures ANOVA (with 2 “strain” x 2 “phases”) and Student’s t-tests were also applied to data from the context-conditioned and cue (CS)- conditioned freezing results of Exp. 3.

## **RESULTS**

MANOVA analyses of the ASR-2 session from Exp. 1 (Figure 1A), and for ASR-1 and ASR-2 sessions from Exp. 2 (Figure 2A), showed no significant effects of “trial block” (within subject factor) nor “strain x trial block” interactions (all  $F_s < 1.7$ ,  $p > 0.2$ ). Strain effects were significant in ASR-2 session from Exp. 1 ( $F(1,14) = 6.3$ ,  $p < 0.03$ ], as well as in ASR-1 ( $F(1,14) = 28.9$ ,  $p < 0.001$ ] and ASR-2 sessions [ $F(1,14) = 5.4$ ,  $p < 0.04$ ] from Exp. 2.

Student’s t-tests applied to data from the ASR-2 session in Exp. 1 (Figure 1A) confirmed the results of MANOVA analyses, by showing that RLA-I rats displayed higher startle responses than their RHA-I counterparts in the first and fourth 10-trial blocks [ $t(14) > 2.5$ ,  $p < 0.05$  in both cases). RLA-I rats also showed higher fear-potentiated startle than RHA-I rats as seen by the average “difference” between acoustic startle stimulus preceded by the CS (i.e. “potentiated”) and acoustic “startle stimulus alone” [ $t(14) = 3.0$   $p < 0.01$ ; Figure 1B].

In Exp. 2, without matching the rats of the two strains for the ASR-1 session, Student’s t-tests also confirmed significant differences between both strains in the ASR-1 phase (the three 10-trial blocks) as well as in the fourth 10-trial block of the ASR-2 phase [all  $t(14) > 3.1$ ,  $p < 0.01$ ; Figure 2A]. Again, RLA-I rats showed higher fear-

potentiated startle (Figure 2B) than RHA-I animals [ $t(14)=3.23, p < 0.01$ ].

Covariance analysis of fear-potentiated startle responses taking ASR-2 values (averaged for the 4 10-trial blocks) as covariates showed significant "Strain" effects in both experiments [both  $F(1,14) \geq 6.1, p \leq 0.03$ ] while the covariate was not significant [in both experiments  $F(1,14) \leq 3.6, p \geq 0.08$ ].

As "2 (strain) x 2 (sex)" factorial ANOVAs separately applied to contextual and cue-conditioned freezing results (exp. 3) showed no significant sex nor "strain x sex" interaction effects [both  $F(1,34) < 3.5, p > 0.1$ ], the data from experiment 3 were pooled by sex and a repeated measures (2 -strain- x 2 -context and cue phases-) ANOVA, followed by between-strain Student's t-tests, were applied. Results from the repeated measures ANOVA analysis showed significant "Strain" [ $F(1,33)=10.8, p=0.002$ ] and "Phase" [ $F(1,33)=6.7, p=0.014$ ], but no interaction [ $F(1,33)=1.1, p=0.3$ ] effects, thus showing that RLA-I rats displayed a significantly greater (two-fold) amount of freezing in both context and cue conditioning tests than their RHA-I counterparts and that freezing levels in the "CS" (cue) phase were overall higher. Between-strain Student's t-tests applied to each phase confirm these ANOVA results (both  $t(33) > 2.91, p < 0.01$ ) (see Figure 3).

## DISCUSSION

In agreement with previous results (Aguilar *et al.* 2000; Schwegler *et al.* 1997; Yilmazer-Hanke *et al.* 2002) the present work reports that RLA-I rats showed higher baseline acoustic startle responses than RHA-I animals during both the noise-alone -ASR-1 and ASR-2 - phases (i.e. unconditioned startle stimulus alone) in Exps. 1-2. It is worth pointing out that when both strain groups were matched as a function of their ASRs during the first session (experiment 1; ASR -1 phase), RLA-I rats also showed increased startle responses during the habituation/postconditioning phase of the test (ASR-2 phase) session, thus indicating a higher degree of context-conditioned fear as compared to RHA-I rats. Moreover, as indicated by comparison of experiments 1 and 2, a main finding of the present study was the observation that, regardless of whether the animals were matched or not according to their ASRs (in ASR-1 phase), RLA-I rats displayed a markedly enhanced (CS-induced) fear-potentiated startle response as compared to the RHA-I strain in the FPS phase of both experiments. In fact, the potentiation (i.e. the evidence of fear (cue)-conditioning) of startle observed in that phase was about 6-11 times more pronounced in RLA-I rats than in their RHA-I counterparts, as the latter did not show any evidence of startle potentiation. It is also remarkable that such an enhanced FPS in RLA-I rats, relative to their RHA-I counterparts, was observed regardless of whether the procedure involved either one or two fear-conditioning sessions (i.e. 10 or 20 CS-shock pairings, respectively). This is a relevant issue, as it points out that prominent FPS, and the observed between-strain differences, can be

obtained after 10 (rather than 20, as in exp.1) CS-shock pairings and by using a 2-day (rather than 4-day, as in exp.1) experimental procedure.

On the other hand, and in line with the data of these two FPS studies, RLA-I rats also showed elevated fear responses (relative to RHA-I rats) in the CFC study (exp. 3), as indicated by their enhanced levels of learned freezing in both the contextual phase and in the presence of the cue stimulus (i.e. the light-CS-).

These results coincide with those of Yilmazer-Hanke *et al.* (2002) using a procedure of shock-induced context-sensitization of startle in a single session. Most importantly, however, the present study is the first demonstration of differences between the RHA-I and RLA-I rat strains in two cue-induced fear-conditioning procedures (i.e. in which fear is elicited by previously neutral signals or contexts), thus allowing differentiation among unconditioned fear/anxiety responses, and fear conditioned to discrete/phasic stimuli.

Between-strain differences in fear-potentiated startle and/or classical fear conditioning are an important prerequisite for comparative morphological and functional studies of the amygdala, as both procedures have been essential cornerstones in the study of the neuroanatomy of fear and anxiety and have led to an emphasis on the role played by the amygdala in regard to these emotional responses (e.g. Davis *et al.* 1993; Gray and McNaughton, 2000; LeDoux, 1996). In that context, studies with the Roman rat lines/strains have shown that: (i) low doses of arginine-8- vasopressin administered into the central amygdala enhanced shock-induced bradycardia and immobility towards contexts in RLA rats while not affecting RHA rats (Rooszendaal *et al.* 1992); (ii) posttraining injections of corticotropin-releasing hormone, or norepinephrine, into the central amygdala also induced distinct behavioural and neurochemical (FOS induction) effects in both Roman rat lines when tested in stressful situations involving aversive conditioning (Rooszendaal, Koolhaas and Bohus, 1993; Wiersma, Konsman, Knollema, Bohus and Koolhaas, 1998); (iii) inbred RLA-I rats have a greater number of CRF-expressing neurons in the central nucleus of the amygdala as compared to RHA-I rats (Carrasco *et al.* 2008; Yilmazer-Hanke *et al.* 2002); (iv) RLA-I rats also have an increased number of GABAergic neurons expressing PARV (i.e. parvalbumin) and the "anxiolytic" peptide NPY (i.e. neuropeptide Y) in the basolateral complex of the amygdala (Torres *et al.* 2006; Yilmazer-Hanke *et al.* 2002); (v) NGFI-A, which is induced in the amygdala as a consequence of fear, is strongly activated by acute amphetamine in the central nucleus of the amygdala in RLA-I rats, but not in RHA-I animals (Guitart-Masip *et al.* 2008); and, (vi) we have recently found that RLA-I rats also show enhanced CRF mRNA in the dorsal aspect of the bed nucleus of the stria terminalis (BNST) (Carrasco *et al.* 2008).

It is worth noting, at this point, to compare RHA/RLA rats with other rat lines which have been psychogenetically-selected for divergent anxious

behavior. In this regard, Landgraf and Wigger (2002, 2003) have established a successful selective breeding program with the high (HAB) and low (LAB) anxious rats, bidirectionally selected and bred for opposing behavior in the elevated plus-maze. The similarities between RHAs and LABs, as compared to RLAs and HABs, respectively, are remarkable. To say just a few, both HAB and RLA show less exploration of open (or more illuminated) spaces, as in the open-field tests or in various black/white tests (see references in the "Introduction" for the RHA/RLA rats), visit fewer holes in the hole-board test, show a blunted activation of the medial prefrontal cortex upon anxiogenic challenge, and show elevated stress-induced levels of plasma prolactin, ACTH and corticosterone, when compared to their LAB/RHA counterparts (e.g. Carrasco *et al.* 2008; Kalisch, Salomé, Platzer *et al.* 2004; Landgraf and Wigger 2002, 2003; Steimer and Driscoll 2003). Nevertheless, the neuroanatomical differences found between RHA and RLA rats concerning CRF projection neurons in the central amygdala have not been found between HAB and LAB rats (Yilmazer-Hanke *et al.* 2002, 2004) and, contrary to the startle differences found between RHA-I and RLA-I rats (Aguilar *et al.* 2000; Schwegler *et al.* 1997; Yilmazer-Hanke *et al.* 2002; and present results), LAB rats have shown a higher baseline and an increased, fear sensitized acoustic startle, compared to HAB rats (Yilmazer-Hanke *et al.* 2004).

Thus, from the available literature, it would appear that psychogenetic selection for extreme differences in two-way active avoidance acquisition (i.e. the RHA/RLA rat strains) has led to more coherent phenotypical profiles, as related to anxiety/fearfulness, than bidirectional selection for behavior in the elevated plus-maze (i.e. the HAB/LAB rat lines). It has to be taken into account, however, that novelty-induced emotional/anxious behavior (and, particularly, behavior in the open sections of the elevated plus-maze or elevated zero-maze tests for anxiety), acquisition of two-way active avoidance and (baseline or fear sensitized) acoustic startle responses have already been shown to belong to different aspects of the anxiety/fearfulness trait, in such a way that they could eventually share some common processes (i.e. some common variance) while being also relatively independent (e.g. Aguilar *et al.* 2002; Fernández-Teruel *et al.* 2002b; López-Aumatell *et al.* 2008).

In conclusion, the morphological and functional disparities of RLA vs RHA rats with regard to the amygdaloid-BNST system, as well as the between-strain differences in both hypothalamic-pituitary-adrenal responses to stressors and in a wide variety of unconditioned and conditioned anxiety/fear tests (e.g. Carrasco *et al.* 2008; Fernández-Teruel *et al.* 1997; Fernández-Teruel *et al.* 2002b; Steimer and Driscoll, 2003; Steimer and Driscoll, 2005; Steimer *et al.* 1997), provide compelling evidence for considering the RLA/RHA lines/strains of rats as a well-validated behavioral and neurobiological model of trait anxiety/fearfulness. This contention is further supported by the fact that anxiolytic drugs are more effective in

RLA than in RHA rats (Corda *et al.* 1998; Fernández-Teruel, Escorihuela, Tobeña and Driscoll, 1991b; Martin, Oettinger, Driscoll, Buzzi and Bättig, 1982; Steimer and Driscoll, 2003; Torres *et al.* 2007), while the latter have a higher GABAergic tone than the former (Bentareha *et al.* 1998; Giorgi *et al.* 1994). Altogether, the available evidence suggests that RHA and RLA rat strains are a particularly suitable tool to disentangle the behavioural and molecular mechanisms of fear-related responses (Driscoll *et al.* 1998; Fernández-Teruel *et al.* 2002c; Steimer and Driscoll, 2003; Steimer and Driscoll, 2005).

**Acknowledgements:** Supported by grants from the "Ministerio de Ciencia y Tecnología" (SAF2003-03480), DGR (2005SGR-00885), FPI program (R. L-A), and through EURATools European project (European Commission Contract no. LSHG-CT-2005-019015). The authors thank Dr. P. Driscoll for his continuous advice and help.

## REFERENCES

- Aguilar, R., Flint, J., Gray, J., Dawson, G.R., Driscoll, P., Gimenez-Llort, L., Escorihuela, R.M., Fernández-Teruel, A. y Tobeña, A. (2002). Learned fear, emotional reactivity and fear of heights: a factor analytic map from a large F2 intercross of Roman rat strains. *Brain Research Bulletin*, 57, 17-26.
- Aguilar, R., Gil, L., Fernández-Teruel, A., y Tobeña, A. (2004). Genetically-based behavioral traits influence the effects of *Shuttlebox* avoidance overtraining and extinction upon intertrial responding: a study with the Roman rat strains. *Behavioural Processes*, 66, 63-72.
- Aguilar, R., Gil, L., Tobeña, A., Escorihuela, R.M. y Fernández-Teruel, A. (2000). Differential effects of cohort removal stress on the acoustic startle response of the Roman/Verh rat strains. *Behavior Genetics*, 30, 71-75.
- Bentareha, R., Araujo, F., Ruano, D., Driscoll, P., Escorihuela, R.M., Tobeña, A., Fernández-Teruel, A. y Victorica, J. (1998). Pharmacological properties of the GABA<sub>A</sub> receptor complex from brain regions of (hypoemotional) Roman high- and (hyperemotional) low- avoidance rats. *European Journal of Pharmacology*, 354, 91-97.
- Bignami, G. (1965). Selection for high rates and low rates of of avoidance conditioning in the rat. *Animal Behavior*, 13, 221-227.
- Carrasco, J., Marquez, C., Nadal, R., Tobeña, A., Fernández-Teruel, A. y Armario, A. (2008). Characterization of central and peripheral components of the hypothalamus-pituitary-adrenal axis in the inbred Roman rat strains. *Psychoneuroendocrinology*, in press.
- Castanon, N., Dulluc, J., LeMoal, M. y Mormède, P. (1992). Prolactin as a link between behavioral and immune differences between the Roman rat lines. *Physiology & Behavior*, 51, 1235-1241.
- Castanon, N., Dulluc, J., LeMoal, M. y Mormède, P. (1994). Maturation of the behavioral and neuroendocrine differences between the Roman rat lines. *Physiology & Behavior*, 55, 775-782
- Castanon, N., Perez- Diaz, F. y Mormède, P. (1995). Genetic análisis of the relationships between behavioral and neuroendocrine traits in Roman high and low avoidance rat lines. *Behavior Genetics*, 25, 371-384.
- Chaouloff, F., Castanon, N. y Mormède, P. (1994). Paradoxical differences in animal models of anxiety among the Roman rat lines. *Neuroscience Letters*, 182, 217-221.
- Corda, M.G., Lecca, D., Piras, G., Di Chiara, G. y Giorgi, O. (1997). Biochemical parameters of dopaminergic and GABAergic neurotransmission in the CNS of Roman high-avoidance and Roman low-avoidance rats. *Behavior Genetics*, 27, 527-536.
- Corda, M.G., Lecca, D., Piras, G., Viola, H., Medina, J.H. y Giorgi, O. (2001). Voluntary ethanol intake activates meso-accumbal dopaminergic transmission in Roman high-avoidance, but not Roman low-avoidance rats. *Journal of Neurochemistry*, 78 (Suppl. 1), 80.
- Corda, M.G., Piras, G., Lecca, D., Fernández-Teruel, A., Driscoll, P. y Giorgi, O. (2005). The psychogenetically selected Roman rat lines differ in their susceptibility to develop amphetamine sensitization. *Behavioural Brain Research*, 157, 147-156.
- Corda, M.G., Piras, G., Valentini, V., Scano, P. y Giorgi, O. (1998). Differential sensitivity to shock-induced suppression of drinking in the Roman/Verh lines and strains of rats. 28<sup>th</sup> Annual Meeting of the Society for Neuroscience. Los Angeles, Abstr. book, Vol. 24, p. 1182.
- Davis, M., Falls, W.A., Campeau, S. y Kim, M. (1993). Fear-potentiated startle: a neural and pharmacological analysis. *Behavioural Brain Research*, 58, 175-198.
- Driscoll, P., Bättig, K. (1982). Behavioral, emotional and neurochemical profiles of rats selected for extreme differences in active, two-way avoidance performance. En: I. Liebllich (ed.), *Genetics of the brain* (pp. 95-123). Amsterdam: Elsevier.
- Driscoll, P., Cohen, C., Fackelman, P. y Bättig, K. (1990). Differential ethanol consumption in Roman high- and low-avoidance (RHA and RLA) rats, body weight, food intake, and the influence of pre- and post-natal exposure to nicotine and/or injection stress. *Experientia*, 46 (Suppl.), A60.
- Driscoll, P., Escorihuela, R.M., Fernández-Teruel, A., Giorgi, O., Schwegler, H., Steimer, T., Wiersma, A., Corda, M.G., Flint, J., Koolhaas, J.M., Langhans, W., Schulz, P.E., Siegel, J. y Tobeña, A. (1998). Genetic selection and differential stress responses. The Roman lines/strains of rats. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 851, 501-510.
- Escorihuela, R.M., Fernández-Teruel, A., Gil, L., Aguilar, R., Tobeña, A. y Driscoll, P. (1999). Inbred Roman high- and low- avoidance rats: differences in anxiety, novelty seeking and shuttle box behaviors. *Physiology & Behavior*, 67, 19-26.
- Escorihuela, R.M., Fernández-Teruel, A., Tobeña, A., Langhans, W., Bättig, K. y

- Driscoll, P. (1997). Labyrinth exploration. Emotional reactivity, and conditioned fear in young Roman/Verh inbred rats. *Behavior Genetics*, 27, 573-578.
- Fernández-Teruel, A., Escorihuela, R.M., Castellano, B., Gonzalez, B. y Tobeña, A. (1997). Neonatal handling and environmental enrichment effects on emotionality, novelty/reward seeking, and age-related cognitive and hippocampal impairments: focus on the Roman rat lines. *Behavior Genetics*, 6, 513-526.
- Fernández-Teruel, A., Driscoll, P., Gil, L., Aguilar, C., Tobeña, A. y Escorihuela, R.M. (2002a). Enduring effects of environmental enrichment on novelty seeking, saccharin and ethanol intake in two rat lines (RHA/Verh) differing in incentive-seeking behaviour. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 73, 225-231.
- Fernández-Teruel, A., Escorihuela, R.M., Driscoll, P., Tobeña, A. y Bättig, K. (1991a). Infantile (handling) stimulation and behavior in young Roman High- and Low-Avoidance rats. *Physiology & Behavior*, 50, 563-565.
- Fernández-Teruel, A., Escorihuela, R.M., Driscoll, P., Tobeña, A. y Bättig, K. (1992b). Differential effects of early stimulation and/or perinatal flumazenil treatment in young low- and high-avoidance rats. *Psychopharmacology*, 108, 170-176.
- Fernández-Teruel, A., Escorihuela, R.M., Gray, J.A., Aguilar, R., Gil, L., Gimenez-Llort, L., Tobeña, A., Bhomra, A., Nicod, A., Mott, R., Driscoll, P., Dawson, G.R., y Flint, J. (2002b). A quantitative trait locus influencing anxiety in the laboratory rat. *Genome Research*, 12, 618-626.
- Fernández-Teruel, A., Escorihuela, R.M., Nuñez, J.F., Goma, M., Driscoll, P. y Tobeña, A. (1992a). Early stimulation effects on novelty-induced behaviour in two psychogenetically-selected rat lines with divergent emotionality profiles. *Neuroscience Letters*, 137, 185-188.
- Fernández-Teruel, A., Escorihuela, R.M., Tobeña, A. y Driscoll, P. (1991b) Stress and putative endogenous ligands for benzodiazepine receptors: The importance of the aversive situation and of differential emotionality in experimental animals. *Experientia*, 47, 1051-1056.
- Fernández-Teruel, A., Gimenez-Llort, L., Escorihuela, R.M., Gil, L., Aguilar, R., Steimer, T. y Tobeña, A. (2002c). Early-life handling stimulation and environmental enrichment. Are some of their effects mediated by similar neural mechanisms? *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 73, 233-245.
- Ferré, P., Fernández-Teruel, A., Escorihuela, R.M., Driscoll, P., Corda, M.G., Giorgi, O. y Tobeña, A. (1995). Behavior of the Roman/Verh high -and low- avoidance rat lines in anxiety tests: relationship with defecation and self-grooming. *Physiology & Behavior*, 58, 1209-1213.
- Giorgi, O., Piras, G., Lecca, D. y Corda, M.G. (2005a). Behavioural effects of acute and repeated cocaine treatments: a comparative study in sensitisation-prone RHA rats and their sensitisation-resistant RLA counterparts. *Psychopharmacology*, 180, 530-538.
- Giorgi, O., Piras, G., Lecca, D. y Corda, M.G. (2005b). Differential activation of dopamine release in the nucleus accumbens core and shell after acute or repeated amphetamine injections: a comparative study in the Roman high- and low-avoidance rat lines. *Neuroscience*, 135, 987-998.
- Giorgi, O., Piras, G. y Corda, M.G. (2007). The psychogenetically selected Roman high- and low-avoidance rat lines: A model to study the individual vulnerability to drug addiction. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 31, 148-163.
- Giorgi, O., Orlandi, M., Escorihuela, R.M., Driscoll, P., Lecca, D. y Corda, M.G. (1994). GABAergic and dopaminergic transmission in the brain of Roman high-avoidance rats. *Brain Research*, 638, 133-138.
- Gray, J.A. y McNaughton, N. (2000). The Neuropsychology of Anxiety: an enquiry into the functions of the septo-hippocampal system, 2<sup>nd</sup> edition. Oxford: Oxford University Press.
- Guitart-Masip, M., Johansson, B., Cañete, T., Fernández-Teruel, A., Tobeña, A., Terenius, L. y Gimenez-Llort, L. (2008). Regional adaptations in PSD-95, NGFI-A and secretogranin gene transcripts related to vulnerability to amphetamine sensitization in the Roman rat strains. *Neuroscience*, 151, 195-208.
- Kalisch, R., Salomé, N., Platzer, S., Wigger, A., Czisch, M., Sommer, W., Singewald, N., Heilig, M., Berthele, A., Holsboer, F., Landgraf, R., y Auer, D.P. (2004). High trait anxiety and hyperactivity to stress of the dorsomedial prefrontal cortex: a combined ph MRI and FOS study in rats. *NeuroImage*, 23, 382-391.
- Landgraf, R. y Wigger, A. (2002). High vs low anxiety-related behaviour in rats: an animal model of extremes in trait anxiety. *Behavior Genetics*, 32, 301-314.
- Landgraf, R. y Wigger, A. (2003). Born to be anxious: neuroendocrine and genetic correlates of trait anxiety in HAB rats. *Stress*, 6, 111-119.



- LeDoux, J.E. (1996). The emotional brain. New York: Simon and Schuster.
- Maldonado, A., Torres, C., Escarabajal, M.D., Candido, A., de la Torre, L., Gomez, M.J., Tobeña, A. y Fernández-Teruel, A. Successive positive contrast in one-way avoidance behavior with Roman low-avoidance rats. *Physiology & Behavior*, *90*, 803-808.
- Martin, J.R., Oettinger, R., Driscoll, P., Buzzi, R. y Bättig, K. (1982). Effects of chlordiazepoxide and imipramine on maze patrolling within two different maze configurations by psychogenetically selected lines of rats. *Psychopharmacology*, *78*, 58-62.
- Piras, G., Lecca, D., Corda, M.G. y Giorgi, O. (2003). Repeated morphine injections induce behavioral sensitization in Roman high- but not Roman low-avoidance rats. *Neuroreport*, *14*, 2433-2438.
- Pisula, W. (2003). The Roman high- and low-avoidance rats respond differently to novelty in a familiarized environment. *Behavioural Processes*, *63*, 63-72.
- Razaflimanalina, R., Mormede, P. y Velley, L. (1996). Gustatory preference-aversion profiles for saccharin, quinine and alcohol in Roman high- and low-avoidance lines. *Behavioural Pharmacology*, *7*, 78-84.
- Rooszendaal, B., Koolhaas, J.M. y Bohus, B. (1993). Post-training norepinephrine infusion into the central amygdala differentially enhances later retention in Roman high-avoidance and low-avoidance rats. *Behavioral Neuroscience*, *107*, 575-579.
- Rooszendaal, B., Wiersma, A., Driscoll, P., Koolhaas, J.M. y Bohus, B. (1992). Vasopressinergic modulation of stress responses in the central amygdala of the Roman high-avoidance and low-avoidance rat. *Brain Research*, *596*, 35-40.
- Rosas, J.M., Callejas-Aguilera, J.E., Escarabajal, M.D., Gomez, M.J., de la Torre, L., Agüero, A., Tobeña, A., Fernández-Teruel, A. y Torres, C. (2007). Successive negative contrast effect in instrumental runway behaviour: A study with Roman High-(RHA) and Roman Low-avoidance rats. *Behavioural Brain Research*, *in press*.
- Schwegler, H., Pilz, P.K.D., Koch, M., Fendt, M., Linke, R. y Driscoll, P. (1997). The acoustic startle response in inbred Roman High- and Low-avoidance rats. *Behavior Genetics*, *27*, 579-582.
- Shepherd, J.K., Grewal, S.S., Fletcher, A., Bill, D.J. y Dourish, C.T. (1994). Behavioural and pharmacological characterisation of the elevated "zero-maze" as an animal model of anxiety. *Psychopharmacology*, *116*, 56-64.
- Siegel, J. (1997). Augmenting and reducing of visual evoked potentials in high- and low-sensation seeking humans, cats and rats. *Behavioral Genetics*, *27*, 557-563.
- Siegel, J., Gayle, D., Sharma, A. y Driscoll, P. (1996). The locus of origin of augmenting and reducing of visual evoked potentials in rat brain. *Physiology & Behavior*, *60*, 287-291.
- Siegel, J., Sisson, D.F. y Driscoll, P. (1993). Augmenting and reducing of visual evoked potentials in Roman high- and low-avoidance rats. *Physiology & Behavior*, *54*, 707-711.
- Steimer, T. y Driscoll, P. (2003). Divergent stress responses and coping styles in psychogenetically selected Roman high-(RHA) and low-(RLA) avoidance rats: behavioural, neuroendocrine and developmental aspects. *Stress*, *6*, 87-100.
- Steimer, T. y Driscoll, P. (2005). Inter-individual vs line/strain differences in psychogenetically selected Roman high- (RHA) and low- (RLA) avoidance rats: neuroendocrine and behavioural aspects. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, *29*, 99-112.
- Steimer, T., Escorihuela, R.M., Fernández-Teruel, A. y Driscoll, P. (1998). Long-term behavioural and neuroendocrine changes in Roman neonatal handling. *International Journal of Developmental Neuroscience*, *16*, 165-174.
- Steimer, T., La Fleur, S. y Schulz, P.E. (1997). Neuroendocrine correlates of emotional reactivity and coping in male rats from the Roman high (RHA/Verh) and low (RLA/Verh)-avoidance lines. *Behavior Genetics*, *27*, 503-511.
- Torres, C., Candido, A., Escarabajal, M.D., de la Torre, L., Maldonado, A., Tobeña, A. y Fernández-Teruel, A. (2005). Successive negative contrast in one-way avoidance learning in female Roman rats. *Physiology & Behavior*, *85*, 377-382.
- Torres, C., Escarabajal, M.D., Candido, A., de la Torre, L., Gomez, M.J., Maldonado, A., Tobeña, A. y Fernández-Teruel, A. (2007). One-avoidance learning and diazepam in female Roman high-avoidance and low-avoidance rats. *Behavioural Pharmacology*, *18*, 251-253.
- Torres, C., Moron, I., Escarabajal, M.D., Esteban, F.J., Gomez, M.J., de la Torre, L., Candido, A., Maldonado, A., Tobeña, A. y Fernández-Teruel, A. (2006). One-way avoidance learning in female Roman High-Avoidance (RHA) and Roman Low-Avoidance (RLS) rats: strain behavioural divergences and cellular density relationship in the basolateral amygdala. Poster presented at the

FENS Forum 2006 meeting, July 8-12 2006,  
Vienna, Austria.

Wiersma, A., Konsman, J.P., Knollema, S., Bohus, B. y Koolhaas, J.M. (1998). Differential effects of CRH infusion into the central nucleus of the amygdala in the Roman high-avoidance and low-avoidance rats. *Psychoneuroendocrinology*, *23*, 261-274.

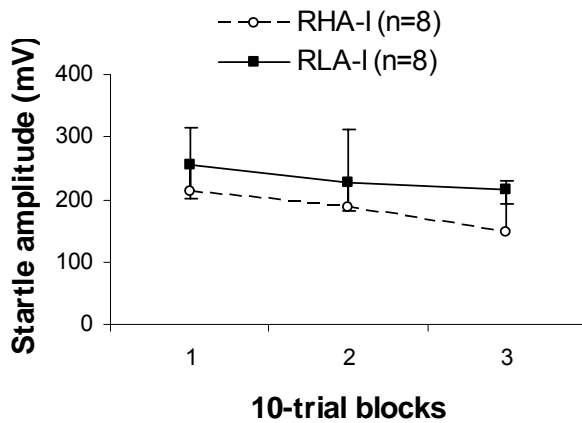
Yilmazer-Hanke, D.M., Faber-Zuschratter, H., Linke, R. y Schwegler, H. (2002). Contribution of amygdala neurons containing peptides and calcium-binding proteins to fear-potentiated startle and exploration-related anxiety in inbred Roman high -and low-avoidance rats. *European Journal of Neuroscience*, *15*, 1206-1218.

Yilmazer-Hanke, D.M., Wigger, A., Linke, R., Landgraf, R. y Schwegler, H. (2004). Two Wistar rat lines selectively bred for anxiety-related behavior show opposite reactions in elevated plus maze and fear-sensitized acoustic startle tests. *Behavior Genetics*, *34*, 309-318.

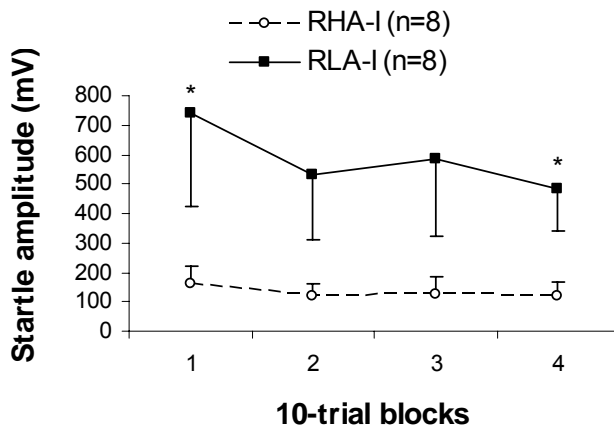
Zeier, H., Bättig, K. y Driscoll, P. (1978) Acquisition of DRL-20 behavior in male and female, Roman high- and low-avoidance rats. *Physiology & Behavior*, *20*, 791-793.

Figure 1:

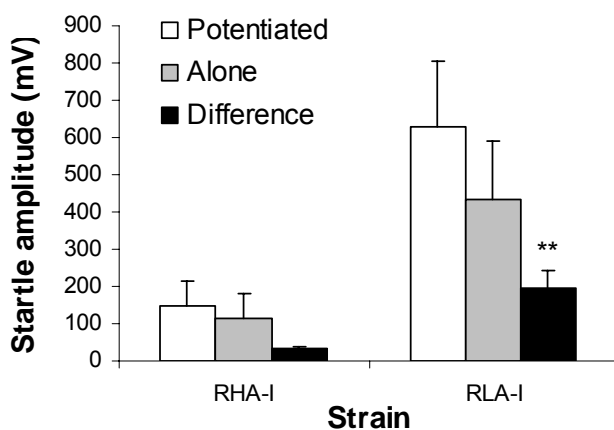
A. EXP. 1: ASR-1 SESSION



B. EXP. 1: ASR-2 SESSION



C. EXP.1: FPS SESSION

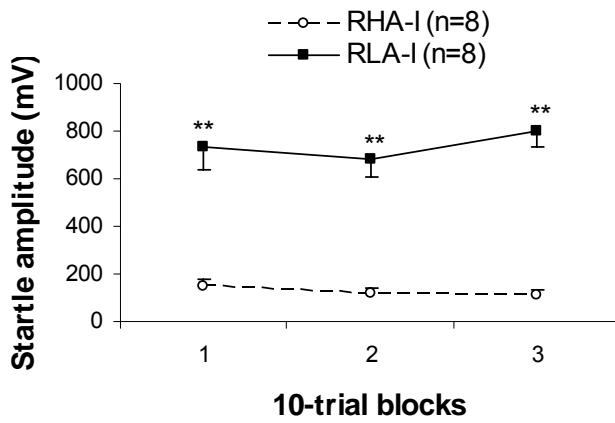


(A) Twenty RHA-I and twenty RLA-I male rats underwent an ASR session (30 acoustic stimuli 105 dB, 50 ms). Eight rats from each strain were then matched according to their similar ASR scores (ASR-1 SESSION) and used for the experiment. They were submitted to two conditioning sessions (see “Methods”). Twenty-four hours later they underwent another (B) ASR session (ASR-2, 40 trials of startle stimulus alone) which was immediately followed by a FPS session (C). Data are means  $\pm$  SEM of maximum startle amplitude averaged for trial blocks.

