

**Trabajo de Pasantía para la  
Licenciatura en Biología Humana**

**OPTIMIZACIÓN DEL MODELO CONDUCTUAL DE ANSIEDAD LIGHT-DARK  
BOX EN RATAS: IMPACTO DE LA ILUMINACIÓN Y DETERMINACIÓN DE LA  
SENSIBILIDAD A DROGAS ANSIOLÍTICAS**

Estudiante: Florencia Bai

Departamento de Neurofarmacología Experimental,  
Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable (IIBCE)

Orientadora de pasantía: Dra. Jessika Urbanavicius

**Diciembre, 2024**

## Resumen

Los modelos animales son clave para estudiar la neurobiología de patologías psiquiátricas, como los trastornos de ansiedad, y desarrollar nuevas estrategias terapéuticas. El modelo *light-dark box* (L-D *box*) evalúa una respuesta no condicionada basada en el conflicto natural de los roedores entre explorar espacios novedosos y evitar ambientes aversivos. La caja tiene dos compartimentos: uno abierto e iluminado (aversivo) y otro cerrado y oscuro. En el *screening* de compuestos, el L-D *box* muestra variabilidad en la respuesta a drogas ansiolíticas que podría explicarse por diferencias en los protocolos experimentales, la proporción de los compartimentos L/D o la intensidad de iluminación. La manipulación de este último factor permite regular la aversión del modelo impactando en la conducta de ansiedad y la respuesta a ansiolíticos. Así, hipotetizamos que mayores intensidades de iluminación aumentan la ansiedad y su sensibilidad a drogas ansiolíticas. Evaluamos el desempeño de ratas macho en el L-D *box* en condiciones de iluminación de 65 y 330lx, así como la respuesta a drogas, de uso clínico, benzodiazepínicas (alprazolam 0.2 y 0.4 o diazepam 1 mg/kg/i.p.) y no-benzodiazepínica (buspirona 0.25 y 0.5 mg/kg/i.p.). Encontramos una reducción significativa del tiempo en el compartimento iluminado y número de *rearings* (conducta exploratoria) a 330lx en comparación con 65lx, indicativo de un aumento en la ansiedad. No observamos cambios en la ansiedad bajo ambas condiciones de iluminación tras la administración de los ansiolíticos. Demostramos que una mayor iluminación incrementa la ansiedad, aunque no detectamos sensibilidad a drogas ansiolíticas en nuestras condiciones. Mayores intensidades de iluminación o cambios en la proporción L/D de la caja serán evaluados para establecer las condiciones óptimas para evaluar sensibilidad a ansiolíticos.

**Palabras clave:** Benzodiazepinas, buspirona, aproximación-evitación, campo abierto, actividad motora

## 1. Introducción

### 1.1. Antecedentes generales

La ansiedad es una respuesta emocional natural e inherente a la conducta humana que forma parte de la respuesta adaptativa frente a situaciones de peligro o estímulos aversivos o estresantes que permite estar alerta y preparados para actuar. En su forma más común, la ansiedad es una sensación de aprensión o temor ante un potencial peligro o lo que podría suceder en el futuro (Daviu et al., 2019). Sin embargo, puede convertirse en patológica cuando esta respuesta se vuelve exagerada, irracional e interfiere de forma significativa con la vida cotidiana de una persona, afectando su bienestar y funcionamiento (Himanshu et al., 2020).

Dentro de los trastornos mentales, los de ansiedad constituyen los más prevalentes en el mundo (Penninx et al., 2021). Según datos de la Organización Mundial de la Salud, se estima que más de 300 millones de personas a nivel mundial sufren un trastorno de ansiedad (WHO, 2023). Según el Manual Diagnóstico y Estadístico de los Trastornos Mentales (DSM-5) los trastornos de ansiedad incluyen: la ansiedad por separación, las fobias, el trastorno de pánico, o el trastorno de ansiedad generalizada, entre otros (DSM-5). De manera general, se caracterizan por la aparición de síntomas como el miedo o la preocupación excesiva, anticipación aprensiva de un daño o desgracia futura o disforia los cuales son acompañados por agitación, síntomas somáticos como aumento del ritmo cardíaco, sudoración, tensión muscular, y alteraciones del sueño (DSM-5; Tyrer & Baldwin, 2006).

El tratamiento farmacológico de primera línea incluye el uso de benzodiazepinas (BZD) y drogas no-benzodiazepínicas, entre las cuales se encuentran los inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina (ISRS) o noradrenalina (ISRN) o drogas como la buspirona, (agonista parcial del receptor serotoninérgico tipo 1A; Brandt et al., 2024; Heesbeen et al., 2024; Penninx et al., 2021). A pesar de su eficacia, estos fármacos presentan limitaciones, sobre todo en relación a la aparición de efectos secundarios no deseados. Las BZD, por ejemplo, aunque actúan rápidamente, generan sedación y su uso prolongado conlleva un alto riesgo de dependencia y deterioro cognitivo (Brandt et al., 2024). Los ISRS y la buspirona, por su parte, tienen un inicio de acción tardío y, en el caso de los ISRS, pueden, además, exacerbar la ansiedad al inicio del tratamiento (Craske & Stein, 2016; Heesbeen et al., 2024). En este contexto, queda en evidencia la necesidad de avanzar en el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas con menores efectos secundarios (Craske & Stein 2016). A su vez, dado que aún existen aspectos sobre su fisiopatología sin comprender resulta importante seguir profundizando en el estudio de sus bases neurobiológicas (Penninx et al., 2021). En este marco, los modelos animales constituyen una herramienta clave para estudiar y comprender la neurobiología subyacente a los trastornos de ansiedad, así como para la búsqueda de estrategias terapéuticas nuevas (Desingu et al., 2023).

Los modelos para evaluar ansiedad pueden clasificarse según la naturaleza del estímulo aversivo que puede desencadenar respuestas aprendidas o innatas. Por un lado, los modelos de conflicto de condicionamiento operante evalúan la respuesta de miedo condicionado frente a situaciones aversivas tales como descargas eléctricas de baja

intensidad. Entre ellos se encuentran la prueba de conflicto de Vogel, el test de evitación pasiva o de miedo condicionado (Campos et al., 2013; Desingu et al., 2023).

Por otro lado, los modelos de respuesta no condicionada se basan en el conflicto natural de los roedores entre la exploración de espacios novedosos y la evitación de ambientes potencialmente aversivos o estresantes. Se apoyan en el conflicto entre estados motivacionales opuestos y se denominan de aproximación-evitación o “*approach-avoidance*” (Desingu et al., 2023; Rosso et al., 2022). Es así que los estados más ansiosos disminuyen la exploración de las áreas aversivas, reduciendo la exposición a posibles amenazas. En esta categoría se encuentran los modelos más comúnmente utilizados incluyendo el laberinto en cruz elevado, la prueba de la alimentación suprimida por novedad y la caja claro-oscura o *light-dark box* (L-D *box*), entre otros (Campos et al., 2013; Desingu et al., 2023; Rosso et al., 2022).

## 1.2. Antecedentes particulares

El L-D *box* se basa en el conflicto natural entre la novedad ante la exposición a un espacio no conocido y la evitación de espacios abiertos e iluminados, a la vez que aprovecha la preferencia de los roedores por los espacios cerrados y oscuros (ya que reducen los riesgos de depredación; Arrant et al., 2013). Fue originalmente desarrollado en ratones por Crawley y Goodwin (1980) y consiste en exponer a los animales a una caja dividida en dos compartimentos, uno negro, cerrado y sin iluminación (dark), y el otro blanco, abierto en el techo e iluminado (*light*; área aversiva), permitiendo su libre exploración (Crawley & Goodwin, 1980; Crawley, 1985). Los autores observaron que, una vez que los animales eran colocados en el compartimento iluminado, rápidamente transitaban hacia el compartimento oscuro. Además, demostraron que drogas ansiolíticas aumentaban las transiciones entre compartimentos y la exploración del área iluminada, lo que se interpreta como niveles más bajos de ansiedad (Crawley & Goodwin, 1980; Crawley, 1981; 1985). Estudios posteriores extendieron y validaron su uso en ratas ajustando las características de la caja, demostrando también sensibilidad para la detección de efectos ansiolíticos, así como ansiogénicos (Bilkei-Gorzó et al., 1998; Chaouloff et al., 1997; Merlo Pich & Samanin, 1986; 1989).

Actualmente se acepta que, además del número de transiciones que fuera originalmente utilizado como indicador de ansiedad, parámetros tales como el tiempo de permanencia en el compartimento iluminado y la latencia para entrar al mismo, así como la actividad motora en este compartimento, permiten evaluar la aparición de conductas de tipo-ansiosas (Arrant et al., 2013; Bourin & Hascoët, 2003; Campos-Cardoso et al., 2023; Costall et al., 1989; Kilfoil et al., 1989).

