

TESIS DOCTORAL 2020

Desarrollo tumoral y conducta tipo-depresiva en ratones macho sometidos a estrés social: vulnerabilidad o resiliencia en función de las estrategias de afrontamiento. Mediadores neuroendocrinos e inmunitarios.

OLATZ GOÑI
BALENTZIAGA



Universidad
del País Vasco

Euskal Herriko
Unibertsitatea

Imagen de portada tomada de Sean Gladwell/Moment/Getty Images.



OLATZ GOÑI BALENTZIAGA

Desarrollo tumoral y conducta tipo-depresiva
en ratones macho sometidos a estrés social:
vulnerabilidad o resiliencia en función de las
estrategias de afrontamiento. Mediadores
neuroendocrinos e inmunitarios.

DIRECTORES:

Dra. Larraitz Garmendia Rezola

Dr. Oscar Vegas Moreno

TESIS DOCTORAL

Mayo 2020

Departamento de Procesos Psicológicos Básicos y su Desarrollo,
Facultad de Psicología, Universidad del País Vasco (UPV/EHU)

Esta tesis ha sido realizada gracias a la Ayuda Predoctoral para la formación de personal investigador no doctor PRE_2015_1_0085 (MOD. A) concedida por el Departamento de Educación, Universidades e Investigación del Gobierno Vasco, disfrutada entre enero de 2016 y septiembre de 2019.

*“La conducta es un espejo en que cada uno
muestra su imagen.”*

Johann Wolfgang von Goethe (1749 -1832)

*“Cree a aquellos que buscan la verdad,
duda de los que la han encontrado.”*

André Gide (1869 - 1951)

AGRADECIMIENTOS

Esta tesis doctoral es una continuación de numerosos trabajos que se han llevado a cabo en el laboratorio de psicobiología de la UPV/EHU, cuyos inicios no fueron nada fáciles. Por eso, lo primero me gustaría agradecer a las personas que tanto esfuerzo y trabajo pusieron para que otros podamos seguir su camino. Gracias Arantza, Joserra, Larraitz y Amaia, por abrirnos las puertas de la investigación a muchas otras personas, y por habernos transmitido vuestra ilusión en este proyecto. Quiero agradecer especialmente a mis directores, Larraitz y Óscar, por confiar en mí y por toda la ayuda que me habéis dado. Gracias por todo el tiempo y esfuerzo que habéis invertido, además de ofrecerme todo el conocimiento que tenéis y que tanta dedicación requiere alcanzar.

Ainitze, maiz esan izan dut, gauza askotan zortea lagun izan ez dudala, baina ondo begiratzuz, zorterik onena tesiaren hasiera hasieratik izan dut zure laguntza eta laguntasunarekin. Zure babesaren ezinbesteko izan da, bai arlo praktikokoan baina baita emozionalean ere. Behar izan dudan guztietan hor izan zera, eskua luzatu eta indarrez tira egiteko. Andrea, muchas gracias por acogerme con los brazos abiertos la primera vez que llegue al laboratorio, tu confianza y tu amabilidad pesaron mucho a la hora de decidir que esto era lo que quería hacer. Gracias por todo tu trabajo, sin él, este experimento no sería el mismo. Gracias también a Joana, tu espíritu siempre positivo y tus ánimos hacen que todo sea posible. Trabajar con vosotras siempre es un placer. Eider, eskerrik asko zure babesagatik, zure gomendioek urrea balio dute. Nora, eskerrik asko beti hor egoteagatik, zure lan egiteko grinarekin urrutira iritsiko zea. Ibane, transmititzen duzun ilusio eta alaitasunak indarra ematen du, nire desiorik onenak hasi duzun bidean. Gainontzeko psikobiologiako pasilloari ere eskerrik asko, Eneritz, Gari, Edu, Amaia, Aitziber, Jurgi, Garikoitz, Gabriela, Mirari eta Asier, lan egiteko giro ona omen da garrantzitsuena, eta zuei esker une benetan atseginak pasa izan ditut. Quiero agradecer, también, el apoyo de la gente del departamento y PAS, y muy en especial a Idoia y Carlos del estabulario, por vuestra actitud siempre positiva, incluso en los momentos más difíciles.

Por otro lado, me gustaría agradecer a Carmen Sandi por aceptarme en el Laboratory of Behavioral Genetics del Brain Mind Institute y permitirme aprender las técnicas que utilizáis en vuestro laboratorio. Silvia, gracias por acompañarme durante

toda la estancia, integrarme en vuestro grupo y hacer que fuese una experiencia inolvidable.

Aita eta ama, zuei eskertzeko ez daukat ez hitz, ez leku nahikorik. Laburtze aldera, bihotz-bihotzez eskertu nahi dizuet hegoak eman eta nire alboan aireratzeagatik. Maialen, eskerrik asko beti nire alboan izateagatik. Nire bizitza errazteaz arduratu zera beti. Eta mila esker gure familia aberasteagatik. Libe eta Jule, zuek oraindik konturatu ez arren, eskerrik beroenak zuei zor dizkizuet, bizitza alaiagoa eta dibertigarriagoa egiteagatik. Eskerrik asko ere koadrila eta hockey-ko lagunei, taldean lan egitearen garrantzia eta balioa erakusteagatik.

ABREVIATURAS

5-HT	5-hidroxitriptamina, serotonina
AA	Activos / Agresivos
ACTH	Hormona adrenocorticotropa o corticotropina (del inglés, <i>Adrenocorticotropic hormone</i>)
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNasa	Enzima desoxirribonucleasa
ADNc	ADN complementario
ADRs	Receptores adrenérgicos
ANA	Activos / No-agresivos
ANOVA	Análisis de la varianza
ARN	Ácido ribonucleico
ARNasa	Enzima ribonucleasa
APA	Asociación Americana de Psiquiatría (del inglés, <i>American Psychological Association</i>)
BH4	5,6,7,8-tetrahydrobiopterina
BHE	Barrera hematoencefálica
BDNF	Factor neurotrófico derivado del cerebro (del inglés, <i>brain derived neurotrophic factor</i>)
CCDA	Citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos
CMH	Complejo mayor de histocompatibilidad

CPA	Células presentadoras de antígenos
CRH	Hormona liberadora de corticotropina (del inglés, <i>Corticotropin-releasing hormone</i>)
CRP	Proteína C reactiva (del inglés, <i>C-reactive protein</i>)
CVOs	Órganos circunventriculares
DA	Dopamina
DBH	Dopamina- β hidroxilasa
DO	Densidad óptica
DSM-5	Manual diagnóstico y estadístico de los trastornos mentales, 5ª edición (del inglés, <i>Diagnostic and statistical manual of menthal disorders</i>)
E.E.M.	Error estándar de la medida
ELISA	Ensayo inmunosorbente ligado a enzimas (del inglés, <i>enzyme linked immunosorbent assay</i>)
ES	Estresados
FST	Prueba de natación forzada (del inglés, <i>Forced swim test</i>).
GAPDH	Gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa
GnRH	Hormona liberadora de gonadotropina (del inglés, <i>Gonadotropin-releasing hormone</i>)
GR	Receptor glucocorticoideo (del inglés, <i>glucocorticoid receptor</i>)
HPA	Hipotálamo - Pituitario - Adrenocortical
HPG	Hipotálamo-pituitario-gonadal
HPRT	Hipoxantina-guanina-fosforribosil-transferasa

IDO	Enzima indolamina 2,3-dioxigenasa
IFN	Interferón
IL	Interleucina
IN	Intactos
iNOS	Enzima inductora de la síntesis de óxido nítrico (del inglés, <i>inducible nitric oxide synthase</i>)
LPS	Lipopolisacarido
MAPK	Proteínas quinasas activadas por mitógenos (del inglés, <i>Mitogen-Activated Protein Kinases</i>)
MCP-1	proteína de monocitos 1
MR	Receptor mineralocorticoideo (del inglés, <i>Mineralocorticoid receptor</i>)
NA	Noradrenalina
NSB	Unión no específica
NE	No-estresados
NF-kB	factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (del inglés, <i>nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>)
NK	Células asesinas naturales (del inglés, <i>natural killer</i>)
NMDA	Receptores N-metil-D-aspartato
OMS	Organización Mundial de la Salud
PGE2	Prostaglandina E2
PR	Pasivos / Reactivos

RNS	Radicales de nitrógeno (del inglés, <i>reactive nitrogen species</i>)
ROS	Radicales de oxígeno (del inglés, <i>reactive oxygen species</i>)
rpm	Revoluciones por minuto
RT-PCR	Reacción de la cadena de polimerasa en transcripción reversa (del inglés, <i>retro transcription polimerase chain reaction</i>)
SAM	Simpático adrenomedular
SEOM	Sociedad Española de Oncología Médica
SNA	Sistema nervioso autónomo
SI	Sistema inmunitario
SNC	Sistema nervioso central
TCR	Receptores de las células T (del inglés, <i>T cell receptor</i>)
TDO	Enzima triptófano 2,3 dioxigenasa
Tf	Temperatura de fusión
TH	Tirosina hidroxilasa
Th	Linfocitos T helper
TNF	Factor de necrosis tumoral (del inglés, <i>tumor necrosis factor</i>)
TSST	Prueba de estrés social Trier (del inglés, <i>trier social stress test</i>)
VEGF	Factor vascular de crecimiento endotelial (del inglés, <i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>)

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN.	1
1.1. DEPRESIÓN Y SISTEMA INMUNITARIO	7
1.1.1. DEPRESIÓN	9
1.1.2. SISTEMA INMUNITARIO (SI)	13
1.1.2.1. Comunicación entre SNC y SI.....	16
1.1.2.1.1. Citocinas	17
1.1.3. HIPÓTESIS INFLAMATORIA DE LA DEPRESIÓN	21
1.1.3.1. Evidencias	21
1.1.3.2. Mecanismo inflamatorios asociados al desarrollo de la depresión	23
1.1.3.2.1. Citocinas y eje Hipotálamo - Pituitario - Adrenocortical (HPA)	24
1.1.3.2.2. Citocinas y sistema monoaminérgico central	25
1.2. ESTRÉS SOCIAL Y DEPRESIÓN	29
1.2.1. ESTRÉS SOCIAL Y ESTRATEGIAS DE AFRONTAMIENTO.....	31
1.2.1.1. Respuesta fisiológica del estrés.....	32
1.2.1.1.1. Sistema simpático - adrenomedular (SAM).....	33
1.2.1.1.2. Eje hipotálamo - pituitario - adrenocortical (HPA)	33
1.2.1.2. Estrategias de afrontamiento.....	36
1.2.2. ESTRÉS, SISTEMA INMUNITARIO Y DEPRESIÓN	41
1.2.2.1. Estrés y depresión.....	41
1.2.2.2. Estrés e inflamación.....	43
1.2.2.2.1. Estrés agudo y citocinas proinflamatorias	44
1.2.2.2.2. Estrés crónico y citocinas proinflamatorias	46
1.3. CÁNCER Y DEPRESIÓN	49
1.3.1. CÁNCER	51
1.3.1.1. Biología del tumor	51
1.3.1.1.1. Melanoma maligno	53
1.3.2. CÁNCER, SISTEMA INMUNITARIO Y DEPRESIÓN	57
1.3.2.1. Sistema inmunitario frente al cáncer.....	57
1.3.2.2. Tumor, citocinas y depresión	58
1.3.3. ESTRÉS, DESARROLLO TUMORAL Y DEPRESIÓN	61
II. OBJETIVOS E HIPÓTESIS.	67
III. MATERIAL Y MÉTODOS.	75

3.1. INSTALACIONES, ANIMALES UTILIZADOS Y CONDICIONES GENERALES DE MANTENIMIENTO.....	77
3.2. DISEÑO EXPERIMENTAL.....	79
3.2.1. 1ª FASE EXPERIMENTAL.....	79
3.2.2. 2ª FASE EXPERIMENTAL.....	81
3.3. CÉLULAS DE MELANOMA B16F10.....	83
3.3.1. CULTIVO DE CÉLULAS.....	83
3.3.2. CONTEO CELULAR.....	83
3.3.3. INOCULACIÓN CELULAR.....	84
3.3.4. CUANTIFICACIÓN DEL DESARROLLO TUMORAL.....	84
3.4. MODELO DE ESTRÉS SOCIAL POR CONTACTO SENSORIAL.....	86
3.4.1. SELECCIÓN Y ENTRENAMIENTO DE RATONES AGRESIVOS.....	86
3.4.2. ESTRÉS SOCIAL MEDIANTE EL MODELO DE CONTACTO SENSORIAL.....	87
3.4.2.1. 1ª Fase experimental (estrés agudo).....	87
3.4.2.2. 2ª Fase experimental (estrés crónico).....	88
3.4.3. EVALUACIÓN CONDUCTUAL Y ESTABLECIMIENTO DE LAS ESTRATEGIAS DE AFRONTAMIENTO.....	90
3.5. EVALUACIÓN DE LA CONDUCTA TIPO ANSIOSO-DEPRESIVA.....	91
3.5.1. PRUEBA DE NATACIÓN FORZADA (FORCED SWIMMING TEST - FST).....	91
3.5.2. PRUEBA DE CAMPO ABIERTO (OPEN FIELD TEST - OFT).....	91
3.5.3. PRUEBA DE PREFERENCIA DE SACAROSA (SUCROSE PREFERENCE TEST - SPT).....	92
3.5.4. PRUEBA DE INTERACCIÓN SOCIAL (IS).....	93
3.6. EXTRACCIÓN DE MUESTRAS BIOLÓGICAS.....	95
3.6.1. EXTRACCIÓN DE SANGRE.....	95
3.6.2. EXTRACCIÓN DEL CEREBRO, ESTRUCTURAS CEREBRALES Y ÓRGANOS.....	96
3.7. ANÁLISIS DE MUESTRAS BIOLÓGICAS.....	97
3.7.1. EXPRESIÓN GÉNICA DE CITOCINAS PROINFLAMATORIAS IL-6 Y TNF- α Y DE LAS ENZIMAS IDO, TDO E iNOS EN EL CEREBRO (REAL TIME RT-PCR).....	97
3.7.2. DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE CORTICOSTERONA EN PLASMA (ELISA).....	102
3.8. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS.....	105
IV. RESULTADOS.....	109
4.1. 1º EXPERIMENTO.....	111
4.1.1. ANÁLISIS DE LAS DIFERENCIAS INDIVIDUALES EN EL AFRONTAMIENTO CONDUCTUAL DEL ESTRÉS SOCIAL.....	113
4.1.2. EFECTO DEL ESTRÉS AGUDO Y DE LAS ESTRATEGIAS DE AFRONTAMIENTO AL ESTRÉS SOBRE EL DESARROLLO TUMORAL.....	116