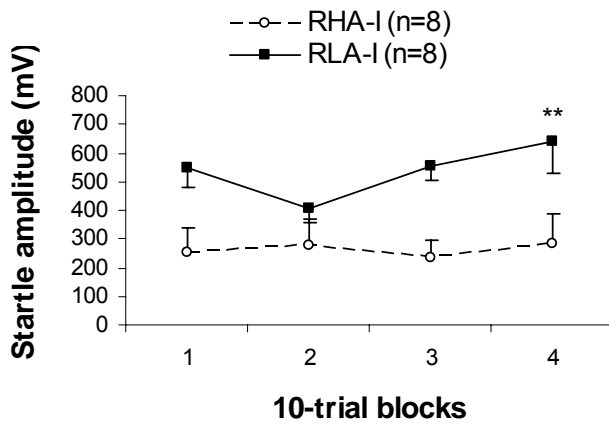
\*  $p \leq 0.05$ , \*\*  $p \leq 0.01$  vs the RHA-I group (Student’s t-test).

Figure 2:

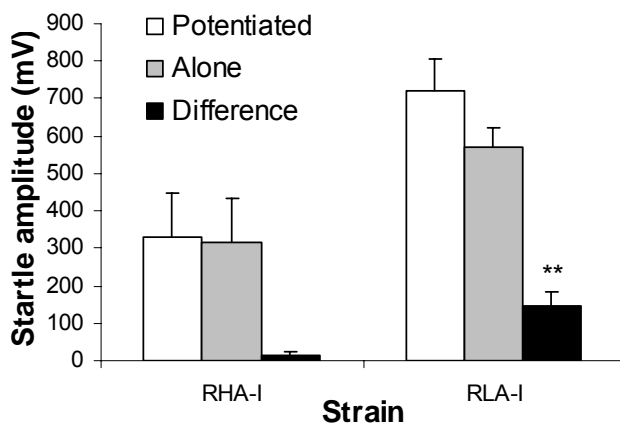
A. EXP. 2: ASR-1 SESSION



B. EXP. 2: ASR-2 SESSION



C. EXP.2: FPS SESSION

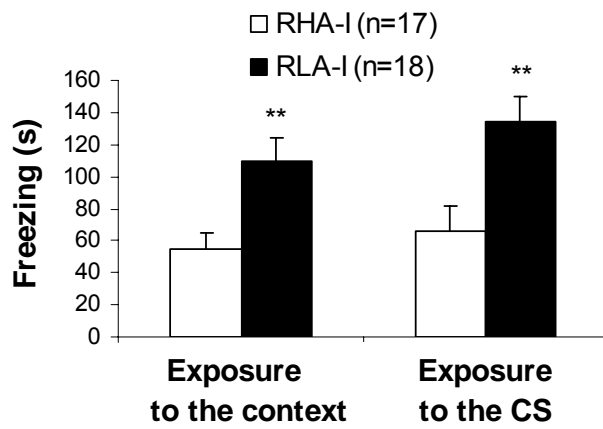


(A) Baseline ASRs (stimulus startle alone) in RHA-I and RLA-I rats. (B) Twenty-four hours after the conditioning session (see “Methods”) rats underwent another ASR session (ASR-2) as in experiment 1. (C) Immediately after the ASR-2 session they were submitted to the FPS session as in experiment 1. Data are means  $\pm$  SEM of maximum startle amplitude averaged for trial blocks.

\*  $p \leq 0.05$ , \*\*  $p \leq 0.01$  vs the RHA-I group (Student’s t-test).

**Figure 3.**

**EXP. 3: CLASSICAL FEAR CONDITIONING**



Means  $\pm$  SEM of time spent freezing (s) during exposure to the context or to the CS are represented. Each group consisted of (approximately) equal numbers of rats from each sex, which were pooled because ANOVA did not show any significant “sex” or “sex by strain” effects (see results). \*\*  $P \leq 0.01$  vs RHA-I group (Student’s t-test).

Colegio Oficial de Psicólogos  
del Principado de Asturias  
Ildefonso S. del Río, +1º B  
33001 Oviedo (Spain)

Tel.: 985 285 778  
Fax: 985 281 374  
E-mail: [psicothema@cop.es](mailto:psicothema@cop.es)  
[www.psicothema.com](http://www.psicothema.com)

Albert Fernández Teruel  
Unidad de Psicología Médica  
Dpto de Psiquiatría y Medicina Legal  
Fac. de Medicina, Univ Autónoma de Barcelona  
08193 Bellaterra, Barcelona

*Director*  
José Muñiz

Ref. Nº: 2008/46

*Directores Asociados*  
Jorge L. Arias  
José R. Fdez.-Hermida  
Serafín Lemos  
J. Carlos Núñez  
Marino Pérez  
Roberto Secades

Oviedo a 11 de Febrero de 2008

*Gestora*  
Olaya García

*Administración*  
Leticia García  
M. Ángeles Gómez

Estimado/a colega:

Nos complace informarle que el manuscrito titulado: THE ROMAN HIGH- AND LOW-AVOIDANCE RAT STRAINS DIFFER IN FEAR-POTENTIATED STARTLE AND FEAR CONDITIONING TO CUES AND CONTEXTS cuyos autores son Dña Regina López-Aumatell, Dña. Gloria Blazquez, D. Luis Gil, D. Raúl Aguilar, D. Toni Cañete, Dña. Lydia Giménez-Llort, D. Adolf Tobeña y D. Albert Fernández Teruel, ha sido aceptado para su publicación en Psicothema. En su momento le enviaremos las galeradas para su corrección.

Para cualquier consulta, no dude en ponerse en contacto con nosotros, incluyendo la referencia de su artículo en todas sus comunicaciones (teléfono, fax o correo electrónico).

Le estamos muy agradecidos de que haya elegido la revista Psicothema como medio de publicación.

Reciba un cordial saludo.



José Muñiz  
Director



Olaya García  
Gestora

## **Article II**

Research report

# Fearfulness in a large N/Nih genetically heterogeneous rat stock: Differential profiles of timidity and defensive flight in males and females

Regina Lopez-Aumatell<sup>a</sup>, Marc Guitart-Masip<sup>a</sup>, Elia Vicens-Costa<sup>a</sup>, Lydia Gimenez-Llort<sup>a</sup>,  
William Valdar<sup>b</sup>, Martina Johannesson<sup>b</sup>, Jonathan Flint<sup>b</sup>,  
Adolf Tobeña<sup>a</sup>, Alberto Fernandez-Teruel<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> *Medical Psychology Unit, Department of Psychiatry & Forensic Medicine, Institute of Neurosciences, School of Medicine, Autonomous University of Barcelona, 08193 Bellaterra, Barcelona, Spain*

<sup>b</sup> *Welcome Trust Centre for Human Genetics, University of Oxford, Oxford Roosevelt Drive, Oxford OX3 7BN, UK*

Received 31 July 2007; received in revised form 18 October 2007; accepted 21 October 2007

Available online 26 October 2007

## Abstract

Anxiety-related behaviors were evaluated across various tests in a large sample ( $n=787$ , both sexes) of genetically heterogeneous (N/Nih-HS) rats, derived from an eight-way cross of inbred strains. These tests either evoke unlearned (black–white box, BWB-; novel-cage activity, NACT-; elevated “zero” maze, ZM-; baseline acoustic startle response, BAS-) or learned (fear-potentiated startle, FPS-; two-way active-shuttle box-avoidance acquisition, SHAV-) anxious/fearful responses. The results showed that, with the exception of fear-potentiated startle, almost all (unlearned and learned) behaviors assessed fit with a pattern of sex effects characterized by male rats as being more fearful than females. We applied factor analyses (oblique rotation) to each sex, with the final two-factor solution showing: (1) a first factor (labelled as “Timidity”) comprising BWB, NACT and ZM variables in both sexes, plus SHAV responding in the case of males, and (2) a second factor (called “Defensive Flight”) which grouped BAS, FPS, and SHAV responding in both sexes. An additional regression analysis showed significant influences of (unlearned) risk assessment (i.e. stretch-attendance) behavior on SHAV in males, while FPS was the main variable positively influencing SHAV (in the intermediate and advanced phases of acquisition) in females. This indicates, for the first time, that fear-potentiated startle may have a facilitating role in the rat’s active responses (at least in females) to the cue in the intermediate to advanced phases (i.e. when the initial “passive avoidance/active avoidance” begins to fade) of shuttle box avoidance acquisition. The results of this first extensive behavioral evaluation of N/Nih-HS rats are discussed in terms of their potential usefulness for present and future neurobehavioral and genetic studies of fearfulness/anxiety.

© 2007 Elsevier B.V. All rights reserved.

**Keywords:** Genetically heterogeneous rats; Sex differences; Anxiety; Unlearned fear; Learned fear; Defensive profiles; Factor analysis

## 1. Introduction

Despite the considerable increase in the number and use of inbred (and/or selected) rat strains over the past three decades, outbred rat stocks have contributed and continue to contribute enormously to our knowledge about biobehavioral traits. However, it appears likely that many, if not most, commonly used outbred rat stocks could have a rather narrow genetic ancestry.

It seems that many (perhaps the majority) of available outbred rat stocks would trace their ancestry, at least in part, to a stock that was maintained at the Wistar Institute in Philadelphia from a period before World War I to the 1950s. This Wistar colony was, in turn, derived and established in Europe from a small group of rats just around 1900 (for review see [31]). The origins of Sprague–Dawley and Long-Evans stocks were also based on a very small number of breeders, as each of them derived from a single mating between (presumably) a Wistar female and males from different sources, including a wild-type one. It is likely that these two outbred stocks were subject of significant inbreeding and selection in the initial generations (for references see [31]).

\* Corresponding author. Tel.: +34 93 581 34 56; fax: +34 93 581 14 35.  
E-mail address: [albert.fernandez.teruel@uab.es](mailto:albert.fernandez.teruel@uab.es) (A. Fernandez-Teruel).



Such a scenario prompted Hansen and Spuhler [31] to develop a more naturalistic, genetically heterogeneous rat stock which could yield a broad-range distribution of responses to experimental conditions and could serve as a base population for selection studies. Thus, with the aim of optimizing the distribution of genotypic frequencies and recombination in the population the “National Institutes of Health – N/Nih – Genetically Heterogeneous Rat Stock” (N/Nih-HS rats) was formed through an eight-way cross of as much as possible separate inbred strains which were readily available. These eight parental strains were: the MR/N, WN/N and WKY/N (these three strains trace their ancestry to the original Wistar stock); the M520/N and F344/N (both established in the 1920s, but of unknown origin); the ACI/N (hybrid between the August and Copenhagen strains), the BN/SsN (derived from a color mutant from a stock of wild rats kept at the Wistar Institute) and the BUF/N strain [31,56].

The phenotypes showed by these N/Nih-HS rats in up to 16 ethanol-related traits lend initial support to the effectiveness of the program, as for all traits except one the values of the heterogeneous stock were within the high and low values of the eight parental inbred strains [31,56]. Successful selection studies have also been carried out, departing from the N/Nih-HS rat stock, by breeding divergent lines of rats on the basis of their extreme values in, for instance, sensitivity to acute ethanol [11], aerobic running capacity [34,60] and serotonin-1A receptor sensitivity [42].

Nevertheless, probably the strongest case for the use of genetically heterogeneous stocks comes from the demonstration that these rodent stocks are an unique resource to achieve fine genome-wide genetic mapping of QTLs (“Quantitative Trait Loci”), that is to say, to elucidate even very small genetic influences on continuous phenotypic (behavioral or biological) characters/traits (explaining even less than 2% of the variance; e.g. [27,39,40,61]) to the point that these QTLs can represent chromosomal intervals of  $\leq 1$  cM, thus even allowing gene identification [65] as well as evaluation of epistatic and gene–environment interactions [61,62]. The forementioned works with HS mice are the best recent examples of how, and to what extent, using genetically heterogeneous rodent stocks is becoming crucial for genetically oriented studies that should provide extremely relevant understanding on the genetically based psycho- and neurobiological influences on complex biobehavioral traits. There is no reason to think that the same, or even greater advances, could not be achieved by the use of genetically heterogeneous rats as the present ones.

The N/Nih-HS rat stock has thus far not been characterized in regard to novelty-related exploration and anxiety/fearfulness-related behavioral processes or tasks. This is why, within the context of a wider study on the genetic basis of anxiety/fearfulness (i.e. a QTL fine mapping study), we have carried out the present battery of behavioral tests on those animals with the aim of providing behavioral profiles and studying the factorial/dimensional structure of the different behavioral measures in both sexes. Thus, with this goal in mind, we have characterized a large sample ( $n=787$ ) of N/Nih-HS rats in a series of fearfulness-related phenotypes, including novelty-induced exploratory activity, unlearned and learned fear/anxiety

behaviors. The multitest battery used comprises unconditioned tests of novelty-induced and habituated exploratory activity, the white/black box and “elevated zero maze” tests for unconditioned anxiety (e.g. [49,55,58]) and the baseline acoustic startle test (e.g. [1,59]). As conditioned anxiety/fear tests, we have used the fear-potentiated startle (e.g. [10,36]) and the acquisition of two-way active avoidance in a shuttle box (e.g. [13,17–19,24,46,47]).

Previous results of the most relevant multitest studies on anxiety/fearfulness in rodents disclosed the complexity of this trait but can be summarized as follows [2,3,5,16,26,30,48,49]: (1) some relationships among variables taken from the same test can be considered trivial rather than relevant; (2) low correlations among variables apparently measuring the same or similar phenomena are common among different tests; (3) principal component analysis and factor analysis reveal that anxiety and/or fearfulness have a multifacetic nature that is differentially expressed, depending upon the specific conditions (e.g. type of test, type of animals [strain, species, etc.], etc.) under which it is evaluated. In particular, in the largest study thus far performed, Aguilar et al. [2,24] reported that a three-factor structure was the best explanation of the anxious/fearful behavior shown by an F2 rat sample ( $n=800$ ; derived from the Roman rat strains; see also [12]) evaluated in seven unconditioned and conditioned anxiety tests. The first factor coherently grouped context- and cue-conditioned freezing (classically conditioned fear) with the acquisition of two-way active avoidance, thus giving support to the contention that learned fear (i.e. freezing) runs against acquisition of the two-way active response (e.g. [8,13,17–19,28,29,37]). The second factor concerned a mixed constellation of variables from two-way active avoidance, fear conditioning, open-field activity and defecation, and head-dipping in the hole board test. The third factor grouped anxiety-related variables from the elevated plus-maze test [2]. Importantly, such a factorial structure presented a considerable fit with the results of a genetic QTL study carried out with the same F2 rat sample, altogether suggesting, on a genetic basis, that different biological mechanisms can be anticipated for the behavioral expression of distinctive fearful outputs [2,24,29].

We have studied here the pattern of relationships among the different fearfulness-related variables, unlearned and learned, in N/Nih-HS rats across the tasks mentioned before. It is worth pointing out that (conditioned) fear-potentiated startle has never been jointly tested for associations with acquisition of two-way avoidance. Thus, the present study can shed some light on both the possible shared components of unconditioned and conditioned anxiety and on the communalities, if they exist, between classical fear conditioning (i.e. fear-potentiated startle) and an instrumental fear-motivated task such as the acquisition of two-way active avoidance (see [2,8,13,17–19,24]). Moreover, the structure of the possible relationships among variables can be a very informative starting point with respect to determining, for the first time, the associations among those characters/traits in a genetically heterogeneous rat stock, which in turn might be useful for further (either neurobehavioral or genetic) studies to be carried out with the present genetically heterogeneous rats or with other rat strains/stocks.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Animals

The subjects were 787 N/Nih-HS rats (“National Institutes of Health Genetically Heterogeneous Rat Stock”, see [31]; the progenitors were kindly provided by Dr. Eva Redei, Center for Comparative Medicine, Northwestern University, Chicago, USA), approximately half of each sex. Subjects were 3 months old at the beginning of the experiments (weight: 250–350 g). They were housed in pairs in macrolon cages (50 cm × 25 cm × 14 cm) and maintained with food and tap water available ad lib, under conditions of controlled temperature ( $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ) and a 12 h light–dark cycle (lights on at 08:00 h).

### 2.2. Procedure and apparatus

Experiments were performed during the light cycle, between 09:00 and 19:00 h and in accordance with the Spanish legislation on “Protection of Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes” and the European Communities Council Directive (86/609/EEC) on this subject. Six behavioral tests were administered along a 3-month period for each of the three batches (with  $n = 250\text{--}265$  rats/batch, approximately half of each sex). Two weeks elapsed, on average, between each two consecutive tests. The sequence and the characteristics of the tests were as follows:

#### 2.2.1. Black–white box (BWB)

Two-compartment box (Panlab, Barcelona, Spain) consisting of a black and dark compartment (27 cm × 18 cm × 27 cm) and a white compartment (27 cm × 27 cm × 27 cm) dimly illuminated by a 40 W red bulb placed 35 cm above the floor. Both compartments were separated by a wall (47 cm high) with an opening in its base (7 cm × 7 cm) through which the subject can change of compartment. The apparatus was situated in a black testing room illuminated with red fluorescent light (60 W). A video camera allowed to measure behavior from outside the testing room. For testing, each animal was placed in the black compartment facing the wall. The latency of exit from the black compartment (BWB-LAT), the time spent in the white compartment (BWB-T), the number of entries in the white compartment (BWB-E) and the number of stretched attend postures (BWB-SAP) were measured for 5 min (as examples see [49,58]).

#### 2.2.2. Automated novel-cage activity (NACT)

The apparatus (Panlab, Barcelona, Spain) consisted of a horizontal surface (50 cm × 50 cm) provided with photobeams that detect movement and measure it automatically, loading the data in a computer. The subjects were placed in transparent plexiglas cages (40 cm × 40 cm × 40 cm). They were situated in a white fluorescent (60 W) illuminated chamber. Spontaneous horizontal activity was measured for the first 5 min (ACT-DIST5; measure of novelty-induced – open filed-like – activity) and for the last 5 min (ACT-DIS30; as a measure of habituated activity) of a 30 min session.

#### 2.2.3. Elevated “zero-maze” (ZM)

The maze, similar to that described by Shepherd et al. [55], comprised an annular platform (105 cm diameter; 10 cm width) made of black plywood and elevated to 65 cm above the ground level. It had two open sections (quadrants) and two enclosed ones (with walls 40 cm height). The subject was placed in an enclosed section facing the wall. The apparatus was situated in a black testing room, dimly illuminated with red fluorescent light, and the behavior was videotaped and measured outside the testing room. Latency to enter into an open section (ZM-LAT), time spent in the open sections (ZM-T), number of entries in the open sections (ZM-E), number of stretched attend postures (ZM-SAP), number of crossings (ZM-C), number of “head dips” (ZM-HD) and number of defecation boluses (ZM-D) were measured for 5 min (as examples see [43,55]).

#### 2.2.4. Baseline acoustic startle response (BAS) and fear-potentiated startle (FPS)

Four sound-attenuated boxes (Sr-Lab Startle Response System, San Diego Inst., San Diego, USA) were used. Each box housed a plexiglas cylinder with a grid placed in the bottom. For any test session each animal was placed in the

cylinder, and movements of the cylinder resulting from startle responses were transduced by an accelerometer into a voltage which was amplified, digitized and saved into a computer for analysis. A white noise generator provided background noise of 55 dB in the unlit chambers. Acoustic stimuli of 105 dB and 50 ms were delivered by a loudspeaker, mounted at a distance of 23 cm above the plexiglas cylinder. Startle response amplitude was defined as the maximum accelerometer voltage during the first 200 ms after the startle stimulus onset.

The BAS + FPS procedure involved four phases, carried out in two consecutive days as follows:

#### 2.2.5. Day 1: baseline acoustic startle (BAS-1) and conditioning

For the baseline startle session (BAS-1; administration of the startle stimulus alone), and after 5 min of familiarization to the startle chamber, each rat was exposed to 30 acoustic stimuli of 105 dB (50 ms duration) with an ITI of 30 s. BAS-1 session was immediately followed by the conditioning phase, which consisted of 10 trials. Each conditioning trial consisted of presentation of an acoustic stimulus (70 dB; conditioned stimulus, CS) of 3.2 s after which a .6 mA shock was delivered through the grid, which continued with the acoustic stimulus for further .5 s. Every two consecutive trials were separated by an ITI of 30 s.

#### 2.2.6. Day 2: baseline acoustic startle (BAS-2) and fear-potentiated startle (FPS)

In the 2nd day, 24 h after the conditioning session, the BAS-2 session was administered with the same parameters as in BAS-1 session (see above) except for the fact that 40 trials were performed in BAS-2. This phase was immediately followed by FPS testing, which consisted of administration, in a pseudorandom order, of 20 acoustic stimuli (105 dB, 50 ms) alone and 20 of these stimuli preceded by the CS (70 dB, 3.7 s). ITI was 30 s along the whole FPS test session.

The average response difference between those 20 “alone” trials and those 20 trials preceded by the CS is considered the measure of cue-conditioned fear-potentiated startle (FPS) (as examples see [1,10,32]).

#### 2.2.7. Two-way active, shuttle box avoidance acquisition (SHAV)

The experiment was carried out with three identical shuttle boxes (Letica, Panlab, Barcelona, Spain), each placed within independent, sound-attenuating boxes constructed of plywood. A dim and diffuse illumination was provided by a fluorescent bulb placed behind the opaque wall of the shuttle boxes. The experimental room was kept dark. The shuttle boxes consisted of two equally sized compartments (25 cm × 25 cm × 28 cm), connected by an opening (8 cm × 10 cm). A 2400-Hz, 63-dB tone plus a light (from a small, 7-W lamp) functioned as the CS (conditioned stimulus). The US (unconditioned stimulus), which commenced at the end of the CS, was a scrambled electric shock of .7 mA delivered through the grid floor. Once the rats were placed into the shuttle box, a 4 min familiarization period elapsed before training commenced. Each training trial consisted of a 10 s CS, followed by a 20 s US. The CS or US was terminated when the animal crossed to the other compartment, with crossing during the CS being considered as an avoidance response and during the US as an escape response. Once a crossing had been made or the shock (US) discontinued, a 60 s intertrial interval (ITI) was presented during which crossings (ITC) were also scored. Training consisted of a single 40-trial session.

The variables recorded were the total number of avoidances (SHAV40), the number of intertrial crossings (SHAV-ITC40) and the average response latency (i.e. time elapsed from CS onset until the rat crosses to the other compartment; maximum value of 30 s) for the whole training session (SHAV-LAT40) (as examples see [2,8,17–19,24,46,47]).

## 2.3. Statistical analysis

Student’s *t* tests for independent samples were applied for comparisons of the relevant variables between sexes. Pearson’s correlation coefficient (“rho”), factor analysis techniques (Varimax and direct oblimin rotations) and regression analysis were applied to study the relationships among the different dependent variables (SPSS Windows, 9.0.1, SPSS Inc., USA).

After performing Student’s *t* tests for comparison between sexes a correlation table was obtained for each sex. Taking into account previous studies with the “automated novel-cage activity” test, the baseline and fear-potentiated acoustic startle and the acquisition of two-way active – shuttle box – avoidance (e.g.

Table 1  
Sex-linked differences in fearful behavior

|   | Mean $\pm$ S.E.M.                    |  | <i>t</i> | Sig.             |
|---|--------------------------------------|--|----------|------------------|
|   | Males ( <i>n</i> = 422) <sup>a</sup> | Females ( <i>n</i> = 365) <sup>a</sup> |          |                  |
| <b>Black–white box</b>                                      |                                      |  |          |                  |
| Time spent in the white compartment (s) (BWB-E)             | 27.45 $\pm$ 1.8                      | 37.46 $\pm$ 1.9                        | 3.71     | <i>P</i> < 0,001 |
| Latency to enter into the white compartment (s) (BWB-LAT)   | 152.15 $\pm$ 6.1                     | 89.87 $\pm$ 1.9                        | 7.47     | <i>P</i> < 0,001 |
| # white compartment entries (BWB-E)                         | 1.81 $\pm$ 0                         | 2.81 $\pm$ .1                          | 7.19     | <i>P</i> < 0,001 |
| # stretched attend postures (BWB-SAP)                       | 3.65 $\pm$ .1                        | 3.67 $\pm$ .1                          | .12      | n.s.             |
| <b>“Automated novel-cage activity” test</b>                 |                                      |  |          |                  |
| Distance, minutes 0–5 (cm) (NACT-DIST5)                     | 1210.55 $\pm$ 28.3                   | 1307.68 $\pm$ 30.4                     | 2.33     | <i>P</i> = 0,02  |
| Distance, minutes 6–10 (cm) (NACT-DIST10)                   | 1068.2 $\pm$ 26.7                    | 1042.33 $\pm$ 26.1                     | .68      | n.s.             |
| Distance, minutes 11–15 (cm) (NACT-DIST15)                  | 982.08 $\pm$ 25.5                    | 1044.44 $\pm$ 24.2                     | 1.75     | n.s.             |
| Distance, minutes 16–20 (cm) (NACT-DIST20)                  | 748.37 $\pm$ 21.1                    | 771.12 $\pm$ 22.4                      | .73      | n.s.             |
| Distance, minutes 21–25 (cm) (NACT-DIST25)                  | 619.86 $\pm$ 20.5                    | 648.52 $\pm$ 23                        | .92      | n.s.             |
| Distance, minutes 26–30 (cm) (NACT-DIST30)                  | 530.0 $\pm$ 18.3                     | 547.64 $\pm$ 21.3                      | .63      | n.s.             |
| <b>Elevated “zero-maze”</b>                                 |                                      |  |          |                  |
| Latency to enter into an open section (s) (ZM-LAT)          | 106.85 $\pm$ 6.1                     | 46.58 $\pm$ 4.5                        | 7.68     | <i>P</i> < 0,001 |
| Time spent in the open sections (s) (ZM-T)                  | 44.32 $\pm$ 2.6                      | 62.16 $\pm$ 2.4                        | 4.96     | <i>P</i> < 0,001 |
| # open section entries (ZM-E)                               | 3.23 $\pm$ .1                        | 5.23 $\pm$ .1                          | 7.91     | <i>P</i> < 0,001 |
| # stretched attend postures (ZM-SAP)                        | 3.97 $\pm$ .1                        | 5.09 $\pm$ .2                          | 3.67     | <i>P</i> < 0,001 |
| # defecation boluses (ZM-D)                                 | 1.13 $\pm$ 0                         | 0.58 $\pm$ 0                           | 5.67     | <i>P</i> < 0,001 |
| <b>Acoustic startle response</b>                            |                                      |  |          |                  |
| Baseline acoustic startle response (session 1) (mV) (BAS-1) | 380.41 $\pm$ 24.9                    | 269.35 $\pm$ 20.9                      | 3.31     | <i>P</i> < 0,001 |
| Baseline acoustic startle response (session 2) (mV) (BAS-2) | 315.21 $\pm$ 20.2                    | 233.89 $\pm$ 15.7                      | 3.07     | <i>P</i> = 0,002 |
| Fear-potentiated startle response (FPS)                     | 53.69 $\pm$ 7.4                      | 53.75 $\pm$ 9                          | 0        | n.s.             |
| <b>Two-way shuttle box avoidance conditioning</b>           |                                      |  |          |                  |
| Mean response latency (s) (SHAV-LAT)                        | 11.99 $\pm$ .1                       | 10.89 $\pm$ .1                         | 4.97     | <i>P</i> < 0,001 |
| # intertrial crossings (SHAV-ITC)                           | 20.67 $\pm$ .7                       | 26.44 $\pm$ .9                         | 4.79     | <i>P</i> < 0,001 |
| # avoidances (SHAV)   | 6.95 $\pm$ .3                        | 6.09 $\pm$ .3                          | 1.66     | n.s.             |

Behavioral scores of male and female of the N/Nih-HS rats across the battery of tests. Means ( $\pm$ S.E.M.), Student's *t* tests and *p* values for the main variables from each test are presented. The d.f.s were 1 for the number of experimental groups, and 673 (at least) for the number of subjects used.

<sup>a</sup> For the “Acoustic startle response” males were *n* = 373 and females were *n* = 302.

[1,2,4,8,17–19,24,46,47]), the main target variables to be included in the factor analysis were selected according to theoretical and empirical criteria, while also trying to choose variables which represented (at least partly) different processes. Thus, the horizontal activity during the first 5 min (i.e. novelty-induced activity) and during the last 5 min (i.e. habituated activity; see Table 1) were selected from the “automated novel-cage” (NACT) test. Averaged scores from the three different (BAS-1, BAS-2 and FPS) phases of the acoustic startle test and both the “mean response latency” (which encompasses freezing, escape and avoidance responses) and “total intertrial crossings” (i.e. pseudoavoidance responses [4]) of the shuttle box avoidance task were also selected.

In order to avoid too much redundancy among variables (and the processes they represent) from the BWB and ZM tests, and to select the mainly relevant variables for factor analysis, we followed a two-step approach as suggested by Aguilar et al. [2,3]. First, we applied orthogonally rotated (Varimax) factor analysis on each of both tests to produce a simple structure. From each resultant orthogonal factor, two or three variables were selected according to the following criteria: (1) be consistent with the pre-existing literature, even choosing variables with low loadings but with previously reported theoretical significance and (2) choose the best among several variables, according to theoretical/conceptual reasons, when their loadings onto a given factor were in close proximity. Thus, SAP (“stretched-attend postures” of risk assessment) of both the BWB and ZM tests were selected because of their ethological value (e.g. [6,7]) and based on their differential sex-linked profiles (i.e. sex-related differences for SAP in the ZM test but not in the BWB test; see Table 1 below). The “number of entries into the white compartment” of the BWB and the “time spent into open sections” of the ZM were selected because, according to previous studies, both measures are the best validated anxiety variables for each of these tests in rats (see for instance [49,55,58]). Defecation boluses in the ZM test were also selected provided that novelty-induced defecation is a typical fearfulness-related

variable (e.g. [2,3,14,15,20–23,25]), because they discriminate between males and females (see Table 1 below) and because of their modest associations (i.e. non-redundancy; see correlations in Table 2A and B) with other variables from the BWB, NACT and ZM tests.

After this first step, 12 variables were chosen (see below). The second step was to apply an exploratory, obliquely rotated (direct oblimin) factor analysis to these 12 target variables separately for each sex, followed, after application of the Catell's scree test (to decide whether the two-factor or the three-factor solutions were the most appropriate), by two- or three-factor solutions (direct oblimin) depending on each sex (see below).

### 3. Results

The observation of the means ( $\pm$ S.E.M.) and Student's *t* tests of the main variables in both sexes (Table 1) clearly indicates that, compared to males, females generally show significantly lower signs of anxiety in almost all anxiety/fearfulness-related variables (all Student's *t*  $\geq$  2.33, *p* < .02) except for the fear-potentiated startle and novel-cage activity from minutes 6 to 30 (i.e. habituated activity; Table 1). Thus, most of activity/exploration-related parameters from unconditioned tests (BWB, novel-cage activity (NACT)-, ZM test), as well as baseline acoustic startle (BAS-1 and BAS-2 phases) and acquisition of the two-way avoidance task (see “mean response latency” – SHAV-LAT – for the 40-trial session; Table 1) were sex dependent.