Diferentes drogas ansiolíticas han sido testeadas en este modelo y si bien se ha demostrado que las BZD, ISRS o buspirona son efectivas, existe gran variabilidad en las dosis utilizadas e inconsistencias en su eficacia (Bhagwat et al., 2013; Bilkei-gorzo et al., 1998; Dringenberg et al., 1998; Kapus et al., 2008; Kumar et al., 2016; Rosso et al., 2022). Esta variabilidad podría explicarse por diferencias en los procedimientos experimentales, variaciones en las características de la caja tales como sus dimensiones o proporción de los compartimentos L/D, o la intensidad de iluminación. Estos factores, podrían alterar la exploración de los diferentes compartimentos, por lo que su manipulación permite regular el nivel de adversidad del modelo impactando en el desempeño de los animales e influir en la

respuesta a drogas ansiolíticas (Bourin & Hascoët, 2003; Campos-Cardoso et al., 2023). En particular, se ha reportado que la iluminación es un factor determinante y que una mayor intensidad de la luz aumentaría la adversidad del modelo disminuyendo las conductas de exploración del espacio iluminado (Campos-Cardoso et al., 2023; Costall et al., 1989; García et al., 2005; Kilfoil et al., 1989). A su vez, se ha descrito que la respuesta frente a una droga ansiolítica depende del nivel basal de ansiedad de los animales, sugiriendo que las condiciones de iluminación pueden afectar la respuesta a los diferentes ansiolíticos (Bourin, 2015). Por consiguiente, la intensidad de iluminación se vuelve un parámetro fundamental a la hora de optimizar el uso del modelo en el laboratorio y su validación con drogas ansiolíticas.

## 2. Hipótesis de trabajo

De acuerdo a los antecedentes presentados, este trabajo se basa en la hipótesis de que en el modelo de ansiedad L-D *box*, un aumento en la intensidad de iluminación vuelve el compartimento iluminado más aversivo aumentando la ansiedad experimental en los animales. Asimismo, en un ambiente más aversivo se detectará una mayor sensibilidad a la acción de drogas ansiolíticas.

## 3. Objetivo general

Investigar la influencia de la luz en la conducta de ansiedad y sobre la sensibilidad a drogas ansiolíticas en el modelo L-D *box* en ratas.

## 4. Objetivos específicos

1. Evaluar las conductas de ansiedad en el L-D *box* en condiciones de baja y alta iluminación.
2. Evaluar la respuesta al tratamiento con drogas ansiolíticas en condiciones de baja y alta iluminación.

## 5. Materiales y métodos

**Animales:** Se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar (2 meses) provenientes del bioterio del IIBCE. Los animales fueron criados y alojados en cajas de 50 cm x 37.5 cm x 21 cm en grupos de 5-6 y mantenidos en condiciones controladas de temperatura ( $22\pm 2^\circ\text{C}$ ), ciclo luz-oscuridad (7:00 am/7:00 pm), alimentación (LabDiet®) y agua *ad libitum*. Los experimentos cuentan con la aprobación del Comité de Ética en el Uso de Animales del IIBCE (004/08/2024) de acuerdo a la Ley Nacional de Experimentación Animal N° 18.611.

Se tomaron las medidas necesarias para minimizar el estrés de los animales y utilizar el número mínimo necesario para obtener resultados confiables y reproducibles.

**Drogas:** Se seleccionaron alprazolam y diazepam como drogas ansiolíticas de uso clínico con mecanismo de acción benzodiazepínico y buspirona como no-benzodiazepínico (Penninx et al., 2021). Todas las drogas y sus respectivos vehículos fueron administrados por vía intraperitoneal (i.p.) y las dosis utilizadas fueron: 0.2 y 0.4 mg/Kg para alprazolam (donado por Laboratorio Celsius, Uruguay N°lote 77464), 1 mg/Kg para diazepam (donado por Laboratorio ICU VITA, Uruguay N°lote PMDN/028) y 0.25 y 0.5 mg/Kg para buspirona (#B7148, Sigma-Aldrich) (Bilkei-Gorzó et al., 1998; Griebel et al., 1996). Alprazolam y diazepam fueron disueltas en Tween 80 al 3 % en solución salina, y buspirona en solución salina. Todas las drogas fueron preparadas, fraccionadas y conservadas a -20 °C hasta el momento de ser utilizadas.

**Modelos conductuales:** Todos los experimentos comportamentales fueron llevados a cabo en el cuarto de comportamiento del Departamento de Neurofarmacología Experimental del IIBCE. Para su correcta habituación al ambiente, los animales fueron trasladados al mismo 24 horas antes de los test conductuales. En todo momento se mantuvieron condiciones ambientales de temperatura y ciclo luz-oscuridad similares a las del bioterio y los animales fueron manipulados siempre por el mismo experimentador. Con el objetivo de mantener todos los tratamientos dentro de cada sesión, se balancearon los grupos experimentales.

**Handling:** Durante los 3 días previos a los experimentos comportamentales, los animales recibieron una sesión diaria de 5 minutos de manipulación o *handling*, de forma individual. El *handling* es una estrategia ampliamente utilizada para habitar a los animales y reducir la respuesta de estrés frente a la manipulación que se les hará durante el experimento mejorando el bienestar de los animales (Cloutier et al., 2018; LaFollette et al., 2017). Los dos primeros días las sesiones de *handling* tuvieron lugar en el bioterio y la última sesión se desarrolló en el cuarto de comportamiento el día previo a los experimentos (Figura 1).

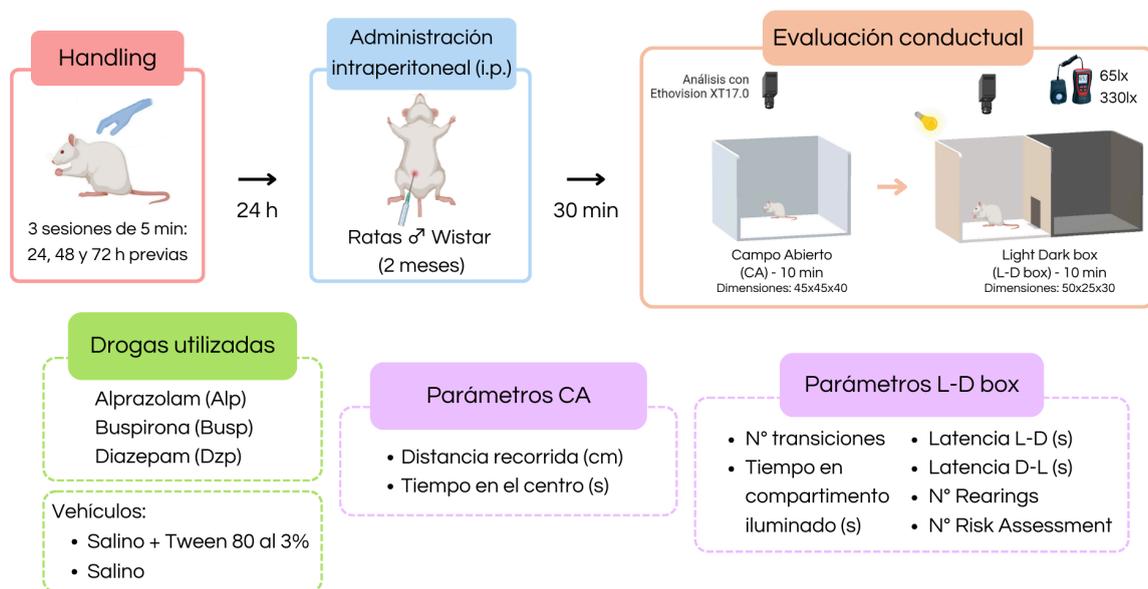
**Campo Abierto (CA):** Para descartar posibles afectaciones locomotoras o efectos sedativos de las drogas que puedan interferir con el desempeño de los animales en el L-D box, se evaluó su actividad locomotora en el CA (File et al., 1994; Lister 1990).

El CA consiste en una caja de acrílico de paredes transparentes de 45 x 45 x 40 cm. Los experimentos fueron filmados, y de manera automática se registró la distancia recorrida como índice de actividad locomotora y el tiempo en el centro mediante el software de video-seguimiento Ethovision XT 17 (Noldus). El tiempo en el centro es propuesto por algunos autores como un parámetro que puede ser sensible a cambios en la ansiedad de los animales (Prut & Belzung, 2003).

**L-D box:** El aparato consiste en una caja de acrílico de 50 x 25 x 30 cm, dividida en dos compartimentos de dimensiones iguales (25 x 25 x 30 cm) unidos por una abertura central de 10 x 10 cm. Uno de ellos, de paredes negras, cubierto y no iluminado; el otro, de paredes blancas, abierto e iluminado mediante una lámpara (bulbo de 14 watts, luz cálida) próxima a la caja (Sena et al., 2003). Las intensidades de iluminación utilizadas fueron de 65 o 330 luxes (lx) medida en el centro del compartimento iluminado las cuales fueron ajustadas variando la distancia de la lámpara a la caja (Campos-Cardoso et al., 2023). Los experimentos fueron filmados y, a partir de los videos, se cuantificaron manualmente los

siguientes parámetros: número de transiciones del compartimento iluminado al oscuro (se consideró como criterio de entrada la introducción de las cuatro patas del animal dentro del mismo), tiempo de permanencia y número de *rearings* (actividad exploratoria vertical) en el compartimento iluminado y conductas de evaluación de riesgo o *risk assessment* (estiramiento del cuerpo del animal desde el compartimento oscuro hacia el iluminado sin transitar hacia ese lado; Campos-Cardoso et al., 2023). Además, se midieron las latencias de primer pasaje del compartimento iluminado al oscuro (latencia L-D) y de la primera vuelta al compartimento iluminado (latencia D-L).

**Procedimiento experimental:** El día del experimento los animales fueron administrados por vía i.p con las diferentes drogas o sus respectivos vehículos. Luego de 30 minutos de espera fueron colocados en el centro de la caja del CA y se permitió su libre exploración durante 10 minutos. Inmediatamente después de su pasaje por el CA, los animales fueron expuestos al L-D box. Las ratas fueron colocadas en el compartimento iluminado de espaldas a la abertura y se permitió su libre exploración durante 10 min (Figura 1).