4.1.3. ESTUDIO DEL ESTRÉS AGUDO SOBRE LA CONDUCTA ANSIOSO/DEPRESIVA EN ANIMALES INOCULADOS Y NO-INOCULADOS CON MELANOMA B16F10.....	117
4.1.3.1. Efecto del tumor, del estrés agudo y de las estrategias de afrontamiento al estrés sobre la preferencia de sacarosa	117
4.1.3.2. Efecto del tumor, del estrés agudo y de las estrategias de afrontamiento al estrés sobre la conducta en la prueba de natación forzada (FST)	118
4.1.3.3. Efecto del tumor, del estrés agudo y de las estrategias de afrontamiento al estrés sobre la conducta en la prueba de campo abierto (OFT).....	119
4.1.4. ESTUDIO DEL ESTRÉS AGUDO SOBRE VARIABLES FISIOLÓGICAS EN ANIMALES INOCULADOS Y NO-INOCULADOS CON MELANOMA B16F10	122
4.1.4.1. Efecto del tumor, del estrés agudo y de las estrategias de afrontamiento del estrés sobre los niveles plasmáticos de corticosterona	122
4.1.4.2. Efecto del tumor, del estrés agudo y de las estrategias de afrontamiento del estrés sobre el peso del bazo	124
4.1.4.3. Efecto del tumor, del estrés agudo y de las estrategias de afrontamiento del estrés sobre el peso corporal	125
4.1.4.4. Efecto del tumor, del estrés agudo y de las estrategias de afrontamiento del estrés sobre la expresión de la enzima IDO en el estriado e hipocampo	126
4.1.4.5. Efecto del tumor, del estrés agudo y de las estrategias de afrontamiento del estrés sobre la expresión de la enzima TDO en el hipocampo	128
4.1.4.6. Efecto del tumor, del estrés agudo y de las estrategias de afrontamiento del estrés sobre la expresión de la enzima iNOS en el estriado e hipocampo	129
4.1.4.7. Efecto del tumor, del estrés agudo y de las estrategias de afrontamiento del estrés sobre la expresión de la citocina IL-6 en el estriado e hipocampo	130
4.1.4.8. Efecto del tumor, del estrés agudo y de las estrategias de afrontamiento del estrés sobre la expresión de la citocina TNF α en el estriado e hipocampo	131
4.1.5. CORRELACIONES	133
4.1.5.1. Correlaciones entre niveles de corticosterona y desarrollo tumoral	133
4.1.5.2. Correlaciones entre niveles de corticosterona y la expresión de la enzima TDO en el hipocampo	133
4.1.5.3. Correlaciones entre los niveles de expresión de citocinas y de las enzimas IDO e iNOS	133
4.2. 2º EXPERIMENTO	137
4.2.1. ANÁLISIS DE LAS DIFERENCIAS INDIVIDUALES EN EL AFRONTAMIENTO CONDUCTUAL DEL ESTRÉS SOCIAL	139
4.2.1.1. Estudio de los cambios conductuales producidos entre las interacciones del día 1 y 9.....	141
4.2.2. EFECTO DEL ESTRÉS CRÓNICO Y DE LAS ESTRATEGIAS DE AFRONTAMIENTO AL ESTRÉS SOBRE EL DESARROLLO TUMORAL	145
4.2.3. ESTUDIO DEL ESTRÉS CRÓNICO SOBRE LA CONDUCTA ANSIOSO/DEPRESIVA EN ANIMALES INOCULADOS Y NO-INOCULADOS CON MELANOMA B16F10	146

4.2.3.1. Efecto del tumor, del estrés crónico y de las estrategias de afrontamiento al estrés sobre la preferencia de sacarosa	146
4.2.3.2. Efecto del tumor, del estrés crónico y de las estrategias de afrontamiento al estrés sobre la conducta en la prueba de natación forzada (FST)	147
4.2.3.3. Efecto del tumor, del estrés crónico y de las estrategias de afrontamiento al estrés sobre la conducta en la prueba de campo abierto (OFT).....	149
4.2.3.4. Efecto del tumor, del estrés crónico y de las estrategias de afrontamiento al estrés sobre la prueba de interacción social (IS)	151
4.2.4. ESTUDIO DEL ESTRÉS CRÓNICO SOBRE VARIABLES FISIOLÓGICAS EN ANIMALES INOCULADOS Y NO-INOCULADOS CON MELANOMA B16F10	153
4.2.4.1. Efecto del tumor, del estrés crónico y de las estrategias de afrontamiento del estrés sobre los niveles plasmáticos de corticosterona	153
4.2.4.2. Efecto del tumor, del estrés crónico y de las estrategias de afrontamiento del estrés sobre el peso del bazo	155
4.2.4.3. Efecto del tumor, del estrés crónico y de las estrategias de afrontamiento del estrés sobre el peso corporal	156
4.2.4.4.Efecto del tumor, del estrés crónico y de las estrategias de afrontamiento del estrés sobre la expresión de la enzima IDO en el estriado e hipocampo	158
4.2.4.5.Efecto del tumor, del estrés crónico y de las estrategias de afrontamiento del estrés sobre la expresión de la enzima TDO en el estriado e hipocampo	159
4.2.4.6.Efecto del tumor, del estrés crónico y de las estrategias de afrontamiento del estrés sobre la expresión de la enzima iNOS en el estriado e hipocampo	161
4.2.4.7.Efecto del tumor, del estrés crónico y de las estrategias de afrontamiento del estrés sobre la expresión de la citocina IL-6 en el estriado e hipocampo.....	162
4.2.4.8.Efecto del tumor, del estrés crónico y de las estrategias de afrontamiento del estrés sobre la expresión de la citocina TNF α en el estriado e hipocampo.....	164
4.2.5. CORRELACIONES	166
4.2.5.1. Correlaciones entre niveles de corticosterona y desarrollo tumoral	166
4.2.5.2. Correlaciones entre niveles de corticosterona y la expresión de la enzima TDO en el hipocampo	166
4.2.5.3. Correlaciones entre los niveles de expresión de citocinas y de las enzimas IDO e iNOS	167
 V. DISCUSIÓN.....	 171
 VI. CONCLUSIONES.....	 187
 VII. REFERENCIAS.	 193
 VIII. ANEXOS.....	 253

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	27
Figura 2.	28
Figura 3.	36
Figura 4.	80
Figura 5.	82
Figura 6.	85
Figura 7.	88
Figura 8.	89
Figura 9.	95
Figura 10.	96
Figura 11.	100
Figura 12.	113
Figura 13.	116
Figura 14.	117
Figura 15.	118
Figura 16.	119
Figura 17.	120
Figura 18.	120
Figura 19.	121
Figura 20.	123
Figura 21.	123
Figura 22.	124
Figura 23.	125
Figura 24.	126
Figura 25.	127
Figura 26.	127
Figura 27.	128
Figura 28.	129
Figura 29.	130
Figura 30.	130

Figura 31.	131
Figura 32.	132
Figura 33.	132
Figura 34.	139
Figura 35.	143
Figura 36.	145
Figura 37.	147
Figura 38.	148
Figura 39.	149
Figura 40.	150
Figura 41.	151
Figura 42.	152
Figura 43.	152
Figura 44.	154
Figura 45.	155
Figura 46.	156
Figura 47.	157
Figura 48.	157
Figura 49.	158
Figura 50.	159
Figura 51.	160
Figura 52.	160
Figura 53.	161
Figura 54.	162
Figura 55.	163
Figura 56.	163
Figura 57.	164
Figura 58.	165

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.	100
Tabla 2.	114
Tabla 3.	114
Tabla 4.	133
Tabla 5.	133
Tabla 6.	134
Tabla 7.	134
Tabla 8.	135
Tabla 9.	135
Tabla 10.	136
Tabla 11.	140
Tabla 12.	140
Tabla 13.	142
Tabla 14.	144
Tabla 15.	166
Tabla 16.	166
Tabla 17.	167
Tabla 18.	167
Tabla 19.	168
Tabla 20.	168
Tabla 21.	168

BLOQUE I.

INTRODUCCIÓN

Todos somos diferentes una realidad indiscutible.

(Psicología de las diferencias individuales, 2018-2019)

Imagina que estas fuera de tu ciudad, de noche, en una calle oscura. A unos 30 metros ves a un hombre muy corpulento que camina hacia ti. Crees que te ha visto y temes que te va a atacar. ¿Qué harías? Una opción es luchar. Para ello, el corazón y la respiración se aceleran, los músculos se ponen tensos, y sudamos para regular la temperatura. Pero puede que pienses que luchar contra ese hombre no sea buena idea, y optes por huir corriendo. En este caso, los cambios fisiológicos necesarios serán los mismos que en el caso de la lucha, ya que necesitarás tener los músculos tensos y el corazón acelerado para correr lo más rápido posible. Una tercera opción sería que te quedases inmóvil, puede que el hombre no te haya visto y pases desapercibido si no te mueves. En este caso los músculos se quedarán rígidos y en tensión para que no sea perceptible ni la respiración. Estas tres respuestas, lucha, huida e inmovilidad, se presentan aquí como reacciones adaptativas a peligros reales y graves. Los organismos reaccionan ante dichas situaciones estresantes activando un complejo repertorio de repuestas conductuales y fisiológicas, cuyos actores principales son el eje HPA y el sistema catecolaminérgico, con el fin de mantener la homeostasis y la supervivencia. Sin embargo, cuando estos sistemas de estrés no se activan adecuadamente, cuando la liberación de sus mediadores no cesa una vez terminada la situación estresante o cuando son utilizados en exceso, se produce un desajuste en el organismo, conocido como *carga alostática*, que puede repercutir en la conducta y en algunas funciones fisiológicas, como el crecimiento, el metabolismo, la circulación, la reproducción y la respuesta inmunitaria (McEwen, 2004, 2008).

En las últimas décadas se ha establecido un nuevo campo de investigación denominado psiconeuroinmunología, cuyo objeto de estudio es el conocimiento de las relaciones entre la conducta, los factores psicosociales, el SNC, el SI y la enfermedad. Uno de los pilares básicos en los que la psiconeuroinmunología ha centrado su investigación sostiene que, el desequilibrio inmunitario observado en diferentes situaciones de estrés, pueden conducir a una mayor o menor incidencia de patologías

inmunodependientes como los procesos neoplásicos, las enfermedades infecciosas y parasitarias y los procesos mórbidos con base autoinmune. Así, el estrés podría modular el curso del cáncer actuando sobre varios mecanismos inmunitarios implicados en los procesos metastáticos. Por otro lado, la alteración de la actividad inmunitaria periférica consecuencia del estrés o de enfermedades como el cáncer, también puede llegar a producir cambios en el funcionamiento cerebral (Joëls y Baram, 2009) que dificultan una adaptación psicológica y disminuyen la capacidad de afrontamiento del individuo (Korte *et al.*, 2005), aumentando la susceptibilidad a diferentes enfermedades mentales como la depresión. A este respecto, la hipótesis inflamatoria de la depresión, planteada por Maes (1995), ha propuesto diferentes vías por las que la inflamación modifica la actividad del sistema nervioso central y repercute sobre la conducta. Sin embargo, hay que tener en cuenta que el impacto y las consecuencias del estrés social varían de unos individuos a otros, debido principalmente a diferencias en la personalidad y en el estilo de afrontamiento. Así, las diferentes respuestas fisiológicas y conductuales generadas en función de las estrategias de lucha, huida o inmovilidad tendrán distintas consecuencias sobre la salud, tanto física como mental, de los individuos (Gil y Caspi, 2006; Koolhaas, 1994). De ahí la importancia de comprender los mecanismos que subyacen a las diferencias individuales en la vulnerabilidad a desarrollar psicopatologías relacionadas con el estrés social.

A pesar de ello, gran parte de los estudios sobre los efectos del estrés, no abordan estas diferencias. La mayoría se centran en estudiar el grado y la forma en que una variable es una función de otra variable. Pero este enfoque presupone algo que de por sí no está justificado, es decir, que todos los sujetos de un experimento son funcionalmente equivalentes. Incluso en la experimentación animal, donde se ha pensado que eliminaría las diferencias individuales entre sujetos, ya que se lleva un control exhaustivo para que los animales de laboratorio sean lo más parecido posibles, tanto genéticamente, como en experiencias vitales, se observan numerosas diferencias. Pavlov, al presentar los resultados experimentales obtenidos en sus estudios con animales, no dejaba de discutir, siempre cuidadosamente, la peculiar “personalidad” de dichos perros (Eysenck, 1989).

El objetivo de este trabajo es contribuir al conocimiento sobre las implicaciones que las diferentes estrategias de afrontamiento al estrés (agudo o crónico) pueden tener sobre el desarrollo tumoral, la actividad inmunitaria y la conducta tipo-

ansioso/depresiva, para así obtener mejor conocimiento de la vulnerabilidad individual al desarrollo de ciertas patologías.

CAPÍTULO 1.1.

DEPRESIÓN Y SISTEMA INMUNITARIO

1.1.1. DEPRESIÓN.

La depresión es un trastorno mental frecuente en todo el mundo y se estima que afecta a más de 300 millones de personas. Actualmente es la principal causa de discapacidad en el mundo y sus consecuencias pueden ser muy graves, llegando al suicidio. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS, 2019), el suicidio es la segunda causa de muerte entre jóvenes de 15-29 años. No es de extrañar, por tanto, el gran interés por parte de la comunidad científica, las grandes instituciones financieras y compañías farmacéuticas que invierten muchos recursos en identificar las causas y los mecanismos subyacentes en la depresión (Grigor'yan y Gulyaeva, 2017). Desarrollar tratamientos efectivos e identificar las claves para una intervención preventiva son objetivos a largo plazo en el estudio de la depresión. Estos objetivos se podrían alcanzar a través de un mayor conocimiento de su etiología, lo que implica identificar los factores de riesgo y resiliencia intervinientes, así como los mecanismos por los que estos factores afectan a la depresión. Entre los factores de riesgo de esta enfermedad se encuentran, la susceptibilidad genética, el desequilibrio neuroquímico, la disfunción de circuitos cerebrales, el procesamiento de información defectuoso, la cognición negativa y los estresores sociales o ambientales. Por todo ello, ha quedado en evidencia la necesidad de un conocimiento holístico de la depresión y su estudio a múltiples niveles de análisis. Así, las investigaciones actuales se centran en entender la sinergia entre diferentes factores, para poder desarrollar mejores herramientas de intervención que puedan abordar la depresión a través de diferentes niveles causales (Cowen, 2014).