Table 2  
Correlation matrix among the main variables for males (A) and for females (B)

|             | BWB-E           | BWB-SAP         | BWB-T           | BWB-LAT         | NACT-DIST5      | NACT-DIST30    | ZM-LAT          | ZM-T            | ZM-E           | ZM-SAP        | ZM-D         | BAS-1          | BAS-2         | FPS            | SHAV-LAT        | SHAV           | SHAV-ITC |
|-------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|----------------|-----------------|-----------------|----------------|---------------|--------------|----------------|---------------|----------------|-----------------|----------------|----------|
| (A)         |                 |                 |                 |                 |                 |                |                 |                 |                |               |              |                |               |                |                 |                |          |
| BWB-E       | 1               |                 |                 |                 |                 |                |                 |                 |                |               |              |                |               |                |                 |                |          |
| BWB-SAP     | <b>.259***</b>  | 1               |                 |                 |                 |                |                 |                 |                |               |              |                |               |                |                 |                |          |
| BWB-T       | <b>.719***</b>  | .083            | 1               |                 |                 |                |                 |                 |                |               |              |                |               |                |                 |                |          |
| BWB-LAT     | <b>-.782***</b> | <b>-.131**</b>  | <b>-.554***</b> | 1               |                 |                |                 |                 |                |               |              |                |               |                |                 |                |          |
| NACT-DIST5  | <b>.416***</b>  | <b>.265***</b>  | <b>.352***</b>  | <b>-.353***</b> | 1               |                |                 |                 |                |               |              |                |               |                |                 |                |          |
| NACT-DIST30 | .225***         | .184***         | .190***         | <b>-.131**</b>  | <b>.304***</b>  | 1              |                 |                 |                |               |              |                |               |                |                 |                |          |
| ZM-LAT      | <b>-.353***</b> | <b>-.128**</b>  | <b>-.240***</b> | <b>.332***</b>  | <b>-.350***</b> | <b>-.118*</b>  | 1               |                 |                |               |              |                |               |                |                 |                |          |
| ZM-T        | <b>.416***</b>  | .199***         | <b>.342***</b>  | <b>-.323***</b> | <b>.410***</b>  | .188***        | <b>-.572***</b> | 1               |                |               |              |                |               |                |                 |                |          |
| ZM-E        | <b>.439***</b>  | .170***         | <b>.315***</b>  | <b>-.366***</b> | <b>.475***</b>  | .188***        | <b>-.637***</b> | <b>.809***</b>  | 1              |               |              |                |               |                |                 |                |          |
| ZM-SAP      | .214***         | <b>.557***</b>  | .153**          | <b>-.141**</b>  | <b>.271***</b>  | .238***        | <b>-.188***</b> | .189***         | <b>.265***</b> | 1             |              |                |               |                |                 |                |          |
| ZM-D        | <b>-.078</b>    | <b>-.016</b>    | <b>-.103*</b>   | <b>-.015</b>    | <b>-.126*</b>   | <b>-.072</b>   | .101*           | <b>-.158***</b> | <b>-.143**</b> | <b>-.038</b>  | 1            |                |               |                |                 |                |          |
| BAS-1       | <b>-.008</b>    | <b>-.005</b>    | <b>-.004</b>    | <b>-.029</b>    | .033            | <b>-.076</b>   | <b>-.068</b>    | <b>-.002</b>    | .021           | .007          | .058         | 1              |               |                |                 |                |          |
| BAS-2       | <b>-.014</b>    | <b>-.016</b>    | .054            | .005            | .050            | <b>-.033</b>   | <b>-.040</b>    | <b>-.011</b>    | .030           | .051          | .043         | <b>.823***</b> | 1             |                |                 |                |          |
| FPS         | .029            | <b>-.010</b>    | .034            | <b>-.019</b>    | <b>-.002</b>    | <b>-.042</b>   | .044            | <b>-.071</b>    | <b>-.095</b>   | .034          | .015         | <b>.253***</b> | .201***       | 1              |                 |                |          |
| SHAV-LAT    | <b>-.079</b>    | <b>-.077</b>    | <b>-.034</b>    | .034            | <b>-.080</b>    | <b>-.024</b>   | .067            | <b>-.092</b>    | <b>-.062</b>   | <b>-.064</b>  | <b>-.008</b> | <b>-.110*</b>  | <b>-.109*</b> | .008           | 1               |                |          |
| SHAV        | .115*           | .087            | .088            | <b>-.038</b>    | .167***         | .160***        | <b>-.098*</b>   | .124*           | .132**         | .105*         | <b>-.015</b> | .078           | .065          | <b>-.032</b>   | <b>-.669***</b> | 1              |          |
| SHAV-ITC    | .093            | .064            | .052            | <b>-.020</b>    | .084            | .117*          | <b>-.119*</b>   | .125*           | .122*          | .085          | <b>-.024</b> | .187***        | .173***       | <b>-.033</b>   | <b>-.577***</b> | <b>.687***</b> | 1        |
| (B)         |                 |                 |                 |                 |                 |                |                 |                 |                |               |              |                |               |                |                 |                |          |
| BWB-E       | 1               |                 |                 |                 |                 |                |                 |                 |                |               |              |                |               |                |                 |                |          |
| BWB-SAP     | <b>.339***</b>  | 1               |                 |                 |                 |                |                 |                 |                |               |              |                |               |                |                 |                |          |
| BWB-T       | <b>.606***</b>  | .121*           | 1               |                 |                 |                |                 |                 |                |               |              |                |               |                |                 |                |          |
| BWB-LAT     | <b>-.655***</b> | <b>-.151**</b>  | <b>-.495***</b> | 1               |                 |                |                 |                 |                |               |              |                |               |                |                 |                |          |
| NACT-DIST5  | <b>.497***</b>  | <b>.396***</b>  | .201***         | <b>-.240***</b> | 1               |                |                 |                 |                |               |              |                |               |                |                 |                |          |
| NACT-DIST30 | .232***         | .205***         | .161**          | <b>-.103*</b>   | <b>.400***</b>  | 1              |                 |                 |                |               |              |                |               |                |                 |                |          |
| ZM-LAT      | <b>-.318***</b> | <b>-.193***</b> | <b>-.207***</b> | .219***         | <b>-.243***</b> | <b>-.130*</b>  | 1               |                 |                |               |              |                |               |                |                 |                |          |
| ZM-T        | <b>.390***</b>  | .203***         | .221***         | <b>-.241***</b> | <b>.299***</b>  | .196***        | <b>-.483***</b> | 1               |                |               |              |                |               |                |                 |                |          |
| ZM-E        | <b>.472***</b>  | <b>.254***</b>  | .231***         | <b>-.264***</b> | <b>.387***</b>  | <b>.267***</b> | <b>-.527***</b> | <b>.812***</b>  | 1              |               |              |                |               |                |                 |                |          |
| ZM-SAP      | <b>.369***</b>  | <b>.669***</b>  | .211***         | <b>-.146**</b>  | <b>.356***</b>  | .202***        | <b>-.191***</b> | .210***         | <b>.279***</b> | 1             |              |                |               |                |                 |                |          |
| ZM-D        | <b>-.113*</b>   | <b>-.162**</b>  | <b>-.054</b>    | <b>-.004</b>    | <b>-.118*</b>   | <b>-.022</b>   | .035            | <b>-.172***</b> | <b>-.142**</b> | <b>-.128*</b> | 1            |                |               |                |                 |                |          |
| BAS-1       | .004            | .055            | <b>-.012</b>    | .038            | <b>-.012</b>    | <b>-.015</b>   | <b>-.061</b>    | <b>-.041</b>    | <b>-.056</b>   | .072          | .041         | 1              |               |                |                 |                |          |
| BAS-2       | .024            | .215***         | .096            | .017            | .035            | .083           | <b>-.067</b>    | <b>-.028</b>    | <b>-.036</b>   | .199***       | <b>-.004</b> | <b>.590***</b> | 1             |                |                 |                |          |
| FPS         | <b>-.107</b>    | <b>-.014</b>    | <b>-.032</b>    | .151**          | <b>-.073</b>    | <b>-.052</b>   | .079            | <b>-.062</b>    | <b>-.072</b>   | <b>-.024</b>  | <b>-.033</b> | 0              | 0             | 1              |                 |                |          |
| SHAV-LAT    | <b>-.033</b>    | <b>-.054</b>    | .014            | .013            | <b>-.080</b>    | <b>-.048</b>   | <b>-.004</b>    | .042            | <b>-.036</b>   | <b>-.103</b>  | <b>-.052</b> | <b>-.071</b>   | <b>-.062</b>  | <b>-.174**</b> | 1               |                |          |
| SHAV        | .010            | .047            | <b>-.048</b>    | .028            | .085            | .029           | .076            | <b>-.045</b>    | .028           | .079          | .042         | .036           | .014          | .187***        | <b>-.795***</b> | 1              |          |
| SHAV-ITC    | .049            | .025            | <b>-.044</b>    | .013            | .151**          | .127*          | .028            | .038            | .118*          | .055          | <b>-.033</b> | <b>-.029</b>   | <b>-.015</b>  | .116*          | <b>-.613***</b> | <b>.713***</b> | 1        |

Correlations  $\geq .25$  are shown in bold letters. BWB-E, white compartment entries (*n*) in the black–white box; BWB-SAP, stretched attend postures (*n*); BWB-T, time spent (*s*) in the white compartment; BWB-LAT, latency (*s*) to enter into the white compartment; NACT-DIST5, NACT-DIST30 distance (cm) travelled during the first 5 min and during the last 5 min, respectively, in the “automated novel-cage activity” test; ZM-LAT, latency (*s*) to entry into an open section in the elevated “zero-maze”; ZM-T, time spent (*s*) in the open sections; ZM-E, open section entries (*n*); ZM-SAP, stretched attend postures (*n*); ZM-D, defecation boluses (*n*); BAS-1, baseline acoustic startle response (session 1) (mV); BAS-2, baseline acoustic startle response (session 2) (mV); FPS, fear-potentiated startle response (mV); SHAV-LAT, mean response latency (*s*) for whole the 40-trial shuttle box avoidance session; SHAV total number of avoidances (*n*) in the 40-trial shuttle box session; SHAV-ITC, total number of intertrial crossings (*n*) in the 40-trial shuttle box session.

\*  $p \leq .05$ , Pearson’s correlation coefficient.  
 \*\*  $p \leq .01$ , Pearson’s correlation coefficient.  
 \*\*\*  $p \leq .001$ , Pearson’s correlation coefficient.

Table 3  
Orthogonal (varimax rotation) factor analysis for the black–white box and for the Elevated “zero-maze” tests

| Test            | Variable  | Males<br>Factor 1 | Females<br>Factor 1 |
|-----------------|---|-------------------|---------------------|
| Black–white box | Latency to enter into the white compartment (s) (BWB-LAT) | –.868             | –.819               |
|                 | Time spent in the white compartment (s) (BWB-E)           | .830              | .787                |
|                 | <b># White compartment entries (BWB-E)</b>                | .947              | .904                |
|                 | <b># Stretched attend postures (BWB-SAP)</b>              | .299              | .411                |
|                 | <i>Explained variance</i>                                 | 60.72%            | 56.88%              |

| Test                 | Variable   | Factor 1 | Factor 1 | Factor 2 |
|----------------------|--|----------|----------|----------|
| Elevated “zero-maze” | # open section entries (ZM-E)                      | .920     | .894     | –        |
|                      | Latency to enter into an open section (s) (ZM-LAT) | –.806    | –.780    | –        |
|                      | <b>Time spent in the open sections (s) (ZM-T)</b>  | .884     | .862     | –        |
|                      | <b># stretched attend postures (ZM-SAP)</b>        | .388     | .274     | .526     |
|                      | <b># defecation boluses (ZM-D)</b>                 | –.247    | –        | –.900    |
|                      | <i>Explained variance</i>                          | 49.79%   | 47.78%   | 20.19%   |

The variables to be chosen to enter in the next factor analyses (see selection criteria in Section 2.3) are highlighted in bold print. Only factors with eigenvalues >1 are extracted.

dent, so that females appear to be generally less anxious/fearful than males.

Correlation coefficients among the most relevant variables for males and females are shown in Table 2A and B. Assuming that fearful rats should show relatively higher latencies to entry into open illuminated spaces/sections and should spent less time in these, we could expect relevant negative within- and between-test correlations among these variables. Just as an example, the within-test correlations between latency to entry into the open spaces/sectors of the BWB and ZM tests and the time spent in these sections are  $r \leq -.57$  (Table 2A and B), which are meaningful and in the expected direction but not too high (although they raise to values  $\leq -.78$  between the “latencies to entry” and the “number of entries”; Table 2A and B). Still lower are the correlations between the same variable across both tests (e.g.  $r \leq .34$  for the “time spent in the white compartment/open sections” between BWB and ZM tests in males; Table 2A) or between measures of unconditioned and conditioned tests (e.g. in males, the number of entries into the open sections in the ZM test show a correlation of .13 with “total avoidances” – SHAV – in the shuttle box session; Table 2A).

As said in Section 2.3, target variables to be included in the following factorial analyses were selected either according to theoretical/empirical criteria (“novel-cage activity” test, acoustic startle response and two-way active avoidance tasks) based on previous works, or after applying orthogonally rotated (Varimax) factor analysis on the BWB and ZM tests (Table 3). After such a selection process 12 variables were chosen as the most relevant ones representing the different behavioral procedures.

Obliquely rotated factor analyses (direct oblimin) were then applied to those 12 target variables (Tables 4 and 5). By doing so we obtained a fourfold structure for the male sample (Table 4A), while a fivefold factor structure emerged with female data (Table 5A). In any case, these factors represented better the pattern seen in the correlation matrix than any theoretically meaningful construct of fearfulness. In the case of the male sample (Table 4), Factor 1 mainly concerns typical measures of anxiety in the BWB and ZM tests, with relevant

weights of defecation (ZM) and “novel-cage” activity; Factor 2 reflects unconditioned and conditioned startle measures; Factor 3, two-way shuttle box avoidance measures; and Factor 4, stretched-attend (risk assessment) postures in the BWB and ZM tests.

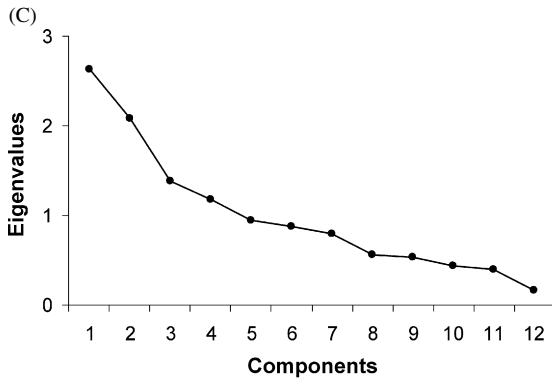
The same factor analysis applied to the female sample (Table 5A) yielded a solution in which the only relevant difference (with respect to that of males) was the appearance of a fourth factor with high loadings for defecation (Table 5A).

After applying the Catell’s scree test to search for simpler and more meaningful factorial structures which could go a step further from those “test-related” solutions [2,3], we obtained a two-factor solution for males (see Table 4C for the Catell’s scree test, and Table 4D), with Factor 1 grouping most of the variables from the unconditioned anxiety tests and (to a much lesser extent, only loadings of .25) shuttle box avoidance measures (provisionally called “Timidity” factor), while Factor 2 representing acoustic startle and shuttle box behavior (provisionally called “Defensive Flight” factor) (Fig. 1). A bit more complex was the output for the female sample, as the Catell’s scree test (see Table 5C) indicated that a three-factor solution should be obtained first. This solution showed that Factor 1 grouped all the activity-related variables from the unconditioned tests (with loadings ranging .47–.74 for variables of these three tests), Factor 2 mainly reflected the three phases of startle testing (loadings of .32–.86), and Factor 3 concerned two-way shuttle box avoidance (loadings of –.85 and .88) and fear-potentiated startle (loading of .41 for FPS). When forcing this into a two-factor solution (to have a better comparison with males) it can essentially be observed (Table 5D) that Factor 2 and Factor 3 of the previous three-factor solution are collapsed and form the second factor (Factor 2) of this two-factor solution (Table 5D). Its structure indicates a first factor (Factor 1: “Timidity”) with variables from the unconditioned activity-related anxiety tests (BWB, ACT and ZM), and a second factor (Factor 2: “Defensive Flight”) with loadings from the different phases of the startle response test and two-way shuttle box avoidance. Hence, the main sex-related difference among these factor solutions is

Table 4  
Four-factor solution, Catell's scree test, two-factor solution and correlations between factors for the male sample

|  | Factor 1 | Factor 2 | Factor 3 | Factor 4 |
|--|----------|----------|----------|----------|
| <b>(A)</b>                                     |          |          |          |          |
| Black–white box                                |          |          |          |          |
| # white compartment entries                    | .702     | –        | –        | .277     |
| # stretched attend postures                    | –        | –        | –        | .824     |
| “Automated novel-cage activity” test           |          |          |          |          |
| Distance, minutes 0–5 (cm)                     | .749     | –        | –        | .348     |
| Distance, minutes 26–30 (cm)                   | .439     | –        | –        | .459     |
| Elevated “zero-maze”                           |          |          |          |          |
| Time spent in the open sections (s)            | .765     | –        | –        | –        |
| # stretched attend postures                    | –        | –        | –        | .856     |
| # defecation boluses                           | –.414    | –        | –        | –        |
| Acoustic startle response                      |          |          |          |          |
| Baseline acoustic startle response (session 1) | –        | .917     | –        | –        |
| Baseline acoustic startle response (session 2) | –        | .900     | –        | –        |
| Fear-potentiated startle response              | –        | .510     | –        | –        |
| Two-way shuttle box avoidance conditioning     |          |          |          |          |
| Mean response latency                          | –        | –        | .871     | –        |
| # intertrial crossings                         | –        | –        | –.877    | –        |
| Factor   | 1        | 2        | 3        | 4        |

|            |       |       |       |   |
|------------|-------|-------|-------|---|
| <b>(B)</b> |       |       |       |   |
| 1          | 1     |       |       |   |
| 2          | –.072 | 1     |       |   |
| 3          | –.058 | –.062 | 1     |   |
| 4          | .186  | .056  | –.103 | 1 |



|  | Factor 1 | Factor 2 |
|--|----------|----------|
| <b>(D)</b>                                     |          |          |
| Black–white box                                |          |          |
| # white compartment entries                    | .645     | –        |
| # stretched attend postures                    | .618     | –        |
| “Automated novel-cage activity” test           |          |          |
| Distance, minutes 0–5 (cm)                     | .714     | –        |
| Distance, minutes 26–30 (cm)                   | .570     | –        |
| Elevated “zero-maze”                           |          |          |
| Time spent in the open sections (s)            | .625     | –        |
| # stretched attend postures                    | .624     | –        |
| # defecation boluses                           | –        | –        |
| Acoustic startle response                      |          |          |
| Baseline acoustic startle response (session 1) | –        | .875     |
| Baseline acoustic startle response (session 2) | –        | .860     |
| Fear-potentiated startle response              | –        | .355     |

Table 4 (Continued)

|  | Factor 1 | Factor 2 |
|--|----------|----------|
| Two-way shuttle box avoidance conditioning |          |          |
| Mean response latency                      | -.25     | -.442    |
| # intertrial crossings                     | .252     | .512     |
| Factor                                     | 1        | 2        |
| (E)  |          |          |
| 1  | 1        |          |
| 2  | .017     | 1        |

Values  $\geq 0.25$  are shown. (A) Oblique four-factor solution (direct oblimin) with the 12 selected variables (factors with eigenvalues greater than one) and correlation among factors (B). (C) Cattell's scree test of the unrotated solution with 12 variables. The first two factors accounted for a total of 39% of the variance (11% and 10% for the third and fourth factors, respectively), thus allowing a two-factor solution (direct oblimin) (D). (E) Correlation between factors.

that, in females, measures of two-way active avoidance acquisition only appear to be related (or associated) to acoustic startle measures, while in males the loadings of two-way avoidance parameters are distributed in both factors (although they preferentially load in the 2nd one).

More specific correlation coefficients (Table 6A) and multiple regression analysis (including as dependent variables the averaged shuttle box response latency – 10-trial blocks – and all the remaining test measures as independent variables; Table 6B) were performed, separated by sex, in order to study the predictive value of startle measures and unconditioned test variables on two-way active avoidance acquisition in its different phases (i.e. different trial blocks). As can be observed in Table 6A and B, fear-potentiated startle (FPS) is the most prominent variable showing negative associations with shuttle box response latencies (11–20, 21–30 and 31–40 trial blocks) in females, i.e. the higher the FPS values the shorter the response latencies in these trial blocks ( $r \geq -.15$   $p \leq .01$  in all cases; Table 6A), while step-wise regression analysis shows that the predominant variable with predictive value over shuttle box response latencies in males is “stretched attend postures” (risk assessment) in the BWB test (Table 6B).

#### 4. Discussion

The present is the first report to date of an extensive behavioral evaluation of N/Nih-HS rats in a battery of anxiety/fearfulness behavioral tests. The observed sex-linked differences in fearfulness are mostly in congruence with previous evidence (e.g. [2,3,16,35]), i.e. females being less anxious or fearful than males. The exception to that trend is fear-potentiated startle, in which no sex-related differences appeared. This cannot be considered as an incongruent result, as previous reports with different rat strains have sometimes found either no differences between sexes or even that females appear to be more anxious than males in some conditioned fear tests (e.g. context- and cue-conditioned freezing; conditioned emotional response paradigm, Vogel's lick suppression test; see [3,9,33,35]).

The results of the present study are also consistent with previous multitest studies of fearfulness in rodents (for review see [2,3,49]), as refers to the fact that significant across-tests correlations exist but they are generally of not very high magnitude, and also because factor analysis shows a multidimensional structure of anxiety/fear-related behaviors in our rat sample (see below). Still, despite that pattern of low correlations, it is nevertheless

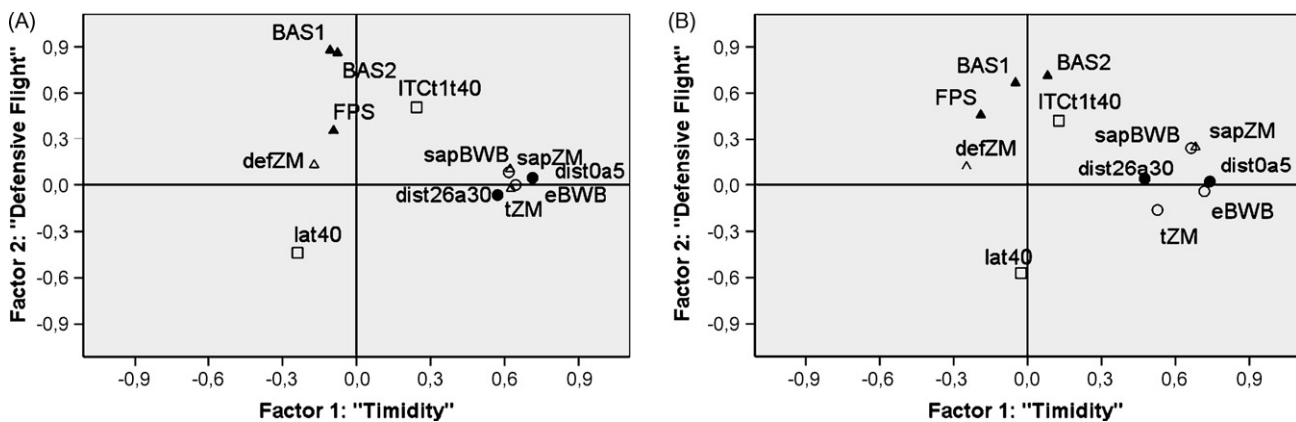
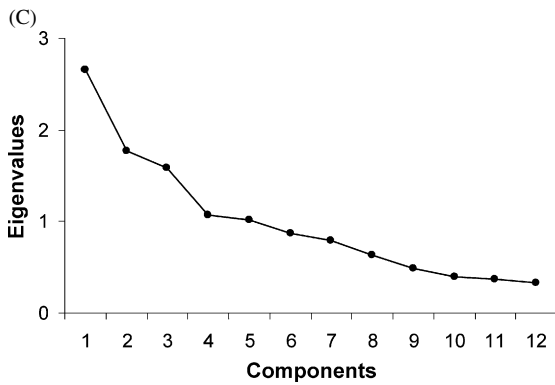


Fig. 1. Oblique two-factor solutions (direct oblimin) with 12 anxiety-related variables from the six behavioral tests for (A) males (accounting for 39% of variance; see Table 4) and (B) females (accounting for 37% of variance; see Table 5). The coordinates of the two axes represent the factor loadings (–1 to 1) of those variables. The symbols represent (see also Section 2): “eBWB” and “sapBWB”, entries into white compartment and stretch-attend postures in the BWB test; “tZM”, time spent into the open sections of the ZM test; “sapZM” and “defZM”, stretch-attend postures and number of defecations in the ZM test; “dist0a5” and “dist26a30”, distance travelled during the first and the last 5-min intervals in the NACT test; “BAS1” and “BAS2”, baseline acoustic startle (i.e. in absence of any conditioned discrete stimulus) in sessions 1 and 2, respectively; “FPS”, fear-potentiated startle; “ITCt1t40”, intertrial crossings made from trial 1 to trial 40 (i.e. the whole 40-trial session) in the shuttle box acquisition session; “lat40”, mean response latency in the 40-trial shuttle box acquisition session.

Table 5  
Five-factor solution, Catell's scree test, two-factor solution and correlations between factors for the female sample

|  | Factor 1 | Factor 2 | Factor 3 | Factor 4 | Factor 5 |
|--|----------|----------|----------|----------|----------|
| <b>(A)</b>                                     |          |          |          |          |          |
| Black–white box                                |          |          |          |          |          |
| # white compartment entries                    | .704     | –        | –        | –        | –.371    |
| # stretched attend postures                    | –        | –        | –        | –        | –.900    |
| “Automated novel-cage activity” test           |          |          |          |          |          |
| Distance, minutes 0–5 (cm)                     | .732     | –        | –        | –        | –.424    |
| Distance, minutes 26–30 (cm)                   | .637     | –        | –        | –        | –        |
| Elevated “zero-maze”                           |          |          |          |          |          |
| Time spent in the open sections (s)            | .598     | –        | –        | –.497    | –        |
| # stretched attend postures                    | .284     | –        | –        | –        | –.885    |
| # defecation boluses                           | –        | –        | –        | .839     | –        |
| Acoustic startle response                      |          |          |          |          |          |
| Baseline acoustic startle response (session 1) | –        | .881     | –        | –        | –        |
| Baseline acoustic startle response (session 2) | –        | .874     | –        | –        | –.254    |
| Fear-potentiated startle response              | –.337    | .307     | –.416    | –.278    | –        |
| Two-way shuttle box avoidance conditioning     |          |          |          |          |          |
| Mean response latency                          | –        | –        | .872     | –        | –        |
| # intertrial crossings                         | –        | –        | .851     | –        | –        |
| Factor   | 1        | 2        | 3        | 4        | 5        |

|            |       |       |      |      |   |
|------------|-------|-------|------|------|---|
| <b>(B)</b> |       |       |      |      |   |
| 1          | 1     |       |      |      |   |
| 2          | –.066 | 1     |      |      |   |
| 3          | .000  | –.125 | 1    |      |   |
| 4          | –.031 | –.016 | .041 | 1    |   |
| 5          | –.251 | –.143 | .068 | .075 | 1 |



|  | Factor 1 | Factor 2 |
|--|----------|----------|
| <b>(D)</b>                                     |          |          |
| Black–white box                                |          |          |
| # white compartment entries                    | .717     | –        |
| # stretched attend postures                    | .665     | .250     |
| “Automated novel-cage activity” test           |          |          |
| Distance, minutes 0–5 (cm)                     | .740     | –        |
| Distance, minutes 26–30 (cm)                   | .475     | –        |
| Elevated “zero-maze”                           |          |          |
| Time spent in the open sections (s)            | .526     | –        |
| # stretched attend postures                    | .682     | .254     |
| # defecation boluses                           | –.250    | –        |
| Acoustic startle response                      |          |          |
| Baseline acoustic startle response (session 1) | –        | .667     |
| Baseline acoustic startle response (session 2) | –        | .713     |
| Fear-potentiated startle response              | –        | .458     |



Table 5 (Continued)

|  | Factor 1 | Factor 2 |
|--|----------|----------|
| Two-way shuttle box avoidance conditioning |          |          |
| Mean response latency                      | –        | –.570    |
| # intertrial crossings                     | –        | .422     |
| Factor                                     | 1        | 2        |
| (E)  |          |          |
| 1  | 1        |          |
| 2  | .006     | 1        |

Values  $\geq 0.25$  are shown. (A) Oblique five-factor solution (direct oblimin) with the 12 selected variables (factors with eigenvalues greater than one) and correlation among factors (B). (C) Cattell’s scree test of the unrotated solution with 12 variables. The first two factors accounted for a total of 37% of the variance (13%, 9% and 8% for the third, fourth and fifth factors, respectively), thus allowing both a three-factor (see Section 3) and a two-factor solution (direct oblimin). (D) The two-factor solution is represented. (E) Correlation between factors.

outstanding that they actually appear consistent: with the sign that could be expected from the hypothesis that some of these different measures of fearfulness should share some common components (with the exception of correlations between startle and shuttle box parameters; see below).

The results of the present factorial analyses of the 12 selected variables can be summarized as follows: (1) In both sexes, there is a first factor grouping all the fearfulness-related variables from the unconditioned tests (“Timidity” factor) and a second factor in which the main weights are for startle measures (“Defen-

sive Flight” factor). (2) In males, measures of two-way active avoidance acquisition load on both factors (i.e. they appear to be associated to both unconditioned fear – BWB, ACT, and ZM tests – as well as to baseline and fear-potentiated startle) although preferentially in the second one. (3) In females, shuttle box avoidance acquisition is only associated to startle measures (Factor 2). These factorial solutions, and the between-factor correlations (Tables 4E and 5E), show that the arising factors are independent and are also something more than the mere reflex of the tests employed.

Table 6

| Variables   | Mean response latency (s) in the two-way shuttle box avoidance conditioning |   |                  |                  |
|---|---|---|------------------|------------------|
|   | Trials 1–10   | Trials 11–20  | Trials 21–30     | Trials 31–40     |
| (A)   |   |   |                  |                  |
| Baseline acoustic startle response (session 1) (mV) | –.105*<br>–.024   | –.080<br>–.067  | –.099<br>–.043   | –.089<br>–.053   |
| Baseline acoustic startle response (session 2) (mV) | –.082<br>–.024  | –.076<br>–.067  | –.102*<br>–.043  | –.105*<br>–.053  |
| Fear-potentiated startle response                   | .088<br>–.020   | .005<br>–.152**   | –.035<br>–.172** | –.023<br>–.175** |
| Dependent variable                                  | Step  | Predictor variable                                      | Cumulative R     | p                |
| (B)   |   |   |                  |                  |
| Males   |   |   |                  |                  |
| Mean response latency (s) trials 11–20              | 1   | # Stretched attend postures in the black–white box      | .137             | .010             |
| Mean response latency (s) trials 21–30              | 1   | # Stretched attend postures in the black–white box      | .158             | .003             |
|   | 2   | Baseline acoustic startle response (session 2) (mV)     | .19              | .002             |
| Mean response latency (s) trials 31–40              | 1   | # Stretched attend postures in the black–white box      | .121             | .023             |
|   | 2   | Baseline acoustic startle response (session 2) (mV)     | .167             | .007             |
| Females   |   |   |                  |                  |
| Mean response latency (s) trials 11–20              | 1   | Fear-potentiated startle response                       | .155             | .008             |
|   | 2   | # Stretched attend postures in the elevated “zero-maze” | .198             | .003             |
| Mean response latency (s) trials 21–30              | 1   | Fear-potentiated startle response                       | .195             | .001             |
|   | 2   | # Stretched attend postures in the elevated “zero maze” | .226             | .001             |
| Mean response latency (s) trials 31–40              | 1   | Fear-potentiated startle response                       | .196             | .001             |

(A) Pearson’s correlation among Shuttle box (40-trial session split in four 10-trial blocks) and acoustic startle response variables for males and females (in bold). (B) Stepwise regression models relating Shuttle box avoidance acquisition (dependent variables) to measures from the unconditioned anxiety tests and fear-potentiated startle (predictor variables).

\*  $p \leq .05$ .  
\*\*  $p \leq .01$ .

Comparison with previous factorial studies using a broad range of (learned and unlearned) fear/anxiety measures is difficult provided the differences in the tests (e.g. elevated plus-maze and Pavlovian-conditioned freezing in Aguilar et al. [2,3] vs. elevated “zero”-maze and fear-potentiated startle in the present study) and in the type of subjects used (F2 rat sample derived from the Roman rat strains vs. N/Nih-HS – genetically heterogeneous – rats, respectively). Still, as in Aguilar et al. study [2], shuttle box avoidance acquisition is also associated to unconditioned measures of fearfulness.

