



UNIVERSIDAD ANDINA DEL CUSCO

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

ESCUELA PROFESIONAL DE PSICOLOGÍA



Tesis

**Efecto del Estrés Crónico Leve en los Comportamientos Tipo Ansiosos y Depresivos
en Ratonés Adultos de dos Cepas Endogámicas, Cusco 2022.**

Presentado por:

Bach. Anzu Gitit Zevallos Arias

ORCID: 0000-0002-7715-1136

Para optar al Título Profesional de:

Licenciada en Psicología

Asesora:

Dra. Grace Violeta Espinoza Pardo

ORCID: 0000-0002-8840-3386

CUSCO – PERÚ

2022



Agradecimientos

Este trabajo fue financiado por el CONCYTEC- PROCIENCIA en el marco de la convocatoria E041-01 Contrato N° 025-2019- FONDECYT-BM-INC.INV.

Así mismo, agradezco al Laboratorio de Investigación en Neurociencias de la Universidad Andina del Cusco por haberme brindado la oportunidad y el espacio para poder desarrollar la presente investigación, en especial al Dr. Luis Fernando Pacheco por su mentoría e impulso académico.

A mi Asesora Dra. Grace Pardo, por su orientación, enseñanza y esfuerzo para que se lleve a cabo esta investigación.

A la Mtra. Vanessa Rozas, por su enseñanza y la confianza depositada en mí, que hizo posible que emprenda este camino en la investigación, le estoy eternamente agradecida.

Finalmente, agradecer a mi familia por su apoyo incondicional, y a si mismo a cada persona que estuvo siguiendo de cerca cada paso en esta Investigación.

Anzu



Dedicatoria

Con mucho cariño y amor dedico esta tesis a mi Mamá; Yobana gracias por su apoyo incondicional, por enseñarme a ser una persona de bien con valores y ser ese motor que me alienta día a día alcanzar mis sueños, este gran paso no hubiera sido posible sin tu soporte y perseverancia por verme cumplir mis metas.

A mi hijo Salvador mi mayor motivación, por ser lo más importante de mi vida, ahora se vienen nuevos retos.

Para todos aquellos que de alguna u otra forma contribuyeron en el desarrollo de esta tesis.

Anzu Gitit



ÍNDICE

CAPÍTULO I	13
INTRODUCCIÓN	13
1.1. Planteamiento del Problema	13
1.2. Formulación del Problema	16
1.2.1. Problema general	16
1.2.2. Problemas específicos	16
1.3. Justificación	17
1.3.1. Conveniencia	17
1.3.2. Relevancia social	18
1.3.3. Implicancias prácticas	18
1.3.4. Valor teórico	18
1.3.5. Utilidad metodológica	19
1.3.6. Viabilidad	19
1.4. Objetivos de la investigación	20
1.4.1. Objetivo general	20
1.4.2. Objetivos específicos	20
1.5. Delimitación del Estudio	21
1.5.1. Delimitación espacial	21
1.5.2. Delimitación temporal	21
1.6. Aspectos éticos	21
CAPÍTULO II	22
MARCO TEÓRICO	22
2.1. Antecedentes del estudio	22



2.2. Bases teóricas	30
Depresión crónica inducida por estrés	30
Síntomas clínicos	31
Modelos teóricos de la depresión	31
<i>Ansiedad</i>	34
Modelos Teóricos de la Ansiedad	34
Diferencias de género en los trastornos de depresión y ansiedad	36
Interacción genética-ambiente y trastornos de depresión y ansiedad	38
<i>Estrés crónico y Trastornos de depresión y ansiedad</i>	39
<i>Modelos animales de depresión crónica</i>	40
Validez del Modelo de Estrés crónico leve	45
Dimensiones del Estrés crónico leve	46
A. Variedad de estímulos	46
Dimensiones de la depresión en modelos animales	47
Dimensiones de Ansiedad de modelo animal	49
Método para evaluar comportamientos de ansiedad en roedores	50
Método para evaluar comportamientos de depresión en roedores	51
<i>Diferencias comportamentales de ratones C57BL/6NCrl y BALB/c.</i>	52
2.3. Marco conceptual	52
2.4. Hipótesis de investigación	53
2.4.1. Hipótesis General	53
2.5. Variables	54



2.5.1. Identificación de variables	54
2.5.2. Operacionalización de variables	55
CAPÍTULO III	58
MÉTODO	58
3.1. Alcance del estudio	58
3.2. Diseño de la investigación	58
3.3. Población	60
3.4. Muestra	60
Protocolo para aplicar el Modelo de Estrés Crónico Leve	61
Proceso de evaluación de Peso corporal y estado del pelaje	62
Evaluaciones comportamentales	63
Comportamientos tipo ansiosos	63
Test de laberinto Elevado en Cruz (LEC)	63
Test de la caja clara- oscura (CO)	64
Comportamientos tipo depresivos	65
Test de Nado Forzado	65
Splash Test	66
Test de Suspensión por la cola	66
3.5. Procedimiento	67
3.6. Técnicas (Experimental y registro conductual) e instrumentos de recolección de datos.	71
3.7. Análisis de Datos	73
CAPÍTULO IV	74



RESULTADOS DE LA INVESTIGACIÓN	74
4.1. Efecto de estrés crónico leve sobre la ganancia de peso corporal	74
4.2. Resultados del Primer objetivo específico:	76
4.3. Resultados del segundo objetivo específico:	78
4.4. Resultados del Tercer objetivo específico:	80
4.5. Resultados del Cuarto objetivo específico:	84
4.6. Resultados del Quinto objetivo específico:	87
4.7. Resultados del Sexto objetivo específico:	90
4.8. Resultados del Séptimo objetivo específico:	93
4.9. Resultados del Octavo objetivo específico:	98
CAPÍTULO V	102
DISCUSIÓN	102
5.1. Descripción de los hallazgos más relevantes y significativos	102
5.2. Comparación crítica con la literatura	106
5.3. Limitaciones del estudio	109
5.4. Implicancias del estudio	109
CONCLUSIONES	111
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	112
Anexos:	121
Matriz de consistencia	121
Matriz de operacionalización del instrumento de investigación	123
Instrumentos de recolección de datos (Registros comportamentales)	127
Presupuesto y financiamiento	132



ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Susceptibilidad a las diferencias individuales en el género	37
Tabla 2 Síntomas de la depresión mayor en el aspecto traslacional	44
Tabla 3 Operacionalización de variables	55
Tabla 4 Operacionalización de variables controladas.....	57
Tabla 5 Diseño experimental de tipo factorial 2x2.....	59
Tabla 6 El diseño experimental de tipo factorial 2x2 (tratamiento experimental por cepa)	59
Tabla 7 Pruebas comportamentales	72
Tabla 8 Resumen de análisis factorial (protocolo ECL x sexo) del test de la caja clara/oscura.....	76
Tabla 9 Resumen de análisis factorial (protocolo ECL x sexo) del test de Laberinto Elevado en Cruz.....	77
Tabla 10 Resumen de análisis factorial (protocolo ECL x sexo) del test Caja clara – oscura Hembras.....	78
Tabla 11 Resumen de análisis factorial (protocolo ECL x sexo) del test Laberinto elevado en cruz Hembras	79
Tabla 12 Resumen de análisis factorial (protocolo ECL x sexo) del test de Nado Forzado	81
Tabla 13 Resumen de análisis factorial (protocolo ECL x sexo) del test de Suspensión de cola.....	82
Tabla 14 Resumen de análisis factorial (protocolo ECL x sexo) del Splash Test	83
Tabla 15 Resumen de análisis factorial (protocolo ECL x sexo) del Test de Nado forzado	85
Tabla 16 Resumen de análisis factorial (protocolo ECL x sexo) del Test de Suspensión de cola.....	86



Tabla 17 Resumen de análisis factorial (protocolo ECL x sexo) del Splash Test87

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Línea temporal de experimentación68

Figura 2 Cronograma de estímulos y pruebas comportamentales70

Figura 3 Efecto del ECL en la ganancia de peso corporal en ratones C57BL/6Ncr1 y
BALB/c.75

Figura 4 Efecto del ECL en el Test comportamental Caja clara – oscura en ratones machos
C57BL/6Ncr1 y BALB/c88

Figura 5 (Efecto del ECL en el Test comportamental Laberinto elevado en cruz en ratones
machos C57BL/6Ncr1 y BALB/c.90

Figura 6 Efecto del ECL en el Test comportamental Caja clara – oscura en ratones
hembras C57BL/6Ncr1 y BALB/c.....91

Figura 7 Efecto del ECL en el Test comportamental Laberinto elevado en cruz en ratones
hembras C57BL/6Ncr1 y BALB/c.....93

Figura 8 Efecto del ECL en el Test comportamental de Nado forzado en ratones machos
C57BL/6Ncr1 y BALB/c.94

Figura 9 Efecto del ECL en el Test comportamental de Suspensión de cola en ratones machos
C57BL/6Ncr1 y BALB/c.96

Figura 10 Efecto del ECL en Splash Test en ratones machos C57BL/6Ncr1 y BALB/c.....97

Figura 11 Efecto del ECL en el Test comportamental de Nado forzado en ratones hembras
C57BL/6Ncr1 y BALB/c.99

Figura 12 Efecto del ECL en el Test comportamental de Suspensión de cola en ratones
hembras C57BL/6Ncr1 y BALB/c.....100



Figura 13 Figura 13. Efecto del ECL en Splash Test en ratones hembras C57BL/6Ncr1 y
BALB/c.101



RESUMEN

La presente investigación tuvo como objetivo determinar de qué manera el estrés crónico leve (ECL) influye en los comportamientos tipo ansiosos y depresivos en ratones adultos de dos cepas endogámicas, BALB/c y C57BL/6NCrI. Para esto, se utilizaron 106 ratones machos (n=51) y hembras (n=27) de la cepa BALB/c y 28 ratones adultos machos (n=13) y hembras (n=15) de la cepa C57BL/6NCrI, los cuales fueron expuestos a un protocolo de ECL durante 5 semanas. Para medir los comportamientos tipo ansiosos se usaron dos pruebas comportamentales: Test de la caja clara – oscura y el Test de laberinto elevado en cruz. Asimismo, para medir los comportamientos tipo depresivos se usaron las pruebas comportamentales: Test de splash (apatía), test de nado forzado y el test de suspensión por la cola. Los datos fueron analizados usando el test estadístico ANOVA. Los resultados mostraron diferencias basales bien definidas en los comportamientos tipo ansiosos y depresivos entre ambas cepas, donde los ratones machos y hembras de la cepa BALB/c muestran comportamientos tipo ansiosos reducidos y comportamientos tipo depresivos incrementados en comparación con los ratones de la cepa C57BL/6NCrI. La exposición al protocolo ECL redujo los comportamientos tipo ansiosos de los ratones machos de ambas cepas, pero no tuvo efecto en los comportamientos tipo ansiosos de las hembras de ninguna de las cepas.

Palabras clave: Estrés crónico leve, ansiedad, depresión, cepas endogámicas.



ABSTRACT

The present investigation aimed to determine how mild chronic stress (LCS) influences anxious and depressive-like behaviors in adult mice of two inbred strains, BALB/c and C57BL/6NCrI. For this, 106 male (n=51) and female (n=27) mice of the BALB/c strain and 28 male (n=13) and female (n=15) adult mice of the C57BL/6NCrI strain were used. which were exposed to an ECL protocol for 5 weeks. To measure anxious-type behaviors, two behavioral tests were used: the light-dark box test and the elevated plus maze test. Likewise, to measure depressive-type behaviors, behavioral tests were used: splash test (apathy), forced swimming test, and the suspension test by the tail. Data were analyzed using the ANOVA statistical test. The results showed well-defined baseline differences in anxiety-like and depressive-like behaviors between both strains, with male and female BALB/c mice showing reduced anxiety-like behaviors and increased depressive-like behaviors compared to C57BL/6NCrI strain mice. Exposure to the ECL protocol reduced anxiety-like behaviors in male mice of both strains, but had no effect on anxiety-like behaviors in females of either strain.

Keywords: Mild chronic stress, anxiety, depression, inbred strains.



CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

1.1. Planteamiento del Problema

La presente investigación tuvo como objetivo determinar de qué manera el estrés crónico leve afecta los comportamientos tipo ansiosos y depresivos en ratones adultos de dos cepas endogámicas. Los trastornos del estado de ánimo relacionados con el estrés, como la ansiedad y la depresión, son muy frecuentes en la población y afectan significativamente a la capacidad de los individuos para desarrollarse y llevar una vida gratificante. Para que un individuo sea diagnosticado con trastorno depresivo mayor, se requiere la presencia de cinco de los nueve síntomas estén presentes durando el periodo de dos semanas, uno de esos síntomas debe ser el estado de ánimo deprimido o la anhedonia que es la pérdida de interés o placer. Otros de los síntomas que caracteriza este trastorno es el cambio en el peso corporal o apetito, insomnio o hipersomnias, retraso psicomotor o agitación, pérdida de energía o fatiga, culpabilidad, dificultad de concentración o indecisión e ideación suicida (Uher y otros, 2014). Las mujeres tienen mayor riesgo de padecer estos trastornos y su susceptibilidad está influenciada por factores genéticos, ambientales y psicológicos.

En la actualidad, aproximadamente 970.1 millones de personas en el mundo padecen de trastornos mentales, dentro de ellos en el trastorno de la depresión, se estima que 279.6 millones de personas padecen de este trastorno, y existe una mayor prevalencia de presentar este trastorno en mujeres con 107.4 millones de personas frente a 109.2 millones de varones, así mismo en el trastorno de ansiedad refleja una mayor prevalencia en mujeres con 187.5 millones de personas frente a 113.9 millones de varones (GBD 2019 Mental Disorders Collaborators, 2022). Por otro lado, los efectos psicológicos de la pandemia COVID- 19,



sumado a las circunstancias económicas y sociales de la población, podrían aumentar de manera significativa la carga mundial de trastornos mentales comunes. (Daly y otros, 2020). Así también, según Diez-Canseco y otros (2014) en Perú los trastornos neuropsiquiátricos ocupaban el primer lugar de los indicadores de carga de enfermedad; entre las patologías se encuentra la depresión y ansiedad, que es además la más prevalente en pacientes con patologías crónicas no transmisibles. Respecto a ello, uno de los estudios epidemiológicos realizados en el Perú hace un poco más de una década fue el del Instituto Especializado de Salud Mental Honorio Delgado Hideyo Noguchi, el cual ha reportado que aproximadamente un 37% de población peruana estudiada habría tenido la probabilidad de padecer algún trastorno psicológico alguna vez en su vida y que la proporción de personas que tuvieron o tienen depresión en Lima Metropolitana era de 18,2% , 16,2% en la sierra y 21,4% en la selva (Rondón, 2006). Así mismo en un estudio más reciente indican que la prevalencia de la depresión en la población peruana adulta mayor es de un (14,3%), influyen factores de riesgo como la condición de mujer, la edad avanzada, pobreza, residir en zonas rurales, carencia de educación y discapacidad física (Martina y otros, 2017).

Aunque la información sobre los síntomas y la epidemiología de la depresión están bien documentados, no se conocen las causas claras de este trastorno. Sin embargo, se considera que varios factores, incluyendo los biológicos, genéticos, ambientales y psicosociales, pueden incrementar el riesgo de desarrollar el trastorno. (Pérez y otros, 2017). De entre estos factores, los factores genéticos pueden tener una influencia de 30-40% en la susceptibilidad para la depresión, mientras que factores no genéticos, como los psicosociales y ambientales, solos o en interacción con el factor genético, pueden explicar el 60-70% de variación en la susceptibilidad para la depresión (Sullivan y otros, 2000). Entre los factores



ambientales, la exposición a eventos estresantes crónicos (variables, impredecibles e incontrolables) en la vida es considerado un precipitante importante en el desarrollo de trastornos como la ansiedad y depresión (Kessler R. , 1997).

Aproximadamente solo el 50% de los pacientes deprimidos tratados con fármacos logran una remisión completa, esto refleja que los tratamientos disponibles para la depresión no son óptimos. A pesar de los importantes avances que existen para determinar las causas de la depresión y las bases neurológicas aún no se logra su comprensión plena (Prins y otros, 2011). Frente a ello, resulta relevante la creación de modelos animales robustos para conocer las respuestas de ansiedad y depresión y poder comprender la etiología de los trastornos mentales como la ansiedad y la depresión, así como la contribución de los antecedentes genéticos en la susceptibilidad para el desarrollo de estos trastornos. A su vez, el resultado de estos conocimientos puede contribuir a pensar en nuevas estrategias de tratamientos terapéuticos eficientes y menos invasivos para poder revertir la sintomatología de la depresión.

El estrés crónico leve (ECL) es un modelo animal de depresión que imita los cambios de comportamiento inducidos por el estrés que se asemejan a ciertas características del trastorno de depresión en humanos (Willner P. , 1997). Además, estos cambios de comportamiento inducidos por estrés se pueden aliviar con tratamientos antidepresivos (Willner, 2017b). Los estudios preclínicos que usan el modelo de ECL en ratones han mostrado diferencias en la sensibilidad al estrés (Mozhui y otros, 2010), así como diferencias entre cepas en respuesta a fármacos en otros modelos comportamentales de depresión (Yalcin y otros, 2008), sugiriendo que los factores genéticos y diferencias en el estresor pueden contribuir a los efectos comportamentales en los modelos de depresión.



Los ratones de las cepas C57BL/6NCrI y BALB/c son los más usadas en estudios biomédicos básicos y difieren en su sensibilidad a diferentes estresores, siendo que ratones de la cepa BALB/c son descritos en la literatura como animales más ansiosos (An y otros, 2011) y más vulnerables a estresores sociales (Razzoli y otros, 2011) y a un protocolo de ECL (Ducottet & Belzung, 2005), sugiriendo que su sensibilidad al ECL para desarrollar fenotipos ansiosos y depresivos puede ser diferente.

Este proyecto tuvo por objetivo principal determinar las potenciales diferencias en los comportamientos de ansiedad y depresión inducidos por ECL en ratones de dos cepas endogámicas, C57BL/6NCrI y BALB/c. Asimismo, en este estudio se propuso determinar si la susceptibilidad al ECL para desarrollar fenotipos tipo depresivos y ansiosos puede ser dependiente del sexo.

1.2. Formulación del Problema

1.2.1. Problema general

¿De qué manera el estrés crónico leve afecta los comportamientos tipo ansiosos y depresivos en ratones adultos de dos cepas endogámicas, Cusco 2022?

1.2.2. Problemas específicos

- ¿En qué medida el estrés crónico leve influye sobre los comportamientos tipo ansiosos en los ratones de la cepa C57BL/6NCrI según el sexo?
- ¿En qué manera el estrés crónico leve influye sobre los comportamientos tipo ansiosos en los ratones de la cepa BALB/c según el sexo?
- ¿En qué medida el estrés crónico leve influye sobre los comportamientos tipo depresivos en los ratones de la cepa C57BL/6NCrI según el sexo?



- ¿En qué medida el estrés crónico leve influye sobre los comportamientos tipo depresivos en los ratones de la cepa BALB/c según el sexo?
- ¿En qué manera el estrés crónico leve influye sobre los comportamientos tipo ansiosos en los ratones machos según la cepa?
- ¿En qué medida el estrés crónico leve influye sobre los comportamientos tipo ansiosos en los ratones hembras según la cepa?
- ¿En qué manera el estrés crónico leve influye sobre los comportamientos tipo depresivos en los ratones machos según la cepa?
- ¿En qué medida el estrés crónico leve influye sobre los comportamientos tipo depresivos en los ratones hembras según la cepa?

1.3. Justificación

1.3.1. Conveniencia

Hacer uso del modelo de ECL, es considerado un modelo de animal de depresión que tiene mayor validez y potencial traslacional, de manera que nos permitió tener una aproximación para entender cómo es la etiología de la depresión y la ansiedad, los mismos que son problemas psicopatológicos que afectan a la sociedad actualmente, y así mismo evidenciar cómo contribuye el contexto o situaciones adversas para que se desencadene el desarrollo de estas patologías. Además, este modelo estresor se utilizó en el macroproyecto que busca generar nuevas estrategias terapéuticas para tratar la ansiedad y la depresión, usando compuestos semisintéticos de las macamidas.



1.3.2. Relevancia social

Al hacer uso de un modelo traslacional se puede dar mayores indicios sobre la etiología de la depresión y la ansiedad, debido a que estos dos trastornos mentales perjudican significativamente el desarrollo del individuo en diferentes contextos, de tal manera la investigación muestra su relevancia social en vista de que a partir de los resultados se puede obtener un modelo experimental robusto, que es fundamental para desarrollar nuevos estudios de exploración farmacológica y tratamientos oportunos a estas, siendo beneficiosa para la comunidad científica y para la sociedad en su conjunto.

1.3.3. Implicancias prácticas

Los resultados de la investigación, puede dar lugar a nuevos tratamientos adecuados y menos invasivos para los trastornos como la depresión y la ansiedad, a través de modelos de animales que demuestren eficacia y validez. Por consiguiente, los resultados obtenidos sugieren que, aunque ambas cepas de ratones sometidos a estrés crónico, muestran una reducción de comportamientos similares a la depresión y ansiedad, siendo así que los ratones de la cepa BALB/c, evidencian un perfil mejorado en este tipo de comportamientos. Estos hallazgos pueden tener implicancias prácticas en la investigación básica experimental de esta cepa, como un modelo potencial de resiliencia y poder explorar acerca de los mecanismos neurobiológicos que subyacen este tipo de trastornos.

Valor teórico

El desarrollo de la investigación permitió un mayor conocimiento teórico sobre los mecanismos genéticos o neurobiológicos, mediante los cuales el estrés puede inducir cambios duraderos generando fenotipos ansiosos o depresivos, siendo causas ambientales o



predisposiciones genéticas que contribuyen a la aparición de estos trastornos. Además, los hallazgos de esta investigación también han permitido explorar los efectos del estrés crónico y los mecanismos que influyen en el desarrollo de trastornos depresivos y ansiosos, por lo cual significa generar conocimiento útil en áreas como la etiopatogenia y el desarrollo psicoafectivo.

Utilidad metodológica

La utilidad metodológica de la presente investigación se presentó al comprobar la validez del modelo animal, en dos cepas de ratones a través del modelo de Estrés crónico leve. Este protocolo es ampliamente usado en ratones y ratas para explorar los efectos a largo plazo del estrés crónico, su replicabilidad depende del tipo de cepa, métodos de evaluación aplicados y el laboratorio. Dicho lo anterior, los resultados de esta investigación son de utilidad metodológica al contribuir con evidencia de que las dos cepas de ratones utilizadas, ambas procedentes del bioterio de la Universidad Andina del Cusco, no demuestran ser un buen modelo para estudiar los efectos del Estrés crónico leve en la depresión y ansiedad.

Viabilidad

La universidad cuenta con un bioterio en el cual se producen las cepas de ratones C57BL/6NCr1 y BALB/c, con los cuales se realizó este estudio. Además, dispone de todos los requerimientos y estándares para controlar el desarrollo y la crianza de los ejemplares. Asimismo, el trabajo se desarrolló con apoyo de un equipo multidisciplinar, el cual está conformado por biólogos moleculares, psicólogos, farmacólogos, veterinarios, médicos y neurocientíficos; con una gran trayectoria y experticia en proyectos de investigación experimental. La presente propuesta se ejecutó como parte del proyecto marco Incorporación



de Investigadores FONDECYT-Banco Mundial (Proyecto 025-2019-F-BM), de modo que, la presente investigación tuvo financiamiento de este fondo.

1.4. Objetivos de la investigación

1.4.1. Objetivo general

Determinar en qué medida el estrés crónico leve influye en los comportamientos tipo ansiosos y depresivos en ratones adultos de dos cepas endogámicas, Cusco 2022.

1.4.2. Objetivos específicos

- Establecer el efecto del estrés crónico leve sobre los comportamientos tipo ansiosos en los ratones de la cepa C57BL/6NCrI según el sexo
- Establecer el efecto del estrés crónico leve sobre los comportamientos tipo ansiosos en los ratones de la cepa BALB/c según el sexo
- Establecer el efecto del estrés crónico leve sobre los comportamientos tipo depresivos en los ratones de la cepa C57BL/6NCrI según el sexo
- Establecer el efecto del estrés crónico leve sobre los comportamientos tipo depresivos en los ratones de la cepa BALB/c según el sexo
- Establecer el efecto del estrés crónico leve sobre los comportamientos tipo ansiosos en los ratones machos según la cepa
- Establecer el efecto del estrés crónico leve sobre los comportamientos tipo ansiosos en los ratones hembras según la cepa
- Establecer el efecto del estrés crónico leve sobre los comportamientos tipo depresivos en los ratones machos según la cepa



- Establecer el efecto del estrés crónico leve sobre los comportamientos tipo depresivos en los ratones hembras según la cepa

1.5. Delimitación del Estudio

1.5.1. Delimitación espacial

El estudio se realizó en las instalaciones del Laboratorio de Investigación en Neurociencias de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad Andina del Cusco, ubicada en la C.C. Qollana, en el distrito de San Jerónimo, provincia de Cusco, Perú.

1.5.2. Delimitación temporal

La presente investigación se realizó entre los meses de junio de 2021 a mayo del 2022.

1.6. Aspectos éticos

Toda manipulación y procedimientos experimentales involucrando animales fue realizada siguiendo las directrices internacionales para manejo de animales de experimentos y bajo la aprobación del Comité de Ética de la Universidad Andina del Cusco (Protocolo #2019-001-IACUC-1).



CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

2.1. Antecedentes del estudio

Las cepas de ratones BALB/c y C57BL/6 son las más usadas en los estudios de comportamiento en relación al estrés, miedo, funciones cognitivas y desarrollo modelos de exploración farmacológica de trastornos mentales y enfermedades neurodegenerativas. Ambas cepas de ratones han sido diseñadas en laboratorio y difieren, principalmente, en su genotipo para desarrollar respuestas inmunes innatas. Varios autores han demostrado que existen diferencias comportamentales entre estas dos cepas de ratones, siendo descritas la cepa BALB/c como más emocional y la cepa C57BL/6 como menos emocional. Conocer cómo ambas cepas difieren en sus respuestas comportamentales emocionales basales o bajo exposición a estresores ambientales es clave para predecir la contribución del factor genético en la susceptibilidad para desarrollar comportamientos tipo ansiosos o depresivos. A continuación, se detallan las diferencias comportamentales basales en sus respuestas comportamentales tipo ansiosas y depresivas de las cepas BALB/c y C57BL/6.

En el año (1982) Crawley & Davis, realizaron una investigación denominada “*Baseline Exploratory Activity Predicts Anxiolytic Responsiveness to Diazepam in Five Mouse Strains*”, en la que sometieron a ratones de las cepas BALB/cJ, CF-1, Swiss Webster/HSD, C57B1/6J, Swiss Webster/NIH, con el objetivo de cuantificar la respuesta a los benzodiazepinas, utilizando un modelo de exploración de la ansiedad en ratones, los autores evaluaron a las cepas con la prueba comportamental de campo abierto. En este estudio los autores encontraron que la cepa C57B1/6J muestra un comportamiento basal y un número de transiciones exploratorias superior a la cepa BALB/cJ, los BALB/cJ mostraron el



comportamiento exploratorio más bajo de la línea de base, acompañado de ninguna respuesta al diazepam. La metodología de este estudio es experimental. Si bien existen diferencias basales en las respuestas ansiosas y depresivas en estas dos cepas, también estas dos cepas se alteran de manera diferente, cuando son expuestos a estresores, a continuación, se detallan los trabajos que demuestran tales diferencias.

