



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**



FACULTAD DE PSICOLOGÍA

**“LA ALTERACIÓN DE LOS RITMOS CIRCADIANOS COMO MODELO DE
DEPRESIÓN EN RATAS”**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
LICENCIADA EN PSICOLOGÍA**

PRESENTA:

ARACELI TAPIA OSORIO

DIRECTORA DE TESIS: DRA. CAROLINA ESCOBAR BRIONES



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

A mi familia

A mi *mamá Jky* por su cariño, motivación y apoyo incondicional que siempre me ha dado. Gracias por ser un ejemplo a seguir.

A mi *papá Javier* por su educación y entrega para formarme en mi vida personal y académica.

A mi *hermano Andy Little* por ser ejemplo de entrega y cariño a la profesión y por compartir momentos divertidos en compañía de películas.

A *Gus* por acompañarme creando atardeceres a mi lado en esta etapa de mi vida.

...y a *La Trompa* por ser mis compañeros de introspección.

La belleza de lo humano yace en su complejidad emocional

Araceli

AGRADECIMIENTOS

A mi maestra, la *Dra. Carolina Escobar Briones*, por darme la oportunidad de incursionar en el ámbito de la investigación científica, apoyarme en la realización de todo este proyecto y por el cariño que me ha brindado. Muchas gracias.

Al *Dr. Roberto Salgado-Delgado*, porque además de la ayuda técnica y académica en esta investigación, ha sido un ejemplo profesional a seguir. Gracias por las opiniones, apoyo académico y por hacer de las horas de trabajo un tiempo más ameno y divertido. Gracias por el buen humor.

Al *jurado* por sus ilustrativos comentarios para mejorar el presente escrito:

Dr. José Luis Díaz Meza

Lic. Karina Simón Arceo

Dr. Fructuoso Ayala Guerrero

A *mis compañeros de laboratorio* por ayudarme, darme sus opiniones y hacer más agradable el trabajo.

A *mis colegas y compañeras de carrera* Pevensie (Lucy, Eli, Itz y Ale) por hacer de la universidad una etapa inolvidable y combinar la diversión con aprendizaje.

A la *UNAM* por darme la oportunidad de ser parte de la Facultad de Psicología y la Facultad de Medicina para desempeñarme tanto académicamente como profesionalmente.

Agradezco el apoyo otorgado por CONACYT 102145: Apoyo para investigadores nacionales para el fortalecimiento de actividades de tutoría y asesoría de estudiantes de licenciatura y proyecto CONACYT 82462, así como a Fundación Telmex por el financiamiento para la realización de la presenta tesis.

INDICE

AGRADECIMIENTOS	3
RESUMEN	6
ABREVIATURAS	7
INTRODUCCIÓN	8
DEPRESIÓN EN HUMANOS	8
<i>Clasificación y síntomas</i>	8
<i>Sistemas monoaminérgicos implicados en el estado de ánimo</i>	9
<i>Los ritmos biológicos: sincronización y desincronización</i>	11
<i>La desincronización y problemas de salud</i>	13
<i>Depresión y ritmos circadianos</i>	14
<u><i>Ritmos circadianos de variables conductuales alteradas en la depresión</i></u>	15
<u><i>Ritmos circadianos de variables fisiológicas y endócrinas alterados en la depresión</i></u>	16
<i>Hipótesis de la etiología de la depresión asociada a ritmos circadianos</i>	18
MODELOS EXPERIMENTALES DE DEPRESIÓN	21
1. Modelos no-simuladores de depresión	21
2. Modelos que simulan depresión	22
<u><i>a) Modelos generados por separación</i></u>	22
<u><i>b) Modelos generados por estrés</i></u>	22
<u><i>c) Modelos inducidos por lesión</i></u>	24
<u><i>d) Modelos inducidos por fármacos en el desarrollo</i></u>	24
<u><i>e) Modelos inducidos por cepas genéticamente diseñadas</i></u>	25
<u><i>f) Modelos inducidos por desincronización circadiana</i></u>	25
<i>Variables circadianas evaluadas en los modelos experimentales de depresión</i>	27

<i>Métodos de evaluación conductual y fisiológica empleadas en modelos experimentales de depresión</i>	29
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	30
OBJETIVOS	31
<i>Objetivo general</i>	31
<i>Objetivos específicos</i>	31
HIPÓTESIS	31
MÉTODO	32
<i>1. Sujetos y condiciones éticas</i>	32
<i>2. Diseño experimental</i>	32
<i>3. Métodos para la alteración de los ritmos circadianos</i>	33
<i>4. Pruebas conductuales para determinar síntomas de depresión</i>	34
<i>5. Determinaciones fisiológicas indicadoras de depresión</i>	37
RESULTADOS	41
<i>Determinaciones conductuales</i>	41
<i>Determinaciones fisiológicas</i>	47
DISCUSIÓN	52
CONCLUSIONES	59
PERSPECTIVAS	59
REFERENCIAS	62
ANEXOS	67
<i>Anexo 1: hoja de registro para campo abierto</i>	67
<i>Anexo 2: definiciones operacionales de las conductas de campo abierto</i>	68

RESUMEN

La depresión es un trastorno afectivo que se caracteriza por un estado de humor deprimido y pérdida de placer a realizar actividades que previamente agradaban. Los modelos experimentales que se emplean para estudiarla resultan en conductas de indefensión aprendida, anhedonia y de ansiedad, que son evaluadas a través de pruebas conductuales. Así mismo, variables fisiológicas como concentración de hormonas en plasma y reacción monoaminérgica celular, replican los síntomas reportados en humanos.

En el presente trabajo se desarrolló un modelo experimental de depresión en ratas basado en la alteración de los ritmos circadianos a través de desincronización externa por luz constante y desincronización interna en un modelo de trabajo nocturno. Se evaluaron síntomas depresivos a través de la actividad locomotora, anhedonia con respecto al consumo de agua azucarada y actividad en campo abierto; complementariamente, las variables fisiológicas evaluadas fueron la ganancia de peso corporal, ingesta de alimento, medición de la hormona de corticosterona e inmunoreactividad celular del Núcleo Supraquiasmático (NSQ).

Los datos obtenidos indican que tanto la desincronización externa por luz constante y la desincronización interna en un modelo de trabajo nocturno, desencadenan en conductas parecidas a la depresión, y confirman la relevancia de una sincronización circadiana para la integridad fisiológica y conductual del organismo. Ambos, se proponen como modelos experimentales para estudiar depresión y su relación con los ritmos circadianos.

ABREVIATURAS

5-HT: Serotonina

ANOVA: Análisis de Varianza

CNTRL: Control

DA: Dopamina

DD: Oscuridad constante

EXP 1: Fase experimental 1

EXP 2: Fase experimental 2

LB: Línea base

LD: Ciclo luz/oscuridad

LL: Luz constante

MOR: Sueño de movimientos oculares rápidos

NE: Noradrenalina

NSQ: Núcleo Supraquiasmático

SOL: Sueño de ondas lentas

TN: Trabajador Nocturno

TH: Tirosina hidroxilasa

ZT: Zeitgeber time

INTRODUCCIÓN

DEPRESIÓN EN HUMANOS

Clasificación y síntomas

La depresión es un trastorno mental-afectivo que se caracteriza por tener síntomas: afectivos (tristeza, anhedonia, pérdida de autoestima, etc.), cognitivos (enlentecimiento de pensamiento con contenido negativo), somáticos (anorexia, pérdida de peso, disminución de impulso sexual, trastornos del sueño) y conductuales (suicidio o intentos) (Breton, 1998). También se define como un síndrome asociado con un estado de ánimo triste, cualitativamente y/o cuantitativamente (duración e intensidad) diferente a la tristeza normal o provocado por situaciones específicas como pena por una pérdida, además de presentar síntomas que afectan la cognición, conducta y el sistema neurovegetativo (Santos y col, 2006).

La depresión se clasifica en *reactiva* y *endógena* (Bonilla y col. 2000). La depresión reactiva, que se subdivide en psicosocial o somatógena que incluye aquella que puede ser ocasionada por causas médicas específicas o relacionada a causas ambientales desencadenantes, afectando el estado anímico de la persona. La depresión endógena, que se refiere aquella que es causa biológica generada por cambios bioquímicos en el Sistema Nervioso Central (SNC), probablemente hereditaria, y puede ser depresiva o bipolar (maniaco-depresivo). Dentro de la depresión endógena se incluye al trastorno afectivo estacional (TAE), que se caracteriza por alteraciones afectivas relacionadas a cambios estacionales (Breton, 1998). A su vez, la depresión reactiva y endógena se clasifican en leve, moderada y grave, indicando el grado de severidad e incapacitación en la que los individuos se encuentran para llevar a cabo actividades de la vida cotidiana.

De acuerdo al Manual Diagnóstico y Estadístico de los Trastornos Mentales (DSM-IV) el Trastorno depresivo mayor se caracteriza por uno o más episodios depresivos mayores y por presentar al menos dos síntomas: estado de ánimo deprimido o una pérdida de interés o placer en casi todas las actividades

(anhedonia) durante 2 semanas e interferir con la vida del sujeto. Así mismo requiere coincidir con al menos 4 de los siguientes síntomas: alteraciones del apetito o peso, trastornos del sueño, alteración de la actividad psicomotora, fatiga o pérdida de energía, sentimientos y pensamientos de minusvalía o culpa exagerada y/o dificultad para concentrarse, pensar o tomar decisiones, y pensamientos recurrentes de muerte o ideación, planes o intentos suicidas.

Así mismo, el DSM-IV indica, que los síntomas y trastornos más comunes que acompañan la depresión mayor pueden ser: llanto, irritabilidad, tristeza, rumiaciones obsesivas, ansiedad, fobias, preocupación excesiva por la salud física y quejas de dolor. Las crisis de angustia, problemas en las relaciones personales, interacciones sociales menos satisfactorias o problemas en la actividad sexual, son otros síntomas asociados. Por lo general se presenta un período con síntomas ansiosos y síntomas depresivos leves con una duración aproximada de semanas o meses, previo a que comience un episodio depresivo mayor.

Sistemas monoaminérgicos implicados en el estado afectivo

La depresión se ha relacionado con cambios bioquímicos en el SNC que involucran varios sistemas de neurotransmisión y se describen a continuación.

Sistema Serotonérgico

Las células que sintetizan serotonina (5HT) se localizan en los núcleos de rafe, ubicados en el tallo cerebral, estos proyectan a la corteza cerebral, hipotálamo, tálamo, ganglios basales, septum e hipocampo. También proyectan al núcleo supraquiasmático (NSQ), reloj biológico endógeno y están implicadas en regular los ritmos circadianos (el ciclo sueño-vigilia, temperatura, etc.) (Thase y col, 2002).

Del mismo modo, el estrés crónico en modelos animales puede afectar este sistema desencadenando pérdida de peso y de sueño, disminución en la actividad locomotora y aumento en la secreción de la hormona liberadora de corticotropina (CRH), glutamato y NE (Thase y col, 2002).

Sistema Dopaminérgico

Se distinguen cuatro vías dopaminérgicas en el cerebro: 1. *Sistema tuberoinfundibular* que proyecta del hipotálamo a la pituitaria y su función principal es inhibir la secreción prolactina; 2. *Sistema nigro-estriado*, se origina de cuerpos celulares de la sustancia negra que proyecta a los ganglios basales y su función es regular la actividad locomotora; 3. *Sistema mesolímbico* que va del área ventral tegmental al núcleo accumbens y al giro cingulado, éste modula la expresión emocional y la conducta dirigida a una meta; y 4. *Sistema mesocortical* que inicia en el área ventral tegmental y proyecta a la corteza prefrontal, tiene que ver con la motivación, inicio de tareas dirigida a una meta y procesos de ejecución cognitiva (Thase y col, 2002).

La disminución de dopamina (DA) que puede ser ocasionada por un estado de estrés crónico, afecta la motricidad y produce anhedonia, también se presentan síntomas cognitivos, como falta de atención o concentración para realizar tareas (Thase y col, 2002).

Sistema Noradrenérgico

Las células de noradrenalina (NE) se localizan en el locus coeruleus (LC), ubicado en el área rostral del tallo cerebral. Estas células proyectan a regiones como el tálamo, sistema límbico, ganglios basales y corteza cerebral, su función principal es el de iniciar y mantener el alertamiento límbico y cortical ante situaciones emocionalmente relevantes. También participan en mantener al sistema en estrés, genera conductas de indefensión y disminuye conductas de exploración y consumación (Thase y col, 2002).

Estos sistemas son de gran relevancia, ya que su implicación da pautas para el tratamiento de este trastorno a través de antidepresivos que bioquímicamente modifican la producción o liberación de dichos neurotransmisores en el organismo, mejorando el estado afectivo del paciente.

Los ritmos biológicos: sincronización y desincronización

Los *ritmos biológicos* son eventos generados por el organismo que tienen una repetición regular y su principal función es la adaptación del organismo a las demandas del medio ambiente. Estos pueden ser de origen exógeno o endógeno. El primero se refiere a aquellos ritmos que se originan como respuesta a los fenómenos ambientales cíclicos; mientras que el segundo, se refiere a los generados por el propio organismo. Los ritmos endógenos se diferencian de los exógenos porque al estar en condiciones constantes estos persisten de manera rítmica sin depender de ningún estímulo externo. Los ritmos biológicos se clasifican de acuerdo a su duración en: Ritmos circadianos, Ritmos ultradianos y Ritmos infradianos (Gruart y col. 2002).

- *Ritmos circadianos*: Estos se caracterizan por tener una duración cercana o alrededor del día.
- *Ritmos ultradianos*: Estos tienen una frecuencia mayor de un día; es decir, ocurre más de una vez al día.
- *Ritmos infradianos*: Estos tienen una frecuencia menor de un día; es decir, requieren más de un día para repetirse.

Los ritmos circadianos se generan endógenamente por una estructura situada en el hipotálamo, conocida como núcleo supraquiasmático (NSQ), el cual es considerado el reloj biológico (Klein y col. 1991). El NSQ tiene la propiedad de generar oscilaciones con un ciclo cercano a las 24 hrs. y transmitir estas oscilaciones al resto del organismo. Además, diversos órganos en el cuerpo, por ejemplo el corazón, el hígado, el músculo esquelético y otros, -también- generan oscilaciones cercanas a 24 hrs. y por lo tanto se les llama osciladores periféricos (Stratmann y col. 2006).

El NSQ está anatómicamente y funcionalmente organizado en dos subdivisiones: un área ventral que recibe principalmente información fótica pues se encuentra

adyacente al quiasma óptico; y la otra área es la dorsal que recibe información no-fótica, expresando el ritmo endógeno del organismo (Moore y col. 2002).

La actividad electrofisiológica *in vivo* del NSQ de roedores se caracteriza por ser mayor en la etapa de luz que de oscuridad, persistiendo este patrón en condiciones constantes de iluminación, lo que indica que dicha actividad no es una respuesta pasiva a las condiciones lumínicas; así mismo, el aislamiento de esta estructura hipotalámica no impide que continúe presentándose la ritmicidad circadiana del reloj. *In vitro*, la respuesta del NSQ es mayor en el día con un patrón sinusoidal que se caracteriza por una acrofase a la mitad del día y el nadir en la noche (Brown y col. 2007).

Para la expresión inmunohistoquímica del NSQ, la proteína c-Fos ha servido como un principal marcador neuronal, ya que la luz es un estímulo que induce su expresión en este núcleo. Bajo condiciones constantes de iluminación se ha descrito una disminución en la expresión de la proteína en comparación a un ciclo luz/oscuridad que presenta un ritmo circadiano asociado a la presencia de luz (Edelstein y col. 2000).

La *sincronización* es un fenómeno que propicia que el reloj biológico (NSQ), y sus osciladores, tengan un período y fase ajustados a los ciclos ambientales. La sincronización se da gracias a la sensibilidad del NSQ y los osciladores endógenos a las señales de tiempo que son periódicas y predecibles para el organismo, esto les permite ajustar sus oscilaciones al estímulo externo o *Zeitgeber* (en alemán “dador de tiempo”). Una buena sincronización favorece que determinados procesos sucedan en el momento en que el ambiente tenga las condiciones más adecuadas para su expresión (Marques, 2002). La *sincronización* puede ser *externa*, que se refiere a la correcta relación de fase del reloj biológico con el medio ambiente; o puede ser *interna*, que se refiere a la correcta relación de fase del reloj con sus osciladores periféricos.

El principal sincronizador para el NSQ es el ciclo luz/oscuridad; no obstante, para los osciladores periféricos son las señales metabólicas; así mismo, se ha encontrado que estímulos sociales como horarios de comida, ejercicio o trabajo influyen en la sincronización de los ritmos circadianos; sin embargo, no se considera un *zeitgeber* pues no es capaz de sincronizar por sí solo al reloj maestro (Mistlberger y col. 2004).