Nevertheless, from the aforementioned associations, those observed between startle responses and shuttle box avoidance acquisition are relatively unexpected, especially because they tend to indicate (especially in females) that the higher the startle responses the better the acquisition of shuttle box avoidance. It must be said, however, that whenever in previous studies the relationships of two-way avoidance acquisition with other conditioned fear tests have been evaluated, they have only been assessed with respect to Pavlovian-conditioned freezing, but not with regard to fear-potentiated startle. In this respect, we observed strong negative associations between context and cue-conditioned freezing (measured in contexts different from the shuttle box) and efficiency of two-way active avoidance acquisition [2,3]. In addition, in a different sample of N/Nih-HS rats (of both sexes) we have found that context-conditioned freezing/fear, as observed in the initial five intertrial intervals of the shuttle box session, is negatively correlated ( $r = -.51, p < .001, n = 85$ ; unpublished data) with avoidance performance in a 40-trial shuttle box acquisition session (see also [52]). Hence, it is clear that early context-conditioned freezing, at the beginning of the two-way avoidance task, is negatively related to acquisition efficiency.

Divergences, or even independency, between the neural mechanisms governing both fear-conditioning-related responses is actually supported by the following findings: (1) septohippocampal lesions improve two-way active avoidance, attenuate context-conditioned freezing (for review see [29,37]) and leave fear-potentiated startle unaffected (e.g. [38,44,45]); (2) basolateral and central amygdala lesions or inactivation (by injection of NMDA [*N*-methyl-D-aspartate] antagonists) impair acquisition of two-way shuttle box avoidance and of fear-potentiated startle [53,63,64]. It has been reported that such disruptions of amygdala function impair shuttle box avoidance acquisition by deteriorating the directionality of escape responses and the attentional reactions to the conditioned stimulus (i.e. to the fear cue) [53]. But the treatment does not affect contextual fear as measured by freezing responses to the context during the intertrial intervals of shuttle box training [53].

The above-mentioned evidence does not preclude, however, that when the conditioned fear/freezing involved in the initial “active avoidance/passive avoidance” conflict (of shuttle box avoidance acquisition) begins to fade, in parallel with the establishment of directed and consistent escape responses, then the amygdala-related cue-conditioned startle (i.e. fear-potentiated startle) can play a facilitating role in the animal’s responses to the cue (conditioned stimulus; see also [53]). Therefore, the present evidence suggests that startle responses and acquisition of two-

way active avoidance, especially in its very initial stages, could be (at least partly) under different neural control.

When there is a conflict between response tendencies, as in the initial acquisition of two-way active avoidance, the animals have to switch very quickly between fear-related and anxiety-related behaviors (e.g. fleeing vs. freezing; active avoidance vs. passive avoidance), and the neural mechanisms operating in the resolution of such a conflict seem to preferentially involve control from the septohippocampal system [29,37] and the posterior cingulate, although activation of the amygdala is also needed in such phases in order to keep enough autonomic arousal along the process. According to this view, the cue (fear)-elicited fleeing response (i.e. escape to the opposite compartment of the shuttle box, which appears when the initial conflict begins to be overcome) would rather be controlled by the amygdala (e.g. [10,29,37,53]), and, thus, the positive association between shuttle box active responding and acoustic startle should then become clearer as the two-way avoidance acquisition session advances. As a matter of fact, the pattern of correlations and multiple regression analysis which emerge in the present female sample, provide some support to that contention, as the “fear-potentiated startle” measure presents the highest correlations with shuttle box performance (averaged response latency per trial blocks) in the 21–30 and 31–40 trial blocks ( $r \geq -.17, p < .01$  in both cases) while no significant correlation was observed in the first 10 trials (Table 6A). Congruently, multiple regression of female data showed that fear-potentiated startle, jointly with measures from the ZM test (i.e. stretched-attend postures) in some cases, predict acquisition of two-way active avoidance (average response latency) in the 11–20, 21–30 and 31–40 trial blocks (Table 6B). In males, regression analysis indicates that baseline acoustic startle (BAS-2 session), jointly with stretched-attend behavior (i.e. risk assessment in the BWB test), significantly influence performance during trials 21–30 and 31–40 of the two-way avoidance session (Table 6B).

Such associations, reported for the first time to date, appear to indicate that baseline (males) and fear-potentiated (females) acoustic startle are positively related to acquisition efficiency in the intermediate and final phases of two-way active avoidance acquisition while, not affecting – or being relatively independent of – performance in the very early stages (initial 10 trials) of the task, i.e. during those acquisition phases in which freezing responses are known to predominate, due to context-conditioned fear and conflict, and run against the appearance of active fleeing/escaping responses (e.g. [2,3,13,18,24,28,53]).

Besides the involvement of the above-mentioned septohippocampal and amygdala circuitry in the acquisition of two-way active avoidance and fear-potentiated startle, dopaminergic mesocorticolimbic circuitry (the so-called “motive circuit”) may also have a role in these paradigms (e.g. [54,57]). In this regard, activation of mesocortical dopaminergic transmission appears to have a critical role in the formation of associations for new behavioral strategies (i.e. learning), as suggested by studies of two-way active avoidance in gerbils [57]. Congruently, the systemic administration of the dopaminergic agonist apomorphine, at doses which show anxiolytic-like effects in other behavioral tests, improves two-way active avoidance acquisi-

tion in rats, whereas dopaminergic antagonists impair it (e.g. [50]). Nevertheless, and in keeping with the possible differential neural mechanisms involved in both the two-way avoidance and fear-potentiated startle paradigms, it has been shown that systemic administration of dopamine antagonists or functional manipulations of the nucleus accumbens (a crucial part of the mesocorticolimbic dopaminergic circuit) do not appear to be critically involved in the acquisition of fear-potentiated startle [32,41]. Thus, research on the involvement of the mesocortical dopaminergic circuitry on two-way active avoidance acquisition and fear-potentiated startle appears to give support to the contention that both types of fear-mediated responses are, at least partly, under differential neural control.

Meanwhile, support for a relative independency of biological mechanisms involved in these two types of fear-driven responses (i.e. acoustic startle and two-way avoidance) has also been provided by genetic (QTL) studies. In a previous study with Roman-derived F2 rats [24] we found several QTLs (i.e. quantitative trait loci; chromosomal locus related to complex quantitative traits) for anxiety, from which those on chromosomes 5, 10 and 15 were the most relevant and consistent with possible pleiotropic effects on a variety of unconditioned and conditioned anxiety/fear-related behavioral parameters. The most important QTL was found in chromosome 5, influencing two-way avoidance acquisition, contextual and cue fear (i.e. freezing) conditioning, elevated plus-maze behavior and activity in an open field in a consistent way. This QTL did not show any influence on startle responses. However, a QTL in chromosome 10 showed influence on shuttle box avoidance acquisition as well as on acoustic startle [24]. Moreover, in a QTL fine mapping study with N/Nih-HS rats which is still under way at our laboratories, preliminary results again indicate that chromosomal loci (QTLs) influencing two-way avoidance acquisition do not have influence on unconditioned or conditioned startle responses (yet unpublished results). Thus, genetic studies of quantitative traits (QTL analysis) also suggest that fear-related startle responses could be, at least partly, biologically dissociated from two-way active avoidance acquisition.

Turning again to the general fearful or “defensive” (see [6,7]) profile of the N/Nih-HS rat stock, and provided that this is the first time that a behavioral characterization as the present has been carried out, it may be of interest to consider the data in comparison with usual results obtained in our laboratory with other strains/stocks of rats. Although direct comparisons with other strains were not within the scope of the present study, our long-standing work with the Roman high- (RHA-I) and low-avoidance (RLA-I) strains (psychogenetically selected for rapid vs. extremely poor acquisition of two-way active avoidance, and very divergent in many fear/anxiety-related measures; e.g. [12,15,23,58]) as well as with Sprague–Dawley rats (SD from the local supplier at the Autonomous University of Barcelona), allows us to advance some confident conclusions: (1) N/Nih-HS present levels of context-conditioned freezing, during the initial five trials of the two-way avoidance task, which are close to those observed in RLA-I rats (approximately 250 s in both cases, while RHA-I rats average 90 s approximately; unpublished data). (2) The level of avoidance acquisition of N/Nih-HS rats (six to

seven avoidances on average, in a 40-trial session) is also similar to that of RLA-I rats (<5 avoidances), and considerably lower than the usual scores of RHA-I (average  $\geq 25$  avoidances in 40 trials) or SD rats (usually a range of 10–18 avoidances in 40 trials, according to a number of studies carried out at our laboratory with SD rats; see for instance [4,8,13,17–19,46,47]). (3) In measures of “number of entries into open sections” and “time spent in open sections” of the “elevated ‘zero’ maze” test of anxiety, the N/Nih-HS rats also resemble the scores of RLA-I rats, which, in turn, are more anxious than the RHA-I strain (i.e. RLA-I and N/Nih-HS rats show much lesser entries into open sections and shorter time spent in these sections than the RHA-I strain; Lopez-Aumatell et al., unpublished data); (4) In the acoustic startle paradigm the Roman strains also show extremely divergent scores, with the RLA-I strain displaying clear fear potentiation of startle while RHA-I rats do not show it [36]. Under our laboratory and procedural conditions the N/Nih-HS rats actually display significant fear-potentiated startle, thus qualitatively resembling RLA-I rats in that respect (although the level of startle responses is about half of that found in RLA-I rats; Lopez-Aumatell et al., unpublished observations, and [36]).

Thus, following Blanchards’ conceptualization of rats’ defensive behaviors in semi-natural testing conditions [6,7] and their definition of defensive distance, from a qualitative viewpoint the N/Nih-HS rats can be seen – very much as the RLA-I rat strain – as prone to freeze (rather than to flee, as the RHA-I strain does), when the defensive distance [6,7] is very short and the defensive direction (according to the concept of Gray and McNaughton, see [29,37]) is not clear because the situation involves a conflict between two incompatible goals. The latter is the case of the initial stages of shuttle box avoidance acquisition, which involve anxiety because of the incompatible tendencies to (1) enter a dangerous situation (i.e. fleeing to the opposite compartment, where the rat has already received a shock [active escape or avoidance]) or (2) to remain (i.e. to freeze [passive avoidance]) in the present one, which is also threatening for the animal (as the rat also received shock in that one). Hence, at least at the beginning of the shuttle box avoidance task the “defensive distance” is very short and the “defensive direction” is unclear for the animal (following the above definitions, see [6,7,29,37]), so that N/Nih-HS (as well as RLA-I) rats show a strong tendency to freeze. As the training session advances, a route (and a directed behavior) to escape becomes progressively evident for the rats (i.e. crossing to the opposite compartment of the shuttle box) and escape behavior is established. Moreover, in agreement with Blanchards’ and Gray and McNaughtons’ definitions of anxiety, anxiolytic drugs ameliorate acquisition of shuttle box avoidance (by reducing conditioned freezing) essentially during those initial conflicting trials (i.e. when a directed escape response is still not consistently acquired, as freezing is very prominent), but not in more advanced acquisition phases (e.g. [8,13,17–19,28,29,47]).

The associations observed among stretch-attendance behaviors (from the BWB and ZM tests) and two-way avoidance acquisition are another new finding. Stretch-attendance (i.e. the rat stretches its body toward an open – or otherwise danger-

ous because it has been associated to a threat – section without entering it) is conceptualized as risk assessment behavior and is sensitive to anxiolytic drugs [6,7,51]. It is worth noting, then, that the number of stretch-attend postures in the ZM test show significant associations with “mean response latencies” in several 10-trial blocks of the two-way active avoidance acquisition (see Table 6A and B). Such a relationship is also sex-dependent and, contrary to the aforementioned associations between startle and avoidance acquisition, it is much more marked in males than in females.

In summary, the present study shows the performance of a large population of N/Nih-HS rats of both sexes in unconditioned and conditioned anxiety/fear-related tests. In agreement with previous works it has been found that females are, generally, less fearful than males. According to factor analysis (oblimin), the dimensional structure of the behavioral results reflects the existence of two factors for males, grouping “unlearned fear measures + avoidance conflict” (Factor 1; “Timidity”) and “acoustic startle measures + avoidance conflict” (Factor 2; “Defensive Flight”), respectively. Three factors appear to explain the behavioral profile of females which, when forced into a two-factor solution (for better comparison with males), show that Factor 1 is very similar to that of males but without loadings of avoidance acquisition measures, whereas Factor 2 is composed of startle measures and active avoidance acquisition. Taken together, the different analyses of the results converge in the idea that, after overcoming the initial trials in which conditioned freezing is prominent (i.e. the highest levels of conflict/anxiety are experienced), acquisition of two-way active avoidance in females appears to be mainly influenced by fear-potentiated startle (according to regression analysis), whereas stretch-attendance (risk assessment) behavior is the most important predictor of avoidance acquisition in males (with some contribution of baseline startle responses). Whether such divergences can be explained by differential sex-dependent involvement of specific neural mechanisms participating in fear-related (i.e. amygdala) or in conflict/anxiety-related (i.e. septo-hippocampal system) processes remains to be elucidated. Genetic (QTL) studies, currently under way in N/Nih-HS rats, could be another useful approach to bring some light on the possible sex-related divergences in the biological mechanisms governing – or influencing – conditioned and unconditioned anxiety (as an example see [61,62]).

Taking into account that N/Nih-HS rats are likely the most genetically heterogeneous in existence (Flint, unpublished data), the present data can serve as a potential reference for future studies with the same as well as with other rat stocks. It would undoubtedly be scientifically relevant, for instance, to evaluate the defensive profile of N/Nih-HS rats in more ethological conditions, as the Blanchards’ VBS and its derivations [6,7,51]. By doing so, and by comparing them with other laboratory rat strains/stocks, it could be possible to ascertain whether the fearful profiles of the heterogeneous rat stock generalize to those semi-natural (or otherwise more ethological) situations as well as to learn about the relative position of the different stock-related defensive profiles within the existing constellation of laboratory rat strains.

## Acknowledgements

Supported by grants from the “Ministerio de Ciencia y Tecnología” (SAF2003-03480), DGR (2005SGR-00885), FPI program (R.L.-A) and through EURATools (European Commission Contract no. LSHG-CT-2005-019015).

The authors thank Toni Cañete and Gloria Blázquez for their continuous assistance.

## References

- [1] Aguilar R, Gil L, Tobeña A, Escorihuela RM, Fernandez-Teruel A. Differential effects of cohort removal stress on the acoustic startle response of the Roman/Verh rat strains. *Behav Genet* 2000;30:71–5.
- [2] Aguilar R, Gil L, Flint J, Gray JA, Dawson GR, Driscoll P, et al. Learned fear, emotional reactivity and fear of heights: a factor analytic map from a large F2 intercross of Roman rat strains. *Brain Res Bull* 2002;57:17–26.
- [3] Aguilar R, Gil L, Gray JA, Driscoll P, Flint J, Dawson GR, et al. Fearfulness and sex in F2 Roman rats: males display more fear though both sexes share the same fearfulness traits. *Physiol Behav* 2003;78:723–32.
- [4] Aguilar R, Gil L, Fernandez-Teruel A, Tobeña A. Genetically-based behavioral traits influence the effects of shuttle box avoidance overtraining and extinction upon intertrial responding: a study with the Roman rat strains. *Behav Process* 2004;66:63–72.
- [5] Belzung C, Le Pape G. Comparison of different behavioral test situations used in psychopharmacology for measurement of anxiety. *Physiol Behav* 1994;56:623–8.
- [6] Blanchard RJ, Blanchard DC, Rodgers J, Weiss SM. The characterization and modeling of antipredator defensive behavior. *Neurosci Biobehav Rev* 1990;14:463–72.
- [7] Blanchard RJ, Yudko EB, Rodgers J, Blanchard DC. Defense system psychopharmacology: an ethological approach to the pharmacology of fear and anxiety. *Behav Brain Res* 1993;58:155–65.
- [8] Boix F, Fernandez-Teruel A, Tobeña A. The anxiolytic action of benzodiazepines is not present in handling-habituated rats. *Pharmacol Biochem Behav* 1988;31:541–6.
- [9] Brush FR, Del Paine SL, Pellegrino LJ, Rykaszewski IM, Dess NK, Collins P. CER suppression, passive-avoidance learning, and stress-suppression of drinking in the Syracuse high- and low-avoidance strains of rats (*Rattus norvegicus*). *J Comp Psychol* 1988;102:337–9.
- [10] Davis M, Falls WA, Campeau S, Kim M. Fear-potentiated startle: a neural and pharmacological analysis. *Behav Brain Res* 1993;58:175–98.
- [11] Draski LJ, Spuhler KP, Erwin VG, Baker RC, Deitrich RA. Selective breeding of rats differing in sensitivity to the effects of acute ethanol administration. *Alcohol Clin Exp Res* 1992;16:48–54.
- [12] Driscoll P, Escorihuela RM, Fernandez-Teruel A, Giorgi O, Schwegler H, Steimer T, et al. Genetic selection and differential stress responses. The Roman lines/strains of rats. *Ann NY Acad Sci* 1998;851:501–10.
- [13] Escorihuela RM, Fernandez-Teruel A, Zapata A, Nuñez JF, Tobeña A. Flumazenil prevents the anxiolytic effects diazepam, alprazolam and adiazolam on the early acquisition of two-way active avoidance. *Pharmacol Res* 1993;28:53–8.
- [14] Escorihuela RM, Fernandez-Teruel A, Tobeña A, Langhans W, Bättig K, Driscoll P. Labyrinth exploration. Emotional reactivity, and conditioned fear in young Roman/Verh inbred rats. *Behav Genet* 1997;27:573–8.
- [15] Escorihuela RM, Fernandez-Teruel A, Gil L, Aguilar R, Tobeña A, Driscoll P. Inbred Roman high- and low-avoidance rats: differences in anxiety, novelty seeking and shuttle box behaviors. *Physiol Behav* 1999;67:19–26.
- [16] Fernandes C, Gonzalez MI, Wilson C, File SE. Factor analysis shows that female rat behavior is characterized primarily by activity, male rats are driven by sex and anxiety. *Pharmacol Biochem Behav* 1999;64:731–8.
- [17] Fernandez-Teruel A, Escorihuela RM, Boix F, Tobeña A. Effects of different handling-stimulation procedures and benzodiazepines on two-way active avoidance acquisition in rats. *Pharmacol Res* 1991;24:273–82.

- [18] Fernandez-Teruel A, Escorihuela RM, Nuñez JF, Zapata A, Boix F, Salazar W, et al. The early acquisition of two-way (shuttle-box) avoidance as an anxiety-mediated behaviour: psychopharmacological validation. *Brain Res Bull* 1991;26:173–6.
- [19] Fernandez-Teruel A, Escorihuela RM, Tobeña A, Driscoll P. Stress and putative endogenous ligands for benzodiazepine receptors: the importance of characteristics of the aversive situation and of differential emotionality in experimental animals. *Experientia* 1991;47:1051–6.
- [20] Fernandez-Teruel A, Escorihuela RM, Driscoll P, Tobeña A, Bättig K. Infantile (handling) stimulation and behavior in young Roman high- and low-avoidance rats. *Physiol Behav* 1991;50:563–5.
- [21] Fernandez-Teruel A, Escorihuela RM, Driscoll P, Tobeña A, Bättig K. Differential effects of early stimulation and/or perinatal flumazenil treatment in young low- and high-avoidance rats. *Psychopharmacology* 1992;108:170–6.
- [22] Fernandez-Teruel A, Escorihuela RM, Nuñez JF, Goma M, Driscoll P, Tobeña A. Early stimulation effects on novelty-induced behaviour in two psychogenetically-selected rat lines with divergent emotionality profiles. *Neurosci Lett* 1992;137:185–8.
- [23] Fernandez-Teruel A, Escorihuela RM, Castellano B, Gonzalez B, Tobeña A. Neonatal handling and environmental enrichment effects on emotionality, novelty/reward seeking, and age-related cognitive and hippocampal impairments: focus on the Roman rat lines. *Behav Genet* 1997;6:513–26.
- [24] Fernandez-Teruel A, Escorihuela RM, Gray JA, Aguilar R, Gil L, Gimenez-Llort L, et al. A quantitative trait locus influencing anxiety in the laboratory rat. *Genome Res* 2002;12:618–26.
- [25] Ferré P, Fernandez-Teruel A, Escorihuela RM, Driscoll P, Corda MG, Giorgi O, et al. Behavior of the Roman/Verh high- and low-avoidance rat lines in anxiety tests: relationship with defecation and self-grooming. *Physiol Behav* 1995;58:1209–13.
- [26] Flaherty CF, Greenwood A, Martin J, Leszczuk M. Relationship of negative contrast to animal models of fear and anxiety. *Anim Learn Behav* 1998;26:397–407.
- [27] Flint J. The genetic basis of neuroticism. *Neurosci Biobehav Rev* 2004;28:307–16.
- [28] Gray JA. *The neuropsychology of anxiety: an enquiry into the functions of the septo-hippocampal system*. Oxford: Oxford University Press; 1982.
- [29] Gray JA, McNaughton N. *The neuropsychology of anxiety: an enquiry into the functions of the septo-hippocampal system*. 2nd ed. Oxford: Oxford University Press; 2000.
- [30] Griebel G, Blanchard C, Blanchard R. Evidence that behaviors in the mouse defense test battery relate to different emotional states: a factor analytic study. *Physiol Behav* 1996;60:1255–60.
- [31] Hansen C, Spuhler K. Development of the National Institutes of Health genetically heterogeneous stock. *Alcohol Clin Exp Res* 1984;8:477–9.
- [32] Josselyn SA, Falls WA, Gewirtz JC, Pistell P, Davis M. The nucleus accumbens is not critically involved in mediating the effects of a safety signal on behavior. *Neuropsychopharmacology* 2005;30:17–26.
- [33] Johnston AL, File SE. Sex differences in animal tests of anxiety. *Physiol Behav* 1991;49:245–50.
- [34] Koch LG, Britton SL. Artificial selection for intrinsic aerobic endurance running capacity in rats. *Physiol Genom* 2001;5:45–52.
- [35] Lehmann J, Pryce CR, Feldon J. Sex differences in the acoustic startle response and prepulse inhibition in Wistar rats. *Behav Brain Res* 1999;104:113–7.
- [36] Lopez-Aumatell R, Blazquez G, Gimenez-Llort L, Gil L, Aguilar R, Tobeña A, et al. Differences in classical fear conditioning and fear-potentiated startle between the Roman rat strains. In: Presented at the proceedings of the 11th EBPS meeting. Barcelona: September; 2005.
- [37] McNaughton N, Gray JA. Anxiolytic action on the behavioural inhibition system implies multiple types of arousal contribute to anxiety. *J Affect Dis* 2000;61:161–76.
- [38] McNish KA, Gewirtz JC, Davis M. Evidence of contextual fear after lesions of the hippocampus: a disruption of freezing but not fear-potentiated startle. *J Neurosci* 1997;17:9353–60.
- [39] Mott R, Flint J. Simultaneous detection and fine mapping of quantitative trait loci using heterogeneous stocks. *Genetics* 2002;160:1609–18.
- [40] Mott R, Talbot CJ, Turri MG, Collins AC, Flint J. A method for fine mapping quantitative trait loci in outbred animal stocks. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:12649–54.
- [41] Oliveira AR, Reimer AE, Brandao ML. Dopamine D2 receptor mechanisms in the expression of conditioned fear. *Pharmacol Biochem Behav* 2006;84:102–11.
- [42] Overstreet DH, Rezvani AH, Pucilowski O, Gause L, Janowsky DS. Rapid selection for serotonin-1A sensitivity in rats. *Psychiatr Genet* 1994;4:57–62.
- [43] Pähkla R, Kask A, Rägo L. Differential effects of beta-carbolines and antidepressants on rat exploratory activity in the elevated zero-maze. *Pharmacol Biochem Behav* 2000;65:737–42.
- [44] Phillips RG, LeDoux JE. Differential contribution of amygdala and hippocampus to cued and contextual fear conditioning. *Behav Neurosci* 1992;106:274–85.
- [45] Phillips RG, LeDoux JE. Lesions of the dorsal hippocampal formation interfere with background but no foreground contextual fear conditioning. *Learn Mem* 1994;1:34–44.
- [46] Prunell M, Escorihuela RM, Fernandez-Teruel A, Nuñez JF, Tobeña A. Differential interactions between ethanol and Ro 15–4513 on two anxiety tests in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 1994;47:147–51.
- [47] Prunell M, Escorihuela RM, Fernandez-Teruel A, Nuñez JF, Tobeña A. Anxiolytic profiles of alprazolam and ethanol in the elevated plus-maze test and the early acquisition of shuttlebox avoidance. *Pharmacol Res* 1994;29:37–45.
- [48] Ramos A, Mellerin Y, Mormede P, Chauloff F. A genetic and multifactorial analysis of anxiety-related behaviours in Lewis and SHR intercrosses. *Behav Brain Res* 1998;96:195–205.
- [49] Ramos A, Mormede P. Stress and emotionality: a multidimensional and genetic approach. *Neurosci Biobehav Rev* 1998;22:33–57.
- [50] Reis FLV, Masson S, Oliveira AR, Brandao ML. Dopaminergic mechanisms in the conditioned and unconditioned fear as assessed by the two-way avoidance and switch-off tests. *Pharmacol Biochem Behav* 2004;79:359–65.
- [51] Ribeiro-Barbosa ER, Canteras NS, Cezario AF, Blanchard RJ, Blanchard DC. An alternative experimental procedure for studying predator-related defensive responses. *Neurosci Biobehav Rev* 2006;29:1255–63.
- [52] Savonenko A, Filipkowski RK, Werka T, Zielinski K, Kaczmarek L. Defensive conditioning-related functional heterogeneity among nuclei of the rat amygdala revealed by c-Fos mapping. *Neuroscience* 1999;94:723–33.
- [53] Savonenko A, Werka T, Nikolaev E, Zielinski K, Kaczmarek L. Complex effects of NMDA receptor antagonist AVP in the basolateral amygdala on acquisition of two-way avoidance reaction and long-term fear memory. *Learn Mem* 2003;10:293–303.
- [54] Schultz W. Getting formal with dopamine and reward. *Neuron* 2002;36:241–63.
- [55] Shepherd JK, Grewal SS, Fletcher A, Bill DJ, Dourish CT. Behavioural and pharmacological characterisation of the elevated “zero-maze” as an animal model of anxiety. *Psychopharmacology* 1994;116:56–64.
- [56] Spuhler K, Deitrich RA. Correlative analysis of ethanol-related phenotypes in rat inbred strains. *Alcohol Clin Exp Res* 1984;8:480–4.
- [57] Stark H, Rothe T, Wagner T, Scheich H. Learning a new behavioral strategy in the shuttle-box increases prefrontal dopamine. *Neuroscience* 2004;126:21–9.
- [58] Steimer T, Driscoll P. Divergent stress responses and coping styles in psychogenetically selected Roman high-(RHA) and low-(RLA) avoidance rats: behavioural, neuroendocrine and developmental aspects. *Stress* 2003;6:87–100.
- [59] Schwegler H, Pilz PKD, Koch M, Fendt M, Linke R, Driscoll P. The acoustic startle response in inbred Roman high- and low-avoidance rats. *Behav Genet* 1997;27:579–82.
- [60] Troxell ML, Loyal Britton S, Koch LG. Genetic models in applied physiology: selected contribution: variation and heritability for the adaptational response to exercise in genetically heterogeneous rats. *J Appl Physiol* 2003;94:1674–81.

- [61] Valdar W, Solberg LC, Gauguier D, Burnett S, Klenerman P, Cookson WO, et al. Genome-wide genetic association of complex traits in heterogeneous stock mice. *Nat Genet* 2006;38:879–87.
- [62] Valdar W, Solberg LC, Gauguier D, Cookson WO, Rawlins JNP, Mott R, et al. Genetic and environmental effects on complex traits in mice. *Genetics* 2006;174:959–84.
- [63] Werka T. The effects of the medial and cortical amygdala lesions on post-stress analgesia in rats. *Behav Brain Res* 1997;86:59–65.
- [64] Werka T, Zielinski K. CS modality transfer of two-way avoidance in rats with central and basolateral amygdala lesions. *Behav Brain Res* 1998;93:11–24.
- [65] Yalcin B, Willis-Owen SA, Fullerton J, Meesaq A, Deacon RM, Rawlins JN, et al. Genetic dissection of a behavioral quantitative trait locus shows that *Rgs2* modulates anxiety. *Nat Genet* 2004;36:1197–202.

## **Article III**

## **ANSIEDAD EN RATAS GENETICAMENTE HETEROGENEAS: HACIA LA IDENTIFICACIÓN DE GENES PARA CARACTERES CONDUCTUALES CUANTITATIVOS**

**Regina López-Aumatell, Elia Vicens-Costa, Marc Guitart-Masip, Esther Martínez-Membrives, William Valdar \*, Martina Johannesson \*, Toni Cañete, Gloria Blázquez, Lydia Giménez-Llort, Jonathan Flint \*, Adolf Tobeña, Alberto Fernández-Teruel.**

Unidad de Psicología Médica, Dep. Psiquiatría y Medicina Legal, Instituto de Neurociencias, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Barcelona, 08193-Bellaterra, Barcelona, España.

\* Welcome Trust Centre for Human Genetics, University of Oxford, Oxford Roosevelt Drive, Oxford OX3 7BN, UK.

**Correspondencia:** Alberto Fernández-Teruel. E-mail: albert.Fernández.teruel@uab.es

### **RESUMEN**

Estudios recientes han mostrado que el uso de ratones genéticamente heterogéneos constituye una estrategia única para la identificación y el “mapeo fino” a alta resolución de locus genéticos (“*Quantitative Trait Loci*”, o QTL) con influencia significativa sobre diferentes caracteres (fenotipos) cuantitativos biológicos y conductuales (ej. fenotipos relacionados con la ansiedad, el miedo, procesos cardiovasculares, procesos inmunológicos, diabetes, obesidad, etc.), hasta el punto de hacer posible la identificación de genes individuales con acción sobre dichos caracteres (los llamados genes cuantitativos). Hasta hoy no se ha llevado a cabo ningún estudio de este tipo con ratas genéticamente heterogéneas. Así, en el contexto de un estudio genético más amplio, evaluamos diversos comportamientos de ansiedad y miedo en ratas genéticamente heterogéneas (N/Nih-HS; derivadas de ocho cepas de ratas consanguíneas) en varias pruebas conductuales de laboratorio que miden ansiedad/miedo no aprendidos (la “Caja blanca/negra” –CBN-, el “Laberinto en ‘cero’ elevado” -LC-) o aprendidos (la conducta de petrificación –*freezing*- en un contexto condicionado, la adquisición de la evitación activa en dos sentidos en la caja de vaivén –*shuttle box*-). La comparación de los perfiles del comportamiento de las ratas N/Nih-HS con los de las cepas consanguíneas de ratas Romanas (RHA-I, poco ansiosas; RLA-I, muy ansiosas) muestra que los valores de las ratas N/Nih-HS en diversas variables (en especial las condicionadas) son más cercanos a los de la cepa relativamente ansiosa, la RLA-I, que a los de las ratas RHA-I (relativamente poco ansiosas). Se hallaron correlaciones significativas entre variables incondicionadas de ansiedad y variables de la adquisición de la evitación activa en dos sentidos, confirmadas parcialmente por análisis de regresión múltiple. Finalmente, la comparación de las ratas N/Nih-HS relativamente “evitadoras” con las poco evitadoras indican que aquellas que muestran buena capacidad de solucionar el conflicto (mediado por ansiedad) en la caja de la vaivén (es decir, las que muestran un número relativamente alto de evitaciones) también exhiben bajos niveles relativos de ansiedad no aprendida. Los resultados de esta evaluación del comportamiento de las ratas heterogéneas N/Nih-HS son discutidos en términos de su potencial utilidad para la investigación neurogenética de la ansiedad y el miedo.