Lepicard y otros (2000). realizaron la investigación titulada “*Balance control and posture differences in the anxious BALB/cByJ mice compared to the non anxious C57BL/6J mice*”. El objetivo del estudio fue someter a ratones de las cepas BALB/cByJ y C57BL/6J a distintas pruebas comportamentales para evaluar las respuestas ansiosas de los animales, como son la prueba de la escalera, la prueba de luz/oscuridad y la prueba del laberinto elevado, y luego evaluaron cómo estas respuestas comportamentales varían luego de un tratamiento con un ansiolítico comercial como el diazepam, este estudio es tipo experimental. En la comparación del perfil de respuestas comportamentales entre cepas, en cada uno de estos test, los autores encontraron que los ratones de la cepa C57BL/6J presentaban una elevada actividad basal y de exploración en un nuevo entorno que los ratones de la cepa BALB/cByJ, lo que sugiere que los primeros tienen un bajo C57BL/6J nivel de ansiedad o son menos emocionales que los segundos. Por otro lado, los ratones BALB/cByJ mostraron una mayor frecuencia de comportamientos defensivos y de evaluación de riesgo, con una exploración limitada de un nuevo entorno junto con una baja actividad locomotora que los ratones de la cepa C57BL/6J. Cuando expuestos a un tratamiento con diazepam, si bien en ambas cepas observaron un efecto ansiolítico, una baja dosis de diazepam causó una mayor alteración tanto los comportamientos de exploración como en la actividad locomotora de los



ratones BALB/cByJ, sugiriendo que estos animales son más sensibles con diazepam que los ratones BALB/cByJ y que son más ansiosos.

En el año (2007) Depino & Gross, realizaron la investigación llamada “*Simultaneous assessment of autonomic function and anxiety-related behavior in BALB/c and C57BL/6 mice*”, encontraron que, al exponer a un campo abierto nuevo, los ratones BALB/c mostraron un mayor comportamiento relacionado con la ansiedad, una menor frecuencia cardíaca y una mayor variabilidad de la frecuencia cardíaca (VFC) en comparación con los ratones C57BL/6. Así mismo, El análisis conductual de los ratones BALB/c y C57BL/6 en las pruebas de campo abierto y pruebas de exploración libre confirmaron los informes anteriores de mayor evitación y menor locomoción de los animales BALB/c cuando se exponen a un entorno desconocido. Por otro lado, los autores también encontraron que las respuestas de la frecuencia cardíaca, la VFC y la temperatura corporal provocadas por la exposición al campo abierto y un entorno desconocido, fueron exageradas en los ratones BALB/c en comparación con los ratones C57BL/6. La conclusión de este estudio indica que incluso las condiciones experimentales en las que la manipulación no confunde las respuestas relacionadas con la ansiedad, los ratones BALB/c muestran una respuesta autonómica reducida a la novedad.

Por su parte Nunes y otros (2018), realizaron la investigación llamada “*Distinctive stress sensitivity and anxiety-like behavior in female mice: strain differences matter*”, el siguiente estudio tuvo como objetivo principal, investigar las diferencias de ansiedad de las hembras de dos cepas de ratones y también estudiar sus alteraciones conductuales y bioquímicas expuestas al estrés. La metodología de este estudio es experimental. Como resultado de la investigación obtuvieron que los ratones C57BL/6 hembra presentaban niveles más bajos de comportamiento ansioso, como muestran los resultados de Respuesta



de Sobresalto Acústico y Laberinto elevado en Cruz en comparación con los ratones hembra Swiss, las hembras Swiss parecen ser más resistentes al estrés que las hembras C57BL/6, así mismo los C57BL/6 mostraron un comportamiento anhedónico, caracterizado por una menor preferencia por una solución de sacarosa. (Nunes y otros, 2018)

Como se observa en estos estudios, estas dos cepas de ratones muestran respuestas comportamentales ansiosas y depresivas distintas, sean estas basales o expuestas a estresores. También en la literatura se han descrito características que son distintas dentro de cada cepa en función del sexo. A continuación, se detallan tales estudios mostrando diferencias entre machos y hembras dentro de cada cepa.

En el año (2006) Mineur y otros., realizaron una investigación Titulada “*Effects of unpredictable chronic mild stress on anxiety and depression-like behavior in mice*” con el objetivo de someter a ratones de las cepas C57BL/6J, BALB/cJy DBA/2J, exponiéndolas al modelo animal de estrés crónico leve impredecible, que simula la depresión. Esta investigación es de tipo experimental. Se evaluaron a las cepas con pruebas comportamentales como laberinto elevado en cruz, campo abierto, caja clara- oscura, suspensión de cola, nado forzado, reflejo de sobresalto y estado de pelaje. En la prueba de laberinto elevado en cruz, los autores encontraron que la cepa C57BL/6J machos y hembras, tuvieron mayor permanencia en los brazos abiertos a diferencia de la cepa BALB/cJ machos y hembras. En la prueba de nado forzado, los BALB/cJ machos y hembras tuvieron más tiempo de inmovilidad que la cepa C57BL/6J, en la prueba de suspensión de cola los machos de las cepas BALB/cJ tienen mayor tiempo de inmovilidad que las hembras de la misma cepa, en la prueba de campo abierto, las hembras mas no los machos de la cepa BALB/cJ, incrementan su actividad locomotora. Por otro los animales machos y hembras de la cepa



C57BL/6J su nivel de actividad locomotora no se altera al estresor, sin embargo las hembras incrementan su comportamiento de exploración en la periferia (en las paredes del laberinto), lo cual sugiere un incremento en los niveles de ansiedad inducidos por el estrés crónico leve impredecible, los autores también encontraron en la evaluación de estado de pelaje que en la cepa BALB/cJ, los machos muestran más deterioro del pelaje a comparación de las hembras, de igual manera en la cepa C57BL/6J los machos tienen un mayor porcentaje de deterioro de pelaje a comparación de las hembras de la misma cepa, siendo los machos más susceptibles al estrés crónico leve impredecible.

En el año (2011) An y otros., realizaron una investigación experimental titulada “*Strain and Sex Differences in Anxiety-Like and Social Behaviors in C57BL/6J and BALB/cJ Mice*”, el objetivo de este estudio fue someter a ratones de la cepa C57BL/6J y BALB/cJ, a una serie de pruebas comportamentales como, campo abierto, laberinto elevado en cruz, prueba de interacción social. La metodología de este estudio es experimental. Los autores encontraron como resultado, que en la prueba de campo abierto la cepa C57BL/6J, las hembras tuvieron un mayor número de transiciones a comparación de los machos, a diferencia de la cepa BALB/cJ, los machos y hembras tuvieron una actividad locomotora reducida, mostrando mayores niveles de ansiedad. Por otro lado, los autores refieren que, en la prueba de laberinto elevado en cruz, los machos de la cepa C57BL/6J pasaron más tiempo en los brazos abiertos, siendo más exploratorios a comparación de las hembras de la misma cepa, así mismo la cepa BALB/cJ, demostró un número reducido de transiciones y la exploración en los brazos abiertos fue mínima. En la prueba de interacción social, los machos de la cepa C57BL/6J mostraron un nivel mayor de exploración social y un bajo nivel en la



cepa BALB/cJ machos y hembras. Los resultados demuestran que la cepa BALB/cJ, presentan fenotipos ansiosos, siendo esta cepa menos exploratoria y sociable.

El objetivo de la presente propuesta fue estudiar cómo estas características comportamentales fenotípicas, se inducen bajo un tipo de estrés crónico, como es el protocolo de estrés crónico leve. Como mencionaremos más adelante, este protocolo intenta modelar, la depresión mayor en humanos. A continuación, se reportan los escasos estudios que han caracterizado el efecto de este protocolo, analizando, sea comparativamente o individualmente, en estas dos cepas.

En el año (2017) Karisetty y otros., realizaron un estudio experimental denominado “*Sex differences in the effect of chronic mild stress on mouse prefrontal cortical BDNF levels: A role of major ovarian hormones*”, con el objetivo de evaluar el efecto de las hormonas sexuales y ováricas sobre los fenotipos de depresión en ratones expuestos a un paradigma de Estrés Crónico Variable sometiendo a ratones de la cepa C57BL/6,.Se evaluó a la cepa C57BL/6 con las siguientes pruebas comportamentales, como, peso corporal, laberinto elevado en cruz, campo abierto, nado forzado, preferencia de sacarosa. En el peso corporal los machos y hembras pierden peso desde el día 4, seguidamente se observó un aumento de peso, pero no significativo. En la prueba de laberinto elevado en cruz, las hembras que pasaron por el estresor, fueron más activas y realizaron un mayor recorrido. En la prueba de campo abierto, tanto hembras como machos, mostraron una mayor actividad locomotora, pasando la mayor parte del tiempo explorando la periferia y la parte central. Así mismo lo autores encontraron que en la prueba de nado forzado, machos y hembras de la cepa C57BL/6 mostraron un mayor tiempo de inmovilidad y una menor latencia. En la prueba de preferencia de sacarosa, las hembras mostraron una reducción por la preferencia de



sacarosa, mostrando un comportamiento anhedónico. Los resultados referentes al comportamiento de la cepa C57BL/6 indican que las hembras de esta cepa se mostraron más activas a comparación de los machos dentro del mismo grupo expuesta al estresor.

En el año (2020) Tsuchimine y otros, realizaron la investigación titulada “*Comparison of physiological and behavioral responses to chronic restraint stress between C57BL/6J and BALB/c mice*” con el objetivo de exponer a ratones de las cepas C57BL/6J (B6) y BALB/c, a un modelo de estrés crónico por restricción, que se utiliza para simular un trastorno depresivo. Se evaluaron a las cepas con las pruebas comportamentales como Nado forzado, suspensión de cola, preferencia de sacarosa. Los animales expuestos al estrés crónico perdieron peso durante todo el periodo de exposición al protocolo, siendo que los ratones de la cepa BALB/c, mostraron una pérdida días antes, a diferencia de las cepas C57BL/6J (B6). Los autores también evaluaron el tamaño de las glándulas adrenales y la concentración de la hormona corticosterona en el pelo de los animales, al término del protocolo encontraron que el tamaño de las glándulas adrenales y la concentración de la corticosterona, se encontraban aumentadas en los animales expuestos a estrés crónico independientemente de la cepa, siendo que el incremento en la corticosterona de la cepa BALB/c, fue aproximadamente tres veces más que para la cepa C57BL/6J (B6). En el test de suspensión de cola y natación forzada, los autores no encontraron ningún efecto del estresor para ninguna de las cepas. En cuanto a la medida de anhedonia, realizada mediante el test de preferencia de sacarosa, ellos encontraron una interacción entre el estresor y la cepa, siendo que la cepa BALB/c mostró una reducción de preferencia de sacarosa, la cepa C57BL/6J (B6) no mostró ninguna variación. Estos resultados sugieren que los ratones de la



cepa BALB/c son más reactivos al estresor y más susceptible a desarrollar fenotipos depresivos.

Por su parte, (2020) Paľucha y otros, realizaron el estudio denominado “*The influence of the duration of chronic unpredictable mild stress on the behavioural responses of C57BL/6J mice*” con el objetivo de someter a las cepas C57BL/6J, al modelo animal estrés crónico leve impredecible induciendo comportamientos depresivos producidos por el estrés. Evaluaron a la cepa C57BL/6J con las siguientes pruebas comportamentales, suspensión de cola, nado forzado y splash test, peso corporal y nivel de corticosterona. En el test de suspensión de cola y natación forzada, los autores no encontraron ningún efecto significativo del estresor para esta cepa. En cuanto a la medida de Apatía, realizada a través de Splash test, encontraron efecto del estresor o la cepa, demostrando una disminución del acicalamiento en esta cepa de ratones, que es un comportamiento relacionado a la Apatía. Así mismo los autores evaluaron el peso corporal y encontraron que desde el día 28 hubo una reducción significativa de peso hasta el día de término del protocolo que fue el día 46, esta reducción de peso puede no estar correlacionada con los cambios de comportamiento. En la evaluación de los niveles de corticosterona, encontraron que los efectos se debilitaron o desaparecieron en el día 36. Estos resultados sugieren que la cepa C57BL/6J, a pesar de demostrar cambios a nivel fisiológico en el sistema de respuestas al estrés y cambios en la ganancia de peso, no desarrolla un fenotipo depresivo, lo que sugiere que la cepa C57BL/6J, no es susceptible al estrés crónico leve impredecible.



2.2. Bases teóricas

Depresión crónica inducida por estrés

Según Lang & Borgwardt (2013) la depresión mayor es un trastorno mental caracterizado por episodios frecuentes de tristeza profunda, pérdida de interés por actividades antes placenteras, sensación de culpa, los cuales va acompañado también de disminución en la concentración, alteraciones del sueño, pérdida o aumento del apetito. Estos eventos pueden tornarse recurrentes o crónicos al punto de alterar profundamente la habilidad de la persona para cuidar de sí mismo y dar cuenta de sus responsabilidades del día a día, Pérez y otros (2017) mencionan que incluso, en una forma más severa, las personas con depresión manifiestan ideaciones suicidas, intentos de autolesión o suicidio.

Una de las explicaciones que se da para la etiología de la depresión mayor es el modelo de diátesis- estrés. Este modelo propone que el estrés puede activar una vulnerabilidad y generar predisposición para desarrollar este trastorno (Colodro y otros, 2018). Este modelo sugiere que las personas que desarrollan depresión tienen una sensibilidad al entorno como resultante de la interacción genética y ambiente, y la depresión es explicada por el factor herencia en un 31 y 42% respecto a otros factores (Sullivan y otros, 2000). Se ha descrito, por ejemplo, que las personas que desarrollan depresión presentan un polimorfismo en el gen del transportador de serotonina.

Dentro de esta explicación de la depresión, las interacciones entre los factores genéticos y experiencias traumáticas tempranas, pueden persistir en la edad adulta debido a alteraciones en los sistemas mediadores de las respuestas de estrés, como serían los sistemas hipotálamo hipofisario adrenal y noradrenérgica. Estos sistemas hiperactivos explicarían una respuesta exagerada de las personas para diversos estresores y la cual puede desencadenar la



aparición de otros trastornos mentales (Trucco, 2002). Además, se cree que las personas con vulnerabilidad genética cuando expuestas ciertas situaciones adversas incontrolables, impredecibles, de intensidad grande y que amenace directamente la vida de la persona, pueden desencadenar trastornos del estado del ánimo como el de la depresión.

Síntomas clínicos

Según la American Psychiatric Association (2013) el trastorno depresivo se caracteriza por presentar cinco o más de los nueve síntomas siguientes, los cuales deben haber estado presentes durante el mismo periodo de tiempo de dos semanas: 1) Estado de ánimo deprimido, 2) pérdida del placer, 3) cambio de peso o apetito, 4) insomnio o hipersomnia, 5) retraso psicomotor o agitación, 6) pérdida de energía o fatiga, 7) invalidez o culpabilidad, 8) dificultad de concentración y 9) pensamientos de muerte, ideación o intento de suicidio. La aparición de estos síntomas puede causar angustia o deterioro significativo en la persona y estos no deben explicados por alguna condición médica previa, o trastorno de tipo psicótico, episodio maníaco o hipomaníaco.

Modelos teóricos de la depresión

En el campo de la psicología existen varias teorías que han explicado la depresión dentro de las que se encuentran la teoría conductual y la teoría cognitiva.

Teoría conductual de la depresión

La teoría conductual enfatiza la importancia del ambiente en la formación del comportamiento. Esta teoría explica que la depresión sería la resultante de la interacción de la persona con su ambiente a través de comportamientos que el individuo aprende mediante condicionamiento clásico, condicionamiento operante y aprendizaje social. Esta teoría



propone que la depresión sería aprendida mediante la asociación de ciertos estímulos negativos con estados emocionales negativos o que esta podría ser causada por una reducción o retirada de un refuerzo positivo. De la misma manera esta teoría conductual considera que la depresión es la consecuencia de una falta de eventos reforzantes, las habilidades personales para actuar en el entorno, el impacto de ciertos eventos o una combinación de estos. Esto quiere decir que, en circunstancias de mayores niveles de estrés causados por eventos inesperados, los individuos experimentan una baja respuesta para las conductas que mejoren su estado de ánimo, y una mayor respuesta de refuerzo positivo para las conductas depresivas (Davidson y otros, 2004).

Teoría cognitiva de la depresión

La teoría cognitiva propone que la depresión es el resultado de un sesgo negativo en el proceso de pensamiento del cual surgen sus síntomas emocionales, comportamentales y físicos. Los síntomas emocionales negativos que acompañan a la depresión, así como los psicósomáticos y fisiológicos tendrían su origen en los esquemas cognitivos desadaptados del propio individuo. Estos esquemas cognitivos rígidos sobre sí mismo, sobre su entorno y sobre el futuro interferirían con el procesamiento de la información positiva, produciendo pensamientos automáticos negativos y sesgados desencadenando en problemas emocionales. Así, esta teoría enfatiza en que el estado emocional de un individuo depende de las creencias que tiene sobre sus experiencias de vida (Clark & Beck, 2010) (Beck, 2008) y las distorsiones cognitivas junto a un estresor relevante aumentaría la probabilidad de aparición de un episodio depresivo (Davidson y otros, 2004).



Teoría Diátesis- Estrés

Una de las teorías psicológicas de la etiología de la depresión es el modelo diátesis-estrés, este modelo afirma que el estrés puede activar una diátesis o vulnerabilidad, predisponiendo al individuo a la psicopatología. Según esta teoría, la combinación de una diátesis con un estresor produciría un evento mayor al que cada uno por separado podría producir en la salud mental de individuo, aumentando el riesgo de desarrollar depresión (Colodro y otros, 2018).

Según Robins & Block (1989) este modelo, las actitudes disfuncionales y los estilos de atribución negativos o positivos a los eventos, aumentan la probabilidad de depresión solo en la medida en que se activan por acontecimientos vitales estresantes. Semejante a la teoría cognitiva, este modelo sugiere que los factores cognitivos negativos surgen durante las situaciones de estrés y esta reactividad cognitiva hace que los individuos sean susceptibles a la depresión y genera la aparición, recaída y recurrencia de este trastorno.

Hipótesis monoaminérgica de la depresión

En el campo de la neurobiología existe la hipótesis monoaminérgica de la depresión. Esta hipótesis está basada en el uso de drogas que atenúan ciertos síntomas clínicos de la depresión. Específicamente, postula que la depresión es causada por una alteración en los niveles de una o más monoaminas, incluyendo la serotonina (5-HT), la norepinefrina (NE) y la dopamina (DA) (revisado en (Dean & Keshavanb, 2017). Las personas con depresión tendrían un desequilibrio en la neurotransmisión serotoninérgica y noradrenérgica, principalmente en la sensibilidad de los receptores y autorreceptores serotoninérgicos (5-HT_{1A}, 5-HT_{1A}, 5-HT₂) y receptores noradrenérgicos (heterorreceptores b-adrenérgicos y a₂-adrenérgicos) (Massart & Mongeau, 2012).



Dentro de esta hipótesis, la explicación de por qué las personas que desarrollan depresión presentan alteraciones en los sistemas de neurotransmisión de las monoaminas ha sido atribuida a los polimorfismos genéticos en el transportador de 5-HT, principalmente en la amígdala. Así, el funcionamiento de este núcleo cerebral en personas con depresión estaría más reactiva en respuesta a los acontecimientos negativos, mediando así un sesgo atencional negativo. Este sesgo atencional hacía los acontecimientos negativos conduciría a distorsiones cognitivas como la personalización, la sobre generalización y la exageración, que a su vez conduciría a actitudes disfuncionales respecto a la valía personal y la aceptabilidad. A su vez, la activación repetida de estas actitudes acabaría creando esquemas cognitivos negativos, los que a su vez activaría el eje HPA en respuesta a la mala interpretación de los acontecimientos externos (Beck, 2008)

Ansiedad

Según Sierra y otros (2003) la ansiedad sería la manifestación de preocupación y miedos excesivos y continuos ante situaciones cotidianas que no representan peligros reales para la persona. Esta manifestación sería acompañando de sensaciones de aprensión, reacciones fisiológicas y respuestas motoras alteradas frecuentes que interfieren con la vida cotidiana de la persona.

Modelos Teóricos de la Ansiedad

Las teorías de la ansiedad se caracterizan principalmente por ser basados en estudios con animales, principalmente derivadas de la tradición etológica. Semejante a las teorías de la depresión, también existe una teoría conductual, una teoría fisiológica y cognitiva, por mencionar algunas. Brevemente mencionaremos estas, haciendo énfasis en que la teoría que contempla la interacción gen-ambiente es la que guía el marco de este trabajo.



Teoría conductual de la ansiedad

Una de las teorías de ansiedad proviene de Pavlov y Watson. Según esta teoría, el organismo aprende a evitar estímulos nocivos a través de algunos mecanismos mediadores. Estos mecanismos mediadores serían el miedo o la ansiedad. Una respuesta condicionada de miedo o ansiedad sería la resultante de repetidos emparejamientos de un estímulo neutro con un estímulo incondicionado (que resulta ser nocivo y causar dolor). Este miedo sería aprendido porque puede apegarse a estímulos previamente neutros, y puede motivar y reforzar. Basado en el miedo o ansiedad adquiridos de esta teoría, se han construido otras como la psicoanalítica, en la que el miedo o ansiedad adquiridos pueden funcionar como impulsos secundarios y establecer nuevos comportamientos mediante la reducción del impulso. Un desarrollo de esta teoría fue realizado por Dollard y Miller en los años 1950, quienes propusieron una teoría comportamental multinivel de la ansiedad, donde la ansiedad tendría una respuesta emocional central es la base de la ansiedad y que esta puede ser adquirida a través de condicionamiento aversivo o a través del lenguaje. Uno de los proponentes de esta teoría es Hans Eysenck, quien a finales de 1950 propuso que la ansiedad depende de dos grandes dimensiones de su teoría de la personalidad como es la extroversión – introversión y el neuroticismo. Un individuo neurótico sería sensible a los estímulos que provocan la ansiedad y esta sensibilidad estaría basada en su sistema nervioso autónomo, de modo que la ansiedad sería heredada. Aunque también, considera que la ansiedad también puede aprenderse mediante los sucesos traumáticos que provocan un miedo incondicionado y se condicionan con nuevos estímulos produciendo respuestas de ansiedad desadaptadas, como la ansiedad como un miedo condicionado. Así, la ansiedad para Eysenck sería tanto innata como aprendida (Strongman, 1995).



Teoría cognitiva de la ansiedad

La teoría cognitiva de la ansiedad se centra en la propuesta por Eysenck, quién considera que el que el sistema cognitivo actúa como una puerta de entrada al sistema fisiológico, de modo que para considerar la ansiedad se debe considerar los dos sistemas. Esta propuesta considera que la forma como almacenan información a largo plazo es diferente entre las personas con un rasgo de ansiedad alto y bajo. Este abordaje de la ansiedad basada en la memoria permitiría entender los cambios en los rasgos de ansiedad que ocurren con el tiempo y también a explicar el hecho de que algunas personas pueden ser más susceptibles a la ansiedad en situaciones estresantes, pero no en otras. Dentro de la teoría cognitiva también hubo una propuesta del modelo de procesamiento de información de la ansiedad desarrollado por Ohman, a inicio de los años 1990. De acuerdo a esta teoría, las personas con alta o baja ansiedad también difieren en su valoración cognitiva de ambigüedad, lo cual a su vez puede determinar una percepción consciente de la amenaza (Strongman, 1995).

Diferencias de género en los trastornos de depresión y ansiedad

Estudios epidemiológicos han establecido relación entre la susceptibilidad de desarrollar depresión con factores biológicos de los individuos, en que las mujeres están más predispuestas a desarrollar trastornos depresivos. Es más, la comorbilidad de los trastornos de ansiedad es igual de mayor en las mujeres que en los hombres y tener un historial de haber sufrido ansiedad previa aumenta el riesgo de depresión de forma equivalente en hombres y mujeres. Sin embargo, si la ansiedad está presente a lo largo de la vida en las mujeres a diferencia de los hombres, puede contribuir a incrementar el riesgo de desarrollar depresión (Kuehner, 2003); (Zahn y otros, 2008). Estas diferencias entre mujeres y hombres para el riesgo de desarrollar trastorno depresivo mayor, sería debido a una contribución de la



heredabilidad, el cual se estima que en el caso de las mujeres contribuye con un riesgo de 30-40% mayor que para los hombres (Flint & Kendler, 2014), (Sullivan y otros, 2000). A estas diferencias genéticas se suman otras como las hormonales, de temperamento y sociales, que contribuyen a que las mujeres sean más susceptibles a desarrollar trastornos de depresión en relación a los hombres. En la tabla 1 se presenta un resumen de estas diferencias individuales en el género basados en el artículo de Albert (2015), Kuehner (2017).

Tabla 1

Susceptibilidad a las diferencias individuales en el género

Susceptibilidad a las diferencias individuales en el género	
Genéticas	Predominancia de alelo corto, que reduce la eficacia transcripcional del promotor del gen 5-HTT, en mujeres y no en hombres.
Hormonales	Activación de las hormonas sexuales, tanto el avance de la etapa puberal, tras la transición a pubertad, como el inicio de la pubertad precoz, y a su vez la menopausia, se relaciona con el aumento del riesgo de depresión en las mujeres
Temperamento	La afectividad negativa, relacionada con el neuroticismo, afecta más a mujeres en relación a los varones, durante la adolescencia y se mantiene a lo largo de la vida.
Social	La adversidad temprana, como el abuso físico, emocional y sexual en la infancia, aumenta los riesgos durante la transición puberal, especialmente en las niñas. Las mujeres corren mayor riesgo de ser víctimas de violencia coercitiva múltiple, sexual y de violencia física grave por parte de la pareja a diferencia de los hombres. Las mujeres víctimas de violencia tienen el doble de probabilidades de desarrollar depresión y otros trastornos relacionados.

Fuente: Tabla basada en el artículo de Albert (2015), Kuehner (2017).



Interacción genética-ambiente y trastornos de depresión y ansiedad

Los estudios genético-ambientales investigan si la susceptibilidad psicológica individual a los acontecimientos de vida estresante está moderada por factores genéticos; a su vez también examinan el posible efecto moderador del género. Es decir, si la interacción gen- ambiente es más fuerte en los hombres o en las mujeres. Investigaciones que se realizaron en la región polimórfica ligada al transportador de serotonina (5-HTTLPR), identificaron un polimorfismo con una variante alélica larga y otra corta. La variante del alelo corto reduce la eficacia transcripcional del promotor del gen 5-HTT, reduciendo así la función del 5-HTT. Los resultados del estudio mostraron que los portadores del alelo corto, suelen desarrollar depresión en respuesta a acontecimientos vitales estresantes y estrés ambiental (Avshalom y otros, 2003) (Sharpley y otros, 2014). Sin embargo, estos eventos estresantes o adversos que se vivencian, pueden dar lugar a que se procese de manera eficaz los acontecimientos traumáticos vividos. Asimismo, se involucra la interacción genética-ambiente y factores psicosociales, para el desarrollo de la resiliencia.

Resiliencia sería la capacidad de una persona para adaptarse con éxito al estrés agudo, al trauma o a formas más crónicas de adversidad (Rutter, 2007). Por tanto, un individuo resiliente sigue demostrando respuestas adaptativas, respuestas psicológicas y fisiológicas al estrés, o alostasis psicobiológica que quiere decir que muestra un cambio para enfrentar un desafío a causa de situaciones de exigencia o estrés para recuperar su estabilidad a nivel psicológico y biológico (Charney, 2004), (McEwen, 2003)

Los cambios estocásticos y epigenéticos que se producen durante el desarrollo del cerebro serían un medio adicional de generar variabilidad en el comportamiento de los individuos, preparándolos mejor para una serie de posibles desafíos ambientales. Según lo



mencionado, los cambios epigenéticos aleatorios que impulsan la resiliencia promoverían la supervivencia durante periodos de extrema dureza. Por otro lado, los genes del individuo y su interacción con los factores ambientales darían forma a los circuitos neuronales los cuales se reflejarían en las fortalezas psicológicas y comportamientos característicos de los individuos resilientes. De igual manera, la existencia de polimorfismos genéticos que afectan a la reactividad límbica y la conectividad prefrontal-límbica de una persona pueden influir en sus respuestas iniciales a eventos negativos o traumáticos, así como en su capacidad de revalorización cognitiva de esos acontecimientos. A su vez los circuitos integrados que median en el estado de ánimo y las emociones determinarían su capacidad de resiliencia al estrés y, este se reflejaría finalmente en la estructura psicológica del individuo (Feder y otros, 2009).