Cuando se altera la relación de fase del NSQ con el medio ambiente se produce una *desincronización externa*; mientras que cuando existe una alteración en la salida de señales rítmicas del reloj hacia el resto del organismo, generando un desacoplamiento del organismo con su propio reloj, se le denomina *desincronización interna*.

La desincronización y problemas de salud

La desincronización interna en humanos, se refiere a una pérdida de la organización temporal entre distintas funciones del organismo, donde las diferentes variables fisiológicas comienzan a manifestar distintos períodos entre sí. Se han descrito tres tipos de desincronización interna: Espontánea, Forzada y Transitoria (Aguilar-Roblero y col. 2002).

La *desincronización interna espontánea*, se ha estudiado experimentalmente y es aquella que se da como consecuencia de permanecer en condiciones aisladas de sincronizadores ambientales. En esta situación, el ritmo del ciclo sueño-vigilia presenta un periodo mayor de 24 hrs. que va siendo mayor cada día, pero no esta acoplado con el ritmo de temperatura (Aschoff y Weaver, 1962; citado en Czeisler y col. 2001).

La desincronización interna generada por viajes trasmeridionales o mejor conocido como fenómeno de “jet lag”, es una enfermedad ocasionada por cruzar varias zonas horarias en poco tiempo y es un ejemplo de *desincronización interna transitoria*. Se caracteriza por síntomas de fatiga durante el nuevo día e

incapacidad para dormir en la noche, pérdida del apetito y sensación de indigestión después de una comida, disminución de la capacidad para concentrarse, pérdida de motivación, irritabilidad y dolores de cabeza. Estos síntomas se revierten cuando el reloj circadiano se ajusta a la nueva hora local (Waterhouse y col. 2006).

El trabajo nocturno es un tipo de *desincronización interna forzada*, pues es una actividad que requiere de cambios constantes en el ciclo sueño-vigilia. Requiere de trabajar cuando el cuerpo necesita descansar, generando alteraciones en hábitos alimenticios, comiendo en horarios de descanso y varias veces alimento poco saludable. Por otro lado, la calidad de sueño se deteriora debido a que el sueño diurno no es muy reparador y la seguridad se ve comprometida, ya que esta condición ocasiona una mayor propensión a accidentes en el trabajo. Este trabajo desencadena problemas gastrointestinales y metabólicos asociados a la condición del trabajo (Waterhouse y col. 2006). Se han descrito alteraciones en el sistema inmune y aumento de la hormona de cortisol (hormona del estrés), así como de trastornos de ansiedad y depresión asociadas a alteraciones en neuropéptidos relacionadas al sueño y estado anímico. Esta forma de vida propicia el consumo de sustancias nocivas para mantenerse en estado de alerta durante el trabajo, ejemplos de estas: la cafeína, la nicotina y anfetaminas (Foster y col. 2005).

Depresión y ritmos circadianos

En la literatura se ha descrito que las personas con depresión, presentan alteraciones circadianas en variables conductuales y fisiológicas; estas pueden ser causa o efecto de un estado afectivo alterado. Se considera que el fenómeno rítmico en desórdenes del humor puede ser más una consecuencia que causa de conductas de depresión y manía (Wirz-Justice, 1995).

Ritmos circadianos de variables conductuales alteradas en la depresión

Humor o estado afectivo: La variación del humor puede ser típica o atípica (Urretavizcaya y col, 2006). La típica se caracteriza por una mejoría vespertina del humor, mientras que la atípica se refiere a una mejoría matutina, siendo esta última más común en el trastorno bipolar (Yannielli, 2002). Sin embargo, se ha considerado que no hay una relación sistemática entre el tipo de variación de humor y los síntomas depresivos pues difiere entre individuos; así mismo, esta característica tiene una respuesta positiva a la privación de sueño y al tratamiento con antidepresivos (Wirz-Justice, 1995).

Alteraciones del sueño: A la depresión se asocian cambios en el ciclo sueño-vigilia que pueden variar tales como presentar *insomnio* inicial (dificultad para conciliar el sueño), *insomnio* medio (despertar y problemas para volver a dormir) o tardío (despertar precoz e incapaz de volver a dormir). También se pueden presentar alteraciones del *sueño de movimientos oculares rápidos o MOR* como adelanto de fase o latencia acortada, aumento en su intensidad y disminución en la duración del primer episodio o aumento en su densidad (Jiménez y col. 2000). El aumento del sueño MOR se acompaña de un pobre mantenimiento de sueño, hipercortisolismo, altos niveles del metabolito de noradrenalina: MHPG (3-metoxi-4-hidroxipeniglycol) en la periferia y aumento en la temperatura corporal (Thase y col. 2002). Por otro lado, se ha reportado una disminución del sueño delta, y/o fragmentación del sueño total (Jiménez y col. 2000; Leibenluft y col. 2001), presentando los pacientes mejoría cuando se les realiza una privación total o parcial del sueño, sobre todo si es en la segunda parte, lo que indica la existencia de un mecanismo circadiano involucrado (Leibenluft y col. 2001). Se ha observado que cuando se recupera el sueño hay una remisión de los síntomas depresivos; así mismo, la privación potencia el tratamiento a largo plazo de los antidepresivos (Wirz-Justice, 1995). Del mismo modo, se ha descrito *hipersomnolencia* que es más común en jóvenes y mujeres, *disminución de la eficacia de sueño y despertares* nocturnos con una pérdida prematura del *sueño de ondas lentas o SOL* en depresiones estacionales o trastorno bipolar. A pesar de lo descrito, estos

cambios no se consideran específicos para diagnosticar depresión, pero se normalizan al ser tratado el trastorno (Thase y col. 2002).

Se considera que la alteración del sueño puede resultar como consecuencia de una desregulación de la neurotransmisión serotoninérgica, noradrenérgica y/o acetolinérgica, ya que tienen un importante papel en la regulación del sueño (Thase y col. 2002).

Ritmos circadianos de variables fisiológicas y endócrinas alterados en la depresión

Temperatura: Se ha descrito un aumento anormal de la temperatura en la noche, con alteraciones en la fase circadiana y la amplitud (Martín del Campo, 2000; Urretavizcaya y col. 2006).

Hormonas: Disminución en la secreción nocturna de *melatonina* y avance de fase en el ritmo de ésta (Leibenluft y col. 2001; Martín del Campo, 2000; Urretavizcaya y col. 2006). También liberación disminuida de la *hormona de crecimiento (GH)* después de dormir o en situaciones demandantes, que se ha asociado a la disminución de SOL y a la reducción en la latencia del sueño MOR, lo cual es más común en depresiones infantiles. Disminución de *somatostatina*, que tiene como función inhibir la secreción de la hormona de crecimiento (GH) y detener los efectos de la hormona liberadora de corticotropina (CRH), la hormona adrenocorticotropa (ACTH) y hormona estimulante tiroidea (TSH) (Thase y col. 2002).

El eje hipotálamo-hipófisis-adrenal (HHA): Se ha reportado hiperactivo, resultando un estado de hipercortisolismo mantenido, sin posibilidad de disminuir el nivel de cortisol (hormona del estrés) en sangre, así como un adelanto de fase en el nadir, mayor duración de secreción nocturna y supresión de su secreción diurna, lo cual se asocia a un continuo estado de estrés (Leibenluft y col. 2001; Urretavizcaya y col. 2006). El hipercortisolismo, coincide con disfunciones en mediciones de neurotransmisores como de NE o 5-HT y se expresa diferencialmente en

episodios leves depresivos, depresión mayor y subtipos más restrictivos. También se asocia a alteraciones de memoria, disminución en la abstracción y resolución de problemas complejos (Thase y col. 2002). Del mismo modo, este estado puede llevar a una disminución del apetito y actividad sexual, pérdida de peso y sueño o alteraciones de sueño; síntomas característicos de la depresión (Hećimović, 2006).

El eje hipotálamo-hipófisis-tiroideo HHT: Se encuentra alterado existiendo un aumento en la liberación de la hormona liberadora de tirotrópina (TRH) en líquido cefalorraquídeo y amplitud disminuida del ritmo de esta (Baldessarini, 1986; Leibenluft y col. 2001; Urretavizcaya y col. 2006); así mismo, se reportan niveles elevados en plasma de tirotrópina u hormona estimulante de la tiroides (TSH), con una respuesta exagerada a la infusión de TRH (Thase y col. 2002); así mismo, una alteración en el ritmo circadiano de TSH con un aplanamiento de la elevación normal en la noche (Urretavizcaya y col. 2006).

Monoaminas: Como se mencionó anteriormente, los sistemas noradrenérgicos, serotoninérgicos y dopaminérgicos están involucrados en el estado emocional; por lo tanto, la catecolamina NE e indolamina 5HT regulan funciones generalmente afectadas en la depresión como la energía, sueño, apetito, libido y conducta psicomotora.

En pacientes con depresión se ha encontrado disminuido el nivel de 5-HT en suicidas depresivos (Jiménez y col. 2000); asociado a niveles bajos del metabolito de este neurotransmisor en fluido cerebroespinal de 5 HIAA (ácido-5-hidroxitriptófano), el cual se ha relacionado más a riesgo de suicidio, intentos y otras conductas relacionadas. Se ha comprobado que en la depresión la actividad serotoninérgica central, pre como postsináptica es deficiente, existiendo una hipoactividad serotoninérgica tanto a nivel central como periférico que puede revertirse con tratamiento crónico de antidepresivos (Yannielli, 2002). Estudios *post mortem* de suicidas a causa de depresión, indican un metabolismo alto o bajo

de NE, incremento de receptores adrenérgicos α_2 (asociado al estrés), un aumento del precursor de NE: Tirosina hidroxilasa (TH) y disminución en la densidad del transportador de NE (Hećimović, 2006), así como bajos niveles urinarios de secreción de MHPG; sin embargo, ninguno de estos síntomas se han considerado específicos de la depresión (Thase y col. 2002).

Alteraciones inmunológicas: Se considera que puede existir una alteración celular inmune debido a una disminución en la proliferación de linfocitos en respuesta a los mitógenos, proponiendo una asociación entre la disfunción inmune y severidad clínica del trastorno, probablemente mediada por privación de sueño e hipercortisolismo (Thase y col. 2002).

Hipótesis de la etiología de la depresión asociada a ritmos circadianos

Se han desarrollado diversas hipótesis para explicar el origen de la depresión, considerando relaciones causales potenciales entre ritmos circadianos, estado de humor, neurotransmisores y otros factores, como puede observarse en la Figura 1 (modificado de Goodwin y Jamison 1990, citado en Rosenwasser y col. 1997). En este modelo se expone una posible relación recíproca entre la alteración de los ritmos circadianos y alteraciones conductuales, ya sea causa o efecto del estado afectivo; así mismo, una covariación entre la ritmicidad y estado afectivo que puede deberse a otras variables (genéticas, empíricas, neuroquímicas o factores neuroendocrinos):

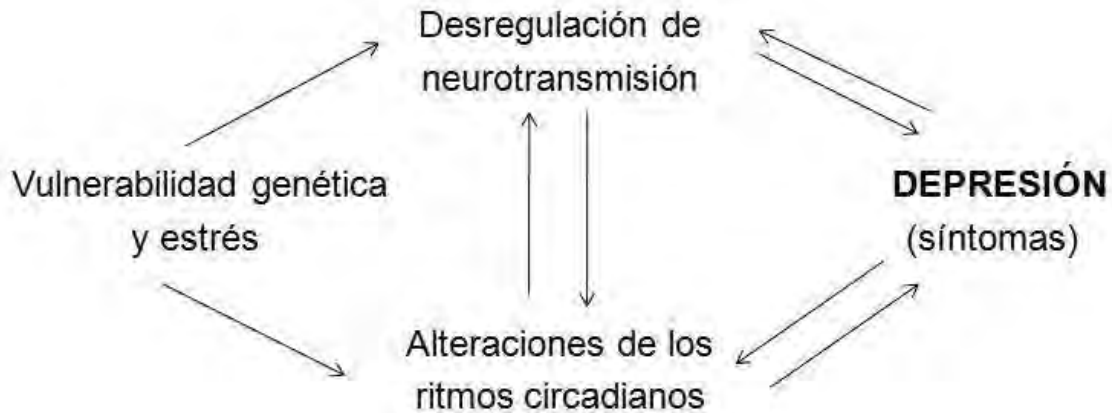


Figura 1. Modelo de relaciones causales potenciales de la depresión, la vulnerabilidad genética y el estrés son factores que generan alteraciones de neurotransmisión y de ritmos circadianos, que a su vez pueden ser causa y efecto de la sintomatología depresiva (modificado de Goodwin y Jamison, 1990 citado en Rosenwasser y col. 1997).

Papoušek (1975; citado en Wirz-Justice, 1995) describió por primera vez que la depresión puede surgir de constelaciones temporales que alteran la sincronización interna o externa de individuos predispuestos. Así mismo, se han desarrollado hipótesis cronobiológicas o “hipótesis del adelanto de fase” (Yannielli, 2002), acerca de la etiología de la depresión con respecto a los ritmos circadianos. Estas hipótesis sugieren diversas relaciones entre la depresión y los ritmos circadianos:

1. La depresión puede ser la causa de una relación de fase alterada entre el sistema circadiano y el ciclo sueño-vigilia (Urretavizcaya y col, 2006). Una deficiencia del proceso S (homeostático) que se refiere a la acumulación de sueño en el día o del proceso C (circadiano) que se refiere a un desorden en la regulación temporal circadiana por el núcleo supraquiasmático, ya sea por un corto período endógeno anormal o anomalías de las vías aferentes de los *zeitgebers* como causa de las alteraciones de sueño. Estos procesos de regulación de sueño al estar alterados afectan el tiempo, la duración y la arquitectura del sueño (Martín del Campo, 2000; Urretavizcaya y col. 2006; Wirz-Justice, 1995).

2. La depresión puede deberse a una disminución de la amplitud de los ritmos endógenos circadianos (Urretavizcaya y col. 2006; Yannielli, 2002), lo que

predispone a una susceptibilidad a cambios de fase de ritmos (Leibenluft y col. 2001) conductuales y fisiológicas como las anteriormente descritas.

3. La depresión puede originarse como consecuencia de una desincronización conductual y/o endocrino-metabólico debido a un bajo acoplamiento entre el marcapasos circadiano y sus sincronizadores naturales o zeitgebers (Urretavizcaya y col. 2006; Yannielli, 2002), ya que se ha descrito que pacientes con desórdenes en el humor se sincronizan débilmente a estos. De ellos resultan ritmos circadianos con una fase inestable, como consecuencia a una exposición menor o a *zeitgebers* menos poderosos. También las rutinas sociales alteradas causan desincronización de los ritmos con el ambiente (jet-lag, shiftwork) (Leibenluft y col. 2001).

La inestabilidad de fase puede deberse a diversos mecanismos: 1) periodo circadiano endógeno muy cercano o lejano a 24 hrs. 2) baja amplitud del marcapaso o 3) bajo acoplamiento entre marcapasos y la sincronización a estímulos fóticos y no fóticos (Rossenwasser y col. 2007; Wirz-Justice, 1995).

4. La depresión debido a alteraciones en los zeitgebers sociales (comidas, tiempo de compañía o ejercicio) afecta los ritmos circadianos biológicos. Estas alteraciones asociadas a la depresión son una desorganización de las funciones, más que un adelanto de fase (Thase y col. 2002). Algunos precipitantes psicosociales de depresión pueden ser eventos asociados al estilo de vida, estrés crónico, o falta de apoyo social apropiado (Wirz-Justice, 1995).

5. La depresión como consecuencia de una disminución en la actividad sináptica de los sistemas de neurotransmisión como los serotoninérgicos, noradrenérgicos, o ambos, pues se ha reportado la reversión de los síntomas depresivos, posterior a un tratamiento crónico con antidepresivos, llamada *hipótesis monoaminérgica* (Hećimović, 2006; Thase y col; Yannielli, 2002).

Así mismo, se ha planteado una *hipótesis serotoninérgica* que se basa en que: 1) Desórdenes en la actividad serotoninérgica puede contribuir a muchos de los síntomas observados en la depresión (ej. estado de ánimo, apetito, sueño, actividad sexual y disfunciones cognitivas); 2) La interferencia farmacológica de la síntesis o almacenamiento de 5HT puede inducir depresión en individuos vulnerables; 3) Una actividad serotoninérgica anormal puede darse a uno o más niveles (precursor, síntesis, liberación, almacenamiento, metabolismo o receptores postsinápticos); 4) Las drogas antidepresivas generalmente potencian la actividad serotoninérgica central (Yannielli, 2002).