### **ABSTRACT**

Recent studies have shown that genetically heterogeneous (outbred) mice are an unique resource for the identification and fine mapping of genetic locus (i.e. Quantitative Trait Loci, QTL) influencing many different biological, disease-related and behavioral (e.g. anxiety-related) quantitative phenotypes or traits. The use of such heterogeneous stocks allows genetic mapping to a level of resolution that permits (quantitative) gene identification. No such study has been done thus far with genetically heterogeneous rats. Thus, within the context of a wider genetic study, in the present work we evaluated anxiety-related behaviors across various tests in a large sample (n=143) of genetically heterogeneous (N/Nih-HS) rats, derived from an eight-way cross of inbred strains. These tests either evoke unlearned (Black/White box, elevated “zero” maze) or learned (context conditioned freezing, two-way active -shuttle box- avoidance acquisition) anxious/fearful responses. Comparison of the behavioral profiles of N/Nih-HS rats with those of high anxious (RLA-I) and low anxious (RHA-I) inbred rat strains shows that N/Nih-HS rats tend to be closer to the high anxious strain. Significant correlations were found among variables from the unconditioned anxiety tests and acquisition of two-way active avoidance, which were partially confirmed by multiple regression analyses. Finally, comparison of relatively high-avoider N/Nih-HS rats with low-



avoider animals indicates that heterogeneous (N/Nih-HS) rats which show good ability to solve the anxiety-mediated “passive avoidance-active avoidance” conflict in the shuttle box (i.e. rats showing relatively high number of avoidances) also display lower anxiety levels in several other (unlearned or learned) behavioral measures. The results of this behavioral evaluation of N/Nih-HS rats are discussed in terms of their potential usefulness for present and future neurobehavioural and genetic studies of fearfulness/anxiety.

## 1. INTRODUCCIÓN

El uso de cepas consanguíneas (“*Inbred*”) de roedores (ratas y ratones) de laboratorio en las últimas tres décadas ha promovido un muy importante progreso en la investigación neurocientífica y en la neurogenética en particular. Sin embargo, la utilización de cepas no consanguíneas (“*outbred*”; o, genéticamente heterogéneas) ha contribuido y continúa contribuyendo enormemente a nuestro conocimiento sobre los mecanismos subyacentes a los rasgos y procesos psicobiológicos. A este respecto, una de las evidencias más importantes de la utilidad de los animales de laboratorio genéticamente heterogéneos en la investigación neurogenética viene dada por la demostración de que dichos stocks de roedores constituyen un recurso único para el “mapeo” fino y de alta resolución de “locus cromosómicos cuantitativos” (QTLs, “*Quantitative Trait Loci*”) que influyen en caracteres conductuales o biológicos complejos (y continuos). Así, en ratones genéticamente heterogéneos (llamados “HS”, procedentes del cruce de 8 cepas consanguíneas, y tras más de 50 generaciones de cruce), se ha conseguido el mapeo genético fino de diversos caracteres biológicos y conductuales cuantitativos, identificando gran cantidad de QTLs con influencia sobre dichos fenotipos y a intervalos cromosómicos de 1 centimorgan o menos. Cada uno de los diferentes QTLs suele explicar el 5% o menos de la varianza del rasgo fenotípico (ej. Mott y cols 2002; Mott y cols 2000; Valdar y cols 2006a), pero los reducidos intervalos cromosómicos (de ahí el nombre de “mapeo fino” o “*fine mapping*”) en los que se “mapean” permiten la identificación de genes (llamados “genes cuantitativos” o “*QTL genes*”) con influencia significativa sobre esos caracteres cuantitativos (ej. Yalcin y cols. 2004), así como el análisis de las interacciones epistáticas (entre genes, o entre locus genéticos –QTLs-) y las interacciones “locus genéticos X ambiente” (Valdar *et al.* 2006b).

Los trabajos mencionados arriba, realizados con ratones HS, son los mejores ejemplos recientes de cómo y en qué medida el uso de roedores genéticamente heterogéneos se ha convertido en crucial para los estudios sobre los mecanismos genéticos de fenotipos cuantitativos complejos.

La ansiedad es uno de tales rasgos/fenotipos complejos, y uno de los que ha despertado un gran

interés científico en las últimas décadas. La susceptibilidad a la ansiedad, al estrés y a los trastornos relacionados con ellos suponen un problema sanitario creciente (y con manifestaciones muy diversas) que, a pesar del intenso esfuerzo en su estudio desde diferentes perspectivas –psicológica, psicopatológica, neurobiológica- tanto en animales como en humanos, aún se resisten a la “disección” definitiva de sus mecanismos genéticos (p. ej. Cano Vindel *et al.* 2007; Eysenck y Eysenck 2007; Fernández-Teruel *et al.* 2002; Fullerton *et al.* 2003; González Ramírez y Landero Hernández 2006; Leza 2005; Scherrer *et al.* 2000; ver Willis-Owen y Flint 2007 para revisión). En este sentido, la posibilidad de llevar a cabo estudios genéticos (y con alta resolución) de rasgos cuantitativos relacionados con la temerosidad (emotividad, ansiedad) en ratas genéticamente heterogéneas puede dar lugar a avances muy significativos respecto a la identificación de locus (o QTLs), genes y/o procesos moleculares/fisiológicos (dependientes de dichos genes) reguladores de la ansiedad (ver p.ej. Flint 2004; Willis-Owen y Flint 2007, y referencias).

Hansen y Spuhler (1984) desarrollaron un stock de ratas genéticamente heterogéneas (las ratas N/Nih-HS a partir de ahora; o “*National Institutes of Health Genetically Heterogeneous Stock*”), a través de un cruce de ocho cepas de ratas consanguíneas, tan separadas genéticamente como fue posible en ese momento (en función del conocimiento disponible sobre los ancestros de dichas cepas). Las ocho cepas parentales eran: la MR/N, la WN/N y la WKY/N (estas tres cepas remontan su ascendencia a la cepa Wistar original); la M520/N y la F344/N (ambas establecidas en los años 20, pero de origen desconocido); la ACI/N (híbrida entre las cepas “*August*” y “*Copenhagen*”), la BN/SsN (derivada de una mutante del color de un stock de ratas salvajes mantenido en el instituto “Wistar”), y la cepa BUF/N (Hansen y Spuhler 1984).

La caracterización inicial de las ratas N/Nih-HS demostró, a partir del estudio de 16 fenotipos relacionados con el consumo de alcohol y sensibilidad al etanol, que el programa de generación de un stock de ratas genéticamente heterogéneo había sido exitoso, puesto que en casi la totalidad de los rasgos (relacionados con consumo/efectos del etanol) los valores del stock de animales heterogéneo caían aproximadamente

en medio de los valores altos y bajos de las ocho cepas parentales consanguíneas (Hansen y Spulver 1984, Spulver y Deitrich 1984). A partir de las ratas N/Nih-HS se han realizado, desde entonces, varios programas de selección psicogenética exitosos, dando lugar a líneas/cepas de ratas divergentes en base a sus valores extremos en, por ejemplo, sensibilidad al etanol agudo (Draski y otros. 1992), capacidad aeróbica (Koch y Britton 2001) y sensibilidad de los receptores serotoninérgicos 1A centrales (Overstreet y otros. 1994). Sin embargo, las ratas heterogéneas N/Nih-HS no han sido hasta hoy caracterizadas en conductas, aprendidas o no, que reflejen ansiedad o miedo, así como tampoco respecto a otros tipos de fenotipos conductuales.

En el contexto de un amplio estudio sobre las bases genéticas de la ansiedad/temerosidad/miedo (esto es, un estudio de “mapeo” fino de QTLs para la ansiedad/miedo, que se halla en curso en el marco de un proyecto europeo; ver Aitman y cols. 2008), nuestro laboratorio adquirió las ratas heterogéneas N/Nih-HS. El objetivo del proyecto es el “mapeo” fino de QTLs para la ansiedad/miedo/temerosidad en ratas, tomando como base nuestro anterior trabajo (Fernández-Teruel y cols 2002a), en el que por primera vez identificamos varios QTL para diferentes conductas de ansiedad/miedo en animales híbridos (generación F2) de las ratas Romanas de Alta Evitación (RHA-I, poco ansiosas) y Romanas de Baja Evitación (RLA, muy ansiosas) (ver Aguilar y cols 2002, 2003; Fernández-Teruel y cols 2002a). En dicho trabajo (Fernández-Teruel y cols 2002a) se estableció que un QTL (en un intervalo de unos 40 centimorgans; es decir, puede contener aún centenares de genes) en el cromosoma 5 de la rata era el que presentaba una influencia más significativa sobre diversos fenotipos del rasgo de ansiedad en la generación F2 de ratas citada, de tal manera que tanto conductas de ansiedad incondicionada (no aprendida) como de miedo aprendido eran influidas por dicho QTL. Es decir, nos hallamos ante un QTL con efectos pleiotrópicos sobre diversos fenotipos que pueden contribuir a un rasgo complejo [el QTL influye significativamente sobre la conducta de adquisición de la evitación activa en dos sentidos –mediada por la ansiedad, como se sabe (Fernández-Teruel y cols. 1991a)-, de condicionamiento clásico de miedo a un contexto y a un estímulo condicionado, y de exploración del “Campo Abierto” –*Open Field*- y de los brazos abiertos del laberinto en cruz elevado –*Elevated Plus-Maze*-; Fernández-Teruel y cols 2002a). Ello nos llevó a plantearnos, en el presente proyecto, el “mapeo fino” a alta resolución del mencionado QTL del cromosoma 5, con el objetivo de poder fragmentarlo en

intervalos suficientemente reducidos como para que contengan un pequeño número de genes que influyan sobre los fenotipos de ansiedad/miedo que son objetivo del proyecto (de acuerdo con lo hallado en el proyecto anterior; Fernández-Teruel y cols 2002a).

Dado que las ratas heterogéneas N/Nih-HS no han sido caracterizadas por sus perfiles de ansiedad/miedo, y dadas las dificultades para obtener las 8 cepas parentales originales de las que se derivaron las N/Nih-HS (dos de dichas cepas ya no existen, y algunas de las otras no son las originales), nos planteamos compararlas con las mencionadas cepas RHA-I y RLA-I, psicogenéticamente seleccionadas (a partir de ratas Wistar) por su facilidad vs extrema dificultad para la adquisición de la conducta de evitación activa en dos sentidos (ej. Driscoll y Bättig 1982; Driscoll y cols 1998; Escorihuela y cols 1995, 1999; Fernández-Teruel y cols 1997). La particularidad de las cepas RHA-I y RLA-I es que, como consecuencia de su selección psicogenética y de la co-selección (aleatoria) de otros caracteres a través de décadas, también muestran respuestas muy divergentes (diferencias extremas, en ocasiones, según la variable que se mida) de ansiedad/miedo y de estrés. Así, las respuestas conductuales (condicionadas e incondicionadas) y neuroendocrinas de ansiedad/estrés de las ratas RHA son consistentemente inferiores a las de las RLA, como se ha demostrado en múltiples tests y/o tareas de laboratorio, tales como la respuesta de sobresalto (basal, sensibilizada y condicionada –o potenciada por miedo-), diversos tests de conflicto, pruebas de ansiedad incondicionada, efectos de contraste negativo sucesivo, respuesta del eje hipotálamo-pituitario-adrenal, y otras (ej. Aguilar y cols 2000; Carrasco y cols 2008; Driscoll y cols 1998; Driscoll y cols 2008; Escorihuela y cols 1997, 1999; Fernández-Teruel y cols 1991d, 1992a-b, 1997, 1998, 2002b; Ferre y cols 1995; Lopez-Aumatell y cols 2005, 2008; Schwegler y cols 1997; Steimer y cols 1997; Steimer y Driscoll 2003ab; Torres y cols 2008; Rosas y cols 2007).

La batería de pruebas usada incluyó tres tests/tareas relacionadas con la ansiedad/miedo y validadas para la medida de tales procesos en ratas de laboratorio, como son la “Caja Blanca/Negra” (ej. Ramos y Mormede 1998; Steimer y Driscoll 2003) y el “laberinto en ‘cero’ elevado” (ej. Pähkla y cols 2000; Shepherd y cols 1994), como tests de ansiedad incondicionada, y la adquisición de la evitación activa en dos sentidos (en caja de vaivén, o “*Shuttlebox*”) como tarea instrumental mediada por ansiedad/miedo condicionado (ej. Boix y cols 1988; Escorihuela y cols 1993;

Fernández-Teruel y cols. 1991 a-c, 2002 a; Prunell y cols 1994 a,b).

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1- Animales

Se han utilizado 143 ratas macho del stock de ratas N/Nih-HS (“*National Institutes of Health Genetically Heterogeneous Stock*”, ver Hansen y Spuhler 1984; los progenitores nos fueron amablemente proporcionados por la Dra. Eva Redei, Center for Comparative Medicine, Northwestern University, Chicago, USA). Se utilizaron también 37 ratas macho RHA-I y RLA-I (n= 18-19 por cepa) de la misma edad, procedentes de nuestra colonia del laboratorio de Barcelona (UAB). Los animales tenían aproximadamente 4 meses de edad al inicio de los experimentos (peso: 350-400 g). Fueron estabulados en jaulas del macrolon (50 x 25 x 14 centímetros) y en parejas del mismo sexo, y mantenidos con libre acceso a comida (pienso estándar, Panlab) y agua, bajo condiciones de temperatura controlada (22±2° C) y de un ciclo luz-oscuridad controlado de 12 h (encendido en 08:00 h). Los grupos de ratas RHA-I y de RLA-I se componían de ratas de 7 familias diferentes por lo menos, mientras que el grupo de ratas N/Nih-HS procedía de 40 familias diferentes.

### 2.2- Aparatos y procedimiento

Los experimentos fueron realizados durante la fase de luz del ciclo, entre las 09:00 y 19:00 h, y de acuerdo con la legislación española sobre la “Protección de los animales usados para propósitos científicos y experimentales” y la directiva del Consejo de la Comunidad Europea (86/609/EEC) sobre este tema. Se administraron tres pruebas o tareas comportamentales a lo largo de un período aproximado de 2 meses, con un intervalo de unas 2-3 semanas entre cada dos pruebas consecutivas. Los grupos de ratas RHA-I y RLA-I fueron intercalados en los diferentes tests de comportamiento, de la manera más contrabalanceada posible (por día y por horario), entre las ratas del grupo N/Nih-HS. La secuencia y las características de las pruebas fueron como sigue:

**Caja Blanca-Negra (CBN).** Caja de dos compartimientos (Panlab, Barcelona, España), consistiendo en un compartimiento negro y oscuro (27x18x27 centímetro) y un compartimiento blanco (27x27x27 centímetro). Este último estaba iluminado por un débil bulbo rojo de 40 W colocado a 35 centímetros de altura sobre el suelo. Ambos compartimientos estaban separados por una pared (47 centímetros de alto) con una abertura en su base (7x7 centímetros) a modo de puerta, a través de la que la rata puede cambiar libremente de compartimiento. El aparato se

situaba en una habitación pintada de negro e iluminada con la luz fluorescente roja (60 W) situada en el techo. La conducta de cada animal se filmó con una cámara de vídeo desde el exterior de la habitación experimental. Cada animal fue individualmente colocado en el compartimiento negro mirando frente a la pared del mismo. Durante 5 minutos se midió, para cada rata, la latencia (en segundos) de salida del compartimiento negro (*BWB-LAT*), el tiempo pasado en el compartimiento blanco (*BWB-T*), el número de entradas en el compartimiento blanco (*BWB-E*) y el número de posturas de “evaluación del riesgo” (*BWB-SAP*; postura de estiramiento de la cabeza y mitad anterior del cuerpo hacia el compartimiento blanco, pero sin llegar a entrar en él completamente) (ej. Ramos y Mormede 1998; Steimer y Driscoll 2003).

#### “*Laberinto elevado en ‘cero’*” (*LC*).

El laberinto, similar al descrito por Shepherd y cols (1994), consiste en una plataforma anular (diámetro de 105 centímetros; anchura de 10 centímetros) hecha de madera negra y elevada a 65 centímetros sobre el nivel del suelo. Tiene dos secciones (cuadrantes) abiertas y otras dos (de idéntica superficie) flanqueadas por paredes de una altura de 40 centímetros. Para el test, cada rata fue situada en una de las secciones protegidas por paredes (mirando hacia ellas). El aparato se hallaba situado en una sala experimental pintada de negro, la misma que para la prueba anterior, con condiciones de iluminación y de grabación de la conducta de los animales también idénticas. Para cada rata se midieron, durante 5 minutos, la latencia (en segundos) de entrada en una sección abierta (*ZM-LAT*), tiempo pasado en las secciones abiertas (*ZM-T*), número de entradas en las secciones abiertas (*ZM-E*), el número de posturas de “evaluación del riesgo” (*ZM-SAP*, ver arriba) (ej. Pähkla y cols 2000; Shepherd y cols 1994).

#### *Adquisición de la evitación activa en dos sentidos en la “Shuttlebox” (SH).*

El experimento fue realizado con tres “*Shuttleboxes*” (cajas de lanzadera o de vaivén) idénticas (Letica, Panlab, Barcelona, España), cada una colocada dentro de una caja de insonorización de madera. Un bulbo fluorescente colocado detrás de la pared opaca de los *Shuttleboxes* proporcionaba iluminación débil y difusa a cada caja. La sala experimental se mantuvo oscura. Cada *Shuttlebox* se compone de dos compartimientos idénticos (25x25x28 cm), conectados por una abertura (8x10 cm). El estímulo condicionado (EC) fue un tono de 2400-Hz y 63-dB más una luz (de una pequeña lámpara de 7-W). El estímulo incondicionado (EI), que se iniciaba al finalizar el EC, consistió en una descarga eléctrica (con “*scrambler*”) de 0.7

mA a través de la reja de acero. Una vez que las ratas eran (individualmente) colocadas en la *Shuttlebox* se iniciaba un período de familiarización a la caja de 4 minutos de duración. Tras ese período de 4 minutos se iniciaba la sesión de evitación activa en dos sentidos de 40 ensayos. Cada ensayo de entrenamiento consistió en un EC de 10 s, seguido por el EI (choque eléctrico) de duración máxima de 20 s. El EC o el EI finalizaban cuando la rata cruzaba al compartimiento opuesto, considerándose una respuesta de evitación cuando el cruce se producía en presencia del EC y una respuesta de escape cuando se producía en presencia del EI. Una vez producido un cruce (evitación o escape) al compartimiento opuesto se iniciaba un intervalo de descanso (intervalo entre ensayos) de 1 minuto. El entrenamiento consistió en una sola sesión de 40 ensayos.

Las variables registradas fueron el número total de evitaciones (*SH-EV40*), así como el número de evitaciones acumuladas en diferentes bloques de ensayos (ej. evitaciones a los 10 ensayos y a los 20 ensayos), el número de cruces durante el intervalo entre ensayos (*SH-C40*) y la latencia (en segundos) media de respuesta para toda la sesión de entrenamiento (*SH-LAT40*) (véase a Aguilar y otros. 2002; Fernández-Teruel y otros., 1991a-c).

### 2.3.- Análisis estadísticos.

Para los diferentes análisis se han utilizado el coeficiente de correlación de Pearson y la regresión múltiple (paso a paso, “*Step wise*”), así como ANOVAs de un factor (tres grupos experimentales) seguidos de pruebas de Duncan para comparaciones múltiples y pruebas “t” de Student para grupos independientes. Las pruebas “t” de Student se aplicaron tanto para los análisis de comparación entre dos grupos extremos (sujetos seleccionados por tener valores de una desviación estándar por encima o por debajo de la media del grupo N/Nih-HS para una determinada variable) como para comparación directa entre los grupos RHA-I y RLA-I, puesto que existen hipótesis claras sobre la dirección de las diferencias esperables entre ambas cepas de ratas (las RHA-I se espera que sean menos ansiosas que las RLA-I, en función de toda la literatura previa; ver “Introducción”).

### 3.- RESULTADOS

La Tabla 1 muestra los descriptivos de los valores de las ratas N/Nih-HS en las variables más relevantes de los diferentes tests de ansiedad.

En la Figura 1A-C se observa que las ratas RLA-I presentan mayor ansiedad incondicionada que las RHA-I en el test LC, representada por diferencias significativas en las variables de ansiedad

“entradas en secciones abiertas” [ANOVA  $F(2,170)=3.2$   $p<0.01$ ;  $p<0.05$ , tests de Duncan entre RHA-I y los otros dos grupos] y “tiempo pasado en secciones abiertas” [ $t(35)=2.2$   $p=0.03$  entre RHA-I y RLA-I], así como en la “latencia de la primera entrada a una sección abierta” (en esta variable el ANOVA no fue significativo, pero sí lo fue la prueba de “Chi cuadrado”, pues el % de animales que salieron a una sección abierta en menos de 30 segundos fue mayor en el grupo RHA-I que en las RLA-I;  $-\text{Chi}=8.99$   $p=0.011$ ). Los valores del grupo N/Nih-HS en esas tres variables se situaron entre los de las ratas RHA-I y RLA-I, siendo significativamente diferentes respecto al grupo RHA-I sólo en la variable “entradas en secciones abiertas” ( $p<0.05$ , test de Duncan; Fig. 1A)

La Figura 1D-F muestra la correspondiente comparación entre los tres grupos de ratas en las variables relevantes de la prueba de adquisición activa en dos sentidos. Como se esperaba, las ratas RHA-I mostraron diferencias muy marcadas respecto a las RLA-I. Así, el grupo RHA-I realizó más respuestas de evitación (Fig. 1D), menor latencia media de respuesta (Fig. 1E) y mucho menos tiempo de conducta condicionada (por miedo) de petrificación (o *freezing*; Fig. 1F) en los primeros 5 intervalos entre ensayos. Todo ello fue reflejado por ANOVAs muy significativos (ver más abajo), observándose a su vez que, comparadas con las ratas RHA-I, las ratas N/Nih-HS muestran menor número de evitaciones [ $F(2,170)=26.5$   $p<0.001$ ;  $p<0.05$  test de Duncan; Fig. 1D], mayor latencia media de respuesta [ $F(2,170)=16.9$   $p<0.001$ ;  $p<0.05$  test de Duncan; Fig. 1E] y niveles superiores de conducta de petrificación condicionada al contexto [ $F(2,63)=55.3$   $p<0.001$ ;  $p<0.05$  test de Duncan; Fig. 1F]. En cambio, las ratas N/Nih-HS sólo se diferencian de las RLA-I en la latencia media de respuesta [ANOVA citado arriba para Fig. 1E].

En la Figura 2A-B se presentan las diferencias que se producen entre ratas N/Nih-HS agrupadas por sus valores extremos (media  $\pm$  1 desviación estándar) en la variable “evitaciones totales” en la sesión de adquisición de evitación activa en dos sentidos. Se observa que las ratas N/Nih-HS relativamente buenas “evitadoras” son las menos ansiosas, pues muestran un mayor “% de tiempo transcurrido en las secciones abiertas del LC [ $t(50) = 2.5$   $p < 0.03$ ; Fig. 2A] y menor tiempo de petrificación condicionada al contexto [ $t(20)= 2.09$   $p=0.05$ ; Fig. 2B].

El análisis correspondiente seleccionando grupos de ratas N/Nih-HS con valores extremos en “% de tiempo pasado en secciones abiertas del LC” (con los mismos criterios de arriba (ver leyenda de

Figura 2C-D), muestra que las ratas menos ansiosas, es decir, aquellas que pasaron un mayor porcentaje de tiempo en las secciones abiertas del test, son también las que más respuestas de evitación realizan, en especial durante los 10 [t(87)= 3.0 p = 0.004; Fig. 2C].

La Tabla 2A muestra los patrones de correlaciones entre variables de los diferentes tests en la muestra de ratas N/Nih-HS. Se observan correlaciones sistemáticas y significativas entre los dos tests incondicionados, la CBN y el LC, como sería esperable. También aparecen correlaciones, más bajas pero significativas (0.18 a 0.234), entre algunas variables de ansiedad del LC y las evitaciones a los 10 y 20 ensayos de la prueba de adquisición de evitación activa en dos sentidos, indicando (en general) que a mayor conducta en las secciones abiertas del LC (menor ansiedad incondicionada) se corresponde una tendencia a realizar con más eficacia la tarea de evitación en dos sentidos. La Tabla 2B da apoyo parcial a lo anterior, pues la regresión múltiple indica que las “entradas en secciones abiertas del LC” y las “posturas de evaluación de riesgo” son predictores significativos de las respuestas de evitación a los 10, 20 ó 40 ensayos (el total de la sesión) en la caja de vaivén (*Shuttlebox*).

## DISCUSIÓN.

El presente estudio muestra los resultados de la evaluación del comportamiento de temerosidad (ansiedad, miedo) en una muestra amplia de ratas N/Nih-HS en varios tests validados para la medida de ansiedad o miedo, tanto condicionados como incondicionados, en ratas de laboratorio (ver referencias sobre su validez en la “Introducción”). Además, se ha comparado el perfil de las ratas genéticamente heterogéneas con los valores de dos cepas consanguíneas, las RHA-I y las RLA-I, que presentan comportamiento divergente en medidas de ansiedad, miedo y estrés.

Los resultados de este estudio constituyen una confirmación parcial y una extensión de nuestro trabajo previo de caracterización dimensional (factorial) del comportamiento ansioso/temeroso en ratas heterogéneas (Lopez-Aumatell *et al.* 2008), tanto en el patrón de correlaciones entre diferentes medidas como en los resultados del análisis de regresión múltiple, puesto que aparecen asociaciones significativas entre variables de los tests incondicionados de ansiedad y la adquisición de la evitación activa en dos sentidos. No obstante, el actual trabajo añade nueva e importante información con respecto a algunas características del perfil de comportamiento “defensivo” (esto es, ansioso o miedoso) de las ratas N/Nih-HS, pues la

comparación con las cepas RHA-I y RLA-I indica, por vez primera, que:

1) En el laberinto elevado en “cero” las ratas N/Nih-HS muestran valores en “latencia de la primera entrada en una sección abierta”, en “número de entradas en secciones abiertas” y en “tiempo pasado en secciones abiertas” que caen entre los valores medios de las cepas RHA-I y RLA-I. 2) Los niveles de miedo condicionado al contexto de las ratas N/Nih-HS, medidos por la conducta de petrificación (*freezing*) durante los primeros 5 intervalos entre ensayos del entrenamiento (cuando ninguna rata ha hecho aún respuestas de evitación), son mucho más cercanos a los de la cepa de ratas RLA-I (que son muy ansiosas, y condicionan estímulos y contextos aversivos fácilmente; ver López-Aumatell y cols 2005). 3) El nivel de adquisición de la evitación activa en dos sentidos de las ratas N/Nih-HS (7.9 evitaciones en promedio) es también más similar al de las RLA-I (3.2 evitaciones de media) que al de las ratas RHA-I (promedio de 25 evitaciones) (a título informativo, en varios estudios hemos comprobado que las ratas Sprague-Dawley de la colonia de la UAB, Barcelona, realizan medias de entre 10 y 18 evitaciones en 40 ensayos; véanse por ejemplo Aguilar y cols 2004; Escorihuela y cols 1993; Fernández-Teruel y cols 1991a-c; Prunell y cols 1994a-b). 4) En el total de la sesión de entrenamiento de evitación las ratas heterogéneas N/Nih-HS exhiben niveles de cruces entre ensayos (23 de media) similares a los valores de las RLA-I (media de 19) y muy inferiores a los de las ratas RHA-I (media de 109 cruces) (los resultados de las cepas RHA-I y RLA-I no se han incluido aquí por motivos de espacio).

Los resultados indican que, en la prueba de ansiedad incondicionada (el LC), las ratas N/Nih-HS no presentan un perfil que indique de manera definitiva que son más ansiosas o menos que alguna de las dos cepas consanguíneas de comparación (las relativamente muy ansiosas RLA-I, y las relativamente poco ansiosas RHA-I), aunque sus valores en las tres variables relevantes mencionadas caen entre los márgenes de los mostrados por las cepas Romanas. En cambio, respecto a los niveles de miedo condicionado al contexto (*freezing* o petrificación durante los 5 primeros intervalos entre ensayos, esto es, condicionamiento clásico de miedo) es claro que las ratas N/Nih-HS muestran perfiles “defensivos” (en terminología de Blanchard y cols 1990, 1993; Gray y McNaughton 2000; Griebel y cols 1996; McNaughton y Gray 2000) que en gran medida las asemejan a las ratas RLA-I. En línea con dicho perfil defensivo, de tipo predominantemente “petrificador” (o *freezer*) ante situaciones condicionadas de conflicto (como lo es el inicio del entrenamiento en la *Shuttlebox*, un conflicto de

“evitación pasiva/evitación activa”), las ratas N/Nih-HS claramente presentan poca habilidad para la adquisición de la evitación activa en dos sentidos, que se manifiesta en las respuestas de evitación totales e, indirectamente, en el número de cruces entre ensayos mencionado arriba (conducta “pseudocondicionada” que se halla relacionada con el aprendizaje eficaz de esta tarea; ej. Aguilar y cols 2004). Por tanto, y a falta de más estudios comparativos entre las ratas N/Nih-HS y otras cepas en tareas de ansiedad incondicionada, parece claro que las ratas heterogéneas N/Nih-HS presentan algunas características conductuales que las acercan más al perfil de la cepa ansiosa RLA-I que al de las ratas RHA-I (poco ansiosas; véanse referencias arriba).

Algunos trabajos previos han estudiado en ratas no seleccionadas (ej. Wistar, Sprague-Dawley) la relación entre ansiedad incondicionada y condicionada, utilizando el test de ansiedad del “laberinto en cruz elevado” (“*Elevated Plus-Maze*”) y evaluando si una menor ansiedad medida en dicho test (mayor exploración de los brazos abiertos) predice que los animales adquirirán la evitación activa en dos sentidos más rápidamente. Los resultados de dichos estudios no han sido concluyentes, pues en algún caso han hallado esa hipotética relación (Ho y cols 2002, Prunell y cols 1994b) y en otros casos tal asociación no ha aparecido (Ribeiro y cols 1999). A parte de utilizar diferentes cepas de ratas y procedimientos en los tests conductuales empleados, dichos trabajos se han realizado con un número de animales relativamente reducido ( $n < 50$ ).

En cambio, el presente estudio representa la primera ocasión en que en ratas genéticamente heterogéneas (probablemente las más heterogéneas que existen; Flint *et al.* resultados no publicados, comunicados por Johannesson y cols, en el “*Rat Genomics & Models meeting*”, Cold Spring Harbor, USA 2007), y en una muestra grande de ellas ( $n=143$ ), se evalúa la relación entre conductas de ansiedad no aprendidas y respuestas aprendidas (condicionadas) de miedo. Ello se ha llevado a cabo por tres procedimientos que se complementan: 1) el análisis de las correlaciones entre las variables de los diferentes tests en toda la muestra; 2) la selección de submuestras de animales con valores extremos en las variables conductuales de interés para observar cómo esto predice los valores que tomarán otras variables de ansiedad y, 3) el análisis de regresión múltiple, en toda la población de ratas usada, para la evaluación de qué variables predicen la adquisición de la evitación activa en dos sentidos.

Así, se observan correlaciones significativas (aunque bajas; entre  $r= 0.18$  y  $r= 0.23$ ) entre diferentes variables que representan ansiedad incondicionada en el test LC, como por ejemplo el “% de tiempo pasado en las secciones abiertas” y el “nº de entradas en secciones abiertas, y el número de evitaciones durante los primeros 20 ensayos (Tabla 1A). El análisis de regresión múltiple confirma, además, que el “número de entradas en secciones abiertas” predice positivamente y significativamente el número de evitaciones que las ratas realizan tanto durante los 10-20 primeros ensayos como en el total de la sesión de adquisición (40 ensayos; Tabla 1B). Y, por último, y de forma coherente con los análisis mencionados, la comparación entre subgrupos de ratas N/Nih-HS que muestran valores extremadamente bajos o altos (1 desviación de estándar por debajo o por encima de la media) en diversas variables muestra que: 1) En comparación con las ratas que no adquieren conducta de evitación, las ratas con más altos valores de evitaciones (o sea, las que muestran una más eficaz resolución del conflicto que supone la adquisición de la evitación activa en dos sentidos) son animales que pasan más tiempo en las secciones abiertas del test LC y que muestran menores niveles de conducta de petrificación condicionada al contexto (Fig. 2A-B). 2) En línea con lo anterior, seleccionando las ratas que presentan valores extremos en “% de tiempo pasado en secciones abiertas del LC”, se observa que las menos ansiosas (las que pasan más tiempo en secciones abiertas) son las que con más rapidez/facilidad inician el aprendizaje de la evitación activa en dos sentidos (o sea, las que mejor resuelven el conflicto inicial en esta tarea; Fig. 2C-D).