Estrés crónico y Trastornos de depresión y ansiedad

El estrés crónico es un importante problema de salud mundial y se ha asociado a muchas enfermedades graves, como la depresión, las enfermedades cardíacas, la diabetes, la hipertensión, y hasta el cáncer (Chandrasekhar y otros, 2012)

Por su parte el RDoC, iniciativa que busca explicar trastornos mentales, aplicando la investigación clínica, básica y epidemiológica, se centra en el estudio de la psicopatología, como correlato de alteraciones funcionales detectables, biológicas y comportamentales (Woody & Gibb, 2015). Así mismo el RDoC define el estrés crónico como un estado emocional aversivo causado por una exposición prolongada a condiciones, estados o estímulos internos y/o externos, que son adaptativos para escapar o evitar. La exposición puede ser real o anticipada; causando cambios en el afecto, la cognición, la fisiología y el comportamiento provocados por la amenaza sostenida, y a su vez persisten en el tiempo a



pesar que ya no exista amenaza alguna (Vilar y otros, 2019). En tal sentido, la respuesta humana al estrés, da como resultado la depresión, ansiedad y depresión ansiosa (Ross y otros, 2017)

Modelos animales de depresión crónica

La depresión mayor es uno de los principales trastornos mentales que tiene mayor morbilidad a nivel mundial, este trastorno tiene mucha recurrencia y cronicidad y tiene poca respuesta a tratamientos antidepresivos, es por ello que se requieren modelos de animales válidos, estos modelos actuales se basan en la manipulación del entorno al que están expuestos los roedores, durante diversas etapas de su desarrollo. Estas manipulaciones pueden generar alteraciones conductuales o biológicas que se pueden relacionar con la sintomatología y fisiopatologías de la depresión mayor.

Estos modelos consisten en aplicar factores de estrés durante el periodo de desarrollo o en la edad adulta de los roedores, imitando eventos vitales adversos. A continuación, se detallan los modelos de roedores más usados para inducir inducen depresión crónica:

- Adversidad en la vida temprana:

Los roedores, como las ratas o los ratones, nacen inmaduros y dependen exclusivamente para sobrevivir del cuidado materno durante las dos primeras semanas de vida postnatal. La separación materna durante este período temprano es considerada un evento estresor importante capaz de afectar el comportamiento y el fenotipo biológico de las crías en la adultez. Estos efectos incluyen retraso en las habilidades de aprendizaje y la memoria (en cepas de ratones BALB/c), desarrollo de comportamientos de tipo depresivo (en ratones BALB/c y en ratones C57BL/6) y comportamientos tipo ansiosos (en ambas



cepas). A nivel biológico estas manipulaciones inducen cambios en los factores de crecimiento neuronales, el desarrollo del sistema de respuesta al estrés y alteraciones estructurales y funcionales en áreas cerebrales involucradas en el procesamiento del estrés (Planchez y otros, 2019)

Los siguientes modelos consisten en aplicar cierto tipo de estresores impredecibles y/o incontrolables en la vida adulta de los roedores y que resultan en alteraciones dramáticas del comportamiento emocional. Estos modelos incluyen la indefensión aprendida, derrota social, inestabilidad social crónica, estrés por depredadores y estrés crónico leve imprevisible. A continuación se describen brevemente cada uno de ellos.

- Indefensión aprendida:

Propuesto Martin Seligman a finales de los años 1960, este modelo propone que la exposición de un animal a un estresor inescapable como un shock eléctrico fuerte, induce una falla en el aprendizaje de evitar o escapar del estímulo, lo que resulta con el tiempo en un aprendizaje de indefensión. La explicación a nivel neurobiológico de este resultado comportamental sería que, la exposición a shock eléctrico induciría una fuerte activación de las neuronas en el núcleo rafe dorsal, llevando a una liberación aguda de 5-HT lo que provoca una desensibilización duradera de los auto receptores de 5-HT_{1A} en ese núcleo. Asimismo, la exposición al estresor incrementaría los niveles de neurotrofinas y la hormona del estrés, alterando de manera prolongada estos sistemas. La validez predictiva de este modelo se basa en que las personas con depresión clínica también presentan alteraciones neurobiológicas semejantes a los descritos para los roedores (Planchez y otros, 2019)



- Derrota social:

En este modelo, un roedor macho que es expuesto por varios días consecutivos a una jaula con un residente agresivo nuevo cada vez (generalmente un animal de la misma especie de tamaño mayor), desarrolla comportamientos de retraimiento social y anhedonia, llamado de derrota social. Este modelo induce cambios neurobiológicos relevantes para la depresión clínica como la alteración de la corteza prefrontal desencadenando un incremento de la actividad de la amígdala, alteración de los sistemas de respuesta al estrés, el sistema inmunológico, entre otros eventos fisiológicos alterados. Este modelo es sensible al tratamiento crónico usando drogas inhibitoras de la recaptación de serotonina y de ketamina (Planchez y otros, 2019).

- Inestabilidad social crónica:

Este modelo es generalmente usado en roedores hembras, debido a que las hembras son más vulnerables a estrés psicosociales y son más propensas a desarrollar síntomas depresivos. Este paradigma consiste en exponer durante varias semanas a un ambiente de inestabilidad social como alternar fases de aislamiento o de hacinamiento de animales en una caja durante 1-48 h. Este procedimiento es capaz de provocar una disminución del apetito, cambios en el ciclo circadiano, elevación de los niveles de adrenalina y corticosterona y disminución de preferencia por la sacarosa, que refleja la anhedonia (Planchez y otros, 2019)

- Estrés por depredador:

Este modelo es parecido al de derrota social, donde el roedor es confrontado ante un depredador físico o el olor de este. Esta exposición puede inducir un fenotipo tipo



depresivo, que se refleja en la disminución de preferencia de sacarosa, comportamientos de ansiedad en el test de campo abierto y de interacción social. Estos efectos pueden ser atenuados mediante tratamiento crónico de fluoxetina, indicando la validez predictiva del modelo. Sin embargo, este modelo imitaría un evento traumático, como el trastorno de estrés postraumático, por lo que su respuesta a un antidepresivo no sería suficiente para ser considerado como modelo de depresión, pues no sería específico (Planchez y otros, 2019)

- Estrés crónico leve imprevisible:

Este modelo consiste en someter a los roedores a una amplia variedad de micro estresores, con características de ser leves en cuanto a su intensidad, es decir no inducen dolor físico; crónicos, ya que se repiten durante semanas, se producen de manera imprevisible, se exponen a diversos estímulos diferentes a lo largo de días/ semanas, la duración varía en cada estresor. Este modelo induce efectos neurobiológicos que se observan en el trastorno depresivo (Planchez y otros, 2019). Este es el modelo que se usó para el estudio, el cual se detalla a continuación.

Modelo de Estrés crónico leve

El modelo de estrés crónico leve (Chronic Mild Stress) se desarrolló a finales de la década de 1980 como un modelo animal de depresión que se diferenciaba en tres aspectos importantes de otros modelos disponibles en ese momento: las condiciones de inducción eran relativamente realistas, el modelo se centraba en un síntoma central de la depresión, la anhedonia y la prolongada duración del modelo era adecuado para investigar los efectos de los tratamientos farmacológicos crónicos (Willner P. , 2017a). De modo que, el procedimiento de Estrés crónico leve fue diseñado involucrando la exposición del animal a



una serie de factores estresores continuos e imprevisibles, como períodos de privación de agua y comida, pequeñas disminuciones de temperatura y otro tipo de manipulaciones leves análogas. Los animales sometidos a estos "micro estresores" por este periodo de tiempo, desarrollan un extenso espectro de alteraciones conductuales, neurobiológicas y fisiológicas que podrán revertirse eficazmente con un tratamiento antidepresivo crónico (Willner, 2017b).

El modelo genéricamente se denomina Estrés crónico leve, pero diversos investigadores describieron su procedimiento como Estrés crónico leve de diversas maneras, esto plantea que las distintas denominaciones denotan procedimientos diferentes, si el término "imprevisible" refiere que el procedimiento es más aleatorio, y si el término es "leve" refiere que el procedimiento es menos severo. (Willner, 2017b)

El procedimiento fue diseñado originalmente para ser una versión más suave de un protocolo de estrés crónico variado descrito por Katz y otros (Willner, 2017b) que incluye una serie de elementos severamente estresantes. Por lo tanto, el Estrés crónico leve imita los cambios conductuales inducidos por el estrés que se asemejan a ciertas características del Trastorno depresivo mayor (Strekalova y otros, 2022).

Tabla 2

Síntomas de la depresión mayor en el aspecto traslacional

Síntomas humanos	Síntomas ratones/ ratas
● Inhibición psicomotora	
● Anhedonia	● Anhedonia
● Desesperanza	● Desesperanza
● Déficit de afrontamiento	● Déficit de afrontamiento
● Deterioro cognitivo	● Deterioro cognitivo
● Trastornos del sueño	● Trastornos del sueño
● Síntomas vegetativos	● Síntomas vegetativos
● Cambios de peso	● Cambios de peso

Fuente: Strekalova y otros (2022)



La depresión mayor se caracteriza por la aparición de al menos un síntoma principal que es la Anhedonia, que suele ir acompañado de una serie de síntomas secundarios. Alguno de estos síntomas es exclusivamente humano, sin embargo, pueden replicarse en roedores. Tabla basada en el artículo de (Strekalova y otros, 2022).

Por otro lado, con respecto a este modelo se exponen crónicamente a las ratas o ratones a un bombardeo constante de micro estresores imprevisibles, lo que provoca alteraciones en el comportamiento del animal, como una disminución en su respuesta a las recompensas, llamado también anhedonia, un síntoma central de la depresión en humanos. En el modelo, la respuesta comportamental a la recompensa se evalúa mediante pruebas periódicas en las que el animal tiene acceso a una solución dulce muy preferida, o a una elección entre una solución dulce y agua. El consumo o la preferencia por la recompensa dulce disminuye a lo largo de las semanas de exposición a los estresores, pero puede restablecerse a los niveles normales mediante un tratamiento crónico con fármacos antidepresivos (Willner, 2017b)

Validez del Modelo de Estrés crónico leve

En relación con la validez de los modelos de animales de depresión, la validez predictiva se refiere a la capacidad de respuesta específica y selectiva a los antidepresivos. Es decir, si un fármaco es eficaz en pacientes con depresión clínica, éste debería actuar de la misma forma en un modelo animal de depresión crónica. Por otro lado, la validez facial se refiere a las similitudes fenomenológicas que comparten el modelo animal y la sintomatología descrito en humanos. Es decir, la evaluación es realizada basado en los síntomas descritos en el DSM-V, especialmente con los síntomas centrales de la depresión. La validez de constructo del modelo se fundamenta en la similitud de constructos desde una



perspectiva psicológica. Uno de estos constructos se centra en la anhedonia y también en los correlatos neurobiológicos subyacentes a la depresión clínica, especialmente basados en los efectos neurobiológicos al estrés crónico leve y las alteraciones coincidentes en poblaciones clínicamente diagnosticadas con depresión clínica (Planchez y otros, 2019).

El modelo de Estrés crónico leve fue el primero que se investigó sistemáticamente utilizando estos criterios. En cuanto a su validez predictiva, este modelo demostró respuesta a la administración crónica, pero no a la aguda, de una amplia gama de antidepresivos establecidos. Los diversos estudios que utilizan este modelo de Estrés crónico leve, contribuyen a la construcción de relatos teóricos de los procesos psicobiológicos inmersos en la depresión y la acción antidepresiva, reforzando aún más la validez de constructo de este modelo (Willner, 2017b)

Dimensiones del Estrés crónico leve

De acuerdo a lo manifestado por Willner (2017b) las dimensiones del Estrés crónico leve son:

A. Variedad de estímulos

Refiere a la presentación de estresores aleatorios frente a los fijos, y a su vez comprenden diferentes indicadores: Número de micro estímulos usados durante las semanas del modelo, Frecuencia de aplicación de micro estímulos por día, Alternancia de aplicación de micro estímulos por día, Frecuencia de aplicación de micro estímulos por semana.

De acuerdo al experimento y para evaluar el efecto de la variedad de estímulos se ha considerado los siguientes ítems:

- a. Número de micro estímulos usados durante 5 semanas



- b. Frecuencia de aplicación de micro estímulos por día.
- c. Alternancia de aplicación de micro estímulos por día.
- d. Frecuencia de aplicación de micro estímulos por semana

B. Severidad de Estímulos

Referente a la gravedad es más recóndita, debido a que la severidad de los estímulos depende de los diferentes procedimientos de estrés. los diferentes micro estresores que se aplican en el Estrés crónico leve se clasificaron en cuanto a su gravedad, en una escala de 5 puntos (Willner, 2017b)

De acuerdo al experimento y para evaluar el efecto de la severidad de estímulos se ha considerado los siguientes ítems:

- a. Proporción de micro estímulos aplicados por día.
- b. Duración de micro estímulos aplicados por día.
- c. Duración de micro estímulos por semana

Dimensiones de la depresión en modelos animales

Dentro de las dimensiones sobre los comportamientos depresivos se consideran síntomas como la impotencia y la inhibición psicomotora en los humanos, en los ratones estos síntomas se evalúan a través del test de natación forzada de Porsolt y se manifiestan con una prolongación de la conducta de flotación pasiva (inmovilidad) y una latencia reducida para dejar de nadar y empezar a flotar (Strekalova y otros, 2022)



A. Escape/desesperación: Conductas dirigidas a la huida, desarrollan una postura inmóvil cuando se les coloca en una situación estresante ineludible (Cryan y otros, 2005)

De acuerdo al experimento y para evaluar Escape/desesperación, se ha considerado los siguientes ítems:

- a. Latencia para entrar en inmovilidad
- b. Duración de la inmovilidad

B. Signos fisiológicos/ inmovilidad flotación: Son conductas provocadas previamente a un factor de estrés que se cree que induce un estado de desesperación conductual ya que los animales se vuelven más inmóviles a medida que avanza la prueba (Bogdanova y otros, 2013). De acuerdo al experimento y para evaluar Signos fisiológicos/ inmovilidad flotación, se ha considerado los siguientes ítems:

- a. Número de bolos fecales al final de cada evaluación
- b. Latencia para entrar en inmovilidad o flotación
- c. Duración de la inmovilidad/flotación

C. Anhedonia: Son conductas de auto acicalamiento o auto asistencia en los roedores y estos comportamientos se ven alterados si se presenta síntomas depresivos y anhedonia que producen una reducción del acicalamiento en ellos (Yalcin y otros, 2008), (Butelman y otros, 2019)

De acuerdo al experimento y para evaluar la Anhedonia, se ha considerado los siguientes ítems:



- a. Latencia para iniciar comportamiento de acicalamiento
- b. Duración total de los eventos de acicalamiento

Dimensiones de Ansiedad de modelo animal

De acuerdo a Bourin & Hascoët (2003) menciona que los ratones tienen una aversión innata a las zonas iluminadas y su comportamiento exploratorio espontáneo se ve afectado en respuesta a factores de estrés leves, asimismo, Montgomery (1955) manifiesta que los roedores demuestran miedo a la novedad ambiental lo cual evoca en ellos el miedo a la exploración, a continuación, se menciona las dimensiones de los comportamientos tipo ansiosos.

A. Exploración: Una situación de conflicto natural se produce cuando un animal se expone a un entorno desconocido o a objetos nuevos, el conflicto se produce entre la tendencia a explorar y la tendencia inicial a evitar lo desconocido (neofobia). La actividad exploratoria refleja el resultado combinado de estas tendencias en situaciones nuevas (Bourin & Hascoët, 2003).

De acuerdo al experimento y para evaluar la exploración, se ha considerado los siguientes ítems:

- a. Latencia en Caja Oscura
- b. Latencia en Caja Clara

B. Aproximación-evitación de lugares abiertos, elevados e iluminados: Cuya premisa es que la novedad ambiental evoca simultáneamente el miedo y la curiosidad, creando así un conflicto de aproximación y evitación (Rodgers & Dalvi, 1997).



De acuerdo al experimento y para evaluar la aproximación – evitación de lugares abiertos, elevados e iluminados, se ha considerado los siguientes ítems:

- a. Número de entradas a brazos abiertos
- b. Tiempo en brazos abiertos.

Método para evaluar comportamientos de ansiedad en roedores

Se han diseñado diferentes pruebas para evaluar comportamientos tipo ansiosos en los roedores, sin embargo, para evaluar sintomatología del Trastorno depresivo mayor se utilizan la exposición forzada de un roedor con un entorno nuevo, por ejemplo, un laberinto abierto o elevado, una caja de luz/oscuridad o evitar espacios abiertos. Seguidamente se detalla las pruebas comportamentales que se utilizan para evaluar comportamientos tipo ansiosos en roedores.

- Test Laberinto elevado en cruz: Es una de las pruebas comportamentales para medir conductas tipo ansiosas en roedores. La prueba se basa en la tendencia natural de los roedores a evitar los lugares abiertos o elevados, que se contrapone a su curiosidad innata por explorar zonas que son nuevas para ellos. Por ende, un ratón menos ansioso visitará los brazos abiertos y más expuestos del laberinto con más frecuencia, mientras que un ratón con ansiedad elevada tenderá a pasar más tiempo en los brazos cerrados (Kraeuter y otros, 2019). El instrumento consiste brazos abiertos (sin muros) y brazos cerrados (con muros) los cuales se cruzan transversalmente en el centro de cada uno de los brazos.
- Test de la Caja clara – oscura: Esta prueba se basa en la aversión innata de los roedores a las zonas iluminadas y en el comportamiento exploratorio de los roedores. Se da una situación de conflicto natural cuando se expone al animal a un entorno desconocido o a



objetos nuevos, si el animal muestra un tiempo de permanencia menor en la caja clara respecto a la caja oscura y un número menor de transiciones entre cada caja, sugiere niveles elevados de ansiedad (Bourin & Hascoët, 2003).

- **Test de Campo abierto:** La prueba de campo abierto se utiliza en los estudios de las bases neurobiológicas de la ansiedad y para probar nuevas dianas farmacológicas y compuestos ansiolíticos, este procedimiento utiliza una cámara para medir el movimiento del animal en zonas periféricas y central de una caja y evalúa locomoción, la ansiedad y conductas estereotipadas como el acicalamiento (Kraeuter y otros, 2019).

Método para evaluar comportamientos de depresión en roedores

A continuación, se detallan que métodos se usa para evaluar comportamientos de depresión en roedores:

- **Pruebas de desesperación:** Las pruebas habituales que se usan son el test de nado forzado y de suspensión de cola, estas pruebas consisten en colocar al roedor en una situación incómoda, en este caso un tanque de agua o que el animal este en una posición donde está suspendido por la cola, de la cual es imposible escapar, los animales muestran episodios de inmovilidad, que aumentan progresivamente, por ello, la inmovilidad se califica como “desesperación” y se considera que refleja estados similares a la depresión (Planchez y otros, 2019).
- **Anhedonia:** Son conductas de auto acicalamiento o auto asistencia en los roedores y estos comportamientos se ven alterados si se presenta síntomas depresivos y anhedonia que producen una reducción del acicalamiento en ellos (Yalcin y otros, 2008), (Butelman y otros, 2019).



- *Apatía*: Levy y Dubois (2006) mencionan que la apatía es como un déficit en el comportamiento dirigido a objetivos, En los roedores, se han propuesto cinco medidas diferentes para evaluarla, entre ellas construcción de nidos, la alteración del aseo personal, reducción del cuidado maternal, menor interés social y reducción del interés por los objetos nuevos (Planchez y otros, 2019).

Diferencias comportamentales de ratones C57BL/6NCrl y BALB/c.

Los ratones de las cepas C57BL/6Ncr1 y BALB/c, son las más usados en estudios de modelos biomédicos y varían en cuanto a la sensibilidad que tienen estas cepas expuestas a diferentes estresores, siendo que los ratones de la cepa BALB/c son descritos, como animales más ansiosos (An y otros, 2011), y más susceptibles a estresores ambientales (Razzoli y otros, 2011). Sin embargo, algunos estudios indican que los ratones BALB/c mostraron mayores niveles de interacción social que los ratones C57BL/6, así mismo (An y otros, 2011) mencionan que los ratones C57BL/6 en comparación con los BALB/c son más ansiosos.

2.3. Marco conceptual

- **Estrés Crónico Leve:** El modelo Estrés crónico leve consiste en la aplicación secuencial y crónica, en ratones o ratas, a una serie de micro estresores diarios de intensidad leve e impredecible (Willner, 2017b)
- **Comportamientos tipo depresivos:** Los comportamientos tipo depresivos en las ratas o ratones se manifiesta con cambios en comportamiento, disminución de la respuesta a las recompensas y a su vez demuestran conductas del síntoma principal de la depresión que es la anhedonia. Este síntoma se evalúa periódicamente mediante el Test de sacarosa en la que se le da al animal acceso a una solución dulce muy preferida, el consumo o la



preferencia por la recompensa dulce disminuye con las semanas de exposición al protocolo (Willner, 2017a)

- **Comportamientos tipo ansiosos:** En los roedores los comportamientos tipo ansiosos se presenta en situaciones de conflicto que pueden ser generadas por estados motivacionales opuestos inducidos por situaciones de aproximación- evitación. Las conductas de aproximación se dan en entornos nuevos, reflejando un impulso exploratorio, por otro lado, los impulsos de evitación también pueden ser no aprendidos, como la aversión a lugares nuevos, iluminados, abiertos y elevados (Campos y otros, 2013). Por consiguiente, los ratones con ansiedad son menos exploratorios y evitativos en entornos nuevos, abiertos, iluminados y elevados.
- **Cepa:** el termino cepa refiere a la variante genética de ratones, se caracterizan por ser uniformes fenotípicamente y ser sensibles a cambios del ambiente.

2.4. Hipótesis de investigación

Si se somete a dos cepas de ratones C57BL/6NCrI y BALB/c de ambos sexos, durante 6 semanas a un protocolo de estrés crónico leve, se plantean las siguientes hipótesis:

2.4.1. Hipótesis General

HG-1: Los comportamientos tipo ansiosos y depresivos serán significativamente afectados en ambas cepas, siendo mayor el efecto en ratones de la cepa BALB/c, considerados más ansiosos y reactivos a estresores, que de los de la cepa C57BL/6NCrI.

HG-2: Los comportamientos tipo ansiosos y depresivos serán significativamente afectados en las cepas C57BL/6NCrI y BALB/c, siendo mayor el efecto en ratones hembras que en machos.



2.5. Variables

2.5.1. Identificación de variables

A. Variable Independiente:

VI1- Estrés Crónico Leve

VI2: Cepa

VI3: Sexo

B. Variable Dependiente:

VD1- Comportamientos tipo ansiosos

VD2- Comportamientos tipo depresivos

C. Variables Controladas

VC1- Condiciones ambientales (temperatura, ciclo de luz y humedad)

VC2- Estabulación (N° de animales por jaula, material de nido, alimentación, agua y control de CO₂ y O₂).



2.5.2. Operacionalización de variables

Tabla 3

Operacionalización de variables

Variables	Definición conceptual	Definición operacional	Dimensiones	Indicadores
Estrés crónico leve	De acuerdo a Willner (2016) el estrés crónico leve puede inducir este efecto, de acuerdo a la variedad de estímulos y severidad de estímulos e intensidad	El modelo Estrés crónico leve consiste en la aplicación secuencial y crónica, en ratones o ratas, a una serie de micro estresores diarios de intensidad leve e impredecible.	<ul style="list-style-type: none"> - Variedad de estímulos - Severidad de estímulos 	<ul style="list-style-type: none"> - Número de micro estímulos usados durante 5 semanas. - Frecuencia de aplicación de micro estímulos por día. - Alternancia de aplicación de micro estímulos por día. - Frecuencia de aplicación de micro estímulos por semana - Proporción de micro estímulos aplicados por día. - Duración de micro estímulos aplicados por día. - Duración de micro estímulos por semana
Comportamientos tipo Depresivos	Trastorno mental caracterizado por episodios frecuentes de tristeza profunda, pérdida de interés por actividades antes placenteras, sensación de culpa, alteraciones del sueño, pérdida o aumento del apetito (Lang & Borgwardt, 2013).	De acuerdo a lo observado, en el proceso de experimentación se ha considerado las siguientes dimensiones para analizar los comportamientos tipo depresivos: Escape/desesperación, Inmovilidad/flotación, Apatía, perdida del peso corporal.	<ul style="list-style-type: none"> - Escape/desesperación - Inmovilidad/flotación - Apatía - Perdida del peso corporal 	<ul style="list-style-type: none"> - Conductas dirigidas a la huida, desarrollan una postura inmóvil. - Incremento de Inmovilidad del roedor. - Incremento de Inmovilidad del roedor. - Reducción de N° de acicalamientos - Medida en gramos



Variables	Definición conceptual	Definición operacional	Dimensiones	Indicadores
Comportamientos tipo ansiosos	Manifestación de preocupación, miedos excesivos y continuos ante situaciones cotidianas que no representan peligros reales para la persona. Acompañado de síntomas como sensaciones de aprensión, reacciones fisiológicas y respuestas motoras alteradas frecuentes que interfieren con la vida cotidiana de la persona. (Sierra, Ortega, & Zubeidat, 2003)	De acuerdo a lo observado en el proceso de experimentación se ha considerado las siguientes dimensiones para analizar los comportamientos tipo ansiosos: Exploración y Aproximación- evitación de lugares abiertos, elevados e iluminados.	- Exploración - Aproximación- evitación de lugares abiertos, elevados e iluminados.	- Evita los espacios nuevos e iluminados - Evita espacios abiertos, elevados e iluminados



Tabla 4

Operacionalización de variables controladas

Variables Controladas	Definición operacional	Indicador	Naturaleza	Escala
Condiciones ambientales	Se controlará la temperatura en cada sala, así mismo el ciclo de luz que es el período de luz/oscuridad y la humedad en cada ambiente donde permanecen los ratones.	<ul style="list-style-type: none"> ● Temperatura ● Luz ● Humedad 	Cuantitativa	Nominal
Estabulación	Son las instalaciones donde nacen, viven y se reproducen los ratones y tienen un mismo tipo de alimentación.	<ul style="list-style-type: none"> ● Cantidad de ratones por jaula ● Alimentación ● Reproducción ● Gestación ● Anidación 	Cuantitativa y cualitativa	Nominal



CAPÍTULO III

MÉTODO

3.1. Alcance del estudio

Esta investigación presenta un alcance explicativo, puesto que están dirigidos a explicar la ocurrencia de un fenómeno y en qué condiciones se manifiesta por medio del empleo de métodos y diseños válidos y rigurosos (Hernández & Mendoza, 2018) (Sanchez & Reyes, 2015). Así mismo este trabajo se enfocó en estudiar las respuestas de ansiedad y depresión en ratones, basados en modelos experimentales, los cuales estuvieron previamente estandarizados como son el protocolo de estrés crónico leve y las evaluaciones comportamentales como laberinto elevado en cruz, natación forzada, caja clara- oscura, suspensión por la cola, splash test y preferencia de sacarosa. Los resultados de esta investigación contribuirán a un mayor conocimiento sobre cómo los eventos estresantes o contextos adversos, facilitan el desarrollo de patologías como la ansiedad y la depresión.