La *hipótesis GABAérgica* se refiere a un posible déficit de GABA (ácido- γ -aminobutírico) principal neurotransmisor inhibitorio, que actuaría sobre sistemas de neurotransmisión relacionadas al estado afectivo en neuronas centrales y que resultaría en síntomas depresivos, probablemente inhibiendo el efecto de neurotransmisores como 5-HT y NE (Hećimović, 2006).

MODELOS EXPERIMENTALES DE DEPRESIÓN

El objetivo de los modelos animales es el de imitar los fenómenos clínicos de la depresión en humanos para acceder a la comprensión de la fisiopatogénesis de la enfermedad, aportando información sobre el fundamento psicobiológico de las patologías (Yannielli, 2002). Existen diversos modelos experimentales de depresión que se han descrito en la literatura (Porsolt y col. 2001), y pueden clasificarse de acuerdo a las manipulaciones empleadas para generar un estado depresivo (basado en Bonilla y col. 2000):

1. Modelos no-simuladores de depresión: Estos se refieren a aquellas manipulaciones en donde se evalúa el efecto de fármacos antidepresivos en la conducta de indefensión aprendida que exhiben los animales en pruebas como la de nado forzado, conducta considerada como indicador de depresión.

2. Modelos que simulan depresión: Estos modelos generan síntomas similares a lo reportado en humanos: alteración de la actividad locomotora, trastornos del sueño, y disminución de conductas motivadas por placer (anhedonia) en el consumo de agua con azúcar, estimulación intracraneal y conducta sexual.

a) Modelos generados por separación. Se distingue por provocar un período de protesta (agitación, llanto) que es inducida a edad temprana, separando las crías de sus madres por un tiempo en diferentes momentos del día y a temperatura variada. Esto se convierte en conductas de desesperanza al llegar a la edad adulta y son observadas en pruebas conductuales de ansiedad y depresión (Rüedi-Bettschen y col. 2004). Existe falta de apetito, menor actividad e interacción social. La separación neonatal y la respuesta motivacional en diferentes condiciones medioambientales persisten hasta la edad adulta (Marais y col. 2008) observada en conductas de indefensión en la prueba de nado forzado y menor expresión de NE en el estriado ventral (Brenes y col. 2007). Existe una mejoría de los síntomas si existe un tratamiento con antidepresivos.

b) Modelos generados por estrés. En estos, la depresión es resultado de una reducción en la actividad del sistema de recompensa a través de estrés, el cual induce alteraciones en la actividad, conductas afectivas, atención, motivación y aprendizaje, todos síntomas asociados a sistemas monoaminérgicos (Rosenwasser y col. 1997). El tratamiento con antidepresivos revierte los síntomas generados por estas manipulaciones. Existen diferentes estrategias para producir estrés y desencadenar síntomas de depresión:

- *Desamparo aprendido:* Se basa en el principio de repetir un estímulo aversivo donde el escape y la evitación son imposibles ocasionando una inmovilidad condicionada. La consecuencia es que al encontrarse en una

situación donde sí se tenga la oportunidad de escape, el animal no lo realiza. Los animales presentan una disminución de la actividad motriz, del apetito, de peso corporal y presentan conductas agresivas.

- *Estrés crónico impredecible*: Se basa en la hipótesis de los estresores en la vida diaria. Durante 3 a 4 semanas aproximadamente, se aplican diversos factores estresantes en diferentes días y aleatoriamente como: inmersión en agua fría, inmovilidad forzada, choques eléctricos, cambios en fotoperiodo (luz/oscuridad), sonido fuerte y luz intensa. Se aplican pruebas conductuales para evaluar síntomas depresivos.
- *Estrés crónico leve impredecible*: La hipótesis en la que se basa este modelo es que los estresores leves crónicos y aleatorios no generan respuestas positivas ante su presencia. La diferencia con el modelo anterior es que los estresores diarios son leves como: aserrín mojado, inclinación de la caja habitación de los animales, privación de agua y comida por poco tiempo, luz estroboscópica o constante y oscuridad constante, que son dados aleatoriamente. Estos cambios de estresores se podrían considerar un tipo de *desincronización circadiana*, ya que se caracteriza por realizar diariamente cambios ambientales inesperados y estresantes, lo que conduce a conducta anhedónica medida por una disminución de la ingestión de agua con azúcar (D'Aquila y col. 1997) y a alteraciones circadianas en la actividad locomotora (Gorka y col. 1996). Así mismo, posterior al estrés crónico leve impredecible, se produce una fragmentación del sueño, aumentando episodios del sueño MOR y SOL1 y acortando la duración de SOL2, así como niveles bajos de GABA en el hipocampo y aumento de 5-HT en sueño MOR y SOL correlacionado con disminución de ingesta de agua con azúcar (Grønli y col. 2007).

c) Modelos inducidos por lesión. La ablación o lesión específica de órganos (bulbos olfatorios, amígdala, tiroides) han resultado en conductas relacionadas a la depresión; así mismo, el tratamiento positivo con antidepresivos indican una relación entre la lesión con depresión.

- *Bulbectomía olfatoria (OBX)* lesión encefálica que causa irritabilidad, hiperactividad, elevación de niveles plasmáticos de corticosteroides en plasma, agresividad, disminución de conducta sexual, déficits de aprendizaje y disminución de neurotransmisores monoaminérgicos en el sistema límbico (Bonilla y col. 2000; Rosenwasser y col. 1997).
- La *lesión serotoninérgica en la amígdala* genera conductas depresivas.
- La *Tiroidectomía (TPX)* produce acortamiento del periodo de actividad en corrimiento libre, y aumento de la actividad total.

d) Modelos inducidos por fármacos durante el desarrollo. Incluye los tratamientos con antidepresivos tricíclicos (TCAs) a animales en edad temprana, presentando consecuentemente síntomas parecidos a la depresión endógena humana cuando son adultos. Algunos síntomas depresivos que se observan son: mayor actividad en campo abierto, consumo voluntario de alcohol, mayor tiempo de inmovilidad en la prueba de nado forzado, menor actividad sexual, conducta agresiva y respuesta de recompensa, aumento de sueño MOR y alteración en sistemas monoaminérgicos (Bonilla, y col. 2000; Rosenwasser y col. 1997). La privación de sueño MOR o empleo de antidepresivos tricíclicos (TCAs) en edad adulta, ayudan a revertir los síntomas.

e) Modelos de depresión inducidos en cepas genéticamente diseñadas.

Este comprende el estudio de la depresión a través de animales genéticamente modificados y caracterizados conductualmente.

- *Rata espontáneamente hipertensa (SHR) y Wistar-Kyoto (WKY)*, son dos cepas para estudiar la susceptibilidad genética a la depresión inducida por estrés. La primera presenta fase avanzada de sincronización, mientras que las segundas muestran periodos largos en corrimiento libre (Rosenwasser y col. 1997).
- *Ratas Flinders (FSL) y Ratas Flinders resistente (FRL)* estas cepas sensibles a drogas, se utilizan en el estudio de depresión basado en un aumento del tono colinérgico. Estos animales muestran hipoactividad, aumento del sueño MOR, respuesta exagerada al estrés y alteraciones en sistema monoaminérgicos y de otros neurotransmisores (Rosenwasser y col. 1997).
- *Ratones BALB/c* son animales que difieren en conducta afectiva, son hiperemocionales y agresivos, susceptibles a déficits conductuales y neuroquímicos al estar bajo estrés, así como a presentar alteraciones circadianas como acortamiento de corrimiento libre en oscuridad constante.

f) Modelos inducidos por desincronización circadiana. Esta clasificación

incluye modelos que al realizar variaciones o alteraciones del ciclo luz oscuridad (LD), desencadenan síntomas de depresión mayor o de tipo afectivos- estacionales.

- *Acortamiento del día y alargamiento de la noche* para el estudio de alteraciones circadianas en el trastorno afectivo estacional que genera conductas depresivas como mayor conducta de indefensión y por lo tanto

mayor necesidad de rescate por parte de los experimentadores en la prueba de nado forzado; no obstante, la conducta general en campo abierto no se ve afectada (Einat y col. 2006); así mismo, se ha reportado que fotoperiodos justos de 12 hrs. luz o menos desencadena en conductas de ansiedad y depresión reflejadas en un consumo menor de agua con azúcar, menor conductas exploratorias en la prueba de campo abierto y mayor conductas de indefensión aprendida en la prueba de nado forzado; sin embargo, a pesar de ser una situación que genera estrés, el análisis de concentración de corticosterona no se encuentran afectadas (Prendergast y col. 2004).

- *Condiciones de oscuridad constante (DD)* ocasiona alteración en la expresión inmunohistoquímica de monoaminas como 5-HT en los núcleos de Rafe y de TH en el Locus coeruleus (LC); así mismo, hay mayor presencia de conductas de indefensión y menor de escape en la prueba de nado forzado como síntoma de depresión; siendo revertidos los efectos a través de tratamiento con el antidepresivo desipramina (González y col. 2007).
- *Condiciones de luz constante (LL)* ocasionan alteraciones cognitivas (Pei Ma y col. 2007) y desincronización de los ritmos circadianos de actividad locomotora y cortisol (Honma y col. 1978; Sudo y col. 2003). Debido a las alteraciones cognitivas y conductuales generadas, ésta manipulación se propone como posible método para el estudio de la depresión.
- La *desincronización interna* se ha estudiado principalmente a través de modelos animales de trabajo nocturno. Esta metodología ha demostrado generar desincronización de los osciladores periféricos caracterizados por alteraciones circadianas de la actividad locomotora, de la ingesta de alimento y expresión de triglicéridos en sangre con un consecuente

aumento de peso asociado a los cambios temporales de la ingesta de alimento hacia la hora de descanso. Debido a que esta condición no conduce a la pérdida de la ritmicidad de los genes reloj Per 1 y Per 2 en el NSQ, ni alteración en la ritmicidad de la hormona de corticosterona en plasma sanguíneo, pero sí en otras variables circadianas; se considera un modelo de desincronización interna (Salgado-Delgado y col. 2008). Este modelo refleja la condición que se ha observado en humanos, como se describió anteriormente, por lo que también podría emplearse para el estudio de depresión en esta condición de desincronización.

Variables circadianas evaluadas en los modelos experimentales de depresión

De los modelos anteriormente descritos, no se ha determinado si la depresión endógena es causa o consecuencia de la alteración de los ritmos circadianos o si aspectos neuroquímicos cerebrales se encuentran involucrados en la generación de ambos. No obstante, en algunos modelos se han evaluado diversas variables circadianas que indican una posible relación entre ellas (Tabla 1) (de Yannielli, 2002).

Tabla 1. Parámetros circadianos y neuroquímicos evaluados en modelos experimentales de depresión. En diversos modelos animales de depresión se han descrito alteraciones en variables circadianas y cambios neuroquímicos relacionados a la manipulación experimental, que puede ser desde inducción de estrés hasta administración con antidepresivos a edad temprana.

Modelo	Nivel o amplitud de actividad locomotora	Período	Comienzo de la actividad (fase)	Otras respuestas a la luz	Cambio neuroquímico
OBX (Bulbectomía olfatoria)	Aumentado (DD)	Alargado	Retraso de comienzo, retraso de acrofase del ritmo de actividad locomotora		Disminución en turnover de 5-HT central aumento de contenido de AMPc en NSQ
Estresantes débiles crónicos	Disminuido (LD, DD, LL)			Avance de acrofase en LL	Menores niveles de monoaminas
Desesperanza aprendida	Tendencia a disminuir	Aumento			Menores niveles de monoaminas
Ratas sensibles Flinders	Aumento en actividad de campo abierto	Disminución	Avance (ritmo de temperatura)		Menores niveles de monoaminas; aumento en la sensibilidad colinérgica
Tratamiento neonatal con antidepresivos	Mayor amplitud de ritmos circadianos de bebida; mayor actividad de campo abierto	Aumento de período (desipramina) Sin cambios (clomipramina)	Sin cambios	Sin efecto de LL sobre periodo	Menor frecuencia de disparo en neuronas 5-HT del rafe; subsensibilidad al citalopram; menores niveles de 5-HT hipotalámico; aumento de 5-HIAA/5-HT en diversas regiones cerebrales
Tratamiento neonatal con clomipramina	Mayor actividad de campo abierto; mayor amplitud de ritmo de actividad	Sin cambios en DD; menor periodo en LL	Retraso en acrofases de ritmo de actividad locomotora	Mayor tiempo de resincronización	Menores niveles de 5-HT en hipotálamo y corteza frontal; aumento de 5-HIAA/5-HT en hipotálamo y rafe

Métodos de evaluación conductual y fisiológica empleadas en modelos experimentales de depresión

Para determinar síntomas depresivos en modelos experimentales, se emplean:

- *Pruebas conductuales*. *Test de Porsolt o nado forzado* donde se evalúa la presencia y duración de conducta de indefensión aprendida caracterizada por mayor flotación en el agua (Porsolt y col. 2001). Evaluaciones complementarias, como la *Prueba de campo abierto* y *Laberinto elevado* se utilizan para estudiar conductas de ansiedad ante situaciones novedosas, demostrando una inadecuada capacidad de adaptación que los animales tienen ante este tipo de condición; así mismo, estas evaluaciones sirven de base para observar cambios conductuales posteriores a cierta manipulación (Einat y col. 2006; González y col. 2007).
- *Prueba de agua con azúcar*. Ésta consiste en comparar el consumo del líquido azucarado antes y después de la manipulación experimental. La disminución de lo bebido indica anhedonia. Este test debe realizarse posterior a una habituación al agua con azúcar y a una privación de agua de 24 hrs. aproximadamente (D'Aquila y col. 1996).
- *Análisis de actividad locomotora*. A través de las cuentas de actividad diaria registrada con sensores o en una prueba conductual, se evalúa la actividad total, antes y después de la manipulación experimental (Gorka y col. 1996).
- *Mediciones fisiológicas*. Evaluaciones *inmunohistoquímicas* de monoaminas relacionadas a la depresión, como la expresión de 5-HT en los núcleos de Rafe, y de TH en el Locus coeruleus (González y col. 2007), así como, medición del metabolito de serotonina (5-HTT) y la expresión de mRNA del transportador de la recaptura de dicha monoamina (Won Jahng, y col. 2007). La medición de la *respuesta hormonal* de cortisol o ACTH en plasma es común como medición de estrés en las situaciones experimentales empleadas (Prendergast y col. 2008).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Los modelos experimentales de depresión que actualmente se emplean, se basan en generar estos síntomas a través de manipulaciones estresantes a edad temprana o adulta; sin embargo, no consideran la alteración de los ritmos circadianos como principal factor desencadenante, y tampoco consideran estrategias circadianas para evaluar las alteraciones conductuales y fisiológicas que afectan al organismo relacionadas a la depresión.

Considerando que la depresión puede tener como causa una alteración circadiana, se propone como primer objetivo en este estudio explorar la alteración de los ritmos circadianos como factor desencadenante de conductas depresivas. Esto permitirá desarrollar un modelo de depresión alternativo a los actualmente empleados. Para ello se determinarán las consecuencias de 1) La desincronización externa (luz u oscuridad constante); es decir, la pérdida de acoplamiento del marcapaso circadiano con sus sincronizadores ambientales; y 2) La desincronización interna (modelo de trabajador nocturno), es decir, la pérdida de relación de fase entre el reloj circadiano y sus osciladores periféricos como modelos experimentales de depresión en rata. Con estos modelos se evaluará el desarrollo de depresión a través de determinaciones conductuales basándose en la actividad locomotora y respuesta en las pruebas de agua con azúcar y campo abierto; y determinaciones fisiológicas principalmente corticosterona y expresión neuronal del NSQ (ver pág. 26).

Con estos, se propone establecer un nuevo método experimental para el estudio de la depresión y ofrecer un modelo para comprender los mecanismos que subyacen a los ritmos circadianos y las alteraciones de diversas variables circadianas relacionadas a esta enfermedad.

OBJETIVOS

Objetivo general

Estudiar la participación de la alteración de los ritmos circadianos en el desarrollo de depresión.

Objetivos específicos

Desarrollar un modelo de depresión en rata basado en la alteración de los ritmos circadianos.

Montar una serie de pruebas conductuales que permitan detectar depresión en ratas.

Determinar la relación entre ritmos circadianos y depresión.

HIPÓTESIS

La alteración de los ritmos circadianos caracterizada por una desincronización interna o externa, desencadenará depresión que se observará en los grupos a través de:

1. Actividad locomotora alterada.
2. Alteración de la actividad diaria medida a través de las cuentas de actividad.
3. Alteración del peso corporal.
4. Decremento en el consumo de agua con azúcar como indicador de anhedonia.
5. Decremento de la ingesta de alimento diario.
6. Presencia de conductas asociadas a ansiedad en la prueba de campo abierto.
7. Aumento en la concentración de la hormona corticosterona en plasma.
8. Alteración en la expresión neuronal del Núcleo Supraquiasmático (NSQ).