Los resultados obtenidos poseen especial interés por varios motivos. En primer lugar, son la primera comparación experimental entre el perfil de ansiedad/miedo de las ratas heterogéneas N/Nih-HS y el de dos cepas de ratas consideradas como un buen modelo genético de baja y alta ansiedad, las RHA-I y las RLA-I respectivamente. El hecho de que los valores del stock de ratas N/Nih-HS se sitúen entre los de las cepas Romanas y de que en las medidas relacionadas con miedo condicionado (miedo condicionado al contexto y ejecución en la tarea de evitación activa en dos sentidos) se encuentren cercanas a las ratas ansiosas RLA-I, unido al hecho de que (las N/Nih-HS) son las ratas con mayor heterogeneidad genética disponibles, permite pensar que las ratas N/Nih-HS son fenotípicamente y genotípicamente adecuadas para la realización de estudios genético-cuantitativos, más concretamente estudios de “mapeo” fino de QTLs para los rasgos ansiedad o/y miedo.

En segundo lugar, los diferentes análisis realizados (correlaciones, regresión, comparación de grupos extremos en ansiedad) indican, de forma considerablemente consistente, que existen relaciones entre variables de ansiedad/miedo no aprendido (espontáneo) y medidas de miedo aprendido. Estas relaciones no son, sin embargo, muy intensas si se tiene en cuenta toda la muestra de ratas y se aplica análisis correlacional o de regresión, aunque el análisis comparativo de subgrupos con valores extremos en variables relevantes (por tanto, sólo con los extremos de la muestra) confirma que las relaciones existen. En línea con lo que indican estudios anteriores de QTLs para la ansiedad en ratas (Fernández-Teruel y cols 2002 a) se puede hipotetizar, por tanto, que en el proyecto genético de búsqueda y “mapeo” fino de QTLs para la ansiedad/miedo que ya está en curso (ver Johannesson y cols 2007, comunicación oral al “*Rat Genomics & Models meeting*”, Cold Spring Harbor, USA 2007; en el marco del proyecto europeo que llevamos a cabo, ver Aitman y cols 2008) sería esperable hallar algún QTL con influencia significativa sobre más de una conducta de ansiedad, por ejemplo sobre el número de evitaciones, el tiempo de “petrificación” condicionada al contexto y (tal vez) las “entradas en secciones abiertas” de los tests incondicionados (ver Fernández-Teruel y cols 2002 a). Pero, asimismo, sería esperable también hallar otro u otros QTLs que presentasen influencia significativa sobre variables específicas de tests conductuales específicos (p. ej. algún QTL que influya sólo sobre las variables de entradas y/o tiempo en secciones abiertas del test LC; ver también Fernández-Teruel y cols 2002 a). De acuerdo con las hipótesis anteriores, los resultados preliminares (no publicados; aún en fase experimental) del estudio de mapeo fino de QTLs que estamos realizando indican, por el momento, que en el cromosoma 5 de las ratas N/Nih-HS parece hallarse un QTL para la conducta de adquisición de la evitación activa en dos sentidos (Johannesson y cols 2007; ver arriba), así como otros probables QTLs para conductas incondicionadas de ansiedad en los tests utilizados aquí. Son QTLs obtenidos con alta resolución, de manera que lo reducido de los intervalos “mapeados” podrá permitir la identificación de los pocos genes (menos de una decena, en el caso de alguno de esos QTLs) que dichos intervalos contienen. Nos proponemos investigar (trabajo ya en curso) si alguno de los genes contenidos en dichos QTLs (con influencia significativa sobre la ansiedad) se expresan diferencialmente en las ratas muy ansiosas (RLA-I) y poco ansiosas (RHA-I) aquí utilizadas. Si así fuese, el siguiente paso sería construir, con ese gen (o genes) candidato, ratas transgénicas, con sobreexpresión del gen, y ratas

“*knock down*”, con expresión disminuida del gen, partiendo de las cepas RHA-I/RLA-I. Esas dos nuevas cepas de ratas con el gen manipulado serían evaluadas conductualmente en pruebas de ansiedad diversas, a efectos de observar si nuestra manipulación de los niveles de expresión del gen confirman que el mismo está realmente implicado en la regulación del rasgo de ansiedad/miedo/temerosidad.

**Acknowledgements:** Supported by grants from the “Ministerio de Ciencia y Tecnología” (SAF2003-03480), DGR (2005SGR-00885), FPI program (R. L-A) and through EURATools (European Commission Contract no. LSHG-CT-2005-019015).

## REFERENCIAS

- Aguilar, R., Gil, L., Tobeña, A., Escorihuela, R. M., & Fernández-Teruel, A. (2000). Differential effects of cohort removal stress on the acoustic startle response of the Roman/Verh rat strains. *Behavior Genetics*, *30*, 71-75.
- Aguilar, R. (2002). *Fearfulness in a large F2 progeny of the Roman rats: Paving the way for QTL'S genes localisation*. Tesis doctoral publicada electrónicamente. Bellaterra: Universidad Autónoma de Barcelona.
- Aguilar, R., Gil, L., Flint, J., Gray, J. A., Dawson, G. R., Driscoll, P., Gimenez-Llort, L., Escorihuela, R. M., Fernández-Teruel, A. & Tobeña, A. (2002). Learned fear, emotional reactivity and fear of heights: A factor analytic map from a large F2 intercross of Roman rat strains. *Brain Research Bulletin*, *57*, 17-26.
- Aguilar, R., Gil, L., Gray, J. A., Driscoll, P., Flint, J., Dawson, G. R., Gimenez-Llort, L., Escorihuela, R. M., Fernández-Teruel, A. & Tobeña, A. (2003). Fearfulness and sex in F2 Roman rats: males display more fear though both sexes share the same fearfulness traits. *Physiology & Behavior*, *78*, 723-732.
- Aguilar, R., Gil, L., Fernández-Teruel, A., & Tobeña, A. (2004). Genetically-based behavioral traits influence the effects of shuttle box avoidance overtraining and extinction upon intertrial responding: a study with the Roman rat strains. *Behavioural Processes*, *66*, 63-72.
- Aitman, T. J., Crister, J., Cuppen, E., Dominiczak, A., Fernández-Suarez, X., Flint, J., Gauguier, D., Geurts, A. M., Gould, M., Harris, P. C., Holmdahl, R., Hubner, N., Izsvák, Z., Jacob, H. J., Kuramoto, T., Kwitek, A. E., Marrone, A., Mashimo, T., Moreno, C., Mullins, J., Mullins, L., Olsson, T., Pravenec, M., Riley, L., Saar, K., Serikawa, T., Shull, J. D., Szpirer, C., Twigger, S. N., Voigt, B., Worley, K. (2008). Progress and prospects in rat genetics: a community view. *Nature Genetics*, *40*, 516- 522.
- Belzung, C., & Le Pape, G. (1994). Comparison of different behavioral test situations used in psychopharmacology for measurement of anxiety. *Physiology & Behavior*, *56*, 623-628.
- Blanchard, R. J., Blanchard, D. C., Rodgers, J., & Weiss, S. M. (1990). The characterization and modeling of antipredator defensive behavior. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, *14*, 463-472.
- Blanchard, R. J., Yudko, E. B., Rodgers, J., & Blanchard, D.C. (1993). Defense system psychopharmacology: an ethological approach to the pharmacology of fear and anxiety. *Behavioural Brain Research*, *58*, 155-165.
- Boix, F., Fernández-Teruel, A., & Tobeña, A. (1988). The anxiolytic action of benzodiazepines is not present in handling-habituated rats. *Pharmacology Biochemistry and Behaviour*, *31*, 541-546.
- Brush, F. R., Del Paine, S. L., Pellegrino, L. J., Rykazewski, I. M., Dess, N. K., & Collins, P. (1988). CER suppression, passive-avoidance learning, and stress-suppression of drinking in the Siracuse high- and low- avoidance strains of rats (*Rattus norvegicus*). *Journal of Comparative Psychology*, *102*, 337-339.
- Cano Vindel, A., Miguel Tobal, J. J., González Ordí, H., & Iruarizaga Díez, I. (2007). Hiperventilación y experiencia de ansiedad. *Ansiedad y Estrés*, *13*, 291-302.
- Carrasco, J., Márquez, C., Nadal, R., Tobeña, A., Fernández-Teruel, A., & Armario, A. (2008). Characterization of central and peripheral components of the hypothalamus- pituitary-adrenal axis in the inbred Roman rat strains. *Psychoneuroendocrinology*, *33*, 437-445.
- Davis, M., Falls, W. A., Campeau, S., & Kim, M. (1993). Fear-potentiated startle: a neural and pharmacological analysis. *Behavioural Brain Research*, *58*, 175-198.
- Draski, L. J., Spuhler, K. P., Erwin, V. G., Baker, R. C., & Deitrich, R. A. (1992). Selective breeding of rats differing in sensitivity to the effects of acute ethanol administration. *Alcoholism, Clinical and Experimental Research*, *16*, 48-54.



- Driscoll, P., Escorihuela, R. M., Fernández-Teruel, A., Giorgi, O., Schwegler, H., Steimer, T., Wiersma, A., Corda, M. G., Flint, J., Koolhaas, J. M., Langhans, W., Schulz, P.E., Siegel, J., & Tobeña, A. (1998). Genetic selection and differential stress responses. The Roman lines/strains of rats. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 851, 501-510.
- Escorihuela, R. M., Fernández-Teruel, A., Zapata, A., Nuñez, J. F., & Tobeña, A. (1993). Flumazenil prevents the anxiolytic effects diazepam, alprazolam and adinazolam on the early acquisition of two-way active avoidance. *Pharmacological Research*, 28, 53-58.
- Escorihuela, R. M., Fernández-Teruel, A., Tobeña, A., Langhans, W., Bättig, K., & Driscoll, P. (1997). Labyrinth exploration. Emotional reactivity, and conditioned fear in young Roman/Verh inbred rats. *Behavior Genetics*, 27, 573-578.
- Escorihuela, R. M., Fernández-Teruel, A., Gil, L., Aguilar, R., Tobeña, A., & Driscoll, P. (1999). Inbred Roman high- and low-avoidance rats: differences in anxiety, novelty seeking and shuttle box behaviors. *Physiology & Behavior*, 67, 19-26.
- Eysenck, M. W., & Eysenck, W. (2007). Four-factor theory and the anxiety disorders. *Ansiedad y Estrés*, 13, 283-289.
- Fernandes, C., Gonzalez, M. I., Wilson, C., & File, S.E. (1999). Factor analysis shows that female rat behavior is characterized primarily by activity, male rats are driven by sex and anxiety. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 64, 731-738.
- Fernández-Teruel, A., Escorihuela, R. M., Boix, F., & Tobeña, A. (1991a). Effects of different handling- stimulation procedures and benzodiazepines on two-way active avoidance acquisition in rats. *Pharmacological Research*, 24, 273-282.
- Fernández-Teruel, A., Escorihuela, R. M., Nuñez, J. F., Zapata, A., Boix, F., Salazar, W., & Tobeña, A. (1991b). The early acquisition of two-way (shuttle-box) avoidance as an anxiety-mediated behaviour: psychopharmacological validation. *Brain Research Bulletin*, 26, 173-176.
- Fernández-Teruel, A., Escorihuela, R. M., Tobeña, A., & Driscoll, P. (1991c). Stress and putative endogenous ligands for benzodiazepine receptors: The importance of characteristics of the aversive situation and of differential emotionality in experimental animals. *Experientia*, 47, 1051-1056.
- Fernández-Teruel, A., Escorihuela, R. M., Driscoll, P., Tobeña, A., & Bättig, K. (1991d). Infantile (handling) stimulation and behavior in young Roman High- and Low-Avoidance rats. *Physiology & Behavior*, 50, 563-565.
- Fernández-Teruel, A., Escorihuela, R.M., Driscoll, P., Tobeña, A., & Bättig, K. (1992a). Differential effects of early stimulation and/or perinatal flumazenil treatment in young low- and high-avoidance rats. *Psychopharmacology*, 108, 170-176.
- Fernández-Teruel, A., Escorihuela, R. M., Nuñez, J. F., Goma, M., Driscoll, P., & Tobeña, A. (1992b). Early stimulation effects on novelty-induced behaviour in two psychogenetically-selected rat lines with divergent emotionality profiles. *Neuroscience Letters*, 137, 185-188.
- Fernández-Teruel, A., Escorihuela, R., M., Castellano, B., Gonzalez, B., & Tobeña, A. (1997). Neonatal handling and environmental enrichment effects on emotionality, novelty/reward seeking, and age-related cognitive and hippocampal impairments: focus on the Roman rat lines. *Behavior Genetics*, 6, 513-526.
- Fernández-Teruel, A., Escorihuela, R. M., Aguilar, R., Gil, L., Gonzalez, B., Castellano, B., Driscoll, P., & Tobeña, A. (1998). Respuestas de estrés y efectos de la experiencia temprana: Evidencia conductual, fisiológica y neuromorfológica. *Ansiedad y Estrés*, 4, 135-170.
- Fernández-Teruel, A., Escorihuela, R. M., Gray, J. A., Aguilar, R., Gil, L., Gimenez-Llort, L., Tobeña, A., Bhomra, A., Nicod, A., Mott, R., Driscoll, P., Dawson, G.R., & Flint, J. (2002). A quantitative trait locus influencing anxiety in the

- laboratory rat. *Genome Research*, *12*, 618-626.
- Ferré, P., Fernández-Teruel, A., Escorihuela, R. M., Driscoll, P., Corda, M. G., Giorgi, O., & Tobeña, A. (1995). Behavior of the Roman/Verh high -and low- avoidance rat lines in anxiety tests: relationship with defecation and self-grooming. *Physiology & Behavior*, *58*, 1209-1213.
- Flaherty, C. F., Greenwood, A., Martin, J., & Leszczuk, M. (1998). Relationship of negative contrast to animal models of fear and anxiety. *Animal Learning & Behaviour*, *26*, 397-407.
- Flint, J. (2004). The genetic basis of neuroticism. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, *28*, 307-316.
- Fullerton, J., Cubin, M., Tiwari, H., Wang, C., Bomhra, A., Davidson, S., Miller, S., Fairburn, C., Goodwin, G., Neale, M. C., Fiddy, S., Mott, R., Allison, D. B., & Flint, J. (2003). Linkage analysis of extremely discordant and concordant sibling pairs identifies quantitative-trait loci influence variation in the human personality trait neuroticism. *American Journal of Human Genetics*, *72*, 879-890.
- González Ramírez, M. T., & Landero Hernández, R. (2006). Síntomas psicósomáticos y teoría transaccional del estrés. *Ansiedad y Estrés*, *12*, 45-61.
- Griebel, G., Blanchard, D. C., & Blanchard, R. J. (1996). Evidence that behaviors in the mouse defense test battery relate to different emotional states: A factor analytic study. *Physiology & Behavior*, *60*, 1255-1260.
- Gray, J. A. (1982). *The Neuropsychology of Anxiety: an enquiry into the functions of the Septo-hippocampal System*. Oxford: Oxford University Press.
- Gray, J. A., & McNaughton, N. (2000). *The Neuropsychology of Anxiety*. Oxford: Oxford University Press.
- Hansen, C., & Spuhler, K. (1984). Development of the National Institutes of Health genetically heterogeneous stock. *Alcoholism, Clinical and Experimental Research*, *8*, 477-479.
- Johnston, A. L., & File, S. E. (1991). Sex differences in animal tests of anxiety. *Physiology & Behavior*, *49*, 245- 250.
- Koch, L. G., & Britton, S. L. (2001). Artificial selection for intrinsic aerobic endurance running capacity in rats. *Physiological Genomics*, *5*, 45-52.
- Lehmann, J., Pryce, C. R., & Feldon, J. (1999). Sex differences in the acoustic startle response and prepulse inhibition in Wistar rats. *Behavioural Brain Research*, *104*, 113-117.
- Leza, J. C. (2005). Mecanismos del daño cerebral inducido por estrés. *Ansiedad y Estrés*, *11*, 123-140.
- Lopez-Aumatell, R., Blazquez, G., Gimenez-Llort, L., Gil, L., Aguilar, R., Tobeña, A., & Fernández-Teruel, A. (2005). Differences in classical fear conditioning and fear-potentiated startle between the Roman rat strains. *Behavioural Pharmacology*, *16 (Suppl.)*, 632.
- Lopez-Aumatell, R., Guitart-Masip, M., Vicens-Costa, E., Gimenez-Llort, L., Valdar, W., Johannesson, M., Flint, J., Tobeña, A. & Fernández-Teruel, A. (2008). Fearfulness in a large N/Nih genetically heterogeneous rat stock: Differential profiles of timidity and defensive flight in males and females. *Behavioural Brain Research*, *188*, 41-55.
- McNaughton, N., & Gray, J. A. (2000). Anxiolytic action on the behavioural inhibition system implies multiple types of arousal contribute to anxiety. *Journal of Affective Disorders*, *61*, 161-176.
- McNish, K. A., Gewirtz, J. C., & Davis, M. (1997). Evidence of contextual fear after lesions of the hippocampus: A disruption of freezing but not fear-potentiated startle. *The Journal of Neuroscience*, *17*, 9353-9360.
- Mott, R., & Flint, J. (2002). Simultaneous detection and fine mapping of quantitative trait loci using heterogeneous stocks. *Genetics*, *160*, 1609-1618.
- Mott, R., Talbot, C. J., Turri, M. G., Collins, A. C., & Flint, J. (2000). A method for fine mapping quantitative trait loci in outbred animal stocks. *Proceedings of the*

- National Academy of Sciences of the United States of America, 97, 12649-12654.
- Overstreet, D. H., Rezvani, A. H., Pucilowski, O., Gause, L., & Janowsky, D. S. (1994). Rapid selection for serotonin-1A sensitivity in rats. *Psychiatric Genetics*, 4, 57-62.
- Pähkla, R., Kask, A., & Rägo, L. (2000). Differential effects of beta-carbolines and antidepressants on rat exploratory activity in the elevated zero-maze. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 65, 737-42.
- Phillips, R. G., & LeDoux, J. E. (1992). Differential contribution of amygdala and hippocampus to cued and contextual fear conditioning. *Behavioral Neuroscience*, 106, 274-285.
- Phillips, R. G., & LeDoux, J. E. (1994). Lesions of the dorsal hippocampal formation interfere with background but no foreground contextual fear conditioning. *Learning & Memory*, 1, 34-44.
- Prunell, M., Escorihuela, R. M., Fernández-Teruel, A., Nuñez, J. F., & Tobeña, A. (1994a). Differential interactions between ethanol and Ro 15-4513 on two anxiety tests in rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 47, 147-151.
- Prunell, M., Escorihuela, R. M., Fernández-Teruel, A., Nuñez, J. F., & Tobeña, A. (1994b). Anxiolytic profiles of alprazolam and ethanol in the elevated plus-maze test and the early acquisition of Shuttlebox avoidance. *Pharmacological Research* 29, 37-45.
- Ramos, A., Mellerin, Y., Mormede, P., & Chauloff, F. (1998). A genetic and multifactorial analysis of anxiety-related behaviours in Lewis and SHR intercrosses. *Behavioural Brain Research*, 96, 195-205.
- Ramos, A., & Mormede, P. (1998). Stress and emotionality: A multidimensional and genetic approach. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 22, 33-57.
- Ribeiro-Barbosa, E. R., Canteras, N. S., Cezario, A. F., Blanchard, R. J., & Blanchard, D. C. (2006). An alternative experimental procedure for studying predator-related defensive responses. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 29, 1255-1263.
- Savonenko, A., Filipkowski, R. K., Werka, T., Zielinski, K., & Kaczmarek, L. (1999). Defensive conditioning-related functional heterogeneity among nuclei of the rat amygdala revealed by c-Fos mapping. *Neuroscience*, 94, 723-733.
- Savonenko, A., Werka, T., Nikolaev, E., Zielinski, K., & Kaczmarek, L. (2003). Complex effects of NMDA receptor antagonist AVP in the basolateral amygdala on acquisition of two-way avoidance reaction and long-term fear memory. *Learning & Memory*, 10, 293-303.
- Scherrer, J. F., True, W. R., Xian, H., Lyons, M. J., Eisen, S. A., Goldberg, J., Lin, N., & Tsuang, M. T. (2000). Evidence for genetic influences common and specific to symptoms of generalized anxiety and panic. *Journal of Affective Disorders*, 57, 25-35.
- Shepherd, J. K., Grewal, S. S., Fletcher, A., Bill, D. J., Dourish, & C. T. (1994). Behavioural and pharmacological characterisation of the elevated "zero-maze" as an animal model of anxiety. *Psychopharmacology*, 116, 56-64.
- Spuhler, K., & Deitrich, R. A. (1984). Correlative analysis of ethanol-related phenotypes in rat inbred strains. *Alcoholism, Clinical and Experimental Research*, 8, 480-484.
- Steimer, T., & Driscoll, P. (2003). Divergent stress responses and coping styles in psychogenetically selected Roman high-(RHA) and low-(RLA) avoidance rats: behavioural, neuroendocrine and developmental aspects. *Stress*, 6, 87-100.
- Schwegler, H., Pilz, P. K. D., Koch, M., Fendt, M., Linke, R., & Driscoll, P. (1997). The acoustic startle response in inbred Roman High- and Low-avoidance rats. *Behavior Genetics*, 27, 579-582.
- Troxell, M. L., Loyal Britton, S., & Koch, L. G. (2003). Genetic models in applied physiology: selected contribution: variation and heritability for the adaptational response to exercise in genetically heterogeneous rats. *Journal of Applied Physiology*, 94, 1674-1681.

- Valdar, W., Solberg, L. C., Gauguier, D., Burnett, S., Klenerman, P., Cookson, W. O., Taylor, M. S., Rawlins, J. N. P., Mott, R., & Flint, J. (2006a). Genome-wide genetic association of complex traits in heterogeneous stock mice. *Nature Genetics*, *38*, 879-887.
- Valdar, W., Solberg, L. C., Gauguier, D., Cookson, W. O., Rawlins, J. N. P., Mott, R., & Flint, J. (2006b). Genetic and environmental effects on complex traits in mice. *Genetics*, *174*, 959-984.
- Werka, T. (1997). The effects of the medial and cortical amygdala lesions on post-stress analgesia in rats. *Behavioural Brain Research*, *86*, 59-65.
- Werka, T., & Zielinski, K. (1998). CS modality transfer of two-way avoidance in rats with central and basolateral amygdala lesions. *Behavioural Brain Research*, *93*, 11-24.
- Willis-Owen, S. A. G., & Flint, J. (2007). Identifying the genetic determinants of emotionality in humans; insights from rodents. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, *31*, 115-124.
- Yalcin, B., Willis-Owen, S. A., Fullerton, J., Meesaq, A., Deacon, R. M., Rawlins, J. N. P., Copley, R. R., Morris, A. P., Flint, J., & Mott, R. (2004). Genetic dissection of a behavioral quantitative trait locus shows that *Rgs2* modulates anxiety. *Nature Genetics*, *36*, 1197-1202.
- Ying-Jui, H., Eichendorff, J., & Schwarting, R. K. W. (2002). Individual response profiles of male Wistar rats in animal models for anxiety and depression. *Behavioural Brain Research*, *136*, 1-12

**Tabla 1.** Descriptivos de las variables conductuales en los diferentes tests de ansiedad en las ratas N/Nih-HS (n=143)

|   | Mean $\pm$ SEM  |
|---|-----------------|
| Caja Blanca-Negra   |                 |
| Latencia de entrada en el compartimiento blanco (s)                                   | 133,3 $\pm$ 9,9 |
| # Entradas en compartimiento blanco   | 2,3 $\pm$ 0,2   |
| Tiempo pasado en el compartimiento blanco (s)   | 36,2 $\pm$ 3,5  |
| # Posturas de evaluación del riesgo   | 5,5 $\pm$ 0,2   |
| Laberinto Elevado en "Cero"   |                 |
| Latencia de entrada en una sección abierta (s)  | 74,9 $\pm$ 8,9  |
| # Entradas en secciones abiertas  | 4,3 $\pm$ 0,3   |
| Tiempo pasado en secciones abiertas (s)   | 61,8 $\pm$ 4,6  |
| # Posturas de evaluación del riesgo   | 7,7 $\pm$ 0,3   |
| Tiempo de posturas de evaluación del riesgo (s)                                       | 35,8 $\pm$ 1,6  |
| % Tiempo en secciones abiertas  | 23,6 $\pm$ 1,7  |
| Adquisición de la evitación activa en dos sentidos en la <i>Shuttlebox</i>            |                 |
| Latencia media de respuesta (s)   | 11,7 $\pm$ 0,3  |
| # Evitaciones 10 ensayos  | 0,2 $\pm$ 0     |
| # Evitaciones 20 ensayos  | 1,6 $\pm$ 0,2   |
| # Evitaciones 40 ensayos  | 7,9 $\pm$ 0,6   |
| # Cruces entre ensayos  | 23,1 $\pm$ 1,5  |
| Conducta de petrificación ( <i>Freezing</i> ) primeros 5 intervalos entre ensayos (s) | 216,2 $\pm$ 6,2 |

**Tabla 2.** Correlaciones entre las variables de los diferentes tests de ansiedad (A) y regresión múltiple para las variables de “evitación” (B) en las ratas N/Nih-HS (n=143)

**A) Correlaciones**

|             | CBN-E  | CBN-T  | CBN-PER | LC-E   | LC-T   | LC-% T | LC-PER | LC-T PER | SH-EV 10 | SH-EV 20 | SH-EV 40 | SH-LAT  | SH-C   | SH-PETR |
|-------------|--------|--------|---------|--------|--------|--------|--------|----------|----------|----------|----------|---------|--------|---------|
| CBN-E       | 1      |        |         |        |        |        |        |          |          |          |          |         |        |         |
| CBN-T       | ,70*** | 1      |         |        |        |        |        |          |          |          |          |         |        |         |
| CBN-PER     | ,52*** | ,14    | 1       |        |        |        |        |          |          |          |          |         |        |         |
| LC-E        | ,51*** | ,43*** | ,30***  | 1      |        |        |        |          |          |          |          |         |        |         |
| LC-T        | ,45*** | ,41*** | ,26**   | ,83*** | 1      |        |        |          |          |          |          |         |        |         |
| LC-% T      | ,45*** | ,40*** | ,29***  | ,86*** | ,99*** | 1      |        |          |          |          |          |         |        |         |
| LC-PER      | ,17*   | ,08    | ,29***  | ,52*** | ,29*** | ,36*** | 1      |          |          |          |          |         |        |         |
| LC-T PER    | ,02    | -,07   | ,32***  | ,22**  | ,06    | ,15    | ,74*** | 1        |          |          |          |         |        |         |
| SH-EV10     | ,15    | ,01    | -,01    | ,23**  | ,21**  | ,21**  | ,05    | -,09     | 1        |          |          |         |        |         |
| SH-EV20     | ,16    | ,09    | ,04     | ,23*** | ,18*   | ,18*   | ,07    | -,06     | ,47***   | 1        |          |         |        |         |
| SH-EV40     | ,16    | ,07    | ,03     | ,16    | ,15    | ,13    | -,05   | -,19*    | ,31***   | ,78***   | 1        |         |        |         |
| SH-LAT      | -,13   | -,02   | -,01    | -,15   | -,13   | -,12   | ,08    | ,14      | -,24**   | -,62***  | -,73***  | 1       |        |         |
| SH-C        | ,17*   | ,08    | -,02    | ,15    | ,13    | ,11    | -,08   | -,19*    | ,30***   | ,72***   | ,74***   | -,65*** | 1      |         |
| SH-PETR (#) | -,11   | -,24   | ,11     | ,02    | -,16   | -,15   | ,05    | ,06      | ,02      | -,38**   | -,43**   | ,44**   | -,46** | 1       |

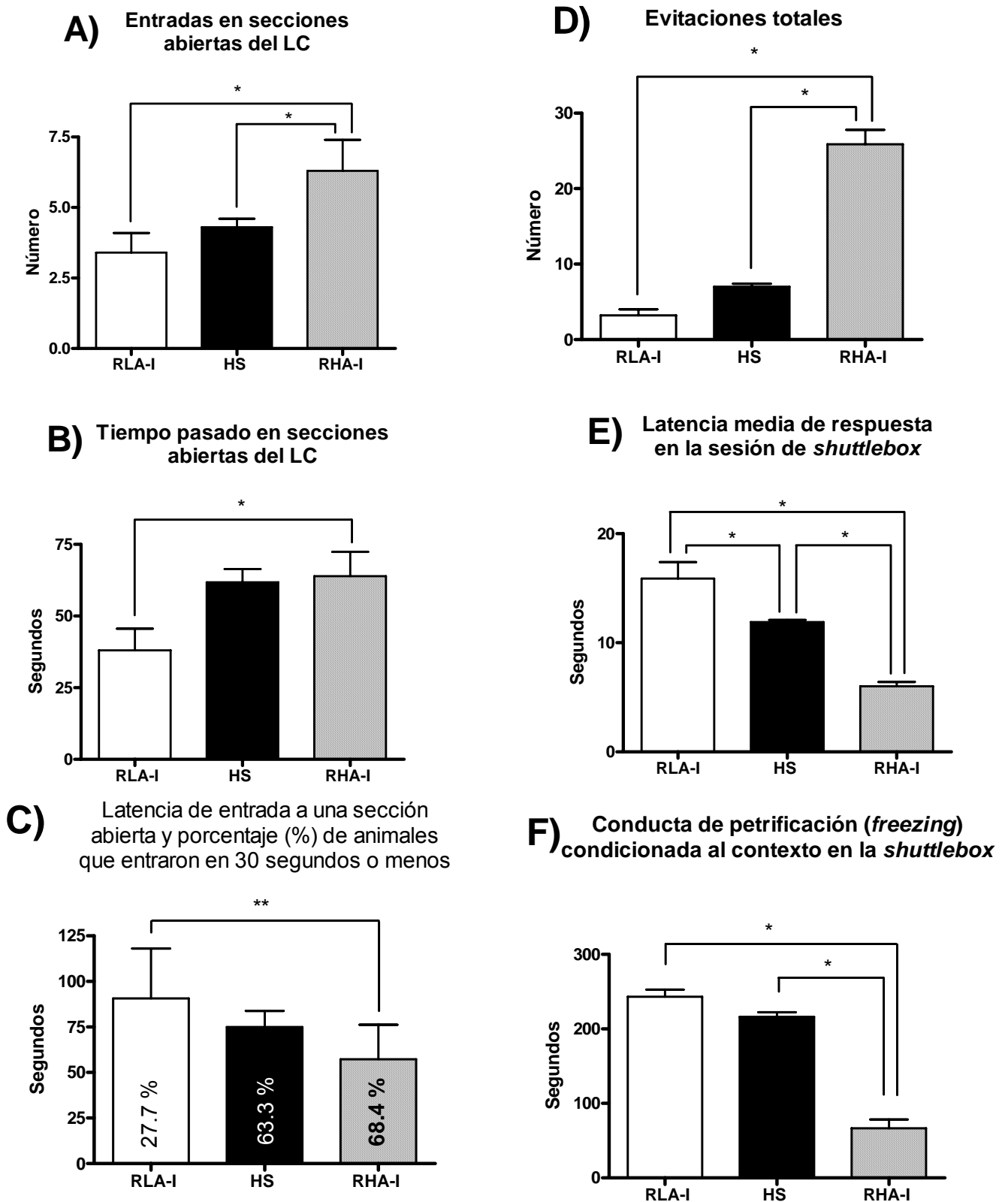
**B) Regresión múltiple (stepwise).**

| Variable dependiente           | Paso | Variable predictora  | R acumulada | p     |
|--------------------------------|------|--|-------------|-------|
| # Evitaciones a los 10 ensayos | 1    | # Entradas en las secciones abiertas en el Laberinto Elevado en "Cero" | 0,26        | 0,003 |
| # Evitaciones a los 20 ensayos | 1    | # Entradas en las secciones abiertas en el Laberinto Elevado en "Cero" | 0,22        | 0,011 |
| # Evitaciones a los 40 ensayos | 1    | # Posturas de evaluación del riesgo en el Laberinto Elevado en "Cero"  | 0,2         | 0,021 |
|                                | 2    | # Entradas en las secciones abiertas del Laberinto Elevado en "Cero"   | 0,29        | 0,003 |

**Tabla 2. A)** Correlaciones entre las variables de los diferentes tests de ansiedad en las ratas N/Nih-HS (n=143). CBN-E, entradas (n) en la Caja Blanca-Negra; CBN-T, tiempo pasado (s) en el compartimento blanco; CBN-PER posturas de evaluación del riesgo (n); LC-E, entradas en las secciones abiertas (n) en el Laberinto Elevado en “Cero”; LC-T, tiempo pasado (s) en las secciones abiertas; LC-%, porcentaje de tiempo pasado en las secciones abiertas; LC-PER, posturas de evaluación del riesgo (n); SH-EV10, evitaciones a los 10 ensayos (n); SH-EV20, evitaciones a los 20 ensayos (n); SH-EV40, evitaciones a los 40 ensayos (n); SH-LAT, latencia media de respuesta en la *Shuttlebox* (s); SH-C cruces entre ensayos; SH-PETR, conducta de petrificación (s).