Los trastornos depresivos constituyen una categoría principal en el manual diagnóstico y estadístico de la Asociación Psiquiátrica Americana, DSM-5 (American Psychiatric Association, 2013), y se dividen en Trastorno Depresivo Mayor y Distimia.

La Asociación Americana de Psiquiatría (APA) establece los siguientes criterios y síntomas específicos del Trastorno de Depresión Mayor:

A. Presencia de cinco (o más) de los siguientes síntomas durante un período de 2 semanas, que representan un cambio respecto a la actividad previa; uno de los síntomas debe ser (1) estado de ánimo depresivo o (2) pérdida de interés o de placer. Nota: No incluir síntomas que se pueden atribuir claramente a otra afección médica.

1. Estado de ánimo depresivo la mayor parte del día, casi todos los días según lo indica el propio sujeto (p. ej., se siente triste, vacío o sin esperanza) o de la observación realizada por otros (p. ej., llanto). Nota: En niños y adolescentes el estado de ánimo puede ser irritable.
 2. Disminución acusada del interés o del placer por todas o casi todas las actividades, la mayor parte del día, casi todos los días (según refiere el propio sujeto u observan los demás).
 3. Pérdida importante de peso sin hacer dieta o aumento de peso (p. ej. modificación de más del 5 % del peso corporal en 1 mes), o pérdida o aumento del apetito casi todos los días. Nota: En niños considerar el fracaso para el aumento de peso esperado.
 4. Insomnio o hipersomnia casi todos los días.
 5. Agitación o enlentecimiento psicomotor casi todos los días (observable por los demás, no meras sensaciones subjetivas de inquietud o de enlentecimiento).
 6. Fatiga o pérdida de energía casi todos los días.
 7. Sentimientos de inutilidad o culpabilidad excesiva o inapropiada (que pueden ser delirantes) casi todos los días (no los simples autorreproches o culpa por el hecho de estar enfermo).
 8. Disminución de la capacidad para pensar o concentrarse, o para tomar decisiones, casi todos los días (ya sea una atribución subjetiva o una observación ajena).
 9. Pensamientos recurrentes de muerte (no sólo temor a la muerte), ideación suicida recurrente sin un plan específico, tentativa de suicidio o un plan determinado para suicidarse.
- B. Los síntomas provocan malestar clínicamente significativo o deterioro social, laboral o de otras áreas importantes de la actividad del individuo.
- C. El episodio no se puede atribuir a los efectos fisiológicos directos de una sustancia (p. ej., una droga, un medicamento) o de una enfermedad médica (p.ej., hipotiroidismo).

Nota: Los criterios A-C constituyen un episodio de depresión mayor.

Nota: Las respuestas a una pérdida significativa (p. ej., duelo, ruina económica, pérdidas debidas a una catástrofe natural, una enfermedad o discapacidad grave) pueden incluir un sentimiento de tristeza intensa, rumiación acerca de la pérdida, insomnio, pérdida del apetito y pérdida de peso que figuran en el criterio A, y pueden simular un episodio depresivo. Aunque estos síntomas pueden ser comprensibles o considerarse apropiados a la pérdida, también se debería pensar atentamente en la presencia de un episodio de depresión mayor además de la respuesta normal a una pérdida significativa. Esta decisión requiere inevitablemente el criterio clínico basado en la historia del individuo y en las normas culturales para la expresión del malestar en el contexto de la pérdida.

D. El episodio de depresión mayor no se explica mejor por un trastorno esquizoafectivo, esquizofrenia, un trastorno esquizofreniforme, trastorno delirante, u otro trastorno especificado o no especificado del espectro de la esquizofrenia y otros trastornos psicóticos.

E. Nunca ha habido un episodio maníaco o hipomaníaco.

Nota: Esta exclusión no se aplica si todos los episodios de tipo maníaco o hipomaníaco son inducidos por sustancias o se pueden atribuir a los efectos fisiológicos de otra afección médica.

La distimia en cambio, se caracteriza por su duración, ya que tiene que durar al menos 2 años, pero el número de síntomas es menor y estos son más leves. En ambos casos, el trastorno tiene que suponer una dificultad para la vida social y laboral, que no puede ser explicado por otras causas.

1.1.2. SISTEMA INMUNITARIO (SI).

El sistema inmunitario es un entramado extremadamente complejo dedicado a mantener la integridad del organismo a través de la distinción entre los tejidos propios y los cuerpos extraños, tales como virus, bacterias, hongos, parásitos o procesos neoplásicos. Las células específicas y los órganos linfoides que lo componen se extienden por todo el cuerpo, tanto en tejidos, tales como la glándula del timo, el bazo, los ganglios linfáticos, la médula ósea, las amígdalas y el apéndice, como en fluidos. Por otro lado, el organismo también dispone de barreras naturales de defensa, como la piel, el pelo o las mucosas, que son capaces de bloquear la adherencia de sustancias extrañas, eliminándolas posteriormente mediante diferentes mecanismos, y de los fluidos corporales, como las lágrimas, la saliva y la orina, que están compuestos por sustancias bactericidas capaces de producir la lisis de numerosos microorganismos. Pero si estas barreras no llegan a impedir que una sustancia extraña entre al organismo, el sistema inmunitario pondrá en marcha mecanismos que actuarán frente al invasor, mediante la inmunidad innata y la inmunidad adquirida.

Inmunidad innata: es una forma de defensa no-específica que se caracteriza por su acción de tipo local y una alta velocidad de respuesta. Son varios los tipos celulares especializados en respuestas inmunitarias innatas:

- *Células especializadas en la eliminación de microorganismos, células alteradas y restos celulares mediante fagocitosis:* monocitos, macrófagos y las células granulocíticas (neutrófilos, basófilos y eosinófilos).
- *Células especializadas en la eliminación de otras células del propio organismo que se han vuelto peligrosas:* células citotóxicas, como las células Natural Killer (NK) y macrófagos.
- *Células que inician reacciones inflamatorias:* mastocitos y basófilos. Este tipo de respuesta inmunitaria se limita a actuar allí donde se ha producido la infección mediante un proceso de inflamación impulsado fundamentalmente por las citocinas proinflamatorias.

Inmunidad adquirida: es la forma de defensa específica que se caracteriza por la proliferación y diferenciación de células inmunitarias específicas en respuesta al patógeno sobre el que actúa, y por la memoria inmunológica, siendo capaz de recordar las características del patógeno y dar una respuesta más rápida y específica si vuelve a invadir el organismo (Clark *et al.*, 2013). Las células encargadas de esta respuesta son los linfocitos, que se dividen en dos tipos:

Linfocitos B: los linfocitos B se originan y maduran en la médula ósea, y una vez finalizados estos procesos se ubican en los ganglios linfáticos, donde se activan en presencia de un agente extraño. Los linfocitos B participan en la inmunidad humoral, que se caracteriza por la producción y liberación de anticuerpos o inmunoglobulinas con el fin de destruir los antígenos. Así, los linfocitos B son capaces de reconocer al antígeno de manera específica a través de las inmunoglobulinas de membrana, uniéndose a él. Tras la unión antígeno-anticuerpo las inmunoglobulinas mandan información de la presencia del antígeno, activando a los linfocitos B. Tras su activación, estas células generan una gran cantidad de anticuerpos específicos para este antígeno concreto. Así, el antígeno acaba siendo destruido a través de diferentes mecanismos en los que participan macrófagos, granulocitos y células NK dependiendo del tipo de inmunoglobulina. Algunos de los linfocitos B activados se convertirán en “células memoria”, es decir, presentan un mecanismo de aprendizaje específico a través del cual será posible una respuesta inmunitaria más rápida ante posteriores invasiones del mismo antígeno.

Linfocitos T: algunos microorganismos, como por ejemplo los virus, para poder replicarse tienen la necesidad de habitar dentro de las células infectadas y para combatirlos es necesaria la inmunidad celular que actúa como mecanismo de ataque contra los microorganismos intracelulares gracias a los linfocitos T. Para que estas células inmunitarias se activen y luchen contra el antígeno es necesaria la presencia de una célula presentadora de antígeno, que se encargará de captar, procesar y presentar antígenos sobre sus membranas para que sean reconocidos por los linfocitos T. Por otro lado, para que el organismo sea capaz de distinguir entre lo propio y lo ajeno, todas las células del organismo presentan un grupo de proteínas que reciben el nombre de complejo mayor de histocompatibilidad (CMH). Dentro de estas proteínas podemos diferenciar el CMH-I y CMH-II, presentando cada una de ellas un tipo de antígeno. Así,

las moléculas CHM-I se asocian a antígenos peptídicos derivados de virus para ser presentados a linfocitos citotóxicos (CD8+), mientras que las moléculas CHM-II se asocian a antígenos peptídicos derivados de la degradación de bacterias y grandes proteínas, para ser presentados a linfocitos T cooperadores (CD4+).

Existen varios subtipos de linfocitos T, cada uno de ellos con una función distintiva.

- *Linfocitos T cooperadores*: coordinan la respuesta inmune mediante la colaboración en la activación de macrófagos, linfocitos B, células T citotóxicas y linfocitos T supresores, mediante la producción de diferentes citocinas.
- *Linfocitos T citotóxicos*: cumplen las funciones efectoras de la inmunidad celular, para ello, reconocen a la célula infectada y secretan una serie de moléculas para conseguir la apoptosis de la célula diana.
- *Linfocitos T supresores o reguladores*: su función consiste en eliminar la inmunidad celular al final de la reacción inmune para evitar que esta reacción sea desmedida y provoque efectos nocivos para el organismo.
- *Células NK*: su actividad se encuentra entre la respuesta innata y la adquirida, ya que provienen del mismo precursor que los linfocitos T pero no presentan un receptor específico para las moléculas CHM. Estas células son activadas por ciertas citocinas o por interferones provenientes de células infectadas por virus, y provocan la muerte de la célula diana a través de la destrucción de la membrana plasmática.

Los linfocitos T, al igual que los linfocitos B, también desarrollan memoria inmunológica con el fin de poder defender al organismo contra futuros ataques del mismo patógeno.

Es importante señalar la existencia de mensajeros químicos en el sistema inmunitario, ya que estos permiten la comunicación de las células específicas entre ellas y con otras células y tejidos de todo el cuerpo. Las células infectadas o dañadas, liberan

mensajeros químicos llamados quimiocinas, que atraen células inmunitarias específicas, que, a su vez, liberan diversas citocinas que influyen sobre estas células y sobre el modo en el que el sistema inmunitario actúa para eliminar cualquier patógeno potencial. Una vez que el peligro ha desaparecido el sistema inmunitario sigue actuando, ya que también se encarga de reparar y regenerar el tejido dañado (Clark *et al.*, 2013).

1.1.2.1. Comunicación entre SNC y SI

Durante las últimas décadas ha habido un aumento de estudios en el campo de la psiconeuroinmunología que demuestran la estrecha relación bidireccional existente entre el sistema inmunitario y el cerebro (Capuron y Miller, 2011). Ya en la antigua Grecia se describe la existencia de un vínculo entre el estado psicológico de la mente y los efectos sobre la salud del organismo (Viljoen *et al.*, 2003). En 1964, Solomon y Moos publicaron un artículo donde vinculaban factores psicológicos con enfermedades físicas y posteriormente publicaron más artículos fortaleciendo la misma hipótesis. Pero fue en 1975, tras la publicación de un artículo sobre la inmunosupresión condicionada al sabor (Ader y Cohen, 1975), cuando se estableció la relación bidireccional entre estos dos sistemas del organismo. Posteriormente, Ader, publicó el libro *Psychoneuroimmunology* (1981) donde reunía diferentes estudios sobre la relación entre el sistema inmunitario, sistema nervioso central (SNC) y la conducta, quedando, así, establecida la psiconeuroinmunología como disciplina científica. Estos conocimientos han puesto el foco sobre el rol que puede tener el sistema inmunitario en numerosas psicopatologías.

Esta relación entre el sistema inmunitario y el sistema nervioso central se puede lograr por diversas vías, pero son las citocinas antes citadas las que mayor protagonismo tienen a la hora de cumplir esta función. Estas moléculas, que son producidas principalmente por los macrófagos, linfocitos T y monocitos, son las encargadas de llevar el aviso de procesos inflamatorios periféricos al sistema nervioso central.

1.1.2.1.1. Citocinas.

Las citocinas son glicoproteínas liberadas por células inmunitarias, conocidas como las hormonas del sistema inmunitario. Las principales citocinas son las interleucinas (IL), interferones (IFN), factores de necrosis tumoral (TNF), factores estimuladores de colonias y varios factores de crecimiento. Se pueden diferenciar según su actividad biológica; algunas son proinflamatorias, estimulan la actividad del sistema inmunitario y son liberadas periféricamente cuando hay un daño o infección de células o tejidos, mientras que las antiinflamatorias también liberadas periféricamente durante el proceso inflamatorio disminuyen y dan por finalizada la actividad de las citocinas proinflamatorias. Mantener el balance de la señal de estas moléculas es crucial para sostener la homeostasis inmune y estimular adecuadamente las células inmunes como parte de la respuesta inmunitaria (Clark *et al.*, 2013).

La especificidad de la respuesta inmune obtenida está determinada por la expresión de los receptores de citocinas que se encuentran ampliamente repartidas en tejidos y órganos (Clark *et al.*, 2013). Así, estas moléculas producen efectos en células fuera del sistema inmunitario y, además, también pueden ser sintetizadas y liberadas por células no-inmunitarias. Por ello, son consideradas como hormonas que pueden funcionar localmente o sistémicamente para dirigir la respuesta inmune y también coordinar dicha respuesta con otros sistemas fisiológicos del cuerpo, incluyendo al sistema nervioso (Dunn *et al.*, 2005). Sin embargo, el SNC, es en gran medida, un sistema “inmunológicamente privilegiado”, ya que se encuentra protegido de la respuesta inmune periférica mediante la barrera hematoencefálica (BHE). Siendo esto así, en la actualidad sabemos que existe una comunicación de señales inflamatorias al cerebro que puede darse por vía humoral, neural y/o celular (Langgartner *et al.*, 2019).