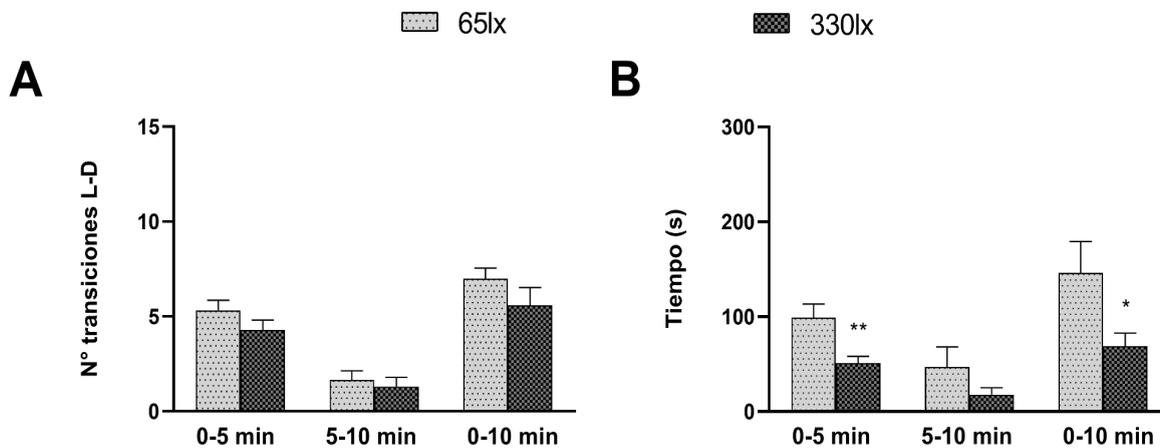


**Figura 1.** Protocolo seguido durante los días del experimento.

**Análisis estadístico:** Los datos fueron analizados utilizando el test *t*-Student o análisis de varianza (ANOVA) de una vía, seguido del test de comparación múltiple de Tukey y fueron expresados como la Media  $\pm$  Error Estándar de la media (EEM). Para la estadística y gráficas se utilizó el software GraphPad Prism 8.0.2. La significación estadística fue establecida para  $p < 0.05$ .

## 6. Resultados

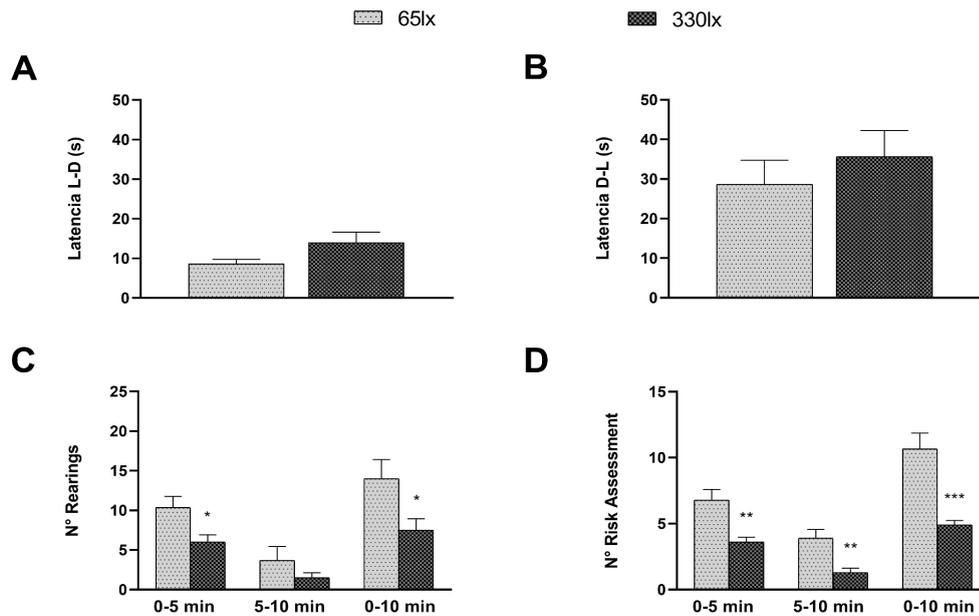
### 6.1. Evaluación del efecto de la iluminación en las conductas de ansiedad en el L-D box



**Figura 2.** Efecto de la iluminación sobre el número de transiciones (A) y tiempo de permanencia en el compartimento iluminado (B) evaluado en el L-D box. Media  $\pm$  EEM. Test t-Student. \* vs. 65 lx. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ . n = 9-10.

En la figura 2 se muestra el efecto de la iluminación sobre el número de transiciones (A) y el tiempo de permanencia en el compartimento iluminado (B) en el L-D box registrados durante 10 minutos y desglosados en períodos de 5 minutos (0-5 y 5-10 min).

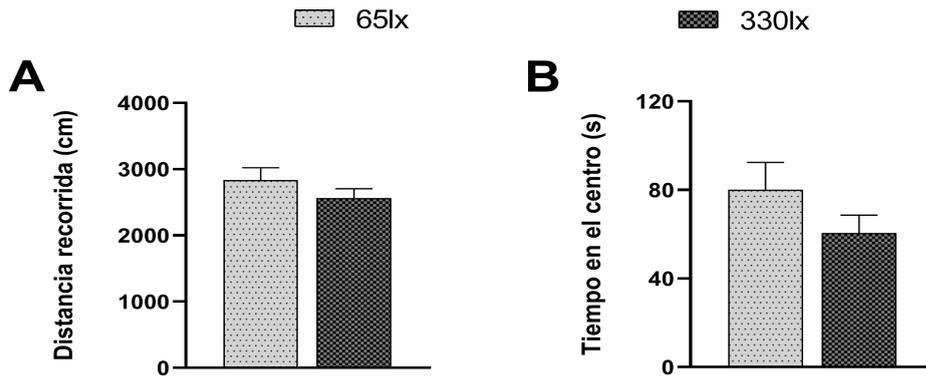
En primer lugar, no observamos diferencias significativas en el número de transiciones cuando comparamos ambas condiciones de iluminación en los períodos de tiempo de 0-5; 5-10 min o en el tiempo total de registro (0-10 min) [ $T(17) = 1,396$ ,  $p = 0,181$ ;  $T(17) = 0,533$ ,  $p = 0,601$ ;  $T(17) = 1,254$ ,  $p = 0,227$ , respectivamente]. Por otra parte, observamos una disminución significativa en el tiempo de permanencia en el compartimento iluminado en el grupo expuesto a 330 lx en comparación con 65 lx en el período de 0-5 min [ $T(17) = 3,112$ ,  $p = 0,006$ ] y 0-10 min [ $T(17) = 2,214$ ,  $p = 0,041$ ]. No se observaron diferencias en el período de 5-10 min [ $T(17) = 1,360$ ,  $p = 0,192$ ].



**Figura 3.** Efecto de la iluminación sobre la latencia L-D (A), latencia D-L (B), número de *rearings* (C) y número de *risk assessment* (D) evaluado en el L-D box. Media  $\pm$  EEM. Test *t*-Student. \* vs. 65 lx. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ .  $n = 9-10$ .

En la figura 3 se muestra el efecto de la iluminación sobre las latencias L-D (A) y D-L (B) evaluadas durante el tiempo total de registro (10 minutos) y el número de *rearings* (C) y de *risk assessment* (D) en el L-D box registrados durante 10 minutos y desglosados en periodos de 5 minutos (0-5 y 5-10 min).

La comparación de las dos condiciones de iluminación no mostró diferencias significativas en las latencias L-D [ $T(17) = 1,791$ ,  $p = 0,091$ ] o D-L [ $T(17) = 0,764$ ,  $p = 0,456$ ]. Sin embargo, encontramos una disminución significativa del número de *rearings* en el grupo expuesto a 330 lx en el período 0-5 min [ $T(17) = 2,622$ ,  $p = 0,018$ ] y 0-10 min [ $T(17) = 2,376$ ,  $p = 0,030$ ] en comparación con los animales expuestos a 65 lx. No se observaron diferencias significativas en el período de 5-10 min [ $T(17) = 1,195$ ,  $p = 0,248$ ]. El número de *risk assessment* fue significativamente menor en el grupo expuesto a 330 lx en comparación con el grupo a 65 lx en los intervalos de tiempo 0-5, 5-10 y 0-10 min [ $T(17) = 3,683$ ,  $p = 0,002$ ;  $T(17) = 3,543$ ,  $p = 0,003$ ;  $T(17) = 4,828$ ,  $p = 0,0002$ ; respectivamente].