MÉTODO

1. Sujetos y consideraciones éticas

Se utilizaron 26 ratas macho de la cepa Wistar de entre 200-250 g., divididos en cuatro grupos: 3 con n=6 cada uno, y 1 con n=8; los animales fueron colocados en cajas individuales de acrílico (50x30x20 cm) en lockers ubicados dentro de un cuarto de bioferio con un sistema de inyección y extracción de aire, condiciones de temperatura controlada ($22\pm 1^{\circ}\text{C}$) y con libre acceso al agua y alimento (Rodent Laboratory Chow 5001). Las camas de aserrín se cambiaron cada semana, durante dos semanas de habituación previa a la manipulación. Desde el inicio del estudio tres grupos (n=18) se cambiaron a un ciclo 12 hrs. luz/oscuridad (LD) invertido (prendido de luces 20:00 hrs. y apagado 08:00 hrs.), mientras que el restante asignado al modelo de trabajador nocturno (n=8) permaneció en un ciclo normal 12 hrs. (prendido de luces 06:00 hrs. y apagado 18:00 hrs.). Se definió como ZT0 la hora de prendido de la luz y ZT12 la hora de apagado de la luz. Todas las condiciones cumplieron con la Norma Oficial Mexicana **NOM-062-ZOO-1999** para el cuidado de los animales.

2. Diseño Experimental

Los animales fueron divididos en 4 grupos: Control (CNTRL; n=6) durante todo el experimento se mantuvieron con el ciclo invertido de luz oscuridad 12 hrs. LD y sin ser manipulados; y 3 Experimentales: 1. En condiciones constantes de oscuridad (DD; n=6), 2. En condiciones constantes de iluminación (LL; n=6); y 3. Trabajador nocturno, con un ciclo regular de luz oscuridad 12 hrs. LD y sometidas a un paradigma de trabajo nocturno (TN; n=8).

Después de dos semanas de habituación al ciclo invertido para todos los grupos se realizó una evaluación en línea base (LB) de todas las determinaciones conductuales y fisiológicas. Durante las condiciones experimentales correspondientes, se realizaron dos evaluaciones más, siendo la primera a las 3-4 semanas (Fase experimental 1: Exp 1), y la segunda a las 6-7 semanas (Fase

experimental 2: Exp 2). Las evaluaciones se realizaron en diferentes días, a la misma hora y en el período de actividad (Figura 2).

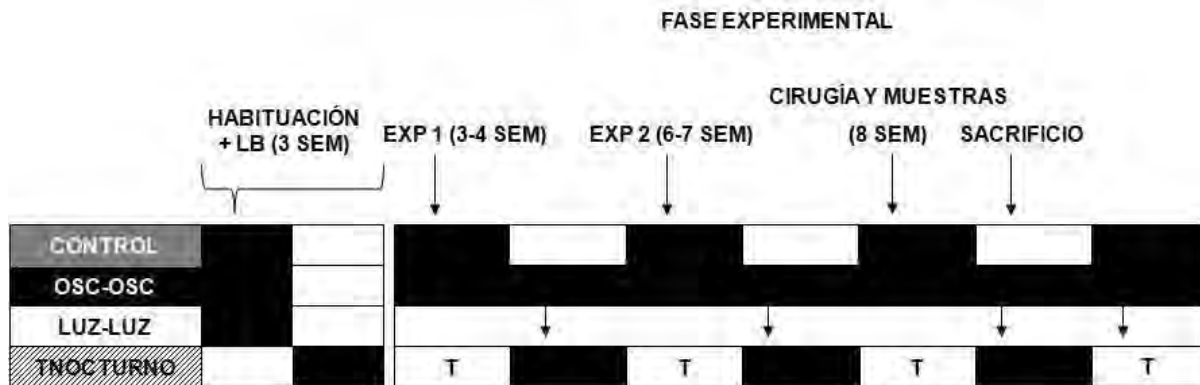


Figura 2. Esquema representativo del diseño experimental. Las barras en blanco (luz) y negro (oscuridad) indican el ciclo luz/oscuridad de cada grupo en la línea base (LB) y la fase experimental (Exp 1 y Exp 2), evaluándose en la fase de oscuridad o actividad (indicado por las flechas): Actividad espontánea, consumo de agua con azúcar, actividad en campo abierto, peso corporal e ingesta de alimento. T= Trabajo nocturno en las ruedas de actividad forzada por 8 hrs.

3. Métodos para la alteración de los ritmos circadianos

Condiciones de iluminación constante

Posterior a la línea base (LB) un grupo de 6 ratas se sometió a condiciones de oscuridad constante (DD) para lo cual se apagaron los focos removiendo el timer del locker en donde se mantenían. Otro grupo de 6 ratas se mantuvo en luz constante (LL), del mismo modo se removió el timer pero se dejaron los focos prendidos, esta condición permaneció por 8 semanas de la fase experimental.

Estrategia para generar condiciones de trabajo nocturno en ratas (Modelo de trabajo nocturno)

Después de la LB, se inició la fase de trabajo. Para llevarla a cabo, cada rata se sacó de su jaula habitación y se le colocó en una rueda de actividad cerrada, conectada a un motor que genera oscilaciones lentas y constantes (1 revolución/2.5 min.) obligándolas a moverse (trabajar) 8 hrs. diarias durante la fase de luz (etapa de descanso) de 8 a.m. a 4 p.m. (ZT2-ZT10) de lunes a viernes (Figura 3). En las ruedas de actividad se colocaba alimento y agua *ad libitum*. Después de las 8 hrs. de trabajo los animales se regresaban a su jaula hasta el

siguiente día. Los fines de semana se mantuvieron sin manipulación dentro de sus cajas habitación de registro. Este procedimiento se continuó por 8 semanas.



Figura 3. Rueda de actividad forzada para modelar condiciones del trabajador nocturno. Rueda que consta de cuatro divisiones con una rata en cada una, con rotaciones lentas que mantienen despiertos a los animales durante las 8 horas (lunes a viernes), con acceso libre al alimento y agua.

4. Pruebas conductuales para determinar síntomas de depresión en rata

Actividad locomotora

La actividad locomotora espontánea se monitoreó a lo largo de la línea base (LB) y las fases experimentales. Para ello los animales se alojaron individualmente en un cuarto aislado, sono-amortiguado, en cajas de acrílico transparente, a las cuales se les adaptó un sistema de registro conductual automatizado que consiste de sensores de presión colocados bajo las cajas, que registran el movimiento de los animales continuamente a lo largo de las 24 hrs. Los movimientos crean pulsos analógicos que se almacenan en una computadora en unidades de 1-5 min. (Figura 4).

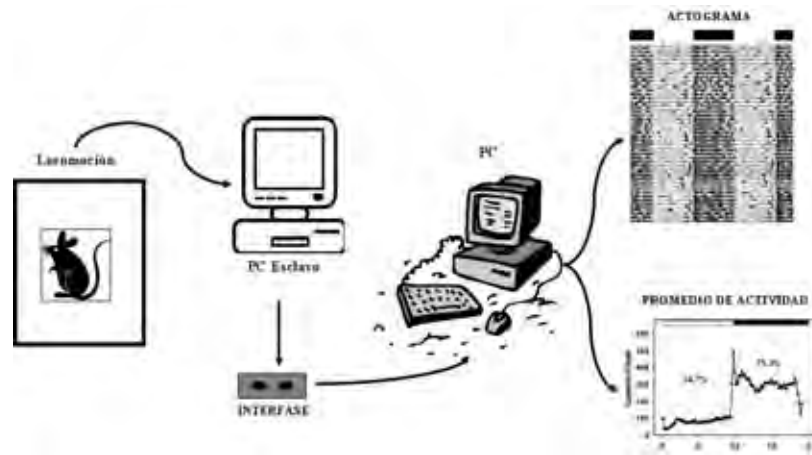


Figura 4. Sistema de registro conductual de las ratas. Figura representativa donde se observa como la actividad registrada de los sensores de presión debajo de las cajas se almacenan en una computadora que posteriormente es enviada a otra para obtener el registro de actividad diaria a modo de actograma o promedio de actividad.

Prueba de agua con azúcar

La conducta anhedónica asociada a un estado de depresión se evaluó a través de la reacción a un estímulo agradable: agua con azúcar. Esta prueba ha sido empleada y validada por muchos grupos y se considera un indicador confiable para determinar síntomas de depresión en ratas.

La prueba se realizó para todos los grupos (exceptuando al grupo LL en las etapas experimentales) en la fase de oscuridad y en sus cajas habitación. Posterior a un día de habituación al agua con azúcar para evitar neofobia, se privó de agua a todos los grupos por 19 hrs., siendo para los grupos CNTRL, LL y DD a partir de las 16:00 hrs. del día anterior hasta las 11:00 hrs. del día de la prueba; mientras que para el grupo TN la privación comprendió de la 01:00 hrs. del día anterior hasta las 21:00 hrs. del día de la prueba. Los grupos CNTRL, DD y TN se probaron a las ZT15 o CT15, es decir, a tres horas después de que se apagara la luz. Debido a que se encontraba en condiciones de luz constante, el grupo de LL se corrió a la misma hora que el CNTRL.

Para la prueba se colocaron dos botellas, una con 100 mL de agua con azúcar al 5%, y otra con agua normal, ambas botellas se dejaron por 30 min. de acuerdo a

reportes previos (D'Aquila y col. 1997, Grønli y col. 2003, Rygula y col. 2005). Antes y después de la prueba se pesaron las botellas y se midió con una escala el volumen para determinar el líquido consumido; terminada la prueba, se les permitió libre acceso al agua.

Prueba de campo abierto

Se empleó un campo abierto de 59.3 cm. de ancho y 59.5 cm. de largo dividido en cuadros de 11.6 cm. (Figura 5). Los animales fueron evaluados por 5 min. bajo luz roja (5W, 127V) en su periodo de actividad (noche) en ZT13 o CT13 (para el grupo DD); es decir, una hora después de que se apagara la luz. Para el grupo LL la prueba se llevo a cabo a la misma hora que el grupo CNTRL. Durante la prueba se realizó grabación simultánea de cada rata. Con las grabaciones obtenidas, se evaluaron las conductas que indican un estado de ansiedad como: exploración (apoyo y levantamiento), acicalamiento (aseo y rascado), paradas a la orilla y al centro del campo, así como, el número de bolos fecales y orina como respuestas autónomas relacionadas a esta condición. Todas estas conductas, se evaluaron y anotaron en una hoja diseñada bajo las definiciones operacionales establecidas previamente por el experimentador (Anexos 1 y 2). El análisis de datos en video se realizó por el experimentador unos días posteriores a la prueba.

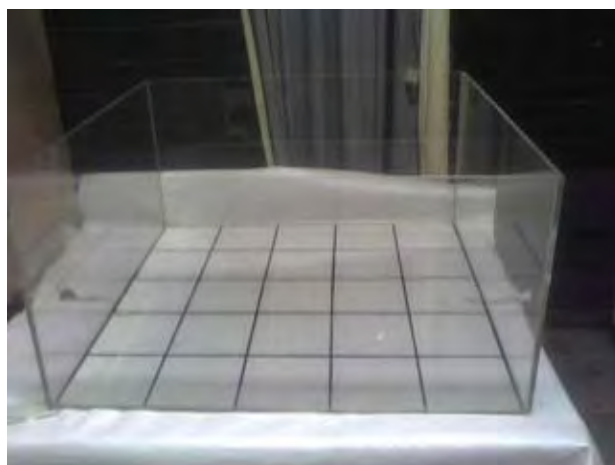


Figura 5. Campo abierto empleado para el análisis de conductas de ansiedad como: exploración, acicalamiento, paradas a la orilla y al centro del campo, orina y número de bolos fecales como respuestas autónomas relacionadas a esta condición.

5. Determinaciones Fisiológicas indicadoras de depresión en rata

Se realizaron evaluaciones fisiológicas para determinar cómo las condiciones de alteración de ritmos circadianos influyen sobre variables relacionadas a la depresión en el organismo:

Peso corporal

Todas las ratas fueron pesadas al llegar del bioterio, después de las 2 semanas de habituación se pesaron en LB, a las 3 (Exp 1) y a las 6 (Exp 2) semanas de estar en la condición experimental respectiva. El peso de los animales se adquirió en cada ocasión al finalizar la prueba de campo abierto.

Ingesta diaria de alimento

Durante cada una de las etapas de evaluación (LB, Exp 1 y Exp 2), se determinó la ingestión diaria de alimento. Para ello se dejaron 50 g. del alimento regular sobre el comedero (Purina Chow) en un día sin manipulación y se pesó el alimento restante 24 hrs. después.

Determinación de la concentración de la hormona corticosterona

Para obtener el nivel de concentración de corticosterona en los animales se les insertó una cánula en la vena yugular interna, de acuerdo a Steffens (1970). Las ratas fueron anestesiadas con Xilazina y Ketamina (PiSA 0.01 ml/100 g.) y canuladas en la vena yugular interna con una cánula yugular pediátrica de silicón de polietileno (0.025 mm. de diámetro interno y 0.047 mm. de diámetro externo; Silastic Brand; Dow Corning Corp., Midland, MI, USA) llena de heparina (500 U/ml) como anticoagulante. La cánula fue fijada en la espalda entre ambas escápulas (omóplatos) y se tapó con una pequeña aguja. Los animales fueron regresados a las condiciones experimentales correspondientes y después de dos días, se extrajeron muestras sanguíneas en dos puntos temporales (ZT0 y ZT12) correspondientes al pico más bajo y al valor más alto de expresión de dicha hormona, respectivamente. Las muestras de sangre (250 µl) se colectaron en tubos Eppendorf (1.8 ml) conteniendo un gel separador del coágulo (Vacutainer),

se obtuvo el suero por centrifugación, 5 min. a 3000 rpm., guardándose alícuotas de 50-100 µl a -45° C para su posterior análisis.

La corticosterona fue determinada con 25 µL de suero con el *Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas* ELISA (del inglés *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*) con un Kit comercial (Diagnostic Systems laboratorios, Inc, Webster TX, USA), basado en la detección de un antígeno no marcado e inmovilizado sobre una fase sólida mediante anticuerpos que producen una reacción colorante, que es medido por espectrofotometría (Thermo Labsystems Multiskan Ascent 354). Esta reacción de unión es detectada por un contador gamma (Compañía Cobra II, Packard) y convertida con una curva estándar al suero de corticosterona. Los perfiles temporales diarios fueron comparados entre grupos con relación a los dos puntos temporales.

Inmunohistoquímica para proteína c-Fos

Al finalizar las evaluaciones conductuales de la última fase experimental y después de haber terminado de adquirir las muestras de sangre, las ratas (CNTRL, DD y TN n= 4 y LL n=3) fueron sacrificadas con una sobredosis de pentobarbital sódico (Sedal-Vet 65 mg/ml) y perfundidas por punción cardiaca (ventrículo izquierdo) con 250 ml. de solución salina (0.9%), seguido de paraformaldehído al 4% en buffer fosfato (PBS, 0.1 M, pH 7.2). Al finalizar la perfusión, se extrajeron los cerebros y se posfijaron en paraformaldehído al 4% durante una hora. Los animales fueron perfundidos en el punto temporal ZT1 (CNTRL y LL) o CT1 para el grupo DD, y así obtener la expresión de la proteína c-Fos correspondiente al inicio del día.

Los cerebros fueron extraídos, posfijados por una hora y crioprotegidos en una solución de sacarosa al 30% en PBS al 0.1 M por 24 hrs. Los cerebros se congelaron y se cortaron en secciones de 40 µm. con un crióstato a -20° C y se colectaron en 4 series. De estas series sólo las secciones correspondientes al NSQ de cada animal se incubaron por 72 hrs. a 4°C con un anticuerpo para la

proteína c-Fos hecho en conejo (Santa Cruz Biotechnology, USA) diluido 1:2500 en Supermix (0.25% de gelatina, 0.5% de tritón X-100 en PBS pH 7.2).

Después de dos días de incubación, las secciones se lavaron 3 veces por 10 minutos en PBS y posteriormente se incubaron por 2 hrs. con un anticuerpo biotinilado 1:200 (anticonejo hecho en cabra; Vector laboratories) diluido en Supermix. Al finalizar las 2 hrs. de incubación, se lavaron 3 veces por 10 min. en PBS y los cortes se incubaron en una solución de avidina-biotina peroxidasa al 0.9% (Vectastain Elite ABC Kit; vector Labs, USA) por 2 horas a 4°C. Al finalizar la incubación, los cortes se lavaron 3 veces por 10 min. en PBS y al finalizar el último lavado, se activó el cromógeno con diaminobenzidina (0.5 mg/ml, en buffer de trizma a pH 7.2), y peróxido de hidrógeno al 30% (35 µl/100 ml), dando un color café. Los cortes se lavaron 3 veces por 5 min. Cada corte fue montado en láminas (porta-objetos) gelatinizados y deshidratadas en una serie de alcoholes y aclaradas con xilol para poder ser cubiertos con cubreobjetos y Entellan (Merck).

