



UNIVERSIDAD ANDINA DEL CUSCO

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
ESCUELA PROFESIONAL DE MEDICINA HUMANA



Universidad
Andina
del Cusco



EVALUACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA DE RECEPTORES CORTICOIDEOS Y DE CONTRA- REGULACION EN CEPAS DE RATÓN C57BL/6NCrI Y BALB/c INDUCIDOS A UN MODELO DE ESTRÉS EN LA VIDA TEMPRANA

Presentado por:

Ricardo Narciso Montoya Huallpamaita

Código ORCID: 0009-0008-7035-9162

Tesis para optar el título profesional de Médico
Cirujano

Asesora:

MSc. Katerin Taboada Rosell

Código ORCID: 0000-0002-3700-2937

CUSCO – PERÚ

2023



AGRADECIMIENTOS

A veces las oportunidades aparecen solo una vez y no hay que tener miedo de tomarlas, agradezco a las personas que me dieron la oportunidad de hacer lo que solo en mis sueños pensé.

Gracias Dra. Di-Yanira Bravo González, por sus esfuerzos en la implementación del Instituto de Neurociencias de la Universidad Andina del Cusco, brindando la oportunidad a todos los que deseen seguir aprendiendo.

Gracias Dr. Luis Pacheco Otárola, por darme la oportunidad de trabajar en este proyecto; Gracias Dr. Juan Manuel Iglesias Pedraz, por mantenernos en tensión solo con su presencia dentro del laboratorio, pero que entre miradas incómodas y chanchos en caja china, aprendí de usted el arte de un buen “PCR”; Dra. Grace Violeta Espinoza Pardo, porque con su sola presencia puede alegrar y llenar el ambiente de tanto conocimiento y aprendizaje.

Gracias a mi asesora Dra. Katerin Taboada Rosell, por no inducirme la apoptosis en el proceso de corrección, por tener una paciencia única digna de cualquier filósofo romano y sobre todo por el trato horizontal que usted tiene para con todos, nunca olvidare su escuela.

Gracias Dra. Eliana J. Ojeda Lazo por sus consejos, su predisposición y ser como una madre, para todos los que cursamos esta honorable profesión.

Gracias a mis compañeros de laboratorio Carlos Medina y Sergio Cruz, por su ayuda y paciencia en mis gateadas por el mundo molecular, por las salseadas y conversaciones reactivas que llenaron de risas mis meses de mala postura entre pipetas, alcohol y hielo a -80°C .



Gracias querido amigo Jair Góngora, sin ti nunca hubiera tenido esta oportunidad.

Gracias Familia mía, por permitirme y apoyarme a hacer lo que me llena y me deja satisfecho pese al tiempo, pese a todo.

Y gracias mí, por tomar la decisión y no desperdiciar esta oportunidad de crecer, y aprender que una verdadera investigación toma tiempo.



DEDICATORIA

A mi querido maestro y amigo Dr. José Nieto Muriel, sus consejos me guiaron hasta hoy, su imagen, sus palabras, su persona siempre harán eco en mi vida y en todos los que alguna vez tuvieron la dicha de conocerlo.

A mis mejores amigos, Rensis, Massi y Aldiño, gracias por poner a prueba mi salud mental todos estos años, perdón, digo mantenerme mentalmente estable y romperme el celular para rankear el unite, ¡¡¡sosiéguese!!!, ya mejoraremos.

A Wiskas por hacer más colorida mi vida en estos oscuros momentos. Gooooo...!!!

A todas las personas con las que compartí y compartieron un poco de su vida conmigo, sin ustedes, no sería quien soy.

A mi abuela Andrea, aun te sigo extrañando después de tantos años.

A mis abuelos Nila Y Uriel, sin su apoyo no sería el profesional que soy.

A la persona más importante de mi vida, Carmen Rosa madre mía, sin ti, mi amor por la ciencia no tendría cabida, gracias por tu apoyo, gracias por las diferencias de opiniones y por soportar mi forma de ser.

Y a usted lector, siga con esa hambre de conocimiento, por mi parte yo también seguiré hambriento de ciencia.



ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	2
DEDICATORIA	4
ABSTRACT.....	10
INTRODUCCIÓN	11
CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN.....	12
1.1. Planteamiento del Problema.....	12
1.2. Formulación del Problema.....	14
1.2.1. Problema General	14
1.2.2. Problemas Específicos	15
1.3. Justificación	15
1.4. Objetivos de Investigación	16
1.4.1. Objetivo General.....	16
1.4.2. Objetivos Específicos	16
1.5. Delimitación de Estudio	17
1.5.1. Delimitación Espacial	17
1.5.2. Delimitación Temporal.....	17
1.6. Viabilidad del estudio.....	17
CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO.....	19
2.1. Antecedentes de Estudio	19
2.1.1. Antecedentes internacionales.....	19
2.2. Bases Teóricas.....	20
2.2.1. Estrés en la Vida Temprana (ELS).....	20
2.2.2. Hipocampo y ELS	21
2.2.3. ELS y modulación del eje Hipotálamo-Hipofisario-Adrenal	22
2.2.4. Sujeto en el que se realizará el estudio	24
2.3. Hipótesis	27
2.3.1. Hipótesis Alternativa	27
2.3.2. Hipótesis Nula	27
2.4. Variables	28
2.4.1. Identificación de Variables.....	28
2.4.2. Operacionalización de Variables	29
2.5. Definición de términos.....	31
CAPITULO III: MÉTODO	33
3.1. Alcance del estudio	33
3.2. Diseño	33
3.2.1. Reproducción	33
3.2.2. Grupos experimentales y controles.....	34
3.2.3. Protocolo de restricción de nido para ELS	34
3.2.4. Colecta	36
3.2.5. Extracción de ARNm	36
3.2.6. Análisis de expresión génica.....	40



3.3.	Población	41
3.4.	Muestra	41
3.5.	Plan de análisis de datos.....	43
3.5.1.	Estadística.....	43
3.5.2.	Base de datos	43
CAPITULO IV: RESULTADOS.....		44
4.1.	Análisis experimental de la cepa BALB/c	44
4.1.1.	Análisis de la expresión génica de GR hipocampal en cepas de ratones BALB/c en crías y adultos 44	
4.1.2.	Análisis de la expresión génica de MR en cepas de ratones BALB/c en crías y adultos	47
4.1.3.	Análisis de la expresión génica de CRHR1 en cepas de ratones BALB/c en crías y adultos ...	49
4.2.	Análisis experimental en la cepa C57BL/6NCrI.....	52
4.2.1.	Análisis de la expresión génica de GR en cepas de ratones C57BL/6NCrI en crías y adultos	52
4.2.2.	Análisis de la expresión génica de MR en cepas de ratones C57BL/6NCrI en crías y adultos	55
4.2.3.	Análisis de la expresión génica de CRHR1 en cepas de ratones C57BL/6NCrI en crías y adultos 57	
5.1.	Descripción de los hallazgos más relevantes y significativos	61
5.2.	Limitaciones del estudio	62
5.3.	Comparación crítica con la literatura existente.....	62
5.4.	Implicaciones del estudio	66
CONCLUSIONES		68
RECOMENDACIONES.....		70
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS		71
MATRIZ DE CONSISTENCIA		77
INSTRUMENTO DE RECOLECCION DE DATOS.....		79



INDICE DE TABLAS

Tabla 1: Operacionalización de variables	29
Tabla 2: Cepas utilizadas	42
Tabla 3: Expresión génica de GR hipocampal en hembras adultas y crías de la cepa de ratón BALB/c.....	44
Tabla 4: Expresión génica de GR hipocampal en machos adultos y crías de la cepa de ratón BALB/c.....	46
Tabla 5: Expresión génica de MR hipocampal en hembras adultas y crías de la cepa de ratón BALB/c.....	47
Tabla 6: Expresión génica de MR hipocampal en machos adultos y crías de la cepa de ratón BALB/c.....	48
Tabla 7: Expresión génica de CRHR1 hipocampal en hembras adultas y crías de la cepa de ratón BALB/c.....	49
Tabla 8: Expresión génica de CRHR1 hipocampal en machos adultos y crías de la cepa de ratón BALB/c.....	51
Tabla 9: Expresión génica de GR hipocampal en hembras adultas y crías de la cepa de ratón C57BL/6NCrL.....	52
Tabla 10: Expresión génica de GR hipocampal en machos adultos y crías de la cepa de ratón C57BL/6NCrL.....	53
Tabla 11: Expresión génica de MR hipocampal en hembras adultas y crías de la cepa de ratón C57BL/6NCrL.....	55
Tabla 12: Expresión génica de MR hipocampal en machos adultos y crías de la cepa de ratón C57BL/6NCrL.....	56
Tabla 13: Expresión génica de CRHR1 hipocampal en hembras adultas y crías de la cepa de ratón C57BL/6NCrL.....	57
Tabla 14: Expresión génica de CRHR1 hipocampal en machos adultos y crías de la cepa de ratón C57BL/6NCrL.....	59
Tabla 15: Consolidación de datos.....	60
Tabla 17: Matriz de consistencia.....	77
Tabla 18: Ficha de recolección de muestras.....	79
Tabla 19: Ficha de procesamiento de muestras.....	80



ÍNDICE DE GRAFICOS

Gráfico 1: Expresión génica de GR en Hembras 75 días cepa BALB/c.	45
Gráfico 2: Expresión génica de GR en Hembras 12 días cepa BALB/c	45
Gráfico 3: Expresión génica de GR en Macho 75 días cepa BALB/c.....	46
Gráfico 4: Expresión génica GR en Macho 12 días cepa BALB/c.....	46
Gráfico 5: Expresión génica MR en Hembras 75 días cepa BALB/c.....	48
Gráfico 6: Expresión génica MR en Hembras 12 días cepa BALB/c.....	48
Gráfico 7: Expresión génica de MR en Macho 75 días cepa BALB/c.	49
Gráfico 8: Expresión génica de MR en Macho 12 días cepa BALB/c.	49
Gráfico 9: Expresión CRHR1 en Hembras 75 días cepa BALB/c.	50
Gráfico 10: Expresión CRHR1 en Hembras 12 días cepa BALB/c.	50
Gráfico 11: Expresión génica CRHR1 en Macho 75 días cepa BALB/c.	51
Gráfico 12: Expresión génica CRHR1 en Macho 12 días cepa BALB/c.	51
Gráfico 13: Expresión génica GR en Hembra 75 días cepa C57BL/6NCrI.	53
Gráfico 14: Expresión génica GR en Hembra 12 días cepa C57BL/6NCrI.	53
Gráfico 15: Expresión génica GR en Machos 75 días cepa C57BL/6NCrI.....	54
Gráfico 16: Expresión génica GR en Macho 12 días cepa C57BL/6NCrI	54
Gráfico 17: Expresión génica MR en Hembras 75 días cepa C57BL/6NCrI.	56
Gráfico 18: Expresión génica MR en Hembra 12 días cepa C57BL/6NCrI.....	56
Gráfico 19: Expresión génica de MR en Machos 75 días cepa C57BL/6NCrI.	57
Gráfico 20: Expresión génica de MR en Macho 12 días cepa C57BL/6NCrI.....	57
Gráfico 21: Expresión génica CRHR1 en Hembras 75 días cepa C57BL/6NCrI.....	58
Gráfico 22: Expresión génica CRHR1 en Hembra 12 días cepa C57BL/6NCrI.	58
Gráfico 23: Expresión génica de CRHR1 en Machos 75 días cepa C57BL/6NCrI.....	60
Gráfico 24: Expresión génica de CRHR1 en Macho 12 días cepa C57BL/6NCrI	60



RESUMEN

El estrés en la vida temprana (ELS) es una realidad presente en el contexto humano, causado por el maltrato infantil, que genera cambios morfológicos y moleculares en el eje HPA y sus receptores hipotalámicos. Sin embargo, los estudios directos en humanos son imposibles, por ende, se requiere usar animales de experimentación para mejorar la comprensión de estos procesos. En este estudio, se busca observar los cambios que el ELS pudo generar en los receptores de glucocorticoide, mineralocorticoide y CRHR1 en ratones, y así observar los cambios que el ELS tiene sobre los receptores hipocampales GR, MR y CRHR1 en la edad temprana y la adultez de ratones de las cepas BALB/c y C57BL/6NCrI. Se utilizó el paradigma de restricción de nido en ratones, a los cuales se les extrajo el hipocampo a los 12 y 75 días, y se analizó la expresión génica de GR, MR y CRHR1 mediante RT-qPCR. Como resultados se encontraron cambios en la expresión génica de estos receptores a los 12 días de vida en todas las cepas y sexos analizados, aunque el patrón de expresión difiere entre cepas y sexos. A los 75 días de edad, los machos de la cepa BALB/C y las hembras de la cepa C57BL/6NCrI mostraron los cambios más destacados, con aumento en la expresión de los tres genes estudiados, aunque con patrones distintos. Las hembras de la cepa C57BL/6NCrI mostraron una expresión 20% mayor de estos receptores, mientras que los machos de la cepa BALB/c expresaron en promedio un 50% menos a los 12 días y con un aumento de más del 80% a los 75 días. El presente estudio contribuye al entendimiento de los mecanismos moleculares involucrados en la respuesta al ELS y puede aportar a futuras investigaciones en el campo de la neurobiología del estrés y el desarrollo terapéutico.

Palabras claves: Estrés en la vida temprana (ELS), receptores corticoides, C57BL/6NCrI, BALB/c, expresión génica, eje HPA.



ABSTRACT

The early life stress (ELS) is a reality in human context, caused by childhood maltreatment, which generates morphological and molecular changes in the HPA axis and its hypothalamic receptors. However, direct studies in humans are impossible, therefore experimental animals are required to improve the understanding of these processes. In this study, the aim is to observe the changes that ELS may generate in glucocorticoid, mineralocorticoid, and CRHR1 receptors in mice, and thus observe the changes that ELS has on hippocampal receptors GR, MR, and CRHR1 in early life and adulthood of BALB/c and C57BL/6NCrI mice strains. The mouse nest restriction paradigm was used, in which the hippocampus was removed from mice at 12 and 75 days of age, and gene expression of GR, MR, and CRHR1 was analyzed using RT-qPCR. As results, changes in the expression of these receptors were found at 12 days of age in all strains and sexes analyzed, although the expression pattern differs between strains and sexes. At 75 days of age, males of BALB/C strain and females of C57BL/6NCrI strain showed the most prominent changes, with increased expression of all three genes studied, but with distinct patterns. Females of C57BL/6NCrI strain showed a 20% higher expression of these receptors, while males of BALB/c strain expressed on average 50% less at 12 days and with an increase of over 80% at 75 days. This study contributes to the understanding of the molecular mechanisms involved in the response to ELS and may contribute to future research in the field of stress neurobiology and therapeutic development.

Keywords: Early life stress (ELS), Corticoid receptors, C57BL/6NCrI, BALB/c, Gene expresión, HPA axis.



TESIS FINAL

por Ricardo Narciso Montoya Huallpamayta

Fecha de entrega: 10-may-2023 04:54a.m. (UTC-0500)

Identificador de la entrega: 2089361262

Nombre del archivo: Final_Ricardo_Montoya_con_L_de_O_sin_aspectos_operativos_1.docx (1.24M)

Total de palabras: 17300

Total de caracteres: 90024





UNIVERSIDAD ANDINA DEL CUSCO

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
ESCUELA PROFESIONAL DE MEDICINA HUMANA



Universidad
Andina
del Cusco



EVALUACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA DE RECEPTORES CORTICOIDEOS Y DE CONTRA- REGULACIÓN EN CEPAS DE RATÓN C57BL/6NCrI Y BALB/c INDUCIDOS A UN MODELO DE ESTRÉS EN LA VIDA TEMPRANA

Presentado por:

Ricardo Narciso Montoya Huallpamaita

Código ORCID: 0009-0008-7035-9162

Tesis para optar el título profesional de Médico
Cirujano

Asesora:

MSc. Katerin Taboada Rosell

Código ORCID: 0000-0002-3700-2937

CUSCO – PERÚ

2023





INFORME DE ORIGINALIDAD

8%

INDICE DE SIMILITUD

7%

FUENTES DE INTERNET

3%

PUBLICACIONES

3%

TRABAJOS DEL ESTUDIANTE

FUENTES PRIMARIAS

1

repositorio.uandina.edu.pe

Fuente de Internet

3%

2

Submitted to Universidad Andina del Cusco

Trabajo del estudiante

2%

3

Pérez Landero Sergio. "Las interacciones epistáticas entre las subunidades catalíticas de la PKA gobiernan la actividad de los factores de transcripción de Saccharomyces cerevisiae, Hsf1 y Skn7, durante el crecimiento en glucosa y en respuesta a calor", TESIUNAM, 2019

Publicación

<1%

4

Cornejo Granados María Fernanda. "Estudio de la interacción patógeno-hospedero en un modelo murino de tuberculosis pulmonar mediante el análisis del transcriptoma y el secretoma", TESIUNAM, 2021

Publicación

<1%

5

ddd.uab.cat

Fuente de Internet

<1%






Recibo digital

Este recibo confirma que su trabajo ha sido recibido por Turnitin. A continuación podrá ver la información del recibo con respecto a su entrega.


La primera página de tus entregas se muestra abajo.