3.2. Diseño de la investigación

El diseño de la investigación es experimental pura de tipo factorial 2 x 2, de corte longitudinal; es decir se manipula la variable independiente. Para el presente estudio, la unidad experimental fue el animal y se compuso de dos factores, el tratamiento experimental (control vs tratados) y el sexo (hembras y machos) o cepas (C57BL/6Ncr1 y BALB/c). El estudio contó con dos grupos control y dos grupos experimentales, considerando a las cepas como unidad experimental, la asignación de estas fue de modo aleatorio. Para analizar el cambio de las variables dependientes en relación con la manipulación de las variables independientes en distintos momentos de la experimentación, la manipulación de las



variables independientes se hizo en cuatro grupos experimentales y controles, como se representa en el siguiente cuadro:

El diseño experimental de tipo factorial 2x2 (tratamiento experimental por sexo) fue el siguiente:

Tabla 5

Diseño experimental de tipo factorial 2x2

	Factor B	
Factor A	Nivel B1(ECL)	Nivel B2 (control)
Nivel A1 (macho)	A1B1	A1B2
Nivel A2 (hembra)	A2B1	A2B2

Tabla 6

El diseño experimental de tipo factorial 2x2 (tratamiento experimental por cepa)

	Factor B	
Factor A	Nivel B1 (ECL)	Nivel B2 (control)
Nivel A1 (BALB/c)	A1B1	A1B2
Nivel A2 (C57BL/6Ncr1)	A2B1	A2B2



3.3. Población

La población de estudio considerada para el desarrollo de la siguiente investigación fue ratones del bioterio automatizado de la Universidad Andina del Cusco, los cuales a la fecha de junio del 2021 eran un total de 300 ratones.

A. Criterios de inclusión

- Ratones adultos entre 4- 6 semanas de edad
- Peso corporal estándar entre 25- 30 g machos y hembras entre 20-26 g.
- Ratones sanos
- Ratones controles
- Nunca expuestos a un procedimiento previo y apareamiento

B. Criterios de Exclusión

- Animales muy pequeños
- Estado del pelaje deteriorado
- Peso por debajo de los valores establecidos
- Expuestos a un procedimiento previo
- Técnicas e instrumentos de recolección de datos

3.4. Muestra

Para el presente trabajo de investigación, la muestra fue seleccionada aleatoriamente a partir de cada camada. Fueron usados 78 ratones adultos (6-8 semanas) machos (51) y hembras (27) de la cepa BALB/c y 28 ratones adultos (6-8 semanas) machos (13) y hembras



(15) de la cepa C57BL/6NCrl, ambas cepas provenientes del Bioterio de la Universidad Andina del Cusco. Los animales fueron alojados 3-5 animales en jaulas estándares de acrílico transparente y serán mantenidos en condiciones ambientales estándares de ciclo/luz oscuridad (12 horas, con inicio del ciclo a las 06h00), a temperatura de 23 ± 2 °C y humedad a 30 ± 2 °C. Todos los animales tendrán acceso libre a agua y comida.

Toda manipulación y procedimientos experimentales contemplados en este estudio fueron realizados de acuerdo con las directrices de la Guide for the Care and Use of Laboratory Animal (National Research Council, 2011 y la aprobación del comité de ética para estudio con animales de la Universidad Andina del Cusco.

Protocolo para aplicar el Modelo de Estrés Crónico Leve

Una semana antes del inicio del protocolo, todos los animales fueron pesados y este peso corporal sirvió de referencia para las variaciones que se observaron en las semanas de ejecución del protocolo. Para la ejecución de este procedimiento, jaulas conteniendo 4-5 animales fueron aleatoriamente distribuidos en dos salas separadas, un grupo de animales formaron el grupo control y el otro el grupo formará el grupo ECL. Ambas salas estuvieron bajo las mismas condiciones de ciclo luz/oscuridad, temperatura y humedad que la sala de estabulación de animales. Los animales del grupo ECL, ambas salas estuvieron bajo las mismas condiciones de ciclo luz/oscuridad, temperatura y humedad que la sala de estabulación de animales. Los animales del grupo ECL fueron expuestos cada día a diferentes secuencias de 2-3 estresores leves e impredecibles: destellos de luz (3 h), estrés acústico (3-4 h), jaula inclinada (45°) (8-10 h)), lecho húmedo (8-10 h), restricción de movimiento (1 h), inversión de luz (12h). Estos diferentes estresores se aplicaron aleatoriamente cada semana para maximizar la impredecibilidad y evitar la habituación de los animales.



Se espera que esta secuencia de estímulos estresores e impredecibles induzcan cambios progresivos en el peso corporal de los animales, así como en las respuestas comportamentales de ansiedad y depresión. De modo que, cada semana fueron evaluados el estado del pelaje y el peso corporal y desde la segunda semana de exposición, los animales fueron evaluados con una batería de pruebas comportamentales. Durante la segunda e inicio de la tercera semana se iniciaron con evaluaciones comportamentales relacionadas a ansiedad (caja-clara oscura, laberinto elevado en cruz). Durante la última mitad de la tercera semana y cuarta semana, se realizarán las evaluaciones de apatía (Splash test) y en comportamientos tipo depresivos (nado forzado y suspensión por la cola) y anhedonia, respectivamente. A continuación se detallan cada una de estas evaluaciones.

Proceso de evaluación de Peso corporal y estado del pelaje

El estado del pelaje y el peso corporal serán evaluados juntos en una sola sesión al inicio del protocolo ECL (medida basal) y luego al final de cada semana de exposición al protocolo ECL. La evaluación del estado del pelaje consistirá en observar 8 partes diferentes del cuerpo del animal y puntuar el estado de deterioro de acuerdo con protocolos previamente descritos: Será observados: cabeza, cuello, pelaje dorsal, pelaje ventral, patas delanteras, patas traseras, región genital y la cola. El deterioro del pelaje será considerado cuando el pelaje se encuentre amarillento, con grumos y sin acicalamiento. Para cada área del cuerpo observada se puntuará cero (0) si el pelaje se observa en buenas condiciones, 0.5 para pelaje medianamente deteriorado y 1 para para pelaje completamente deteriorado.



Evaluaciones comportamentales

Comportamientos tipo ansiosos

La evaluación de respuestas tipo ansiosas se realizará mediante la exposición de los animales a dos tipos de pruebas comportamentales: el laberinto elevado en cruz y la caja clara/oscura. Ambas pruebas se basan en la tendencia del animal para explorar.

Test de laberinto Elevado en Cruz (LEC)

El laberinto elevado en cruz es una de las pruebas comportamentales para medir conductas tipo ansiosas en roedores. Esta prueba se basa en una aversión natural del ratón para áreas abiertas y elevadas, como también el comportamiento espontáneo de explorar los ambientes nuevos para él. El instrumento consiste brazos abiertos (sin muros) y brazos cerrados (con muros) los cuales se cruzan transversalmente en el centro de cada uno de los brazos. Para la evaluación, los animales serán transportados a la sala de evaluación y serán habituados durante una hora antes del inicio de las pruebas comportamentales. Las condiciones ambientales de temperatura, humedad e iluminación serán mantenidas semejantes a la sala de estabulación de los ratones. La evaluación consistirá en colocar al animal en el área central del laberinto, con la cabeza en dirección al brazo abierto opuesto y dejará al animal explorando el laberinto durante 5 minutos. Al término del test, el animal será colocado de vuelta a su jaula con sus congéneres y al término de la evaluación de todos los ratones de la jaula, serán devueltos a su sala de estabulación. Al final de cada evaluación, el número de bolos fecales dejados por el animal será anotado y en seguida el laberinto será limpiado usando papel toalla y alcohol 70%. Toda la evaluación será registrada con una cámara de video acoplada a un computador y los siguientes parámetros serán analizados: la latencia para entrar a los brazos abiertos, el tiempo total que el animal pasó en los brazos



cerrados, el tiempo total que el animal pasó en los brazos abiertos, número de transiciones entre brazo abierto- brazo cerrado y viceversa.

El tiempo que el animal pasa los brazos abiertos es un indicador de ansiedad, por lo que un tiempo mayor esta área del laberinto sugiere que el ratón tiene menores niveles de ansiedad para la conducta de exploración en el laberinto (Komada y otros, 2008).

Test de la caja clara- oscura (CO)

Esta prueba evalúa comportamientos relacionados a la ansiedad en roedores. El instrumento consiste en dos cajas, una clara y otra oscura del mismo tamaño (23 cm x 15 cm x 15 cm). La caja clara es iluminada por una lámpara de luz blanca colocada en la parte superior. La caja clara y oscura se comunican a través de una pequeña compuerta (5 x 5 x 5 cm). Una hora antes de la evaluación, los animales fueron transportados a la sala de evaluación donde permanecieron habituándose a la sala durante 1 hora. El test comenzó colocando al animal en el centro de la caja clara y se dejó explorar al animal durante 5 minutos. Al término de la evaluación, el animal fue devuelto a su jaula con sus congéneres y luego que todos los animales de la jaula hayan sido evaluados, todos fueron llevados a su sala de estabulación. Al final de cada evaluación, el número de bolos fecales dejados por el animal fueron anotados y el instrumento fue limpiado usando papel toalla y alcohol 70%. Toda la evaluación se registró usando una cámara filmadora acoplada a computador. Los siguientes parámetros fueron analizados: la latencia para entrar a la caja oscura, el número de transiciones de una caja a otra y el tiempo de duración en cada una de las cajas.

Si el animal muestra un tiempo de permanencia menor en la caja clara respecto a la caja oscura y un número menor de transiciones entre cada caja, sugiere niveles elevados de ansiedad (Bourin & Hascoët, 2003)



Comportamientos tipo depresivos

La evaluación de respuestas de depresión se realizó mediante la exposición de los animales a tres tipos de pruebas comportamentales: test de splash, test de nado forzado, test de suspensión por la cola y test de preferencia de sacarosa.

Test de Nado Forzado

El test de nado forzado mide conductas tipo depresivas en ratones y está basado en la observación de la respuesta que presentan los roedores cuando son expuestos a una situación estresante sin salida como la del tanque con agua. En esta situación los ratones inicialmente muestran movimientos vigorosos de escape y luego una postura inmóvil. Para esta evaluación se usó el protocolo propuesto por Porsolt y otros (2001), el cual fue realizado al inicio de la cuarta semana de la aplicación del protocolo ECL. El test se realizó en un tanque de acrílico transparente de 43.5cm de alto x 25cm de diámetro de plástico acrílico, el cual se llenó con agua a temperatura de 26°C hasta alcanzar los 20 cm desde la base del tanque. Este nivel de agua se marcó y la temperatura del agua se verificó usando un termómetro. Los animales fueron habituados a la sala de evaluación una hora antes del inicio de los test. Para la evaluación, el animal se colocó en el tanque del agua y su comportamiento fue observado durante 6 minutos. Al término de la evaluación, los animales fueron recogidos del tanque, secados con un papel toalla en exceso de agua en su cuerpo y de sus respectivas jaulas y luego devueltos a sus salas de estabulación. Al final de la evaluación de cada animal, se cuantificó el número de bolos fecales dejado por el animal en el tanque y estos fueron recogidos usando un colador. Por cuestiones de logística, todos los animales de una jaula se evaluaron en un mismo tanque de agua (4-5 animales) y el agua se renovó para evaluar animales de diferentes jaulas. Toda la evaluación se registró usando una cámara de video



acoplada a computador y los siguientes comportamientos se registraron: la latencia para el primer evento de inmovilidad y el tiempo total de inmovilidad durante los últimos 4 minutos del test.

Será considerado inmovilidad cuando el ratón reduzca sus movimientos al mínimo para flotar o quedarse inmóvil manteniendo su cabeza fuera del agua. Si el animal muestra una menor latencia para el primer evento de inmovilidad y un mayor tiempo de inmovilidad sugiere niveles elevados de depresión ante esa situación inescapable (Yankelevitch y otros, 2015)

Splash Test

El día del test, se preparó una solución de sacarosa al 10% usando agua destilada y colocando la solución en botella con atomizador. Para el test, cada animal se colocó en una jaula limpia sin viruta y se aplicó el spray de solución sacarosa 10% en el lomo del animal. La solución de sacarosa en el pelaje del animal inducirá un comportamiento de acicalamiento. La latencia para el primer evento de grooming, número de eventos de grooming y duración de cada evento de grooming será registrado durante 5 minutos. La actividad de cada ratón se registró por medio de archivos de video a través del software análisis comportamental Ethovision XT versión 15. Se registro de manera simultánea tres ratones. Para ello se empleó 3 cajas en las cuales se designó 3 arenas diferentes.

Test de Suspensión por la cola

Semejante al test de nado forzado, el test de suspensión por la cola mide comportamientos tipo depresivos basados en la respuesta de inmovilidad que muestra el animal luego de vigorosos movimientos iniciales orientados a escapar cuando es colocado en



una situación de estrés inescapable, como es la suspensión por la cola. El tiempo de inmovilidad se considera indicador de desesperación conductual o comportamiento tipo depresivo (Porsolt y otros, 2001). Los animales fueron habituados a la sala de evaluación una hora antes del inicio de los test. Para la evaluación, los ratones fueron suspendidos por la cola sobre un arnés colocado en la parte superior (80 cm de la base de la mesa) del aparato consistente en cuatro compartimentos de madera de color negro de 55 cm de altura x 60 de largo y 11.5 cm de profundidad), donde se evaluó cuatro ratones al mismo tiempo. “La cola se aseguró usando velcro adhesivo colocado a 1 cm de la punta de la cola durante 6 minutos. Al final de la evaluación el animal se descolgó y fue colocado en su jaula y cuando todos los animales de la jaula fueron evaluados, se devolvieron a su sala de estabulación. Al término de la evaluación, se cuantifico el número de bolos fecales dejado por el animal y el aparato fue limpiado con papel toalla y alcohol 70%. Toda la evaluación se registró usando una cámara de video acoplada a computador y los siguientes comportamientos se registraron: la latencia para el primer evento de inmovilidad y la duración de inmovilidad durante los últimos 4 minutos del periodo de test.

Semejante al test de NF, mayor latencia para primer evento de inmovilidad y tiempo de inmovilidad sugiere niveles elevados de depresión en los ratones.

3.5. Procedimiento

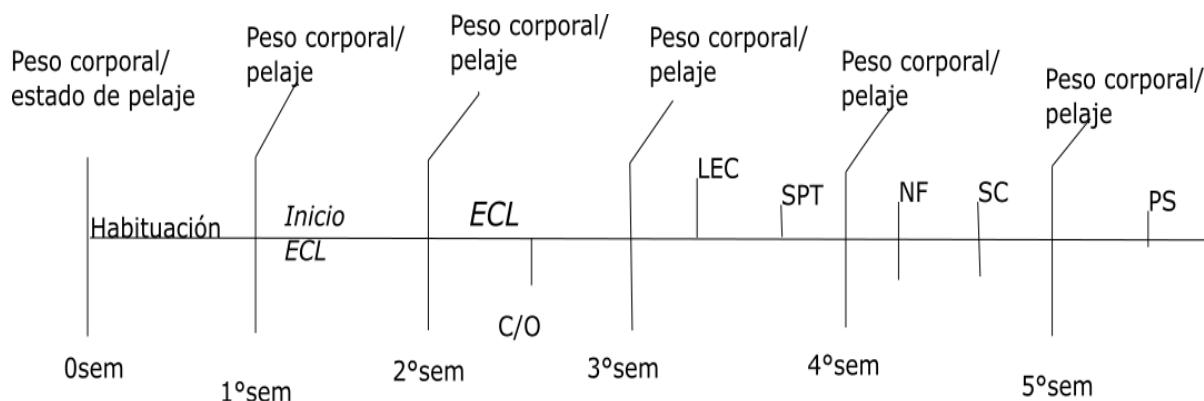
Una semana antes del inicio del protocolo, todos los animales fueron pesados y luego basados en el peso corporal y se distribuyeron en dos grupos: el grupo control (CTL) y el grupo estrés crónico leve (ECL) y a lo largo de 5 semanas fueron expuestos al protocolo de ECL y evaluados en diversas pruebas comportamentales como se ilustra en la **Figura 1**.



Una semana antes del inicio del estudio, los animales del grupo ECL se retiraron de sus estantes de estabulación automáticos y fueron alojados en la sala de estímulos para habituación, los animales de ambos grupos pasaron por un test basal de preferencia de sacarosa. Durante la primera semana se aplicará los siguientes estímulos: destellos de luz (DL) cinco veces por semana con una duración de 3h cada día, con alternancia de horarios para que el estímulo no sea predecible por el animal, el estrés acústico (EA) se aplicó 2 h al día, seis veces por semana, restricción de movimiento (RM) este estímulo se aplicó tres veces por semana con 1h de duración , lecho húmedo (LH) tuvo una duración de 14h dos veces por semana, jaula inclinada (JI, aproximadamente 45 ° de inclinación) tuvo una duración de 13h, se aplicó una vez por semana, , se evaluó peso corporal y pelaje una vez por semana durante 2h, inversión de luz (IL, 12 horas luz y 12 oscuridad) se aplicó este estímulo durante un día, 12h de luz y 12h de oscuridad.

Figura 1

Línea temporal de experimentación



Leyenda:

- ✓ ECL: Estrés crónico leve.
- ✓ C/O: Evaluación comportamental Caja clara – oscura.
- ✓ LEC: Evaluación comportamental de laberinto elevado en cruz.



- ✓ SPT: Splash Test.
- ✓ NF: Evaluación comportamental de nado forzado.
- ✓ SC: Evaluación comportamental de Suspensión de cola.

Desde la segunda semana los animales fueron evaluados con una serie de estímulos y evaluaciones comportamentales relacionadas a la ansiedad (caja clara- oscura) : destellos de luz (DL) se aplicó cinco veces por semana con una duración de 3h cada día, estrés acústico (EA) se aplicó 2 h al día cuatro veces por semana, restricción de movimiento (RM) se aplicó tres veces por semana con 1h de duración, evaluación comportamental de caja clara- oscura se aplicó 4h al día dos veces a la semana, se evaluó peso corporal y pelaje una vez por semana durante 2h, inversión de luz (IL) se aplicó este estímulo durante un día , 12h de luz y 12 de oscuridad y restricción de comida (RC) se realizó una vez a la semana durante 14h. La tercera semana se aplicó la evaluación comportamental de laberinto elevado en cruz relacionado a la ansiedad, dos veces a la semana por 4h, restricción de movimiento (RM) se aplicó tres veces por semana con 1h de duración, destellos de luz (DL) se realizó cuatro veces por semana durante 3h cada día ,estrés acústico (EA) se aplicó 2 h al día, dos veces por semana, la mitad de la tercera semana se aplicó la evaluación comportamental de apatía -Splash test, dos veces por semana con una duración de 4h, se evaluó peso corporal y pelaje una vez por semana durante 2h e inversión de luz (IL) una vez por semana durante 24h en periodos de 12h de luz y 12h de oscuridad. En la cuarta semana se realizaron evaluaciones comportamentales tipo depresivos (nado forzado y suspensión por la cola), así mismo se aplicaron los estímulos como el estrés acústico (EA) dos veces por semana con alternancia de horarios durante 2h, la prueba comportamental de Nado Forzado durante dos días consecutivos por 4 h, destellos de luz (DL) una vez por semana durante 3h , restricción de



movimiento (RM) una vez por semana durante 1h, a mitad de semana se realizó la prueba comportamental de suspensión de cola por dos días durante 4h, se aplicó lecho húmedo (LH) como único estímulo en el día durante 9h, inversión de luz (IL) periodo de oscuridad durante 12h, se evaluó peso corporal y pelaje una vez por semana durante 2h. Restricción de comida (RC) y de agua durante 19h. En la quinta semana se evaluó Anhedonia con el test de preferencia de sacarosa durante 5h.

La **Figura 2** muestra la programación de los estímulos y las pruebas comportamentales al cual fueron sometidos los animales diariamente y su duración.

Figura 2

Cronograma de estímulos y pruebas comportamentales

ESTIMULOS													
Miércoles		Jueves		Viernes		Sábado		Domingo		Lunes		Martes	
CTL	ECL	CTL	ECL	CTL	ECL	CTL	ECL	CTL	ECL	CTL	ECL	CTL	ECL
7-10h DL		7-9h EA		6-18h IL (oscuro)		7-8h RM		7-10h DL		7-9h EA		7-9h peso corporal/Evaluación de pelaje	
12-14h EA		11-14h DL				11-13h DL		11-13h EA		11-12h RM		10-13h EA	
16-17 RM		16-6h LH		18-6h IL (luz)		17-6h EA		17-6h JI		14-17h DL		16-6hh LH	
7-9h EA		7-10h DL		6-18h IL (oscuro)		8-12h Caja clara oscura		8-12h Caja clara oscura		7-9h RM		7-9h peso corporal/Evaluación de pelaje	
11-14h DL		12-14h EA		18-6h IL (luz)		14-17h DL		14-16h EA		11-12h DL		10-11h RM	
16-6h RC		16-17 RM								14-17h EA		13-16h DL	
8-12h Laberinto elevado en cruz		8-12h Laberinto elevado en cruz		6-18h IL (oscuro)		8-12h Splash Test		8-12h Splash Test		7-10h DL		7-9h peso corporal/Evaluación de pelaje	
14-17h DL		15-16h RM		18-6h IL (luz)		14-17h DL		15-16 RM		12-14h EA		10-13h EA	
										16-17 RM		14-17 DL	
8-12h Nado forzado		8-12h Nado forzado		8-9h Suspensión de cola		8-9h Suspensión de cola		7-16h LH		6-18h IL (oscuro)		7-9h peso corporal/Evaluación de pelaje	
16-18h EA		15-16h RM		15-17h EA		14-17h DL				18-6h IL (luz)		14-9h RC/R de agua	
8-13h Preferencia de sacarosa		Colecta de encéfalos										7-9h peso corporal/Evaluación de pelaje	



Leyenda:

- ✓ DL: destellos de luz.
- ✓ EA: estrés acústico.
- ✓ RM: restricción de movimiento
- ✓ IL: inversión de luz
- ✓ JI: jaula inclinada
- ✓ RC: restricción de comida
- ✓ LH: lecho húmedo.

3.6. Técnicas (Experimental y registro conductual) e instrumentos de recolección de datos.

Prueba comportamental 1: Test de caja clara – oscura

Prueba comportamental 2: Test de Laberinto elevado en cruz

Prueba comportamental 3: Test de nado forzado

Prueba comportamental 4: Test de suspensión de cola

Prueba comportamental 5: Splash test



Tabla 7

Pruebas comportamentales

Pruebas comportamentales	Autores	Aplicación	Áreas de evaluación	Duración	Calificación	Validez y confiabilidad
Test de caja clara – oscura	Crawley y Goodwin.	Individual	Exploración	5min	Contabilizar el tiempo que el animal permanece en la caja clara respecto a la caja oscura y contabilizar el número de transiciones entre cada caja.	Según McKinney & Bunney, 1969) mencionan que la validez de un modelo animal se determina por lo siguiente: ➤ Sea razonablemente análogo al trastorno humano, en manifestaciones o sintomatología.
Test de Laberinto elevado en cruz	Montgomery KC.	Individual	Aproximación- evitación de lugares abiertos, iluminados y elevados	5 min	Contabilizar el tiempo que el animal pasa en los brazos abiertos, y número de transiciones entre cada brazo.	➤ Haya un cambio de comportamiento que se pueda monitorear objetivamente.
Test de nado forzado	Porsolt RD.	Individual	Desesperación	6 min	Contabilizar el tiempo para la latencia del primer evento de inmovilidad y el tiempo total de inmovilidad	➤ Los cambios de comportamiento observados puedan revertirse con los mismos tratamientos farmacológicos que son eficaces en humanos (ansiolíticos y antidepresivos)
Test de suspensión de cola	Thierry B, Steru, Simon P y Porsolt RD.	Individual	Escape	6 min	Contabilizar el tiempo para la latencia del primer evento de inmovilidad y el tiempo total de inmovilidad	➤ El sistema debe ser reproducible entre investigadores.
Splash test	Ipek Yalcin; Catherine Belzung y Alexandre Surget.	Individual	Apatía	5 min	Contabilizar el tiempo de latencia para el primer evento de acicalamiento, N° de eventos de acicalamiento y duración.	



3.7. Análisis de Datos

Se utilizó Microsoft Excel 365 para la tabulación de datos. Para los análisis estadísticos y generación de gráficos se usó programa Graphpad Prism 6.01 (San Diego, CA, USA). Todos los datos pasaron por el test de normalidad de Kolmogorov- Smirnov y dependiendo de éste, los datos fueron analizados como paramétricos o no paramétricos. Un primer nivel de análisis fue realizado para comparar la interacción entre el efecto del tratamiento (control vs ECL) y el sexo (macho vs hembra) dentro de cada cepa, el cual se realizó usando el Test ANOVA de dos vías, seguido del test de Bonferroni. Un segundo nivel de análisis fue realizado para comparar el efecto del tratamiento (control vs ECL) y las cepas (C57BL/6NCrl vs BALB/c), considerando machos y hembras separadamente, para el cual también se usó el test ANOVA de dos vías, seguido del test de Bonferroni. Para todos los análisis estadísticos el nivel de significancia se consideró cuando el valor p fue <0.05 .



CAPÍTULO IV

RESULTADOS DE LA INVESTIGACIÓN

4.1. Efecto de estrés crónico leve sobre la ganancia de peso corporal

La ganancia de peso corporal fue determinada a lo largo de las 5 semanas de exposición al protocolo de ECL, y fue calculada en relación al peso basal. El análisis de ANOVA de dos vías repetidas de la ganancia de peso corporal de ratones machos de la cepa C57BL/6Ncr1, mostró una interacción significativa entre los factores protocolo X semanas [$F(5, 55) = 6.436; p < 0,0001$], efecto principal semanas [$F(5, 55) = 21.41; p < 0,0001$] y efecto principal del tratamiento [$F(1, 11) = 31.87, p = 0,0001$]. Un análisis *post hoc* de comparaciones múltiples Sidak reveló que los ratones ECL mostraron una reducción significativa en la ganancia de peso corporal respecto a su control, a partir de la 3 semana hasta el término del protocolo (**Figura 3A**). Concerniente a la ganancia de peso en las hembras de la cepa C57BL/6Ncr1, el análisis mostró efecto significativo del factor semanas [$F(1, 11) = 31.8, p = 0,0001$], sin significancia para el efecto de tratamiento [$F(1, 13) = 0.08; p = 0,77$] e interacción [$F(5, 65) = 2.27; p = 0,05$], donde los ratones ECL y Control, muestran semejante ganancia de peso a lo largo de las semanas de exposición al protocolo (**Figura 3B**).