Conteo celular

Para cuantificar la expresión de c-Fos en el NSQ se eligieron 3 secciones representativas de acuerdo con el atlas estereotáxico de Paxinos y Watson (1998) tomando en cuenta una sección anterior, medial y posterior, y realizando el conteo de las dos subregiones: ventral y dorsal (Moore y col. 2002).

Las imágenes fueron examinadas bajo un microscopio de luz (Olympus BX41; Olympus, Japón) y capturadas con una cámara digital a una ampliación 20X (Image-Pro Plus 5.1, Media Cybernetics Inc.). Se utilizó un sistema computarizado de análisis de imágenes para digitalizar imágenes y evaluar el número de células inmunopositivas (MetaVue 4.5, Universal Imaging Corporation, Downingtown PA, USA).

Los núcleos inmunoreactivos fueron contados bilateralmente por el experimentador bajo un microscopio de luz (Nikon Eclipse E600; Nikon, Tokio,

Japón). Para evitar el número de falsos positivos, se determinó la densidad óptica del fondo en una región cercana que carece de c-Fos. Las células marcadas que quedaron dos veces por debajo de la densidad óptica del fondo fueron contadas, mientras las células que superaron este umbral fueron descartadas. Finalmente, la media de los valores se graficó y se compararon con un ANOVA de dos vías para los factores grupo y tiempo.

Análisis Estadísticos

Los datos obtenidos de las determinaciones conductuales y fisiológicas se ordenaron por grupos y por fase experimental y se representan como medias \pm el error estándar (sem). El aumento de peso corporal y actividad diaria fue analizado con un Análisis de Varianza (ANOVA) de una vía para el factor grupos (4). La ingesta de alimento, el consumo de agua con azúcar, y las conductas de campo abierto, fueron analizadas con una ANOVA de dos vías, para los factores: grupo (4) y fases experimentales (3). Todos los análisis fueron seguidos de una comparación post-hoc de Duncan ($p < 0.05$).

Para la concentración de corticosterona, así como el número de células positivas a c-Fos, fueron evaluadas con una ANOVA de dos vías para los factores grupo (4 niveles) y tiempo o región respectivamente (2 niveles), seguidas de una comparación múltiple de Tukey para n desiguales ($p < 0.05$). El análisis estadístico fue realizado con el programa Statistica para la versión de Windows 4.5 (StatSoft, 1993).

RESULTADOS

Determinaciones conductuales

Actividad locomotora

En su línea base (LB), los cuatro grupos presentaron un ritmo claro sincronizado al ciclo LD, con un período aproximado de 24 hrs., como puede observarse en la parte superior de cada actograma (Figuras 6-9). Al iniciar la manipulación experimental el grupo CNTRL permaneció sincronizado al ciclo LD impuesto (Figura 6); mientras que el grupo DD comenzó a presentar corrimiento libre de su actividad locomotora, siendo cada día más tarde el inicio de la actividad, pero sin pérdida del período que fue en promedio de 24.5 hrs. (Figura 7). El grupo LL perdió progresivamente la ritmicidad, presentando ritmos ultradianos sin período significativo (Figura 8). Finalmente, el grupo TN presentó una modificación en su conducta diaria con un decremento significativo ($p < 0.05$) de la actividad nocturna y aumento de la actividad diurna, la cual fue evidente durante los fines de semana; así mismo, se observó un adelanto de la actividad nocturna hacia el final del intervalo de trabajo forzado en la rueda (Figura 9).

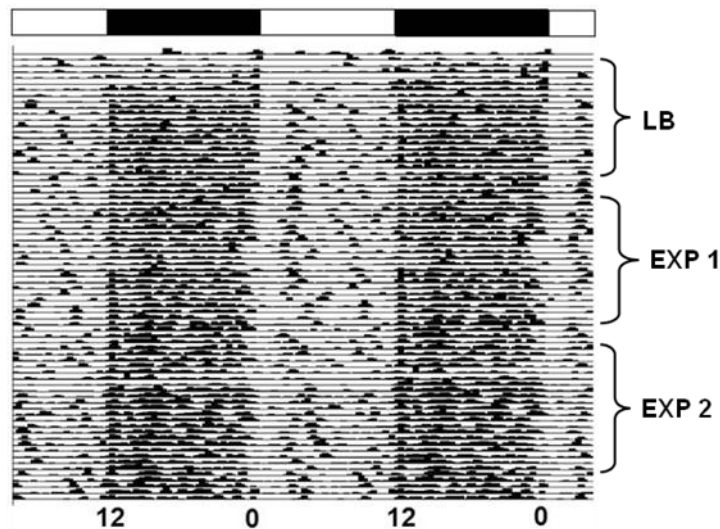


Figura 6. Actograma representativo en doble representación de un animal CNTRL. La conducta permaneció sincronizada al ciclo LD a lo largo del experimento. En el eje de las ordenadas cada línea representa un día y en el eje de las abscisas se representan las horas del día, inicio (ZT12) y fin (ZT0) de la actividad nocturna. Las barras negras y blancas representan los intervalos de noche y días respectivamente.

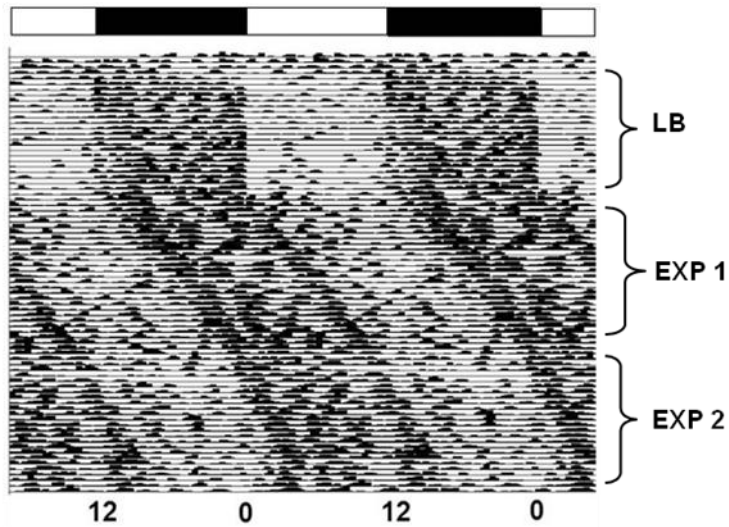


Figura 7. Actograma representativo en doble representación de un animal DD. Posterior a la habituación al ciclo invertido y línea base (LB), los animales permanecieron en condiciones constantes de oscuridad (DD), generando un corrimiento libre de la actividad locomotora pero sin pérdida de la ritmicidad (Exp 1 y Exp 2). Los días de registro se representan en el eje de las ordenadas, mientras que en el eje de las abscisas se representan las horas del día.

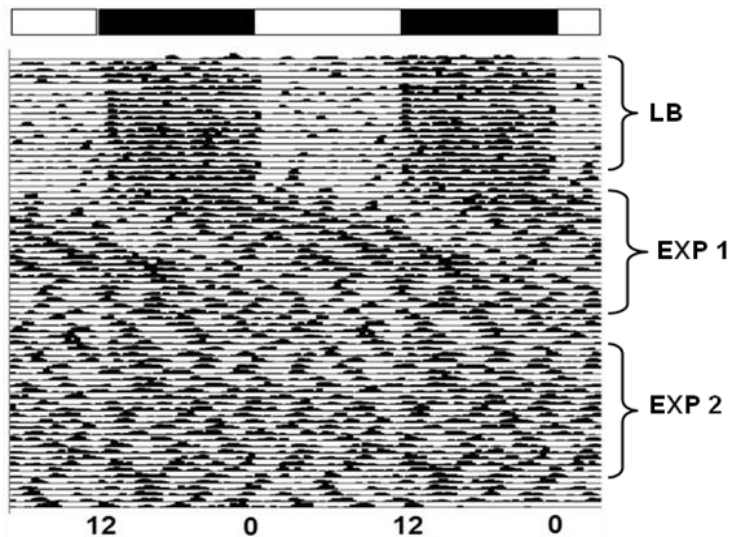


Figura 8. Actograma representativo en doble representación de un animal LL. Posterior a la habituación al ciclo invertido y LB, los animales permanecieron en condiciones de iluminación constante (LL) induciendo una arritmicidad conductual (Exp 1 y Exp 2). El eje de las ordenadas representa los días de registro y el eje de las abscisas las horas del día.

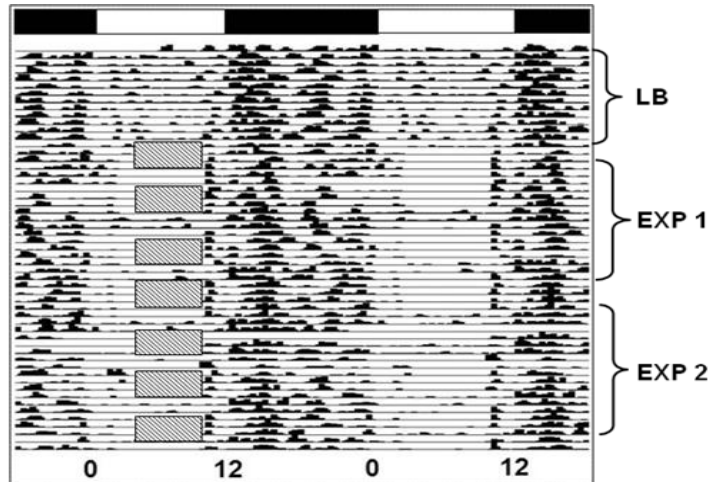


Figura 9. Actograma representativo en doble representación de un animal TN. Posterior a la línea base (LB), se inició el trabajo forzado. Los espacios marcados muestran los intervalos en donde las ratas permanecían en las ruedas. La actividad permaneció sincronizada al ciclo LD impuesto, pero con un adelanto de ésta hacia el final del periodo del trabajo, y un aumento en la etapa de luz los fines de semana. El eje de las ordenadas representa los días de registro y el eje de las abscisas las horas del día.

Se adquirió el porcentaje de cuentas diarias de actividad con respecto a la LB. El grupo CNTRL mantuvo niveles similares de la actividad locomotora diaria en Exp 1 y Exp 2; los grupos DD y LL aumentaron, y el grupo TN disminuyó notablemente. El ANOVA mostró que existen diferencias entre los grupos experimentales ($p < 0.05$) y el análisis post hoc de Duncan mostró diferencia entre el grupo TN y los experimentales en Exp 1 y Exp 2, pero no con el CNTRL (Figura 10).

Porcentaje cuentas diarias de actividad

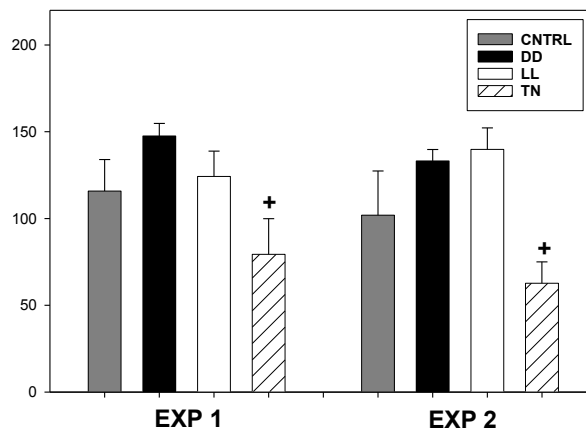


Figura 10. Porcentaje de cuentas diarias de actividad con respecto a la línea base (LB). (+) El grupo TN en Exp 1 disminuyó la actividad con respecto al grupo LL y en Exp 2 con respecto a los grupos DD y LL.

Prueba de agua con azúcar

En la LB todas las ratas consumieron un promedio de entre 25 y 27 mL de agua azucarada en el intervalo de 30 min. sin diferencias significativas entre grupos. En Exp 1 (3-4 semanas) después de iniciadas las manipulaciones experimentales los grupos CNTRL y DD aumentaron el consumo del líquido, en cambio se encontró conducta ahnedónica en los grupos LL y TN, disminuyendo el consumo progresivamente con respecto al grupo CNTRL ($p < 0.05$). Los efectos de las manipulaciones experimentales fueron aún más evidentes después de 6-7 semanas (Exp 2). El post hoc de Duncan mostró una diferencia significativa del grupo LL con respecto al CNTRL y el grupo TN con respecto a todos los grupos en Exp 1 y en Exp 2 ($p < 0.05$) (Figura 11).

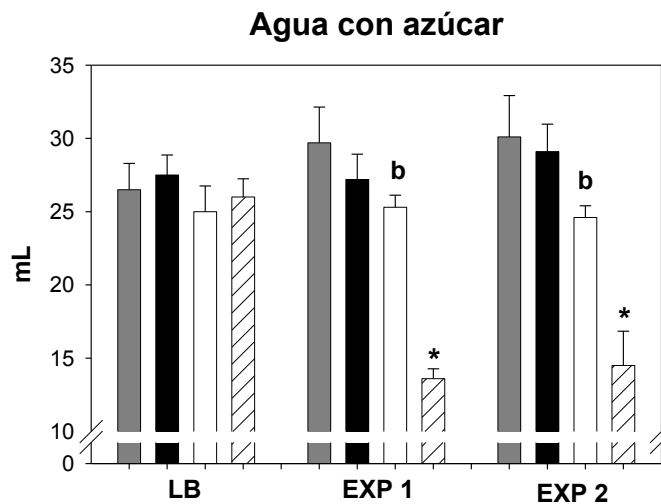


Figura 11. Promedio de consumo de agua con azúcar. En LB, no existieron diferencias entre los grupos. Con respecto al grupo CNTRL (gris), el grupo LL (blanco) y TN (rayado) con respecto a todos los grupos, mostraron conducta ahnedónica en Exp 1 y Exp 2, reduciendo el consumo de agua con azúcar. * = diferencia entre TN y todos los grupos, **b** = diferencia entre LL y CNTRL.

Prueba de campo abierto

El grupo CNTRL no mostro cambios en ninguna conducta permaneciendo similar en las tres evaluaciones. De las conductas analizadas sólo se encontraron diferencias en las conductas de acicalamiento, paradas al centro, paradas a la orilla y cuadros recorridos. No se encontraron efectos en las mediciones de exploración, bolos fecales y orina (Tabla 2).

Tabla 2. Valores promedio de conductas no significativas en campo abierto. Las conductas de Exploración, Bolos fecales y Orina, no fueron diferentes entre los grupos ni en ninguna fase experimental.

		LB	EXP 1	EXP 2	
Exploración	CNTRL	32.60	34.00	27.60	NS
	DD	36.16	33.33	29.50	NS
	LL	39.33	42.00	27.66	NS
	TN	33.00	31.28	23.71	NS
Bolos	CNTRL	1.60	2.40	1.40	NS
	DD	0.16	1.33	2.16	NS
	LL	1.50	1.66	1.50	NS
	TN	2.14	2.85	2.29	NS
Orina	CNTRL	1.00	0.80	0.40	NS
	DD	0.50	1.66	2.17	NS
	LL	0.33	0	0.67	NS
	TN	1.00	0.43	0.57	NS

1) Acicalamiento. El grupo CNTRL no tuvo diferencias a lo largo de las evaluaciones. Los grupos LL y TN mostraron progresivamente mayor número de eventos de acicalamiento y rascado. El ANOVA indicó diferencias entre grupos y el post hoc de Duncan indicó diferencias del grupo TN en LB con respecto a los grupos experimentales y en Exp 1 con respecto al grupo CNTRL ($p < 0.05$) (Figura 12).

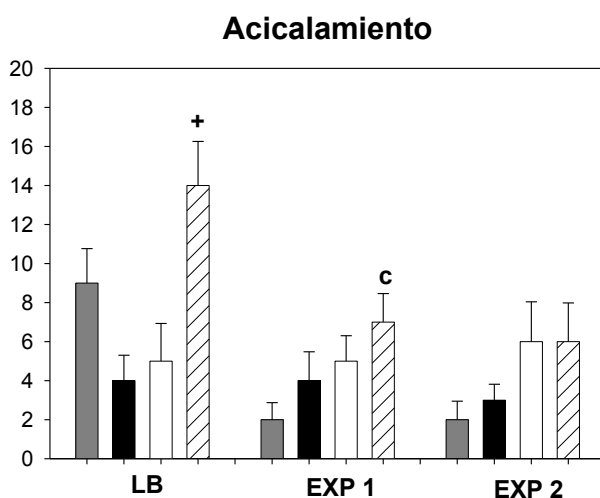


Figura 12. Promedio de Acicalamiento en el campo abierto del número de veces que las ratas presentaban la conducta de rascar o aseo en los 5 min de evaluación. Diferencias en LB entre el grupo TN (rayado) con respecto a los grupos experimentales (+) y en Exp 1 fue diferente (c) sólo con respecto al grupo CNTRL (gris). Los grupos LL (blanco) y TN muestran una tendencia a aumentar en Exp 2.