La vía humoral consiste en la transmisión y la producción de mediadores inflamatorios a través de regiones específicas de la BHE. En un principio se pensaba que esta comunicación solo podía ser posible mediante regiones permeables de la BHE como los órganos circunventriculares (CVOs) (estructuras altamente vascularizadas que tienen capilares permeables situados alrededor del tercer y cuarto ventrículo), entre las que se encuentran la glándula pineal, el órgano parapineal y el órgano paraventricular (Ericsson *et al.*, 1994; García-Lecea *et al.*, 2017; Komaki *et al.*, 1992). Más adelante también se observó que las células endoteliales de los CVOs poseen algunos tipos de receptores

de citocinas (Ek *et al.*, 2001), que funcionan como estaciones de relevo donde se realiza la transducción de información de señales inflamatorias periféricas al SNC (Langgartner *et al.*, 2019). Cuando las citocinas se unen a sus receptores, producen y liberan mediadores inflamatorios en el compartimento perivascular que pueden alcanzar el cerebro e interactuar con células inmunes no-neuronales para inducir procesos inflamatorios locales (Quan *et al.*, 1997) o activar las terminales nerviosas para alterar la señal neuronal hacia otras regiones cerebrales (Stitt, 1990). Por otro lado, Banks (2005) identificó otra ruta independiente de CVOs, que consiste en un sistema de transporte selectivo de citocinas por la BHE. Así, muchas citocinas como la IL-1 β , el TNF y la IL-6 son capaces de cruzar la BHE mediante transporte específico, mientras que otras citocinas como la IL-2 y la IL-10, no pueden hacerlo.

Otra vía de comunicación es la vía neuronal, propuesta por Watkins *et al.* (1994) y que hace referencia a los inputs sensoriales de los nervios periféricos aferentes que transmiten la información inflamatoria periférica al cerebro. A este respecto, el nervio vago parece ser especialmente importante, puesto que la administración de IL-1 β periféricamente puede activar neuronas sensoriales vagales. Esta vía proyecta en el tracto solitario y transmite la información al núcleo paraventricular del hipotálamo, la amígdala y a los núcleos de la estría terminal del tálamo (Bonaz *et al.*, 2016, 2017), donde esta información sensorial induce la correspondiente respuesta fisiológica y conductual (Bonaz *et al.*, 2016; Dantzer *et al.*, 2008).

Por último, la vía celular de comunicación hace referencia a la migración de células inmunitarias periféricas activadas al cerebro. Se ha observado que los altos niveles de TNF α periféricos inducen la producción de la proteína quimiotáctica de monocitos-1 (MCP-1), sustancia quimioatrayente que promueve el transporte de leucocitos periféricos al SNC. Estas células inmunitarias, a su vez, activan los macrófagos que residen en el cerebro para producir TNF α adicional en el SNC (Kerfoot *et al.*, 2006).

Cuando las citocinas, mediante estas tres vías, llegan al cerebro, amplifican su señal y hacen que numerosos elementos como los astrocitos, la microglía y diversas neuronas produzcan a su vez más citocinas, siendo las células de la microglía, equivalente de los macrófagos en el cerebro, las más activas a este respecto (Miller *et al.*, 2009). Las citocinas liberadas en el cerebro ponen en marcha una serie de cambios

necesarios para abordar la respuesta inmune y hacer frente al factor causante de la inflamación (Lotrich *et al.*, 2013). Así, Kipnis (2018), ha propuesto que el sistema inmunitario actúa como el “séptimo sentido”, ya que su función principal es detectar los microorganismos y enviar la información necesaria al SNC, para que posteriormente, la respuesta inmune sea programada en el cerebro y este puede coordinar la respuesta tanto fisiológica como conductual y mantener así la homeostasis del organismo.

Los cambios conductuales que experimenta el organismo tras un proceso inflamatorio fueron definidos por Ben Hart (1988) como “conducta de enfermedad”. Este investigador indicó que los animales enfermos, incluidos los humanos, muestran alteración de la actividad del sueño-vigilia, reducción de la actividad diaria y una disminución del interés por la comida, por el aseo, por la socialización, por la reproducción, así como por los comportamientos hedónicos. Investigaciones como las llevadas a cabo por De La Garza (2005) muestran que la administración de citocinas proinflamatorias como IL- β y TNF- α producen conducta de enfermedad en ratones, que se expresa mediante la anhedonia, hipersomnias, fatiga, disminución de habilidades cognitivas y la reducción de comportamientos sociales y exploratorios. Estos cambios conductuales promueven la conservación de la energía y son adaptativos cuando se limitan al periodo en el que el organismo hace frente al reto inmunológico. Por ello, Dantzer *et al.* (2008) plantearon que las características psicológicas y conductuales de la enfermedad, junto con los cambios fisiológicos, representan una estrategia organizada del organismo que le permite hacer frente a una infección. Pero, cuando la actividad del sistema inmunitario se cronifica o está mal regulada, la excesiva liberación de citocinas contribuirá al desarrollo de síntomas conductuales característicos de los trastornos depresivos (Capuron y Miller, 2011).

1.1.3. HIPÓTESIS INFLAMATORIA DE LA DEPRESIÓN.

La aparición de la psiconeuroinmunología y el creciente incremento de información respecto a la interacción entre el sistema inmunitario y el sistema nervioso han permitido constatar la importancia de la actividad inmunitaria en el desarrollo de enfermedades, no solo físicas, sino también mentales (Carney y Freedland, 2003). Hace más de dos décadas, Maes (1995) planteó la hipótesis de la implicación de una excesiva activación del sistema inmunitario en la patogénesis del trastorno depresivo. También se conoce como hipótesis inflamatoria, ya que, de acuerdo con este autor, serán los niveles elevados de citocinas proinflamatorias los que promueven la evolución y el mantenimiento de los síntomas depresivos (Maes, 1995).

Cuando las señales de las citocinas periféricas, producidas por diversos factores, como la respuesta de estrés, cáncer, infecciones, etc., llegan al SNC, son capaces de interactuar en, prácticamente, todas las áreas cerebrales relevantes en la regulación del estado de ánimo y en la fisiopatología de la depresión. Las citocinas pueden producir efectos sobre los neurocircuitos relacionados con la actividad motora y la motivación (ganglios basales), con el estado de ánimo, el arousal y la alarma (corteza cingulada anterior) y la función cognitiva (hipocampo) a través de diversos mecanismos. Como veremos más adelante, las citocinas son capaces de alterar factores de crecimiento, la neurogénesis, la plasticidad sináptica, el metabolismo de neurotransmisores y la función neuroendocrina (Capuron y Miller, 2011), mecanismos, todos ellos, implicados en la fisiopatología de la depresión.

1.1.3.1. Evidencias.

Existen numerosas evidencias de la relación entre el sistema inmunitario y el desarrollo de trastornos depresivos que refuerzan la hipótesis inflamatoria de la depresión.

Por un lado, las evidencias proceden de la observación de que un gran número de pacientes deprimidos presentan inflamación crónica (Dantzer, 2017; Miller y Raison, 2016; Raison *et al.*, 2006; West y Maes, 1999). Los primeros estudios pusieron de manifiesto la existencia de una activación inmune sistémica en pacientes deprimidos (Maes *et al.*, 1992). Más adelante se observó que estos pacientes mostraban una

hiperactividad de la respuesta inmunitaria innata, expresada sobre todo mediante el incremento de los niveles de citocinas proinflamatorias, tales como IL-6, IL-1 β , TNF- α , IFN- γ y la proteína C-reactiva, cuya función es coordinar diferentes funciones celulares que estimulan e incrementan la inflamación (Dowlati *et al.*, 2010; Haapakoski *et al.*, 2015; Howren *et al.*, 2009; Köhler *et al.*, 2017; Liu *et al.*, 2012; Slavich y Irwin, 2014; Thomas *et al.*, 2014). Numerosos autores han encontrado una relación positiva entre la concentración de factores inflamatorios y el número de síntomas y severidad del trastorno depresivo (Hiles *et al.*, 2012; Meyers *et al.*, 2005; Motivala *et al.*, 2005). Además, la administración de antidepresivos reduce estos elevados niveles de citocinas en pacientes depresivos (Diamond *et al.*, 2006; Kubera *et al.*, 2001; Maes, 2001).

Por otra parte existen numerosas evidencias que relacionan las enfermedades que cursan con la inflamación, como es el caso del cáncer, las alergias, enfermedades coronarias, enfermedades infecciosas y las enfermedades inflamatorias autoinmunes, con una mayor prevalencia de depresión (Dantzer *et al.*, 2008). Así, se ha observado que la incidencia de depresión es mayor en pacientes con hepatitis C (Golden *et al.*, 2005) y en personas con enfermedades coronarias que cursan con inflamación (Sforzini *et al.*, 2019).

Las evidencias descritas hasta el momento se basan en correlaciones, y como tales, no indican si los niveles elevados de citocinas causan depresión o si son de alguna manera secundarios al desorden (ya que podrían ser el resultado de alteraciones del sueño o de la enfermedad física). Sin embargo, varias líneas de investigación apoyan la idea de que las citocinas proinflamatorias pueden causar síntomas depresivos e incluso formas de depresión clínicamente diagnosticables. Se ha observado que el tratamiento de ciertas enfermedades como hepatitis C, esclerosis múltiple, algunas infecciones y distintos tipos de cáncer, basado en la administración de citocinas, puede inducir la aparición de síntomas depresivos. Así, varios trabajos indican que el tratamiento con IFN α , una de las citocinas más utilizadas en estos tratamientos, produce trastornos afectivos, como la depresión, estados maníacos, hipomanía y estados mixtos (Capuron y Miller, 2004). Otros estudios observaron que los retos inmunológicos que aumentaban la inflamación también alteraban la actividad neural en regiones cerebrales que se han visto implicadas en la depresión, incluyendo los ganglios basales, cerebelo, corteza cingulada anterior y el estriado ventral. A este respecto, Capuron *et al.* (2012)

encontraron una reducción de la respuesta neuronal del estriado ventral tras la administración crónica de IFN- α a pacientes con hepatitis C, que a su vez correlacionaba con un aumento de los síntomas de anhedonia, depresión y fatiga. Del mismo modo, estudios realizados en animales han observado un aumento de las conductas tipo-depresivas tras la administración de IL-1 y lipopolisacárido (LPS), un potente estimulador de la producción y liberación de las citocinas proinflamatorias IL-1, IL-6, TNF α e INF γ (Kent *et al.*, 1992; Larson y Dunn, 2001; Yirmiya, 1996). Así, por ejemplo, Yirmiya (1996) observó que la administración de LPS disminuía la frecuencia con la que las ratas presionaban una palanca para obtener la solución de sacarosa. Esta respuesta asociada con la anhedonia, uno de los síntomas centrales de la depresión, fue revertida por la administración del antidepresivo imipramina.

1.1.3.2. Mecanismos inflamatorios asociados al desarrollo de la depresión.

Pese al perjuicio que tienen los trastornos depresivos sobre la salud y sobre la calidad de vida de las personas, todavía no se conoce con exactitud la fisiopatología subyacente a esta enfermedad, ni existen datos concluyentes sobre los biomarcadores que posibiliten un diagnóstico clínico objetivo (Jentsch *et al.*, 2015). No sorprende por tanto que el 20% de los pacientes deprimidos sean resistentes al tratamiento farmacológico convencional (Gaynes, 2009). Por ello, y dado que las evidencias indican una asociación entre la depresión y un aumento de biomarcadores inflamatorios, uno de los mayores retos de la psiconeuroinmunología actual, es conocer los mecanismos inmunitarios implicados en la etiopatología de los trastornos depresivos. Es decir, conocer las vías por las que las citocinas inflamatorias pueden contribuir a los mecanismos patofisiológicos de la depresión identificados en la actualidad, tales como, la disfunción de sistemas monaminérgicos y del eje Hipotálamo - Pituitario - Adrenocortical (HPA), cambios en factores de crecimiento y neuropéptidos, alteraciones en la transmisión de glutamato y una disminución de la neurogénesis (Dunn *et al.*, 2005; Miller *et al.*, 2009).

1.1.3.2.1. Citocinas y eje Hipotálamo - Pituitario - Adrenocortical (HPA).

La activación del eje HPA es uno de los marcadores biológicos más consistentes en pacientes deprimidos, habiéndose hallado niveles elevados de glucocorticoides en aproximadamente dos de cada tres pacientes con depresión (Pariante y Lightman, 2008; Ströhle y Holsboer, 2003). Además de niveles altos de cortisol, se ha encontrado un incremento del tamaño de las glándulas adrenales y pituitaria (Holsboer y Barden, 1996), y alteraciones en el balance de los receptores glucocorticoides (GR) y mineralocorticoides (MR) (Carvalho y Pariante, 2008) en estos pacientes deprimidos. También se ha observado un incremento de la expresión génica de la hormona liberadora de corticotropina (CRH) en los núcleos paraventriculares del hipotálamo en estudios postmortem realizados en pacientes deprimidos (Binder y Nemeroff, 2010). Estudios con modelos animales de depresión han observado niveles elevados de corticosterona y de la hormona adrenocorticotropa (ACTH), así como, un aumento del tamaño de glándulas adrenales (Avitsur *et al.*, 2001; Saltzman *et al.*, 2004). Además, el consenso alcanzado sobre la hiperactividad del eje HPA en la depresión hace que hoy día la administración de glucocorticoides sea utilizado como modelo de depresión en animales (Krishnan y Nestler, 2008).

Esta relación entre la actividad del eje HPA y la depresión podría estar mediada por las citocinas proinflamatorias, ya que estas pueden activar el eje HPA y aumentar la liberación de los glucocorticoides. Así, se ha observado que varias citocinas proinflamatorias, tales como, IL-6, TNF α e IL-1 tienen un efecto activador sobre el eje HPA, siendo la IL-1 la que muestra una mayor efecto (Dunn, 2005; Silverman *et al.*, 2003). Se ha observado también que el incremento de ACTH y cortisol tras la administración de INF- α en pacientes con cáncer correlaciona con el desarrollo de sintomatología depresiva (Capuron y Miller, 2004; Felger y Lotrich, 2013). Este fenómeno podría deberse a una disfunción de los GR y consecuente sensibilización de las vías CRH en el cerebro (Pace *et al.*, 2007, 2009), ya que una de las vías principales por las que las citocinas estimulan el eje HPA es a través del aumento de liberación de CRH por parte de las neuronas del núcleo paraventricular del hipotálamo (Silverman *et al.*, 2005).