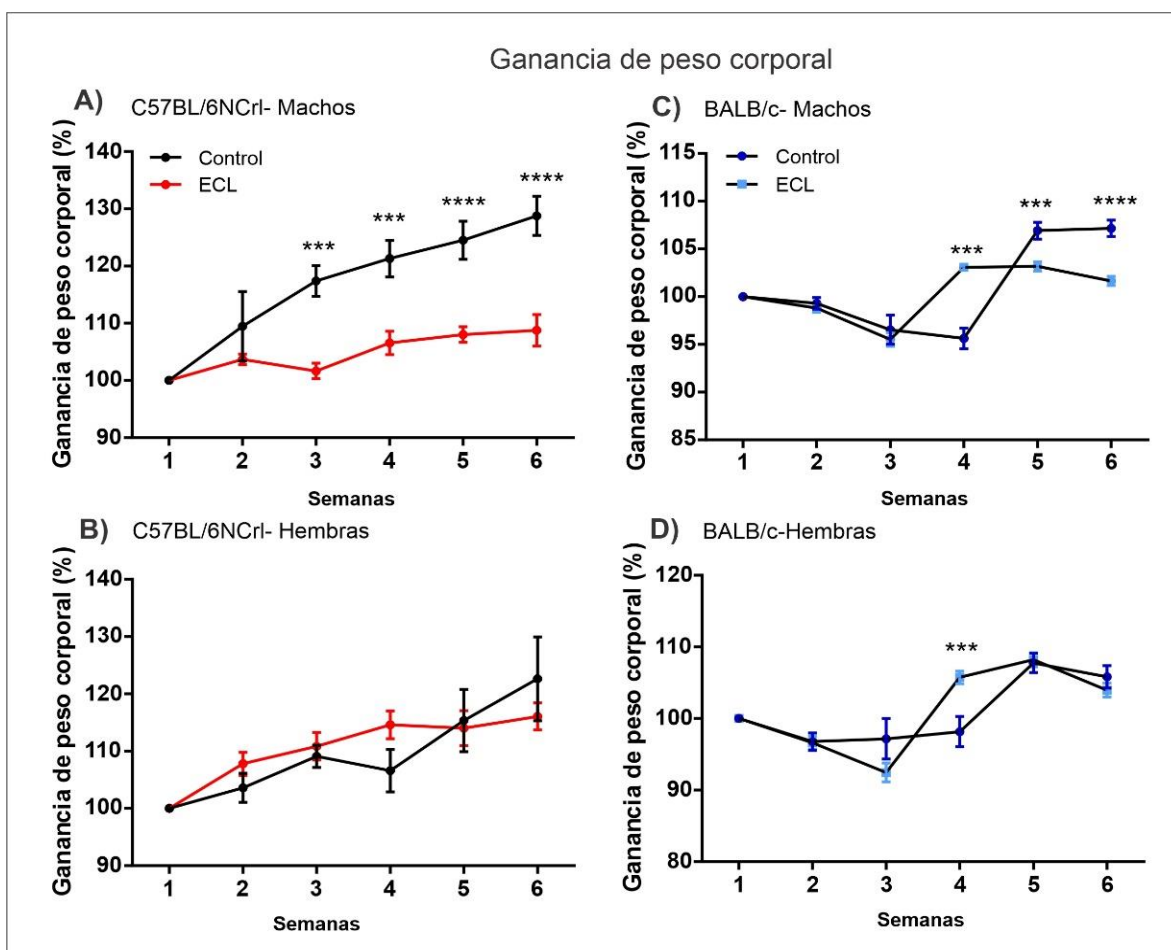
El análisis de ANOVA de 2 vías referente a los machos de la cepa BALB/c, mostró una interacción significativa [$F(5, 230) = 24.4; p < 0,0001$] y un efecto principal de las semanas [$F(5, 230) = 58.57; p < 0,0001$], mas no se encontró un efecto significativo de tratamiento [$F(1, 46) = 1.253, p = 0,2688$]. Un análisis *post hoc* de Sidak, reveló que los ratones ECL BALB/c machos, muestran un incremento significativo en la ganancia de peso corporal en la cuarta semana comparados a los controles ($p < 0,001$), sin embargo, en la 5ta y 6ta semana este mismo grupo mostró una reducción significativa de peso corporal referente a su grupo control



($p < 0,001$ y $p < 0,0001$ respectivamente). (**Figura 3C**). Referente a la ganancia de peso en las hembras de la cepa BALB/c, el análisis mostró una interacción significativa [$F(5, 160) = 5.41$; $p < 0,0001$], también se mostró un efecto significativo en el factor semanas [$F(5, 160) = 32.0$; $p < 0,0001$], en el tratamiento no se halló significancia [$F(1, 32) = 0.04$, $p = 0,84$]. Un análisis *Post hoc* de Sidak mostró que los ratones ECL hembras de la cepa BALB/c, tuvieron una ganancia de peso en la 4ta semana respecto a sus pares control ($p < 0,001$) (Figura 3D).

Figura 3

Efecto del ECL en la ganancia de peso corporal en ratones C57BL/6Ncr1 y BALB/c.



Nota: El porcentaje de ganancia corporal respecto al peso basal a lo largo de las 5 semanas de exposición al protocolo de ECL en ratones machos (A) y hembras (B) de la cepa C57, y ratones machos (C) y hembras (D) de la cepa BALB/c. El porcentaje de ganancia de peso corporal fue calculado respecto al peso basal medido una semana antes al inicio del protocolo. Los datos mostrados son valores de la media \pm EPM. $N=8-9$ por grupo. *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$.



4.2. Resultados del Primer objetivo específico:

El primer objetivo de este estudio fue establecer el efecto del estrés crónico leve sobre los comportamientos tipo ansiosos en los ratones de la cepa C57BL/6NCrI según el sexo. Para esto, los datos de la evaluación en las pruebas de la caja clara/oscura y laberinto elevado en cruz fueron analizados usando ANOVA de dos vías, considerando los factores protocolo y sexo.

Test de la Caja clara - oscura

El análisis de la latencia para entrar a la caja oscura mostró un efecto principal del sexo [$p=0,02$] pero no efecto del protocolo o interacción entre ambos factores [$p>0,05$] (Tabla 8), donde los ratones macho muestran una latencia demorada para entrar a la caja oscura comparado con los ratones hembra de la misma cepa. Por otro lado, el análisis del tiempo en la caja clara y el número de bolos fecales no arrojó significancia para efecto del protocolo, sexo o interacción entre ambos factores (Tabla 8).

Tabla 8

Resumen de análisis factorial (protocolo ECL x sexo) del test de la caja clara/oscura

Factores	Interacción		
	Sexo	Protocolo	Sexo x Protocolo
Test de la caja clara/oscura			
C57BL/6NCrI			
<i>Latencia (s)</i>	$F_{(1,24)} = 5,47,$ $p = 0,02$	$F_{(1,24)} = 0,11,$ $p = 0,73$	$F_{(1,24)} = 1,08,$ $p = 0,30$
<i>Tiempo en caja clara (s)</i>	$F_{(1,24)} = 1,91,$ $p = 0,17$	$F_{(1,24)} = 0,19,$ $p = 0,66$	$F_{(1,24)} = 1,95,$ $p = 0,17$



<i>N° bolos fecales</i>	<i>$F(1,24) = 2,41,$ $p = 0,13$</i>	<i>$F(1,24) = 0,01,$ $p = 0,89$</i>	<i>$F(1,24) = 0,01,$ $p = 0,89$</i>
-------------------------	---	---	---

Nota: Análisis estadísticamente significativo está resaltado en negrita

Test de Laberinto elevado en cruz

Referente al comportamiento ansioso en la prueba de laberinto elevado en cruz, el análisis ANOVA de dos vías no mostró ningún efecto del sexo, protocolo o interacción entre ambos factores, para el desempeño de los ratones de la cepa C57BL/6Ncr1 en la prueba de laberinto elevado en cruz (**Tabla 9**). Esto sugiere que el desempeño de ratones macho y hembras de la cepa C57BL/6Ncr1 en la prueba de laberinto elevado en cruz son semejantes, independiente del protocolo.

Tabla 9

Resumen de análisis factorial (protocolo ECL x sexo) del test de Laberinto Elevado en

Cruz

Factores	Interacción		
Laberinto elevado en cruz	Sexo	Protocolo	Sexo x Protocolo
C57BL/6Ncr1			
<i>N° entradas brazos abiertos</i>	<i>$F(1,24) = 0,007$ $p = 0,93$</i>	<i>$F(1,24) = 0,018$ $p = 0,89$</i>	<i>$F(1,24) = 0,92$ $p = 0,76$</i>
<i>Tiempo en brazos abierto (s)</i>	<i>$F(1,24) = 0,52$ $p = 0,47$</i>	<i>$F(1,24) = 0,007$ $p = 0,93$</i>	<i>$F(1,24) = 1,39$ $p = 0,24$</i>
<i>N° bolos fecales</i>	<i>$F(1,24) = 0,001$ $p = 0,96$</i>	<i>$F(1,24) = 0,48$ $p = 0,49$</i>	<i>$F(1,24) = 0,77$ $p = 0,38$</i>



4.3. Resultados del segundo objetivo específico:

El segundo objetivo de este estudio fue establecer el efecto del estrés crónico leve sobre los comportamientos tipo ansiosos evaluados en el Test de la caja clara – oscura, en los ratones de la cepa BALB/c según el sexo. Para esto se realizó un análisis ANOVA de dos vías considerando los factores sexo y protocolo.

Test de la Caja clara - oscura

El análisis no mostró efecto del factor sexo [$p = 0,15$] o interacción [$p = 0,97$] en la latencia y N° de bolos fecales, sin embargo, mostro un efecto principal del protocolo [$p = 0,0001$] en el tiempo en la caja clara, mas no se encontró efecto del factor sexo e interacción, donde los machos y hembras ECL pasan mayor tiempo en la caja clara a comparación de sus controles. (Tabla 10).

Tabla 10

Resumen de análisis factorial (protocolo ECL x sexo) del test Caja clara – oscura

Factores	Interacción		
	Sexo	Protocolo	Sexo x Protocolo
Test Caja clara – oscura			
BALB/c			
Latencia (s)	$F (1,56) = 1,71$ $p = 0,19$	$F (1,56) = 0,04$ $p = 0,82$	$F (1,56) = 0,04$ $p = 0,82$
Tiempo en caja clara (s)	$F (1,56) = 2,12$ $p = 0,15$	$F (1,56) = 20,4$ $p = 0,0001$	$F (1,56) = 0,00$ $p = 0,97$



<i>N° bolos fecales</i>	<i>$F(1,56) = 1,51$ $p = 0,22$</i>	<i>$F(1,56) = 3,03$ $p = 0,08$</i>	<i>$F(1,56) = 0,03$ $p = 0,86$</i>
-------------------------	--	--	--

Nota: Análisis estadísticamente significativo está resaltado en negrita

Test de Laberinto elevado en cruz

Referente al comportamiento ansioso en la prueba de laberinto elevado en cruz, el análisis ANOVA de dos vías mostró para el tiempo en los brazos abiertos una interacción significativa entre el sexo y protocolo ($p < 0,03$), sin efectos principal del factor sexo ($p = 0,24$) y protocolo ($p = 0,06$). El análisis *post hoc* no mostro significancia, sin embargo, se muestra una tendencia que los machos ECL y CONTROL pasan tiempo semejante en los brazos abiertos, las hembras ECL pasan un tiempo significativamente menor que sus controles (**Tabla 11**). Respecto al N° de entradas en brazos abiertos no se encontró interacción, o efecto principal del sexo o protocolo. Por otro lado, en el N° de bolos fecales hubo efecto del sexo ($p = 0,02$) sin efecto del protocolo, e interacción. Donde los machos tuvieron mayor N° de bolos fecales a comparación de las hembras, independiente del protocolo. Estos resultados sugieren que la exposición del protocolo ECL, incrementa los niveles de ansiedad en las hembras BALB/c aunque los machos parecen ser más reactivos.

Tabla 11

Resumen de análisis factorial (protocolo ECL x sexo) del test Laberinto elevado en cruz

Factores	Interacción		
Test de Laberinto elevado en cruz	Sexo	Protocolo	Sexo x Protocolo
BALB/c			



<i>N° entradas brazos abiertos</i>	$F (1,70) = 0,39$ $p = 0,53$	$F (1,70) = 0,21$ $p = 0,64$	$F (1,70) = 2,16$ $p = 0,14$
<i>Tiempo en brazos abierto (s)</i>	$F (1,70) = 1,35$ $p = 0,24$	$F (1,70) = 3,54$ $p = 0,06$	$F (1,70) = 4,46$ $p = 0,03$
<i>N° bolos fecales</i>	$F (1,70) = 5,38$ $p = 0,02$	$F (1,70) = 0,28$ $p = 0,59$	$F (1,70) = 0,28$ $p = 0,59$

Nota: Análisis estadísticamente significativo está resaltado en negrita

4.4. Resultados del Tercer objetivo específico:

El tercer objetivo de este estudio fue establecer el efecto del estrés crónico leve sobre los comportamientos tipo depresivos en los ratones de la cepa C57BL/6NCrI según el sexo. Medidos en el Test de Nado forzado.

Test de Nado forzado

Para esto se realizó un análisis ANOVA de dos vías, considerando los factores sexo y protocolo, el cual mostró una interacción significativa [$p = 0,003$] en el tiempo de inmovilidad, sin efectos principal de factor sexo [$p = 0,06$] y protocolo [$p = 0,09$](**Tabla 12**). Un análisis *post hoc* reveló que los machos ECL de la cepa C57BL/6NCrI, incrementan su tiempo de inmovilidad comparado con sus controles, mientras que las hembras ECL reducen su tiempo de inmovilidad comparado con sus controles. Respecto a la latencia 1era inmovilidad no hubo efecto del sexo, protocolo e interacción. Referente a los N° de bolos fecales hubo efecto principal del protocolo sin efecto del sexo e interacción, donde los machos y hembras ECL tuvieron mayor N° de bolos fecales comparado con sus controles. Estos resultados sugieren que los comportamientos tipo depresivos afectan de manera opuesta respecto al sexo, donde a pesar que machos y hembras expuestas al protocolo



muestran mayor reactividad fisiológica los machos, incrementan sus comportamientos tipo depresivos, mientras que las hembras reducen estos comportamientos.

Tabla 12

Resumen de análisis factorial (protocolo ECL x sexo) del test de Nado Forzado

Factores	Interacción		
	Sexo	Protocolo	Sexo x Protocolo
Test de Nado Forzado			
C57BL/6NCrl			
<i>Latencia 1era inmovilidad (s)</i>	$F(1,24) = 0,04$ $p = 0,83$	$F(1,24) = 4,00$ $p = 0,05$	$F(1,24) = 0,38$ $p = 0,54$
<i>Tiempo de inmovilidad (s)</i>	$F(1,24) = 3,62$ $p = 0,06$	$F(1,24) = 3,07$ $p = 0,09$	$F(1,24) = 10,5$ $p = 0,003$
<i>Nº bolos fecales</i>	$F(1,24) = 0,37$ $p = 0,54$	$F(1,24) = 5,18$ $p = 0,03$	$F(1,24) = 0,22$ $p = 0,64$

Nota: Análisis estadísticamente significativo está resaltado en negrita.

Test de Suspensión de cola

Referente al comportamiento depresivo en la prueba de suspensión por la cola, se realizó un análisis ANOVA de dos vías, el cual mostró una interacción significativa entre el sexo y protocolo [$p=0,04$] en el tiempo de inmovilidad, con efectos principales de factor sexo [$p=0,03$] sin embargo no hubo del factor protocolo [$p=0,86$] (**Tabla 13**). Un análisis *post hoc* reveló que los machos ECL de la cepa C57BL/6NCrl pasan mayor tiempo de inmovilidad a a comparación de sus controles, las hembras ECL reducen su tiempo de inmovilidad respecto a sus controles. Respecto a la latencia mostro un efecto del protocolo ($p=0.04$) sin efecto del sexo e interacción, donde los machos y hembras ECL mostraron una menor latencia para



inmovilidad comparado con sus controles. Referente a los N° de bolos fecales no se encontró efecto del sexo, protocolo e interacción. Estos resultados sugieren que, aunque los machos y hembras expuestas al protocolo muestran una rápida respuesta de inmovilidad, son los machos que muestran mayor tiempo de inmovilidad esto indica que tienen mayor comportamientos tipo depresivos a comparación de las hembras.

Tabla 13

Resumen de análisis factorial (protocolo ECL x sexo) del test de Suspensión de cola

Factores	Interacción		
	Sexo	Protocolo	Sexo x Protocolo
Test de Suspensión de cola			
C57BL/6NCrI			
<i>Latencia 1era inmovilidad (s)</i>	$F (1,22) = 3,78$ $p=0,06$	$F (1,22) = 4,37$ $p=0,04$	$F (1,22) = 0,91$ $p=0,43$
<i>Tiempo de inmovilidad (s)</i>	$F (1,22) = 5,31$ $p=0,03$	$F (1,22) = 0,02$ $p=0,86$	$F (1,22) = 4,42$, $p=0,04$
<i>N° bolos fecales</i>	$F (1,22) = 0,40$ $p=0,53$	$F (1,22) = 3,30$, $p=0,99$	$F (1,22) = 0,05$, $p=0,81$

Nota: Análisis estadísticamente significativo está resaltado en negrita

Splash Test

Referente al comportamiento depresivo (apatía) en la prueba de Splash Test, el análisis ANOVA de dos vías mostró un efecto principal del protocolo [$p=0,004$] en el tiempo de grooming, mas no se encontró efecto del factor sexo [$p=0,49$] o interacción [$p=0,62$] donde los machos y hembras ECL tuvieron mayor tiempo de grooming a comparación de sus controles (**Tabla 14**). Referente al N° de bolos fecales no hubo efecto del sexo, protocolo e



interacción. Estos resultados sugieren que los machos y hembras ECL incrementaron sus comportamientos de acicalamiento, mostrando una reducción de comportamientos tipo depresivos a comparación de sus controles en términos de Apatía.

Tabla 14

Resumen de análisis factorial (protocolo ECL x sexo) del Splash Test

Factores	Interacción		
	Sexo	Protocolo	Sexo x Protocolo
Splash Test			
C57BL/6NCr1			
<i>Tiempo de grooming</i> (s)	$F_{(1,24)} = 0.48,$ $p = 0,49$	$F_{(1,24)} = 9,85$ $p = 0,004$	$F_{(1,24)} = 0.24,$ $p = 0,62$
<i>N° bolos fecales</i>	$F_{(1,24)} = 1.32,$ $p = 0,26$	$F_{(1,24)} = 0.24,$ $p = 0,62$	$F_{(1,24)} = 2.19,$ $p = 0,15$

Nota: Análisis estadísticamente significativo está resaltado en negrita



4.5. Resultados del Cuarto objetivo específico:

El cuarto objetivo de este estudio fue establecer el efecto del estrés crónico leve sobre los comportamientos tipo depresivos en los ratones de la cepa BALB/c según el sexo.

Test de Nado forzado

Para esto se realizó un análisis ANOVA de dos vías de la Latencia para 1era inmovilidad en el Test de nado forzado, considerando los factores sexo y protocolo y se encontró un efecto principal del protocolo [$p=0,002$], mas no se encontró efecto del factor sexo [$p=0,75$] o interacción [$p=0,87$], donde machos y hembras expuestas al protocolo ECL muestran una mayor latencia de primera inmovilidad respecto a sus controles (**Tabla 15**). Referente al tiempo de inmovilidad se encontró efecto del protocolo ($p =0,0009$), mas no efecto del sexo e interacción, donde los machos y hembras ECL tuvieron un menor tiempo de inmovilidad respecto a sus controles. Referente al N° de bolos fecales no se encontró efecto del factor sexo, protocolo e interacción. Estos resultados sugieren que el protocolo afecta de manera semejante a los machos y hembras de la cepa BALB/c, específicamente reduciendo sus comportamientos tipos depresivos.



Tabla 15

Resumen de análisis factorial (protocolo ECL x sexo) del Test de Nado forzado

Factores	Interacción		
Test de Nado forzado	Sexo	Protocolo	Sexo x Protocolo
BALB/c			
<i>Latencia 1era</i>	$F (1,31) = 0,09$	$F (1,31) = 10,6$	$F (1,31) = 0,02$
<i>inmovilidad (s)</i>	$p=0,75$	$p=0,002$	$p=0,87$
<i>Tiempo de inmovilidad</i>	$F (1,31) = 0,27$	$F (1,31) = 13,3$	$F (1,31) = 0,63,$
<i>(s)</i>	$p= 0,60$	$p = 0,0009$	$p=0,42$
<i>N° bolos fecales</i>	$F (1,31) = 2,58$	$F (1,31) = 0,06,$	$F (1,31) = 0,00$
	$p=0,11$	$p=0,80$	$p=0,96$

Nota: Análisis estadísticamente significativo está resaltado en negrita

Test de Suspensión por la cola

Referente al comportamiento depresivo en la prueba de suspensión por la cola, se realizó un análisis ANOVA de dos vías, considerando los factores sexo y protocolo, no se encontró ningún efecto del factor sexo [$p>0,05$], factor protocolo [$p>0,05$] o interacción [$p>0,05$] en la latencia 1era inmovilidad, tiempo de inmovilidad y N° de bolos fecales. Estos resultados sugieren que machos y hembras de la cepa BALB/c no fueron susceptibles al protocolo, al menos evaluados en este Test (**Tabla 16**).



Tabla 16

Resumen de análisis factorial (protocolo ECL x sexo) del Test de Suspensión de cola

Factores	Interacción		
	Sexo	Protocolo	Sexo x Protocolo
Test de Suspensión de cola			
BALB/c			
<i>Latencia 1era inmovilidad (s)</i>	$F_{(1,67)} = 1,87$ $p = 0,17$	$F_{(1,67)} = 1,03$ $p = 0,31$	$F_{(1,67)} = 0,58$ $p = 0,44$
<i>Tiempo de inmovilidad (s)</i>	$F_{(1,67)} = 0,05$ $p = 0,80$	$F_{(1,67)} = 2,65$ $p = 0,10$	$F_{(1,67)} = 0,22$ $p = 0,63$
<i>N° bolos fecales</i>	$F_{(1,62)} = 1,57$ $p = 0,21$	$F_{(1,62)} = 0,58$ $p = 0,44$	$F_{(1,62)} = 0,38$ $p = 0,53$

Splash Test

Referente al comportamiento depresivo en la prueba de Splash test, el análisis ANOVA de dos vías encontró un efecto principal en el sexo [$p=0,009$], con una tendencia del factor protocolo [$p=0,05$] más no interacción [$p=0,64$] en el tiempo de grooming (**Tabla 17**), donde las hembras tuvieron mayor tiempo de grooming a comparación de los machos, independiente del protocolo. Los machos y hembras tienden a mostrar mayor tiempo de grooming a comparación de sus controles. Referente al N° de bolos fecales hubo efecto del sexo ($p=0,01$) y protocolo ($p=0,01$) mas no en la interacción ($p=0,97$). Donde el protocolo



induce un incremento de N° de bolos fecales en relación a sus controles, aunque esto es mayor en los machos a comparación de las hembras.

Tabla 17

Resumen de análisis factorial (protocolo ECL x sexo) del Splash Test

Factores	Interacción		
	Sexo	Protocolo	Sexo x Protocolo
Splash Test			
BALB/c			
<i>Tiempo de grooming</i>	<i>F (1,74) =7,17</i>	<i>F (1,74) =3,78</i>	<i>F (1,74) =0,21</i>
(s)	<i>p=0,009</i>	<i>p=0,05</i>	<i>p=0,64</i>
<i>N° bolos fecales</i>	<i>F (1,74) =6,88</i>	<i>F (1,74) =6,38</i>	<i>F (1,74) =0,00</i>
	<i>p= 0,01</i>	<i>p=0,01</i>	<i>p=0,97</i>

Nota: Análisis estadísticamente significativo está resaltado en negrita

4.6. Resultados del Quinto objetivo específico:

El quinto objetivo de este estudio fue establecer el efecto del estrés crónico leve sobre los comportamientos tipo ansiosos en los ratones machos según la cepa. Para esto se evaluó el test comportamental caja clara – oscura en la segunda semana de aplicación del protocolo de Estrés crónico leve.

Test de la Caja clara - oscura

El análisis ANOVA de dos vías de la latencia para entrar a la caja oscura en ratones machos de las cepas C57BL/6Ncr1 y BALB/c, se encontró un efecto principal del factor cepa [$F (1, 44) = 41.1; p < 0,0001$], mas no se encontró efecto del factor protocolo [$F (1, 44) = 1.11; p$



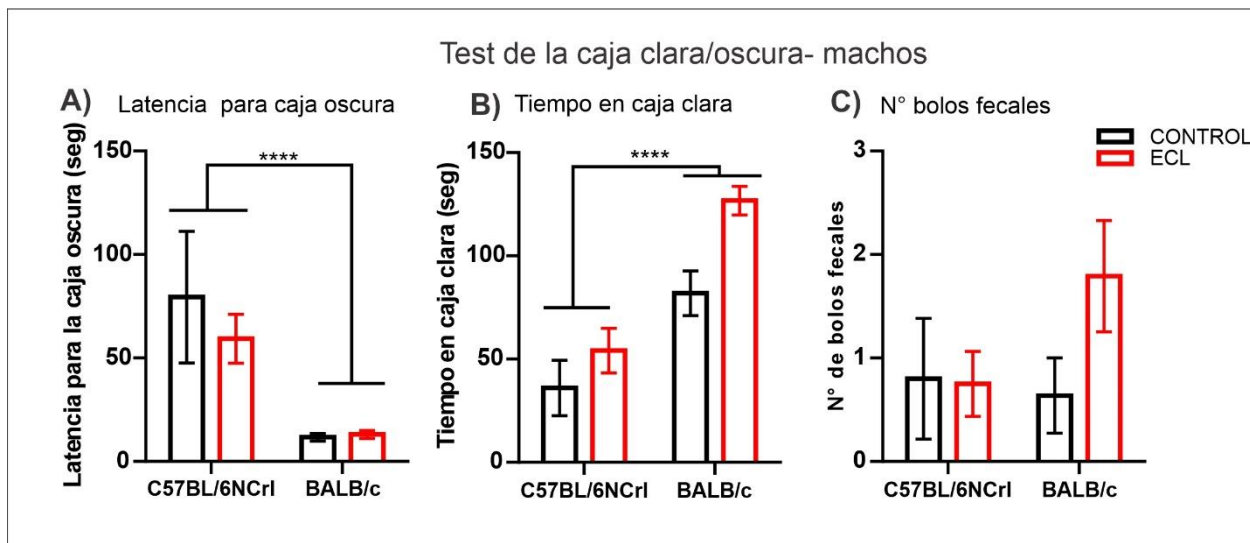
=0,29] o interacción [$F(1,44) = 1.47; p=0,23$], donde los ratones BALB/c tuvieron una menor latencia a comparación de la cepa C57BL/6Ncr1 (**Figura 4A**). Concerniente al tiempo de permanencia en la caja clara, se encontró un efecto significativo en el factor cepa [$F(1,44) = 27.5; p=0,0001$], y protocolo [$F(1,44) = 7,76; p=0,007$] no se encontró efecto de la interacción [$F(1,44) = 1,39; p=0,24$], donde la cepa BALB/c independiente del protocolo pasan mayor tiempo en la caja clara a comparación de la cepa C57BL/6Ncr1, así mismo el efecto del protocolo indujo un incremento en el tiempo en la caja clara en ambas cepas (**Figura 4B**).

Referente al N° de bolos fecales no se encontró un efecto significativo de la cepa [$F(1,44) = 0,39; p=0,5320$], protocolo [$F(1,44) = 0,62; p=0,4320$] o interacción [$F(1,44) = 0,7478; p=0,3919$] (**Figura 4C**).

Figura 4

Efecto del ECL en el Test comportamental Caja clara – oscura en ratones machos

C57BL/6Ncr1 y BALB/c



Nota: La latencia en caja clara machos (A), el Tiempo en caja clara de Machos (B), y N° de bolos fecales en machos (C). Los datos mostrados son valores de la media \pm EPM. $N=8-9$ por grupo. ** $p<0.01$ *** $p<0.001$, **** $p<0.0001$.