2) Paradas en el centro. El grupo CNTRL no presentó diferencias en esta conducta a lo largo de las evaluaciones; sin embargo, disminuyeron en los grupos TN y DD con respecto a LL en Exp 1 ($p < 0.05$) (Figura 13).

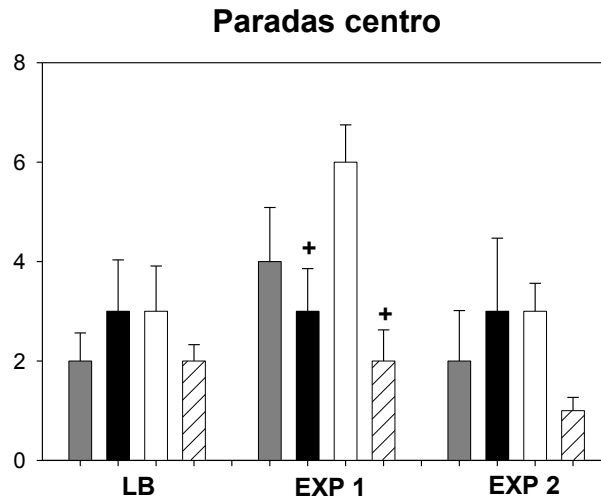


Figura 13. Promedio de Paradas al centro del campo abierto. Tanto en LB como en el grupo CNTRL (gris) no existieron diferencias en el número de veces que las ratas se detuvieron en los cuadros centrales del campo abierto. En Exp 1 (+) indica diferencia de los grupos DD (negro) y TN (rayado) con respecto al grupo LL (blanco).

3) Paradas en la orilla. El grupo CNTRL no fue diferente entre las mediciones. Los grupos DD y TN disminuyeron significativamente con respecto a éste tanto en LB como en Exp 1 ($p < 0.05$) (Figura 14).

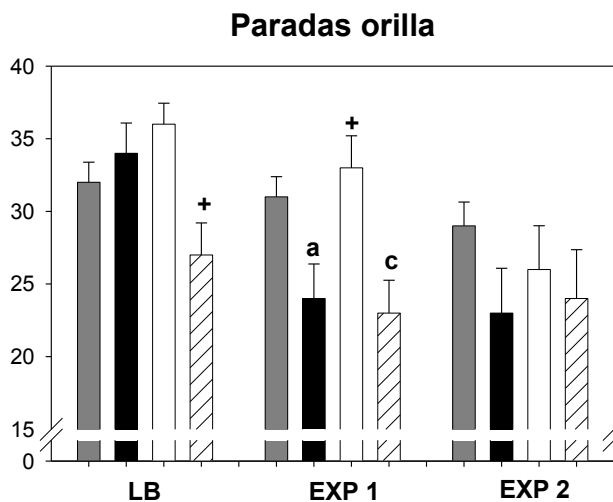


Figura 14. Promedio de Paradas en la orilla del campo abierto. El número de veces que los animales se detenían en las orillas en el grupo CNTRL (gris) permaneció sin cambios. En LB (+) indica menos en el grupo TN (rayado) con respecto a DD (negro) y LL (blanco). En Exp 1 (a) el grupo DD y (c) el grupo TN con respecto al CNTRL presentaron una disminución. (+) El grupo LL aumentó con respecto a los grupos experimentales.

4) Cuadros recorridos. El grupo CNTRL permaneció sin cambios en el número de cuadros recorridos a lo largo de las evaluaciones. En LB el grupo LL mostró ser mayor con respecto al grupo CNTRL, mientras el grupo TN mostró una disminución con respecto a los otros grupos experimentales, que fue significativamente diferente de acuerdo al análisis post hoc de Duncan ($p < 0.05$). En Exp 1 no se encontraron diferencias entre los grupos y en Exp 2 sólo el grupo DD mostró ser significativamente menor ($p < 0.05$) con respecto al grupo CNTRL (Figura 15).

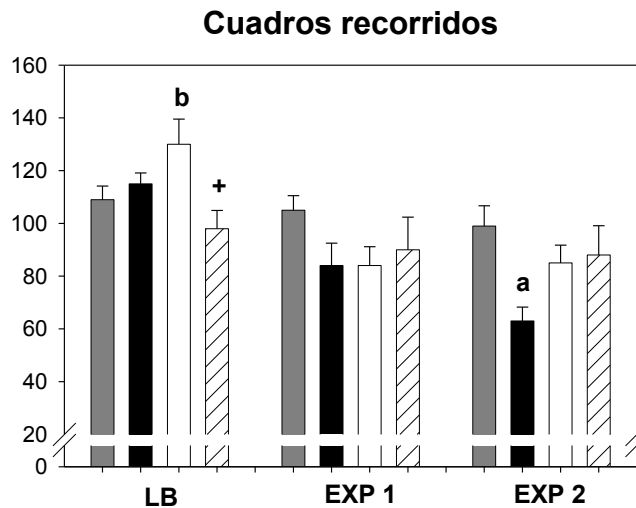


Figura 15. Promedio de Cuadros recorridos en el campo abierto. El grupo CNTRL (gris) no cambió a lo largo de las evaluaciones. En LB (**b**) el grupo LL (blanco) con respecto al grupo CNTRL y (**+**) el grupo TN (rayado) con respecto a los grupos experimentales mostraron diferencias significativas. En Exp 1 no se presentaron diferencias entre los grupos. En Exp 2 (**a**) sólo el grupo DD (negro) fue diferente respecto al grupo CNTRL.

Determinaciones Fisiológicas

Peso corporal

La ganancia de peso corporal se calculó de las 3 y 6 semanas de permanecer en las condiciones experimentales con respecto a la LB. En Exp 1 el grupo CNTRL aumentó su peso a 73 gr. promedio, mientras que el grupo TN tuvo una ganancia significativamente mayor ($p < 0.05$) de peso corporal con respecto a todos los grupos. En Exp 2 el grupo CNTRL ganó 114 gr. promedio, el grupo DD disminuyó significativamente el peso con respecto a este y el grupo TN ganó significativamente más peso con respecto a todos los grupos ($p < 0.05$) (Figura 16).

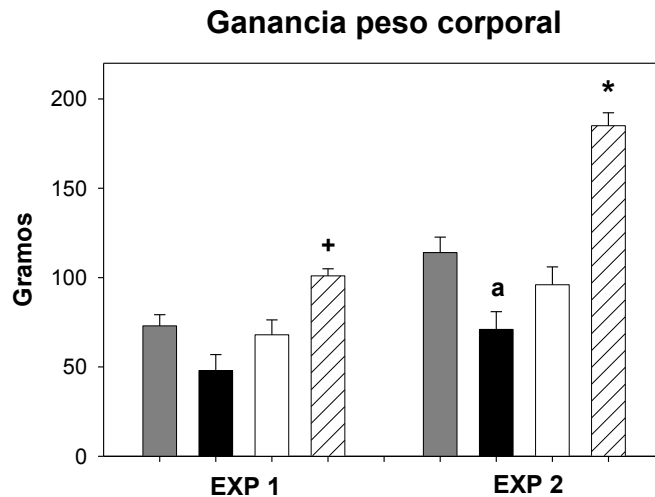


Figura 16. Ganancia de Peso corporal con respecto a la LB. El grupo CNTRL (gris) aumentó su peso con respecto a LB en las dos fases experimentales. En Exp 1 (+) el grupo TN (rayado) tuvo mayor ganancia de peso corporal sólo con respecto a los grupos experimentales. En Exp 2 (a) el grupo DD (negro) mostró una disminución significativa con respecto al grupo CNTRL y (*) el grupo TN tuvo una mayor ganancia con respecto a todos los grupos.

Ingesta diaria de alimento

La ingesta de alimento por el grupo CNTRL fue similar en las tres fases experimentales. En LB no hubo diferencias entre los grupos. En Exp 1 el análisis post hoc de Tukey ($p < 0.05$) indicó un aumento de la ingesta de alimento del grupo TN con respecto a los demás. En Exp 2 nuevamente no se presentaron diferencias (Figura 17).

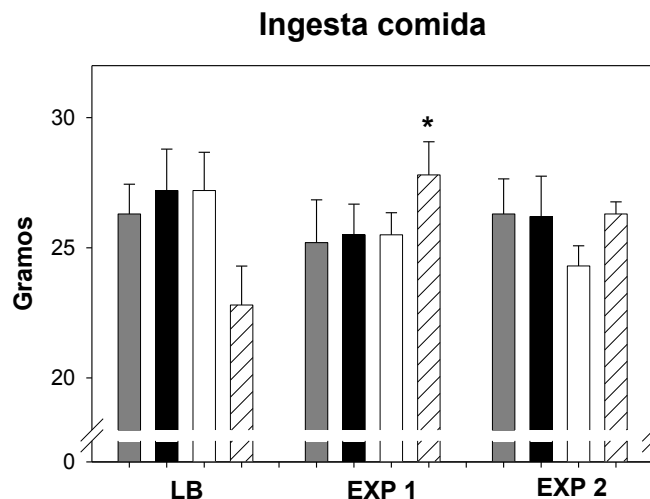


Figura 17. Promedio de Ingesta diaria de alimento. El grupo CNTRL (gris) mantuvo similar la ingesta de alimento en las tres evaluaciones. No se presentaron diferencias de la ingesta en LB. (*) El grupo TN (rayado) en Exp 1 tuvo mayor consumo con respecto a todos los grupos. En Exp 2 no hubo diferencias. El grupo LL presentó una tendencia a disminuir el consumo de alimento.

Concentración de corticosterona en sangre

El grupo CNTRL no tuvo diferencias en la concentración de la hormona de corticosterona en los dos puntos temporales obtenidos. El ANOVA con post hoc de Tukey no mostró diferencias entre los grupos ($p < 0.05$). Se observaron niveles más altos al inicio de la noche (ZT12) comparados con el final de la noche (ZT0) (Figura 18).

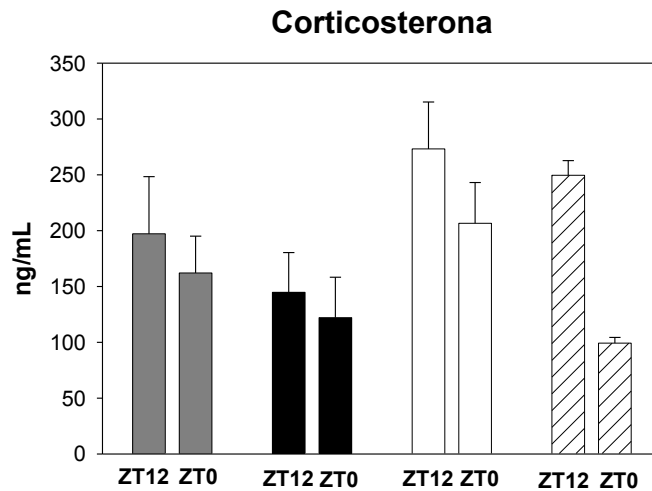


Figura 18. Promedio de concentración de Corticosterona en dos puntos temporales. El grupo CNTRL (gris), así como los experimentales: DD (negro), LL (blanco) y TN (rayado) no presentaron diferencias en la concentración al inicio (ZT12) o al final (ZT0) del periodo de actividad. Es observable una tendencia de niveles altos de concentración en el grupo LL.

El promedio general de los dos puntos temporales obtenidos tampoco fueron diferentes de acuerdo al ANOVA con post hoc de Tukey en ninguno de los grupos experimentales ($p < 0.05$) (Figura 19).

Corticosterona

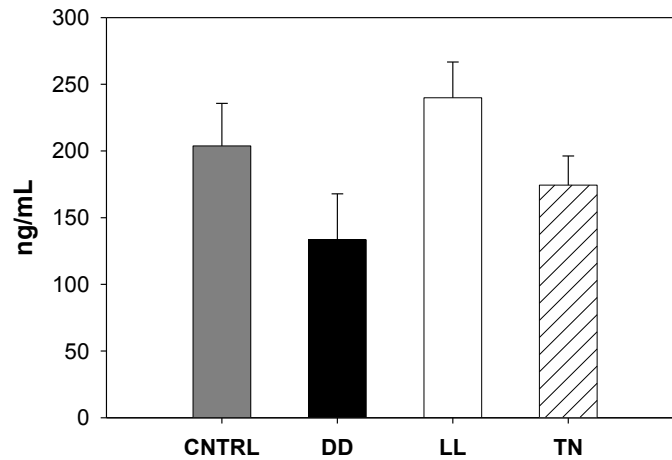


Figura 19. Promedio de concentración de Corticosterona de dos puntos temporales. No fue significativamente diferente entre los grupos (CNTRL, DD, LL o TN) tomando en cuenta el promedio de concentración de los dos puntos temporales obtenidos (ZT0 y ZT12). Se observa una tendencia de concentración alta en el grupo LL y disminución en el grupo DD.

Immunoreactividad para proteína c-Fos

La expresión de actividad celular del NSQ en el grupo CNTRL fue mayor en el área ventral que en la dorsal (Figura 20). La expresión de las células immunoreactivas a la proteína c-Fos en las dos áreas descritas en todos los grupos experimentales con respecto al grupo CNTRL fue significativamente menor ($p < 0.05$) (Figura 21).

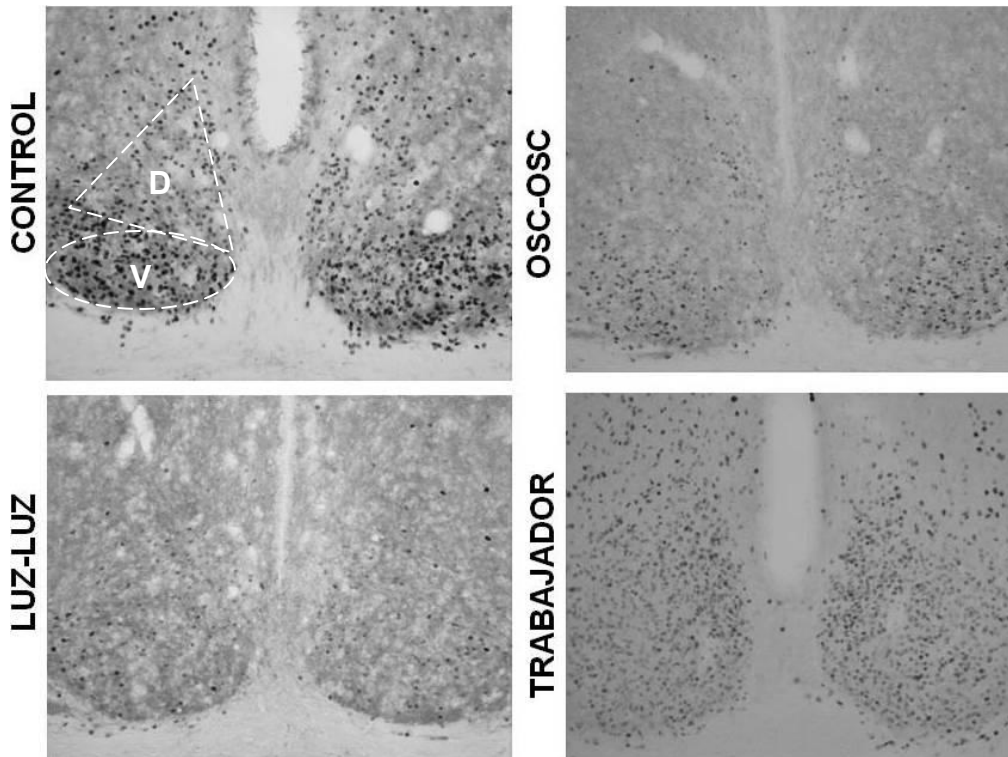


Figura 20. Fotos representativas correspondientes al área medial del núcleo supraquiasmático (NSQ). Imágenes en blanco y negro del NSQ de un animal de cada grupo adquiridas con una ampliación de 20X. Las áreas punteadas indican la región del núcleo que se contabilizó. D=Dorsal y V= Ventral.