1.1.3.2.2. Citocinas y sistema monoaminérgico central.

El déficit monoaminérgico fue una de las primeras y principales hipótesis de la fisiopatología de la depresión, según el cual, una reducción de los niveles de monoaminas en el cerebro altera el estado de ánimo y la conducta. Esta idea está apoyada por el hecho de que el mecanismo de acción de la mayoría de los antidepresivos consiste en aumentar los niveles de monoaminas en el cerebro. Existe una aceptación general de que los mediadores inflamatorios pueden producir cambios sobre los neurotransmisores monoaminérgicos del cerebro (Delgado, 2000). Concretamente, las citocinas proinflamatorias producen una disminución de los niveles de serotonina (5-HT), dopamina (DA) y noradrenalina (NA), alterando la actividad de las enzimas implicadas en su síntesis o reduciendo la disponibilidad de sus precursores (Bunney y Davis, 1965; Coppen, 1967; Langgartner *et al.*, 2019; Nutt, 2002; Raphael y Wooding, 2006; Schildkraut, 1965).

El principal precursor de la serotonina es el triptófano y su disponibilidad disminuye tras la activación de las enzimas triptófano 2,3 dioxigenasa (TDO) e indolamina 2,3 dioxigenasa (IDO), que degradan el triptófano a través de la vía de la kinurenina. Las citocinas IFN- γ , TNF- α , IL-6 e IL-1 β (Anderson *et al.*, 2013; Dantzer *et al.*, 2018; Fujigaki *et al.*, 2006) son las responsables de inducir la enzima IDO, aumentando su actividad y/o síntesis, mientras que en el caso de la enzima TDO son los glucocorticoides (Dantzer *et al.*, 2008) quienes realizan esta función a través de los receptores GR (Green y Curzon, 1968). Por ello, tanto los niveles altos de citocinas proinflamatorias, como la elevada activación del eje HPA, producida en respuesta al estrés, darían lugar a una mayor degradación del triptófano en derivados de la kinurenina (Widner *et al.*, 2000). Esta degradación limita la disponibilidad del triptófano para la biosíntesis de la serotonina, pudiendo dar lugar al desarrollo de síntomas depresivos (Widner *et al.*, 2002). En esta línea, numerosos estudios indican una marcada reducción de triptófano en plasma en personas con trastornos depresivos (Maes *et al.*, 2011; Maes y Rief, 2012; Manjarrez-Gutierrez *et al.*, 2009), pero no se han podido establecer datos concluyentes, ya que otros estudios no han observado esta relación (Myint *et al.*, 2007; Pinto *et al.*, 2012; Sublette, *et al.*, 2011). Por otro lado, la acumulación de kinurenina, inducida por citocinas, a expensas del triptófano, puede dar lugar al aumento de sus metabolitos: ácido kinurénico y ácido quinolínico (Maes *et al.*, 2011) (Figura 1). El ácido kinurénico producido por astrocitos se asocia con una función

protectora, sin embargo, el ácido quinolínico producido por la microglía es tóxico para las células, ya que al actuar como agonista del receptor NMDA (receptor ionotrópico del glutamato), puede contribuir a la excitotoxicidad y al estrés oxidativo y finalmente a la neurodegeneración (Haroon *et al.*, 2012). Así, diversos estudios han encontrado un aumento de los niveles de ácido quinolínico (Bay-Richter *et al.*, 2015) y una disminución de la ratio ácido kinurénico/ácido quinolínico (Savitz *et al.*, 2015) en pacientes deprimidos, apoyando así la hipótesis de la implicación de la vía de la kinurenina en el desarrollo de síntomas depresivos. Además, el ácido quinolínico, induce un aumento de la cantidad de glutamato disponible (Bay-Richter *et al.*, 2015). La unión del glutamato al receptor NMDA, además de aumentar la excitotoxicidad, disminuye la producción del factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) (Hardingham *et al.*, 2002), observado en pacientes deprimidos, tanto en plasma (Karege *et al.*, 2002; Shimizu *et al.*, 2003) como en el hipocampo (Chen *et al.*, 2001; Dwivedi *et al.*, 2001; Karege *et al.*, 2005). Algunos autores han sugerido que la disminución de la neurogénesis, junto con la reducción de la disponibilidad de monoaminas inducida por citocinas, explicaría la resistencia al tratamiento antidepresivo en pacientes con elevados niveles de marcadores inflamatorios (Duman y Monteggia, 2006).

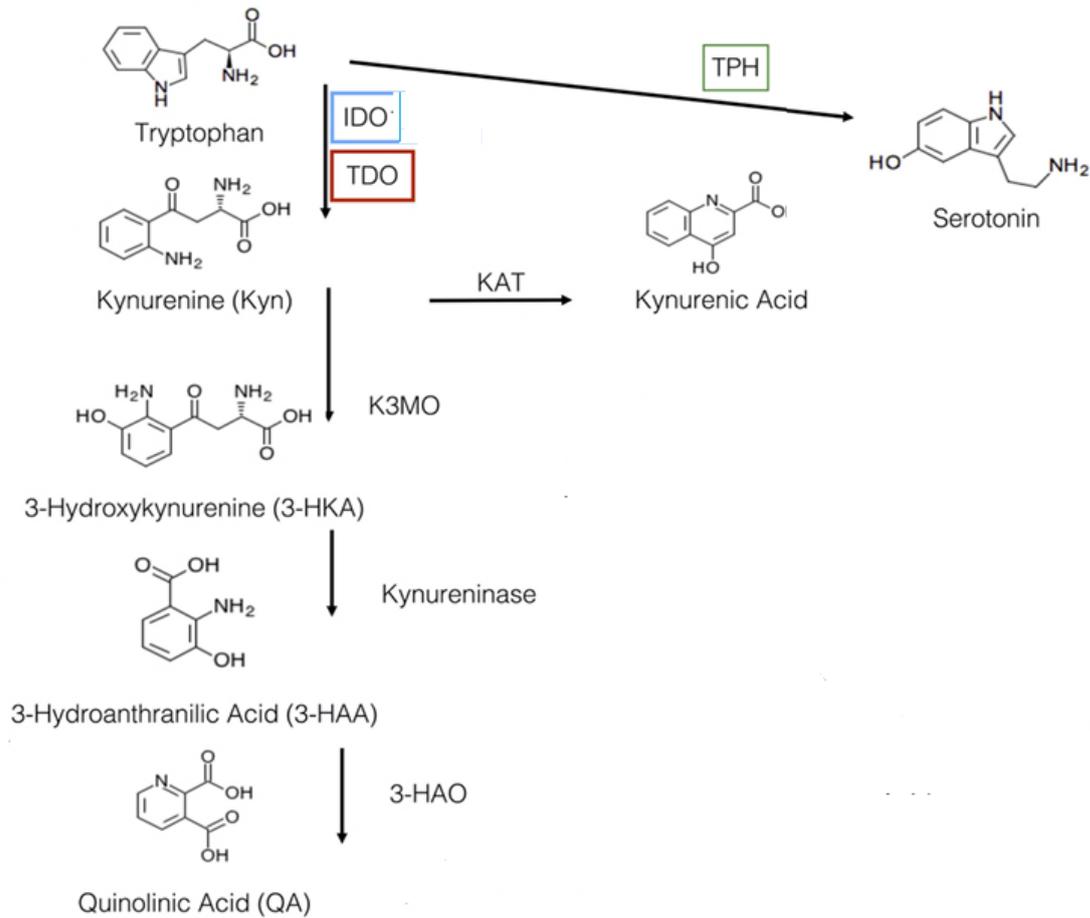


Figura 1. Vía de la quinurenina. Nota. IDO = Enzima indolamina 2,3-dioxigenasa; TDO = enzima triptófano 2,3-dioxigenasa; TPH = triptófano hidroxilasa; KAT = kinurenina transaminasa; K3MO = kinerunina 3-monooxidasa; 3-HAO = 3-hydroxyanthranilate 3,4-dioxygenase. (Imagen adaptada de Van der Leek *et al.* (2017).

Por otra parte, las citocinas proinflamatorias moderan la actividad del BH4 (5,6,7,8-tetrahydrobiopterina), cofactor importante para las enzimas que median la síntesis de monoaminas (Celik *et al.*, 2010; Myint *et al.*, 2007; Sperner-Unterweger *et al.*, 2014). La inflamación aumenta la producción de óxido nítrico sintasa inducible (iNOS), enzima que precisa de la BH4 como cofactor para la conversión de arginina en óxido nítrico (Neurauter *et al.*, 2008), de manera que se ve reducida la disponibilidad de la BH4 para la síntesis de monoaminas (Figura 2). Además, las citocinas inflamatorias también aumentan los radicales de oxígeno y nitrógeno (ROS/RNS) que producen la oxidación de BH4, contribuyendo, así, a la disminución de su disponibilidad para otras reacciones (Cunnington y Channon, 2010). Por lo tanto, la reducción de BH4, que se da en situaciones de excesiva liberación de citocinas, conllevaría a la disminución de la

producción de neurotransmisores como la dopamina, noradrenalina y serotonina, y al desarrollo de síntomas depresivos (Felger *et al.*, 2013a; Felger *et al.*, 2013b; Neurauter *et al.*, 2008).

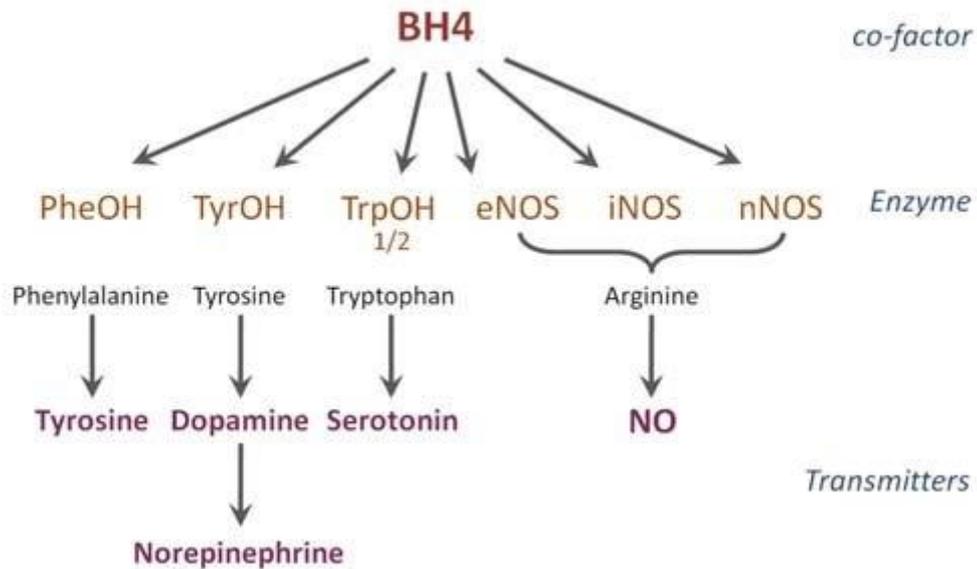


Figura 2. Rutas de biosíntesis de monoaminas y óxido nítrico que precisan de BH4. Nota. PheOH=Fenilalanina hidroxilasa; TyrOH=Tirosina hidroxilasa; TrpOH=Triptófano hidroxilasa; eNOS=Óxido nítrico sintasa endotelial; iNOS=Óxido nítrico sintasa inducible; nNOS=Óxido nítrico sintasa neuronal; NO=Óxido nítrico. (Imagen tomada de Latremoliere y Costigan, 2011).

CAPÍTULO 1.2.

ESTRÉS SOCIAL Y DEPRESIÓN

1.2.1. ESTRÉS SOCIAL Y ESTRATEGIAS DE AFRONTAMIENTO.

Aunque la concepción negativa del estrés está más que extendida en nuestra sociedad, el estrés es una respuesta fisiológica y conductual adaptativa, que se activa en nuestro organismo cuando hacemos frente a situaciones adversas, con el objetivo de mantener la homeostasis e incrementar las probabilidades de supervivencia. Estas respuestas coordinadas, denominadas “respuesta de estrés”, fueron estudiadas por primera vez por Selye en 1936. De acuerdo con el autor, ante una situación de estrés, independientemente de su naturaleza, los individuos generan la misma respuesta adaptativa estereotipada. Décadas más tarde, en 1972, Mason criticó la teoría de Selye acerca de las respuestas no específicas de estrés y en 1992, Chrousos y Gold modificaron este concepto. Según ellos, la respuesta adaptativa de estrés presentaba cierta especificidad dependiendo del tipo de estresor que la genera, pero esta especificidad se perdía cuando aumentaba la severidad del estresor. Así, para estos autores el estrés se definiría como *“un estado de desarmonía o de homeostasis amenazada que evoca tanto respuestas específicas como no específicas”* (Chrousos y Gold, 1992). El concepto de homeostasis fue acuñado por Cannon en 1926 para explicar la tendencia del organismo a estabilizar los valores biológicos esenciales a un determinado nivel, el que se considera adecuado. Pero estos niveles que se consideran adecuados en un organismo sano, puede que no sean los requeridos durante una enfermedad o una situación estresante, por lo que estos valores pueden variar. Ya en 1998 se introdujo un concepto clave para entender estos cambios fisiológicos producidos por el estrés, la alostasis (McEwen, 1998, 2004), definido como *“el proceso de adaptación y reajuste fisiológico del organismo ante la exposición a diferentes estresores con el objetivo de retornar a la homeostasis”*. Así, en respuesta a diferentes agentes estresores puntuales, generalmente denominados agudos, se liberan una serie de sustancias, como la adrenalina o el cortisol, cuya principal función es promover la adaptación, por lo que en general producen cambios beneficiosos para el organismo. Sin embargo, cuando estos mediadores del estrés no se activan adecuadamente, cuando su liberación no cesa una vez terminada la situación estresante o cuando son utilizados en exceso, como en el caso del estrés crónico, se produce un desequilibrio continuo en el organismo que conduce a una carga, que McEwen denominó *“carga alostática”* (McEwen, 2004, 2008). Este desequilibrio continuo que impide al organismo volver a la homeostasis produce una reducción de la capacidad de resistencia del individuo, haciéndole más susceptible a padecer enfermedades de diferente índole.