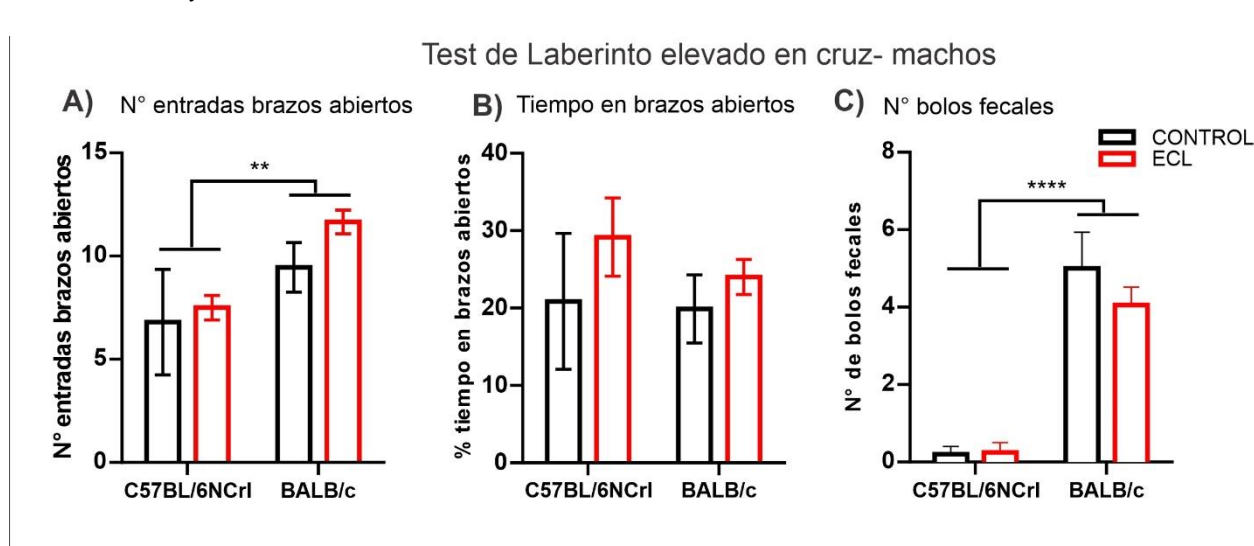
Test de Laberinto elevado en cruz

Referente al comportamiento tipo ansioso en la prueba Laberinto elevado en cruz, se evaluó al inicio de la tercera semana de aplicación del protocolo ECL. El análisis ANOVA de 2 vías del número de entradas en brazos abiertos en ratones macho de las cepas C57BL/6Ncr1 y BALB/c, mostró un efecto principal del factor cepa [$F(1, 56) = 7,82; p=0,007$], sin efecto principal del protocolo ECL [$F(1, 56) = 1,36; p=0,24$] o la interacción [$F(1, 56) = 0,34; p=0,55$], donde los ratones machos de la cepa BALB/c, tienen mayores números de entradas en brazos abiertos, a comparación de los ratones machos de la cepa C57BL/6Ncr1 referente al N° de entradas en los brazos abiertos (**Figura 5A**). Concerniente al porcentaje de tiempo de permanencia en los brazos abiertos, no se encontró efecto principal del factor cepa [$F(1, 56) = 0,04; p=0,83$], protocolo ECL [$F(1, 56) = 0,94; p=0,33$] o interacción [$F(1, 56) = 0,56; p=0,45$] (**Figura 5B**). Referente al N° de bolos fecales, se encontró efecto del factor cepa [$F(1, 56) = 23,5; p<0,0001$], sin efecto del factor protocolo [$F(1, 56) = 0,12; p=0,72$] o interacción [$F(1, 56) = 0,17; p=0,67$] donde la cepa BALB/c tuvo mayor N° de bolos fecales a comparación de la cepa C57(**Figura 5C**). Estos resultados sugieren que la cepa C57BL/6Ncr1 muestran mayor comportamientos tipo ansioso a comparación de la cepa

BALB/c. los resultados en ambos test nos sugieren que los C57BL/6NcrI muestran mayor fenotipo ansioso, aunque los ratones BALB/c muestren una mayor reactividad fisiológica.

Figura 5

(Efecto del ECL en el Test comportamental Laberinto elevado en cruz en ratones machos C57BL/6NcrI y BALB/c.



Nota: N° de entradas en brazos abiertos de machos (A). Porcentaje de tiempo en brazos abiertos en machos (B) y N° de bolos fecales en machos (C). Los datos mostrados son valores de la media \pm EPM. N=8-9 por grupo. ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$.

4.7. Resultados del Sexto objetivo específico:

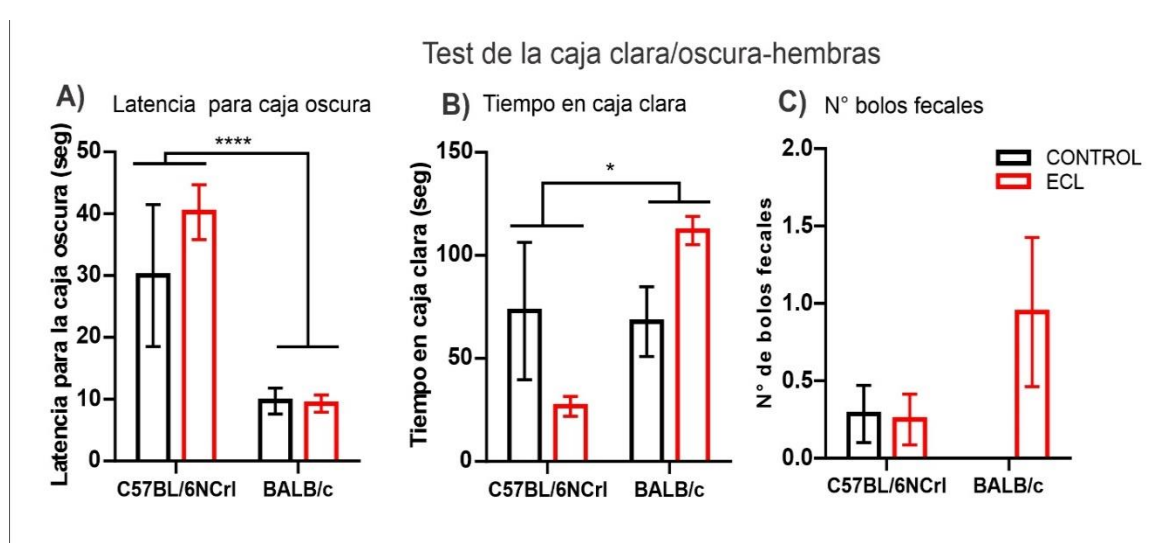
El sexto objetivo de este estudio fue establecer el efecto del estrés crónico leve sobre los comportamientos tipo ansiosos en los ratones hembra según la cepa. Para esto se evaluó el test comportamental caja clara – oscura, en la segunda semana de aplicación del protocolo de ECL. El análisis ANOVA de 2 vías de la latencia en la caja oscura en ratones hembras de las cepas C57BL/6NcrI y BALB/c, mostró una interacción significativa en el factor cepa [F (1, 36) = 27,4; $p < 0,0001$], sin efecto principal del protocolo [F (1, 36) = 1,00; $p = 0,32$] o interacción [F (1, 36) = 1,19; $p = 0,28$], donde los ratones hembras de la cepa BALB/c muestran una latencia menor para entrar al área oscura que los ratones hembras de la cepa



C57BL/6Ncr1 (**Figura 6A**). Concerniente al tiempo de permanencia en la caja clara, en análisis ANOVA de 2 vías mostró un efecto significativo en la interacción [$F(1, 36) = 8,45$; $p=0,006$], y en el factor cepa [$F(1, 36) = 6,63$; $p=0,01$] no se encontró efecto del protocolo ECL [$F(1, 36) = 0,00$; $p=0,94$], donde la cepa BALB/c pasa un mayor tiempo en la caja clara que los ratones de la cepa C57BL/6Ncr1. Un análisis *post hoc* de comparaciones múltiples Sidak reveló que mientras los ratones ECL de la cepa C57BL/6Ncr1 pasan un tiempo significativamente menor en la caja clara comparado con sus controles, los ratones hembra ECL de la cepa BALB/c tienden a permanecer un tiempo mayor en la caja clara comparado con sus controles (**Figura 6B**). Concerniente al N° de bolos fecales, el análisis ANOVA de 2 vías no encontró efecto del factor cepa [$F(1, 36) = 0,17$; $p=0,67$], protocolo ECL [$F(1, 36) = 0,86$; $p=0,35$] o interacción [$F(1, 36) = 1,00$; $p=0,32$] (**Figura 6C**).

Figura 6

Efecto del ECL en el Test comportamental Caja clara – oscura en ratones hembras C57BL/6Ncr1 y BALB/c



Nota: La latencia en caja clara hembras (A), el Tiempo en caja clara de hembras (B), y N° de bolos fecales en hembras (C). Los datos mostrados son valores de la media \pm EPM. $N=8-9$ por grupo. ** $p<0.01$ *** $p<0.001$, **** $p<0.0001$.

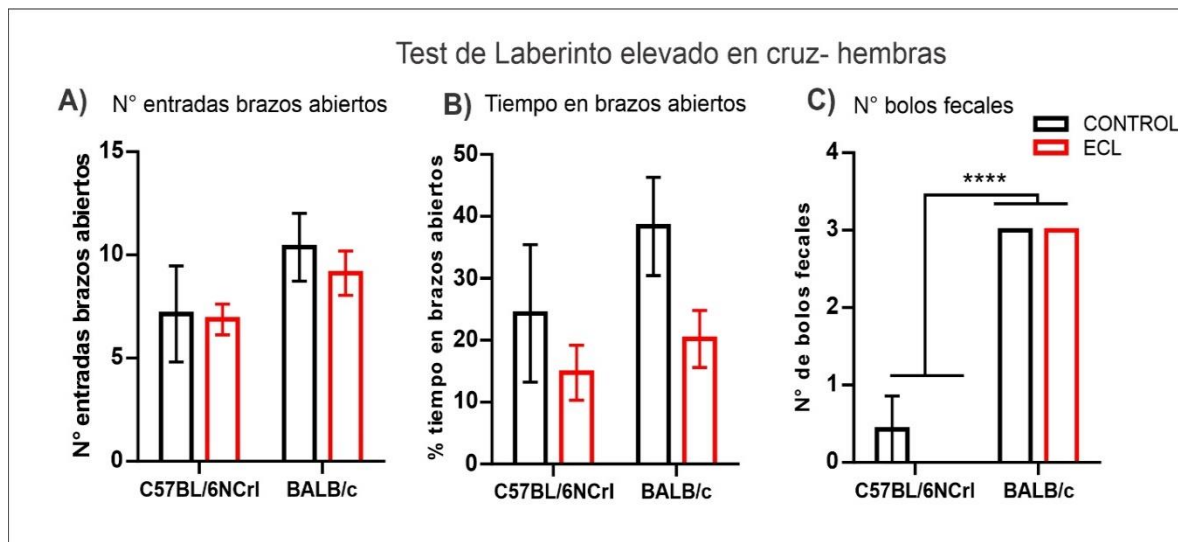


Test de Laberinto elevado en cruz

Referente al comportamiento tipo ansioso en la prueba Laberinto elevado en cruz, evaluado al inicio de la tercera semana de aplicación del protocolo Estrés crónico leve, el análisis del N° de entradas en brazos abiertos en ratones hembra de las cepas C57BL/6Ncr1 y BALB/c mediante el test ANOVA de 2 vías no mostró efecto del factor cepa [$F(1, 38) = 3,38; p=0,07$], efecto del protocolo ECL [$F(1, 38) = 0,19; p=0,65$], o de la interacción [$F(1, 38) = 0,07; p=0,78$] (**Figura 7A**). El análisis ANOVA de vías del porcentaje de tiempo en los brazos abiertos no mostró efecto principal del protocolo ECL [$F(1, 38) = 3,84; p=0,05$], del factor cepa [$F(1, 38) = 1,89; p=0,17$] ni interacción [$F(1, 38) = 0,36; p=0,54$] (**Figura 7B**). Referente al N° de bolos fecales se mostró un efecto del factor cepa [$F(1, 38) = 343,2; p<0,0001$], sin efecto del factor protocolo ECL [$F(1, 38) = 2,03; p=0,16$], ni interacción [$F(1, 38) = 2,03; p=0,16$], donde la cepa BALB/c independiente del protocolo tuvo mayor N° de bolos fecales a comparación de la cepa C57BL/6Ncr1 (**Figura 7C**).

Figura 7

Efecto del ECL en el Test comportamental Laberinto elevado en cruz en ratones hembras C57BL/6Ncr1 y BALB/c.



Nota: N° de entradas en brazos abiertos de hembras (A). Porcentaje de tiempo en brazos abiertos en hembras (B) y N° de bolos fecales en hembras (C). Los datos mostrados son valores de la media \pm EPM. N=8-9 por grupo. ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$.

4.8. Resultados del Séptimo objetivo específico:

El séptimo objetivo de este estudio fue establecer el efecto del estrés crónico leve sobre los comportamientos tipo depresivos en los ratones machos según la cepa. Para esto se evaluó la prueba de nado forzado al inicio de la cuarta semana de aplicación del protocolo ECL.

Test de nado forzado

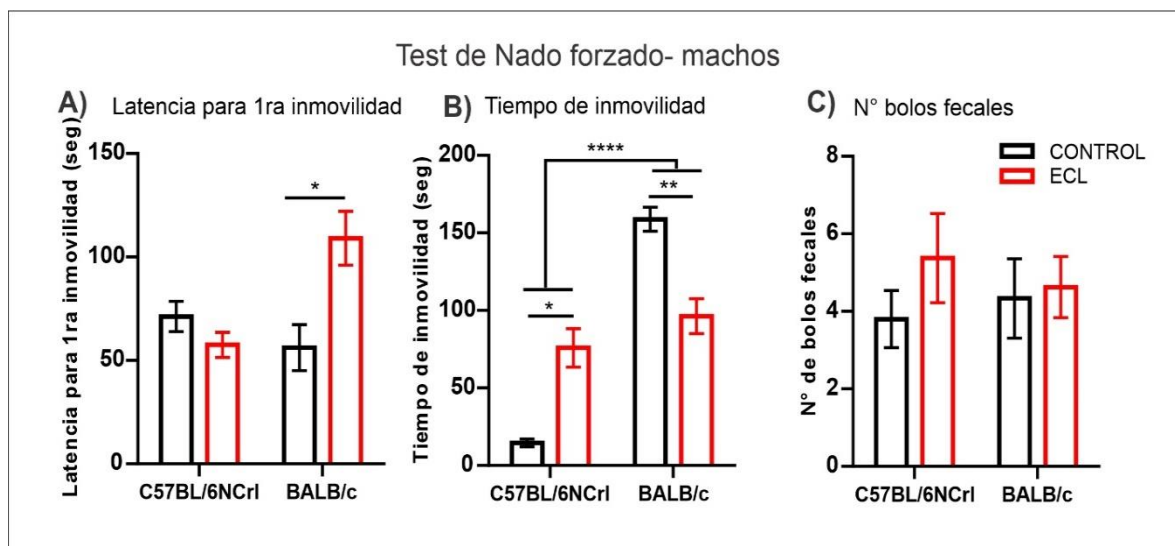
El análisis ANOVA de 2 vías de la latencia para la primera inmovilidad de ratones machos de las cepas C57BL/6Ncr1 y BALB/c mostró una interacción significativa [$F(1, 31) = 5,27; p=0,02$], sin efecto del factor cepa [$F(1, 31) = 1,58; p=0,21$] ni en el protocolo ECL [$F(1, 31) = 1,82; p=0,18$]. Un análisis de *post hoc* de comparaciones múltiples Sidak reveló que,



mientras los ratones machos ECL de la cepa C57BL/6Ncr1 tienen la misma latencia que sus controles, los ratones machos ECL de la cepa BALB/c mostraron un incremento significativo en la latencia para el primer evento de inmovilidad comparado a sus controles (**Figura 8A**). El análisis ANOVA de 2 vías del tiempo de inmovilidad mostró interacción significativa [$F_{(1, 31)} = 20.9; p < 0.0001$] y efecto principal del factor cepa [$F_{(1, 31)} = 37.0; p < 0.0001$] más sin efecto del factor protocolo [$F_{(1, 31)} = 0.002; p = 0.96$] donde la cepa BALB/c independiente del protocolo pasa un mayor tiempo de inmovilidad a comparación de la cepa C57BL/6Ncr1. Un análisis *post hoc* de comparaciones múltiples Sidak reveló que, mientras los ratones machos ECL de la cepa C57BL/6Ncr1 pasan más tiempo en inmovilidad que sus controles, los ratones machos ECL de la cepa BALB/c pasan menos tiempo en inmovilidad que sus controles (**Figura 8B**). Referente al N° de bolos fecales, no se encontró significancia en el factor cepa [$F_{(1, 31)} = 0.009; p = 0.92$], ni en el protocolo ECL [$F_{(1, 31)} = 0.73; p = 0.39$] o interacción [$F_{(1, 31)} = 0.34; p = 0.56$] (análisis ANOVA de vías) (**Figura 8C**).

Figura 8

Efecto del ECL en el Test comportamental de Nado forzado en ratones machos C57BL/6Ncr1 y BALB/c.





*Nota: La latencia para primera inmovilidad en machos (A), el tiempo de inmovilidad en machos (B) y el N° de bolos fecales en machos (C). Los datos mostrados son valores de la media \pm EPM. N=8-9 por grupo. ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$.*

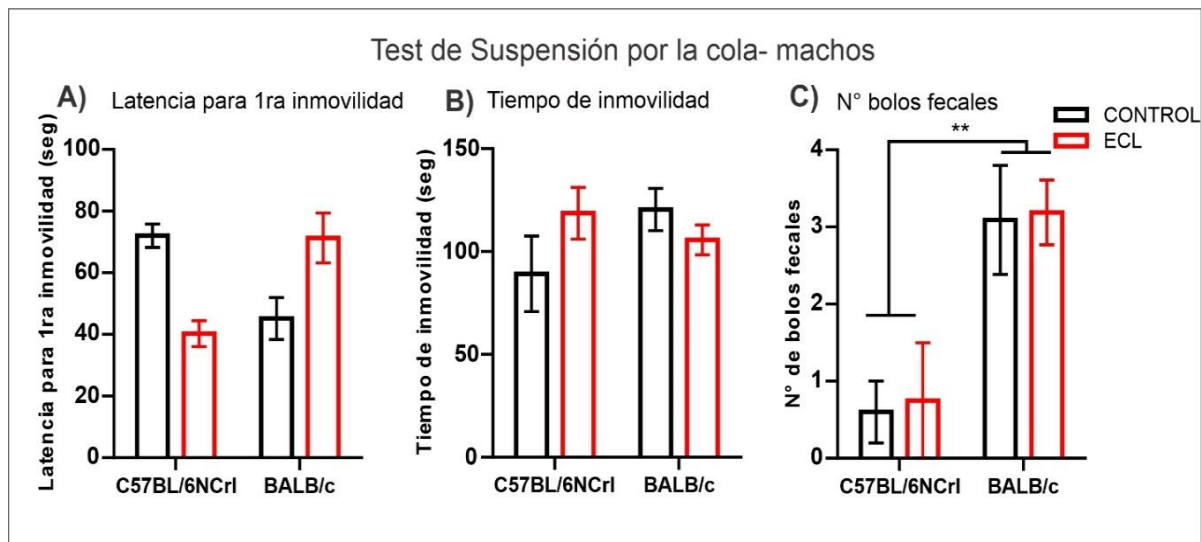
Test de suspensión de cola

Referente al comportamiento tipo depresivo en la prueba de Suspensión de cola, el cual se evaluó en la cuarta semana de aplicación del protocolo Estrés crónico leve, el análisis ANOVA de dos vías de la latencia para el primer evento de inmovilidad en ratones machos de las cepas C57BL/6Ncr1 y BALB/c, mostró interacción significativa [$F(1, 56) = 4,78; p=0,04$] sin efectos del factor cepa [$F(1, 56) = 0,02; p=0,87$] y del protocolo ECL [$F(1, 56) = 0,04; p=0,83$]. Aunque la latencia para el primer evento de inmovilidad de los ratones machos ECL de la cepa C57BL/6Ncr1 tiende a ser menor que su control y que la latencia de los ratones machos ECL de la cepa BALB/c tiende a ser mayor que su control, el análisis post hoc de Sidak no reveló diferencias significativas entre los grupos (**Figura 9A**). Concerniente al tiempo de inmovilidad, el análisis ANOVA de 2 vías no mostró efecto principal del factor cepa [$F(1, 56) = 0,45; p=0,50$], protocolo ECL [$F(1, 56) = 0,29; p=0,59$] o interacción [$F(1, 56) = 2,63; p=0,11$] (**Figura 9B**). El análisis estadístico del N° de bolos fecales mostró significancia en el factor cepa [$F(1, 52) = 10,6; p=0,001$], sin efecto principal del protocolo ECL [$F(1, 52) = 0,02; p=0,87$] o interacción [$F(1, 52) = 0,001; p=0,97$] donde los BALB/c

tuvieron mayor N° de bolos fecales a comparación de la cepa C57BL/6Ncr1 independiente del protocolo (**Figura 9C**).

Figura 9

Efecto del ECL en el Test comportamental de Suspensión de cola en ratones machos C57BL/6Ncr1 y BALB/c.



*Nota: La latencia para primera inmovilidad en machos (A), el tiempo de inmovilidad en machos (B) y el N° de bolos fecales en machos (C). Los datos mostrados son valores de la media \pm EPM. N=8-9 por grupo. ** $p < 0.01$*

Splash test

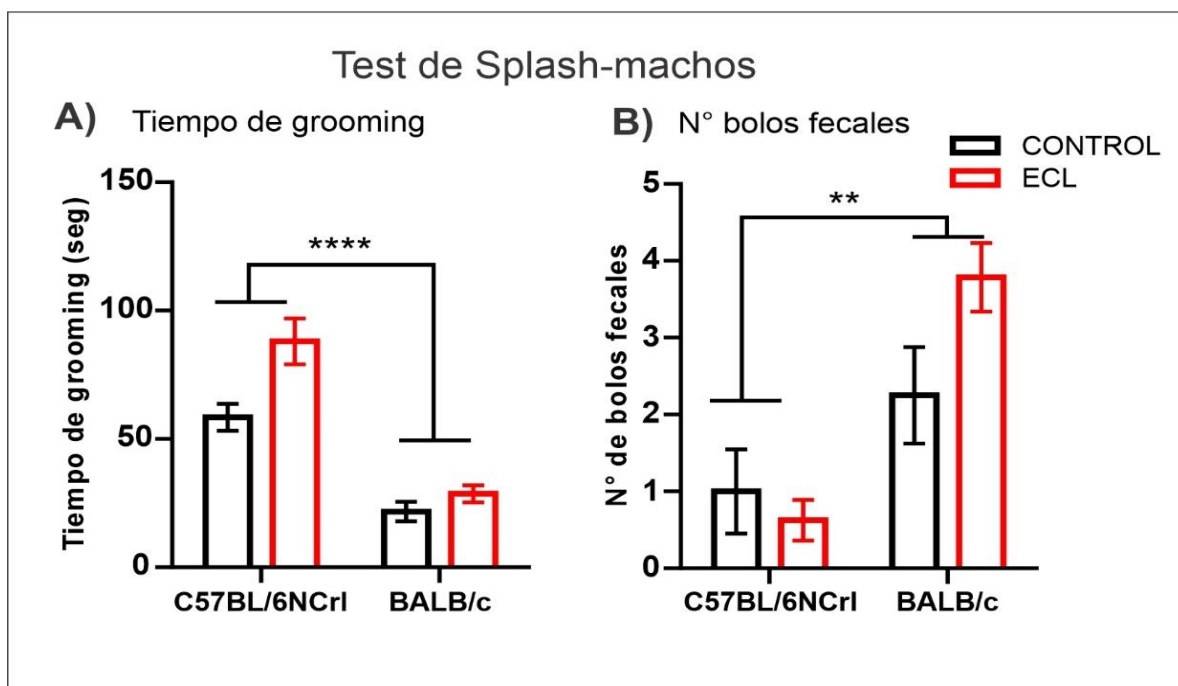
Referente al comportamiento de apatía en la prueba de Splash Test, se evaluó en la tercera semana de aplicación del protocolo Estrés crónico leve, el análisis ANOVA de 2 vías del tiempo de acicalamiento (*grooming*) en ratones machos de las cepas C57BL/6Ncr1 y BALB/c mostró un efecto principal del factor cepa [$F(1, 58) = 56,6; p < 0,0001$] y un efecto principal del factor protocolo ECL [$F(1, 58) = 8,18; p = 0,005$] aunque sin interacción significativa [$F(1, 58) = 3,16; p = 0,08$], donde los ratones machos de la cepa BALB/c muestran un mayor tiempo de grooming que los ratones machos de la cepa C57BL/6Ncr1, independiente del protocolo. Así mismo, los ratones ECL tienden a mostrar un mayor tiempo



de grooming que los ratones controles, independiente de la cepa (**Figura 10A**). Esto sugiere que los ratones de la cepa BALB/c muestran un perfil de menor grooming que los ratones de la cepa C57BL/6Ncr1 y que la exposición al protocolo ECL incrementa este perfil de acicalamiento, con una mayor tendencia en la cepa C57BL/6Ncr1. Concerniente al N° de bolo fecales, el análisis ANOVA de 2 vías mostró un efecto significativo del factor cepa [$F(1, 58) = 7,93; p=0,006$], sin efecto en el protocolo ECL [$F(1, 58) = 0,54; p=0,46$] o interacción [$F(1, 58) = ,48; p=0,22$] donde los BALB/c tuvieron mayor N° de bolos fecales a comparación de la cepa C57 independiente del protocolo. (**Figura 10B**).

Figura 10

Efecto del ECL en Splash Test en ratones machos C57BL/6Ncr1 y BALB/c.



*Nota: Tiempo de Grooming en ratones machos (A), y N° de bolos fecales en machos (B). Los datos mostrados son valores de la media \pm EPM. N=8-9 por grupo. ** $p<0.01$, **** $p<0.0001$.*



4.9. Resultados del Octavo objetivo específico:

El octavo objetivo de este estudio fue establecer el efecto del estrés crónico leve sobre los comportamientos tipo depresivos en los ratones hembras según la cepa. Para esto se evaluó la prueba de nado forzado al inicio de la cuarta semana de aplicación del protocolo Estrés crónico leve.