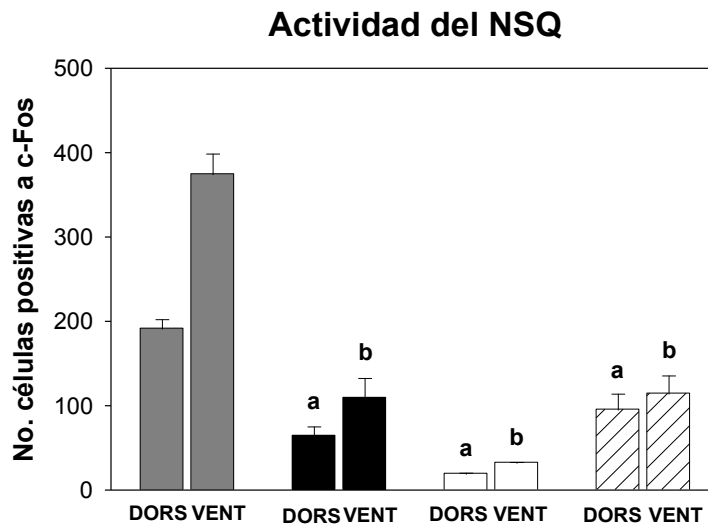


Figura 21. Promedio de células inmunoreactivas a c-Fos en el área ventral y dorsal del núcleo supraquiasmático (NSQ). El grupo CNTRL (gris) presentó una expresión celular en el área ventral mayor que la dorsal. (a) Disminución significativa de células inmunoreactivas del área dorsal (DORS) y (b) del área ventral (VENT) de los grupos experimentales: DD (negro), LL (blanco) y TN (rayado) con respecto a las del grupo CNTRL.

DISCUSIÓN

La vida actual ha propiciado cambios en la actividad diaria, prolongando la actividad nocturna como consecuencia a una mayor exposición a la luz artificial. Estos cambios propician una desincronización circadiana que genera alteraciones a la salud física y mental como consecuencia de la alteración tanto al reloj biológico como a los osciladores periféricos. Esta desincronización se acompaña de alteración de los hábitos alimenticios, inversión de patrones del ciclo de actividad-reposo, afectando principalmente el sueño y generando problemas de salud física y mental.

Los resultados obtenidos en este estudio indican, que la alteración de los ritmos circadianos por la luz constante, como generador de desincronización externa y el modelo experimental de trabajador nocturno, como generador de desincronización interna, producen síntomas conductuales de depresión. En cambio, con los mismos modelos de desincronización, sólo algunas variables fisiológicas presentaron alteraciones en el patrón temporal.

El patrón temporal de la *actividad locomotora* espontánea medida con el sistema de registro automatizado, mostró cambios importantes como arritmicidad conductual en el caso del grupo con luz constante y de inversión de la actividad hacia el horario de la actividad forzada en el trabajador nocturno. En el grupo DD a pesar de observarse un corrimiento libre de la conducta, la actividad locomotora permaneció con ritmo. El grupo LL se caracterizó por una pérdida del ritmo desde la primera fase experimental (3-4 semanas); sin embargo, esta fue más evidente hasta la segunda fase (6-7 semanas). Se observó un patrón conductual arritmico sin periodo definido como se ha descrito en estudios previos (Depres-Brummer y col. 1995; Gorka, 1996). El grupo TN se caracterizó por un adelanto del inicio de la actividad nocturna, coincidiendo hacia el final del período de la actividad forzada y

un decremento de la actividad nocturna, también se observó aumento de la actividad en la fase de luz los días sin trabajo (fin de semana), lo cual denota un aplanamiento del ritmo de actividad, como ya se ha reportado (Salgado-Delgado y col. 2008). El porcentaje de cuentas de actividad diaria mostró una tendencia de aumentar en el grupo LL. Esto coincide con experimentos previos, donde animales que habitan bajo luz constante presentan hiperactividad en pruebas como laberinto elevado o campo abierto, como consecuencia de la iluminación constante (Fonken y col. 2009). Los resultados obtenidos confirman lo que otros estudios han reportado, reafirmando que estas condiciones de desincronización circadiana afectan la actividad locomotora del animal.

La prueba conductual de consumo de agua con azúcar tiene validez y confiabilidad para evaluar anhedonia, una de las principales características de la depresión. En el caso de modelos experimentales es a través de la exposición a un estímulo palatable para la rata. Esta prueba se ha empleado en diferentes protocolos de investigación sobre depresión, teniendo como ventaja ser una evaluación no invasiva, no estresante y práctica ya que el tiempo de exposición (30 min) se ha considerado como el intervalo mínimo para obtener el consumo total de agua posterior a un día de privación de líquido (D'Aquila y col. 1997).

Como se esperaba, la prueba de *agua con azúcar* indicó conducta anhedónica, tanto en el grupo LL como en el grupo TN, que fueron los que mostraron alteraciones de la ritmicidad. En ambos, el consumo disminuyó significativamente con respecto al grupo CNTRL en Exp 1 y en Exp 2. Esta disminución fue más evidente en el grupo TN. Por otro lado, se observó que los grupos CNTRL y DD aumentaron el consumo de agua con azúcar, como se espera para animales sin manipulación que aumentan progresivamente el consumo de agua con azúcar en comparación a los que están bajo un protocolo de estrés crónico leve (Bessa y col 2009). Los presentes resultados muestran los efectos de la luz constante sobre el

desarrollo de la conducta anhedónica a corto y largo plazo. Estudios previos habían mostrado este efecto únicamente a corto plazo (Fonken y col. 2009). Cabe destacar que los resultados obtenidos en el grupo TN son novedosos, pues en los modelos experimentales de trabajo nocturno no se había estudiado el impacto de estas condiciones sobre trastornos afectivos ocasionados por una desincronización interna (Salgado-Delgado y col. 2009). En poblaciones humanas, expuestas a condiciones de trabajo nocturno, se ha descrito mayor propensión a trastornos afectivos (Foster y col. 2005). Por lo tanto, se mostró que la alteración de los ritmos diarios desencadena síntomas depresivos que pueden evaluarse a través de la disminución de consumo del líquido azucarado.

Los síntomas depresivos, pueden ser generados por varios modelos experimentales y evaluados con estrategias similares a las empleadas en el presente estudio. Por ejemplo, la lesión de los bulbos olfatorios resulta en conducta anhedónica en la prueba de agua con azúcar, que se acompaña de actividad locomotora exagerada (Romeas y col. 2009). El estrés crónico leve además de generar conducta anhedónica evaluada por el mismo test, disminuye la actividad locomotora general (Gorka y col. 1996), la aumenta en la prueba conductual de laberinto elevado (Castro y col. 2005) o la disminuye en dicha prueba (Bessa y col. 2009). Del mismo modo, es importante resaltar que en el presente proyecto, la actividad locomotora total se mostró alterada en los grupos LL y TN que a su vez presentaron conducta anhedónica en la prueba de agua con azúcar, implicando que al alterarse la variable circadiana de actividad locomotora también se presenta una respuesta anhedónica. Considerando la relación entre dichos parámetros conductuales, es importante hacer hincapié en la relevancia de su evaluación para el desarrollo de modelos experimentales y la determinación de síntomas depresivos en otros modelos.

En la *prueba de campo abierto*, donde se esperaba un aumento de conductas relacionadas a la ansiedad, no se encontraron diferencias significativas con respecto a las respuestas autónomas, reflejadas en el número de heces fecales o de orina, ni en la conducta de exploración, que es un indicador de ansiedad (Archer, 1973). Las conductas de acicalamiento, paradas a la orilla y al centro, sólo se observaron diferentes en LB y en la primera fase experimental. Los cuadros recorridos fueron similares en LB y Exp 1 y estuvieron reducidos en el grupo DD en Exp 2. En general los grupos LL y TN mostraron mayor conducta de ansiedad. Estos resultados a pesar de no ser los esperados, coinciden con datos previamente descritos donde animales bajo la misma condición de luz constante y evaluados en el campo abierto no presentan cambios de la actividad locomotora (Prendergast y col. 2008; Fonken y col. 2009). Tampoco otros paradigmas experimentales de depresión han mostrado este tipo de cambios (Einat y col, 2006). Estos resultados parecen indicar que ya sea que esta prueba conductual no sea la más adecuada para estudiar síntomas de ansiedad relacionadas a la depresión, o bien que las dimensiones del campo abierto no fueran adecuadas para la rata. El tamaño del campo empleado en el presente estudio fue de dimensiones menores a los utilizados en otros experimentos, lo cual resta novedad y resta el factor estresante que un área abierta debiera generar, ocasionado habituación en poco tiempo. Otra razón que se contempla se refiere a que debido a que los animales fueron evaluados bajo luz tenue roja, el cambio de la condición de luz a oscuridad en los animales LL haya enmascarado la respuesta de este grupo mejorando el desempeño de los animales en la prueba.

Dada la diversidad de resultados reportados en varios estudios no puede asegurarse la manera en que la ansiedad contribuye y de qué modo se encuentre relacionada con la determinación conductual de la depresión en diseños experimentales. Se ha discutido que existe comorbilidad entre la depresión y otros trastornos afectivos, haciendo que la sintomatología no se distinga entre un trastorno y otro (Fonken y col. 2009).

Debido a que otro de los síntomas en la depresión es la alteración de peso e ingesta de alimento (DSM-IV; Breton, 1998), se esperaba un cambio en estas variables en animales con alteración de los ritmos; sin embargo, no se encontraron las diferencias esperadas. Con respecto a la *ganancia de peso corporal* de los grupos experimentales sólo el grupo DD tuvo menor ganancia con respecto al CNTRL, mientras que el grupo LL sólo se observó disminuir. En contraste, el grupo TN tuvo una ganancia mayor de peso corporal, que de acuerdo a un reporte previo, esta condición de actividad forzada propicia un aumento de peso asociado al cambio de horario de ingesta de alimento a su etapa de descanso (Salgado-Delgado y col. 2008). A pesar de las diferencias encontradas en la ganancia de peso corporal, la *ingesta de alimento* no fue estadísticamente diferente entre los grupos, observándose menor en el grupo LL. Sin embargo, estos resultados indican una posible influencia de la alteración de los ritmos circadianos sobre estas variables que son afectadas en la depresión.

La *concentración de corticosterona* en plasma sanguíneo tampoco mostró ser diferente estadísticamente en ninguno de los grupos experimentales con respecto al grupo CNTRL; tanto en los dos puntos temporales obtenidos, como del promedio de cada uno. En este estudio se esperaba encontrar niveles elevados de corticosterona en las condiciones con síntomas depresivos debido a que se ha reportado un alto nivel de concentración de cortisol en plasma de pacientes deprimidos (Leibenluft y col. 2001; Urretavizcaya y col. 2006); y en estudios experimentales donde animales que habitan en LL, presentan altos niveles de concentración de corticosterona (Claustrat y col. 2008); además que otro modelo animal también reporta el mismo aumento (Ushijima y col. 2006). Este tipo de efectos no son consistentes, ya que otros estudios reportan una disminución de los niveles de concentración de dicha hormona en animales bajo LL, considerándola dependiente de las manipulaciones experimentales empleadas (Fonken y col. 2009). Por otro lado, la concentración elevada de la hormona corticosterona en el grupo LL se ha relacionado con alteraciones cognitivas (Pei

Ma y col. 2007) que son características de la sintomatología depresiva (Bessa y col. 2009). Considerando la evidencia experimental descrita y los presentes resultados, la concentración alta de esta hormona es un síntoma asociado a la depresión que acompaña la alteración conductual y conducta anhedónica en el grupo LL.

A pesar que la concentración de corticosterona no resultara significativamente diferente, es importante denotar que el grupo LL mostró una concentración mayor de la hormona. Cabe mencionar que los días de recuperación posterior a la cirugía para la inserción de la cánula fueron dos días y probablemente no fueron suficientes para que los animales pudieran recuperar su ciclo de actividad-reposo previo a la intervención, lo que pudo haber interferido en los datos obtenidos.

Por otro lado, es destacable la baja supervivencia posterior a la cirugía de los animales del grupo LL, ya que sólo continuaron tres ratas que en comparación al grupo CNTRL tardaron más en recuperarse de la anestesia. Así mismo, se observó que los animales de este grupo presentaban mayor desarrollo de ácaros en la piel, lo que podría indicar que el sistema inmune está siendo afectado como consecuencia de las condiciones de luz constante. Al respecto, se ha reportado que una exposición excesiva a la luz en la noche inhibe la producción de la hormona Melatonina, la cual tiene una función antioxidante y reduce la probabilidad del desarrollo de tumores, también enlentece el envejecimiento y evita alteraciones degenerativas relacionadas con la edad adulta (Reiter, 2006).

La expresión de *células inmunoreactivas a c-Fos* en el NSQ en ZT1 (o CT1 en DD) con respecto al grupo CNTRL se encontró como se esperaba, significativamente inhibida tanto en el área dorsal como ventral en los tres grupos experimentales, principalmente el grupo LL. Esta inhibición de la expresión celular en los grupos

DD y LL puede indicar que la exposición a condiciones constantes de iluminación inhibe la respuesta de las células del NSQ al no existir un estímulo fótico que active el área ventral. Además, estas condiciones podrían estar interfiriendo sobre la expresión adecuada del ritmo endógeno que se expresa en el área dorsal. La inhibición de la respuesta inmunoreactiva en el reloj biológico sugiere que la función del NSQ como regulador de los ritmos biológicos está decrementada. De esto resultaría que la capacidad para mantener la ritmicidad conductual del organismo acoplada a los ciclos diarios de luz/oscuridad se encuentra disminuída al permanecer en condiciones de luz constante o como consecuencia de la desincronización externa. Este mismo efecto se ha descrito en animales bajo luz y oscuridad constante por 36-48 hrs. A diferencia de un ciclo LD, las condiciones de DD y LL presentan una disminución en la expresión de la proteína de c-Fos, en el área dorsal y ventrolateral del NSQ. Esto es observable a diferentes puntos temporales (Edelstein, 2000). Los presentes datos muestran, que en condiciones constantes de iluminación (DD y LL) y de trabajo nocturno, el reloj biológico se encuentra inhibido en los tres grupos experimentales, los cuales también presentan alteración en la actividad locomotora y conducta anhedónica; síntomas característicos de la depresión.

Es importante mencionar que la producción de 5-HT ocurre principalmente en la fase de oscuridad y que por su parte, la luz puede modificar la sensibilidad del NSQ; el cual influye sobre la respuesta fótica del reloj endógeno (Wirz-Justice, 1995). Así mismo, se conoce que el NSQ contiene transportadores de serotonina (Legutko y col. 2008), por lo que se puede pensar que la condición de luz constante en este protocolo experimental, esté actuando sobre la sensibilidad del NSQ a responder adecuadamente a estímulos fóticos, reflejada en una inhibición de la expresión neuronal. Por otro lado, una exposición a luz por un tiempo prolongado puede promover la eliminación crónica de 5-HT, resultando en la modificación de la sincronización, disminución de la amplitud del ciclo actividad y reposo (Wirz-Justice, 1995); además de la disminución en la respuesta hedónica.

CONCLUSIONES

1. Con base en los resultados obtenidos se concluye que tanto condiciones de desincronización externa (basada en luz constante) como la desincronización interna (a través del modelo de trabajador nocturno) son generadoras de síntomas relacionados a depresión.

2. Estas manipulaciones alteran el reloj biológico, ya que la expresión celular resultó inhibida en los tres grupos experimentales, lo que resalta la importancia de la relación entre el funcionamiento adecuado del reloj maestro para el estado afectivo.

3. Al confirmar la hipótesis de que la alteración de los ritmos circadianos por luz constante y en un modelo de trabajo nocturno desencadenan síntomas de depresión, se proponen estas manipulaciones, como nuevos modelos experimentales para el estudio de la depresión y de los procesos circadianos implicados. Se considera una nueva propuesta, ya que a diferencia de estudios previos, el presente proyecto evidencia los efectos que a largo plazo generan estos tipos de desincronización en la respuesta conductual o fisiológica, y la respuesta del NSQ en dichas condiciones.

PERSPECTIVAS

Es importante en un futuro determinar los mecanismos que subyacen los ritmos circadianos alterados, a la depresión y la expresión de otras hormonas y genes relacionados. Por el momento se desconoce la manera en que el reloj biológico y los genes reloj participan en el desarrollo de enfermedades afectivas, así como su relación con sistemas de neurotransmisión relacionadas al humor (Serotonina, Dopamina y Norepinefrina). Se ha descrito que estos sistemas de

neurotransmisión presentan un ritmo circadiano en su concentración, secreción y síntesis de enzimas relacionadas, así como de la expresión de actividad de receptores a estas monoaminas. Todo esto sugiere que la alteración de los ritmos circadianos pueda afectar estos circuitos y ocasionar efectos en el estado afectivo y motivacional (McClung, 2007). Por otro lado, se han relacionado genes reloj específicos a desórdenes afectivos, tanto en pacientes como en roedores, encontrando polimorfismos en los genes CLOCK y BMAL1 (McClung, 2007).