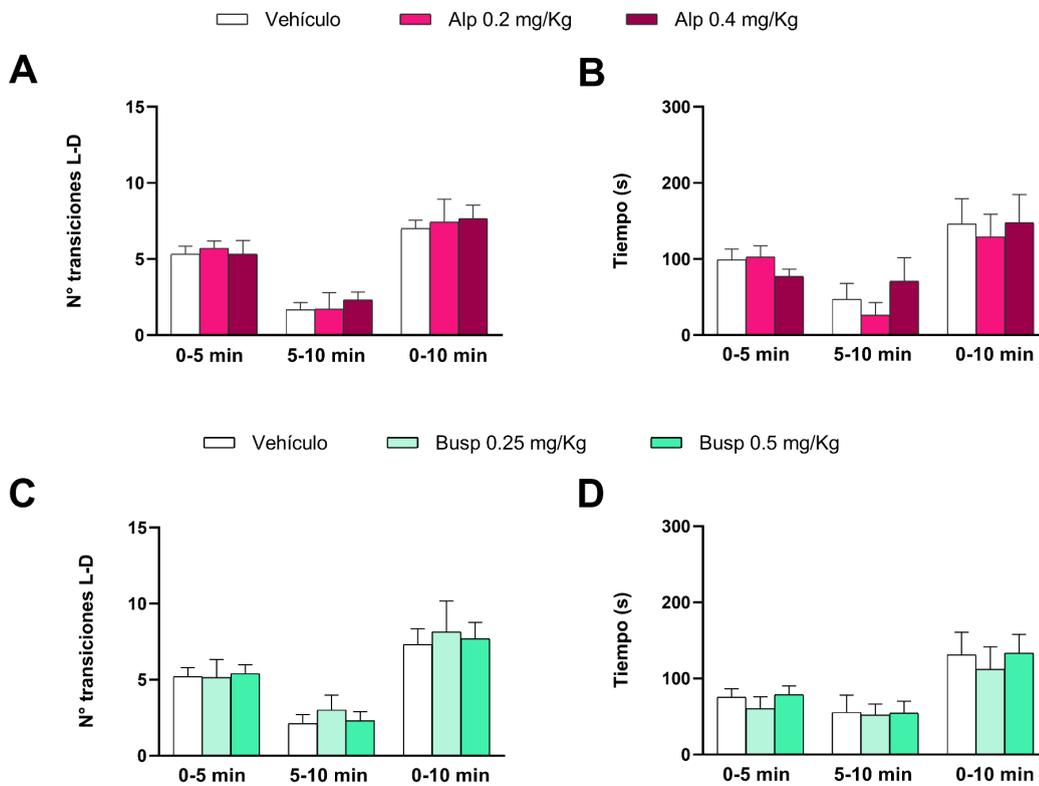


**Figura 4.** Distancia recorrida (A) y tiempo en el centro (B) evaluados en el CA. Media  $\pm$  EEM. Test *t*-Student. n= 9-10.

En la figura 4 se muestra la distancia recorrida (A) y tiempo en el centro (B) evaluados en el CA durante 10 minutos en los animales que posteriormente fueron expuestos a diferentes condiciones de iluminación en el L-D *box*. No observamos diferencias significativas entre ambos grupos de animales en la distancia recorrida [ $T(17) = 1,160$ ,  $p = 0,262$ ] o el tiempo en el centro [ $T(17) = 1,358$ ,  $p = 0,192$ ].

## 6.2. Evaluación de la sensibilidad a drogas ansiolíticas en el L-D box

### 6.2.1. Evaluación de la sensibilidad a drogas ansiolíticas bajo la condición de 65lx



**Figura 5.** Efecto de la administración aguda de alprazolam (Alp) o buspirona (Busp) i.p. sobre el número de transiciones (A y C) y tiempo de permanencia en el compartimento iluminado (B y D) evaluado en el L-D box. Media  $\pm$  EEM. ANOVA de una vía seguido del test de comparación múltiple de Tukey.  $n = 6-10$ .

En la figura 5 se muestra el efecto de la administración aguda de alprazolam o buspirona sobre el número de transiciones (A y C) y el tiempo de permanencia en el compartimento iluminado (B y D) en el L-D box registrados durante 10 minutos y desglosados en periodos de 5 minutos (0-5 y 5-10 min).

Los resultados obtenidos mostraron que la administración de alprazolam no indujo un efecto significativo en el número de transiciones para ninguno de los periodos de tiempo 0-5; 5-10 o 0-10 min [ $F(2, 19) = 0,125, p = 0,884$ ;  $F(2, 19) = 0,239, p = 0,790$ ;  $F(2, 19) = 0,116, p = 0,891$ ; respectivamente]. Asimismo, no observamos un efecto del tratamiento en el tiempo de permanencia en el compartimento iluminado en ninguno de los periodos de tiempo evaluados [0-5 min:  $F(2, 19) = 0,901, p = 0,423$ ; 5-10 min:  $F(2, 19) = 0,831, p = 0,451$ ; 0-10 min:  $F(2, 19) = 0,091, p = 0,914$ ].

El tratamiento con buspirona no indujo un efecto significativo en el número de transiciones [0-5 min:  $F(2, 24) = 0,033, p = 0,968$ ; 5-10 min:  $F(2, 24) = 0,402, p = 0,673$ ; 0-10 min:  $F(2, 24) = 0,094, p = 0,911$ ] ni en el tiempo de permanencia en el compartimento iluminado [0-5 min:  $F(2, 24) = 0,577, p = 0,569$ ; 5-10 min:  $F(2, 24) = 0,008, p = 0,992$ ; 0-10 min:  $F(2, 24) = 0,151, p = 0,861$ ].

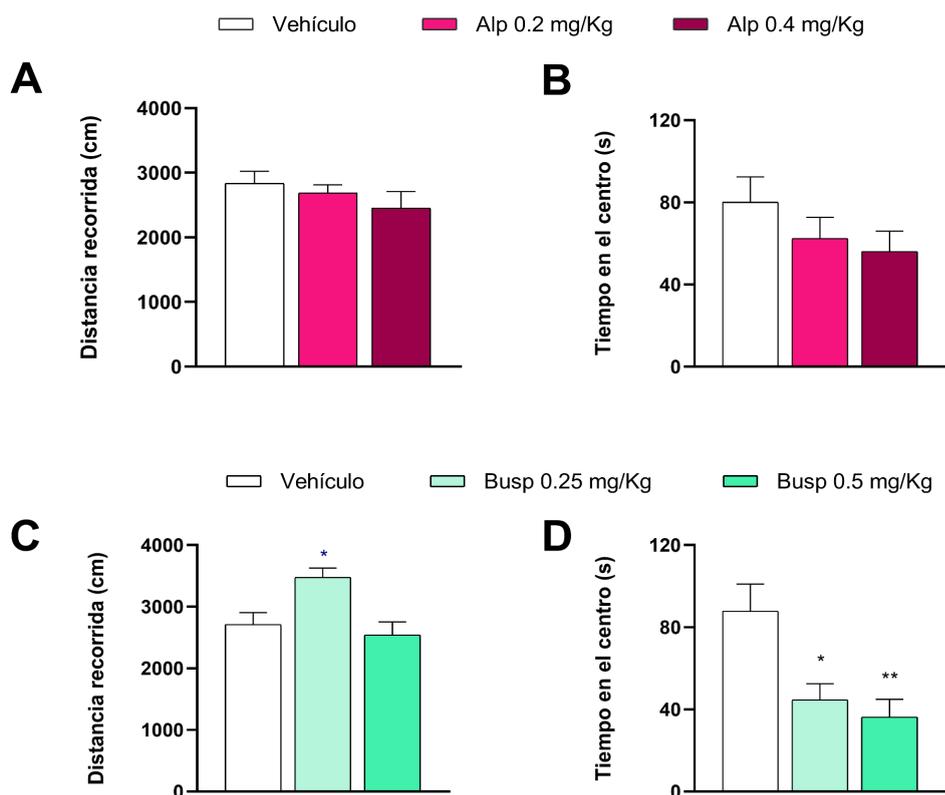
	Latencia L-D (s)	Latencia D-L (s)	N° Rearings	N° Risk Assessment
Vehículo	8,67 ± 1,12	28,67 ± 6,06	14,0 ± 2,41	10,67 ± 1,20
Alp 0.2 mg/kg	17,43 ± 4,58	20,14 ± 4,43	15,0 ± 3,98	8,0 ± 1,11
Alp 0.4 mg/kg	8,83 ± 1,58	22,17 ± 4,90	16,33 ± 2,82	11,33 ± 1,73
Vehículo	8,80 ± 1,14	36,30 ± 11,04	11,30 ± 1,81	8,10 ± 0,87
Busp 0.25 mg/kg	7,14 ± 1,26	113,30 ± 81,62	12,29 ± 3,45	6,71 ± 0,61
Busp 0.5 mg/kg	7,40 ± 1,12	19,90 ± 4,55	17,50 ± 3,90	6,40 ± 1,17

**Tabla 1.** Efecto de la administración aguda de alprazolam (Alp) o buspirona (Busp) i.p. sobre la latencia L-D, latencia D-L, número de *rearings* y número de *risk assessment* evaluado en el L-D box. Media ± EEM. ANOVA de una vía seguido del test de comparación múltiple de Tukey. n= 6-10.

En la tabla 1 se muestra el efecto de la administración aguda de alprazolam o buspirona sobre la latencia L-D y D-L, el número de *rearings* y *risk assessment* evaluados en el L-D box durante 10 minutos.

La administración de alprazolam no demostró un efecto significativo en la latencia L-D [F(2, 19) = 3,283, P=0,060], D-L [F(2, 19) = 0,725, P=0,497], y tampoco en el número de *rearings* [F(2, 19) = 0,141, P=0,870] o de *risk assessment* [F(2, 19) = 1,652, P=0,218].

El tratamiento con buspirona no mostró un efecto significativo para ninguno de los parámetros cuantificados [latencia L-D: F(2, 24) = 0,588, p = 0,563, latencia D-L: F(2, 24) = 1,598, p = 0,223, número de *rearings*: F(2, 24) = 1,195, p = 0,320; número de *risk assessment*: F(2, 24) = 0,925, p = 0,410].