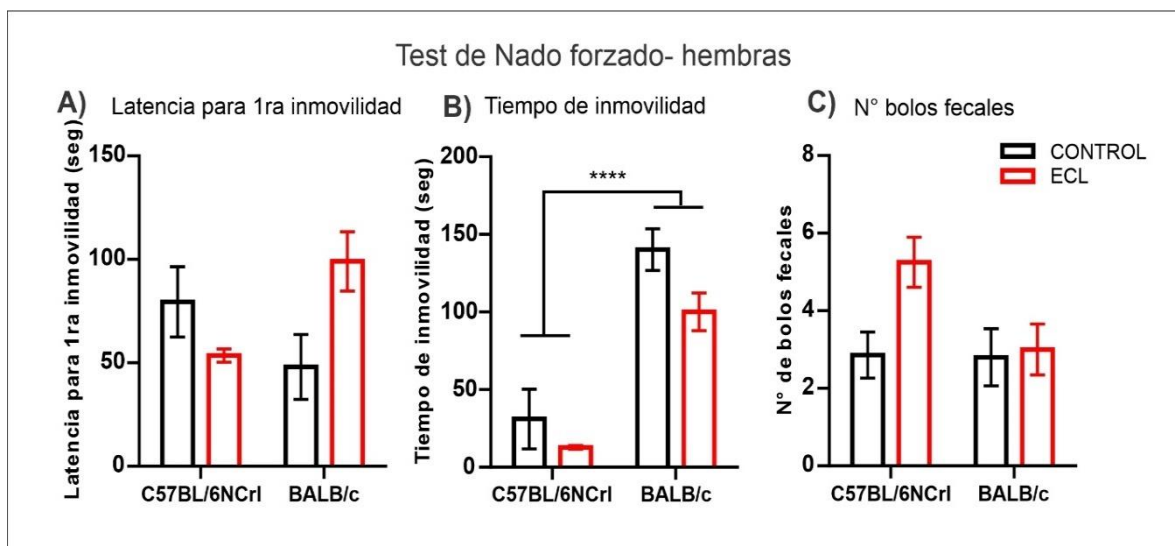
Test de nado forzado

El análisis de ANOVA de 2 vías de la latencia para el primer evento de inmovilidad en ratones hembras de las cepas C57BL/6Ncr1 y BALB/c mostró una interacción significativa [$F(1, 24) = 8,54; p=0,007$], sin efecto del factor cepa [$F(1, 24) = 0,55; p=0,46$], ni del protocolo ECL [$F(1, 24) = 1,27; p=0,27$]. El análisis *post hoc* de comparaciones múltiples Sidak no reveló diferencias significativas entre los grupos, aunque se observa una tendencia de los ratones C57 expuestas al protocolo tienden a reducir y los BALB tienden a incrementar la latencia para 1era inmovilidad comparado con sus controles (**Figura 11A**). El análisis de ANOVA de vías del tiempo de inmovilidad en ratones hembras de las cepas C57BL/6Ncr1 y BALB/c mostró un efecto significativo en el factor cepa [$F(1, 24) = 56,9; p<0,0001$] y en el factor protocolo ECL [$F(1, 24) = 5,00; p=0,03$] pero sin significancia en la interacción [$F(1, 24) = 0,70; p=0,41$], donde los ratones de la cepa BALB/c permanecen más tiempo en inmovilidad que los ratones de la cepa C57BL/6Ncr1, independiente del protocolo. Además, la exposición al protocolo ECL tiende a reducir el tiempo de inmovilidad de los ratones, independiente de la cepa (**Figura 11B**). Concerniente al N° de bolos fecales, el análisis ANOVA de 2 vías no mostró significancia en los factores cepa [$F(1, 24) = 2,94; p=0,09$], protocolo ECL [$F(1, 24) = 3,72; p=0,06$] o interacción [$F(1, 24) = 2,66; p=0,11$], mientras que los ratones BALB/c expuestas al protocolo no incrementa el n° de bolos fecales comparado

con sus controles, sin embargo, los C57BL/6Ncr1 expuestos a protocolo incrementan su N° de bolos fecales comparado a sus controles (**Figura 11C**).

Figura 11

Efecto del ECL en el Test comportamental de Nado forzado en ratones hembras C57BL/6Ncr1 y BALB/c.



*Nota: La latencia para primera inmovilidad en hembras (A), el tiempo de inmovilidad en hembras (B) y el N° de bolos fecales en hembras (C). Los datos mostrados son valores de la media \pm EPM. N=8-9 por grupo. ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$.*

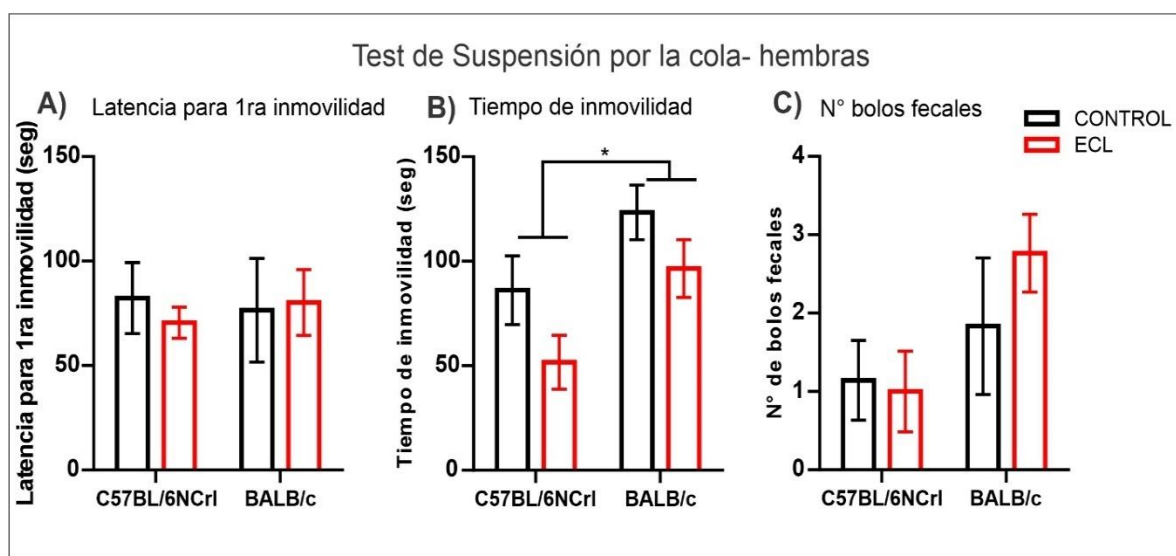
Test de suspensión de cola

Referente al comportamiento tipo depresivo en la prueba de Suspensión de cola, se evaluó en la cuarta semana de aplicación del protocolo Estrés crónico leve. El análisis ANOVA de vías de la latencia para la primera inmovilidad en ratones hembras de las cepas C57BL/6Ncr1 y BALB/c, no mostró significancia en los factores cepa [$F(1, 33) = 0,009$; $p = 0,92$], protocolo ECL [$F(1, 33) = 0,039$; $p > 0,84$] o interacción [$F(1, 33) = 0,14$; $p = 0,70$] (**Figura 12A**). En el tiempo de inmovilidad, el análisis estadístico mostró significancia en los factores cepa [$F(1, 33) = 5,79$; $p = 0,02$], pero no protocolo ECL [$F(1, 33) = 3,23$; $p = 0,08$]

o interacción [$F(1,33) = 0,04; p=0,82$], donde los BALB, pasan mayor tiempo de inmovilidad a comparación de los C57 independiente del protocolo. Así mismo los ratones de ambas cepas expuestos a protocolo tienden a reducir su tiempo de inmovilidad comparado a sus controles (**Figura 12B**). Referente al N° de bolos fecales no se halló significancia en los factores Cepa [$F(1,32) = 3.31; p=0.07$], Protocolo ECL [$F(1,32) = 0.34; P=0.56$] e Interacción [$F(1,32) = 0.63; p=0.43$], sin embargo, se muestra una tendencia que los ratones de la cepa BALB/c tienen mayor N° de bolos fecales comparado con la cepa C57BL/6Ncr1 (**Figura 12C**).

Figura 12

Efecto del ECL en el Test comportamental de Suspensión de cola en ratones hembras C57BL/6Ncr1 y BALB/c.



*Nota: La latencia para primera inmovilidad en hembras (A), el tiempo de inmovilidad en hembras (B) y el N° de bolos fecales en hembras (C). Los datos mostrados son valores de la media \pm EPM. N=8-9 por grupo. ** $p<0.01$*

Splash Test

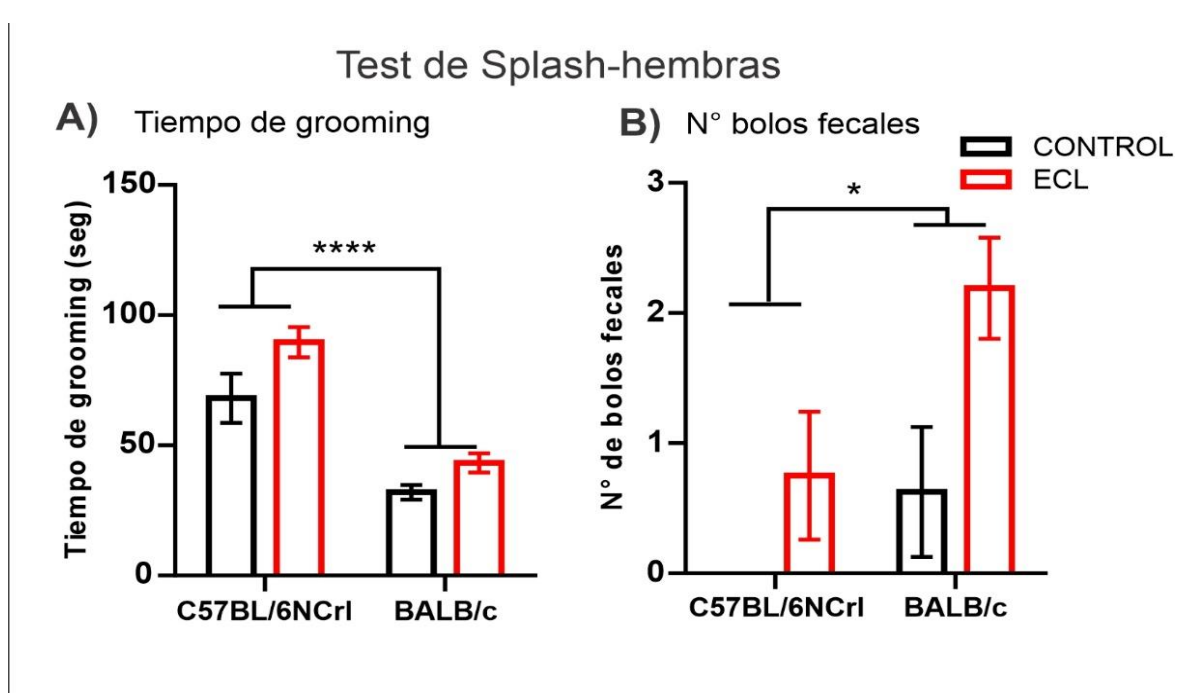
Referente al comportamiento de apatía en la prueba de Splash Test, se evaluó en la tercera semana de aplicación del protocolo Estrés crónico leve. El análisis ANOVA de 2 vías



del tiempo de Grooming en ratones hembras de las cepas C57BL/6NcrI y BALB/c, mostró un efecto principal del factor cepa [$F(1, 40) = 52,35; p < 0,0001$] y del factor protocolo ECL [$F(1, 40) = 8,25; p = 0,006$] pero no se encontró interacción [$F(1, 40) = 0,80; p = 0,37$], donde los ratones hembra de la cepa BALB/c pasan menos tiempo en grooming que los ratones hembras de la cepa C57BL/6NcrI, independiente del protocolo. Además, la exposición al protocolo ECL induce un incremento en el tiempo grooming independiente de la cepa (**Figura 13A**). El análisis estadístico del N° de bolos fecales mostró significancia en los factores cepa [$F(1, 40) = 4,27; p = 0,04$], y en el protocolo ECL [$F(1, 40) = 5,37; p = 0,02$] pero sin significancia en la Interacción [$F(1, 40) = 0,66; p = 0,41$], donde los BALB tuvieron mayor N° de bolos fecales independiente del protocolo, así mismo la exposición al protocolo incremento el N° de bolos fecales en ambas cepas (**Figura 13B**).

Figura 13

Figura 13. Efecto del ECL en Splash Test en ratones hembras C57BL/6NcrI y BALB/c.



Nota: Tiempo de Grooming en ratones hembras (A), y N° de bolos fecales en hembras (B). Los datos mostrados son valores de la media \pm EPM. N=8-9 por grupo. ** $p < 0.01$, **** $p < 0.0001$.



CAPÍTULO V

DISCUSIÓN

5.1. Descripción de los hallazgos más relevantes y significativos

El objetivo principal de este estudio fue determinar de qué manera el estrés crónico leve influye en los comportamientos tipo ansiosos y depresivos en ratones adultos de dos cepas endogámicas, para esto dos cepas de ratones adultos de ambos sexos fueron sometidos a un protocolo de Estrés Crónico Leve durante 5 semanas. Durante los cuales pasaron por un batería de evaluaciones para determinar comportamientos tipo ansiosos y depresivos, a continuación, se detalla los principales hallazgos de este estudio.

Diferencias basales entre sexo en los comportamientos tipo ansiosos y depresivos

Los hallazgos principales de este estudio fueron que al comparar el desempeño en las pruebas para medir comportamiento tipo ansioso entre ratones machos y hembras de la cepa C57BL/6NCrI, encontramos que las hembras son más ansiosas que los machos cuando fueron evaluados a la caja clara – oscura, las cuales pasan menos tiempo en la caja clara. Estas diferencias de sexo no se encontraron en la prueba de Laberinto elevado en cruz. Por otro lado, no se encontraron diferencias significativas en la comparación de comportamientos tipo ansiosos de ratones machos y hembras de la cepa BALB/c en las pruebas de la caja clara – oscura y de laberinto elevado en cruz. Esto sugiere que existen diferencias de sexo en los comportamientos tipo ansioso basales en los ratones de la cepa C57BL/6NCrI, al menos cuando evaluados mediante el test de la caja clara-oscura, pero estas diferencias basales entre sexos no parecen estar presentes en los ratones de la cepa BALB/c.



Mientras que otras investigaciones previas mencionan que los machos de la cepa C57BL/6J pasaron más tiempo en los brazos abiertos, siendo más exploratorios a comparación de las hembras de la misma cepa. De igual manera los autores refieren que los machos y hembras de la cepa BALB/cJ, tuvieron una actividad locomotora reducida, mostrando mayores niveles de ansiedad, en la prueba de campo abierto (An y otros, 2011). En otro estudio realizado mencionan que las hembras C57BL/6 comparados con otros ratones hembras de la cepa Swiss, tienen un perfil menos ansioso, cuando evaluados en las pruebas de Laberinto elevado en cruz y Respuesta de sobresalto acústico (Nunes y otros, 2018).

En lo referente a las diferencias basales entre sexos en los comportamientos tipo depresivos encontramos que los machos de la cepa C57BL/6NCrI muestran mayores comportamientos depresivos que las hembras de la misma cepa cuando fueron evaluados en la prueba de suspensión por la cola, donde los machos muestran un mayor tiempo de inmovilidad que las hembras. Estas diferencias no se encontraron en el test de nado forzado como tampoco se encontró diferencias entre sexo en el perfil de apatía mediante la evaluación del test de splash. Por otra parte, de la comparación de comportamientos tipo depresivos entre machos y hembras de la cepa BALB/c no se encontró diferencias cuando fueron evaluados en la prueba de nado forzado y suspensión de cola, por el contrario. Sin embargo, la comparación del desempeño en el test de splash mostró que los machos muestran mayores niveles de apatía, pues muestran menor tiempo de acicalamiento a comparación de las hembras BALB/c. Esto resultados sugieren que los ratones de la cepa C57BL/6NCrI y BALB/c muestran diferencias basales entre sexos en los comportamientos tipo depresivos, siendo los machos los que muestran más comportamientos depresivos que las hembras.



Nuestros hallazgos referentes a los comportamientos tipo depresivos son opuestos a otras investigaciones donde mencionan que los machos de las cepas BALB/cJ tienen mayor tiempo de inmovilidad que las hembras de la misma cepa, en la prueba de suspensión de cola, mostrando un mayor fenotipo depresivo (Mineur y otros, 2006)

Diferencias basales entre cepas en los comportamientos tipo ansiosos.

Los hallazgos principales de este estudio fueron que los machos de la cepa C57BL/6NCrI muestran mayores niveles de ansiedad que los machos BALB/c, donde los machos C57BL/6NCrI pasan menos tiempo explorando la caja clara del test de la caja clara-oscuro y realizan menos número de transiciones entre los brazos y pasan menos tiempo en los brazos abiertos en el test de laberinto elevado en cruz en comparación de los ratones machos de la cepa BALB/c. Asimismo, encontramos que las hembras C57BL/6NCrI se muestran más ansiosas que las hembras de la cepa BALB/c, pues las primeras pasan menos tiempo en la caja clara del test de la caja clara-oscuro. Esta diferencia basal entre cepas para las hembras no fue observada en la prueba del laberinto elevado en cruz, donde ambas cepas tienen el mismo perfil de respuesta de ansiedad. De esto se tiene que los machos y hembras de la cepa C57BL/6NCrI muestran mayores comportamientos tipo ansioso que los ratones de la cepa BALB/c.

Nuestros hallazgos son distintos a los reportados en otras investigaciones como Lepicard y otros (2000), quienes encontraron que los ratones de la cepa C57BL/6J presentan una elevada actividad basal y de exploración en un nuevo entorno que los ratones de la cepa BALB/cByJ, lo que sugiere que los primeros tienen un bajo nivel de ansiedad o son menos emocionales que los segundos (Crawley & Davis, 1982). Así mismo, otro estudio ha reportado que la exposición a un nuevo ambiente y a un entorno desconocido provoca



respuestas exageradas en la frecuencia cardiaca y reactividad fisiológica de la BALB/c, los cuales muestran mayores niveles de comportamiento ansioso en comparación con los ratones de la cepa C57BL/6 (Depino & Gross, 2007)

Esta contradicción de nuestros hallazgos con aquellos reportados en la literatura en la que los ratones de la cepa C57BL/6 son los menos ansiosos en comparación con los ratones de la cepa BALB/c, puede ser debido a variaciones genéticas que pueden haber sufrido ambas cepas de ratones utilizados en el estudio de aquellas que originalmente fueron producidas. Futuros trabajos de genotipado serán necesarios para verificar que las cepas de ratones de nuestro estudio conservan aún la genética correspondiente a la cepa BALB/c o C57BL/6N.

Diferencias basales entre cepas en los comportamientos tipo depresivos.

En este estudio encontramos que los ratones machos de la cepa BALB/c tienen mayores niveles de comportamientos tipo depresivos que los machos de la cepa C57BL/6NCrI, pues cuando fueron evaluados en la prueba de Nado forzado los primeros pasan más tiempo inmóviles que los segundos. Asimismo, en la prueba de Splash Test, los ratones machos BALB/c muestran menor tiempo de acicalamiento que los ratones C57BL/6NCrI. Estas diferencias entre cepas no se observaron cuando fueron evaluados en la prueba de suspensión de cola.

Con respecto a las hembras de la cepa BALB/c, estas muestran mayores niveles de comportamientos tipo depresivos a comparación de las hembras de la cepa C57BL/6NCrI. Este perfil fue observado en el test de nado forzado y suspensión de cola, donde las hembras BALB/c muestran mayor tiempo de inmovilidad. Asimismo, en el test de splash, las hembras BALB/c muestran un menor tiempo de acicalamiento comparados con las hembras de la cepa C57BL/6NCrI. Estos resultados sugieren que los ratones machos y hembras de la cepa



BALB/c muestran más comportamientos tipo depresivos basales que los ratones de la cepa C57BL/6NCrI.

5.2. Comparación crítica con la literatura

Estudios previos han reportado que los ratones de la cepa C57BL/6J machos y hembras pasan más tiempo en los brazos abiertos de la prueba de laberinto elevado en cruz en comparación con los ratones de la cepa BALB/cJ machos y hembras. Estos resultados indican que los ratones de la cepa C57BL/6J tienen un fenotipo menos ansioso que la BALB/cJ. Mineur y otros. (2006). Nuestros resultados son contradictorios con este hallazgo previos, pues en nuestro estudio los machos de la cepa C57BL/6NCrI muestran mayores niveles de ansiedad que los machos BALB/c. Asimismo, en nuestro estudio, las hembras de la cepa C57BL/6NCrI se mostraron más ansiosas que los machos de la misma cepa cuando fueron evaluados a la caja clara – oscura pero no se encontraron diferencias en la prueba de Laberinto elevado en cruz. Este resultado contradice hallazgos previos, en los que las hembras de la cepa C57BL/6NCrI han sido descritas con bajos niveles de comportamiento ansioso comparadas con los machos de la misma cepa (Nunes y otros, 2018). No obstante, cuando evaluados en la prueba de laberinto elevado en cruz, los machos de la cepa C57BL/6J pasan más tiempo en los brazos abiertos, siendo más exploratorios a comparación de las hembras de la misma cepa (An y otros, 2011)

Estas discrepancias en nuestros hallazgos con la literatura pueden ser debido a muchos factores entre los que pueden estar las variaciones del genotipo debido a las diferencias de las subcepas C576BL/NcrI, ya que parece ser que las subcepas de los ratones C57 pueden variar en la expresión de sus niveles de angiotensina II tipo 1 (AT₁), donde las subcepas que muestran niveles más altos de receptores, presentarías fenotipos más ansiosos



en comparación con las subcepas que presentan menores niveles de expresión de estos receptores (Golding y otros, 2011)

Efectos del estrés crónico en los comportamientos tipo ansiosos.

En nuestra investigación encontramos que los ratones macho de las cepas C57BL/6NCrI y BALB/c expuestos al protocolo ECL redujeron sus comportamientos tipo ansiosos en comparación de sus controles. Específicamente, los ratones expuestos al protocolo ECL se mostraron más exploratorios de lugares abiertos e iluminados como el del test de la caja clara oscura. Este efecto no se encontró en la evaluación del test de laberinto elevado en cruz en ninguna de las cepas. Por otro lado, no se observó efecto del protocolo ECL en los comportamientos tipo ansioso de las hembras de ninguna de las cepas. Estos resultados sugieren que los ratones macho de las cepas C57BL/6NCrI y BALB/c son resilientes a los efectos crónicos del ECL en los comportamientos tipo ansiosos y que los comportamientos tipo ansiosos de las hembras de ambas cepas no son sensibles de alteración por los efectos del ECL.

Nuestros hallazgos son similares a otro estudio respecto al efecto del protocolo induciendo mejores mecanismos de afrontamiento en las cepas, donde los autores refieren que las hembras de la cepa C57BL/6 que pasaron por el protocolo fueron más activas y realizaron un mayor recorrido en la prueba de Laberinto elevado en cruz, de igual manera se evidencio un aumento de la actividad locomotora tanto en machos y hembras en la prueba de campo abierto, estos resultados refieren que las hembras fueron más activas expuestas a estresor (Karisetty y otros, 2017).



Efectos del estrés crónico en los comportamientos tipo depresivos

En nuestra investigación encontramos que los ratones machos, pero no las hembras de la cepa C57BL/6NCrI expuestos al protocolo ECL incrementaron sus comportamientos tipo depresivos en comparación que sus controles. Específicamente, si bien la exposición al protocolo ECL redujo los niveles de apatía (test de splash) en los ratones machos y hembras de la cepa C57BL/6NCrI en comparación con sus respectivos controles, los machos ECL de esta cepa incrementaron y las hembras redujeron sus niveles de inmovilidad en el test nado forzado. Por otro lado, los ratones machos y hembras de la cepa BALB/c expuestos al protocolo ECL redujeron considerablemente sus niveles de inmovilidad en el test de nado forzado, así como su comportamiento de apatía (test de splash) en comparación con sus controles. En el test de Suspensión de cola no se encontró ningún efecto del protocolo para los comportamientos depresivos en ambas cepas.

Estos resultados sugieren que los machos, pero no las hembras de la cepa C57BL/6NCrI son más vulnerables a los efectos crónicos del ECL en los comportamientos tipo depresivos comparado con los ratones de la cepa BALB/c, mientras que estos últimos parecen ser resilientes a estos efectos, independiente del sexo. Resultados similares al nuestro han sido previamente reportados, en la que ratones de las cepas BALB/c y C57BL/6J expuestos al protocolo ECL y evaluados en las pruebas comportamentales de suspensión de cola y natación forzada no mostraron alteraciones en sus comportamientos tipo depresivos (Tsuchimineya y otros, 2020). Así mismo otro estudio no encontraron ningún efecto significativo del ECL en los comportamientos tipo de depresivos para la cepa C57BL/6J (Palucha y otros, 2020). Sin embargo, los mismos autores han reportado que la exposición al ECL, induce una reducción en el número de acicalamientos en los ratones de la cepa de



ratones C57BL/6J, que es un comportamiento relacionado con la apatía (Palucha y otros, 2020)

Estas diferencias en los resultados para la exposición al ECL podrían ser debido a variaciones genéticas, ya mencionadas más arriba, así como a las condiciones de alojamiento y las condiciones de evaluación usados entre los estudios.

5.3. Limitaciones del estudio

Nuestra investigación muestra que el protocolo ECL no afecta en la dirección esperada los comportamientos tipo ansiosos y depresivos de los ratones de las cepas C57BL/6NCr1 y BALB/c, por lo que consideramos que hubo factores implicados como la edad de los ratones de la cepa C57BL/6NCr1 que fue distinta al de los ratones de la cepa BALB/c, los C57BL/6NCr1 eran más adultos que los BALB/c. De igual manera no hay un estudio adecuado sobre la variabilidad del genotipo en las cepas, esto comprobaría si las cepas utilizadas en el estudio aún conservan su linaje predeterminado.

Finalmente, es posible que los ratones debido a otros estresores puedan haberse adaptado de mejor manera, mostrando conductas resilientes como las que encontramos al exponerlos al protocolo ECL.

5.4. Implicancias del estudio

Este estudio, muestra que la exposición a Estrés crónico leve no incrementa los comportamientos tipo ansiosos en las cepas C57BL/6NCr1 y BALB/c, pero incrementa el comportamiento tipo depresivos de los ratones machos de la cepa C57BL/6NCr1. Estos hallazgos no fueron los esperados, pues nuestra hipótesis era que aquella cepa descrita como más ansiosa y reactiva a los estresores, es decir los ratones de la BALB/c, fueran más



vulnerables a los efectos del ECL, pero nuestros hallazgos han mostrado que la exposición a este tipo de estresor crónico incrementa los comportamientos exploratorios en esta cepa de ratones, sugiriendo respuestas resilientes. Consideramos que, el protocolo ECL podría ser usado en este tipo de cepas de ratones para ver la relación que existe con los comportamientos resilientes y los mecanismos neurobiológicos involucrados en este tipo de respuestas.



CONCLUSIONES

Primera conclusión: El ECL no indujo alteraciones en los comportamientos tipo ansioso tanto en machos y hembras de las cepas C57BL/6NCrI

Segunda conclusión: El ECL redujo los niveles de ansiedad de manera semejantes en los ratones macho y hembras de la cepa BALB/c.

Tercera conclusión: El ECL incrementó los comportamientos tipo depresivos de los ratones macho de la cepa C57BL/6NCrI pero no alteró el de las hembras de la misma cepa expuestas al ECL.

Cuarta conclusión: El ECL redujo de manera semejante los comportamientos tipo depresivos de ratones macho y hembras de la cepa BALB/c.

Quinta conclusión: Los comportamientos tipo ansiosos de los ratones machos de ambas cepas son resilientes a los efectos crónicos del ECL.

Sexta conclusión: Los comportamientos tipo ansiosos de ratones hembra de las cepas C57BL/6NCrI y BALB/c no fueron afectados por la exposición al ECL.

Séptima conclusión: Los comportamientos tipo depresivos de los ratones machos de la cepa C57BL/6NCrI fueron incrementados por la exposición al ECL, mientras que los comportamientos tipo depresivos de los ratones machos de la cepa BALB/c fueron reducidos, sugiriendo un efecto resiliente del ECL en estos últimos.

Octava conclusión: Los comportamientos tipo depresivo de ratones hembras de ambas cepas expuestas al protocolo ECL fueron reducidos, sugiriendo también un efecto resiliente dependiente del sexo.



REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Albert, P. (2015). Why is depression more prevalent in women? *J Psychiatry Neurosci*, 40(4), 219-221. <https://doi.org/https://doi.org/10.1503/jpn.150205>
- American Psychiatric Association. (2013). *DSM-5. United States: American Psychiatric*.
- An, X., Zou, J., Wu, R., Yang, Y., Tai, F., Zeng, S., Jia, R., Zhang, X., Liu, E., & Broders, H. (2011). Strain and Sex Differences in Anxiety-Like and Social Behaviors in C57BL/6J and BALB/cJ Mice. *Exp. Anim.*, 60(2), 111-123. https://www.jstage.jst.go.jp/article/expanim/60/2/60_2_111/_pdf
- Avshalom, C., Karen, S., Moffit, T., Taylos, A., Craig, I., Harrington, H., Mcclay, J., Molino, J., Martín, J., Braithwaitey, A., & Poulton, R. (2003). Influencia del estrés vital en la depresión: moderación por un polimorfismo en el gen 5-HTT. *Gene. Science*, 301(5631), 386-389. <https://doi.org/https://doi.org/10.1126/science.1083968>.
- Beck, A. (2008). The Evolution of the Cognitive Model of Depression. *Am J Psychiatry*, 165(8), 969-977. <https://doi.org/https://doi.org/10.1176/APPI.AJP.2008.08050721>
- Bogdanova, O., Kanekar, S. K., & Renshaw, P. (2013). Factors influencing behavior in the forced swim test. *Physiology & behavior*, 118, 227-239. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2013.05.012>
- Bourin, M., & Hascoët, M. (2003). The mouse light/dark box test. *European Journal of Pharmacology*, 463(1-3), 55-65. [https://doi.org/https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0014-2999\(03\)01274-3](https://doi.org/https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0014-2999(03)01274-3)
- Butelman, E., McElroy, B., Priszano, T., & Kreek, M. (2019). Impact of pharmacological manipulation of the κ -opioid receptor system on self-grooming and anhedonic-like behaviors in male mice. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 370(1), 1-8. <https://doi.org/10.1124/JPET.119.256354>



- Campos, A., Fogaca, M., Aguiar, D., & Guimaraes, F. (2013). Animal models of anxiety disorders and stress. *Revista Brasileira de Psiquiatria*, 35(2), 101-111. <https://doi.org/https://doi.org/10.1590/1516-4446-2013-1139>
- Chandrasekhar, K., Kapoor, J., & Anishetty, S. (2012). A prospective, randomized double-blind, placebo-controlled study of safety and efficacy of a high-concentration full-spectrum extract of Ashwagandha root in reducing stress and anxiety in adults. *Indian Journal of Psychological Medicine*, 3(255-262), 34. <https://doi.org/https://doi.org/10.4103/0253-7176.106022>
- Charney, D. (2004). Psychobiological Mechanisms of Resilience and Vulnerability: Implications for Successful Adaptation to Extreme Stress. *Psychiatry*, 161(2), 195-216. <https://doi.org/https://doi.org/10.1176/appi.ajp.161.2.195>
- Clark, D., & Beck, A. (2010). Cognitive theory and therapy of anxiety and depression: Convergence with neurobiological findings. *Trends in Cognitive Sciences*, 14(9), 418-424. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/J.TICS.2010.06.007>
- Colodro, L., Couvy, B., Zhu, G., Coventry, W., Byrne, E., Gordon, S., Wright, M., Montgomery, G., Madden, P., Ripke, S., & Aleros, L. (2018). A direct test of the diathesis-stress model for depression. *Molecular psychiatry*. *Molecular psychiatry*, 23(7), 1590–1596. <https://doi.org/https://doi.org/10.1038/mp.2017.130>
- Crawley, N., & Davis, L. (1982). Baseline exploratory activity predicts anxiolytic responsiveness to diazepam in five mouse strains. *Brain Research Bulletin*, 8(6), 609-612. [https://doi.org/https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0361-9230\(82\)90087-9](https://doi.org/https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0361-9230(82)90087-9)
- Cryan, J., Mombereau, C., & Vassout, A. (2005). The tail suspension test as a model for assessing antidepressant activity: review of pharmacological and genetic studies in mice. *Neurosci Biobehav Rev*, 29(4-5), 571-625. <https://doi.org/doi:10.1016/j.neubiorev.2005.03.009>
- Daly, M., Sutin, A., & Robinson, E. (2020). Longitudinal changes in mental health and the COVID-19 pandemic: evidence from the UK Household Longitudinal Study. *Psychological Medicine*, 52, 2549–2558. <https://doi.org/https://doi.org/10.1017/S0033291720004432>



- Davidson, K., Rieckmann, N., & Lespérance, F. (2004). Psychological theories of depression: potential application for the prevention of acute coronary syndrome recurrence. *Psychosomatic medicine*, *66*(2), 165–173. <https://doi.org/https://doi.org/10.1097/01.psy.0000116716.19848.65>
- Dean, J., & Keshavanb, M. (2017). Accepted Manuscript Title: The Neurobiology of Depression: an Integrated View. *Asian Journal of Psychiatry*, *27*(1876-2018), 101-111. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ajp.2017.01.025>
- Depino, A., & Gross, C. (2007). Simultaneous assessment of autonomic function and anxiety-related behavior in BALB/c and C57BL/6 mice. *Behavioural Brain Research*, *177*(2), 254-260. <https://doi.org/https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bbr.2006.11.025>
- Diez-Canseco, F., Ipince, A., Toyama, M., Benate, Y., Galán, E., Medina, J., D. S., Araya, R., & Miranda, J. (2014). Integration of mental health and chronic non-communicable diseases in Peru: challenges and opportunities for primary care settings. *Rev Peru Med Exp Salud Publica*, *31*(1), 131-136. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24718538/>
- Ducottet, C., & Belzung, C. (2005). Correlations between behaviours in the elevated plus-maze and sensitivity to unpredictable subchronic mild stress: Evidence from inbred strains of mice. *Behavioural Brain Research*. *Psychobiologie des Emotions*, *156*(1), 153-162. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bbr.2004.05.018>.
- Feder, A., Nestler, E., & Charney, D. (2009). Psychobiology and molecular genetics of resilience. *Nature Reviews Neuroscience*, *10*(6), 446-457. <https://doi.org/https://doi.org/10.1038/nrn2649>
- Flint, J., & Kendler, K. (2014). La genética de la depresión mayor. *Neuron*, *81*(3), 484-503.
- GBD 2019 Mental Disorders Collaborators. (2022). Global, regional, and national burden of 12 mental disorders in 204 countries and territories, 1990-2019: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. *The lancet. Psychiatry*, *9*(2), 137–150. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S2215-0366\(21\)00395-3](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S2215-0366(21)00395-3)



- Golding, B., Overall, A., & Gard, P. (2011). Strain differences and the role of AT(1) receptor expression in anxiety. *Int J Mol Epidemiol Genet*, 1(2), 51-55. <https://doi.org/https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21537401/>
- Hernández, R., & Mendoza, P. (2018). *Metodología de la investigación: Las rutas cuantitativa, cualitativa y mixta* (Primera ed.). McGraw-Hill Interamericana Editores, S.A. de C.V.
- Karisetty, B., Pranav, J., & Arvind Kumar, S. C. (2017). Sex differences in the effect of chronic mild stress on mouse prefrontal cortical BDNF levels: A role of major ovarian hormones. *Neuroscience*, 356(0306-4522), 89-101. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2017.05.020>
- Kessler, R. (1997). The effects of stressful life events on depression. *Annual review of psychology*, 48, 191-214. <https://doi.org/https://doi.org/10.1146/annurev.psych.48.1.191>
- Komada, M., Takao, K., & Miyakawa, T. (2008). Elevated plus maze for mice. *Pub Med. gov*, 22(1088). <https://doi.org/https://doi.org/doi:10.3791/1088>
- Kraeuter, A., Guest, P., & Sarnyai, Z. (2019). The Y-Maze for Assessment of Spatial Working and Reference Memory in Mice. *Methods in molecular biology*, 1916, 105-111. https://doi.org/https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8994-2_10
- Kuehner, C. (2003). Gender differences in unipolar depression: An update of epidemiological findings and possible explanations. *Acta Psychiatrica Scandinavica*, 108(3), 163-174. <https://doi.org/https://doi.org/10.1034/J.1600-0447.2003.00204.X>
- Kuehner, C. (2017). Why is depression more common among women than among men? *In The Lancet Psychiatry*, 4(2), 146-158. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S2215-0366\(16\)30263-2](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S2215-0366(16)30263-2)
- Lang, U., & Borgwardt, S. (2013). Molecular Mechanisms of Depression: Perspectives on New Treatment Strategies. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 31, 761-777. <https://doi.org/https://doi.org/https://doi.org/10.1159/000350094>
- Lepicard, E., Venault, P., Pérez, F., Joubert, C., Berthozb, A., & Chapouthier, G. (2000). Balance control and posture differences in the anxious BALB/cByJ mice compared to the non anxious C57BL/6J mice. *Behavioural Brain Research*,



117(1-2), 185-195. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0166-4328\(00\)00304-1](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0166-4328(00)00304-1).

Levy, R., & Dubois, B. (2006). Apathy and the functional anatomy of the prefrontal cortex-basal ganglia circuits. *Cereb Cortex*, 16(7), 916-928. <https://doi.org/DOI:10.1093/cerca/bhj043>

Martina, M. A., Miguel, Gutiérrez, C., Nolberto, V., & Piscocoya, J. (2017). Depresión y factores asociados en la población peruana adulta mayor según la ENDES 2014-2015. *Anales de la Facultad de Medicina*, 78(4), 393-397. <https://doi.org/https://dx.doi.org/10.15381/anales.v78i4.14259>

Massart, R., & Mongeau, R. L. (2012). Beyond the monoaminergic hypothesis: neuroplasticity and epigenetic changes in a transgenic mouse model of depression. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 367(1601), 2485–2494. <https://doi.org/https://doi.org/10.1098/rstb.2012.0212>

McEwen, B. (2003). Mood disorders and allostatic load. *Biological Psychiatry*, 54(3), 200-207. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0006-3223\(03\)00177-X](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0006-3223(03)00177-X)

Mineur, Y., Belzung, C., & Crusio, W. (2006). Effects of unpredictable chronic mild stress on anxiety and depression-like behavior in mice. *Effects of unpredictable chronic mild stress on anxiety and depression-like behavior in mice*, 175(1), 43-50. <https://doi.org/https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bbr.2006.07.029>

Montgomery, K. (1955). The relation between fear induced by novel stimulation and exploratory drive. *Revista de psicología comparativa y fisiológica*, 48(4), 254-260. <https://doi.org/https://doi.org/https://doi.org/10.1037/h0043788>

Mozhui, K., Karlsson, R., Kash, T., Ihne, J., Norcross, M., Patel, S., Farrell, M., Hill, E., Graybeal, C., Martin, K., Camp, M., Fitzgerald, P., Ciobanu, D., Sprengel, R., Mishina, M., & Wellman, C. (2010). Strain differences in stress responsivity are associated with divergent amygdala gene expression and glutamate-mediated neuronal excitability. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 30(15), 5357–5367. <https://doi.org/https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5017-09.2010>



- Nunes, R. B., Da-Silva, E., & Monteiro, T. (2018). Distinctive stress sensitivity and anxiety-like behavior in female mice: Strain differences matter. *Neurobiology of Stress*, 9, 55-63. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ynstr.2018.08.002>
- Palucha, A., Podkowa, C., Rafał, A., Brański, P., & Burnat, G. (2020). The influence of the duration of chronic unpredictable mild stress on the behavioural responses of C57BL/6J mice. *Behavioural Pharmacology*, 31(6), 574-582. https://doi.org/https://journals.lww.com/behaviouralpharm/Fulltext/2020/09000/The_influence_of_the_duration_of_chronic.7.aspx
- Pérez, Arlene, Cervantes, M., Hijuelos, A., Pineda, C., & Salgado, H. (2017). Prevalencia, causas y tratamiento de la depresión mayor. *Revista biomédica*, 28(2), 73-98. <https://doi.org/https://doi.org/10.32776/revbiomed.v28i2.557>
- Planchez, B., Surget, A., & Belzung, C. (2019). Animal models of major depression: drawbacks and challenges. *Journal of neural transmission*, 126(11), 1383–1408. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s00702-019-02084-y>
- Porsolt, R., Brossard, G., Hautbois, C., & Roux, S. (2001). Rodent Models of Depression: Forced Swimming and Tail Suspension Behavioral Despair Tests in Rats and Mice. *Current Protocols in Neuroscience*, , 14(1), 8-10. <https://doi.org/https://doi.org/https://doi.org/10.1002/0471142301.ns0810as14>
- Prins, J., Olivier, B., & Korte, M. (2011). Triple reuptake inhibitors for treating subtypes of major depressive disorder: the monoamine hypothesis revisited. *Expert opinion on investigational drugs*, 20(8), 1107–1130. <https://doi.org/https://doi.org/10.1517/13543784.2011.594039>
- Razzoli, M., Carboni, L., Andreoli, M., Ballottari, A., & Arbán, R. (2011). Different susceptibility to social defeat stress of BalbC and C57BL6/J mice,. *Neurosciences CEDD*, 216(1), 100-108. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bbr.2010.07.014>.
- Robins, C., & Block, P. (1989). Cognitive theories of depression viewed from a diathesis-stress perspective: Evaluations of the models of Beck and of Abramson, Seligman, and Teasdale. *Cognitive Therapy and Research*, 13(4), 297-313. <https://doi.org/10.1007/BF01173475>



- Rodgers, R., & Dalvi, A. (1997). Anxiety, defence and the elevated plus-maze. *Neuroscience and biobehavioral reviews*, 21(6), 801–810. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/s0149-7634\(96\)00058-9](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/s0149-7634(96)00058-9)
- Ross, R., Foster, S., & Ionescu, D. (2017). The Role of Chronic Stress in Anxious Depression. *Chronic Stress*, 1, 1-10. <https://doi.org/https://doi.org/10.1177/2470547016689472>
- Rutter, M. (2007). Implications of Resilience Concepts for Scientific Understanding. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1094(1), 1-12. <https://doi.org/https://doi.org/https://doi.org/10.1196/annals.1376.002>
- Sanchez, H., & Reyes. (2015). *Metodología de la investigación científica*. <https://doi.org/https://es.scribd.com/document/291708420/Resumen-Sanchez-y-Reyes>
- Sharpley, C., Palanisamy, S., Glyde, N., Dillinghamd, P., & Agnew, L. (2014). An update on the interaction between the serotonin transporter promoter variant (5-HTTLPR), stress and depression, plus an exploration of non-confirming findings. *Behavioural Brain Research*, 273(15), 89-105. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bbr.2014.07.030](https://doi.org/https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bbr.2014.07.030)
- Sierra, J., Ortega, V., & Zubeidat, I. (2003). Ansiedad, angustia y estrés: tres conceptos a diferenciar. *Mal-estar E Subjetividade*, 3(1), 10-59. <https://doi.org/https://www.redalyc.org/pdf/271/27130102.pdf>
- Strekalova, T., Liu, Y., Kiselev, D., Khairuddin, S., Lok, J., Chiu, Y., Lam, J., Chan, Y., Pavlov, D., Proshin, A., Lesch, K., Anthony, D., & Wei, L. (2022). Chronic mild stress paradigm as a rat model of depression: facts, artifacts, and future perspectives. *Psychopharmacology*, 239(3), 663–693. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s00213-021-05982-w>
- Strongman, K. (1995). Theories of Anxiety. *New Zealand Jo 'rna/ of Psychology*, 24(2). <https://es.scribd.com/doc/205043991/Theories-of-Anxiety-K-T-Strongman>
- Sullivan, P. F., Neale, M. C., & Kendler, K. S. (2000). Genetic epidemiology of major depression: review and meta-analysis. . *The American journal of psychiatry*, 157(10), 1552–1562. <https://doi.org/https://doi.org/10.1176/appi.ajp.157.10.1552>



- Sullivan, P., Neale, M., & Kendler, K. (2000). Genetic Epidemiology of Major Depression: Review and Meta-Analysis. *American Journal of Psychiatry*, 157(19), 1552–1562. <https://doi.org/doi:10.1176/appi.ajp.157.10.1552>
- Trucco, M. (2002). Estrés y trastornos mentales: aspectos neurobiológicos y psicosociales. *Revista chilena de neuro-psiquiatría*, 40(2), 8-19. <https://doi.org/https://dx.doi.org/10.4067/S0717-92272002000600002>
- Tsuchimine, S., Matsuno, H., O'Hashi, K., Chiba, S., Yoshimura, A., Kunugi, H., & Sohya, K. (2020). Comparison of physiological and behavioral responses to chronic restraint stress between C57BL/6J and BALB/c mice. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 525(1), 33-38. <https://doi.org/https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2020.02.073>
- Uher, R., Payne, J., Pavlova, B., & Perlis, R. (2014). Major depressive disorder in DSM-5: implications for clinical practice and research of changes from DSM-IV. *Depression and anxiety*, 31(6), 459-471. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/da.22217>
- Vilar, A., Pérez, V., Blasco, M., Pérez, E., Ballester, L., Batlle, S., Alonso, J., Serrano, A., & Forero, C. (2019). Translational research in psychiatry: The Research Domain Criteria Project (RDoC). *Psiquiatría y Salud Mental*, 12(3), 187-195. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.rpsm.2018.04.002>
- Willner, P. (1997). Validity, reliability and utility of the chronic mild stress model of depression: a 10-year review and evaluation. *Psychopharmacology*, 134(4), 319–329. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s002130050456>
- Willner, P. (2017a). Reliability of the chronic mild stress model of depression: A user survey. *Neurobiology of Stress*, 6, 68-77. <https://doi.org/https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ynstr.2016.08.001>
- Willner, P. (2017b). The chronic mild stress (CMS) model of depression: History, evaluation and usage. *Neurobiology of Stress*, 6, 78–93. <https://doi.org/https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ynstr.2016.08.002>
- Woody, M., & Gibb, B. (2015). Integrating NIMH Research Domain Criteria (RDoC) into Depression Research. *Current Opinion in Psychology*, 4, 6-12. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.copsyc.2015.01.004>



- Yalcin, I., Coubard, S., Bodard, S., Chalon, S., & Belzung, C. (2008). Effects of 5,7-dihydroxytryptamine lesion of the dorsal raphe nucleus on the antidepressant-like action of tramadol in the unpredictable chronic mild stress in mice. *Psychopharmacology*, 200(4), 497–507. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s00213-008-1227-3>
- Yankelevitch, R., Franko, M., A. H., & Doron, R. (2015). *The Forced Swim Test as a Model of Depressive-like Behavior*. *JOVE* 97. <https://doi.org/https://doi.org/10.3791/52587>
- Zahn, C., Shirtcliff, E., & Marceau, K. (2008). Disorders of childhood and adolescence: Gender and psychopathology. *Annual Review of Clinical Psychology*, 4, 275-303. <https://doi.org/https://doi.org/10.1146/ANNUREV.CLINPSY.3.022806.091358>



Anexos:

Matriz de consistencia

Efecto del Estrés crónico leve en los comportamientos tipo ansiosos y depresivos en ratones adultos de dos cepas endogámicas, Cusco 2022

Problema	Objetivos	Hipótesis	Variables	Metodología
<p>General:</p> <p>¿De qué manera el estrés crónico leve afecta los comportamientos tipo ansiosos y depresivos en ratones adultos de dos cepas endogámicas, Cusco 2022?</p>	<p>General:</p> <p>Determinar de qué manera el estrés crónico leve influye en los comportamientos tipo ansiosos y depresivos en ratones adultos de dos cepas endogámicas, Cusco 2022.</p>	<p>HG-1: Los comportamientos tipo ansiosos y depresivos serán significativamente afectados en ambas cepas, siendo mayor el efecto en ratones de la cepa BALB/c, considerados más ansiosos y reactivos a estresores, que de los de la cepa C57BL/6NCrI.</p>	<p>Independiente: VII Exposición a Estrés Crónico Leve</p> <p>Dependiente: VD1- Comportamientos tipo depresivos</p> <p>VD2- Comportamientos tipo ansiosos</p> <p>Control Vc1: Cepa Vc2: Sexo</p>	<p>Alcance de Investigación: Explicativo</p> <p>Diseño de investigación: Diseño experimental puro de tipo factorial</p> <p>Sujetos: 106 ratones de las cepas C57BL/6NCrI y BALB/c (64 machos y 42 hembras)</p> <p>Metodología: Estrés crónico leve</p> <p>Recolección de datos: - Test de la caja clara – oscura</p>
<p>Específicos:</p> <p>¿En qué medida el estrés crónico leve influye sobre los comportamientos tipo ansiosos en los ratones de la cepa C57BL/6NCrI según el sexo?</p>	<p>Específicos:</p> <p>Establecer el efecto del estrés crónico leve sobre los comportamientos tipo ansiosos en los ratones de la cepa C57BL/6NCrI según el sexo.</p>	<p>HG-2: Los comportamientos tipo ansiosos y depresivos serán significativamente afectados en las cepas C57BL/6NCrI y BALB/c, siendo mayor el efecto en ratones hembras que en machos.</p>		
<p>Específicos:</p> <p>¿En qué medida el estrés crónico leve influye sobre los comportamientos tipo ansiosos en los ratones de la cepa BALB/c según el sexo?</p>	<p>Específicos:</p> <p>Establecer el efecto del estrés crónico leve sobre los comportamientos tipo ansiosos en los ratones de la cepa BALB/c según el sexo</p>			



¿En qué medida el estrés crónico leve influye sobre los comportamientos tipo depresivos en los ratones de la cepa C57BL/6NCrI según el sexo?

Establecer el efecto del estrés crónico leve sobre los comportamientos tipo depresivos en los ratones de la cepa C57BL/6NCrI según el sexo.

¿En qué medida el estrés crónico leve influye sobre los comportamientos tipo depresivos en los ratones de la cepa BALB/c según el sexo?

Establecer el efecto del estrés crónico leve sobre los comportamientos tipo depresivos en los ratones de la cepa BALB/c según el sexo

¿En qué medida el estrés crónico leve influye sobre los comportamientos tipo ansiosos en los ratones machos según la cepa?

Establecer el efecto del estrés crónico leve sobre los comportamientos tipo ansiosos en los ratones machos según la cepa

En qué medida el estrés crónico leve influye sobre los comportamientos tipo ansiosos en los ratones hembras según la cepa?

Establecer el efecto del estrés crónico leve sobre los comportamientos tipo ansiosos en los ratones hembras según la cepa

¿En qué medida el estrés crónico leve influye sobre los comportamientos tipo depresivos en los ratones machos según la cepa?

Establecer el efecto del estrés crónico leve sobre los comportamientos tipo depresivos en los ratones machos según la cepa

¿En qué medida el estrés crónico leve influye sobre los comportamientos tipo depresivos en los ratones hembras según la cepa?

Establecer el efecto del estrés crónico leve sobre los comportamientos tipo depresivos en los ratones hembras según la cepa

- Test de laberinto elevado en cruz
- Test de Nado forzado
- Test de suspensión de cola
- Splash Test

Análisis estadísticos:

- GraphPad Prism 6.01
- ANOVA de 2 factores



Matriz de operacionalización del instrumento de investigación

Variable	Dimensiones	Indicadores	Ítems o reactivos	Escala valorativa
Variable Independiente: Estrés crónico leve con exposición diaria a estímulos impredecibles durante 5 semanas.	1. Variedad de estímulos	<ul style="list-style-type: none"> - Número de micro estímulos usados durante 5 semanas - Frecuencia de aplicación de micro estímulos por día - Alternancia de aplicación de micro estímulos por día - Frecuencia de aplicación de micro estímulos por semana 	<ul style="list-style-type: none"> - 7 micro estímulos (Destellos de Luz, Estrés Acústico, Restricción de Movimiento, Lecho Húmedo, Jaula Inclinada, Inversión de Luz, RC/A) - Aplicación de 3 micro estímulos por día (Ejm: Destellos de Luz, Estrés Acústico, Restricción de Movimiento) - Un micro estímulo presentado a determinada hora en un día no es repetido en el siguiente día (Ejm: Día 1: Destellos de Luz-Estrés Acústico -Restricción de Movimiento; Día 2: Restricción de comida-Lecho Húmedo – Estrés Acústico) - Un determinado estímulo es repetido 3-4 veces por semana. 	- Naturaleza de la variable: cuantitativa continua. Escala de medición: estímulos por día



Variable	Dimensiones	Indicadores	Ítems o reactivos	Escala valorativa
	2. Severidad de estímulos	<ul style="list-style-type: none">- Proporción de micro estímulos aplicados por día- Duración de micro estímulos aplicados por día- Duración de micro estímulos por semana	<ul style="list-style-type: none">- Dos micro estímulos de severidad leve (Ejem: Destellos de Luz -Estrés Acústico) es acompañado de un micro estímulo de severidad alta (Ejem: Restricción de Movimiento, Restricción de Comida).- Un micro estímulo de severidad alta es presentado durante 12 horas sin acompañamiento de otro micro estímulo (Inversión de Luz)- Microestimulos de severidad leve son aplicados 2-3 h por día. Los de severidad alta son aplicados en 1 h por día.- Micro estímulos de severidad leve: 12 horas por semanas- Micro estímulos de severidad alta: 3 horas por semana	-
Variables dependientes: - Comportamientos tipo ansiosos	<ul style="list-style-type: none">- Exploración- Aproximación-avoidance	<ul style="list-style-type: none">- Latencia en Caja Oscura- Latencia en Caja Clara	<ul style="list-style-type: none">- Test de la caja clara/oscura	<ul style="list-style-type: none">- Naturaleza de la variable: cuantitativa continua. Escala de medición: razón



Variable	Dimensiones	Indicadores	Ítems o reactivos	Escala valorativa
	<ul style="list-style-type: none">de lugares abiertos, elevados e iluminadosSignos fisiológicos	<ul style="list-style-type: none">- Número de entradas a brazos abiertos- Tiempo en brazos abiertos.	<ul style="list-style-type: none">- Test de laberinto elevado en cruz	
Comportamientos tipo depresivos:	<ul style="list-style-type: none">Escape/deseperación.Signos fisiológicos	<ul style="list-style-type: none">- Latencia para entrar en inmovilidad o flotación- Duración de la inmovilidad/flotación- Número de bolos fecales al final de cada evaluación	<ul style="list-style-type: none">- Test de suspensión por la cola- Test de natación forzada	<ul style="list-style-type: none">- Naturaleza de la variable: cuantitativa continua. Escala de medición: razón.
	<ul style="list-style-type: none">ApatíaSignos fisiológicos	<ul style="list-style-type: none">- Latencia para iniciar comportamiento de acicalamiento.- Duración total de los eventos de acicalamiento.- Número de eventos de acicalamiento.	<ul style="list-style-type: none">- Test de la aplicación de solución de sacarosa o splash test.	<ul style="list-style-type: none">- Naturaleza de la variable: cuantitativa continua. Escala de medición: razón.



Variable	Dimensiones	Indicadores	Ítems o reactivos	Escala valorativa
		- Número de bolos fecales al final de cada evaluación		
- Peso corporal		- Cantidad en gramos	- Balanza de medición	- Naturaleza de la variable: cuantitativa continua. Escala de medición: razón
- Estado del pelaje		- Puntuación semanal del grado de deterioro de pelaje de 8 regiones corporales: cabeza, cuello, lomo, abdomen, genital, patas traseros, patas delanteras, cola.	- Ficha de observación	- Naturaleza de la variable: cuantitativa discreta. Escala de medición: ordinal
Variables control: - Cepa		- C57BL/6NCr1 - BALB/c	-	- Naturaleza de la variable: cualitativa. Escala de medición: Nominal
- Sexo		- Macho - Hembra	-	- Naturaleza de la variable: cualitativa. Escala de medición: Nominal



Presupuesto y financiamiento

Ítems	Cantidad	Precio unitario S/.	Precio total S/.
Ratones C57BL/6NCr1	78	21,00	1638,00
Ratones BALB/c	28	21,00	588,00
Alimento x Kls	80	7,00	560,00
Alojamiento mensual de ratones	106	361,00	38266,00
Guantes de nitrilo paquetes x 50	4	38,00	152,00
Papel toalla x 50	40	6,00	240,00
Alcohol 70%	10	15,00	150,00
Marcador permanente	20	3,00	60,00
Hojas Bond	1	15,00	15,00
Lápiz y lapiceros	20	1,50	30,00
Plumón de pizarra de varios colores	30	3,00	90,00
Marcadores	20	3,00	60,00
Cintas adhesivas	4	3,50	14,00
Botas de cirugía x60	6	15,00	90,00
Cofias x100	2	15,00	30,00
Mascarillas quirúrgicas	10	25,00	250,00
Viruta	1	40,00	40,00
Mandiles desechables	50	5,00	250,00
Total:			S/ 20,093,40

El financiamiento para el desarrollo de la presente investigación fue realizado por FONDECYT-Banco Mundial (Proyecto 025-2019-F-BM).