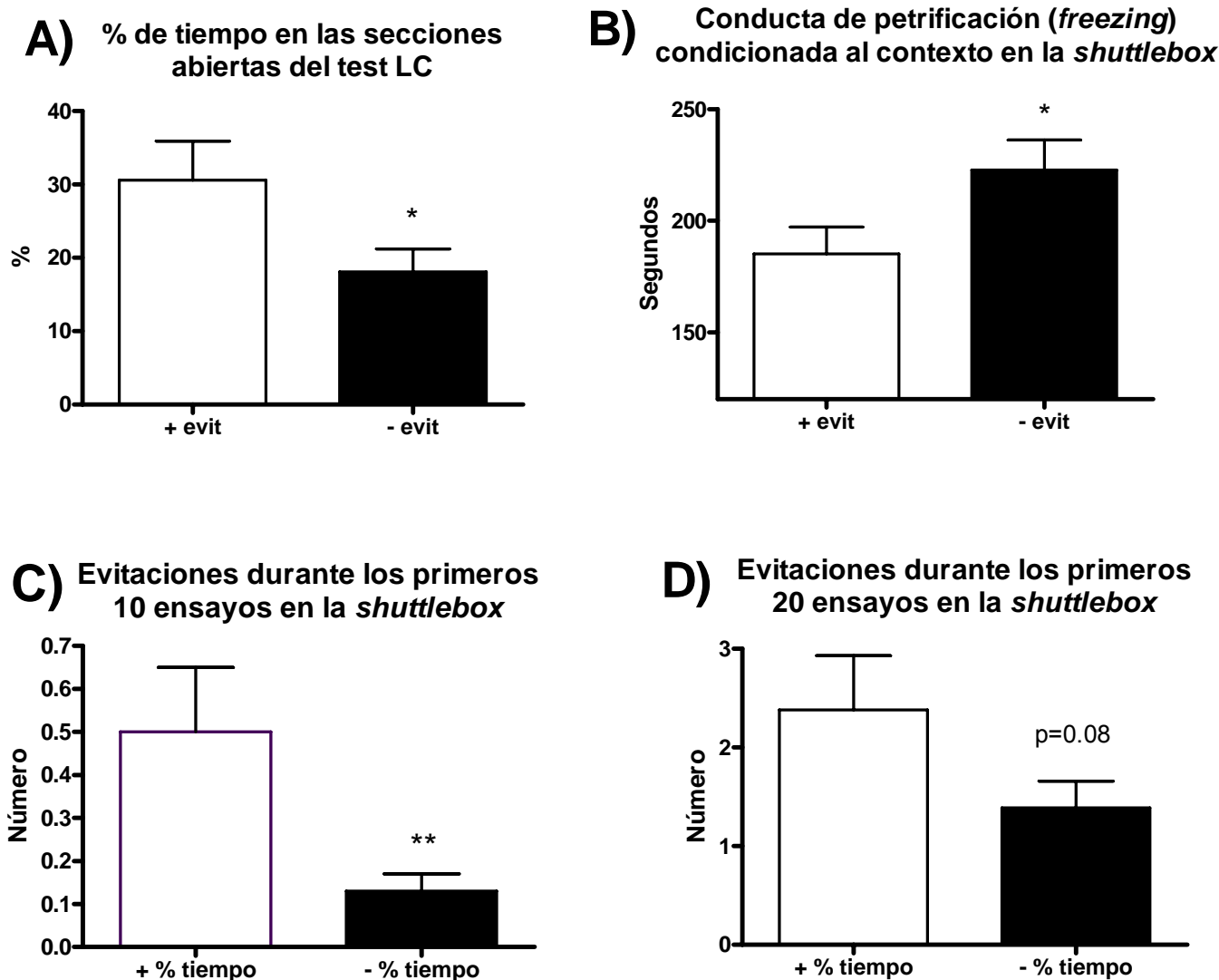
\*  $p \leq 0.05$ , \*\*  $p \leq 0.01$ , \*\*\*  $p \leq 0.001$ , Coeficiente de correlación de Pearson. Se destacan en negrita las correlaciones  $> 0.25$  y enmarcadas en un recuadro, las correlaciones más relevantes entre variables del LC (ansiedad espontánea) y la sesión de SH (ansiedad condicionada). (#) Para la conducta de petrificación (SH-PETR) n=46.

**B)** Análisis de regresión múltiple (*stepwise*) para las variables de los tests incondicionados y de evitación (parciales y totales) en las ratas N7Nih-HS (n=143).



**Figura 1. A-C)** Comparación, en variables de ansiedad incondicionada, entre las ratas N/Nih-HS (n=143) y las ratas RHA-I (n=18) y RLA-I (n=19). Se presentan medias  $\pm$  error estándar, y significación de la prueba de Duncan (tras ANOVA significativo) en la Fig 1A. Se presenta la prueba t de Student entre los grupos RHA-I y RLA-I en la Fig. 1B. Para la gráfica 1C, se presenta prueba de Chi-cuadrado. \*  $p \leq 0.05$ , \*\*  $p \leq 0.01$ .

**D-F)** Comparación, en variables de la prueba de evitación activa, entre las ratas N/Nih-HS (n=143) y las ratas RHA-I (n=18) y RLA-I (n=19). Se presentan medias  $\pm$  error estándar, y significación de las pruebas de Duncan (tras ANOVA significativo). \*  $p \leq 0.05$ .



**Figura 2. A-B)** Medias  $\pm$  error estándar de variables de evitación activa en dos sentidos en ratas N/Nih-HS que presentan valores extremos en porcentaje de tiempo transcurrido en las secciones abiertas del test Laberinto Elevado en “Cero”. Los grupos extremos fueron seleccionados por presentar valores en la variable “% de tiempo en secciones abiertas” una desviación estándar por encima (“+ % tiempo”) o por debajo (“- % tiempo”) de la media de % de tiempo de todo el grupo (media= 23.6, desviación estándar= 20.3). \*\* $p \leq 0.01$ , Prueba t de Student. **C-D)** Medias  $\pm$  error estándar de la variable “% de tiempo en secciones abiertas” del test LC (A) y “tiempo de petrificación condicionada al contexto” en la *Shuttlebox* (B) en ratas N/Nih-HS que presentan valores extremos en adquisición de la evitación activa en dos sentidos. Los grupos extremos fueron seleccionados por presentar un número de evitaciones totales una desviación estándar por encima (“+ evit”) o por debajo (“- evit”) de la media de evitaciones totales de todo el grupo (media= 7.9 y desviación estándar= 7.0). \*  $p \leq 0.05$ , Prueba t de Student.



# Ansiedad y Estrés

ISSN 1134-7537

## Editores

Antonio Cano Vindel, U. Complutense  
Juan J. Miguel Tobal, U. Complutense

## Director

Antonio Cano Vindel, U. Complutense

## Ayudantes

Julia Vidal Fdez. José Martín Salguero

## Consejo de Redacción

Esther Calvete Zumalde, U. Deusto  
Pablo Fernández Berrocal, U. Málaga  
Enrique G. Fdez.-Abascal, UNED  
Héctor González Ordí, U. Complutense  
José M. Hernández López, U.A. Madrid  
Iciar Iruarizaga Díez, U. Complutense  
Jesús Martín García, U. Complutense  
Francisco Miguel Tobal, U. Complutense  
Javier Pérez Pareja, U. Islas Baleares  
Albert Sesé Abad, U. Islas Baleares

## Consejo Editorial

José M<sup>o</sup> Arredondo, U. Complutense  
José L. Ayuso Gubémez, U. Complutense  
Américo Baptista, U. Lusófona (Portugal)  
José Bermúdez, UNED  
Gualberto Buéla Casal, U. Granada  
Helio Carpintero, U. Complutense  
José Antonio Carrobes, U.A. Madrid  
Charles S. Carver, U. Miami (USA)  
Jean Cottraux, H. Neurologique, Lyon (Francia)  
Enrique Echeburúa, U. País Vasco  
Michael W. Eysenck, U. Londres (G.B.)  
Rocío Fernández-Ballesteros, U.A. Madrid  
Jordi Fernández Castro, U. A. Barcelona  
Sandro Galea, U. Michigan (USA)  
Aldo Galeazzi, U. Padua (Italia)  
Vicente Garrido Genovés, U. Valencia  
Manuel Gutiérrez Calvo, U. de la Laguna  
Stevan E. Hobfoll, Kent State University (USA)  
Francisco J. Labrador, U. Complutense  
Juan Mayor, U. Complutense  
Francisco Martínez Sánchez, U. Murcia  
Xavier Méndez Camillo, U. Murcia  
Manuel Muñoz López, U. Complutense  
G. Pérez Mango Hospital G. Marañón, Madrid  
José María Peiró Silla, U. Valencia  
José Luis Pinillos, U. Complutense  
José M<sup>o</sup> Prieto Zamora, U. Complutense  
Antonio Puente, U. N. Carolina Wilmington (USA)  
Jesús Rodríguez Marín, U. M. Hernández  
Stanley Rosenberg, Dartmouth M.S. (USA)  
Marisa Salanova Soria, U. Castellón  
Pilar Sánchez López, U. Complutense  
Ralf Schwarzer, Freie U. Berlin (Alemania)  
Fernando Silva Moreno, U. Complutense  
Charles D. Spielberger, U. S. Florida (USA)  
Manuel Valdés, U. Barcelona  
H. M. Van der Ploeg, U. Amsterdam (Holanda)  
Jaime Vila Castelar, U. Granada

## Ansiedad y Estrés

Facultad de Psicología, Buzón 23  
Universidad Complutense de Madrid  
28223 Madrid

Tel. +34 91 394 31 11  
Tel. +34 91 394 30 23  
Tel. +34 91 394 30 24  
Fax: +34 91 394 31 89  
E.Mail: ansiedad.e@psi.ucm.es  
Web: www.ucm.es/info/seas/revista

Regina López-Aumatell  
Unidad de Psicología Médica  
Dep. Psiquiatría y Medicina Legal  
Instituto de Neurociencias, Facultad de Medicina  
Universidad Autónoma de Barcelona  
08193-Bellaterra, Barcelona, España

Don Antonio Cano Vindel, Editor y Director de la revista "Ansiedad y Estrés", una revista multidisciplinar de psicología, medicina, neurociencias y ciencias sociales,

## HACE CONSTAR:

Que el artículo cuyo título y autores se detallan más abajo ha concluido el proceso de revisión, llevado a cabo por diferentes revisores anónimos, y ha sido aceptado para su publicación en un próximo número de esta revista (Año: 2008, Volumen: 14).

**Título:** ANSIEDAD EN RATAS GENETICAMENTE HETEROGENEAS: HACIA LA IDENTIFICACIÓN DE GENES PARA CARACTERES CONDUCTUALES CUANTITATIVOS

**Autores:** Regina López-Aumatell, Elia Vicens-Costa, Marc Guitart-Masip, Esther Martínez-Membrives, William Valdar, Martina Johannesson, Toni Cañete, Gloria Blázquez, Lydia Giménez-Llort, Jonathan Flint, Adolf Tobeña, Alberto Fernández-Teruel

Para que así conste donde convenga y a petición del interesado, firmo la presente, en Madrid a 22 de abril de 2008.



Fdo.: Dr. Antonio Cano Vindel  
Editor y Director

## **Article IV**

**UNLEARNED ANXIETY PREDICTS LEARNED FEAR:  
A STUDY WITH HETEROGENEOUS RATS  
AS COMPARED WITH THE ROMAN RAT STRAINS**

**Regina López-Aumatell, Elia Vicens-Costa, Marc Guitart-Masip, Esther Martínez-Membrives, William Valdar, Martina Johannesson, Toni Cañete, Gloria Bázquez, Lydia Giménez-Llort, Peter Driscoll, Jonathan Flint, Adolf Tobeña, Alberto Fernández-Teruel.**

Medical Psychology Unit, Department of Psychiatry & Forensic Medicine, Institute of Neurosciences, School of Medicine, Autonomous University of Barcelona, 08193-Bellaterra, Barcelona, Spain.

\* Welcome Trust Centre for Human Genetics, University of Oxford, Oxford Roosevelt Drive, Oxford OX3 7BN, UK.

**Correspondence:** Regina López-Aumatell. E-mail: regina.lopez@uab.es

## **1. INTRODUCTION**

The use of inbred rodent strains over the past three decades has promoted very important progress in neuroscience and neurogenetic research. However, outbred rodent stocks have contributed and continue to contribute enormously to our knowledge about biobehavioral traits. In this regard, a strong case for the use of genetically heterogeneous (outbred) stocks comes from the recent demonstration that these rodent stocks are an unique resource to achieve fine genome-wide genetic mapping of QTLs (“Quantitative Trait Loci”), that is to say, to elucidate even very small genetic influences on the variance (explaining even less than 2% of it) of quantitative phenotypic (behavioral or biological) characters/traits (e.g. Mott and Flint 2002; Mott *et al.* 2000; Valdar *et al.* 2006a), to the point that these QTLs can represent chromosomal intervals of  $\leq 1$ cM, thus even allowing gene identification (Yalcin *et al.* 2004) as well as the molecular study of epistatic and gene-environment interactions (Valdar *et al.* 2006b). The aforementioned works with HS mice are the best recent examples of how and to what extent using genetically heterogeneous rodent stocks is becoming crucial for genetically-oriented studies that should provide extremely relevant understanding on the genetically-based psycho- and neurobiological influences on complex biobehavioral traits. There is no reason to think that the same, or even greater advances could not be achieved by the use of genetically heterogeneous rats.

Hansen and Spuhler (1984) developed a genetically heterogeneous rat stock, the “National Institutes of Health -N/Nih- Genetically Heterogeneous Rat Stock” (N/Nih-HS rats), through an eight-way cross of as much as possible separate inbred strains which were readily available at that time. These eight parental strains were: the MR/N, WN/N and WKY/N (these three strains trace their ancestry to the original Wistar stock); the M520/N and F344/N (both established

in the 1920s, but of unknown origin); the ACI/N (hybrid between the August and Copenhagen strains), the BN/SsN (derived from a color mutant from a stock of wild rats kept at the Wistar Institute) and the BUF/N strain (Hansen and Spuhler 1984).

The phenotypes showed by N/Nih-HS rats in up to 16 ethanol-related traits lend initial support to the effectiveness of the program, as for all traits except one the values of the heterogeneous stock were within the high and low values of the eight parental inbred strains (Hansen and Spuhler 1984, Spuhler and Deitrich 1984). Successful selection studies have also been carried out, departing from the N/Nih-HS rat stock, by breeding divergent lines of rats on the basis of their extreme values in, for instance, sensitivity to acute ethanol (Draski *et al.* 1992), aerobic running capacity (Koch and Britton 2001) and for serotonin-1A sensitivity (Overstreet *et al.* 1994).

Within the context of a study on the genetic basis of anxiety/fearfulness (i.e. a QTL fine mapping study which is currently under way), in a previous work we characterized the N/Nih-HS rat stock (n=787 rats of both sexes) in a battery of novelty-related exploration and anxiety/fearfulness tests for the first time (López-Aumatell *et al.* 2007). Factor analyses of the data showed a basic two-fold structure in which Factor 1 (named “Timidity”) grouped unlearned fear measures (from the “light-dark” box and the “elevated ‘zero’ maze”) and acquisition of two-way active avoidance (only in males), while Factor 2 (named “Defensive Flight”) was mainly composed of baseline and fear-potentiated acoustic startle plus acquisition of two-way avoidance (López-Aumatell *et al.* 2007).

Thus, taking advantage of the aforementioned study and as a further step in the same direction, the aims of the present work were: (1) to achieve a better characterization of N/Nih-HS rats with regard to their levels of (unlearned) anxiety and learned fear as compared to rat strains with

divergent profiles in those phenotypes (see below), and (2) to better study the relationships among different unlearned and learned anxiety/fear measures in heterogeneous rats.

For the first of those objectives, i.e. to compare N/Nih-HS rats with other rat strains with divergent anxious profiles, we have chosen the psychogenetically-selected inbred Roman rat strains, given the difficulties to obtain the 8 original parental inbred strains from which the N/Nih-HS stock was derived (two of these parental strains are not in existence, and some of the others are not the originals) and to maintain them in our resources. We have decided to make limited comparisons between both Roman rat strains (which are readily available at our laboratory colony resources) and the N/Nih-HS stock because such comparisons can still be informative provided that the Roman strains show extreme scores in some of the most relevant behavioral tasks used. In fact, the Roman rat strains have been selected for their very good (Roman High-Avoidance, RHA-I) vs extremely poor (Roman Low-Avoidance, RLA-I) acquisition of the two-way active (shuttle box) avoidance response (Driscoll and Bättig 1982; Driscoll et al 1998; Escorihuela et al 1995, 1999), but also show, as a consequence of that psychogenetic selection, very divergent responses to anxiety/fear-inducing and to stressful situations. In that sense, it has been known for many years that the RHAs (either outbred or inbred) consistently display lower behavioural and neuroendocrine responses to anxiogenic or stressful situations than their RLA counterparts (e.g. Aguilar *et al.* 2000; Carrasco *et al.* 2008; Driscoll et al 1998; Escorihuela et al 1997, 1999; Fernández-Teruel et al 1991, 1992a,b, 1997; Ferre et al 1995; Lopez-Aumatell et al 2005; Steimer *et al.* 1997; Steimer and Driscoll 2003a,b). In particular, and for the sake of comparison with the heterogeneous rat stock, the RHA-I and RLA-I strains display rather extreme values not only in shuttle box avoidance acquisition (their selection criterion; e.g. Driscoll *et al.* 1998; Escorihuela *et al.* 1999; Aguilar *et al.* 2004) but also in baseline and shock-potentiated acoustic startle (e.g. Aguilar *et al.* 2000; Lopez-Aumatell *et al.* 2005), in classical fear (freezing) conditioning (e.g. Aguilar 2002; Fernández-Teruel *et al.* 1998; Lopez-Aumatell *et al.* 2005) and in activity/exploration measures in various (typically used) unlearned anxiety tests, as several light-dark testing procedures (black-white box, hexagonal light-dark tunnel labyrinth; Fernández-Teruel *et al.* 2002; Steimer and Driscoll 2003; Steimer *et al.* 1998) and the elevated plus-maze in some studies (e.g. Driscoll *et al.* 1998; Escorihuela *et al.* 1999; Steimer and Driscoll 2003; but see controversial

results in Chaouloff et al Yilmazer-Hanke *et al.* 2002).

The test battery used comprises novelty-induced exploratory activity, the “elevated zero maze” test of anxiety and the baseline acoustic startle test. As conditioned anxiety/fear tests, we have used two well-validated models, i.e. the fear-potentiated startle test and the acquisition of two-way active avoidance in a shuttle box.

## 2. MATERIALS AND METHODS

### 2.1- Animals

The subjects were 277 male N/Nih-HS rats (“National Institutes of Health Genetically Heterogeneous Rat Stock”, see Hansen and Spuhler 1984; the progenitors were kindly provided by Dr. Eva Redei, Center for Comparative Medicine, Northwestern University, Chicago, USA). Male RHA-I and RLA-I rats from our laboratory colony in Barcelona were also used. Subjects were approximately 4 months old at the beginning of the experiments (weight: 350-400 g). They were housed in pairs in macrolon cages (50 x 25 x 14 cm) and maintained with food and tap water available ad lib, under conditions of controlled temperature (22±2° C) and a 12-h light-dark cycle (lights on at 08:00 h). The RHA-I and RLA-I groups had rats from at least 7 different litters, while N/Nih-HS group had rats from 40 different litters.

### 2.2- Procedure and apparatus

Experiments were performed during the light cycle, between 09:00 and 19:00 h and in accordance with the Spanish legislation on “Protection of Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes” and the European Communities Council Directive (86/609/EEC) on this subject. Five behavioural tests were administered along a 2.5 month period, with 2-3 weeks elapsing between each two consecutive tests. The sequence and the characteristics of the tests were as follows:

**Automated novel-cage activity (NACT).** The apparatus (Panlab, Barcelona, Spain) consisted of a horizontal surface (50 x 50 cm) provided with photobeams that detect movement and measure it automatically, loading the data in a computer. The subjects were placed in transparent plexiglas cages (40x40x40 cm). They were situated in a white fluorescent (60 w) illuminated chamber. Spontaneous horizontal activity and total defecation boluses were measured for 5 minutes (*ACT-DIST5; measure of novelty-induced –open filed-like- activity*).

### ***Elevated “zero-maze” (ZM).***

The maze, similar to that described by Shepherd *et al.* (1994), comprised an annular platform (105 cm diameter; 10 cm width) made of black plywood and elevated to 65 cm above the ground level. It had two open sections (quadrants) and two enclosed ones (with walls 40 cm height). The subject was placed in an enclosed section facing the wall. The apparatus was situated in a black testing room, dimly illuminated with red fluorescent light, and the behavior was videotaped and measured outside the testing room. Latency to enter into an open section (*ZM-LAT*), time spent in the open sections (*ZM-T*), number of entries in the open sections (*ZM-E*), number of stretched attend postures (*ZM-SAP*), number of crossings (*ZM-C*), number of “head dips” (*ZM-HD*) and number of defecation boluses (*ZM-D*) were measured for 5 minutes. (see Pähkla *et al.*, 2000; Shepherd *et al.*, 1994).

### ***Baseline acoustic startle response (BAS) and fear potentiated startle (FPS).***

Four sound-attenuated boxes (Sr-Lab Startle Response System, San Diego Inst., San Diego, USA) were used. Each box housed a plexiglas cylinder with a grid placed in the bottom. For any test session each animal was placed in the cylinder, and movements of the cylinder resulting from startle responses were transduced by an accelerometer into a voltage which was amplified, digitized and saved into a computer for analysis. A white noise generator provided background noise of 55 dB in the unlit chambers. Acoustic stimuli of 105 dB and 50 ms were delivered by a loudspeaker, mounted at a distance of 23 cm above the plexiglas cylinder. Startle response amplitude was defined as the maximum accelerometer voltage during the first 200 ms after the startle stimulus onset.

The BAS + FPS procedure involved 4 phases, carried out in 2 consecutive days as follows:

#### ***Day 1: Baseline acoustic startle (BAS-1) and conditioning.-***

For the baseline startle session (BAS-1; administration of the startle stimulus alone), and after 5 min of familiarization to the startle chamber, each rat was exposed to 30 acoustic stimuli of 105 dB (50 ms duration) with an ITI of 30 s. BAS-1 session was immediately followed by the conditioning phase, which consisted of 10 trials. Each conditioning trial consisted of presentation of an acoustic stimulus (70 dB; conditioned stimulus –CS-) of 3.2 s after which a 0.6-mA shock was delivered through the grid, which continued with the acoustic stimulus for a further 0.5 s. Every 2 consecutive trials were separated by an ITI of 30 s.

#### ***Day 2: Baseline acoustic startle (BAS-2) and fear-potentiated startle (FPS).-***

In the 2<sup>nd</sup> day, 24 hours after the conditioning session, the BAS-2 session was administered with the same parameters as in BAS-1 session (see above) except for the fact that 40 trials were performed in BAS-2. This phase was immediately followed by FPS testing, which consisted of administration, in a pseudorandom order, of 20 acoustic stimuli (105 dB, 50 ms) alone and 20 of these stimuli preceded by the CS (70 dB, 3.7 s). ITI was 30 s along the whole FPS test session.

The average response difference between those 20 “alone” trials and those 20 trials preceded by the CS is considered the measure of cue-conditioned fear-potentiated startle (FPS) (see Aguilar *et al.* 2002; Davis *et al.*, 1993).

### ***Two-way active, Shuttlebox avoidance acquisition (SHAV).***

The experiment was carried out with three identical *Shuttleboxes* (Letica, Panlab, Barcelona, Spain), each placed within independent, sound-attenuating boxes constructed of plywood. A dim and diffuse illumination was provided by a fluorescent bulb placed behind the opaque wall of the *Shuttleboxes*. The experimental room was kept dark. The *Shuttleboxes* consisted of two equally sized compartments (25x25x28 cm), connected by an opening (8x10 cm). A 2400-Hz, 63-dB tone plus a light (from a small, 7-W lamp) functioned as the CS (conditioned stimulus). The US (unconditioned stimulus), which commenced at the end of the CS, was a scrambled electric shock of 0.7 mA delivered through the grid floor. Once the rats were placed into the *Shuttlebox*, a 4-min familiarization period elapsed before training commenced. Each training trial consisted of a 10-s CS, followed by a 20-s US. The CS or US was terminated when the animal crossed to the other compartment, with crossing during the CS being considered as an avoidance response and during the US as an escape response. Once a crossing had been made or the shock (US) discontinued, a 60-s intertrial interval (ITI) was presented during which crossings (ITC) were also scored. Training consisted of a single 40-trial session.

The variables recorded were the total number of avoidances (*SHAV40*), the number of inter-trial crossings (*SHAV-ITC40*) and the average response latency for the whole training session (*SHAV-LAT40*) (see Aguilar *et al.* 2002; Fernández-Teruel *et al.*, 1991).

### **2.3- Statistical analysis**

Oneway ANOVAs for the three experimental groups, Duncan's tests for comparisons between groups when appropriate (i.e. after significant anova), and Student's t-tests for independent samples for comparisons between RHA-I and RLA-I groups to test for the *a priori* predicted between-strain differences, were used (SPSS Windows, 9.0.1, SPSS Inc; USA). Student's t-tests (for independent samples) were also used to evaluate differences between the behaviourally extreme groups (according to their extreme values --i.e. mean  $\pm$  1 standard deviation-- in the selected/target variables).

Finally, a correlation matrix and factorial analysis were carried out with the most relevant variables from each test, followed by a step-wise multiple regression analysis.

## DISCUSSION

The present report shows the results of an extensive behavioural evaluation of N/Nih-HS rats in a battery of anxiety/fearfulness behavioral tests. The results of this study constitute an outstanding support to our previous multitest behavioural characterization of the heterogeneous rat stock (Lopez-Aumatell *et al.* 2008), as the pattern of correlations among measures, as well as the factorial and regression analyses show a remarkable consistency between both studies. Still, the present work adds new and important information regarding some behavioural characteristics of N/Nih-HS rats by showing which is the position of these heterogeneous rats in regard to their "timidity" and/or "defensive" behavioural profiles in comparison with two inbred strains which are very divergent in those traits (i.e. the RHA-I and RLA-I rat strains). Moreover, the present study provided also the possibility of analyzing to what extent unlearned anxiety/emotionality (i.e. novel-cage activity, behaviour in the elevated "zero" maze and baseline acoustic startle) and learned fear-related behaviours (i.e. fear-potentiated startle and acquisition of shuttle box avoidance) show relationships between them.

In short, the results show for the first time that: 1) In measures of novel-cage (i.e. open-field-like) activity, "latency to the first entry into an open section", "number of entries into open sections" and "time spent in open sections" of the "elevated 'zero' maze" test of anxiety, the N/Nih-HS rat stock very much parallels the scores of RLA-I rats, which, in turn, are more anxious than the RHA-I strain according to those behavioural parameters; 2) In the acoustic startle paradigm the Roman strains also show extremely divergent scores, with the RLA-I strain displaying high

levels of baseline startle (BAS-1 variable, mean = 703.2) and clear fear potentiation of startle (average of 116.9) while RHA-I rats do not show it (mean = 122.9 and 9.8, for BAS-1 and FPS respectively). Under our present conditions the N/Nih-HS rats fall in the middle of both Roman rat strains regarding baseline startle (average of 379.9) while they actually display significant fear-potentiated startle (mean = 54.2), thus qualitatively resembling (or being much closer to) RLA-I rats in that respect. 3) The level of avoidance acquisition of N/Nih-HS rats (7 avoidances on average, in a 40-trial session) is also similar to that of RLA-I rats (3 avoidances), and considerably lower than the (usual) scores of RHA-I (average  $\geq$ 25 avoidances in 40 trials) or SD rats (usually a range of 10-18 avoidances in 40 trials, according to a number of studies carried out at our laboratory with SD rats; data not shown; but see for instance [4, 8, 13, 17-19, 46, 47]). 4) N/Nih-HS rats display levels of context conditioned freezing (mean = 233 s), during the initial 5 trials of the two-way avoidance task, which are close to those observed in RLA-I rats (approximately 263 s), while RHA-I rats show much lower average freezing levels (86 s approximately). 5) By comparing subgroups of N/Nih-HS rats showing extremely low or high values (1 standard deviation below or above the mean) of some relevant variables it can be observed that some (extreme) unlearned anxiety behaviours are predictive of scores in learned fear-related scores.

Of special interest is, because it the first report on this association, the fact that extreme scores in "entries into the open sections" (in the ZM test) predict in a hypothetically congruent way the level of fear (or performance) that rats will show in the fear-potentiated startle test and in the acquisition of the two-way shuttle box avoidance task. That variable, "entries into the open sections", appears as one of the best and more coherent predictors of conditioned/learned variables, as it is also positively associated with avoidance acquisition in the factorial analysis and negatively related to fear-potentiated startle in the multiple regression analysis.

Similarly, baseline (unconditioned) acoustic startle (especially BAS-1) appears as a powerful predictive variable, as extreme values lead to divergent (and statistically different) levels of fear-potentiated startle and shuttle box avoidance acquisition (see Fig. 5 and Tables 2-4). However, FPS scores do not appear to be related to two-way shuttle box avoidance acquisition.

While the relationships between unlearned anxiety/fearfulness, i.e. "entries" and/or "time spent" into the open sections of the ZM test (as

well as activity in the novel cage), and fear-potentiated startle or shuttle box avoidance acquisition could be hypothetically expected (although, with the exception of the present study, they have not been demonstrated thus far), the associations observed between baseline startle responses and shuttle box avoidance acquisition are relatively unexpected, especially because they tend to indicate that the higher the startle responses the better the acquisition of shuttle box avoidance. As discussed in our previous related study (Lopez-Aumatell et al 2008), these relationships might be indicating that a certain degree of “startling” reactivity/responses are beneficial for animals to acquire the shuttling response in the two-way avoidance task especially when the initial conflict (i.e. fleeing vs freezing; active avoidance vs passive avoidance), involved in the first part of the session and leading to conditioned freezing behavior, begins to fade and thus shuttling responses start to be more frequent (see Lopez-Aumatell et al 2008). This would mean, nevertheless, that the neural mechanisms involved in both fear-driven responses, i.e. startle and two-way avoidance, are different or act in different ways in both situations. Provided the novelty of these results (jointly with our previous work; Lopez-Aumatell et al 2008), these findings will deserve further investigation.

Meanwhile, a differential neuroregulation of both fear-conditioning-related responses (i.e. baseline and fear-potentiated startle and two-way avoidance acquisition) is actually supported by several findings indicating that the septohippocampal system, the amygdala-related circuitry and the dopaminergic mesocorticolimbic circuitry are differently involved in those behavioural paradigms (see [10, 29, 32, 37, 38, 41, 44, 45, 50, 53, 54, 57, 63, 64]).

Taking into account that N/Nih-HS rats are likely the most genetically heterogenous in existence (Flint, unpublished data), the present data can serve as a potential reference for future studies with the same as well as with other rat stocks. It would undoubtedly be scientifically relevant, for instance, to evaluate the defensive profile of N/Nih-HS rats in more ethological conditions, as the Blanchards' VBS and its derivations [6, 7, 51]. By doing so, and by comparing them with other laboratory rat strains/stocks, it could be possible to ascertain whether the fearful profiles of the heterogeneous rat stock generalize to those semi-natural (or otherwise more ethological) situations as well as to learn about the relative position of the different stock-related defensive profiles within the existing constellation of laboratory rat strains.