Autor de la entrega:	Ricardo Narciso Montoya Huallpamayta
Título del ejercicio:	TESIS
Título de la entrega:	TESIS FINAL
Nombre del archivo:	Final_Ricardo_Montoya_con_L_de_O_sin_aspectos_operativos...
Tamaño del archivo:	1.24M
Total páginas:	81
Total de palabras:	17,300
Total de caracteres:	90,024
Fecha de entrega:	10-may.-2023 04:54a. m. (UTC-0500)
Identificador de la entrega...	2089361262

UNIVERSIDAD ANDINA DEL CUSCO
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
ESCUELA PROFESIONAL DE MEDICINA HUMANA



**Universidad
Andina
del Cusco**



EVALUACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA DE RECEPTORES CORTICOIDEOS Y DE CONTRAREGULACION EN CEPAS DE RATÓN C57BL/6NCrI Y BALB/c INDUCIDOS A UN MODELO DE ESTRÉS EN LA VIDA TEMPRANA

Presentado por:
Ricardo Narciso Montoya Huallpamaita
Código ORCID: 0009-0008-7035-9162
Tesis para optar el título profesional de Médico Cirujano
Asesora:
MSc. Katerin Taboada Rosell
Código ORCID: 0000-0002-3700-2937

**CUSCO – PERÚ
2023**



INTRODUCCIÓN

El maltrato infantil tiene tanta historia como la misma humanidad, describiéndose este desde relatos, escritos formales en el Derecho Romano como el “Pater Familiae”⁽¹⁾, o hechos históricos documentados como el caso de Mary Ellen⁽²⁾; la situación actual no ha mejorado en el mundo a pesar de los avances sociales, siendo esta mediada por la pobreza, la guerra, la explotación y el tráfico ilícito de humanos y/o órganos.

Es también importante subrayar que en el Perú diariamente se realizan innumerables denuncias por violencia familiar y estas siguen aumentando anualmente⁽³⁾.

Es así que, para abordar el tema del abuso infantil y sus consecuencias, es imperativo un enfoque multifacético. Si bien la intervención psicológica oportuna es crucial para prevenir los trastornos del desarrollo derivados del abuso, también es fundamental profundizar en el tema y adoptar una perspectiva más amplia. De este modo, las tendencias actuales enfatizan la necesidad de una comprensión biomolecular del problema.

Estos estudios se centran en la comprensión del eje hipotálamo hipofisario adrenal y el desarrollo cerebral, donde se ven cambios derivados del estrés en la vida temprana, especialmente en el hipotálamo donde se observan cambios estructurales y biomoleculares que mediaran el desarrollo a largo plazo, por ello su comprensión es una necesidad con el objetivo de permitir un desarrollo farmacológico más específico y que a su vez proporcionen formas de intervención más efectivas.



CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN

1.1. Planteamiento del Problema

La Organización Mundial de la Salud (2018) estima que, en todo el mundo, casi mil millones de niños son víctimas de abuso físico, sexual, emocional o abandono ⁽⁴⁾, datos a los cuales nuestra realidad no es ajena, observándose así en alumnos (niños y adolescentes) de nuestra región, en la ciudad de Calca en 2017 presentaron un grado de depresión entre leve y grave entre un 43,1% a 56,9%, con una tendencia a la ideación suicida en la misma proporción ^(5,6,7,8).

Esta realidad impide inevitablemente el crecimiento personal no solo de los menores, sino también de los adultos.

Teniendo esto en cuenta, se debe saber que tanto la violencia física como la psicológica provocan estrés en el medio social en el que se vive y por tanto tendrán efectos fisiológicos dentro de la complejidad humana, que pueden o no ser benéficos; Por ejemplo, niveles bajos de estrés mantienen el estado de alerta y atención en niveles óptimos, pero por el contrario, el aumento excesivo de los niveles de estrés o la prolongación de este sin estados de relajación, como ocurre con la violencia infantil, desencadenará procesos patológicos. ⁽¹⁾.

Además, los efectos negativos del estrés son aún más importantes en el desarrollo del niño, ya que tiene un sistema nervioso en constante desarrollo, observándose cambios en los procesos fisiológicos y morfológicos de estructuras cerebrales ⁽²⁾, relacionados con cambios cognitivo-conductuales, que influyen en la memoria, el rendimiento cognitivo, el pensamiento ejecutivo, la regulación emocional y el afecto ⁽³⁾.

Por estas razones, una mejor comprensión fisiopatológica de estos procesos es fundamental para idear nuevos enfoques de las patologías derivadas de esta



problemática; sin embargo, existen muchas limitaciones al estudiar los efectos del abuso infantil, especialmente porque la experimentación directa es imposible y por lo tanto es difícil observar los aspectos bioquímicos relacionados con esta; por ello, es necesario desarrollar estrategias acordes a las limitaciones, a través de modelos de estudio en animales capaces de replicar de cierta manera, los efectos del “estrés en vida temprana (ELS)”, en la población infantil, emulando de manera confiable procesos de señalización molecular como el eje hipotálamo-pituitario-suprarrenal (eje HPA). Sin embargo, al igual que en humanos existen variables importantes que decidirán como el individuo responderá al estrés, también en animales de experimentación esta respuesta variara dependiendo del sexo, del tiempo de estímulo, base genética del individuo, calidad del cuidado materno, control apropiado, de la edad al momento de la aplicación del test, del ciclo día/noche, tamaño de las literas, experiencias externas, entre otros; por lo que es necesario una correcta calibración del experimento y las condiciones en la que se he de realizar, para obtener una correcta correlación entre el modelo animal y su contraparte humana ⁽⁹⁾.

También es necesario tener en cuenta las diferencias que existen entre individuos, debido a que se han observado en modelos de fragmentación del cuidado materno cambios en la maduración hipocampal, lo cual disminuye la proliferación celular y acelera la maduración de las interneuronas generando una posible aceleración en el aprendizaje del miedo contextual; y pese a que estos procesos se desarrollan en ambos sexos, el comportamiento tipo depresivo está más asociado a las hembras debido a procesos hormonales propios de su género ⁽¹⁰⁾.

Otros procesos que necesitan ser tomados en cuenta son las variaciones en la bioquímica cerebral durante el desarrollo prenatal, donde existen hormonas placentarias como la *placental 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 2* (11 β -



HSD2), las cuales son capaces de inactivar a los corticoesteroides; mientras que en el desarrollo postnatal se observan niveles bajos de la hormona adenocorticotropa (ACTH) y poca respuesta a los estresores externos mediados por el periodo de hiporreactividad al estrés (SHRP), pudiendo durar este hasta los 12 días postnatales. Sin embargo, el SHRP al igual que otros sistemas de señalización cerebral, puede ser sobrecargado por estresores externos y generar la inducción de la secreción de hormona liberadora de corticotropina (CRH), ésta a su vez aumenta los niveles del receptor de CRH tipo 1 (CRHR1) en algunos núcleos hipocampales; siendo posible que este proceso puede ser mediado por el sexo del animal principalmente, aunque también guarda relación con la edad y el tipo de estresor ⁽¹¹⁾.

Finalmente este proyecto estudia los procesos adaptativos ante el estresor de restricción de nido (como factor de ELS) a nivel molecular, en las condiciones del bioterio automatizado UAC, en las cepas de ratón C57BL/6NCrI y BALB/c; de esta manera valora la evolución en la expresión de ARN para los receptores GR, MR y CRHR1 durante etapas críticas para su desarrollo y su adaptación en la adultez diferenciando machos y hembras, con el objetivo de proporcionar datos que sumen al entendimiento del ELS y aporten a estudios posteriores para el ELS en estas mismas cepas de ratón.

1.2. Formulación del Problema

1.2.1. Problema General

¿El estrés en la vida temprana (ELS) por restricción de nido afectara la expresión génica de receptores hipocampales corticoideos y de contra-regulación en ratones de ambos sexos de las cepas C57BL/6NCrI y BALB/c durante las etapas de desarrollo de crías y adultos?



1.2.2. Problemas Específicos

- ¿Cuáles son los efectos del estrés en la vida temprana por restricción de nido sobre la expresión génica del receptor de glucocorticoides (GR) hipocampales en ratones de ambos sexos de las cepas de ratones C57BL/6NCrI y BALB/c durante las etapas de desarrollo de crías y adultos?
- ¿Cuáles son los efectos del estrés en la vida temprana por restricción de nido sobre la expresión génica del receptor de mineralocorticoides (MR) hipocampales en ratones de ambos sexos de las cepas de ratones C57BL/6NCrI y BALB/c durante las etapas de desarrollo de crías y adultos?
- ¿Cuáles son los efectos del estrés en la vida temprana por restricción de nido sobre la expresión génica de receptores CRHR1 hipocampales en ratones de ambos sexos de las cepas de ratones C57BL/6NCrI y BALB/c durante las etapas de desarrollo de crías y adultos?

1.3. Justificación

Para el año 2015 en Perú, entre niños y niñas de 9 a 11 años, se observó que casi el 60% de estos fueron víctimas de algún tipo de violencia psicológica y/o física ⁽¹²⁾. Es así que, la alta incidencia de maltrato infantil y la constante búsqueda de nuevos tratamientos más efectivos y con menos efectos secundarios, hacen necesario realizar estudios moleculares más completos; este estudio observa en dos cepas de ratones, la evolución en la expresión génica de receptores glucocorticoides y de contra-regulación, en crías de ratones (momento más crítico del desarrollo) y ratones adultos (adaptación al ELS) utilizando RT-qPCR,; permitiendo de esta manera obtener datos que nos ayudan a entender de mejor manera los procesos de adaptación y correlación genético-fisiológica en estas dos cepas; datos que a su vez podrán ser de cierta



manera extrapolados a la fisiología humana y el ELS, además de que la información obtenida también podrá ser usada en futuras investigaciones que profundicen en el tratamiento del ELS y el desarrollo farmacológico necesario para este fin, usando estas mismas cepas de ratón como base de experimentación.

1.4. Objetivos de Investigación

1.4.1. Objetivo General

Analizar los cambios en la expresión génica de receptores hipocampales corticoideos y de contra-regulación en ratones de las cepas C57BL/6NCr1 y BALB/c inducidos restricción de nido como modelo de estrés en la vida temprana, durante las etapas de desarrollo de crías y adultos.

1.4.2. Objetivos Específicos

- Analizar los cambios en la expresión génica del receptor de glucocorticoides (GR) en ratones de las cepas C57BL/6NCr1 y BALB/c inducidos a restricción de nido como modelo de estrés en la vida temprana, durante las etapas de desarrollo de crías y adultos.
- Analizar los cambios en la expresión génica del receptor de mineralocorticoides (MR) en ratones de las cepas C57BL/6NCr1 y BALB/c inducidos a restricción de nido como modelo de estrés en la vida temprana, durante las etapas de desarrollo de crías y adultos.
- Analizar los cambios en la expresión génica del receptor de la hormona liberadora de corticotropina (CRHR1) en ratones de las cepas C57BL/6NCr1



y BALB/c inducidos a restricción de nido como modelo de estrés en la vida temprana, durante las etapas de desarrollo de crías y adultos.

1.5. Delimitación de Estudio

1.5.1. Delimitación Espacial

La estabulación de animales se desarrolló en el bioterio automatizado y el análisis molecular en el Laboratorio de Neurociencias del Instituto Científico de la Universidad Andina del Cusco.

1.5.2. Delimitación Temporal

La presente investigación tuvo una duración de 2 años entre los meses de enero del 2021 hasta enero del 2023.

1.6. Viabilidad del estudio

El estudio es viable, cuenta con financiamiento de FONDECYT - BANCO MUNDIAL con Convenio N° 025-2019-FONDECYT-BM-INC.INV. bajo el proyecto NUEVAS ESTRATEGIAS TERAPEUTICAS PARA EL TRATAMIENTO DE LA ANSIEDAD Y DEPRESIÓN EMPLEANDO DERIVADOS SEMI SINTETICOS DE LAS MACAMIDAS Y SUS EFECTOS SOBRE LA EXPRESIÓN GÉNICA DE CANNABINOIDES ENDÓGENOS EN NUCLEOS CEREBRALES DE RATONES.

La investigación se realizó con la evaluación y aprobación del Comité de Ética de la Universidad Andina del Cusco, mediante Resolución N° 604-CU-2019-UAC bajo el proyecto NUEVAS ESTRATEGIAS TERAPEUTICAS PARA EL



TRATAMIENTO DE LA ANSIEDAD Y DEPRESIÓN EMPLEANDO
DERIVADOS SEMI SINTÉTICOS DE LAS MACAMIDAS Y SUS EFECTOS
SOBRE LA EXPRESIÓN GÉNICA DE CANNABINOIDES ENDÓGENOS EN
NUCLEOS CEREBRALES DE RATONES.



CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO

2.1. Antecedentes de Estudio

2.1.1. Antecedentes internacionales

Arnett.M. (Estados Unidos, 2015), describe que, en ratones machos con 50 - 70 días de vida, de la cepa C57BL/J expuestos al estresor de la separación materna y modificados con una variante fluorescente en hipocampo del gen para “receptor glucocorticoideo (GR)” mediante inyección estereotáxica de lentivirus; observa que la expresión de este gen es significativamente menor en los ratones expuestos al estresor con respecto a los ratones control ⁽¹³⁾.

Así mismo, en otro estudio en ratones adultos y knockout sometidos al estresor de restricción de nido, se observa la disminución de la actividad del eje hipotálamo hipofisario adrenal(HPA) en las hembras, después de ser expuestos al estresor de inmovilización forzada, mientras que en machos la actividad estaba elevada, adicionalmente mediante la técnica Western Blot en hipocampo, se determina que existe una sobre expresión genica de receptores glucocorticoides y mineralocorticoides, con una sobre regulación importante en machos a nivel del receptor mineralocorticoide ⁽¹⁴⁾.

Courtney J. (Estados Unidos, 2008) observa en su estudio que, en ratones de 9 días de vida de la cepa C57BL/6J sometidos a restricción de nido, existe mayor secreción de los niveles de corticosterona en sangre por la falta de material de nido, así mismo observaron una disminución de los niveles de ARN mensajero de la hormona liberadora de corticotropina en el hipotálamo, específicamente en el núcleo paraventricular ⁽¹⁵⁾.



Bath KG. (Estados Unidos, 2017), otro estudio hecho en ratones C57BL/6N entre los 6 y 75 días de edad, sometidos a la restricción de nido, se observa que las hembras presentan un ligero aumento de secreción de corticosterona en condiciones normales y sobre estrés ⁽¹⁶⁾.

Bath K. (Estados Unidos, 2016) demuestra que en ratones C57BL/6N de 12 días de edad sometidos a restricción de nido disminuye la densidad celular en el subículo hipocampal y los niveles de expresión génica de receptores glucocorticoides y mineralocorticoides ⁽¹⁷⁾.

En cuanto al receptor contra-regulador CRHR1, Xue-Mei L. (2014), demostró que, cuando este receptor es bloqueado en crías de ratones expuestas a estrés, se reducen las alteraciones sinápticas, atenuando el retraso en el desarrollo de las dendritas y mejorando el desarrollo de las neuronas piramidales CA3 del hipocampo a nivel de las espinas dendríticas⁽³⁶⁾.

Bonfiglio J. (Alemania-Argentina, 2013), determina que el receptor CRHR1 puede ser capaz de activar la “quinasa regulada por señales extracelulares tipo 1 y 2, una proteína involucrada en varias funciones fisiológicas como la mitosis, meiosis y funciones pos-mitóticas de células diferenciadas, además de jugar un rol importante en el hipocampo permitiendo la regulación emocional, plasticidad sináptica, aprendizaje y memoria ⁽³⁷⁾.

2.2. Bases Teóricas

2.2.1. Estrés en la Vida Temprana (ELS)

El ELS, es el mayor factor socio-ambiental causante de múltiples patologías (18); como la depresión en niños, jóvenes y adultos, debido a que altera el desarrollo normal de la persona en los momentos más críticos de su desarrollo



(19). Estas alteraciones generan cambios no solo psicológicos, sino también cambios hormonales, estructurales, anatómicos e incluso genéticos ⁽²⁰⁾. Por consiguiente, la alta incidencia y prevalencia del maltrato infantil, generan alteraciones de relevancia, las cuales merecen ser atendidas y entendidas.

2.2.2. Hipocampo y ELS

El hipocampo, una pequeña estructura neuronal ubicada dentro del lóbulo temporal, el cual consta de 3 zonas histológicas (estrato polimorfo, estrato piramidal y estrato molecular) y 4 áreas (CA1, CA2, CA3 y CA4), las cuales reciben información a través de las siguientes vías ⁽²¹⁾:

- Vía Perforante: que procede de la corteza entorrinal hacia la célula granulares en el giro dentado, además de ser esta vía la más importante.
- Vía de las Fibras Musgosas: vía aferente que procede del giro dentado a la región CA3
- Vía colateral de Schaffer: vía eferente de la región CA3 en dirección a la región CA1

Debido a sus características anatómicas y fisiológicas, y mediante distintos experimentos hechos en animales, se genera un modelo por niveles, basados en 5 principales enunciados, que pueden explicar y predecir los efectos del estrés sobre la función hipocámpal ⁽²²⁾.