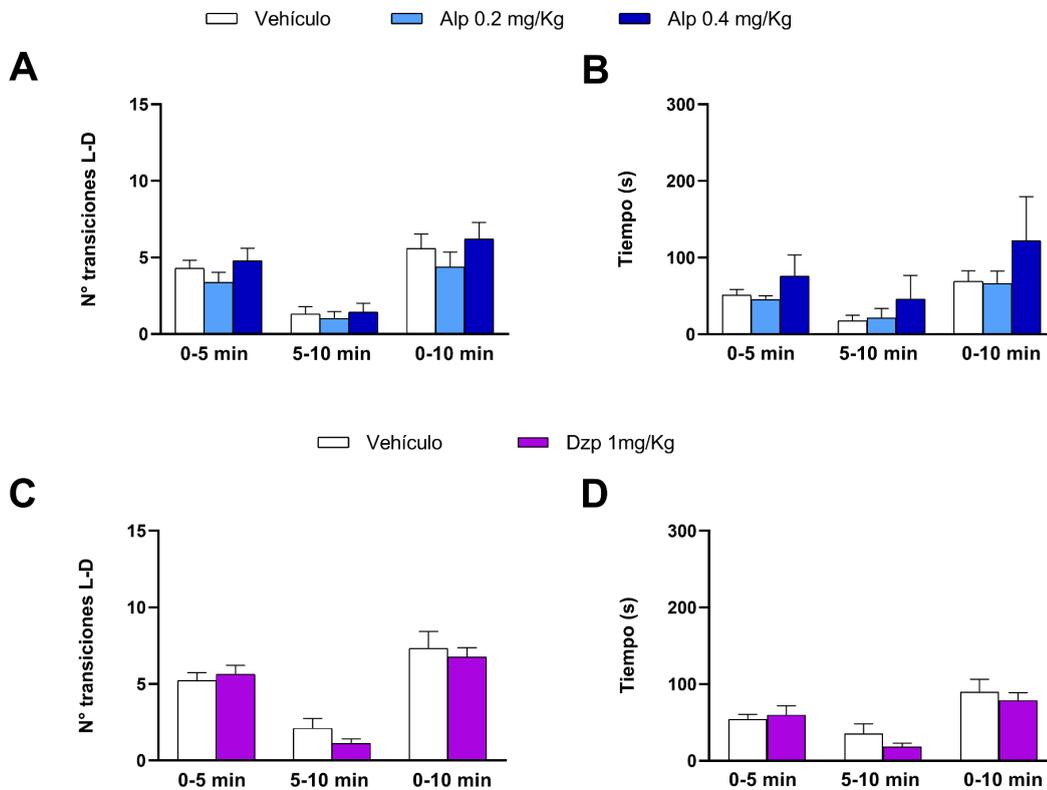
**Figura 6.** Efecto de la administración aguda de alprazolam (Alp) o buspirona (Busp) i.p. sobre la distancia recorrida (A y C) y tiempo en el centro (B y D) evaluado en el CA. Media  $\pm$  EEM. ANOVA de una vía seguido del test de comparación múltiple de Tukey. \* vs Vehículo. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ .  $n = 6-10$ .

En la figura 6 se muestra el efecto de la administración aguda de alprazolam o buspirona sobre la distancia recorrida (A y C) y tiempo en el centro (B y D) evaluados en el CA durante 10 minutos.

Los resultados obtenidos mostraron que el tratamiento con alprazolam no indujo cambios significativos en la distancia recorrida [ $F(2, 19) = 0,969$ ,  $p = 0,398$ ] ni en el tiempo en el centro [ $F(2, 19) = 1,235$ ,  $p = 0,313$ ].

El tratamiento con buspirona mostró un efecto significativo para la distancia recorrida [ $F(2, 24) = 5,553$ ,  $p = 0,010$ ] y el análisis post hoc reveló un aumento significativo para la dosis de 0.25 mg/Kg ( $p = 0,038$ ) respecto del grupo control. A su vez, observamos un efecto significativo del tratamiento para el tiempo en el centro [ $F(2, 24) = 7,147$ ,  $p = 0,004$ ]. El análisis post hoc evidenció una reducción significativa para ambas dosis de buspirona 0.25 mg/Kg ( $p = 0,031$ ) y 0.5 mg/Kg ( $p = 0,004$ ) respecto del grupo control.

## 6.2.2. Evaluación de la sensibilidad a drogas ansiolíticas bajo la condición de 330lx



**Figura 7.** Efecto de la administración aguda de alprazolam (Alp) o diazepam (Dzp) i.p. sobre el número de transiciones (A y C) y tiempo de permanencia en el compartimento iluminado (B y D) evaluado en el L-D box. Media  $\pm$  EEM. Test *t*-Student o ANOVA de una vía seguido del test de comparación múltiple de Tukey.  $n=8-10$ .

En la figura 7 se muestra el efecto de la administración aguda de alprazolam o diazepam sobre el número de transiciones (A y C) y tiempo de permanencia en el compartimento iluminado (B y D) del L-D box registrados durante 10 minutos y desglosados en periodos de 5 minutos.

Los resultados obtenidos mostraron que no hubo un efecto significativo del tratamiento con alprazolam en el número de transiciones en los períodos de tiempo de 0-5; 5-10 o 0-10 min [ $F(2, 24) = 1,051$ ,  $p = 0,365$ ;  $F(2, 24) = 0,184$ ,  $p = 0,833$ ;  $F(2, 24) = 0,825$ ,  $p = 0,450$ ; respectivamente]. Asimismo, no hubo un efecto significativo de alprazolam en el tiempo de permanencia en el compartimento iluminado en los periodos de tiempo evaluados [0-5 min:  $F(2, 24) = 0,941$ ,  $p = 0,404$ ; 5-10 min:  $F(2, 24) = 0,625$ ,  $p = 0,544$ ; 0-10 min:  $F(2, 24) = 0,779$ ,  $p = 0,470$ ].

El tratamiento con diazepam no tuvo efecto significativo sobre el número de transiciones [0-5 min:  $T(15) = 0,511$ ,  $p = 0,617$ ; 5-10 min:  $T(15) = 1,353$ ,  $p = 0,196$ ; 0-10 min:  $T(15) = 0,448$ ,  $p = 0,660$ ] o el tiempo de permanencia en el compartimento iluminado [0-5 min:  $T(15) = 0,440$ ,  $p = 0,666$ ; 5-10 min:  $T(15) = 1,225$ ,  $p = 0,239$ ; 0-10 min:  $T(15) = 0,573$ ,  $p = 0,575$ ].

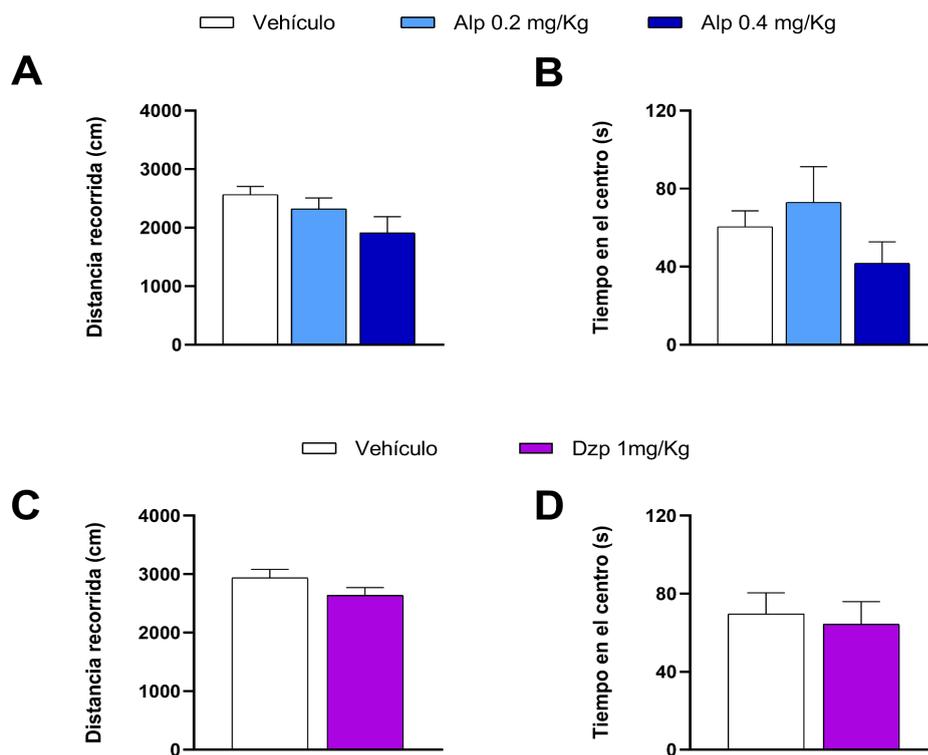
	Latencia L-D (s)	Latencia D-L (s)	N° Rearings	N° Risk Assessment
Vehículo	14,0 ± 2,63	35,60 ± 6,66	7,50 ± 1,42	4,90 ± 0,35
Alp 0.2 mg/kg	18,88 ± 3,99	145,3 ± 79,67	6,50 ± 1,44	6,62 ± 0,84
Alp 0.4 mg/kg	9,44 ± 2,25	29,44 ± 7,98	10,22 ± 2,41	6,11 ± 1,02
Vehículo	9,22 ± 1,63	20,11 ± 2,13	9,67 ± 1,69	6,44 ± 0,77
Dzp 1 mg/kg	8,12 ± 1,63	24 ± 7,32	8,50 ± 1,60	7,75 ± 1,03

**Tabla 2.** Efecto de la administración aguda de alprazolam (Alp) o diazepam (Dzp) i.p. sobre la latencia L-D, latencia D-L, número de *rearings* y número de *risk assessment* evaluado en el L-D box. Media ± EEM. Test *t*-Student o ANOVA de una vía seguido del test de comparación múltiple de Tukey. n= 8-10.

En la tabla 2 se muestra el efecto de la administración aguda de alprazolam o diazepam sobre la latencia L-D y D-L, el número de *rearings* y de *risk assessment* en el L-D box durante el tiempo total de registro (10 minutos).