A lo largo de la historia, el ser humano ha tenido que hacer frente a numerosos estresores físicos: depredadores, peleas, amenazas naturales, etc. (Miller y Raison, 2016), pero en la actualidad, y concretamente en nuestra sociedad, la mayoría de los estresores corresponden a situaciones de estrés social. Así, se ha observado que además de las situaciones traumáticas, como los desastres naturales o las guerras, o las vivencias estresantes como el divorcio o la muerte de un familiar cercano, las situaciones de la vida cotidiana pueden generar altos niveles de estrés. Hay que tener en cuenta que la mayoría de las especies, incluyendo los humanos, pasan la mayor parte de su tiempo interactuando con individuos de su misma especie. Pero vivir en comunidad implica la necesidad de adaptarse a la conducta y a la presencia de otros miembros del grupo. Aunque desde el punto de vista evolucionista, la estructura social debería ser óptima para la salud, la reproducción y la supervivencia, los grupos sociales son dinámicos y por ello se reestructuran una y otra vez. Así, el entorno y la estructura social, además de ser esenciales para la supervivencia, también pueden ser una fuente importante de estrés social (Koolhaas *et al.*, 2017). En este sentido, varios estudios han demostrado que la incapacidad del organismo humano para controlar los estresores sociales y psicológicos puede llevar al desarrollo de alteraciones físicas y psicológicas (Korte *et al.*, 2005; McEwen, 2008) e incluso, precipitar la aparición de trastornos mentales e influir en la incidencia, en la severidad y en el curso de la enfermedad (Cherry *et al.*, 2006; Kar y Bastia, 2006; Matheson *et al.*, 2006; Pflanz y Ogle, 2006; Sandin *et al.*, 2004).

1.2.1.1. Respuesta fisiológica del estrés.

La respuesta neurofisiológica de estrés está orientada a cubrir las necesidades de un organismo ante un estresor, priorizando la supervivencia inmediata. Así, cuando se percibe una situación como estresante o amenazante, se desencadena una respuesta fisiológica y conductual que es modulada por el sistema nervioso central, en el que destaca la implicación del hipotálamo. En cuanto a la respuesta fisiológica, el estrés activa diferentes sistemas del organismo, pero los principales cambios se producen sobre el sistema simpático adrenomedular (SAM) y sobre el eje hipotálamo-pituitario-adrenal (HPA).

1.2.1.1.1. Sistema simpático - adrenomedular (SAM).

Ante una situación de estrés se produce una rápida activación del sistema nervioso autónomo (SNA) (Chrousos, 1998). El hipotálamo, estructura cerebral que integra la información procedente de vías somáticas y viscerales, estimula las vías nerviosas simpáticas, bien directamente o bien a través del núcleo del tracto solitario y del núcleo del locus coeruleus, liberando noradrenalina sobre las células diana. Por otro lado, las neuronas preganglionares simpáticas activan la médula adrenal, que libera adrenalina y noradrenalina a la circulación sanguínea. Estas catecolaminas pueden activar estructuras que no están directamente inervadas por el sistema simpático y reforzar sus efectos, facilitando las reacciones rápidas de "lucha o huida". Los cambios fisiológicos consisten en la estimulación del corazón y aumento del flujo sanguíneo en el sistema nervioso central y en los músculos, mientras que las respuestas conductuales incluyen un aumento de la vigilancia y la alerta, un cambio en el análisis cognitivo, en la atención focalizada y en la euforia/disforia.

Hay que tener en cuenta que la actividad de la médula adrenal representa una respuesta muy corta, debido a la reducida vida media de las catecolaminas en sangre. No obstante, la exposición crónica a estresores no solo aumenta la liberación de catecolaminas, sino que además, produce un incremento en la actividad de las enzimas de síntesis de dichas catecolaminas, la tirosina hidroxilasa (TH) y la dopamina- β hidroxilasa (DBH), en la médula adrenal (Sabban y Kvetnanský, 2001; Sonnentag y Fritz, 2006; Wong y Tank, 2007).

1.2.1.1.2. Eje hipotálamo-pituitario-adrenal (HPA).

El organismo también experimenta un aumento de la actividad del eje HPA en situaciones de estrés. La activación de las neuronas del núcleo paraventricular del hipotálamo da lugar a la secreción de CRH al torrente circulatorio. Esta hormona es transportada hasta la adenohipófisis, donde estimula a las células corticotrópicas que liberan a su vez ACTH (Tsigos y Chrousos, 1994). Esta segunda hormona llega a las glándulas adrenales a través de los vasos sanguíneos, provocando la secreción de

glucocorticoides por parte de la corteza adrenal. En humanos y otros primates, es el cortisol el glucocorticoide que más prevalece, mientras que en roedores es la corticosterona. Los glucocorticoides producen cambios a corto plazo que resultan beneficiosos para afrontar situaciones estresantes, entre ellos se encuentran: inhibir el almacenamiento de glucosa, estimular la degradación de glúcidos, lípidos y proteínas y suprimir la respuesta inmunitaria. Sin embargo, si los niveles de glucocorticoides se mantienen elevados durante un tiempo prolongado, pueden resultar perjudiciales para el organismo, pudiendo causar daño neural, ansiedad, depresión, hipertensión, infertilidad, inhibición del crecimiento, alteraciones del sistema inmune, etc.

Por ello, cuando los glucocorticoides liberados alcanzan cierto umbral, estos modulan la respuesta del eje e inhiben su propia secreción, limitando la duración de la exposición a los glucocorticoides (Charmandari *et al.*, 2005), y, evitando, así, la aparición de patologías asociadas a una activación excesiva y mantenida de la respuesta de estrés. Los glucocorticoides, uniéndose a sus receptores, situados en el eje HPA o en diferentes estructuras cerebrales, producen una supresión de la transcripción de genes que codifican para el CRH y ACTH. Los MR se localizan en gran número de estructuras límbicas, tales como el hipocampo, el hipotálamo, la amígdala y el septum, mientras que los GR se encuentran más repartidos en el cerebro, aunque principalmente se localizan en el hipocampo (Chao *et al.*, 1989; Reul y De Kloet, 1985; Shirazi *et al.*, 2015; Van Eekelen *et al.*, 1988). Los receptores MR son 10 veces más afines a los glucocorticoides que los receptores GR, por lo que cuando hay dosis bajas de glucocorticoides, estos se unirán principalmente a los receptores MR, siendo así estos receptores los que controlen la sensibilidad del eje HPA. Pero cuando los niveles de glucocorticoides aumentan en respuesta al estrés, este se unirá a los receptores GR (Reul y De Kloet, 1985), los cuales se encargarán de finalizar la actividad del eje HPA mediante el feedback negativo.

Pero si la actividad del eje no cesa y se produce un aumento sostenido de los niveles de glucocorticoides, habrá una regulación a la baja o una disminución de la funcionalidad de sus receptores, conocido también como resistencia a los glucocorticoides, que se expresará mediante el aumento de la actividad del eje HPA (Stark *et al.*, 2001; Swaab *et al.*, 2005).

Aunque el SNA y el eje HPA son los principales componentes de la respuesta fisiológica del organismo frente a situaciones estresantes, no son los únicos sistemas alterados. Por ejemplo, la activación del eje HPA hace que se inhiba el eje hipotálamo-pituitario-gonadal (HPG), reduciendo así la liberación de la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH) y consecuentemente, reduciendo los niveles de testosterona en machos e interrumpiendo la ovulación en hembras (Witorsch, 2016). La actividad monoaminérgica en el cerebro también cumple una función muy relevante en la respuesta de estrés, ya que prepara el organismo para hacer frente a dicha situación. La activación noradrenérgica produce cambios conductuales como un aumento de la vigilancia y la alerta, un cambio en el análisis cognitivo, en la atención focalizada y en la euforia/disforia. La activación del sistema dopaminérgico, por su parte, ayuda a planificar la respuesta conductual y a dirigir la atención al estímulo adecuado. Por último, la activación del sistema serotoninérgico está relacionado con conductas de ansiedad previas y un estado de vigilia mayor en situaciones de alarma (Joëls y Baram, 2009). Por otra parte, en la última década, numerosos estudios han encontrado una comunicación bidireccional entre la microbiota intestinal con diferentes sistemas del organismo, como el SNC, endocrino e inmunitario, por lo que no se puede descartar que el estrés también pueda alterar su actividad (Dinan y Cryan, 2012). Finalmente, dada la presencia de receptores adrenérgicos y GR en células inmunitarias, es de esperar que la activación del eje HPA y del SAM, dé lugar a cambios en la actividad inmunitaria (*Figura 3*). Teniendo en cuenta el objetivo de este trabajo, esta relación entre estrés y sistema inmunitario se analizará en un apartado posterior.

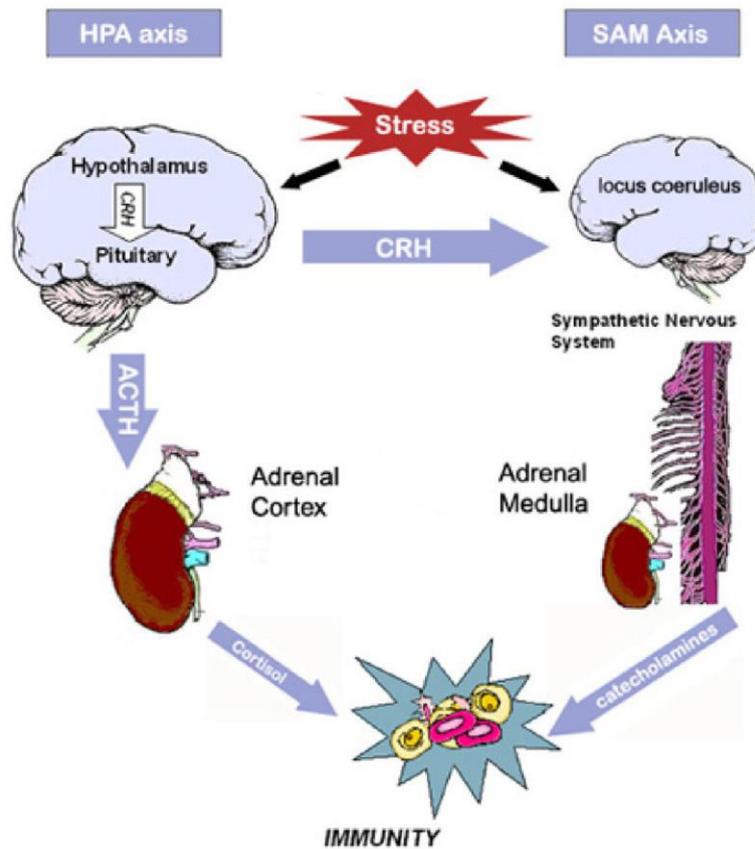


Figura 3. Componentes principales de los ejes HPA y SAM. Nota: HPA= hipotálamo-pituitario-adrenocortical; SAM= simpático-adrenomedular; CRH= hormona liberadora de corticotropina; ACTH= hormona adrenocorticotropina. (Imagen tomada de Thornton y Andersen, 2006).

1.2.1.2. Estrategias de afrontamiento.

Aunque existen muchos trabajos que analizan las repercusiones de la exposición al estrés, hay que tener presente que no todos los individuos responden de la misma manera a una situación estresante. En este contexto, es importante señalar que no son solo las características físicas de un estímulo las que lo hacen aversivo, sino que fundamentalmente es la evaluación cognitiva de dicho estímulo, lo que determina su carácter aversivo y su condición de estresor, por lo que, el impacto de un estímulo estresor queda determinado por la diferente capacidad cognitiva de los individuos para hacer frente a la situación (de Boer *et al.*, 2017; Koolhaas *et al.*, 2017; Ursin, 1998; Ursin y Olf, 1993). Así, solamente un 20-25% de las personas que se enfrentan a un evento estresante desarrollan depresión mayor (Cohen *et al.*, 2007). Las diferencias individuales son una característica común de los organismos vivos y un aspecto fundamental para el

estudio de la conducta y la psicopatología. Sin embargo, los mecanismos biológicos que subyacen a estas diferentes características de rasgo siguen sin despejarse (Forkosh *et al.*, 2019), dificultando, así, establecer relaciones entre las diferencias individuales y sus consecuencias en el organismo. En humanos la consistencia en la expresión emocional y conductual ha sido ampliamente investigada y categorizada en distintos rasgos de personalidad. Ya en el siglo IV. A.C., Hipócrates diferenció cuatro tipos de temperamentos (colérico, optimista, flemático y melancólico), reflejando cada uno de ellos, una manera de afrontar los problemas diarios y que se formarían por la mezcla de los que se consideraban los cuatro líquidos básicos del cuerpo, o humores: sangre, bilis amarilla, bilis negra y flema. Más tarde, en el siglo II. A.C., Galeno propuso que los individuos con temperamento melancólico eran más propensos a desarrollar enfermedades como infecciones y cáncer. Durante el siglo XX, la idea de que la personalidad influye en el desarrollo de enfermedades físicas cobró fuerza tras los estudios de Friedman y Rosenman (1959). Estos autores demostraron que las personas hostiles, competitivas, impacientes, que se enfadaban fácilmente y con una conducta agresiva eran más propensas a enfermedades cardiovasculares, metabólicas y autoinmunes que las personas más relajadas (Friedman y Rosenman, 1971). Por el contrario, las personas con estilos de afrontamiento más evitativos, que reprimen sus emociones, niegan y evitan conflictos, tendrían mayor riesgo de padecer enfermedades infecciosas y cáncer (Baltrusch *et al.*, 1991; Zozulya *et al.*, 2008). Ante situaciones de reto, los seres humanos pueden mostrar un amplio repertorio de estrategias de afrontamiento, como pueden ser la aceptación, la evitación, la evasión o el embotamiento emocional (Rauch *et al.*, 2007). Algunos investigadores han clasificado a los sujetos en dos estilos básicos de afrontamiento basándose en el desarrollo de clústeres conductuales: afrontamiento activo, que se caracteriza por estrategias centradas en los problemas, y afrontamiento pasivo, caracterizado por estrategias centradas en la emoción (Folkman y Moskowitz, 2004; Hino *et al.*, 2002; Matheson y Anisman, 2003).