- Las hormonas del estrés, influyen de manera directa la función hipocámpal, debido a que esta estructura a nivel molecular posee una gran cantidad de receptores corticoideos.



- Las hormonas del estrés también influyen de manera directa o indirecta la amígdala.
- Las proyecciones de la amígdala en dirección del hipocampo, pueden modificar las funciones de esta última.
- El área CA1 del hipocampo en función, es independiente de la amígdala en condiciones sin estrés.
- El hipocampo necesita tanto la estimulación hormonal por corticosteroides, como la acción de la amígdala para sufrir alteraciones en su plasticidad sináptica, siendo de estos dos, la estimulación hormonal la que determinara la magnitud del efecto.

Además se sabe que el ELS en roedores tiene efectos sobre el aumento de la apoptosis celular en el hipocampo en la etapa fetal, a su vez acelera la maduración de esta estructura, mediada probablemente por la sobre expresión de CRH y su acción sobre los receptores de CRH (CRHR); asimismo se observa la posibilidad de afectar la maduración dendrítica de las células piramidales en la área CA3 en la segunda semana postnatal, proceso que no es reversible en su totalidad, por lo que tendrá efectos notables a largo plazo sobre la estructura y función del hipocampo ⁽¹¹⁾. Estas son algunas de las tantas estructuras y funciones del hipocampo, que pueden verse afectadas en su desarrollo debido al ELS.

2.2.3. ELS y modulación del eje Hipotálamo-Hipofisiario-Adrenal

El eje hipotalámico hipofisiario adrenal (HPA), es la vía de respuesta esencial ante cualquier evento de estrés que atente contra la homeostasis corporal, dando al cuerpo ese impulso metabólico necesario para superar el evento y como su



nombre lo indica, es un eje capaz de auto regularse en condiciones que no superen su capacidad, ya sea en intensidad o en tiempo ⁽¹¹⁾.

Este eje también es fundamental en la adaptación de los sujetos a distintos entornos, ya sean favorables o desfavorable mediante cambios específicos en distintas estructuras cerebrales, mediando su función; a esto es necesario aclarar que cada estresor es distinto entre sí y por ende media distintos cambios cerebrales ⁽²³⁾.

El producto final de este eje son los corticoesteroides, y estos son capaces de penetrar fácilmente la barrera hematoencefálica, donde tienen sitios de unión a GR y MR, los cuales tienen distintos grados de afinidad hormonal y distribución en el tejido cerebral, lo que permite también que los corticoesteroides medien distintos grados y formas de adaptación, y desarrollo cerebral ⁽¹¹⁾.

A nivel central los principales componentes del sistema de estrés, son las neuronas productoras de CRH y arginina vasopresina (AVP) localizadas en el núcleo para ventricular del hipotálamo en conjunción con las neuronas noradrenérgicas del locus cerúleos, siendo este sistema estimulado por neurotransmisores colinérgicos y serotoninérgicos, e inhibido por el ácido gamma amino butírico (GABA) y el núcleo arcuato. Es así que, cuando es activado el eje HPA este comenzará por la liberación de CRH, el cual se unirá a los receptores de CRH tipo 1 y 2, activando receptores transmembrana acoplados a proteína G, uniéndose estos al adenilato ciclasa, activando la síntesis de AMP cíclico y la actividad de la *protein* quinasa A, en todo este proceso, CRH demostró tener una mayor afinidad por CRHR1 ⁽²⁴⁾.

El CRHR1 se encuentra en distintas regiones cerebrales incluyendo el hipocampo y principalmente la glándula pituitaria ejerciendo funciones en la



activación de la secreción de ACTH; del mismo modo presenta una función regulatoria mediante interacciones complejas cambiando la función hipocampal de excitatoria a inhibitoria, evitando una sobre excitación de los mecanismos del estrés a nivel molecular.

2.2.4. Sujeto en el que se realizará el estudio

2.2.4.1. Modelo de estudio

Los modelos de estudio a lo largo del tiempo han ido cambiando y seguirán cambiando conforme al desarrollo tecnológico por lo que es importante la elección adecuada de los modelos de estudio dependiendo del nivel de investigación, la complejidad, las limitaciones de espacio, medio y tiempo del estudio, y de los requerimientos del experimentador. Existen varios modelos de estudio desde los realizados en roedores y sus diversos géneros y especies, perros, gatos, etc., hasta los más complejos especímenes con modificaciones genéticas puntuales, las inducciones de enfermedades, los cultivos de celulares, el uso de homínidos e incluso los hechos en el mismo humano ⁽²⁵⁾.

Sabiendo esto, la elección de los especímenes para los estudios, depende de las necesidades del proyecto, la conveniencia del espacio, los recursos y la similitud humano/animal en el aspecto a estudiar; en el presente estudio se tuvo como elección los ratones C57BL/6NCrl y BALB/c como sujeto de estudio por ⁽²⁶⁾:

- Relativa poca necesidad de espacio para su crecimiento.
- Poseen un ciclo corto.



- Docilidad para su manipulación.
- Necesidades biológicas limitadas.
- Fisiología similar a la humana.

2.2.4.2. Ratón C57BL/6NCrl y BALB/c

Los ratones albinos BALB/c son ampliamente usados en estudios de experimentación en animales; estos ratones fueron desarrollados a partir de una cepa de ratones albinos obtenidos por Halsey Bagg alrededor de 1913-1936, quien los mantuvo hasta su 7ma generación. Los estudios de Bagg concluyeron que estos ratones eran mucho más adecuados para estudios comportamentales ⁽²⁷⁾.

Por otro lado, el ratón C57BL/6NCrl es una sublínea de los ratones C57BL/6, la cual es la cepa de ratones endogámica más ampliamente usada para manipulación genética. También es conocida por que en ella se desarrolló el proyecto “genoma del ratón” concluyendo en 2002, finalmente en el 2016 reportan que existe hasta un 70% de similitud entre las secuencias genéticas que codifican proteínas con las humanas, también se observó que existen similitudes notables en los procesos de transcripción, la maquinaria usada y las principales vías de señalización y sin embargo existen diferencias importantes en los detalles de estos procesos ⁽²⁸⁾.

2.2.4.3. Modelo Animal vs Humano

También llamado proceso de extrapolación animal-humano, es un proceso continuo de investigación, mayormente usado en la toxicología, el cual da como resultado una respuesta completa ante la duda entre la similitud de dos



o más organismos, en este caso el humano y el ratón, sin embargo, su uso está regulado y estudiado por una serie de parámetros previamente estudiados; y por ende su uso está completamente validado bajo ciertas condiciones. Es necesario saber también que, aunque el valor predictivo de los modelos animales es aparentemente muy alto, estos pueden presentar inconsistencias, por ejemplo, en muchos casos se ha demostrado que sustancias que pueden ser nociva o no tener ningún efecto sobre ciertas especies, pueden ser inocuas y beneficiosas en el humano y viceversa ⁽²⁵⁾, un caso señalado es la capacidad del acetominofeno, la benzocaína, los cloratos, la lidocaína, etc. Para producir metahemoglobinemia en modelos animales, siendo estos productos en su mayoría inocuos en el humano a dosis regulares ⁽²⁹⁾.

Adicionalmente también se tienen que evaluar las similitudes entre las estructuras y funciones del hipocampo del ratón y humano; se sabe que existen similitudes anatómicas y fisiológicas entre ambas estructuras más allá de la diferencia en tamaño, sin embargo las interconexiones entre las distintas zonas hipocampales, sus vías aferentes y eferentes se mantiene proporcionales entre la humana y la del ratón, además de que los procesos neuroendocrinos dependientes de corticoides siguen siendo los mismos, aunque estos respondan de manera diferente en ciertos casos, procesos que probablemente estén mediados por la evolución; es más, el eje HPA cumple las misma funciones en ambas especies y es regulado por receptores corticoides de función similar ⁽³⁰⁾.



2.2.4.4. Paradigma de restricción de nido y ELS

El paradigma de restricción de nido permite emular el maltrato infantil a través de la fragmentación del cuidado materno; esto se logra restringiendo y limitando los materiales que la madre ratón pueda obtener para la elaboración del nido; siendo este un factor que genera estrés en la madre, ya que disminuye su estancia dentro del nido por la necesidad de conseguir los materiales necesarios para mantenimiento de sus crías, al mismo tiempo las crías entran en un proceso de estrés por el abandono materno ⁽¹⁵⁾.

2.3. Hipótesis

2.3.1. Hipótesis Alternativa

La expresión génica (ARN mensajero - ARNm) de receptores glucocorticoides (GR), receptores mineralocorticoides (MR) y receptor para CRH tipo 1 (CRHR1) en el área hipocámpal de crías de ratón y adultos de las cepas C57BL/6Ncr1 y BALB/c es alterada por el estrés producido en la vida temprana por medio del modelo de restricción de nido.

2.3.2. Hipótesis Nula

La expresión génica (ARN mensajero - ARNm) de receptores glucocorticoides (GR), receptores mineralocorticoides (MR) y receptor para CRH tipo 1 (CRHR1) en el área hipocámpal de crías de ratón y adultos de las cepas C57BL/6Ncr1 y BALB/c no es alterada por el estrés producido en la vida temprana por medio del modelo de restricción de nido.



2.4. Variables

2.4.1. Identificación de Variables

Variables Independientes

- **Restricción de nido:** Se define como un tipo de protocolo-paradigma utilizado con el fin de causar ELS.
- **Tiempo de restricción de nido:** Se define como el tiempo de exposición a la causa del ELS.

Variable Dependiente

- **Expresión Génica de Receptores Corticoides:** Se define como la expresión de ARNm correspondiente a los receptores corticoides en estudio (GR, MR y CRHR1).

Variable Interviniente

- **Edad de Ratones:** Se define como el tiempo de vida del espécimen, desde su nacimiento hasta el momento en el que se procede a la recolección del material de estudio

Variables Moderadora

- **Sexo de los ratones:** Se define como el sexo biológico que puede diferenciar el proceso de adaptación al estrés.
- **Cepa de ratón:** Se define como la cepa de ratón usada.



2.4.2. Operacionalización de Variables

Tabla 1: Operacionalización de variables

VARIABLE	DEFINICION CONCEPTUAL	DIMENSIONES	TIPO DE VARIABLE	NATURALEZA	ESCALA DE MEDICION	INDICADOR	FUENTE DE INFORMACION	DEFINICION OPERACIONAL
Restricción de nido	Estresor usado para generar ELS en ratones	Físico	Independiente	Cualitativa	Nominal	Presencia del estresor	Estudios Previos	Uso Del Estresor Si:1 No:0
Tiempo de Restricción de nido	Tiempo que se somete a los ratones al estresor específico.	Físico	Independiente	Cuantitativo	Continua	Tiempo de exposición	Estudios previos	Tiempo de uso del estresor 8 Días:1 0 días: 0
Expresión Génica de receptores Glucocorticoides	Expresión de ARNm	Genético	Dependiente	Cuantitativo	Continuo	Cuantificación de la expresión	PCR	Cuantificación relativa de la expresión génica
Expresión Génica de receptores Mineralocorticoides	Expresión de ARNm	Genético	Dependiente	Cuantitativo	Continuo	Cuantificación de la expresión génica	PCR	Cuantificación relativa de la expresión génica



Expresión Génica de Crhr1	Expresión de ARNm	Genético	Dependiente	Cuantitativo	Continuo	Cuantificación de la expresión genica.	PCR	Cuantificación relativa de la expresión génica
Edad	Tiempo de vida en días, desde el nacimiento	Biológico	Interviniente	Cuantitativo	Continuo	Número de días de vida	Historial del ratón	Edad 12 días: 0 75 días: 2
Sexo	Sexo	Biológico	Moderadora	Cualitativo	Nominal	Distancia ano-genital. Presencia de pezones.	Sexado	Sexo Macho: 0 Hembra: 1
Cepa de Ratón	Cepa	Biológico	Moderadora	Cualitativo	Nominal	Registro del espécimen	Datos de registro en bioterio	Cepa: C57BL/6Ncr1: 0 BALB/c:1

Nota: Elaborado por el autor en base al marco teórico



2.5. Definición de términos

1. **Receptores corticoideos:** Receptores específicos para hormonas corticoideas como glucocorticoides y mineralocorticoides, cuya función es la modulación del estrés y funciones asociadas.
2. **GR:** Receptor para glucocorticoides.
3. **MR:** Receptor para Mineralocorticoides.
4. **Receptor de contra regulación:** Receptores de *feedback* negativo.
5. **CRHR1:** Receptor de hormona liberadora de corticotropina tipo 1.
6. **RT-qPCR:** Reacción en cadena de la polimerasa de transcripción inversa o reversa.
7. **Ct:** Es la intersección entre una curva de amplificación y una línea umbral relativa a la fluorescencia de los reactivos usados. Se trata de una medición relativa de la concentración del gen objetivo frente a la muestra control en la reacción de PCR.
8. **ELS:** Estrés en la vida temprana, se refiere a cualquier evento que expone a un niño (en experimentación con animales se refiere a la cría) a estímulos físicos y/o psicológicos que exceden su capacidad para afrontar este con éxito.
9. **ARNm:** Es una molécula de cadena simple de ARN, complemento de una de las cadenas de ADN de un gen.
10. **ADN genómico:** ADN contenido en los cromosomas.
11. **Degradación de ARN:** Destrucción del ARN, en este caso por ARNasa.
12. **Restricción de Nido:** Paradigma usado para genera ELS en ratones, consiste en limitar el acceso a los animales de experimentación a material de nido, frente a su contraparte control, sin limitar el acceso a agua o comida.



13. **Gen *Houskeeping***: Son genes que se expresan sin necesidad de regulación adicional y por ende su expresión es constante en todas las células y condiciones en un mismo organismo.
14. ***Threshold***: significa el punto en el que el ciclo de amplificación de la PCR, en el cual la cantidad de señal fluorescente emitida es por el reactivo de verificación, supera un nivel determinado.
15. **Electroforesis**: Técnica que permite la separación de moléculas según su peso mediante la inducción de un campo eléctrico.
16. **H₂O DEPC**: Agua tratada con dietilpírocarbonato, asegurando la inactivación de nucleasas.
17. ***ad libitum***: manejo de la alimentación de animales en cual se ofrece a los animales tanta comida como deseen.



CAPITULO III: MÉTODO

3.1. Alcance del estudio

El presente estudio es de alcance correlacional, busca estudiar la evolución en el tiempo de los efectos de la restricción de nido (como factor para inducir ELS) sobre la expresión génica de GR, MR y CRHR1 en ratones de dos distintas cepas (C57BL/6NCrI y BALB/c), además compara los datos obtenidos entre las distintas variables no independientes, permitiendo ampliar el conocimiento existente sobre los efectos del ELS, datos que a su vez podrán ser utilizados en futuras investigaciones en el tratamientos del ELS usando las cepas exploradas en este trabajo.

3.2. Diseño

El tipo de investigación es experimental puro, de nivel analítico y prospectivo debido al uso de sujetos de experimentación (ratones de cepas C57BL/6NCrI y BALB/c) en los cuales se manipula las variables independientes mediante la restricción de nido, permitiendo de esta manera estudiar el comportamiento en la expresión génica de GR, MR y CRHR1

3.2.1. Reproducción

La reproducción se llevó a cabo según las normas propias del bioterio automatizado de la Universidad Andina del Cusco. El protocolo de apareamiento se realizó con un ratón macho por cada 3 o 4 ratones hembras los cuales se agruparon en una sola jaula por el lapso de 7 días; una vez finalizado este periodo el macho fue separado, después de 7 días se inició el monitoreo hasta observar la formación de un tapón vaginal.



3.2.2. Grupos experimentales y controles

Los animales de experimentación dentro del bioterio automatizado se encontraron a temperatura constante de 24 °C, con control de humedad, ciclo claro-oscuro de 12 horas y alimento-agua *ad libitum*.

La formación de grupos fue de manera aleatoria simple, separados por camadas de máximo 6 crías y mínimo 4 crías, donde como mínimo existen 2 machos y 2 hembras, posteriormente se asignaron cada camada al grupo experimental o control.

La formación de grupos fue de la siguiente manera:

Grupo C57BL/6NCrI

- a) Grupo Control 12 días: G01-C-ctr12
- b) Grupo Control 75 días: G02-C-ctr75
- c) Grupo Experimental 12 días: G03-C-exp12
- d) Grupo Experimental 75 días: G04-C-exp75

Grupo BALB/c

- a) Grupo Control 12 días: G05-B-ctr12
- b) Grupo Control 75 días: G06-B-ctr75
- c) Grupo Experimental 12 días: G07-B-exp12
- d) Grupo Experimental 75 días: G08-B-exp75

3.2.3. Protocolo de restricción de nido para ELS

Para desarrollar un modelo de estrés es necesaria la correcta utilización de un modelo de estrés en la edad temprana, por ello se usa el paradigma de “restricción de nido” ⁽¹⁵⁾.



Las crías en crecimiento se encontraron en condiciones controladas dentro del bioterio automatizado; para los animales del grupo control y experimental se siguió el siguiente cronograma:

Grupo Control:

- a) P0: día 0 o día de nacimiento de las crías.
- b) P2: día de grupaje y de cambio de caja de la madre y la cría, donde se les coloca material de nido (algodón y viruta).
- c) P10: día de cambio de la madre y crías a cajas limpias con viruta.
- d) P12: día de colecta de tejido para el grupo etario de 12 días.
- e) P73: día inicio de las pruebas comportamentales
- f) P75: día de colecta de tejido para el grupo etario de 75 días.