La administración de alprazolam no demostró un efecto significativo en la latencia L-D [F (2, 24) = 2,401, p = 0,112], D-L [F (2, 24) = 2,357, p = 0,116] o en el número de *rearings* [F (2, 24) = 1,080, p = 0,356] y de *risk assessment* [F (2, 24) = 1,376, p = 0,272].

El tratamiento con diazepam no mostró diferencias significativas en comparación con el grupo control en ninguno de los parámetros cuantificados [latencia L-D: T(15) = 0,474, p = 0,642), latencia D-L: T(15) = 0,537, p = 0,599, número de *rearings*: T(15) = 0,497, p = 0,626; número de *risk assessment*: T(15) = 1,032, p = 0,319].



**Figura 8.** Efecto de la administración aguda de alprazolam (Alp) o diazepam (Dzp) i.p. sobre la distancia recorrida (A y C) y tiempo en el centro (B y D) evaluado en el CA. Media  $\pm$  EEM. Test *t*-Student o ANOVA de una vía seguido del test de comparación múltiple de Tukey.  $n = 8-10$

En la figura 8 se muestra el efecto de la administración aguda de alprazolam o diazepam sobre la distancia recorrida (A y C) y tiempo en el centro (B y D) en el CA registrados durante 10 minutos.

Los resultados obtenidos mostraron que la administración de alprazolam no indujo un efecto significativo para la distancia recorrida [ $F(2, 24) = 2,669, p = 0,090$ ] o el tiempo en el centro [ $F(2, 24) = 1,521, p = 0,239$ ].

No observamos diferencias significativas luego del tratamiento con diazepam en la distancia recorrida [ $T(15) = 1,547, p = 0,143$ ] o el tiempo en el centro [ $T(15) = 0,339, p = 0,739$ ].

## 7. Discusión

En este trabajo demostramos que en el modelo L-D *box* la intensidad de luz incide sobre las conductas de ansiedad disminuyendo la exploración del compartimento iluminado en aquellos animales expuestos a una mayor iluminación. Este cambio en la ansiedad experimental se evidenció por una disminución en el tiempo de permanencia en el compartimento iluminado y en el número de *rearings* (exploración vertical). Sin embargo, en nuestras condiciones experimentales no evidenciamos una respuesta ansiolítica frente a la administración aguda de las drogas evaluadas bajo ninguna condición de iluminación.

De acuerdo a lo esperado, y en concordancia con lo reportado en la literatura, nuestros resultados confirman que la iluminación es un factor influyente en el comportamiento de los animales. En particular, Campos-Cardoso y cols. (2023), evaluaron el comportamiento de ratas macho en el L-D *box*, bajo tres condiciones de iluminación, 25, 65 y 330 lx. Demostraron que bajas intensidades promueven la exploración del compartimento iluminado, evidenciado como un aumento en el tiempo de permanencia en el mismo, mientras que ante iluminaciones altas la exploración disminuye. En particular, observaron que bajo la iluminación de 25 lx los tiempos de exploración fueron similares en ambos compartimentos (iluminado y oscuro) durante los primeros 5 minutos de registro, indicando que en estas condiciones el espacio iluminado no generaría aversión. Por el contrario, los animales expuestos a 330 lx mostraron un tiempo de permanencia en el compartimento iluminado cercano al 10% del tiempo total, indicativo de un aumento en la ansiedad. Bajo 65 lx, el porcentaje de tiempo en el compartimento iluminado fue cercano al 25%.

De manera interesante, observaron también que la previa exposición de las ratas al laberinto en cruz elevado como estímulo aversivo, redujo el tiempo de permanencia en el compartimento iluminado, indicativo de un efecto ansiogénico. Es así que estos autores proponen que la iluminación de 65 lx constituiría una condición neutral apropiada para evaluar posibles efectos ansiolíticos o ansiogénicos (Campos-Cardoso et al., 2023). A su vez, en este trabajo, los autores también registraron el número de transiciones, *rearings*, la latencia D-L y si bien algunos de estos parámetros mostraron cambios dependientes de la intensidad de luz, se resalta la robustez del tiempo de permanencia en el compartimento iluminado como parámetro sensible al impacto de la luz sobre los niveles de ansiedad.

En el L-D *box*, así como en otros modelos tales como el laberinto en cruz elevado, se describe que un mayor nivel de ansiedad se asocia con un mayor número de *risk assessment* (Griebel et al., 1996; Mikics et al., 2005; Rodgers et al., 1999). Nuestros resultados mostraron una reducción en el número de *risk assessment* lo que se contrapone al aumento de la ansiedad observado. En concordancia con nuestros resultados, Campos-Cardoso y cols., (2023), reportaron que los animales expuestos a 330 lx, en los cuales los niveles de ansiedad serían mayores, realizaron un menor número de *risk assessment* que aquellos evaluados bajo la condición de 65 lx. En este contexto, se requieren más estudios para poder determinar la relevancia de este parámetro como indicador de ansiedad.

Hasta nuestro conocimiento, el trabajo de Campos-Cardoso es el único que evalúa de manera específica el impacto de la luz en el L-D *box* en ratas. Sin embargo, y a pesar de encontrar variabilidad en los datos reportados en la literatura, existen evidencias que dan soporte a la hipótesis de que el aumento de la iluminación favorece la aparición de

conductas de ansiedad (Sena et al., 2003; Bueno et al., 2005). Así, trabajos que utilizaron intensidades de luz en el rango de 60-65 lx reportan tiempos de permanencia en el compartimento iluminado superiores a 200 segundos (Arrant et al., 2013; Sena et al., 2003) mientras que con mayores iluminaciones (300-450 lx) se han descrito tiempos de permanencia menores, con exploraciones inferiores a 75 segundos (Agustí et al., 2021; Kumar et al., 2016).

Es importante mencionar que las diferencias observadas en el comportamiento de los animales en el L-D box se deberían exclusivamente a la influencia de la luz y no a posibles afectaciones motoras dado que su evaluación previa en el CA no mostró diferencias en la actividad locomotora ni el tiempo en el centro.

Por otra parte, de forma contraria a lo esperado, nuestro estudio no evidenció la acción ansiolítica de las drogas ensayadas bajo ninguna condición de iluminación.

Alprazolam tiene una demostrada acción ansiolítica en diferentes modelos conductuales tales como el laberinto en cruz elevado, la prueba de conflicto de Vogel o el campo abierto, aunque existe variabilidad en las dosis utilizadas (González-Pardo et al., 2006; Griebel et al. 1996; Prunell et al., 1994; Söderpalm & Engel, 1990). Griebel y cols. (1996), utilizando el L-D box en ratones, reportaron un aumento en el tiempo de permanencia en el compartimento iluminado a la dosis de 0.1 y 0.3 mg/Kg i.p. bajo una iluminación de 4000 lx. Así, es posible especular que esta alta intensidad de luz pudiera favorecer la detección del efecto ansiolítico de la droga. Sin embargo, no podemos descartar que las diferencias observadas se deban a la especie utilizada. De igual manera, un aumento en el número de transiciones y tiempo de permanencia en el compartimento iluminado fue descrito en ratones utilizando iluminaciones mayores a 400 lx aunque con dosis mayores de alprazolam (1 y 2 mg/Kg i.p.; Azevedo et al., 2019). Cabe mencionar que las dosis de alprazolam utilizadas en este trabajo no afectaron la actividad de los animales en el CA pero en un ensayo piloto realizado en nuestro laboratorio, las dosis de 1 y 2 mg/Kg provocaron una notoria afectación de la actividad motora (datos no mostrados). Esta última observación sería probablemente producto del efecto sedativo de las BZD, lo que limita su evaluación en el L-D box (Bourin & Hascoët, 2003; Crawley, 1985).

A su vez, en condiciones de baja iluminación (65 lx) tampoco evidenciamos una acción ansiolítica para buspirona, una droga con un mecanismo de acción no-benzodiazepínico (Heesbeen et al., 2024). Buspirona ha sido previamente ensayada en el L-D box en ratas, y una acción ansiolítica, evidenciada como un aumento del tiempo en movimiento en el compartimento iluminado, fue reportada para las mismas dosis que fueron evaluadas en nuestro trabajo (Bilkei-Gorzó et al., 1998). Sin embargo, no es posible determinar si la ausencia de efecto observada en nuestro trabajo podría estar influenciada por las condiciones de iluminación ya que los autores no reportan la intensidad utilizada. Es importante destacar que, en este trabajo, la acción ansiolítica de buspirona fue evidenciada en animales previamente tratados con la droga m-clorofenil-piperazina la cual induce un perfil conductual de tipo-ansioso en el L-D box, sugiriendo que un estado basal de los animales más ansioso podría favorecer la sensibilidad a su acción ansiolítica (Bilkei-Gorzó et al., 1998; Bourin, 2015).