Estos estilos de afrontamiento al estrés también han sido estudiados en roedores, ya que incluso en condiciones totalmente estandarizadas, animales del mismo sexo, edad y cepa, muestran diferencias individuales consistentes en su respuesta fisiológica y conductual (Koolhaas *et al.*, 1999). Estas diferencias individuales han sido consideradas tradicionalmente más como un inconveniente que como una oportunidad, por la mayoría de los investigadores, muy probablemente debido al dogma experimental de

reducir la variabilidad individual lo máximo posible para poder obtener resultados estadísticamente significativos con el menor número de sujetos. Sin embargo, en este trabajo, al igual que en muchos de los que se citan en el mismo, la variabilidad fisiológica y conductual de los individuos se considera un factor fundamental en la interpretación de los resultados experimentales obtenidos.

Las primeras descripciones de las estrategias de afrontamiento fueron realizadas por Henry y Stephens (1977), quien sugería la existencia de dos modelos de respuesta al estrés: activa y pasiva. La respuesta activa fue descrita originalmente por Cannon (1915) como respuesta de lucha-huída y se caracteriza por el control territorial y la agresión. La estrategia pasiva, en cambio, fue descrito como la respuesta de conservación-retirada por Engel y Schmale (1972) y se caracteriza conductualmente por inmovilidad y bajos niveles de agresión. Estas ideas apoyaron la hipótesis de que los niveles individuales de conducta agresiva estaban relacionados con la manera en la que los sujetos reaccionaban ante retos del entorno. Hay que tener en cuenta que la conducta agresiva es ampliamente utilizada por numerosas especies de forma instrumental para controlar el ambiente social y por lo tanto contribuir a la reproducción y la supervivencia (de Boer *et al.*, 2017).

Años más tarde se observó que los animales también mostraban diferencias conductuales ante situaciones en las que no existía demanda de la conducta agresiva, y Koolhaas *et al.* (1999), encontraron que la manera en la que los animales reaccionan con manifestaciones conductuales a la gran variedad de dificultades que se encuentran en el entorno está relacionada con los niveles individuales de agresividad. Por ejemplo, observaron que los sujetos que mostraban más agresividad al defender su jaula de un macho no-familiar pasaban más tiempo enterrando la pinza que les había producido un shock eléctrico, mientras que los sujetos que mostraban niveles bajos de agresividad permanecían más tiempo inmóviles en el extremo opuesto al que se encontraba la pinza (Koolhaas *et al.*, 1999). Estos autores concluyeron que ambas conductas, enterrar la pinza o quedarse inmóviles, eran igualmente exitosas para conseguir el objetivo deseado, en este caso, evitar el shock eléctrico, y plantearon que probablemente los términos activo y pasivo podrían llevar a confusión, ya que no describían la manera en que los animales respondían en función de la demanda del entorno (Benus *et al.*, 1987, 1990). Por ello, Koolhaas *et al.*, (1999) clasificaron las estrategias en proactivas y reactivas. La complejidad de las respuestas conductuales observadas en situaciones de estrés, hace

pensar en la existencia de no solo dos estrategias de afrontamiento. Por ello, estudios recientes, han introducido el concepto de “dominio identitario” (Forkosh *et al.*, 2019). Estos autores han clasificado a los sujetos en base a la descomposición de una amplia gama de conductas con múltiples dimensiones, y a pesar de encontrar 4 tipos de dominios identitarios, plantean que estos podrían ser más si se llega a estudiar la conducta de los animales en su entorno natural.

Los estilos de afrontamiento, además de diferenciarse por rasgos conductuales propios para cada estrategia, también van acompañados por diferentes respuestas fisiológicas (Koolhaas *et al.*, 2007). Varios estudios han encontrado que los sujetos caracterizados por estrategias de afrontamiento activas muestran una mayor actividad del sistema SAM, en comparación a los sujetos pasivos, cuando se enfrentan a un evento estresante (Fokkema *et al.*, 1995; Koolhaas, 1994; Korte *et al.*, 1997, 1998; Sgoifo *et al.*, 1996). En esta línea se han observado niveles elevados de adrenalina y noradrenalina en animales agresivos, y una correlación positiva entre los niveles de noradrenalina y conductas activas durante la prueba de enterramiento defensivo. Este aumento de la actividad del sistema simpático podría deberse a que estos sujetos preparan su organismo para una respuesta de acción (Koolhaas *et al.*, 2007). Por el contrario, los sujetos con estrategias pasivas, muestran una mayor actividad del eje HPA en comparación a los sujetos activos (Bell, 2007; Koolhaas, 2008; Koolhaas *et al.*, 2007, 1999). A este respecto, algunos estudios han encontrado un incremento en los niveles de corticosterona en plasma en sujetos no-agresivos (Korte *et al.*, 1992; Walker *et al.*, 2009) o pasivos/reactivos (Azpiroz *et al.*, 2008).

Durante los últimos 40 años se ha experimentado un incremento en la investigación de la neurociencia afectiva, proporcionando numerosas evidencias sobre las conductas de afrontamiento al estrés y su relación con la actividad de las áreas cerebrales límbicas, tales como la corteza prefrontal, núcleo accumbens, amígdala, septum, hipocampo e hipotálamo. Mediante estudios realizados con mapeos de genes que actúan como marcadores de la actividad neuronal como c-Fos, han podido observar la existencia de diferencias en la activación de regiones del cerebro en función del estilo de afrontamiento (Haller *et al.*, 2006; Menard *et al.*, 2004; Veenema y Neumann, 2007; Veening *et al.*, 2005). Por ejemplo, en el paradigma de residente-intruso, los ratones residentes con conductas proactivas de lucha mostraron un mayor número de neuronas

c-Fos-positivas en numerosas estructuras del sistema límbico, en comparación con los sujetos residentes reactivos/no-agresivos (Haller *et al.*, 2006). Estos datos sugieren que la actividad funcional de estas redes neuronales, y, por ende, la tendencia a actuar de forma proactiva o reactiva, estaría determinada por una gran variedad de sustratos moleculares: neurotransmisores, hormonas, citocinas y sus respectivas encimas metabólicas y receptores.

Estudios llevados a cabo en nuestro laboratorio, encontraron que los sujetos activos/proactivos sometidos a estrés agudo, mostraban una mayor síntesis de dopamina en relación a los sujetos del grupo pasivo/reactivo, y a los del grupo control (De Miguel, 2010). Estos datos son coherentes, ya que las vías dopaminérgicas se proyectan principalmente sobre las regiones del sistema límbico que ejercen un efecto sobre el control de la agresión (Höglund *et al.*, 2005; Summers y Winberg, 2006), la actividad motora (Waters *et al.*, 2005), el aprendizaje, la motivación y la recompensa (Korzan *et al.*, 2006). Por otro lado, los sujetos del grupo pasivo/reactivo sometidos a estrés agudo mostraron una menor síntesis de serotonina que los sujetos activos/proactivos, y que los sujetos control (De Miguel, 2010).

1.2.2. ESTRÉS, SISTEMA INMUNITARIO Y DEPRESIÓN.

1.2.2.1. Estrés y depresión.

Las principales teorías sobre la depresión han propuesto que el estrés podría iniciar procesos cognitivos y biológicos que aumentarían el riesgo a desarrollar depresión (Beck, 1967; Brown y Harris, 2012; Monroe *et al.*, 2009; Slavich y Irwin, 2014). Actualmente, se considera que el estrés es un factor principal en la etiología de la depresión (Blatt, 2004; Kendler *et al.*, 1999; Kessler, 1997; Patten, 1999). Numerosos estudios han examinado los procesos cognitivos que podrían estar mediando en esta relación (Gotlib y Joormann, 2010; Kircanski *et al.*, 2012), pero no existen datos concluyentes acerca de los procesos biológicos generados en situaciones de estrés, que junto con los procesos cognitivos y afectivos, podrían estar influenciando al desarrollo de los trastornos depresivos (Slavich y Irwin, 2014).

Los datos obtenidos en humanos, que constatan el aumento del riesgo a desarrollar depresión por el estrés, constituyen uno de los hallazgos más consistentes y mejor descritos sobre la depresión (Risch *et al.*, 2009; Slavich y Irwin, 2014). A este respecto, Mazure (1998) encontró que las personas con depresión habían experimentado 2,5 veces más eventos estresantes que el grupo control y que el 80% de las personas con trastornos depresivos había padecido algún evento estresante. Aunque la mayoría de los estudios no diferencian el tipo de estresor, algunos trabajos indican que aquellas situaciones en las que se experimenta un estrés social tendrían una asociación más fuerte con el distrés emocional, que constituye una característica importante de la depresión (Slavich *et al.*, 2010). Slavich *et al.* (2009) observaron que las personas que habían experimentado algún evento estresante con rechazo social, desarrollaban depresión antes que las personas que experimentaban otros tipos de eventos estresantes severos. Esto puede ser debido a la importancia que, desde un punto de vista evolutivo, tienen los vínculos sociales en la supervivencia, ya que facilitan el acceso a los recursos.

La utilización de modelos animales de estrés psicosocial han permitido investigar acerca de la relación existente entre las bases neurobiológicas que subyacen al estrés social y la aparición de psicopatologías (Henry *et al.*, 1993; Koolhaas *et al.*, 1999; Wiepkema y Schouten, 1992). En especies de animales sociales la jerarquía social es una

característica básica, ya que la posición en dicha jerarquía puede determinar el acceso a los recursos, como, por ejemplo, condiciones de vida saludables y parejas reproductoras, por lo que la pérdida de estatus resulta un factor altamente estresante. Así, el modelo de derrota social en roedores macho ha sido utilizado como modelo de depresión en numerosas ocasiones (Czéh *et al.*, 2016; Gómez-Lázaro *et al.*, 2012; Gururajan *et al.*, 2019; Hollis y Kabbaj, 2014; Rygula *et al.*, 2005). Trabajos realizados utilizando este modelo sugieren que los efectos de la derrota social son diferentes en función de su duración. Tras 2-4 días consecutivos de exposición, varios estudios encontraron una disminución de la actividad motora, exploración, agresión y conducta sexual (Koolhaas *et al.*, 1997; Meerlo *et al.*, 1996), así como un aumento de las conductas de subordinación y ansiosas (Crawford *et al.*, 2013; Ruis *et al.*, 1999). La exposición consecutiva de 4-7 días, por su parte, produjo cambios característicos de la conducta tipo-depresiva: menor movilidad en la prueba de natación forzada (FST), menor preferencia de sacarosa, más conductas de evitación social y disminución del peso corporal (Berton *et al.*, 1998; Calvo *et al.*, 2011; Duclot y Kabbaj, 2013; Hollis *et al.*, 2010).

No obstante, la estrategia utilizada para afrontar estas situaciones de estrés social es un factor fundamental que puede determinar la vulnerabilidad de los sujetos a desarrollar trastornos depresivos. En estudios realizados en humanos, los datos muestran que las personas con estrategias de afrontamiento disfuncionales, como mayores sentimientos de culpa, rumiación y catastrofismo, y menos valoraciones positivas, presentan mayor sintomatología ansioso/depresiva (Garnefski *et al.*, 2002; Prinz *et al.*, 2012), mientras que personas con estrategias de afrontamiento activas muestran una mayor resiliencia a los efectos del estrés (Southwick *et al.*, 2005). Los estudios realizados utilizando el modelo de derrota social han evidenciado que los individuos pueden diferir considerablemente en la forma en que responden al estrés social, mostrando una alta variabilidad conductual (de Boer *et al.*, 2017; Koolhaas *et al.*, 1999, 2007; Walker *et al.*, 2009), que podría modular la propensión a desarrollar patologías (Buwalda *et al.*, 2005). Así, diferentes estudios observaron que las ratas con menor latencia de sumisión y clasificadas como pasivas, mostraban una menor preferencia de sacarosa tras 5 días de interacción social (Wood *et al.*, 2015), y que las ratas con una mayor latencia de ataque eran más susceptibles a las consecuencias negativas del estrés (Veenema *et al.*, 2003). Además, estudios en nuestro laboratorio, encontraron que los ratones pasivos, clasificados por su conducta manifestada durante la última

interacción social, tras 18 días de derrota social, mostraban una mayor inmovilidad (Pérez-Tejada *et al.*, 2013) y una menor latencia de inmovilidad (Gómez-Lázaro *et al.*, 2011) en la prueba FST.

La mayoría de los estudios han investigado el efecto del estrés y de las estrategias de afrontamiento sobre manifestaciones conductuales características de la depresión, pero siguen sin conocerse los mecanismos biológicos que median en esta relación. La hipótesis inflamatoria de la depresión puede contribuir a este conocimiento, ya que el estrés puede activar procesos inflamatorios y por lo tanto modular los mecanismos implicados en la fisiopatología de la depresión.

1.2.2.2. Estrés e inflamación.

Existe un número creciente de datos clínicos y de laboratorio que indican que la inflamación puede ser activada no solo por agentes infecciosos, sino que también el estrés tiene la capacidad para inducir y aumentar la producción de citocinas inflamatorias (Dhabhar, 2014; Gouin *et al.*, 2012; Segerstrom y Miller, 2004; Slavich y Irwin, 2014). Teniendo en cuenta que el estrés psicológico es el principal factor de riesgo para el inicio de trastornos depresivos, se ha propuesto, en concordancia con la hipótesis inflamatoria de la depresión, que este aumento de citocinas inflamatorias es el mecanismo principal por el cual la exposición al estrés afecta al desarrollo de esta psicopatología.

Las investigaciones acerca de los posibles mecanismos por los que el estrés aumenta la producción de citocinas, señalan como principales candidatos para mediar este aumento a los glucocorticoides y catecolaminas, productos finales de los dos principales ejes implicados en la respuesta fisiológica de estrés (*Figura 3*). Estas hormonas son los mediadores neuroendocrinos primarios en respuesta a la exposición al estrés y, como tales, funcionan como señales de peligro en todo el cuerpo para ayudar al organismo a responder y a sobrevivir a una amenaza. Por tanto, no es sorprendente que estas respuestas neuroendocrinas también se hayan identificado como mediadores clave en la regulación de la respuesta inflamatoria tras la exposición al estrés psicológico.