Grupo Experimental:

- a) P0: día 0 o día de nacimiento de las crías.
- b) P2: día de grupaje y de cambio de caja de la madre y la cría, donde se les coloca la mitad de material de nido (algodón y viruta) que al grupo control.
- c) P10: día de cambio de la madre y crías a cajas limpias con cantidad de viruta igual a la del grupo control.
- d) P12: día de colecta de tejido para el grupo etario de 12 días.
- e) P73: día inicio de las pruebas comportamentales
- f) P75: día de colecta de tejido para el grupo etario de 75 días.



3.2.4. Colecta

Se colectaron muestras de tejido cerebral fresco siguiendo lo normado por la ley N°30407, Ley de Protección y Bienestar Animal y El Comité de Ética de la Universidad Andina del Cusco, de causar el menor sufrimiento posible a los animales de experimentación.

La eutanasia de los ratones de 12 y 75 días de vida se realizó mediante dislocamiento cervical y decapitación rápida, previa anestesia con hidrocloreto de ketamina e hidrocloreto de xilacina, una vez colectado el cerebro, se extrajo el hipocampo en un medio frío, con ayuda de un estereoscopio para los cerebros de menor tamaño, y herramientas de disección finas; el tejido hipocampal diseccionado fue almacenado en microtubos *RNAse free* de 1.5ml previamente rotulados con los datos del espécimen, fueron pesados y llevados a refrigeración a -20°C para su mantención temporal y finalmente se refrigeraron a -80°C para su almacenamiento hasta el momento de uso.

3.2.5. Extracción de ARNm

La extracción del ARN total se realizó mediante el “protocolo de TRIzol” (*Sigma Aldrich*)⁽³¹⁾; utilizando materiales y/o insumos de grado molecular; primero se procedió a homogeneizar la muestra con ayuda de una jeringa y 300 µl de *mammalian lysis buffer IX* (25µl Tris-HCl 25mM pH 8 + 20µl NaCl 100mM + 10µl Tx-100 1% + 10µl SDS 0.1% + 2µl EDTA 1mM pH 8 + 933µl H₂O DEPC) + beta mercaptoetanol 5%, entre 4°C y 10°C, a esta mezcla se le agrego 500 µl del reactivo de TRIzol y se agito rápidamente durante 15 segundos, se dejó incubar durante 5 minutos; a la mezcla obtenida se le agrego entre 200 µl y 300 µl de cloroformo y se agito periódicamente con fuerza durante 5 minutos, luego



se centrifugo durante 15 minutos a 12000rpm y 4°C; del paso anterior se obtuvo una solución con 2 fases e interfase, de la cual la fase superior fue transferida sin perturbar la interfase a otro microtubo *RNAsa free* de 1.5 ml, ésta solución obtenida se volvió a mezclar con 200 µl - 300 µl de cloroformo, repitiendo los pasos anteriores hasta la transferencia de la fase superior a un nuevo microtubo de las mismas características; la solución obtenida contiene ARNm suspendida en H₂O, para precipitarla se usó 1000 µl de isopropanol y previa homogeneización, la solución resultante fue incubada entre 20 y 60 minutos a -20°C, posteriormente la mezcla se centrifugo 15 minutos a 12000rpm y 4°C; del procedimiento anterior se obtuvo un precipitado blanco(*pellet*), el cual se conservó descartando el isopropanol, posteriormente se lavó dos veces el *pellet* con etanol al 75% en H₂O DEPC; finalmente el *pellet* obtenido fue suspendido en 15µl a 30µl de H₂O DEPC dependiendo de su tamaño y se cuantificó en el espectrofotómetro (*NanoDrop 2000, Thermo scientific*) a partir de 1µl de la solución obtenida; la muestra obtenida es ARNm, sin embargo ello puede contener ADN genómico por lo que fue necesario someter está a un proceso de purificación.

La purificación del ARNm se realizó mediante el “protocolo de precipitación de ADN con fenol y acetato de sodio”⁽³²⁾; a la solución obtenida en el protocolo anterior se le agregó 40µl de acetato de sodio a 50mM, 40µl de cloruro de sodio a 50mM y se llevó a un volumen final de 200µl con H₂O DEPC, se incubo en hielo por 20 a 30 minutos, agitando periódicamente; seguidamente se agregaron 200µl de Fenol-Cloroformo 5:1(*Thermo scientific*), se incubo durante 5 minutos, agitando periódicamente; la mezcla obtenida se procesa de la misma manera que en la obtención de ARNm, desde la segunda adición de 200µl de cloroformo, sin



embargo el *pellet* obtenido fue re-suspendido en un volumen menor al previamente usado para la misma muestra, siendo esta entre 10µl y 15µl de H₂O DEPC; la muestra obtenida fue evaluada y posteriormente refrigerada a -80°C hasta su posterior uso.

La evaluación de la cuantificación, degradación y pureza del material genético obtenido fue realizada mediante:

- Cuantificación mediante espectroscopia en longitudes de onda 230, 260 y 280, para que los resultados de estas pruebas se consideren favorables deben tener las siguientes características:
 - La muestra debe contener en total mínimamente 9000 ng de material genético a una mínima concentración de 600 ng/µl para garantizar una cantidad suficiente de material para experimentación y concentración que evite degradación en el tiempo.
 - La relación 260/280 y 260/230 deben ser de 2 +/- 0.2 para garantizar la limpieza adecuada del material genético y que esta no interfiera con los procesos de retro transcripción y amplificación.
- Electroforesis en gel de agarosa al 1% en base de buffer TBE y bromuro de etidio sometido a 100v de corriente directa, las muestras a cargarse en el gel de agarosa deben contener ⁽³¹⁾.
 - 16.5 µl de muestra con agua DEPC y un contenido neto de entre 1000ng y 2000 ng de material genético.
 - 3.5 µl de RNA sample loading buffer (6x).

El gel obtenido fue observado en el transiluminador a luz ultravioleta (UV).

Las muestras para considerarse viables para su uso, deben tener las siguientes características de integridad y pureza respectivamente:



- Evidencia visual a la luz UV de las bandas 18s y 28s verificando que el material genético no presente degradación.
- Ausencia a la evaluación visual con luz UV de bandas extras inmediatamente después de los pozos del gel de agarosa, que evidencien la presencia de material genético de origen genómico.
- Ausencia a la evaluación visual con luz UV de bandas extras, que evidencien la presencia de material desconocido.
- PCR de punto final con el kit “AmpliTaq Gold” en gel de agarosa al 2% en base de buffer TBE y bromuro de etidio, a 100v de corriente directa; las muestras de ARNm fueron procesadas de acuerdo a las especificaciones del fabricante del kit, además del uso el *primer* para gen mitocondrial 18s y/o GAPDH; la muestra obtenida se cargó en el gel previamente hecho en adición de 4 µl de *RNA sample loading buffer (6x)* y se observó en luz ultravioleta ⁽³³⁾.

Para considerar la muestra viable para su uso, no debe presentar amplificación del material genético muestreado, lo que significa ausencia de material genético genómico que interfiera con la cuantificación.

- Si el material genético no cumple con alguna de las características previamente mencionadas, la muestra se somete a una nueva purificación y/o limpieza y se vuelve a evaluar.

Todas las muestras obtenidas que cumplieron con las características adecuadas de pureza, integridad y cantidad, fueron rotuladas como ARN limpio y almacenadas a -80°C hasta su uso.



3.2.6. Análisis de expresión génica

Del material obtenido como ARNm limpio se sintetizó ADN complementario (ADNc) mediante retro-transcripción con ayuda de kit “*High-Capacity cDNArt*” según las especificaciones del fabricante; la cantidad de material genético que se usa es de 2000 ng, que al final de la reacción quedan suspendidos en 20 µl, a los cuales se les añadió 20 µl de H₂O pura para llegar a una concentración final de 50 ng/µl.

El ADNc obtenido fue usado en el proceso de RT qPCR utilizando el Kit de *SYBR green* según las especificaciones del fabricante, y *primers* para GR, MR, CRHR1 y gene 18s como *housekeeping* elaborados por *Applied Biological Materials Inc.* en base a las siguientes secuencias:

- *GR forward:* 5'-TACCCCGACAGAGAAGGAGTT-3'
- *GR reverse:* 5'-AAGGTGCTTTGGTCTGTGGTA-3'
- *MR forward:* 5'-GAGCGTTCTTCTCTTGGACCT-3'
- *MR reverse:* 5'-TGCTGCTCCCTTGAGTACTGT-3'
- *CRHR1 forward:* 5'-TGACAGCCGCCTACA ACTACT-3'
- *CRHR1 reverse:* 5'-GATGCAGACGAACATCCACTT-3'
- *18S forward:* 5'-GCCGCTAGAGGTGAAATTCTT-3'
- *18S reverse:* 5'-TCGTTTATGGTCGGA ACTACG-3'

(Previamente se realizó el análisis de la eficiencia de los *primers* diseñados, antes de su uso).

Para cada reacción de RT-qPCR se usó 50ng de ADN complementario y análisis génico se realizó mediante el uso de 3 réplicas técnicas por cada gen a estudiar.



La reacción de RT-qPCR y el análisis de la misma se realizó en el equipo *AriaMX Real-time PCR System* y los resultados se midieron en el *software* provisto por “Agilent” para este hardware a partir del Ct obtenido, adicionalmente los datos del Ct son analizados a través de método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (34).

3.3. Población

En la parte experimental se utilizó como población, las cepas de ratones alojadas en la infraestructura del bioterio automatizado de la Universidad Andina del Cusco:

- Cepa de ratón BALB/c
- Cepa de ratón C57BL/6NCr1

3.4. Muestra

El tamaño de la muestra se calculó mediante el método de análisis de poder, donde se consideraron los siguientes parámetros: tamaño de efecto (muy alto), error tipo I (considerando el nivel de significancia al 5% ($p=0,05$)), poder del estudio (95%). El cálculo de tamaño de la muestra para cada experimento fue realizado con auxilio del software G*Power3.1.9.7. (35),

El test estadístico se realizó mediante *Means: Difference between two independent means (two groups)*. Los resultados obtenidos del software indicaron un N= 10 en el análisis del tamaño mínimo de muestras para el tipo de experimento en cuestión. De esta manera se estableció el uso de 5 animales por grupo distribuidos de la siguiente manera:



Tabla 2: Cepas utilizadas

Grupo Etario	Cepa de ratón BALB/c		Cepa de ratón C57BL/6NCrl	
	Macho	Hembra	Macho	Hembra
12 días	5 RB	5 RB	5 RB	5 RB
75 días	5 RB	5 RB	5 RB	5-RB

El número mínimo de animales usados en todo el proyecto fue de 80, no se contabilizó la mortalidad de las crías y la variabilidad en la relación de hembras y machos nacida por cada camada.

El análisis del tamaño en base al poder de análisis y el tamaño del efecto fue:

t tests - Means: Difference between two independent means (two groups)

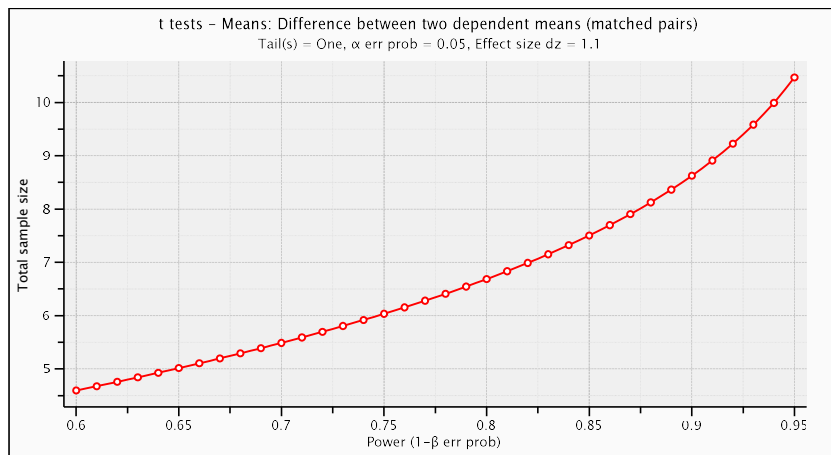
Analysis: A priori: Compute required sample size

Input: Tail(s) = Two
 Effect size dz = 2.6261287
 α err prob = 0.05
 Power (1- β err prob) = 0.95

Output: Noncentrality parameter δ = 4.1522741
 Critical t = 2.3060041
 Df = 8
 Sample size group 1 = 5
 Sample size group 2 = 5
 Total sample size = 10
 Actual power = 0.9513657



Análisis del tamaño de muestra:



3.5. Plan de análisis de datos

3.5.1. Estadística

Los datos obtenidos se procesaron mediante el software “*AriaMx HRM qPCR Software*” que interpreta la *melting curve* en la RT qPCR y de esta se obtuvo una cuantificación relativa de la expresión genética de los animales experimentales comparando los resultados con los de los animales control.

Además, se usó del software *GraphPad Prism 9.5* para el análisis estadístico secundario de la data obtenida.

3.5.2. Base de datos

Computadora de escritorio:

- Procesador: Ryzen 3 1200
- Tarjeta gráfica Radeon RX 570
- Ram 8 gb DDR4 a 2333Mhz
- Sistema Operativo Windows 10 pro
- Programa estadístico *GraphPad Prism 9.5*



CAPITULO IV: RESULTADOS

Para medir los niveles de expresión génica de GR, MR y CRHR1 hipocampales, de los ratones de diferentes cepas después de aplicar el modelo de restricción de nido, se realizaron ensayos de RT-qPCR en muestras de tejido recolectadas en dos momentos específicos de vida de los ratones (12 y 75 días de edad). El análisis se realizó a partir de los datos de los Ct obtenido del programa AriaMX con un *Threshold* de 0.010, estos valores se normalizaron a través del método de Taylor C. et al⁽³⁹⁾, posteriormente se llevó el análisis estadístico en GraphPad Prism 9.5.

4.1. Análisis experimental de la cepa BALB/c

4.1.1. Análisis de la expresión génica de GR hipocampal en cepas de ratones BALB/c en crías y adultos

Tabla 3: Expresión génica de GR hipocampal en hembras adultas y crías de la cepa de ratón BALB/c.

Cepa	Muestra	Media \pm Error Estándar	Desviación Estándar	p valor ($p \leq 0,05$)
BALB/c	Adultas	0.8670 \pm 0,3010	0.5213	0,4193
	(75 días)	Control	1 \pm 0,0006	0,0010
BALB/c	Crías	1,079 \pm 0,1448	0,2896	0,9709
	(12 días)	Control	0,9970 \pm 0,0017	0,0034

Nota. Resumen de la Expresión génica de GR hipocampal en hembras adultas (75 días) y crías (12 días) de la cepa de ratón BALB/c. Los datos muestran la Media (M) \pm Error Estándar (ES); Desviación Estándar (DS). Significancia estadística cuando $p < 0,05$ *diferente de Control; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. Cada grupo contó con 4 animales para el análisis.

La tabla 3 muestra la estimación de la expresión génica del receptor de GR en 3 réplicas biológicas de ratones BALB/c 75 días de edad y 4 réplicas biológicas



de ratones de 12 días de edad, sometidos a ELS. En las hembras adultas de 75 días de edad, se observó que la expresión génica de GR es un 28% menos con valor p de 0,4193 (Grafico 1), mientras que, en las hembras de 12 días de edad, no se observó un cambio en la expresión génica de GR con valor p de 0,9709 (Grafico 2). No se muestra una diferencia estadísticamente significativa en la expresión génica de GR para ninguno de los dos grupos.

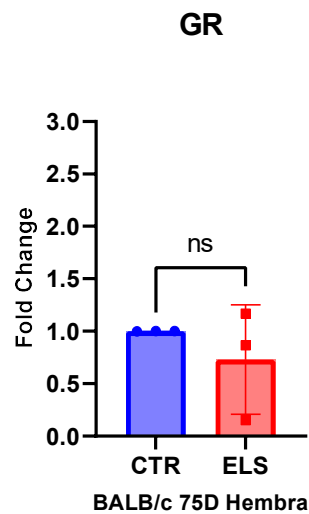


Gráfico 1: Expresión génica de GR en Hembras 75 días cepa BALB/c. BALB/c de 75 días: Control vs Experimental, Expresión génica de GR 28% menor, media y error estándar de 0.8670 ± 0.3010 , SD de 0.5213 y un $p > 0.05$.

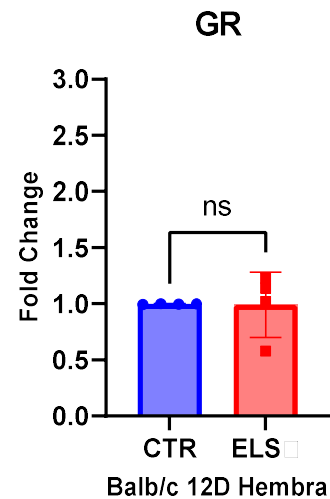


Gráfico 2: Expresión génica de GR en Hembras 12 días cepa BALB/c. BALB/c de 12 días: Control vs Experimental, Expresión génica no significativa de GR, media y error estándar de 1.029 ± 0.1448 , SD de 0.2896 y un valor $p > 0.05$.