Por otra parte, encontramos que la administración de buspirona (0.25 mg/Kg) aumentó la distancia recorrida en el CA y redujo el tiempo en el centro en ambas dosis evaluadas, indicativo de un posible efecto ansiogénico. En este sentido, una acción ansiogénica para buspirona ya ha sido reportada en el L-D box u otros modelos de ansiedad, aunque a dosis

mayores a las utilizadas en este trabajo, limitando el rango de dosis a utilizar (Collinson & Dawson, 1997; File & Andrews, 1991; Kumar et al., 2016). Estas evidencias están en consonancia con lo planteado por Bourin y Hascoët (2003) quienes proponen que drogas que modulan la neurotransmisión serotoninérgica (como es el caso de buspirona) demuestran resultados contradictorios en el L-D box y sostienen que las BZD serían más consistentes en su acción ansiolítica en este modelo (Bourin & Hascoët, 2003; Himanshu et al., 2020). Sin embargo, en nuestro trabajo, tampoco evidenciamos una acción ansiolítica de la BZD diazepam en la condición en que los animales muestran mayores niveles de ansiedad (330 lx). Si bien, diazepam ha sido utilizado como control positivo de efecto ansiolítico en el L-D box (y otros modelos) existen trabajos que reportan ausencia de efecto (Bhagwat et al., 2013; Bilkei-Gorzó et al., 1998; Chaouloff et al., 1997; De Oliveira et al., 2021; Kapus et al., 2008). En la búsqueda de posibles causas que expliquen las diferencias entre nuestras observaciones y aquellas que reportan efecto ansiolítico para diazepam, no es posible determinar si éstas podrían deberse a las condiciones de iluminación ya que las intensidades utilizadas no fueron reportadas (Bhagwat et al., 2013; Bilkei-Gorzó et al., 1998; Kapus et al., 2008). A su vez, otras variables tales como la dosis, vía de administración (oral vs i.p.) o la especie (rata vs ratón) podrían estar en la base de estas discrepancias (Bhagwat et al., 2013; Griebel et al., 1996; Zhang et al., 2020).

En este trabajo, el análisis de las conductas en el L-D box desglosadas en períodos de 5 minutos mostró que los primeros 5 minutos de registro son sensibles a los cambios en la iluminación, en concordancia con el uso extendido de esta duración del test (Bilkei-Gorzó et al., 1998; Chaouloff et al., 1997; Dringenberg et al., 1998; Kumar et al., 2016). Sin embargo, para completar la puesta a punto del modelo en nuestro laboratorio no podemos descartar continuar utilizando un tiempo total de registro de 10 minutos, ya que esta duración podría favorecer la detección de acciones ansiolíticas. En este sentido, Campos-Cardoso y cols. (2023) proponen que el registro de las conductas durante 10 minutos sería apropiado ya que luego de este tiempo los animales reducen la exploración del área aversiva de manera independiente de la condición de iluminación. Esta observación da sustento a la relevancia de la novedad en modelos que evalúan ansiedad basados en el conflicto de aproximación-evitación.

Por último, no podemos desconocer que la dimensión y proporción de los compartimentos L/D de la caja son factores que también podrían influir en el desempeño de los animales en el modelo. Los reportes en la literatura utilizan cajas con una relación L:D 1:1 (Bilkei-Gorzó et al., 1998; Kumar et al., 2016; Sugiyama et al., 2012), así como 2:1 (Agustí et al., 2021; Bourin, 2015; Campos-Cardoso et al., 2023). Esta última proporción favorecería la preferencia natural por el espacio cerrado y oscuro y promovería una mayor permanencia en él. Este comportamiento podría favorecer la detección de la acción ansiolíticas en el modelo y podría ser otra variable a considerar a la hora de optimizar el modelo en nuestro laboratorio.

## 8. Conclusiones

En este trabajo confirmamos que la iluminación en el L-D *box* es un factor que modula la respuesta conductual de ansiedad y que condiciones de iluminación mayores (más aversivas) serían necesarias para detectar sensibilidad a la acción de drogas ansiolíticas.

Las condiciones establecidas hasta ahora permitirían el estudio de potenciales efectos ansiogénicos.

## 9. Perspectivas

- Avanzar en la optimización del modelo L-D *box* en nuestro laboratorio para la detección del efecto de drogas ansiolíticas. Para ello nos proponemos, por un lado, aumentar la intensidad de iluminación del compartimento iluminado y por otro, explorar nuevas proporciones de los compartimentos L/D. Estas modificaciones permitirán aumentar la aversión del compartimento iluminado y la respuesta de ansiedad de los animales, favoreciendo la sensibilidad a los ansiolíticos.
- Determinar si las condiciones actuales son sensibles a la acción ansiogénica del estrés. Estos experimentos permitirán establecer las condiciones experimentales para la caracterización del neuropéptido hipotalámico Hormona Concentradora de Melanina como potencial agente ansiogénico.

## 10. Bibliografía

Agustí, A., Campillo, I., Balzano, T., Benítez-Páez, A., López-Almela, I., Romaní-Pérez, M., Forteza, J., Felipo, V., Avena, N. M., & Sanz, Y. (2021). *Bacteroides uniformis* CECT 7771 Modulates the Brain Reward Response to Reduce Binge Eating and Anxiety-Like Behavior in Rat. *Molecular neurobiology*, 58(10), 4959–4979. <https://doi.org/10.1007/s12035-021-02462-2>

Arrant, A. E., Schramm-Sapyta, N. L., & Kuhn, C. M. (2013). Use of the light/dark test for anxiety in adult and adolescent male rats. *Behavioural Brain Research*, 256, 119–127. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2013.05.035>

Azevedo, H., Ferreira, M., Costa, R. W., Russo, V., Russo, E., Mascarello, A., & Guimarães, C. R. W. (2019). Preclinical characterization of ACH-000029, a novel anxiolytic compound acting on serotonergic and alpha-adrenergic receptors. *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry*, 95, 109707. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2019.109707>

Bhagwat, V., Chowta, M. N., Shoeb, A., Maskeri, R., Venkatesh, V., & Rai, A. (2013). Evaluation of anxiolytic activity of vanillin in wistar albino rats. *International Journal of Nutrition, Pharmacology, Neurological Diseases*, 3(2), 96-101. <https://doi.org/10.4103/2231-0738.112828>

Bilkei-Gorzó, A., Gyertyán, I., & Lévy, G. (1998). mCPP-induced anxiety in the light-dark box in rats--a new method for screening anxiolytic activity. *Psychopharmacology*, 136(3), 291–298. <https://doi.org/10.1007/s002130050568>

Bourin, M., & Hascoët, M. (2003). The mouse light/dark box test. *European journal of pharmacology*, 463(1-3), 55–65. [https://doi.org/10.1016/s0014-2999\(03\)01274-3](https://doi.org/10.1016/s0014-2999(03)01274-3)

- Bourin M. (2015). Animal models for screening anxiolytic-like drugs: a perspective. *Dialogues in clinical neuroscience*, 17(3), 295–303. <https://doi.org/10.31887/DCNS.2015.17.3/mbourin>
- Brandt, J., Bressi, J., Lê, M. L., Neal, D., Cadogan, C., Witt-Doerring, J., Witt-Doerring, M., & Wright, S. (2024). Prescribing and deprescribing guidance for benzodiazepine and benzodiazepine receptor agonist use in adults with depression, anxiety, and insomnia: an international scoping review. *EClinicalMedicine*, 70. <https://doi.org/10.1016/j.eclinm.2024.102507>
- Bueno, C. H., Zangrossi, H., Jr, & Viana, M. B. (2005). The inactivation of the basolateral nucleus of the rat amygdala has an anxiolytic effect in the elevated T-maze and light/dark transition tests. *Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas*, 38(11), 1697–1701. <https://doi.org/10.1590/s0100-879x2005001100019>
- Campos, A. C., Fogaça, M. V., Aguiar, D. C., & Guimarães, F. S. (2013). Animal models of anxiety disorders and stress. *Revista brasileira de psiquiatria*, 35 Suppl 2, 101–111. <https://doi.org/10.1590/1516-4446-2013-1139>
- Campos-Cardoso, R., Godoy, L. D., Lazarini-Lopes, W., Novaes, L. S., dos Santos, N. B., Perfetti, J. G., Garcia-Cairasco, N., Munhoz, C. D., & Padovan, C. M. (2023). Exploring the light/dark box test: Protocols and implications for neuroscience research. *Journal of Neuroscience Methods*, 384. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2022.109748>
- 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. *Behavioural brain research*, 85(1), 27–35. [https://doi.org/10.1016/s0166-4328\(96\)00160-x](https://doi.org/10.1016/s0166-4328(96)00160-x)
- Cloutier, S., LaFollette, M. R., Gaskill, B. N., Panksepp, J., & Newberry, R. C. (2018). Tickling, a Technique for Inducing Positive Affect When Handling Rats. *Journal of visualized experiments : JoVE*, (135), 57190. <https://doi.org/10.3791/57190>
- Collinson, N., & Dawson, G. R. (1997). On the elevated plus-maze the anxiolytic-like effects of the 5-HT(1A) agonist, 8-OH-DPAT, but not the anxiogenic-like effects of the 5-HT(1A) partial agonist, buspirone, are blocked by the 5-HT1A antagonist, WAY 100635. *Psychopharmacology*, 132(1), 35–43. <https://doi.org/10.1007/s002130050317>
- Costall, B., Kelly, M. E., Naylor, R. J., & Onaivi, E. S. (1989). The actions of nicotine and cocaine in a mouse model of anxiety. *Pharmacology, biochemistry, and behavior*, 33(1), 197–203. [https://doi.org/10.1016/0091-3057\(89\)90450-4](https://doi.org/10.1016/0091-3057(89)90450-4)
- Craske, M. G., & Stein, M. B. (2016). Anxiety. *The Lancet*, 388(10063), 3048–3059. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)30381-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)30381-6)
- Crawley, J., & Goodwin, F. K. (1980). Preliminary report of a simple animal behavior model for the anxiolytic effects of benzodiazepines. *Pharmacology, biochemistry, and behavior*, 13(2), 167–170. [https://doi.org/10.1016/0091-3057\(80\)90067-2](https://doi.org/10.1016/0091-3057(80)90067-2)
- Crawley J. N. (1981). Neuropharmacologic specificity of a simple animal model for the behavioral actions of benzodiazepines. *Pharmacology, biochemistry, and behavior*, 15(5), 695–699. [https://doi.org/10.1016/0091-3057\(81\)90007-1](https://doi.org/10.1016/0091-3057(81)90007-1)
- Crawley J. N. (1985). Exploratory behavior models of anxiety in mice. *Neuroscience and biobehavioral reviews*, 9(1), 37–44. [https://doi.org/10.1016/0149-7634\(85\)90030-2](https://doi.org/10.1016/0149-7634(85)90030-2)
- Daviu, N., Bruchas, M. R., Moghaddam, B., Sandi, C., & Beyeler, A. (2019). Neurobiological links between stress and anxiety. *Neurobiology of stress*, 11, 100191. <https://doi.org/10.1016/j.ynstr.2019.100191>
- De Oliveira Sergio, T., Wetherill, L., Kwok, C., Khoylou, F., & Hopf, F. W. (2021). Sex differences in specific aspects of two animal tests of anxiety-like behavior. *Psychopharmacology*, 238(10), 2775–2787. <https://doi.org/10.1007/s00213-021-05893-w>