**Acknowledgements:** Supported by grants from the “Ministerio de Ciencia y Tecnología” (SAF2003-

03480), DGR (2005SGR-00885), FPI program (R. L-A) and through EURATools (European Commission Contract no. LSHG-CT-2005-019015).

## REFERENCES

---

- Aguilar R, Gil L, Tobeña A, Escorihuela RM, Fernández-Teruel A (2000) Differential effects of cohort removal stress on the acoustic startle response of the Roman/Verh rat strains. *Behav. Genet.* 30: 71-75.
- Aguilar R (2002). Fearfulness in a large F2 progeny of the Roman rats: Paving the way for QTL'S genes localisation. Doctoral Dissertation. Autonomous University of Barcelona.
- Aguilar R, Gil L, Flint J, Gray JA, Dawson GR, Driscoll P, Gimenez-Llort L, Escorihuela RM, Fernández-Teruel A, Tobeña A (2002) Learned fear, emotional reactivity and fear of heights: A factor analytic map from a large F2 intercross of Roman rat strains. *Brain Res. Bull.* 57: 17-26.
- Aguilar R, Gil L, Gray JA, Driscoll P, Flint J, Dawson GR, Gimenez-Llort L, Escorihuela RM, Fernández-Teruel A, Tobeña A (2003) Fearfulness and sex in F2 Roman rats: males display more fear though both sexes share the same fearfulness traits. *Physiol. Behav.* 78: 723-732.
- Aguilar, R.; Gil, L.; Fernández-Teruel, A.; Tobeña, A. Genetically-based behavioral traits influence the effects of shuttle box avoidance overtraining and extinction upon intertrial responding: a study with the Roman rat strains. *Behav. Process.* 2004, 66: 63-72.
- Belzung C, Le Pape G (1994) Comparison of different behavioral test situations used in psychopharmacology for measurement of anxiety. *Physiol. Behav.* 56: 623-628.
- Blanchard RJ, Blanchard DC, Rodgers J, Weiss SM. (1990) The characterization and modeling of antipredator defensive behavior. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 14: 463-472.
- Blanchard RJ, Yudko EB, Rodgers J, Blanchard DC (1993) Defense system psychopharmacology: an ethological approach to the pharmacology of fear and anxiety. *Behav. Brain Res.* 58: 155-165.
- Boix F, Fernández-Teruel A, Tobeña A (1988) The anxiolytic action of benzodiazepines is not present in handling-habituated rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 31: 541-546.
- Brush FR, Del Paine SL, Pellegrino LJ, Rykaszewski IM, Dess NK, Collins P (1988) CER suppression, passive-avoidance learning, and stress-suppression of drinking in the Siracuse high- and low-avoidance strains of rats (*Rattus norvegicus*). *J. Comp. Psychol.* 102: 337-339.
- Carrasco J, Márquez C, Nadal R, Tobeña A, Fernández-Teruel A, Armario A (2008) Characterization of central and peripheral components of the hypothalamus-pituitary-adrenal axis in the inbred Roman rat strains. *Psychoneuroendocrinology in press.*
- Davis M, Falls WA, Campeau S, Kim M (1993) Fear-potentiated startle: a neural and pharmacological analysis. *Behav. Brain Res.* 58: 175-198.
- Draski LJ, Spuhler KP, Erwin VG, Baker RC, Deitrich RA (1992) Selective breeding of rats differing in sensitivity to the effects of acute ethanol administration. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 16: 48-54.
- Driscoll, P.; Escorihuela, R.M.; Fernández-Teruel, A.; Giorgi, O.; Schwegler, H.; Steimer, T.; Wiersma, A.; Corda, M.G.; Flint, J.; Koolhaas, J.M.; Langhans, W.; Schulz, P.E.; Siegel, J.; Tobeña, A. Genetic selection and differential stress responses. The Roman lines/strains of rats. *Ann. NY Acad. Sci.* 1998, 851: 501-510.
- Escorihuela RM, Fernández-Teruel A, Zapata A, Nuñez JF, Tobeña A (1993) Flumazenil prevents the anxiolytic effects diazepam, alprazolam and adinazolam on the early acquisition of two-way active avoidance. *Pharmacol. Res.* 28: 53-58.
- Escorihuela, R.M.; Fernández-Teruel, A.; Tobeña, A.; Langhans, W.; Bättig, K.; Driscoll, P. Labyrinth exploration. Emotional reactivity, and conditioned fear in young Roman/Verh inbred rats. *Behav. Genet.* 1997, 27: 573-578.
- Escorihuela RM, Fernández-Teruel A, Gil L, Aguilar R, Tobeña A, Driscoll P (1999) Inbred Roman high- and low-avoidance rats: differences in anxiety, novelty seeking and shuttle box behaviors. *Physiol. Behav.* 67: 19-26.
- Fernandes C, Gonzalez MI, Wilson C, File SE (1999) Factor analysis shows that female rat behavior is characterized primarily by activity, male rats are driven by sex and



- anxiety. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 64: 731-738.
- Fernández-Teruel A, Escorihuela RM, Boix F, Tobeña A (1991a) Effects of different handling-stimulation procedures and benzodiazepines on two-way active avoidance acquisition in rats. *Pharmacol. Res.* 24: 273-282.
- Fernández-Teruel A, Escorihuela RM, Nuñez JF, Zapata A, Boix F, Salazar W, Tobeña A (1991b) The early acquisition of two-way (shuttle-box) avoidance as an anxiety-mediated behaviour: psychopharmacological validation. *Brain Res. Bull.* 26: 173-176.
- Fernández-Teruel A, Escorihuela RM, Tobeña A, Driscoll P (1991c) Stress and putative endogenous ligands for benzodiazepine receptors: The importance of characteristics of the aversive situation and of differential emotionality in experimental animals. *Experientia* 47: 1051-1056.
- Fernández-Teruel, A.; Escorihuela, R.M.; Driscoll, P.; Tobeña, A.; Bättig, K. Infantile (handling) stimulation and behavior in young Roman High- and Low-Avoidance rats. *Physiol. Behav.* 1991d, 50: 563-565.
- Fernández-Teruel, A.; Escorihuela, R.M.; Driscoll, P.; Tobeña, A.; Bättig, K. Differential effects of early stimulation and/or perinatal flumazenil treatment in young low- and high-avoidance rats. *Psychopharmacology* 1992a, 108: 170-176.
- Fernández-Teruel, A.; Escorihuela, R.M.; Nuñez, J.F.; Goma, M.; Driscoll, P.; Tobeña, A. Early stimulation effects on novelty-induced behaviour in two psychogenetically-selected rat lines with divergent emotionality profiles. *Neurosci. Lett.* 1992b, 137: 185-188.
- Fernández-Teruel, A.; Escorihuela, R.M.; Castellano, B.; Gonzalez, B.; Tobeña, A. Neonatal handling and environmental enrichment effects on emotionality, novelty/reward seeking, and age-related cognitive and hippocampal impairments: focus on the Roman rat lines. *Behav. Genet.* 1997, 6: 513-526.
- Fernández-Teruel A, Escorihuela RM, Aguilar R, Gil L, Gonzalez B, Castellano B, Driscoll P, Tobeña A (1998) Respuestas de estrés y efectos de La experiencia temprana: Evidencia conductual, fisiológica y neuromorfológica. *Ansiedad y Estrés* 4: 135-170.
- Fernández-Teruel A, Escorihuela RM, Gray JA, Aguilar R, Gil L, Gimenez-Llort L, Tobeña A, Bhomra A, Nicod A, Mott R, Driscoll P, Dawson GR, Flint J (2002) A quantitative trait locus influencing anxiety in the laboratory rat. *Genome Res.* 12: 618-626.
- Ferré, P.; Fernández-Teruel, A.; Escorihuela, R.M.; Driscoll, P.; Corda, M.G.; Giorgi, O.; Tobeña, A. Behavior of the Roman/Verh high -and low- avoidance rat lines in anxiety tests: relationship with defecation and self-grooming. *Physiol. Behav.* 1995, 58: 1209-1213.
- Flaherty CF, Greenwood A, Martin J, Leszczuk M (1998) Relationship of negative contrast to animal models of fear and anxiety. *Anim. Learn. Behav.* 26: 397-407.
- Flint J (2004) The genetic basis of neuroticism. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 28: 307-316.
- Griebel G, Blanchard C, Blanchard R (1996) Evidence that behaviors in the mouse defense test battery relate to different emotional states: A factor analytic study. *Physiol. Behav.* 60: 1255-1260.
- Gray JA (1982) *The Neuropsychology of Anxiety: an enquiry into the functions of the Septo-hippocampal System.* Oxford University Press, Oxford.
- Gray JA, McNaughton N (2000) *The Neuropsychology of Anxiety: an enquiry into the functions of the Septo-hippocampal System,* 2<sup>nd</sup> Edition. Oxford University Press, Oxford.
- Hansen C, Spuhler K (1984) Development of the National Institutes of Health genetically heterogeneous stock. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 8: 477-479.
- Johnston AL, File SE (1991) Sex differences in animal tests of anxiety. *Physiol. Behav.* 49: 245-250.
- Koch LG, Britton SL (2001) Artificial selection for intrinsic aerobic endurance running capacity in rats. *Physiol. Genom.* 5: 45-52.
- Lehmann J, Pryce CR, Feldon J (1999) Sex differences in the acoustic startle response

- and prepulse inhibition in Wistar rats. *Behav. Brain Res.* 104: 113-117.
- Lopez-Aumatell R, Blazquez G, Gimenez-Llort L, Gil L, Aguilar R, Tobeña A, Fernández-Teruel A. (2005) Differences in classical fear conditioning and fear-potentiated startle between the Roman rat strains. *Behavioural Pharmacology* 16 (Suppl.) : 632.
- McNaughton N, Gray JA (2000) Anxiolytic action on the behavioural inhibition system implies multiple types of arousal contribute to anxiety. *J. Affect. Dis.* 61: 161-176.
- McNish KA, Gewirtz JC, Davis M (1997) Evidence of contextual fear after lesions of the hippocampus: A disruption of freezing but not fear-potentiated startle. *J. Neurosci.* 17: 9353-9360.
- Mott R, Flint J (2002) Simultaneous detection and fine mapping of quantitative trait loci using heterogeneous stocks. *Genetics* 160: 1609-1618.
- Mott R, Talbot CJ, Turri MG, Collins AC, Flint J (2000) A method for fine mapping quantitative trait loci in outbred animal stocks. *Proceed. Nat. Acad. Sci. USA* 97:12649-12654.
- Overstreet DH, Rezvani AH, Pucilowski O, Gause L, Janowsky DS (1994) Rapid selection for serotonin-1A sensitivity in rats. *Psychiatr. Genet.* 4: 57-62.
- Pähkla R, Kask A, Rägo L (2000) Differential effects of beta-carbolines and antidepressants on rat exploratory activity in the elevated zero-maze. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 65:737-42
- Phillips RG, LeDoux JE (1992) Differential contribution of amygdala and hippocampus to cued and contextual fear conditioning. *Behav. Neurosci.* 106: 274-285.
- Phillips RG, LeDoux JE (1994) Lesions of the dorsal hippocampal formation interfere with background but no foreground contextual fear conditioning. *Learn. Mem.* 1: 34-44.
- Prunell M, Escorihuela RM, Fernández-Teruel A, Nuñez JF, Tobeña A (1994a) Differential interactions between ethanol and Ro 15-4513 on two anxiety tests in rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 47: 147-151.
- Prunell M, Escorihuela RM, Fernández-Teruel A, Nuñez JF, Tobeña A (1994b) Anxiolytic profiles of alprazolam and ethanol in the elevated plus-maze test and the early acquisition of *Shuttlebox* avoidance. *Pharmacol. Res.* 29: 37-45.
- Ramos A, Mellerin Y, Mormede P, Chauloff F (1998) A genetic and multifactorial analysis of anxiety-related behaviours in Lewis and SHR intercrosses. *Behav. Brain Res.* 96: 195-205.
- Ramos A, Mormede P (1998) Stress and emotionality: A multidimensional and genetic approach. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 22: 33-57.
- Ribeiro-Barbosa ER, Canteras NS, Cezario AF, Blanchard RJ, Blanchard DC (2006) An alternative experimental procedure for studying predator-related defensive responses. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 29: 1255-1263.
- Savonenko A, Filipkowski RK, Werka T, Zielinski K, Kaczmarek L (1999) Defensive conditioning-related functional heterogeneity among nuclei of the rat amygdala revealed by c-Fos mapping. *Neuroscience* 94: 723-733.
- Savonenko A, Werka T, Nikolaev E, Zielinski K, Kaczmarek L (2003) Complex effects of NMDA receptor antagonist AVP in the basolateral amygdala on acquisition of two-way avoidance reaction and long-term fear memory. *Learn. Mem.* 10: 293-303.
- Shepherd, J.K.; Grewal, S.S.; Fletcher, A.; Bill, D.J.; Dourish, C.T. Behavioural and pharmacological characterisation of the elevated “zero-maze” as an animal model of anxiety. *Psychopharmacology* 1994, 116: 56-64.
- Spuhler K, Deitrich RA (1984) Correlative analysis of ethanol-related phenotypes in rat inbred strains. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 8: 480- 484.
- Steimer, T.; Driscoll, P. Divergent stress responses and coping styles in psychogenetically selected Roman high-(RHA) and low-(RLA) avoidance rats: behavioural, neuroendocrine and developmental aspects. *Stress* 2003, 6: 87-100.

- Schwegler, H.; Pilz, P.K.D.; Koch, M.; Fendt, M.; Linke, R.; Driscoll, P. The acoustic startle response in inbred Roman High- and Low-avoidance rats. *Behav. Genet.* 1997, 27: 579-582.
- Troxell ML, Loyal Britton S, Koch LG (2003) Genetic models in applied physiology: selected contribution: variation and heritability for the adaptational response to exercise in genetically heterogeneous rats. *J. Appl. Physiol.* 94: 1674-1681.
- Valdar W, Solberg LC, Gauguier D, Burnett S, Klenerman P, Cookson WO, Taylor MS, Rawlins JNP, Mott R, Flint J (2006a) Genome-wide genetic association of complex traits in heterogeneous stock mice. *Nat. Genet.* 38: 879-887.
- Valdar W, Solberg LC, Gauguier D, Cookson WO, Rawlins JNP, Mott R, Flint J (2006b) Genetic and environmental effects on complex traits in mice. *Genetics* 174: 959-984.
- Werka T (1997) The effects of the medial and cortical amygdala lesions on post-stress analgesia in rats. *Behav. Brain Res.* 86: 59-65.
- Werka T, Zielinski K (1998) CS modality transfer of two-way avoidance in rats with central and basolateral amygdala lesions. *Behav. Brain Res.* 93: 11-24.
- Yalcin B, Willis-Owen SA, Fullerton J, Meesaq A, Deacon RM, Rawlins JN, Copley RR, Morris AP, Flint J, Mott R (2004) genetic dissection of a behavioral quantitative trait locus shows that *Rgs2* modulates anxiety. *Nat. Genet.* 36: 1197-1202.

Table 1. Descriptives (mean  $\pm$  SEM) of the main behavioural measures across the battery of tests and statistical comparisons among values from the Roman rat strains and the N/Nih-HS rat stock.

|   | Mean $\pm$ SEM   |                   |                   | F     | <i>p</i>        | Differences among groups (Duncan's test) | Student's t-test (RHA-I vs RLA-I) | <i>p</i>        |
|---|------------------|-------------------|-------------------|-------|-----------------|--|-----------------------------------|-----------------|
|   | RHA-I (n= 8-16)  | HS (n=277)        | RLA-I (n= 8-16)   |       |                 |  |                                   |                 |
| "Automated novel-cage activity" test (5 min)        |                  |                   |                   |       |                 |  |                                   |                 |
| Distance travelled (cm)                             | 1647 $\pm$ 141,3 | 1197,3 $\pm$ 30,5 | 1191,1 $\pm$ 49,7 | 2,4   | <i>n.s.</i>     |  | 3,0                               | <i>P</i> <0,01  |
| Elevated "zero-maze"                                |                  |                   |                   |       |                 |  |                                   |                 |
| Latency to enter into the open sections (s)         | 57,2 $\pm$ 19    | 112,3 $\pm$ 6,6   | 90,7 $\pm$ 27,4   | 1,9   | <i>n.s.</i>     |  | 1,0                               | <i>n.s.</i>     |
| Time spent in the open sections (s)                 | 63,9 $\pm$ 8,5   | 41,2 $\pm$ 2,7    | 38 $\pm$ 7,6      | 1,9   | <i>n.s.</i>     |  | 2,2                               | <i>P</i> =0,031 |
| # Open section entries                              | 6,3 $\pm$ 1,1    | 3,1 $\pm$ 0,2     | 3,4 $\pm$ 0,7     | 7,3   | <i>P</i> <0,001 | <i>a, c</i>                              | 2,1                               | <i>P</i> =0,044 |
| # Stretched attend postures                         | 8 $\pm$ 1        | 3,5 $\pm$ 0,2     | 6,6 $\pm$ 0,7     | 19,7  | <i>P</i> <0,001 | <i>b</i>                                 | 1,0                               | <i>n.s.</i>     |
| Acoustic startle response                           |                  |                   |                   |       |                 |  |                                   |                 |
| Baseline acoustic startle response (session 1) (mV) | 122,9 $\pm$ 31,3 | 380,2 $\pm$ 24,9  | 703,2 $\pm$ 96,7  | 2,7   | <i>P</i> =0,05  | <i>c</i>                                 | 5,3                               | <i>P</i> <0,001 |
| Fear-potentiated startle response (FPS)             | 9,8 $\pm$ 12,8   | 53,7 $\pm$ 7,4    | 116,5 $\pm$ 26,3  | 1,03  | <i>n.s.</i>     |  | 3,6                               | <i>P</i> =0,003 |
| Two-way shuttlebox avoidance conditioning           |                  |                   |                   |       |                 |  |                                   |                 |
| Mean response latency                               | 6 $\pm$ 0,4      | 11,9 $\pm$ 0,2    | 15,9 $\pm$ 1,5    | 18,1  | <i>P</i> <0,001 | <i>b, c</i>                              | 5,0                               | <i>P</i> <0,001 |
| # Avoidances  | 25,9 $\pm$ 1,9   | 7 $\pm$ 0,4       | 3,2 $\pm$ 0,8     | 28    | <i>P</i> <0,001 | <i>a, c</i>                              | 10,6                              | <i>P</i> <0,001 |
| # Inter trial crossings                             | 109,4 $\pm$ 20,3 | 20,3 $\pm$ 7,4    | 19,25 $\pm$ 3,6   | 115,6 | <i>P</i> <0,001 | <i>a, c</i>                              | 5,3                               | <i>P</i> <0,001 |
| Freezing first 5 intertrial intervals (s) *         | 86,6 $\pm$ 11,8  | 233 $\pm$ 0,7     | 263,2 $\pm$ 9,5   | 52    | <i>P</i> <0,001 | <i>a, c</i>                              | 11,5                              | <i>P</i> <0,001 |

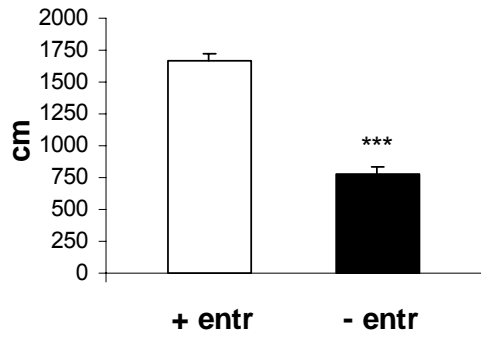
*a* differences between RHA-I and HS

*b* differences between both RHA-I/ RLA-I and HS

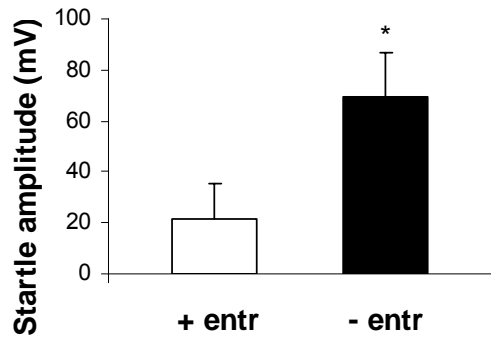
*c* differences between RHA-I and RLA-I

**Figure 1: Extreme groups in the variable entries open sections of ZM**

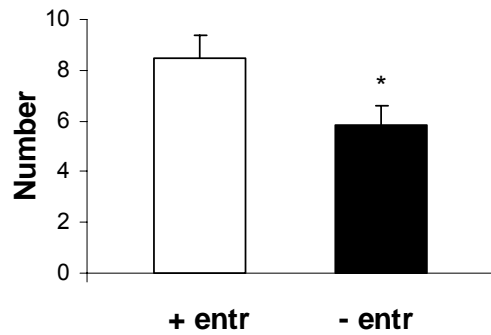
A. DISTANCE TRAVELLED IN THE ACTIVITY METER (1<sup>st</sup> 5 MINUTES)



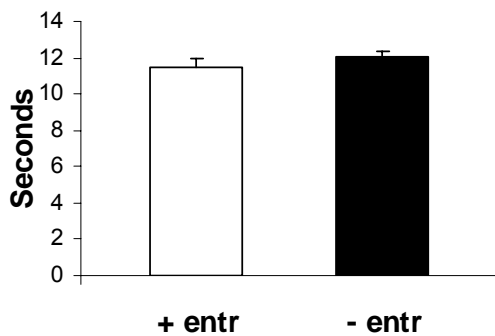
B. FEAR-POTENTIATED STARTLE



C. AVOIDANCES IN THE SHUTTLEBOX

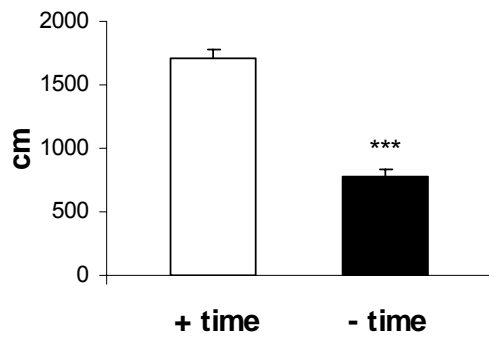


D. MEAN RESPONSE LATENCY (SHUTTLEBOX)

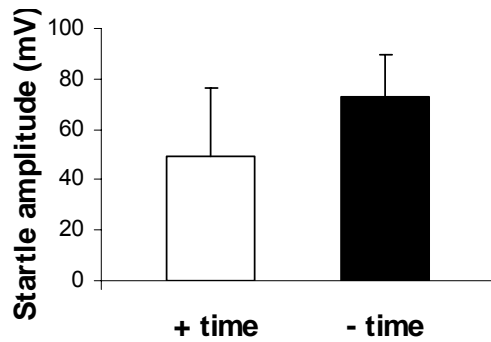


**Figure 2: Extreme groups in the variable time spent in open sections of ZM**

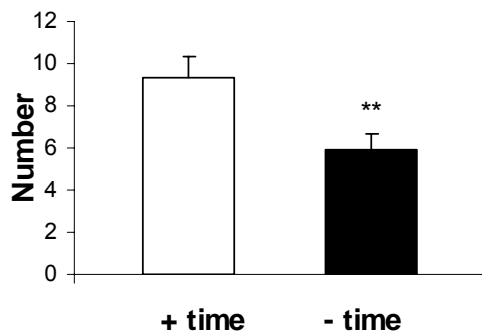
**A. DISTANCE TRAVELLED IN THE ACTIVITY METER (1<sup>st</sup> 5 MINUTES)**



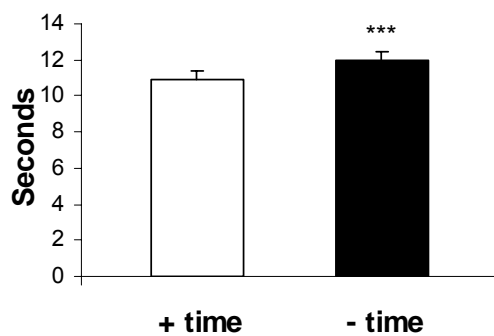
**B. FEAR-POTENTIATED STARTLE**



**C. AVOIDANCES IN THE SHUTTLEBOX**

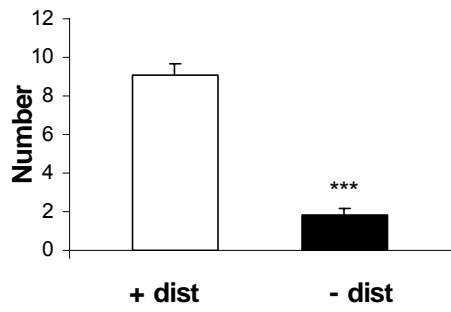


**D. MEAN RESPONSE LATENCY (SHUTTLEBOX)**

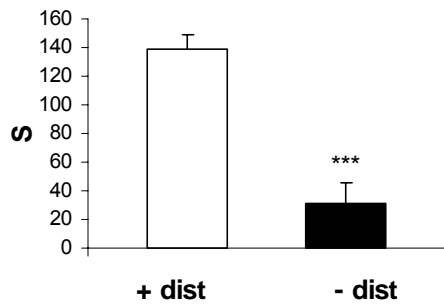


**Figure 3: Extreme groups in the variable distance travelled in the novel cage during the first 5 minutes**

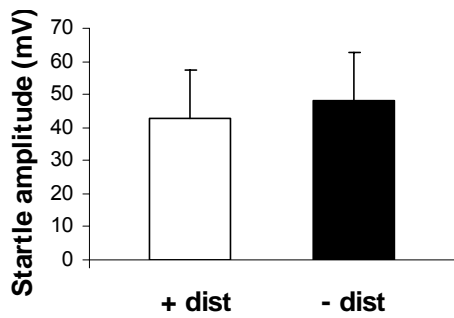
**A. ENTRIES INTO OPEN SECTIONS**



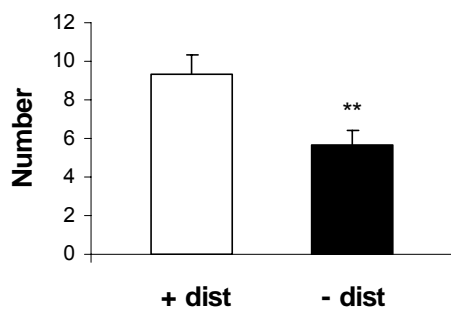
**B. TIME SPENT IN OPEN SECTIONS**



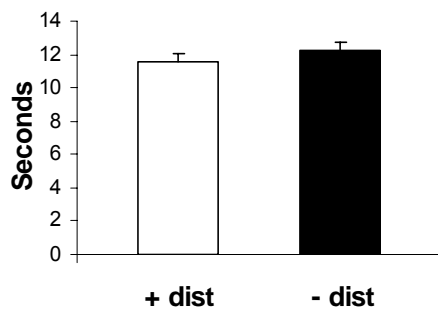
**C. FEAR-POTENTIATED STARTLE**



**D. AVOIDANCES IN THE SHUTTLEBOX**

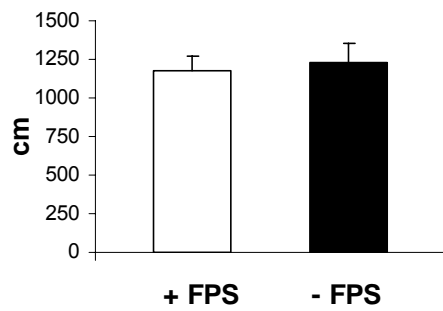


**E. MEAN RESPONSE LATENCY (SHUTTLEBOX)**

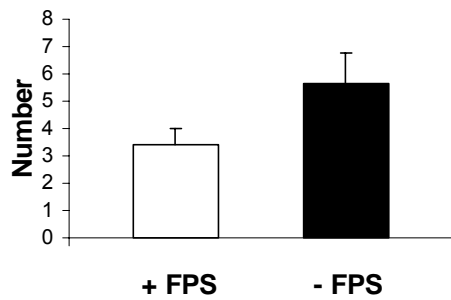


**Figure 4 Extreme groups in the variable fear potentiated startle (FPS)**

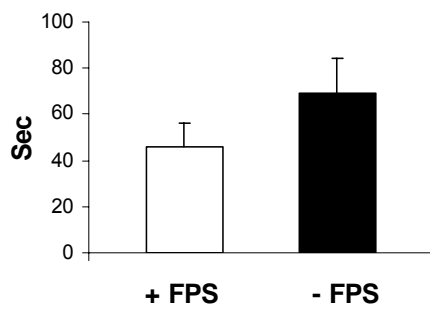
**A. DISTANCE TRAVELLED IN THE ACTIVITY METER (1<sup>st</sup> 5 MINUTES)**



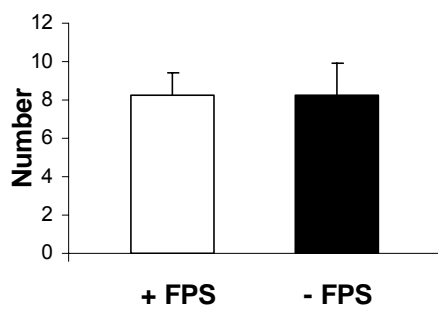
**B. ENTRIES INTO OPEN SECTIONS**



**C. TIME SPENT IN OPEN SECTIONS**



**D. AVOIDANCES IN THE SHUTTLEBOX**



**E. MEAN RESPONSE LATENCY (SHUTTLEBOX)**

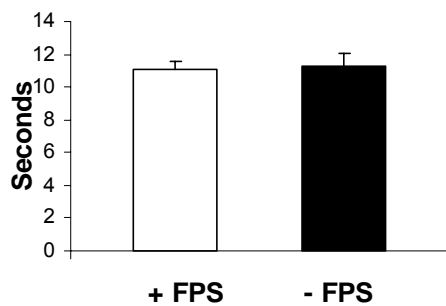
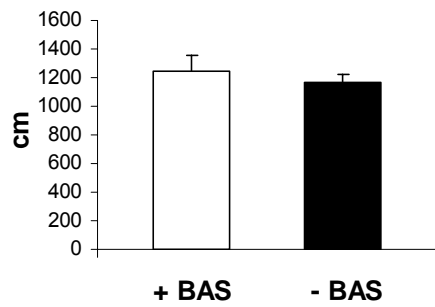


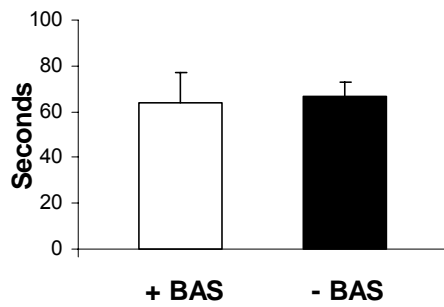


Figure 5. Mean  $\pm$  SEM of the extreme groups in the variable Baseline acoustic startle response

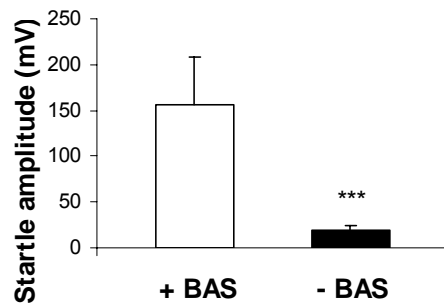
A. DISTANCE TRAVELLED IN THE ACTIVITY METER (1<sup>st</sup> 5 MINUTES)



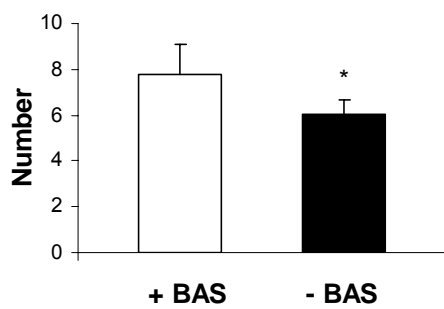
B. TIME SPENT IN OPEN SECTIONS



C. FEAR-POTENTIATED STARTLE



D. AVOIDANCES IN THE SHUTTLEBOX



A. INTERTRIAL CROSSINGS (SHUTTLEBOX)