Tabla 4: Expresión génica de GR hipocampal en machos adultos y crías de la cepa de ratón BALB/c.

Cepa	Muestra	Media ± Error	Desviación	p valor
BALB/c		Estándar	Estándar	(p ≤ 0,05)
Adultos (75 días)	Casos (ELS)	1,305 ± 2,965	5,132	0,3681
	Control	0,9990 ± 0,037	0,0064	ns
Crías (12 días)	Casos (ELS)	0,5050 ± 0,0662	0,1325	0,0005
	Control	0,9970 ± 0,0069	0,0138	***

Nota. Resumen de la Expresión génica de GR hipocampal en machos adultos (75 días) y crías (12 días) de la cepa de ratón BALB/c. Los datos muestran la Media (M) ± Error Estándar (ES); Desviación Estándar (DS). Significancia estadística cuando p < 0,05 *diferente de Control; * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001. Cada grupo contó con entre 3 y 4 animales para el análisis.

La tabla 4 muestra, 3 réplicas biológicas de ratones BALB/c machos adultos de 75 días de edad, donde se observó que la expresión génica de GR fue un 300% mayor con valor p de 0,3681 (Grafico 3); y 4 réplicas biológicas de ratones BALB/c machos de 12 días de vida, se observó que la expresión génica de GR fue un 47% menor con valor p de 0,0005 (Grafico 4). Mostrando una diferencia estadísticamente significativa para el grupo de machos de 12 días.

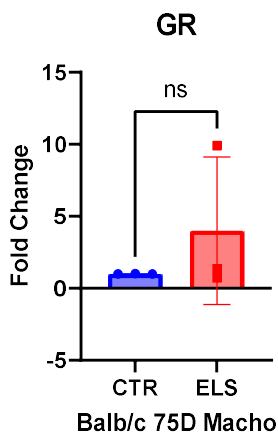


Gráfico 3: Expresión génica de GR en Macho 75 días cepa BALB/c. BALB/c de 75 días: Control vs Experimental, Expresión génica no significativa de GR, media y error estándar de 1,029 ± 0,1448, SD de 0,2896 y un valor p > 0,05.

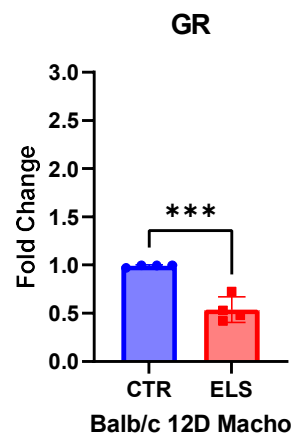


Gráfico 4: Expresión génica GR en Macho 12 días cepa BALB/c. BALB/c de 12 días: Control vs Experimental, Expresión génica de GR 47% menor media y error estándar de 0,5050 ± 0,06626, SD de 0,1325 y un valor p < 0,05.



4.1.2. Análisis de la expresión génica de MR en cepas de ratones BALB/c en crías y adultos

Tabla 5: Expresión génica de MR hipocampal en hembras adultas y crías de la cepa de ratón BALB/c.

Cepa	Muestra	Media ± Error	Desviación	p valor
BALB/c		Estándar	Estándar	(p ≤ 0,05)
Adultas (75 días)	Casos (ELS)	1,121 ± 0,0941	0,1630	0,2681
	Control	1,001 ± 0,0025	0,0037	ns
Crías (12 días)	Casos (ELS)	1,029 ± 0,1709	0,3418	0,7701
	Control	0,9960 ± 0,0015	0,0030	ns

Nota. Resumen de la Expresión génica de MR hipocampal en hembras adultas (75 días) y crías (12 días) de la cepa de ratón BALB/c. Los datos muestran la Media (M) ± Error Estándar (ES); Desviación Estándar (DS). Significancia estadística cuando p < 0,05 *diferente de Control; * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001. Cada grupo contó con 4 animales para el análisis.

La tabla 5 muestra la expresión génica del receptor de MR en 3 réplicas biológicas de ratones BALB/c 75 días de edad y 4 réplicas biológicas de ratones de 12 días de edad, sometidos a ELS. En las hembras adultas de 75 días de edad, se observó que la expresión génica de MR fue un 28% mayor con valor p de 0,2681 (Grafico 5), mientras que, en las hembras de 12 días de edad, no se observó un cambio significativo con valor de p de 0,7701 (Grafico 6). Aunque no se encontró una diferencia estadísticamente significativa en la expresión génica de MR en ninguno de los grupos.

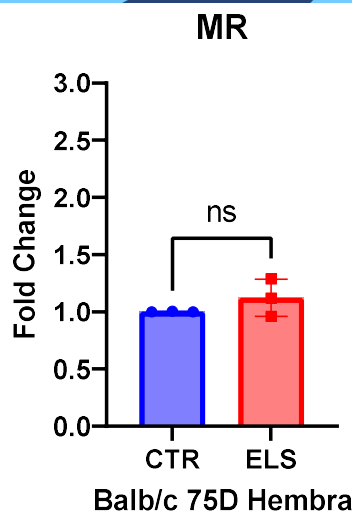


Gráfico 5: Expresión génica MR en Hembras 75 días cepa BALB/c. BALB/c de 75 días: Control vs Experimental, Expresión génica de MR 28% mayor, media y error estándar de $1,121 \pm 0,09412$, SD de $0,1630$ y valor $p > 0,05$.

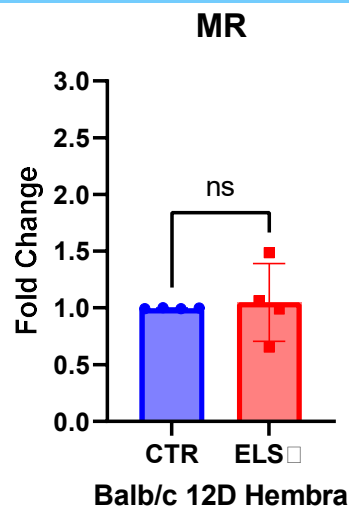


Gráfico 6: Expresión génica MR en Hembras 12 días cepa BALB/c. BALB/c de 12 días: Control vs Experimental, Expresión génica no significativa de MR, media y error estándar de $1,029 \pm 0,1709$, SD de $0,3418$ y valor de $p > 0,05$.

Tabla 6: Expresión génica de MR hipocampal en machos adultos y crías de la cepa de ratón BALB/c.

Cepa	Muestra	Media \pm Error Estándar	Desviación Estándar	p valor ($p \leq 0,05$)
BALB/c	Adultos (75 días)	1,977 \pm 0,3451	0,5978	0,0336
	Crías (12 días)	0,9890 \pm 0,0072	0,0125	*
BALB/c	Casos (ELS)	0,5425 \pm 0,0425	0,0851	< 0,001
	Control	0,9965 \pm 0,0066	0,0132	****

Nota. Resumen de la Expresión génica de MR hipocampal en machos adultos (75 días) y crías (12 días) de la cepa de ratón BALB/c. Los datos muestran la Media (M) \pm Error Estándar (ES); Desviación Estándar (DS). Significancia estadística cuando $p < 0,05$ *diferente de Control; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. Cada grupo contó con 4 animales para el análisis.

La tabla 6 muestra 3 réplicas biológicas de ratones BALB/c machos adultos de 75 días de edad, donde se observó que la expresión génica de MR fue un 108% mayor con valor p de 0,0336 (Gráfico 7); y 4 réplicas biológicas de ratones BALB/c machos de 12 días de edad, la expresión génica de MR fue un 44%

menor con valor p de 0,001 (Gráfico 8). Mostrando una diferencia estadísticamente significativa para ambos grupos.

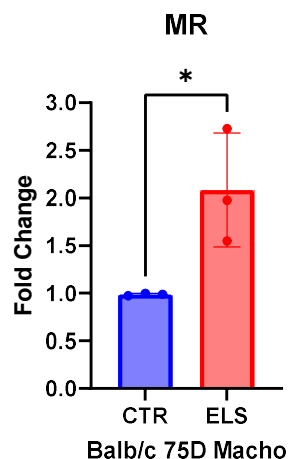


Gráfico 7: Expresión génica de MR en Macho 75 días cepa BALB/c. BALB/c de 75 días: Control vs Experimental, Expresión génica de MR 108% mayor con una media y error estándar de $1,977 \pm 0,3451$, SD de 0,5978 y $p < 0,05$.

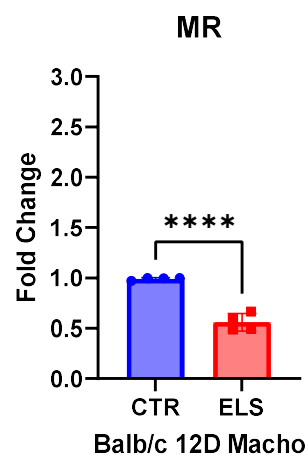


Gráfico 8: Expresión génica de MR en Macho 12 días cepa BALB/c. BALB/c de 12 días: Control vs Experimental, Expresión génica de MR 44% menor, media y error estándar de $0,5425 \pm 0,04258$, SD de 0,08516 y valor $p < 0,05$.

4.1.3. Análisis de la expresión génica de CRHR1 en cepas de ratones BALB/c en crías y adultos

Tabla 7: Expresión génica de CRHR1 hipocampal en hembras adultas y crías de la cepa de ratón BALB/c.

Cepa	Muestra	Media ± Error Estándar	Desviación Estándar	p valor ($p \leq 0,05$)
BALB/c	Adultas (75 días)			
	Casos (ELS)	$1,071 \pm 0,0960$	0,1664	0,8554
	Control	$1,000 \pm 0,0003$	0,0005	ns
BALB/c	Crías (12 días)			
	Casos (ELS)	$1,7050 \pm 0,1574$	0,3147	0,0091
	Control	$0,9970 \pm 0,0017$	0,0034	**

Nota. Resumen de la Expresión génica de CRHR1 hipocampal en hembras adultas (75 días) y crías (12 días) de la cepa de ratón BALB/c. Los datos muestran la Media (M) ± Error Estándar (ES); Desviación Estándar (DS). Significancia estadística cuando $p < 0,05$ *diferente de Control; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. Cada grupo contó con 4 animales para el análisis.



La tabla 7 muestra la estimación de la expresión génica del receptor de CRHR1 en 3 réplicas biológicas de ratones BALB/c 75 días de edad y 4 réplicas biológicas de ratones de 12 días de edad, sometidos a ELS. En las hembras adultas de 75 días de edad, no se observó cambio significativo en la expresión génica de CRHR1 un con valor p de 0,8554 (Grafico 9), mientras que, en las hembras de 12 días de edad, la expresión génica de CRHR1 fue un 59% mayor con valor de p de 0,0091 (Grafico 10). Mostrando una diferencia estadísticamente significativa en la expresión génica de CRHR1 solo para el grupo de hembras de 12 días.

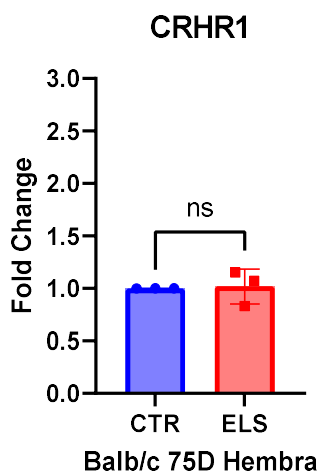


Gráfico 9: Expresión CRHR1 en Hembras 75 días cepa BALB/c. BALB/c de 75 días: Control vs Experimental, Expresión génica no significativa de CRHR1, media y error estándar de $1,071 \pm 0,09606$, SD de 0,1664 y valor $p > 0,05$.

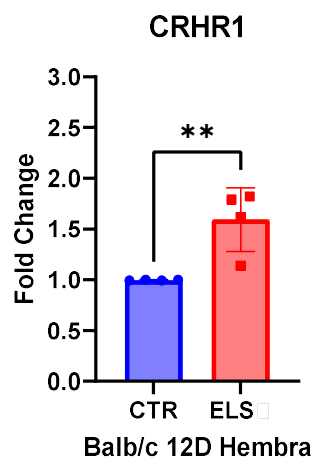


Gráfico 10: Expresión CRHR1 en Hembras 12 días cepa BALB/c. BALB/c de 12 días: Control vs Experimental, Expresión génica 59% mayor de CRHR1, media y error estándar de $1,705 \pm 0,1574$, SD de 0,3147 y valor $p < 0,05$.

Tabla 8: Expresión génica de CRHR1 hipocampal en machos adultos y crías de la cepa de ratón BALB/c.

Cepa	Muestra	Media ± Error	Desviación	p valor
BALB/c		Estándar	Estándar	(p ≤ 0,05)
Adultos	Casos (ELS)	1,556 ± 0,5603	0,9704	0,1879
(75 días)	Control	0,9890 ± 0,0072	0,0125	ns
Crías	Casos (ELS)	0,6880 ± 0,0811	0,1406	0,0143
(12 días)	Control	0,9950 ± 0,0088	0,0153	*

Nota. Resumen de la Expresión génica de CRHR1 hipocampal en machos adultos (75 días) y crías (12 días) de la cepa de ratón BALB/C. Los datos muestran la Media (M) ± Error Estándar (ES); Desviación Estándar (DS). Significancia estadística cuando p < 0,05 *diferente de Control; * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001. Cada grupo contó con 4 animales para el análisis.

La tabla 8 muestra, 3 réplicas biológicas de ratones BALB/c machos adultos de 75 días de edad, donde se observó que la expresión génica de CRHR1 fue un 87% mayor con valor p de 0,1879 (Grafico 11); y 4 réplicas biológicas de ratones BALB/c machos de 12 días de edad, la expresión génica de CRHR1 fue un 44% menor con valor p 0,1406 (Grafico 12). Mostrando una diferencia estadísticamente significativa en la expresión génica de CRHR1 solo para el grupo de machos de 12 día

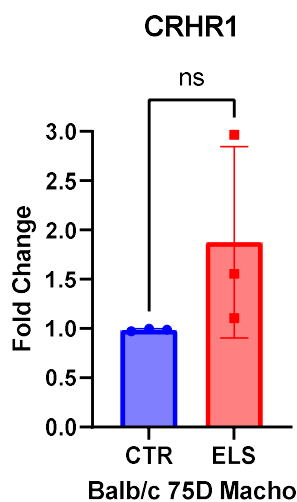


Gráfico 11: Expresión génica CRHR1 en Macho 75 días cepa BALB/c. BALB/c de 75 días: Control vs Experimental, Expresión génica no significativa de CRHR1, media y error estándar de 1,071 ± 0,09606, SD de 0,1664 y valor p > 0,05.

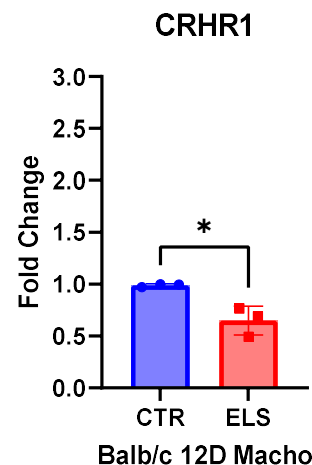


Gráfico 12: Expresión génica CRHR1 en Macho 12 días cepa BALB/c. BALB/c de 12 días: Control vs Experimental, Expresión génica de CRHR1 44% menor, media y error estándar de 0,6880 ± 0,08118, SD de 0,1406 y valor p < 0,05.



4.2. Análisis experimental en la cepa C57BL/6NCrI

4.2.1. Análisis de la expresión génica de GR en cepas de ratones C57BL/6NCrI en crías y adultos

Tabla 9: Expresión génica de GR hipocampal en hembras adultas y crías de la cepa de ratón C57BL/6NCrI.

Cepa	Muestra	Media \pm Error	Desviación	p valor
C57BL/6NCrI		Estándar	Estándar	($p \leq 0,05$)
Adultas (75 días)	Casos (ELS)	1,110 \pm 0,0538	0,1318	0,0110
	Control	1,000 \pm 0,0001	0,0004	*
Crías (12 días)	Casos (ELS)	1,126 \pm 0,1980	0,4850	0,1098
	Control	1,000 \pm 0,0006	0,0016	ns

Nota. Resumen de la Expresión génica de GR hipocampal en hembras adultas (75 días) y crías (12 días) de la cepa de ratón C57BL/6NCrI. Los datos muestran la Media (M) \pm Error Estándar (ES); Desviación Estándar (DS). Significancia estadística cuando $p < 0,05$ *diferente de Control; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. Cada grupo contó con 6 animales para el análisis.

La tabla 9 muestra la estimación de la expresión génica del receptor de GR en 6 réplicas biológicas de ratones C57BL/6NCrI 75 días de edad y 6 réplicas biológicas de ratones de 12 días de edad, sometidos a ELS. En las hembras adultas de 75 días de edad, se observó una expresión génica de GR 16% mayor con valor p de 0,0110 (Grafico 13), mientras que, en las hembras de 12 días de edad, la expresión génica de GR fue un 34% mayor con valor p de 0,1098 (Grafico 14). Mostrando una diferencia estadísticamente significativa para la expresión génica de GR para el grupo de hembras de 75 días.