Considerando lo anteriormente descrito, se propone que posiblemente los sistemas que pudieran estar involucrados en el desarrollo de depresión como consecuencia de una alteración de los ritmos circadianos por exposición excesiva a la luz son la inhibición de producción de la hormona Melatonina y por lo tanto de 5-HT. También la desregulación del sistema hipófisis-hipotálamo adrenal podría afectarse conduciendo a una elevación de la corticosterona lo que pudiera desencadenar una pérdida de los ritmos de esta hormona o de otras.

Los resultados de este estudio son relevantes para explicar algunos tipos de depresión en el ser humano, ya que la sociedad moderna ha incrementado la actividad nocturna y con ello ha aumentado la exposición a la luz artificial en la noche, lo que actualmente se denomina contaminación lumínica (Chepesiuk, 2009). Se propone que el exceso de exposición a la luz y los cambios consecuentes en el patrón conductual llevan a una alteración de hábitos alimenticios, e inversión de patrones del ciclo de actividad-reposo, afectando principalmente el sueño y a su vez, desencadenando problemas de salud física como desarrollo de cáncer y trastornos cardiovasculares (Chepesiuk, 2009). Del mismo modo, se propone que la exposición nocturna a la luz puede desencadenar afecciones a la salud mental como el desarrollo de enfermedades afectivas, entre ellas depresión o ansiedad (Chepesiuk, 2009). Por otro lado, el aumento de luz por la noche ha favorecido el trabajo nocturno, que además de generar alteraciones fisiológicas y metabólicas, sobrepeso y obesidad, elevación de concentración de triglicéridos en sangre, disminución de la actividad diaria y cambios en el horario

de alimentación -también- desencadena alteraciones afectivas como depresión (Chepesiuk, 2009). Todo esto afectaría no sólo el desempeño laboral sino también actividades de la vida cotidiana. Esto es de gran relevancia ya que actualmente la mayor parte de las actividades son realizadas en la noche y estos patrones de conducta son más comunes entre la población, aumentando la susceptibilidad a desarrollar enfermedades como consecuencia a este cambio de exposición lumínica en la noche.

El presente trabajo considera que la alteración de los ritmos circadianos es un factor desencadenante de conductas depresivas; así mismo, los resultados de esta tesis permiten advertir que la exposición a situaciones que propicien una desincronización, ocasionarán alteraciones afectivas. Esto es de gran relevancia, pues nuestra sociedad promueve estilos de vida contrarios a los patrones temporales que nos dicta el reloj biológico, entre ellos las actividades durante la noche en lugar de dormir y los horarios de alimentación desorganizados.

La depresión a nivel mundial va en aumento, estimando que para el 2020 sea la segunda causa principal de discapacidad en el mundo (datos de la OMS), por lo que es importante se considere la relevancia de los ritmos circadianos como factor desencadenante de depresión, especialmente para encontrar y dirigir un tratamiento adecuado para este trastorno afectivo.

REFERENCIAS

Aguilar-Roblero R, Granados-Fuentes D, Caldelas I, Salazar-Juárez A, Escobar C, *Bases neurales de la cronobiología humana: El sistema circadiano distribuido (Cap. 4)*, en: Golombek, D. (compilador) (2002) *Cronobiología humana: Ritmos y relojes biológicos en la salud y en la enfermedad*, Bernal: Universidad Nacional de Quilmes, pp.75-76.

Archer, J. (1973) Tests for emotionality in rats and mice: a review, *Animal Behaviour*, 21: 205-235.

Baldessarini, R. (1986) *Bases biomédicas de la depresión y su tratamiento*, México: Prensa Médica Mexicana.

Bessa JM, Mesquita AR, Oliveira M, Pêgo JM, Cerqueira JJ, Palha J, Almeida O, Sousa N, (2009) A trans-dimensional approach to the behavioral aspects of depression, *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 1 (3): 1-7.

Bonilla H, Vázquez G, Velázquez J, *Los trastornos psiquiátricos y sus modelos animales* en Torner C, Velázquez J, (edits) (2000) *Tópicos en psiquiatría biológica*, México: Sociedad Mexicana de Psiquiatría Biológica, pp. 289-297.

Brenes J, Rodríguez O, Fornaguera J, (2008) Differential effect of environment enrichment and social isolation on depressive-like behavior, spontaneous activity and serotonin and norepinephrine concentration in prefrontal cortex and ventral striatum, *Pharmacology biochemistry and behaviour*, 89: 85-93.

Breton, S. (1998) *La depresión*, México: Planeta.

Brown TM, Piggins HD, (2007) Electrophysiology of the suprachiasmatic circadian clock, *Progress in Neurobiology*, 82: 229-255.

Castro JPMV, Frussa-Filho R, Fukushiro DF, Chinen CC, Abílio VC, Silva RH, (2005) Effects of long-term continuous exposure to light on memory and anxiety in mice, *Physiology & Behavior*, 86: 218-223.

Chepesiuk, R. (2009) Missing the dark: Health effects of light pollution, *Environmental Health Perspectives*, 117 (1): A21-A27.

Claustrat B, Valatax JL, Harthé C, Brun J, (2008) Effect of constant light on prolactin and corticosterona rhythms evaluated using a noninvasive urine sampling protocol in the rat, *Horm Metab Res*, 40: 398-403.

Czeisler CA, Dijk D-J, *Human circadian physiology and sleep-wake regulation (Cap 20)* en: Takahashi J, Turek F, Moore R, (edits) (2001) *Handbook of Behavioral*

Neurobiology: Circadian Clocks (12), NY: Kluwer Academic/Plenum Publishers, pp.532-534.

D'Aquila P, Newton J, Willner P, (1996), Diurnal variation in the effect of chronic mild stress on sucrose intake and preference, *Physiology and Behavior*, 62 (2): 421-426.

Depres-Brummer P, Levi F, Metzger G, Touitou Y, (1995), Light-induced suppression of the rat circadian system, *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 268:1111-1116.

Edelstein K, Beaulé C, D'Abramo R, Amir S, (2000) Expression profiles of JunB and c-Fos proteins in the rat circadian system, *Brain research*, 870: 54-65.

Einat H, Kronfeld-Schor N, Eilam D, (2006) Sand rats see the light: Short photoperiod induces a depression-like response in a diurnal rodent, *Behavioral Brain Research*, 173: 153-157.

Fonken LK, Finy MS, Walton JC, Weil ZM, Workman JL, Ross J, Nelson RJ, (2009), *Behavioural Brain Research*, 205 (2): 349-354.

Foster R, Wulff K, (2005), The rhythm of rest and excess, *Nature Reviews Neuroscience*, 6: 407-414.

González M, Aston-Jones G, (2007) Light deprivation damages monoamine neurons and produces a depressive behavioral phenotype in rats, *PNAS*, 105 (12): 4898-4903.

Gorka Z, Moryl E, Papp M, (1996) Effect of chronic mild stress on circadian rhythms in the locomotor activity in rats, *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 54 (1): 229-234.

Grønli J, Fiske E, Murison R, Bjorvatn B, Sorensen E, Ursin R, Portas C, (2007) Extracellular levels of serotonin and GABA in the hippocampus after chronic mild stress in rats, A microdialysis study in an animal model of depression, *Behavioural Brain Research*, 181: 42-51.

Gruart A, Delgado JM, Escobar C, Aguilar Roblero R, (2002) *Los relojes que gobiernan la vida*, México: Fondo de Cultura Económica.

Hećimović H, Gilliam F, *Phenomenology of depression: towards a neuroscientific perspective (Cap. 2)* en: Gilliam F, Kanner A, Sheline Y, (edit) (2006) *Depression and brain dysfunction*, UK: Taylor & Francis, pp. 51-84.

Honma KI, Hiroshibe T, (1978) Internal synchronization among several circadian rhythms in rats under constant light, *Am J Physiol*, 235, R 243-R249.

Jiménez A, Torner C, Velázquez J, *Depresión y sueño (Cap. 2)* en: Torner C, Velázquez J, (edits) (2000) *Tópicos en psiquiatría biológica*, México: Sociedad Mexicana de Psiquiatría Biológica, pp. 91-97.

Klein DC, Moore RY, Reppert SM, (1991) *Suprachiasmatic nucleus, the mind's clock*, NY: Oxford University Press, pp. 15-50.

Legutko R, Gannon RL, (2001) Serotonin transporter localization in the hamster suprachiasmatic nucleus, *Brain Research*, 893: 77-83.

Leibenluft E, Frank E, *Circadian Rhythms in Affective Disorders (Cap. 23)*, en: Takahashi J, Turek F. Moore R, (edits) (2001) *Handbook of Behavioral Neurobiology: Circadian Clocks (12)*, NY: Kluwer Academic/Plenum Publishers, pp. 625-644.

Marais L, van Rensburg S, van Zyl J, Stein D, Daniels W, (2008) Maternal separation of rat pups increases the risk of developing depressive-like behavior after subsequent chronic stress by altering corticosterone and neurotrophin levels in the hippocampus, *Neuroscience Research*, 61: 106-112.

Marques M, *Ritmos biológicos y ciclos ambientales: Sincronización (Cap. 5)*, en: Golombek, D. (compilador) (2002) *Cronobiología humana: Ritmos y relojes biológicos en la salud y en la enfermedad*, Bernal: Universidad Nacional de Quilmes, pp. 85-86.

Martín del Campo A, *Cronobiología y Psiquiatría* en: Martín del Campo A, Aréchiga H, (edits) (2000) *Cronobiología médica*, México: Cronovera, pp. 42-55.

McClung CA, (2007) Circadian genes, rhythms and the biology of mood disorders, *Pharmacol. Ther.* 114 (2): 222-232

Mistlberger RE, Skene DJ, (2004) Social influences on mammalian circadian rhythms: animal and human studies, *Biol. Rev.* 79: 533-556.

Moore RY, Speh JC, Leak RK, (2002) Suprachiasmatic nucleus organization, *Cell Tissue Res*, 309: 89-98.

Pei Ma, Cao J, Tian M, Hu Cui M, Li Han H, Xiong Yang Y, Xu L, (2007) Exposure to chronic constant light impairs spatial memory and influences long-term depression in rats, *Neuroscience Research*, 59: 224-230.

Porsolt R, Brossard G, Hautbois C, Roux S, (contrib.) (2001) Rodent models of depression: Forced swimming and tail suspension behavioral despair tests in rats and mice, *Behavioral Neuroscience*, Sup. 14, 8. 10A. 1-8. 10A. 10.

Prendergast B, Kay L, (2008) Affective and adrenocorticotrophic responses to photoperiod in wistar rats, *Journal of Neuroendocrinology*, 20: 261-267.

Reiter RJ, *Contaminación lumínica: Supresión del ritmo circadiano de melatonina y sus consecuencias para la salud (Cap. 8)*, en: Golombek, D. (compilador) (2002) *Cronobiología humana: Ritmos y relojes biológicos en la salud y en la enfermedad*, Bernal: Universidad Nacional de Quilmes, pp. 269-289.

Romeas T, Morissette MC, Mnie-Filali O, Piñeyro G, Boye SM, (2009) Simultaneous anhedonia and exaggerated locomotor activation in an animal model of depression, *Psychopharmacology*, 205: 293-303.

Rossenwasser A M, Wirz-Justice A, *Circadian Rhythms and Depression: Clinical and Experimental Models (Cap.17)* en: Redfern P, Lemmer B, (edit) (1997) *Handbook of Experimental Pharmacology, Vol. 125, Physiology and Pharmacology of Biological Rhythms*, Alemania: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, pp. 457-461, 464-479.

Rüedi-Bettschen D, Pedersen E, Feldon J, Pryce C, (2005) Early deprivation under specific conditions leads to reduced interest in reward in adulthood in Wistar rats, *Behavioural brain research*, 156: 297-310.

Steffens AB, (1970) Plasma insulin content in relation to blood glucose level and meal pattern in the normal and hypothalamic hyperphagic rat, *Physiology & Behavior*, 5 (2): 147-151.

Salgado-Delgado R, Ángeles-Castellanos M, Buijs MR, Escobar C, (2008) Internal desynchronization in a model of night-work by forced activity in rats, *Neuroscience*, 154: 922-931.

Salgado-Delgado R, Fuentes B, Escobar C, (2009) La desincronización interna como promotora de enfermedad y problemas de conducta, *Salud mental*, 32 (1): 69-76.

Santos J, Chen L, Erausquin G, *Phenomenology of depression: towards a neuroscientific perspective (Cap. 1)* en: Gilliam F, Kanner A, Sheline Y, (edit) (2006) *Depression and brain dysfunction*, UK: Taylor & Francis, pp. 1-49.

Stratmann M, Schibler U, (2006) *Properties, Entrainment, and Physiological functions of mammalian peripheral oscillators*, 21(6), pp. 494-506.

Sudo M, Sasahara K, Moriya T, Akiyama M, Hamada T, Shibata S, (2003) Constant Light housing attenuates circadian rhythms of mPer2 mRNA and mPER2 protein expression in the suprachiasmatic nucleus of mice, *Neuroscience*, 121:493-499.

Thase M, Jindal R, Howland R, *Biological aspects of depression*, en: Gotlib I, Hammen C, (edits) (2002) Handbook of Depression, Guilford Press: NY, pp.192-204.

Urretavizcaya M, Soria V, Cambras T, *Ritmos biológicos y enfermedad mental (Cap. 25)*, en: Madrid J, Rol de Lama A, (edits) (2006) Cronobiología básica y clínica, Madrid: editec@red., pp. 777-789.

Ushijima K, Morikawa T, To H, Higuchi S, Ohdo S, (2006) Chronobiological disturbances with hyperthermia and hypercortisolism induced by chronic mild stress in rats, *Behavioural Brain Research*, 173: 326-330.

Yannielli P, *Cronobiología de la ansiedad y de la depresión mayor (Cap. 11)*, en: Golombek D, (compilador) (2002) Cronobiología humana: Ritmos y relojes biológicos en la salud y en la enfermedad, Bernal: Universidad Nacional de Quilmes, pp.251-275.

Waterhouse J, Edwards B, Atkinson G, Reilly T, *Alteraciones exógenas de los ritmos biológicos. Trabajo a turnos. Jet-lag (Cap. 26)*, en: Madrid J, Rol de Lama A, (edits) (2006) Cronobiología básica y clínica, Madrid: editec@red., pp. 814-821.

Wirz-Justice A, *Biological rhythms in mood disorders (Cap. 86)*, en: Bloom F, Kupfer D, (edits) (1995) Psychopharmacology: The Fourth Generation of Progress, Nueva York: Raven Press, pp. 999-1017.

Won Jahng J, Kim Goo J, Kim Jin H, Taeck Kim B, Won Kang D, Ho Lee J, (2007) Chronic food restriction in young rats results in depression-and anxiety-like behaviors with decreased expression of serotonin reuptake transporter, *Brain research*, 1150: 100-107.

Anexo 1. Hoja de registro para campo abierto

Observación de campo abierto

Fecha: _____

Rata: _____

Experimento: _____

Tiempo en campo: _____

Observaciones conductuales

Conducta	
Apoyo	
Levantamiento	
Aseo	
Rascar	
Paradas en esquina	
Paradas en la mitad del campo	
Paradas en la orilla del campo	
Paradas por hacer del baño	
Cuadros recorridos	
Bolos fecales	
Orina	

Anexo 2. Definiciones operacionales de las conductas evaluadas en campo abierto

Apoyo: Levantamiento del cuerpo en posición vertical con las patas traseras, colocando las dos patas delanteras en contra de la pared del campo abierto.

Levantamiento: Levantamiento del cuerpo en posición vertical sólo con ayuda de las patas traseras con las patas delanteras recogidas o sólo una sobre la pared del campo abierto.

Aseo: Frotamiento de las patas delanteras contra la cara, nariz o cuerpo a manera de limpieza.

Rascar: Frotamiento de las patas traseras con en el cuerpo o cara.

Paradas en la esquina del campo: Número de veces que se detiene en las esquinas del campo abierto y reanuda la marcha por el campo abierto.

Paradas en la orilla del campo: Número de veces que se detiene en la orilla y reanuda su marcha por el campo abierto.

Paradas a la mitad del campo: Número de veces que se detiene a la mitad y reanuda la marcha por el campo abierto.

Cuadros recorridos: Número de cuadros caminados tomando en cuenta que más de la mitad del cuerpo haya cruzado el cuadro y por lo menos pisado con dos patas.

Bolos fecales: Número de heces depositadas en el campo abierto.

Orina: Número de micciones en el campo abierto.