Desingu, R., Sadasivam, B., Kalra, S. S., & Lakhawat, B. (2023). Animal models of anxiety: a review. *International Journal of Basic & Clinical Pharmacology*, 12(1), 134. <https://doi.org/10.18203/2319-2003.ijbcp20223368>

Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders; DSM-5. (2013). *American Psychiatric Association, 5th ed. Arlington.*

Dringenberg, H. C., Kornelsen, R. A., Pacelli, R., Petersen, K., & Vanderwolf, C. H. (1998). Effects of amygdaloid lesions, hippocampal lesions, and buspirone on black-white exploration and food carrying in rats. *Behavioural brain research*, 96(1-2), 161–172. [https://doi.org/10.1016/s0166-4328\(98\)00010-2](https://doi.org/10.1016/s0166-4328(98)00010-2)

File S. E. (1984). Behavioural pharmacology of benzodiazepines. *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry*, 8(1), 19–31. [https://doi.org/10.1016/0278-5846\(84\)90132-5](https://doi.org/10.1016/0278-5846(84)90132-5)

File, S. E., & Andrews, N. (1991). Low but not high doses of buspirone reduce the anxiogenic effects of diazepam withdrawal. *Psychopharmacology*, 105(4), 578–582. <https://doi.org/10.1007/BF02244384>

Garcia, A. M., Cardenas, F. P., & Morato, S. (2005). Effect of different illumination levels on rat behavior in the elevated plus-maze. *Physiology & behavior*, 85(3), 265–270. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2005.04.007>

González-Pardo, H., Conejo, N. M., & Arias, J. L. (2006). Oxidative metabolism of limbic structures after acute administration of diazepam, alprazolam and zolpidem. *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry*, 30(6), 1020–1026. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2006.03.026>

Griebel, G., Sanger, D. J., & Perrault, G. (1996). Further evidence for differences between non-selective and BZ-1 (omega 1) selective, benzodiazepine receptor ligands in murine models of "state" and "trait" anxiety. *Neuropharmacology*, 35(8), 1081–1091. [https://doi.org/10.1016/s0028-3908\(96\)00080-9](https://doi.org/10.1016/s0028-3908(96)00080-9)

Heesbeen, E. J., van Kampen, T., Verdouw, P. M., van Lissa, C., Bijlsma, E. Y., & Groenink, L. (2024). The effect of SSRIs on unconditioned anxiety: a systematic review and meta-analysis of animal studies. *Psychopharmacology*, 241, 1731-1755. <https://doi.org/10.1007/s00213-024-06645-2>

Himanshu, Dharmila, Sarkar, D., & Nutan (2020). A Review of Behavioral Tests to Evaluate Different Types of Anxiety and Anti-anxiety Effects. *Clinical psychopharmacology and neuroscience : the official scientific journal of the Korean College of Neuropsychopharmacology*, 18(3), 341–351. <https://doi.org/10.9758/cpn.2020.18.3.341>

Kapus, G. L., Gacsályi, I., Vegh, M., Kompagne, H., Hegedus, E., Leveleki, C., Hársing, L. G., Barkóczy, J., Bilkei-Gorzó, A., & Lévy, G. (2008). Antagonism of AMPA receptors produces anxiolytic-like behavior in rodents: effects of GYKI 52466 and its novel analogues. *Psychopharmacology*, 198(2), 231–241. <https://doi.org/10.1007/s00213-008-1121-z>

Kilfoil, T., Michel, A., Montgomery, D., & Whiting, R. L. (1989). Effects of anxiolytic and anxiogenic drugs on exploratory activity in a simple model of anxiety in mice. *Neuropharmacology*, 28(9), 901–905. [https://doi.org/10.1016/0028-3908\(89\)90188-3](https://doi.org/10.1016/0028-3908(89)90188-3)

Kumar, J. R., Rajkumar, R., Lee, L. C., & Dawe, G. S. (2016). Nucleus incertus contributes to an anxiogenic effect of buspirone in rats: Involvement of 5-HT1A receptors. *Neuropharmacology*, 110(Pt A), 1–14. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2016.07.019>

LaFollette, M. R., O'Haire, M. E., Cloutier, S., Blankenberger, W. B., & Gaskill, B. N. (2017). Rat tickling: A systematic review of applications, outcomes, and moderators. *PLoS one*, 12(4), e0175320. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0175320>

Lister R. G. (1990). Ethologically-based animal models of anxiety disorders. *Pharmacology & therapeutics*, 46(3), 321–340. [https://doi.org/10.1016/0163-7258\(90\)90021-s](https://doi.org/10.1016/0163-7258(90)90021-s)

Merlo Pich, E., & Samanin, R. (1986). Disinhibitory effects of buspirone and low doses of sulpiride and haloperidol in two experimental anxiety models in rats: possible role of dopamine. *Psychopharmacology*, 89(1), 125–130. <https://doi.org/10.1007/BF00175204>

Merlo Pich, E., & Samanin, R. (1989). A two-compartment exploratory model to study anxiolytic/anxiogenic effects of drugs in the rat. *Pharmacological research*, 21(5), 595–602. [https://doi.org/10.1016/1043-6618\(89\)90201-6](https://doi.org/10.1016/1043-6618(89)90201-6)

Mikics, E., Barsy, B., Barsvári, B., & Haller, J. (2005). Behavioral specificity of non-genomic glucocorticoid effects in rats: effects on risk assessment in the elevated plus-maze and the open-field. *Hormones and behavior*, 48(2), 152–162. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2005.02.002>

World Health Organization (2023). <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/anxiety-disorders>

Penninx, B. W., Pine, D. S., Holmes, E. A., & Reif, A. (2021). Anxiety disorders. *The Lancet*, 397(10277), 914–927. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)00359-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)00359-7)

Prunell, M., Escorihuela, R. M., Fernández-Teruel, A., Núñez, J. F., & Tobeña, A. (1994). Anxiolytic profiles of alprazolam and ethanol in the elevated plus-maze test and the early acquisition of shuttlebox avoidance. *Pharmacological research*, 29(1), 37–46. [https://doi.org/10.1016/1043-6618\(94\)80096-0](https://doi.org/10.1016/1043-6618(94)80096-0)

Prut, L., & Belzung, C. (2003). The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. *European journal of pharmacology*, 463(1-3), 3–33. [https://doi.org/10.1016/s0014-2999\(03\)01272-x](https://doi.org/10.1016/s0014-2999(03)01272-x)

Rodgers, R. J., Haller, J., Holmes, A., Halasz, J., Walton, T. J., & Brain, P. F. (1999). Corticosterone response to the plus-maze: high correlation with risk assessment in rats and mice. *Physiology & behavior*, 68(1-2), 47–53. [https://doi.org/10.1016/s0031-9384\(99\)00140-7](https://doi.org/10.1016/s0031-9384(99)00140-7)

Rosso, M., Wirz, R., Loretan, A. V., Sutter, N. A., Pereira da Cunha, C. T., Jaric, I., Würbel, H., & Voelkl, B. (2022). Reliability of common mouse behavioural tests of anxiety: A systematic review and meta-analysis on the effects of anxiolytics. *Neuroscience and biobehavioral reviews*, 143, 104928. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2022.104928>

Sena, L. M., Bueno, C., Pobbe, R. L., Andrade, T. G., Zangrossi, H., Jr, & Viana, M. B. (2003). The dorsal raphe nucleus exerts opposed control on generalized anxiety and panic-related defensive responses in rats. *Behavioural brain research*, 142(1-2), 125–133. [https://doi.org/10.1016/s0166-4328\(02\)00399-6](https://doi.org/10.1016/s0166-4328(02)00399-6)

Söderpalm, B., & Engel, J. A. (1990). Alpha 1- and beta-adrenoceptor stimulation potentiate the anticonflict effect of a benzodiazepine. *Journal of neural transmission. General section*, 79(3), 155–167. <https://doi.org/10.1007/BF01245127>

Sugiyama, A., Saitoh, A., Iwai, T., Takahashi, K., Yamada, M., Sasaki-Hamada, S., Oka, J., Inagaki, M., & Yamada, M. (2012). Riluzole produces distinct anxiolytic-like effects in rats without the adverse effects associated with benzodiazepines. *Neuropharmacology*, 62(8), 2489–2498. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2012.02.012>

Tyrer, P., & Baldwin, D. (2006). Generalised anxiety disorder. *Lancet (London, England)*, 368(9553), 2156–2166. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(06\)69865-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(06)69865-6)

Zhang, K., Lu, J., & Yao, L. (2020). Involvement of the dopamine D1 receptor system in the anxiolytic effect of cedrol in the elevated plus maze and light-dark box tests. *Journal of pharmacological sciences*, 142(1), 26–33. <https://doi.org/10.1016/j.jphs.2019.11.004>