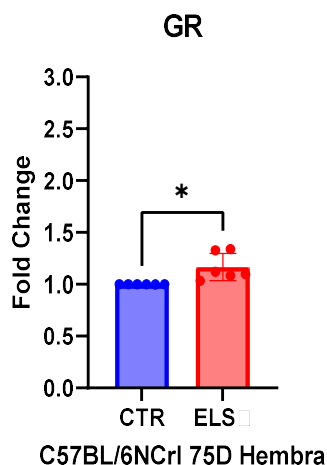


Gráfico 13: Expresión génica GR en Hembra 75 días cepa C57BL/6NCrI. C57BL/6NCrI de 75 días: Control vs Experimental, Expresión génica de GR 16% mayor, media y error estándar de $1,110 \pm 0,0538$, SD de 0,1318 y valor $p < 0,05$.

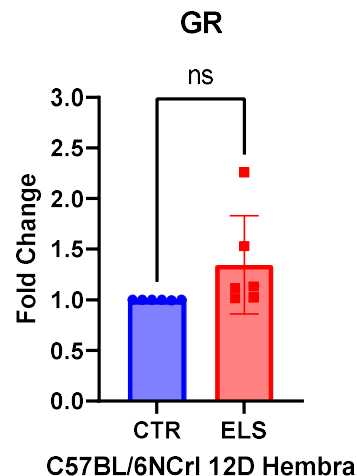


Gráfico 14: Expresión génica GR en Hembra 12 días cepa C57BL/6NCrI. C57BL/6NCrI de 12 días: Control vs Experimental, Expresión génica de GR 34% mayor, media y error estándar de $1,126 \pm 0,1980$, SD de 0,4850 y valor $p > 0,05$.

Tabla 10: Expresión génica de GR hipocampal en machos adultos y crías de la cepa de ratón C57BL/6NCrI.

Cepa	Muestra	Media \pm Error	Desviación	p valor
C57BL/6NCrI		Estándar	Estándar	($p \leq 0,05$)
Adultos (75 días)	Casos (ELS)	$0,9970 \pm 0,0671$	0,1502	0,9494
	Control	$1,000 \pm 0,0008$	0,0017	ns
Crías (12 días)	Casos (ELS)	$1,558 \pm 0,1417$	0,3169	0,0289
	Control	$1,000 \pm 0,0004$	0,0008	*

Nota. Resumen de la Expresión génica de GR hipocampal en machos adultos (75 días) y crías (12 días) de la cepa de ratón C57BL/6NCrI. Los datos muestran la Media (M) \pm Error Estándar (ES); Desviación Estándar (DS). Significancia estadística cuando $p < 0,05$ *diferente de Control; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. Cada grupo contó con 6 animales para el análisis.

La tabla 10 muestra, 6 réplicas biológicas de ratones C57BL/6NCrI machos adultos de 75 días de edad, donde no se observó una diferencia significativa para expresión génica de GR con valor p de 0,9494 (Gráfico 15); y 6 réplicas biológicas de ratones C57BL/6NCrI machos de 12 días de edad, donde la

expresión génica de GR fue un 37% mayor con valor p de 0,0289 (Gráfico 16).

Mostrando una diferencia estadísticamente significativa para la expresión génica de GR solo para el grupo de machos de 12 días.

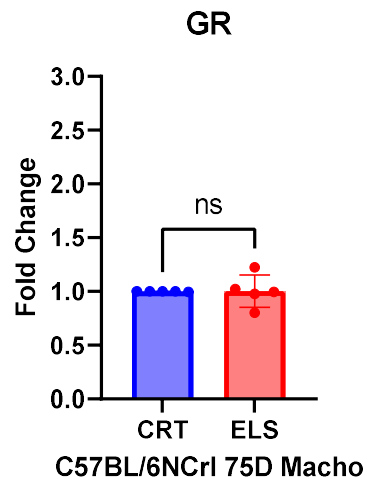


Gráfico 15: Expresión génica GR en Machos 75 días cepa C57BL/6NCrI C57BL/6NCrI de 75 días: Control vs Experimental, Expresión génica no significativa de GR, media y error estándar de 0,9970 ± 0,06719, SD de 0,1502 y un valor p > 0,05.

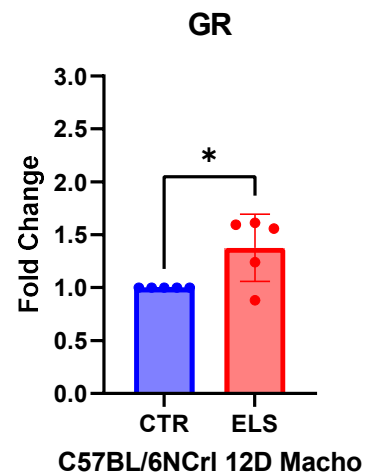


Gráfico 16: Expresión génica GR en Macho 12 días cepa C57BL/6NCrI C57BL/6NCrI de 12 días: Control vs Experimental, Expresión génica de GR 37% mayor, media y error estándar de 1,558 ± 0,1417, SD de 0,3169 y valor p < 0,05.



4.2.2. Análisis de la expresión génica de MR en cepas de ratones C57BL/6NCrI en crías y adultos

Tabla 11: Expresión génica de MR hipocampal en hembras adultas y crías de la cepa de ratón C57BL/6NCrI.

Cepa	Muestra	Media ± Error	Desviación	p valor
C57BL/6NCrI		Estándar	Estándar	($p \leq 0,05$)
Adultas (75 días)	Casos (ELS)	1,311 ± 0,0894	0,2192	0,0349
	Control	1,000 ± 0,0002	0,0006	*
Crías (12 días)	Casos (ELS)	1,450 ± 0,1557	0,3813	0,0066
	Control	1,000 ± 0,0009	0,0024	**

Nota. Resumen de la Expresión génica de MR hipocampal en hembras adultas (75 días) y crías (12 días) de la cepa de ratón C57BL/6NCrI. Los datos muestran la Media (M) ± Error Estándar (ES); Desviación Estándar (DS). Significancia estadística cuando $p < 0,05$ *diferente de Control; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. Cada grupo contó con 6 animales para el análisis.

La tabla 11 muestra la estimación de la expresión génica del receptor de MR en 6 réplicas biológicas de ratones C57BL/6NCrI 75 días de edad y 6 réplicas biológicas de ratones de 12 días de edad, sometidos a ELS. En las hembras adultas de 75 días de edad, se observó que la expresión génica de MR fue un 21% mayor con valor p de 0,0349 (Grafico 17), mientras que, en las hembras de 12 días de edad, la expresión génica de MR fue un 53% mayor con valor p de 0,0066 (Grafico 18). Mostrando una diferencia estadísticamente significativa en la expresión génica de MR para ambos grupos.

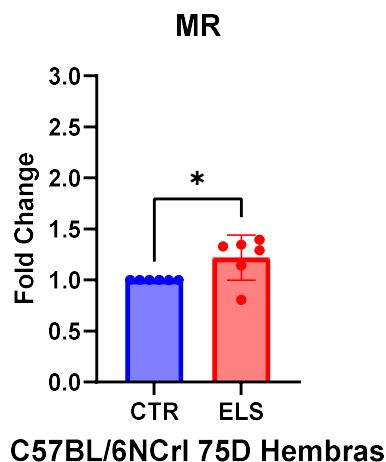


Gráfico 17: Expresión génica MR en Hembras 75 días cepa C57BL/6NCrI. C57BL/6NCrI de 75 días: Control vs Experimental, Expresión génica de MR 21% mayor, media y error estándar de $1,311 \pm 0,08949$, SD de $0,2192$ y valor $p < 0,05$.

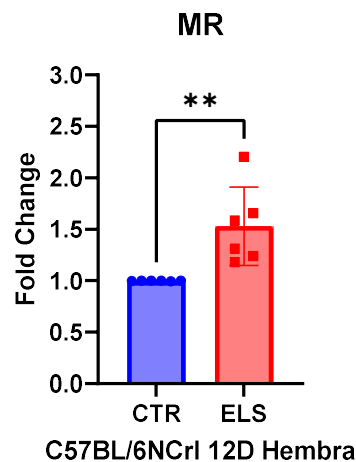


Gráfico 18: Expresión génica MR en Hembra 12 días cepa C57BL/6NCrI. C57BL/6NCrI de 12 días: Control vs Experimental, Expresión génica de MR 53% mayor, media y error estándar de $1,450 \pm 0,1557$, SD de $0,3813$ y valor $p < 0,05$.

Tabla 12: Expresión génica de MR hipocampal en machos adultos y crías de la cepa de ratón C57BL/6NCrI.

Cepa	Muestra	Media \pm Error	Desviación	p valor
C57BL/6NCrI		Estándar	Estándar	($p \leq 0,05$)
Adultos (75 días)	Casos (ELS)	$1,025 \pm 0,0494$	0,1106	0,1847
	Control	$1,000 \pm 0,0008$	0,0017	ns
Crías (12 días)	Casos (ELS)	$1,025 \pm 0,1096$	0,2685	0,2838
	Control	$1,001 \pm 0,0004$	0,0010	ns

Nota. Resumen de la Expresión génica de MR hipocampal en machos adultos (75 días) y crías (12 días) de la cepa de ratón C57BL/6NCrI. Los datos muestran la Media (M) \pm Error Estándar (ES); Desviación Estándar (DS). Significancia estadística cuando $p < 0,05$ *diferente de Control; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. Cada grupo contó con 6 animales para el análisis.

La tabla 12 muestra, 6 réplicas biológicas de ratones C57BL/6NCrI machos adultos de 75 días de edad, no se observó cambio significativo alguno en la expresión génica de MR con valor p de 0,1847 (Gráfico 19); y 6 réplicas biológicas de ratones C57BL/6NCrI machos de 12 días de edad, la expresión génica de MR fue un 12% mayor con valor p de 0,2838 (Gráfico 20). Aunque

no se detectó una diferencia estadísticamente significativa en la expresión génica de MR en ninguno de los grupos.

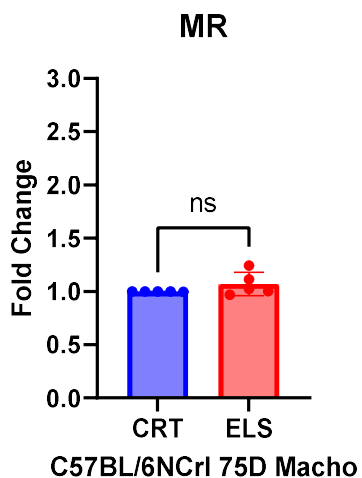


Gráfico 19: Expresión génica de MR en Machos 75 días cepa C57BL/6NCr1. C57BL/6NCr1 de 75 días: Control vs Experimental, Expresión no significativa de MR, media y error estándar de $1,025 \pm 0,04946$, SD de $0,1106$ y valor $p > 0,05$.

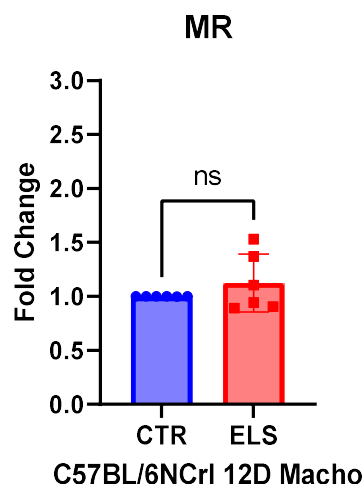


Gráfico 20: Expresión génica de MR en Macho 12 días cepa C57BL/6NCr1. C57BL/6NCr1 de 12 días: Control vs Experimental, Expresión no significativa de MR, media y error estándar de $1,025 \pm 0,1096$, SD de $0,2685$ y valor $p > 0,05$.

4.2.3. Análisis de la expresión génica de CRHR1 en cepas de ratones

C57BL/6NCr1 en crías y adultos

Tabla 13: Expresión génica de CRHR1 hipocampal en hembras adultas y crías de la cepa de ratón C57BL/6NCr1.

Cepa	Muestra	Media \pm Error Estándar	Desviación Estándar	p valor ($p \leq 0,05$)
C57BL/6NCr1	Adultas			
	Casos (ELS)	$1,360 \pm 0,0915$	0,2242	0,0113
	(75 días)			
	Control	$1,000 \pm 0,0002$	0,0006	*
C57BL/6NCr1	Crías			
	Casos (ELS)	$1,883 \pm 0,3456$	0,8466	0,0165
	(12 días)			
	Control	$1,000 \pm 0,0008$	0,0020	*

Nota. Resumen de la Expresión génica de CRHR1 hipocampal en hembras adultas (75 días) y crías (12 días) de la cepa de ratón C57BL/6NCr1. Los datos muestran la Media (M) \pm Error Estándar (ES); Desviación Estándar (DS). Significancia estadística cuando $p < 0,05$ *diferente de Control; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. Cada grupo contó con 6 animales para el análisis.



La tabla 13 muestra la estimación de la expresión génica del receptor de CRHR1 en 6 réplicas biológicas de ratones C57BL/6NCrI 75 días de edad y 6 réplicas biológicas de ratones de 12 días de edad, sometidos a ELS. En las hembras adultas de 75 días de edad, se observó que la expresión génica de CRHR1 fue un 28% mayor con valor p de 0,0113 (Grafico 21), mientras que, en las hembras de 12 días de edad, la expresión génica de CRHR1 fue un 99% mayor con valor p de 0,0165 (Grafico 22). Mostrando una diferencia estadísticamente significativa para la expresión génica de CRHR1 ambos grupos.

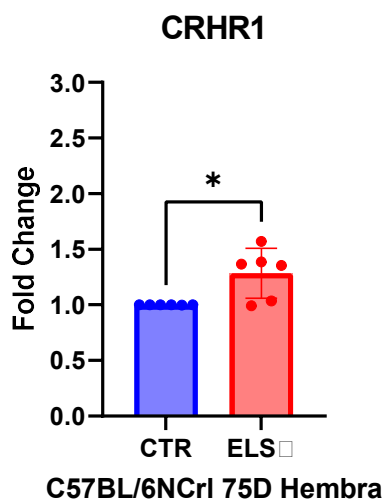


Gráfico 21: Expresión génica CRHR1 en Hembras 75 días cepa C57BL/6NCrI. C57BL/6NCrI de 75 días: Control vs Experimental, Expresión génica de CRHR1 28% mayor, media y error estándar de $1,360 \pm 0,09155$, SD de 0,2242 y valor $p < 0,05$.

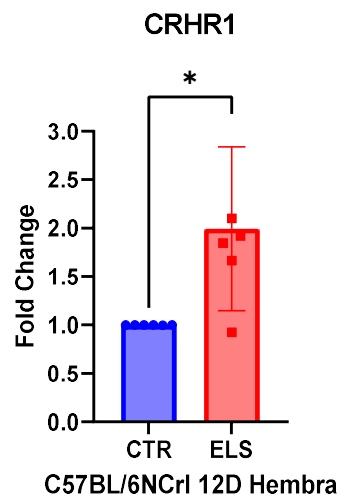


Gráfico 22: Expresión génica CRHR1 en Hembra 12 días cepa C57BL/6NCrI. C57BL/6NCrI de 12 días: Control vs Experimental, Expresión génica de CRHR1 99 % mayor, media y error estándar de $1,883 \pm 0,3456$, SD de 0,8466 y valor $p < 0,05$.



Tabla 14: Expresión génica de CRHR1 hipocampal en machos adultos y crías de la cepa de ratón C57BL/6NCrI.

Cepa	Muestra	Media ± Error	Desviación	p valor
C57BL/6NCrI		Estándar	Estándar	(p ≤ 0,05)
Adultos (75 días)	Casos (ELS)	0,1770 ± 0,1193	0,2668	0,0473
	Control	1,000 ± 0,0004	0,0008	*
Crías (12 días)	Casos (ELS)	1,362 ± 0,1861	0,4559	0,0263
	Control	1,000 ± 0,0001	0,0004	*

Nota. Resumen de la Expresión génica de CRHR1 hipocampal en machos adultos (75 días) y crías (12 días) de la cepa de ratón C57BL/6NCrI. Los datos muestran la Media (M) ± Error Estándar (ES); Desviación Estándar (DS). Significancia estadística cuando p < 0,05 *diferente de Control; * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001. Cada grupo contó con 6 animales para el análisis.

La tabla 14 muestra, 6 réplicas biológicas de ratones C57BL/6NCrI machos adultos de 75 días de edad, se estimó una disminución de la expresión génica de CRHR1 en un 28% con valor p de 0,0473 (Grafico 23); y 6 réplicas biológicas de ratones C57BL/6NCrI machos de 12 días de edad, la expresión génica de CRHR1 fue un 48% mayor con valor p de 0,0263 (Grafico 24). Mostrando una diferencia estadísticamente significativa para expresión génica de CRHR1 ambos grupos.

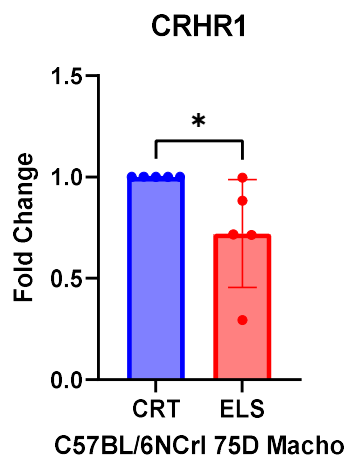


Gráfico 23: Expresión génica de CRHR1 en Machos 75 días cepa C57BL/6NCrI. C57BL/6NCrI de 12 días: Control vs Experimental, Expresión génica de CRHR1 28 % menos, media y error estándar de $0,7170 \pm 0,1193$, SD de 0,2668 y valor $p < 0,05$.

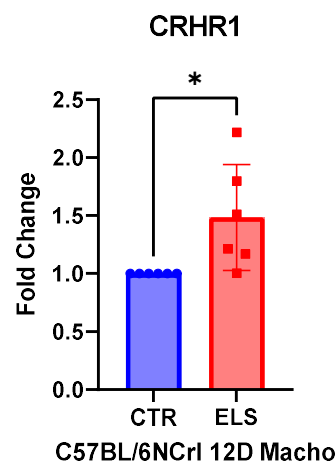


Gráfico 24: Expresión génica de CRHR1 en Macho 12 días cepa C57BL/6NCrI C57BL/6NCrI de 75 días: Control vs Experimental, Expresión génica de CRHR1 48% mayor, media y error estándar de $1,362 \pm 0,1861$, SD de 0,4559 y valor $p < 0,05$.

Tabla 15: Consolidación de datos.

Genero	BALB/c		C57BL/6NCrI	
	Hembra	Macho	Hembra	Macho
12 días – GR	F.C: 0,992	F.C: 0,539	F.C: 1,347	F.C: 1,377
	p valor: 0,9709	p valor: 0,0005	p valor: 0,1098	p valor: 0,0289
12 días – MR	F.C: 1,049	F.C: 0,5600	F.C: 1,531	F.C: 1,125
	p valor: 0,7701	p valor: <0,001	p valor: 0,0066	p valor: 0,2838
12 días – CRHR1	F.C: 1,593	F.C: 0,6490	F.C: 1,993	F.C: 1,485
	p valor: 0,0091	p valor: 0,0143	p valor: 0,0165	p valor: 0,0263
75 días – GR	F.C: 0,7293	F.C: 3,999	F.C: 1,167	F.C: 1,004
	p valor: 0,4193	p valor: 0,3681	p valor: 0,0110	p valor: 0,0671
75 días – MR	F.C: 1,288	F.C: 2,085	F.C: 1,218	F.C: 1,071
	p valor: 0,2681	p valor: 0,0336	p valor: 0,0349	p valor: 0,1847
75 días – CRHR1	F.C: 1,018	F.C: 1,876	F.C: 1,283	F.C: 0,7216
	p valor: 0,8554	p valor: 0,1879	p valor: 0,0113	p valor: 0,0473

La siguiente tabla, consolida todos los datos obtenidos. Mostrando el Fold Change (F.C) y el p valor para cada grupo experimental



CAPITULO V: DISCUSIÓN

5.1. Descripción de los hallazgos más relevantes y significativos

- Todos los animales de experimentación presentaron cambios en la expresión génica de GR, MR y CRHR1 a los 12 días de vida debido al modelo de estrés utilizado.
- A los 12 días de edad, se observaron diferencias en la expresión génica de los receptores en distintas cepas y sexos. Los machos en la cepa BALB/c mostraron disminución del 50% en promedio, en la expresión génica de MR y CRHR1, mientras que las hembras de la cepa C57BL/6NCrI expresaron un 53% ($p:0,0066$) y 99% ($p:0,0165$) más, respectivamente en comparación con los controles.
- A los 75 días de edad, se observaron cambios génicos más resaltantes en los machos de la cepa BALB/c y las hembras de la cepa C57BL/6NCrI, con una sobreexpresión de los receptores en estudio, aunque en proporciones diferentes. La sobre expresión fue mayor en la cepa BALB/c, en contraste con la expresión disminuida observada a los 12 días.
- Existe una diferencia significativa en cómo cada cepa responde al ELS. Los machos de la cepa BALB/c expuestos al estresor en la edad adulta mostraron una sobre expresión del 108% ($p:0,0336$) y 87% ($p:0,1879$) en MR y CRHR1, respectivamente, indicando quizás una adaptación más radical al ELS en comparación con la cepa C57BL/6NCrI, la cual también exhibe sobre expresión de los receptores en cuestión, sin embargo, esta no es tan elevada a los 75 días.
- Se observaron diferencias importantes entre los sexos de cada cepa en su respuesta al estresor. En la cepa BALB/c, las hembras parecen ser más resilientes al ELS por restricción de nido, aunque se necesitan más datos para obtener conclusiones definitivas. Por otro lado, en la cepa C57BL/6NCrI se evidencian dos mecanismos



distintos de adaptación al ELS, donde los machos parecen ser más resilientes al estrés y presentan cambios permanentes solo en la expresión génica de CRHR1, mientras que las hembras muestran una adaptación más sostenida en el tiempo, con niveles relativamente estables de GR y MR a los 12 y 75 días de edad.

5.2. Limitaciones del estudio

- En trabajos de investigación previos son escasos y no permiten hacer una correcta comparación con los datos obtenidos, además que la literatura consultada muestra resultados contrastantes dependiendo del autor, la cepa usada, el estresor y el medio ambiente en el que se desarrolla el experimento.
- Las condiciones y el tiempo para la reproducción de los animales fueron limitada debido a la coexistencia de otros trabajos de investigación simultáneos.
- La curva de aprendizaje de la técnica de RTqPCR usadas en este estudio fue bastante difícil debido al limitado tiempo que exige la experimentación.
- La correcta calibración de los pasos para obtener muestras apropiada de ARN fue tediosa y desafiante en todo su proceso.

5.3. Comparación crítica con la literatura existente

La restricción de nido es un modelo ampliamente utilizado para investigar los efectos del estrés temprano en roedores. En este estudio se usó este modelo para intentar entender cómo el estrés en la vida temprana puede tener un impacto duradero en la expresión génica de GR, MR y CRHR1 en el hipocampo, es así que la restricción de nido ha sido utilizada en ratones las cepas C57BL/6NCrl y BALB/c, para investigar posibles diferencias genéticas en las respuestas al estrés temprano.



Según van Bodegom (Holanda, 2017) varios estudios investigaron los efectos de la restricción de nido en la expresión génica del receptor de glucocorticoides (GR) en el hipocampo de ratones C57BL/6J y ratas durante diferentes etapas de desarrollo, observando que la restricción de nido aumenta la expresión génica del GR en el hipocampo de ratones C57BL/6J en la etapa de desarrollo temprano, lo que puede afectar la sensibilidad del eje HPA al estrés ⁽⁴⁰⁾, estos datos concuerdan con los obtenidos en las hembras y machos de la cepa C57BL/6NCrI la cual expresa entre un 34% y 37% más de GR durante la edad temprana pero persiste moderadamente elevada en un 16% en las hembras de esta cepa. Por otro lado, en ratones BALB/c, los efectos de la restricción de nido en la expresión génica de GR, son menos claros en hembras e invertida en machos, donde estos últimos disminuyen la expresión génica de GR en un 44% durante la edad temprana y parece elevarse durante la edad adulta, sin embargo, se requiere más investigaciones para comprender plenamente este fenómeno y los mecanismos subyacentes. Se ha sugerido que las diferencias en la respuesta del GR y los otros receptores en estudio, a la restricción de nido podrían estar relacionadas con las variaciones genéticas entre las cepas de ratones y su capacidad para adaptarse a condiciones estresantes ⁽⁴⁰⁾.

Bath K. (Estados Unidos, 2016) y van Bodegom (Holanda, 2017) demostraron que la restricción de nido también ha sido asociada con cambios en la expresión génica del receptor de mineralocorticoides (MR) en el hipocampo de ratones ⁽¹⁷⁾⁽⁴⁰⁾, esta información tiene correlación con este estudio, observándose un aumento en la expresión génica de MR de un 53% ($p : 0,0066$), en el hipocampo de ratones C57BL/6NCrI hembras, durante la etapa de desarrollo temprano, aunque estos también describen comportamientos distintos dependiendo de las condiciones, por otra parte, estos resultados podrían tener implicaciones en la regulación de la



respuesta al estrés⁽⁴⁰⁾. Se podría afirmar que este aumento en la expresión génica del MR podría estar relacionado con una mayor capacidad de los ratones para hacer frente al estrés en etapas tempranas de la vida sin embargo esta elevación en la expresión solo se mantiene durante la adultez en un 21% ($p : 0,0311$), para las hembras de esta especie, quizá adaptándolas más a un medio ambiente estresante, mientras que los machos podrían tener un grado de resiliencia mayor ante el ELS, aunque estos resultados demuestran la necesidad de explorar más, o de distinta manera esta peculiaridad en machos de esta cepa. Por otra parte, van Bodegom (Holanda, 2017) observa que la elevación del MR es un cambio adaptativo que puede hacer más responsivos a los ratones ante el estrés ⁽⁴⁰⁾, por lo que en este trabajo se observa en los ratones machos BALB/c, una disminución del 44% ($p : < 0,001$) de la expresión génica del MR en la edad temprana y que esta se eleva drásticamente en la adultez hasta un 108% ($p : 0,0336$), podría sugerir que estos animales han generado cambios adaptativos que les permita ser más reactivos ante el ELS y además de forma permanentes.

El CRHR1 es otro receptor relacionado con el estrés que ha sido investigado en este estudio en el contexto de la restricción de nido. Van Bodegom (Holanda, 2017) y Liao XM (China, 2014) observaron el papel modulador del CRHR1 en el desarrollo neuronal hipocampal a nivel morfofisiológico, dato que tiene importancia al observar que la restricción de nido en este proyecto aumento la expresión génica de CRHR1 en el hipocampo de ratones C57BL/6NCrl entre un 48% ($p : 0,0263$) a un 99% ($p : 0,0165$) para machos y hembras respectivamente, a los 12 días y un 28% ($p : 0,0113$) para hembras a los 75 días, lo que puede estar relacionado con una mayor sensibilidad del eje HPA al estrés en la vida adulta⁽¹¹⁾⁽³⁶⁾, además puede que esta cepa haya tenidos mayores cambios morfofisiológicos en su estructura hipotalámica, aunque para



afirmar esto, se necesitarían estudios citológicos más profundos. Por otro lado, en ratones BALB/c, los efectos de la restricción de nido en la expresión génica de CRHR1 parecen ser menos consistentes y dependen del género, aunque ciertamente el ELS afecta drásticamente su expresión génica en edades tempranas donde en hembras la expresión génica aumenta un 59%(p: 0,0091), mientras que para machos la expresión génica disminuye un 46%(p: 0,01406), pese a que aparentemente estos cambios no se mantienen en la edad adulta, y por ello faltaría explorar de mejor manera este aspecto para dar una apreciación adecuada. Sin embargo y en conclusión se pueden observar 4 patrones distintos de adaptación.

Bath K. (Holanda, 2016) en su meta-análisis y Bath KG (Estados Unidos, 2017) observó que la restricción de nido puede tener efectos diferentes en la expresión génica de receptores del estrés en el hipocampo en ratones de diferentes géneros. Este estudio describe cambios en la expresión de los genes estudiados, y que estos tienen estrecha relación con su sexo^(40,16). Por ejemplo, en ratones de la cepa C57BL/6NCrI, se ha observado un aumento en la expresión génica de CRHR1 para ambos géneros a los 12 días, sin embargo este aumento es mayor en las hembras de esta cepa hasta en un 99%(p: 0,0165), frente al 48%(p: 0,0263) de aumento que presentan los machos y además este cambio parece tener consecuencias a largo plazo, estos cambios podrían sugerir que las hembras de esta cepa se adaptan a un medio de estrés, mientras que los machos son más resilientes ante este estresor, sin embargo para afirmarlo sería necesario complementar los estudios con test comportamentales. Por otro lado, en ratones machos de la cepa BALB/c, se observó una tendencia importante al incremento en la expresión génica de GR, MR y CRHR1, aunque los resultados no sean estadísticamente significativos, en respuesta a la restricción de nido en la edad adulta, mientras que en ratones hembras de la misma cepa no se han observado



cambios significativos de la expresión génica de estos receptores. Estos hallazgos sugieren que las respuestas de los receptores del estrés a la restricción de nido pueden estar influenciadas por el género de los ratones y que se requiere ampliar los estudios para comprender las diferencias de género en la respuesta al estrés temprano.

5.4. Implicaciones del estudio

Este estudio revela la importancia de los receptores de glucocorticoides (GR), mineralocorticoides (MR) y CRHR1 en la respuesta al ELS en distintas cepas y sexos, lo cual puede tener relevancia en el entendimiento de los mecanismos neurobiológicos involucrados en la adaptación al estrés. Además, destaca que la respuesta al ELS varía según la cepa y el sexo de los animales, esto puede tener impacto en la interpretación de estudios previos y en el diseño de futuras investigaciones en el campo del ELS.

Asimismo, sugiere que distintas cepas de animales de experimentación pueden tener respuestas diferentes a un mismo estresor, por ello esto tiene importancia en la selección de cepas para estudios de ELS y en la extrapolación de resultados a diferentes poblaciones animales o humanas.

Este estudio también destaca la importancia de considerar la expresión génica de distintos receptores de estrés de forma conjunta, ya que se observaron patrones de expresión diferenciales en distintos ratones y sexos, teniendo importancia en la comprensión y complejidad de los mecanismos ante el ELS, y en la identificación de posibles blancos terapéuticos.

Este estudio aporta al entendimiento de los mecanismos biológicos subyacentes a la respuesta al ELS, pudiendo direccionar de mejor manera el desarrollo de intervenciones farmacológicas o terapéuticas centradas en la regulación de los



receptores de estrés en distintas condiciones patológicas. Además, resalta la necesidad de seguir estudiando y ahondando en la comprensión de los mecanismos neurobiológicos y genéticos involucrados en la respuesta al ELS, pudiendo ser puerta de inicio en el desarrollo de nuevas estrategias de prevención y tratamiento de trastornos relacionados con el ELS, así como en la promoción de la salud mental en general.

Por último, esta investigación destaca la necesidad de seguir aportando mediante la investigación en el campo del estrés en la vida temprana, con una visión integradora que consideren la variabilidad biológica, la influencia de factores genéticos y el papel del sexo en la respuesta al estrés. Esto puede ayudar a alcanzar una comprensión más profunda de los mecanismos neurobiológicos y genéticos involucrados en la respuesta al ELS, y de esta manera intervenir en el desarrollo de una nueva terapéutica más precisa y efectiva para trastornos relacionados con el ELS en humanos.



CONCLUSIONES

- Los sujetos de estudio que presentaron más cambios en la expresión génica fueron los ratones BALB/c machos los cuales a los 12 días expresaron una disminución importante de la expresión de GR, MR y CRHR1 en un 47% ($p:0,0005$), 43% ($p:<0,001$) y 36% ($p:0,0143$) respectivamente y a los 75 días un aumento en la expresión génica de MR y CRHR1 en un 108% ($p:0,0336$) y 87% ($p:0,1879$) respectivamente. Por otra parte, en la cepa C57BL/6NCrI, las hembras tuvieron los cambios más significativos, observándose a los 12 días un aumento en la expresión de MR y CRHR1 en un 53% ($p:0,0066$) y 99% ($p:0,0165$) respectivamente, cambios que se mantuvieron moderadamente a los 75 días observándose un aumento en la expresión de GR, MR y CRHR1 en un 16% ($p:0,011$), 21% ($p:0,0349$) y 28% ($p:0,0113$) respectivamente.
- El ELS demostró cambiar de forma consistente la expresión génica de los receptores de glucocorticoides, mineralocorticoides, y CRHR1 frente a sus grupos controles, aunque esta variación en la expresión es dependiente de la cepa, el sexo y la edad.
- La identificación de estas diferencias en la expresión de receptores de estrés puede tener implicancias en el entendimiento de los procesos de adaptación y resiliencia al estrés, en la innovación de estrategias preventivas y tratamiento de los trastornos relacionados con el ELS en humanos.
- Entre los animales estudiados, los machos de la cepa BALB/c y las hembras de la cepa C57BL/6NCrI demostraron ser buenos candidatos para experimentación futura y desarrollo terapéutico, al tener cambios marcados en su expresión génica, los cuales pueden servir de referencia para estudios futuros.



- El estudio en la cepa C57BL/6NCr1 demostró tener cambios consistentes tanto en el presente estudio como en la bibliografía consultada, por lo que se puede inferir que las condiciones de experimentación en altura no tienen una influencia apreciable sobre los animales de experimentación al observarse resultados similares.



RECOMENDACIONES

- Considerar la variabilidad biológica, genética y de sexo en la investigación y el diseño de intervenciones terapéuticas relacionadas con el ELS: Dado que la respuesta al ELS es un proceso complejo y puede variar entre individuos debido a la genética y otros factores biológicos, es importante tener en cuenta esta variabilidad en la investigación y el diseño de intervenciones terapéuticas. Esto significa que es necesario considerar una terapéutica personalizada para el tratamiento de trastornos relacionados con el ELS.
- Realizar estudios con técnicas de análisis más diversas como estudios citológicos, *westernblood*, test comportamentales, etc, dado que la respuesta al estrés es un proceso complejo que involucra múltiples sistemas y mecanismos biológicos. Por ello la colaboración entre diferentes disciplinas, como la psicología, la neurobiología, la genética y la medicina, es necesaria para obtener un conocimiento más completo del ELS y desarrollar intervenciones terapéuticas más efectivas.



REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Yaribeygi H, Panahi Y, Sahraei H, Johnston TP, Sahebkar A. stress can decrease the activity of cytotoxic T lymphocytes and natural killer cells and lead to growth of malignant cells, genetic instability, and tumor expansion. *EXCLI J.* 2017;16:1057–72.
2. Danese A, Pariante CM, Caspi A, Taylor A, Poulton R. Childhood maltreatment predicts adult inflammation in a life-course study. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104(4):1319–24.
3. Pechtel P, Pizzagalli DA. Effects of early life stress on cognitive and affective function: An integrated review of human literature. *Psychopharmacology (Berl).* 2011;214(1):55–70.
4. OMS. Informe sobre los resultados de la OMS: presupuestos por programa 2016-2017. 2018;
5. Perú21. Registran 155 casos de violencia sexual contra niñas, niños y adolescentes hasta el mes de octubre. 2020;1–14. Available from: <https://www.defensoria.gob.pe/wp-content/uploads/2020/04/Serie-Informes-Especiales-Nº-007-2020-DP-Violencia-contra-niñas-niños-y-adolescentes-en-el-contexto-de-la-emergencia.pdf>
6. Colectivo Interinstitucional Regional por los Derechos de la Niñez y Adolescencia - Cusco. Informe regional sobre la situación de cumplimiento de los Derechos de Niños , Niñas y Adolescentes de la Región Cusco –. Campaña Nac – 30 años la Conv los Derechos del niño- Región Cusco [Internet]. 2019; Available from: <https://www.mesadeconcertacion.org.pe/storage/documentos/2019-12-05/informe-regional-nna-cusco-final.pdf>



7. Mesa de concertación para la lucha contra la Pobreza. Informe regional de la situación de las niñas, niños y adolescentes de la Región Moquegua. *Inf Reg.* 2019;1–62.
8. Ceballos G, Suárez Y, Suescún J, Gamarra L, González K, Sotelo A. Ideación suicida, depresión y autoestima en adolescentes escolares de Santa Marta. *Duazary* [Internet]. 2015;12(1):4. Available from: <http://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=5053066&info=resumen&idoma=SPA>
9. Murthy S, Gould E. Early life stress in rodents: Animal models of illness or resilience? *Front Behav Neurosci.* 2018;12(July):1–5.
10. Goodwill HL, Manzano-Nieves G, Gallo M, Lee HI, Oyerinde E, Serre T, et al. Early life stress leads to sex differences in development of depressive-like outcomes in a mouse model. *Neuropsychopharmacology* [Internet]. 2019;44(4):711–20. Available from: [dx.doi.org/10.1038/s41386-018-0195-5](https://doi.org/10.1038/s41386-018-0195-5)
11. van Bodegom M, Homberg JR, Henckens MJAG. Modulation of the Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis by Early Life Stress Exposure. *Front Cell Neurosci.* 2017;11:87.
12. Instituto Nacional de Estadística e Informática. Encuesta Nacional Relaciones Sociales ENARES 2013 y 2015. Principales resultados. 2016;2015:1-21.
13. Arnett MG, Pan MS, Doak W, Cyr PEP, Muglia LM, Muglia LJ. The role of glucocorticoid receptor-dependent activity in the amygdala central nucleus and reversibility of early-life stress programmed behavior. *Transl Psychiatry.* 2015 Apr;5(4):e542.
14. Bonapersona V, Damsteegt R, Adams ML, van Weert LTCM, Meijer OC, Joëls M, et al. Sex-Dependent Modulation of Acute Stress Reactivity After Early Life



- Stress in Mice: Relevance of Mineralocorticoid Receptor Expression. *Front Behav Neurosci.* 2019;13:181.
15. Rice CJ, Sandman CA, Lenjavi MR, Baram TZ. A novel mouse model for acute and long-lasting consequences of early life stress. *Endocrinology.* 2008 Oct;149(10):4892–900.
16. Bath KG, Nitenson AS, Lichtman E, Lopez C, Chen W, Gallo M, et al. Early life stress leads to developmental and sex selective effects on performance in a novel object placement task. *Neurobiol Stress.* 2017 Dec;7:57–67.
17. Bath K, Manzano-Nieves G, Goodwill H. Early life stress accelerates behavioral and neural maturation of the hippocampus in male mice. *Horm Behav.* 2016 Jun;82:64–71.
18. (OMS) OM de la S. Maltrato Infantil [Internet]. WHO. 2022. Available from: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/child-maltreatment>
19. Carr CP, Martins CMS, Stingel AM, Lemgruber VB, Juruena MF. The role of early life stress in adult psychiatric disorders: a systematic review according to childhood trauma subtypes. *J Nerv Ment Dis.* 2013 Dec;201(12):1007–20.
20. Ruttle PL, Shirtcliff EA, Armstrong JM, Klein MH, Essex MJ. Neuroendocrine coupling across adolescence and the longitudinal influence of early life stress. *Dev Psychobiol.* 2015 Sep;57(6):688–704.
21. Schunke M. Promettheus, texto Atlas de Anatomia, Cabeza, cuello y neuroanatomia 3ra edicion. 2015. 322–323 p.
22. Kim JJ, Diamond DM. The stressed hippocampus, synaptic plasticity and lost memories. *Nat Rev Neurosci.* 2002 Jun;3(6):453–62.



23. Babicola L, Ventura R, D'Addario SL, Ielpo D, Andolina D, Di Segni M. Long term effects of early life stress on HPA circuit in rodent models. *Mol Cell Endocrinol.* 2021 Feb;521:111125.
24. CRHR1 [Internet]. ncbi. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/1394>
25. Jaimes Alonso Navarro Hernández, Roberto Aerón Ramírez Ojeda CVV. Manual de Procedimientos Recomendables para la Investigación con Animales [Internet]. Mexico. 2012. 159 p. Available from: <http://www.imss.gob.mx/sites/all/statics/profesionalesSalud/investigacionSalud/cbis/manualprocedimientosanimales.pdf>
26. F Fuentes, R Mendoza, A Rosales, A Cisneros. Guía de manejo y cuidado de animales de laboratorio [Internet]. Instituto nacional de salud. 2008. 1–54 p. Available from: www.ins.gob.pe/insvirtual/images/GUIA_ANIMALES_RATON.pdf
27. Potter M. History of the BALB/c Family BT - The BALB/c Mouse: Genetics and Immunology. In: Potter M, editor. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 1985. p. 1–5. Available from: https://doi.org/10.1007/978-3-642-70740-7_1
28. Huprich SK. DEPRESSIVE PERSONALITY DISORDER: THEORETICAL ISSUES, CLINICAL FINDINGS, AND FUTURE RESEARCH QUESTIONS. Vol. 18, *Clinical Psychology Review.* 1998.
29. Roder J. Toxicología veterinaria. Editor Acad León España Prim Edición Madrid, España [Internet]. 2000;205. Available from: http://www.rednacionaldeveterinarias.com.uy/articulos/farmacologia/Manual_de_toxicologia_veterinaria.pdf



30. Clark RE, Squire LR. Similarity in form and function of the hippocampus in rodents, monkeys, and humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2013/06/10. 2013 Jun 18;110 Suppl 2(Suppl 2):10365–70. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23754372>
31. Rio DC, Ares MJ, Hannon GJ, Nilsen TW. Purification of RNA using TRIzol (TRI reagent). *Cold Spring Harb Protoc*. 2010 Jun;2010(6):pdb.prot5439.
32. Suchan T. Phenol-chloroform extraction and ethanol precipitation of RNA [Internet]. *Protocols.io*. Available from: <https://www.protocols.io/view/phenol-chloroform-extraction-and-ethanol-precipita-rzvd766>
33. Hashemipetroudi SH, Nematzadeh G, Ahmadian G, Yamchi A, Kuhlmann M. Assessment of DNA Contamination in RNA Samples Based on Ribosomal DNA. *J Vis Exp*. 2018 Jan;(131).
34. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C(T)}$ Method. *Methods*. 2001 Dec;25(4):402–8.
35. Faul F, Erdfelder E, Lang A-G, Buchner A. G*Power 3: a flexible statistical power analysis program for the social, behavioral, and biomedical sciences. *Behav Res Methods*. 2007 May;39(2):175–91.
36. Liao XM, Yang XD, Jia J, Li JT, Xie XM, Su YA, Schmidt MV, Si TM, Wang XD. Blockade of corticotropin-releasing hormone receptor 1 attenuates early-life stress-induced synaptic abnormalities in the neonatal hippocampus. *Hippocampus*. 2014;24(5):528-540. Available from: doi: 10.1002/hipo.2225437.
37. Bonfiglio, J. J., Inda, C., Senin, S., Maccarrone, G., Refojo, D., Giacomini, D., Turck, C. W., Holsboer, F., Arzt, E., Silberstein, S. B-Raf and CRHR1 Internalization Mediate Biphasic ERK1/2 Activation by CRH in Hippocampal



- HT22 Cells. *Molecular Endocrinology*. 2013; 27(3), 491–510. Available from:
<https://doi.org/10.1210/me.2012-1359>
38. Instituto Nacional de Estadística e Informática (INEI). Encuesta Nacional sobre Relaciones Familiares y Violencia de Género contra las Mujeres 2020 [Internet]. Lima (Perú): INEI; 2020. Available from:
https://www.inei.gob.pe/media/MenuRecursivo/publicaciones_digitales/Est/Lib1698/Libro.pdf
39. Taylor SC, Nadeau K, Abbasi M, Lachance C, Nguyen M, Fenrich J. The Ultimate qPCR Experiment: Producing Publication Quality, Reproducible Data the First Time. *Trends Biotechnol.* 2019 Jul;37(7):761-774. doi: 10.1016/j.tibtech.2018.12.002. PMID: 30655106.
40. van Bodegom M, Homberg JR, Henckens MJAG. Modulation of the Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis by Early Life Stress Exposure. *Front Cell Neurosci.* 2017 Apr 19;11:87. doi: 10.3389/fncel.2017.00087. PMID: 28469557; PMCID: PMC5395581.



MATRIZ DE CONSISTENCIA

Tabla 16: Matriz de consistencia.

Problema de Investigación	Objetivos	Hipótesis	Variables e Indicadores	Metodología	Población y Muestra
<p>Problema General:</p> <p>¿Cuáles son los efectos del estrés en la vida temprana por restricción de nido sobre la expresión génica del receptor de glucocorticoides (GR) hipocampales en ratones de ambos sexos de las cepas de ratones C57BL/6NCrI y BALB/c durante las etapas de desarrollo de crías y adultos?</p> <p>Problemas Específicos:</p> <p>1. ¿Cuáles son los efectos del estrés en la vida temprana por restricción de nido sobre la expresión génica del receptor de glucocorticoides (GR) hipocampales en ratones de ambos sexos de las cepas de ratones</p>	<p>Objetivo General:</p> <p>Analizar los cambios en la expresión génica de receptores hipocampales corticoideos y de contra-regulación en ratones de las cepas C57BL/6NCrI y BALB/c inducidos restricción de nido como modelo de estrés en la vida temprana, durante las etapas de desarrollo de crías y adultos.</p> <p>Objetivos Específicos:</p> <p>1. Analizar los cambios en la expresión génica del receptor de glucocorticoides (GR) en ratones de las cepas C57BL/6NCrI y BALB/c inducidos a restricción de nido</p>	<p>Hipótesis de Alternativa:</p> <p>La expresión génica (ARN mensajero - ARNm) de receptores glucocorticoides (GR), receptores mineralocorticoides (MR) y receptor para CRH tipo 1 (CRHR1) en el área hipocampal de crías de ratón y adultos de las cepas C57BL/6NCrI y BALB/c es alterada por el estrés producido en la vida temprana por medio del modelo de restricción de nido.</p> <p>Hipótesis Nula:</p> <p>La expresión génica (ARN mensajero - ARNm) de receptores glucocorticoides (GR), receptores mineralocorticoides (MR) y receptor para</p>	<p>Variables Independientes</p> <ul style="list-style-type: none"> Restricción de nido Tiempo de restricción de nido <p>Indicadores</p> <ul style="list-style-type: none"> Presencia del estresor Tiempo en días de exposición <p>Variables Dependientes</p> <ul style="list-style-type: none"> Expresión Génica de receptores Glucocorticoides Expresión Génica de receptores Mineralocorticoides Expresión Génica de receptor de CRH <p>Indicadores</p>	<p>Tipo de Investigación:</p> <p>El tipo de investigación es Experimental puro. El nivel es analítico, prospectivo y correlacional</p> <p>Diseño de Investigación:</p> <p>El diseño de la investigación es experimental, se modificará y controlara el estresor (restricción de nido) causantes de ELS y se medirán los efectos que tienen estos sobre la expresión génica de GR, MR y Crhr1</p>	<p>Población:</p> <p>Ratones de experimentación de las cepas BALB/c y C57BL/6NCrI del bioterio de la UAC</p> <p>Muestra:</p> <p>Se utilizarán un mínimo de 80 ratones divididos en grupos:</p> <ul style="list-style-type: none"> BALB/c y C57BL/NCrI. Grupo etarios de 12 días y 75 días. Hembra y Macho. Control y Experimental. <p>Técnicas:</p> <p>RT-qPCR</p> <p>Instrumentos:</p>



<p>C57BL/6NCr1 y BALB/c durante las etapas de desarrollo de crías y adultos?</p> <p>2. ¿Cuáles son los efectos del estrés en la vida temprana por restricción de nido sobre la expresión génica del receptor de mineralocorticoides (MR) hipocampales en ratones de ambos sexos de las cepas de ratones C57BL/6NCr1 y BALB/c durante las etapas de desarrollo de crías y adultos?</p> <p>3. ¿Cuáles son los efectos del estrés en la vida temprana por restricción de nido sobre la expresión génica de receptores CRHR1 hipocampales en ratones de ambos sexos de las cepas de ratones C57BL/6NCr1 y BALB/c durante las etapas de desarrollo de crías y adultos?</p>	<p>como modelo de estrés en la vida temprana, durante las etapas de desarrollo de crías y adultos.</p> <p>2. Analizar los cambios en la expresión génica del receptor de mineralocorticoides (MR) en ratones de las cepas C57BL/6NCr1 y BALB/c inducidos a restricción de nido como modelo de estrés en la vida temprana, durante las etapas de desarrollo de crías y adultos.</p> <p>3. Analizar los cambios en la expresión génica del receptor de la hormona liberadora de corticotropina (CRHR1) en ratones de las cepas C57BL/6NCr1 y BALB/c inducidos a restricción de nido como modelo de estrés en la vida temprana, durante las etapas de desarrollo de crías y adultos.</p>	<p>CRH tipo 1 (CRHR1) en el área hipocampal de crías de ratón y adultos de las cepas C57BL/6NCr1 y BALB/c no es alterada por el estrés producido en la vida temprana por medio del modelo de restricción de nido.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Melting curve</i> hallado por RT qPCR <p>Variable Interviniente</p> <ul style="list-style-type: none"> • Edad <p>Indicador</p> <ul style="list-style-type: none"> • Número de días de vida <p>Variable Moderadora</p> <ul style="list-style-type: none"> • Sexo • Cepa de ratón <p>Indicador</p> <ul style="list-style-type: none"> • Distancia ano-rectal • Presencia de pezones • Registro y color del ratón 		<p>Fichas de recolección de datos de seguimiento, recolección de muestra y rotulación de camadas e individuos.</p>
---	---	---	--	--	--



INSTRUMENTO DE RECOLECCION DE DATOS

Tabla 17: Ficha de recolección de muestras.

Jaula	ID	Cepa	Leva	Sexo	Grupo	Peso (gr)	Fecha de colecta	Hipocampo					Glandula Adrenal			Notas		
								Peso Tubo (gr)	Peso Tubo + Muestra (gr)	Peso Neto Muestra (gr)	Hora Inicio Diseccion	Hora Final Diseccion	Peso Tubo	Peso Tubo + Muestra	Peso Neto Muestra			



Tabla 18: Ficha de procesamiento de muestras.

Codigo Completo	Codigo Investigador	Codigo Camada	Sexo	Numero ID	Cepa	Leva	Ctr/Exp	Peso Ind (gr)	Fecha Colecta	Peso Neto Hipocampo	Particularidad	Procesado	RNA	RNA clean	cDNA	rtPCR



Ficha de Control de Jaulas

 **Universidad Andina del Cusco** CÓDIGO:

PROYECTO: INVESTIGACIÓN REPRODUCTOR

APAREO GESTANTE LACTANTE

ESPECIE: RATÓN CEPA: C57BL/6

Nro. De Animales: () ♀ () ♂

RESPONSABLE  **LABORATORIO DE INVESTIGACIÓN EN NEUROCIENCIAS** / / FECHA NACIMIENTO

OBSERVACIONES _____

F. N. Hembra: / / ♀

F. N. Macho: / / ♂

F. de Apareo: / / Desapareo: / /