Existen marcadas diferencias en el conocimiento de la regulación inflamatoria por los diferentes sistemas o ejes de estrés. Hoy día está bien establecido que las hormonas del eje HPA regulan la inflamación y que el alcance de esta regulación varía en respuesta al estrés psicosocial agudo y crónico. En cambio, se sabe menos acerca del papel del sistema simpático en el control de la inflamación y la sensibilidad de este control en situaciones de estrés agudo y crónico.

1.2.2.2.1. Estrés agudo y citocinas proinflamatorias.

Dhabhar y McEwen (1997, 1999) propusieron que ante situaciones de estrés agudo, el organismo, además de preparar el sistema cardiovascular, la actividad musculo-esquelético y el sistema neuroendocrino que ayudarán a hacer frente a situaciones de lucha-huída, produce una redistribución de recursos mediante la cual las células del sistema inmune se situarían en regiones como la piel y los nódulos linfáticos donde podrían realizar funciones más necesarias en caso de que el estrés venga acompañado de un reto inmunológico, como enfrentarse a algún patógeno o una infección (Dhabhar *et al.*, 2000; Dhabhar, 2014). Estos mismos autores destacan el carácter anticipatorio de esta respuesta inmune, esto es, el SI se activa antes de que se dé el reto, lo cual remarca su aspecto adaptativo.

Pero la mayoría de los estresores que nos encontramos actualmente, como demandas laborales, familiares y sociales, no requieren de la activación inmunitaria que exigiría afrontar las consecuencias de una herida. A pesar de ello, esta respuesta inmunitaria puede ser activada por estas amenazas procedentes del entorno social contemporáneo, es decir, cuando un individuo es expuesto a condiciones adversas que implican conflicto social, evaluación, rechazo, aislamiento o exclusión, incluso por amenazas simbólicas o imaginadas, dando lugar, si se prolonga en el tiempo, a un mayor riesgo de enfermedades relacionadas con la inflamación, incluida la depresión (Cole *et al.*, 2012). Numerosos trabajos en los que se ha observado un incremento de los niveles de citocinas proinflamatorias en plasma producidos por el estrés agudo, corroboran esta idea (Koelsch *et al.*, 2016; Steptoe *et al.*, 2001, 2007).

Estudios en humanos realizados con “Trier Social Stress Test” (TSST), ampliamente utilizado para inducir estrés social (Kirschbaum *et al.*, 1993), encontraron que las personas que fueron sometidas al test, mostraron un incremento en los niveles plasmáticos de cortisol, al mismo tiempo que mostraban un aumento de los niveles plasmáticos de IL-6 (Pace *et al.*, 2010) y mayores niveles del ligamiento al ADN del NF- κ B, paso previo necesario para la síntesis de citocinas (Wolf *et al.*, 2009). Además, Yamakawa *et al.* (2009), observaron una asociación entre el estrés percibido y el incremento de la citocina IL-1 β en plasma. Estudios con animales encontraron que el estrés agudo induce un incremento de marcadores inflamatorios en la circulación sanguínea (Hale *et al.*, 2003; Johnson *et al.*, 2005) y en varias regiones cerebrales (Barnum *et al.*, 2008; Blandino *et al.*, 2006, 2009; Madrigal *et al.*, 2002; Ohgidani *et al.*, 2016). Por ejemplo, Ohgidani *et al.* (2016) encontraron un aumento de TNF α en el hipocampo inmediatamente después de terminar la exposición a estrés mediante inmersión en agua, pero no encontraron cambios en la corteza, el estriado o el cerebelo. Madrigal *et al.* (2002), por su parte, encontraron un incremento de los niveles de TNF α de la corteza en ratas estresadas inmediatamente después de exponerlos a 6 horas de inmovilización.

Aunque los glucocorticoides se han considerado clásicamente como antiinflamatorias, ahora sabemos que tienen efectos pleiotrópicos que incluyen la regulación de las respuestas pro y antiinflamatorias. Estas hormonas de estrés inhiben la producción de citocinas inflamatorias, fundamentalmente, mediante la supresión del factor de transcripción NF- κ B (Bekhat *et al.*, 2017; Bereshchenko *et al.*, 2018). De hecho, el aumento de la actividad del eje HPA inducido por citocinas es un mecanismo autorregulatorio, a través del cual las citocinas dan fin a la respuesta inmunitaria una vez desaparecido el reto inmunológico. Los receptores GR, localizados en células inmunitarias, interactúan directamente con el factor NF κ B impidiendo su ligamiento al ADN, lo cual da lugar a una disminución de la transcripción de citocinas proinflamatorias (Altonsy *et al.*, 2014; De Bosscher *et al.*, 2000; Unlap y Jope, 1995). Además, los glucocorticoides promueven la transcripción y traducción de reguladores antiinflamatorios tales como la IL-10 (Hayashi *et al.*, 2004). Los glucocorticoides, también, parecen suprimir la actividad de otros elementos del sistema inmunitario, como los implicados en la respuesta antiviral, aumentando la susceptibilidad a ciertas enfermedades infecciosas y también al cáncer (Antoni y Dhabhar, 2019).

Sin embargo, el papel de los glucocorticoides durante el estrés no es únicamente suprimir la respuesta inflamatoria. Tal y como describen Sapolsky *et al.* (2000), los glucocorticoides tienen a menudo acciones preparatorias que facilitan respuestas inflamatorias ante estímulos futuros. Así, se sabe que los glucocorticoides producen el priming de monocitos/macrófagos circulantes crítico para su migración al cerebro (Niraula *et al.*, 2018), aumentan los niveles de la prostaglandina E2 (PGE2) (García-Bueno *et al.*, 2005) y facilitan respuestas inflamatorias futuras contribuyendo al priming de la microglía mediante la regulación de receptores inhibidores de la microglía (Frank *et al.*, 2012; Liu, 2018). De acuerdo con estos autores cuando los glucocorticoides alcanzan cierto umbral debido a la exposición a un estresor, podrían modular el inmunofenotipo de la microglía y sensibilizar los mecanismos de la inmunidad innata central ante sucesivos estímulos proinflamatorios, proporcionando así una ventaja para la supervivencia. Se ha sugerido también que, la reducción en la sensibilidad glucocorticoidea observada en respuesta al estrés psicosocial agudo (Rohleder *et al.*, 2003) y al ejercicio (Derijk *et al.*, 1996) facilitaría el aumento inicial de citocinas proinflamatorias, aunque la disminución de la sensibilidad de receptores GR ha sido fundamentalmente observada tras un estrés crónico..

Por último, no hay que olvidar que las catecolaminas liberadas en situaciones de estrés pueden también afectar a la liberación de citocinas. Estos neurotransmisores tienen propiedades tanto pro- como anti-inflamatorias, independientes de NF- κ B, en función del estado de activación en el que se encuentra el sistema inmunitario (Johnson *et al.*, 2019). McNamee *et al.* (2010) demostraron que la administración in vivo de un agonista del receptor β -adrenérgico induce la producción de IL-1 β en el cerebro cuando no hay ningún reto inmunológico, pero disminuye cuando es administrado junto con la endotoxina LPS.

1.2.2.2. Estrés crónico y citocinas proinflamatorias.

Las amenazas procedentes del entorno social son, por su naturaleza, de carácter crónico y dan lugar a que la respuesta de estrés se mantenga activada durante largos periodos de tiempo, produciendo un agotamiento y una sobrecarga alostática (McEwen, 2004). En el caso de la respuesta inmunitaria, como ya hemos visto, el incremento a corto

plazo de las citocinas se presenta como una respuesta adaptativa que aumenta la supervivencia de los sujetos en situaciones en las que hubiera que afrontar las consecuencias de una herida. Sin embargo, el aumento sostenido de estas moléculas provocan una inflamación crónica, que a su vez, contribuye al desarrollo de enfermedades proinflamatorias y autoinmunes (Elenkov y Chrousos, 2002; Gouin *et al.*, 2012), además de algunas psicopatologías, como los trastornos depresivos (Brites y Fernandes, 2015; Dantzer, 2012; Furtado y Katzman, 2015). Diversos estudios han puesto en evidencia que personas sometidas a un estrés psicológico o social crónico presentan niveles elevados de marcadores inflamatorios. Así, familiares a cargo del cuidado de personas con demencia muestran niveles elevados de la citocina proinflamatoria IL-6 y de la proteína C reactiva (CRP) en plasma (Gouin *et al.*, 2012; Lutgendorf *et al.*, 1999; Mausbach *et al.*, 2011; von Kanel *et al.*, 2006). Del mismo modo, algunos estudios han encontrado una asociación entre niveles socioeconómicos bajos y niveles elevados de CRP (Deverts *et al.*, 2012; Gimeno *et al.*, 2007) y entre interacciones sociales negativas del día a día y un aumento de la actividad inflamatoria (Chiang *et al.*, 2012; Fuligni *et al.*, 2009; Marin *et al.*, 2009). Se han encontrado datos similares en estudios realizados en animales. Roedores que fueron sometidos a un estrés crónico por derrota social, mostraron niveles más elevados de TNF α (Savignac *et al.*, 2011), IL-1 β (Munshi *et al.*, 2019) e IL-6 en plasma (Munshi *et al.*, 2019; Savignac *et al.*, 2011). Esto podría ser debido a que el aumento sostenido o excesivo de los niveles de glucocorticoides producen una resistencia de los GR localizados en diferentes tipos de células (Yehuda *et al.*, 1993), incluidas las inmunitarias, dando lugar a una menor sensibilidad a los efectos antiinflamatorios de los glucocorticoides (Schleimer, 1993) y a un aumento sostenido de la inflamación (Antoni y Dhabhar, 2019).

Teniendo en cuenta que las diferentes estrategias de afrontamiento al estrés van acompañadas de una respuesta fisiológica específica, cabe esperar que el estrés produzca efectos diferentes sobre el sistema inmunitario en función de la estrategia de afrontamiento empleada por cada sujeto. Existen pocos trabajos que estudien la variabilidad individual en la secreción de citocinas ante una situación de estrés crónico. Estudios en nuestro laboratorio encontraron que los sujetos con un perfil conductual pasivo tras la derrota social crónica presentaban mayores niveles de IL-6 y de TNF- α en el bazo (Gómez-Lázaro *et al.*, 2011). Trabajos más recientes han encontrado un incremento de los niveles plasmáticos de IL-6 en aquellos ratones más susceptibles a los

efectos negativos del estrés, que se caracterizan por una mayor evitación social (Hodes *et al.*, 2014). A nivel central también se han encontrado niveles más elevados de IL-1 β en el hipotálamo e hipocampo, de IL-6 en el hipotálamo, amígdala y locus coeruleus, y de TNF- α en el locus coeruleus en roedores con estrategias pasivas sometidas a derrota social (Finnell *et al.*, 2017; Pérez-Tejada *et al.*, 2016).

CAPÍTULO 1.3.

CÁNCER Y DEPRESIÓN

1.3.1. CÁNCER.

El cáncer representa más de 200 enfermedades diferentes y actualmente es uno de los mayores problemas de salud en gran parte del mundo (Malyguine *et al.*, 2013). Su nombre proviene de “karkinos”, que significa cangrejo en griego, propuesto por Hipócrates, pero mucho antes, año 3000 a.C., ya se habían realizado las primeras descripciones de cáncer en Egipto. En 1952, Willis lo describió como *“masa anormal de tejido cuyo crecimiento excede del de los tejidos normales y no está coordinado con estos, y que persiste del mismo modo excesivo aún después de finalizar el estímulo que le dio origen”*.

La incidencia de cáncer en el año 2018 fue de 18,1 millones y se estima que en el año 2040 habrá 29,5 millones de nuevos casos en todo el mundo (Sociedad Española de Oncología Médica, 2019). A pesar de que sigue siendo una de las enfermedades más difíciles de tratar, el avance realizado durante las últimas décadas, tanto en prevención, detección y tratamiento son un punto muy positivo de cara a cumplir uno de los objetivos principales de la sanidad actual: que el cáncer deje de ser una enfermedad mortal.

1.3.1.1. Biología del tumor.

El cáncer se origina a partir células normales que aumentan su capacidad para proliferar sin control y que en algunos casos se convierten en malignas. Estas células cancerígenas crecen mediante clonación y se convierten en tumores (Lobo *et al.*, 2007). Pero el tumor es más que una masa aislada de células cancerígenas que proliferan. Son tejidos complejos compuestos por numerosos tipos celulares que participan en interacciones heterotípicas entre ellas. Además, el estroma que está alrededor del tumor, no es un testigo pasivo sino que participa activamente en la génesis del mismo. Durante las últimas décadas estas ideas han tomado fuerza, afianzando la hipótesis de que la biología del tumor no se puede entender simplemente analizando las características de las células tumorales sino que se debe incluir las implicaciones que tiene el entorno del tumor en su génesis (Hanahan y Weinberg, 2011). Para entender la biología del tumor, Hanahan y Weinberg (2011) proponen 6 características principales:

1. *Mantener la señal de proliferación.* Los tejidos normales controlan la producción y liberación de las señales que promueven el crecimiento asegurándose la

homeostasis del número de células y manteniendo la estructura y el funcionamiento normal del tejido. Las células cancerígenas, por el contrario, sufren una desregularización de la señal perdiendo así el control de su producción.

2. *Evadir los supresores de crecimiento.* Existen docenas de supresores que limitan el crecimiento y proliferación de las células mediante diferentes vías, las cuales se encuentran inactivas en numerosos cánceres.
3. *Resistir la muerte celular.* La muerte celular mediante apoptosis es una barrera natural contra el desarrollo del cáncer, y numerosos estudios han demostrado la disminución de la apoptosis celular en aquellos tumores que se desarrollan hasta alcanzar un alto grado de neoplasia y resistencia a las terapias (Adams y Cory, 2007; Lowe *et al.*, 2004)
4. *Tener una replicabilidad inmortal.* La mayoría de las líneas celulares son capaces de pasar por un número limitado de ciclos de crecimiento y división, mientras que las células cancerosas, para poder formar tumores macroscópicos requieren de un potencial de replicabilidad ilimitado.
5. *Inducir angiogénesis.* Los tumores también necesitan alimento en forma de nutrientes y oxígeno, además de poder evacuar restos metabólicos y dióxido de carbono. Para ello, se generan nuevos vasos sanguíneos asociados al tumor mediante angiogénesis. Durante el desarrollo tumoral este proceso estará activado en casi todo momento causando que el resto de la vasculatura esté en reposo para continuamente formar nuevos vasos sanguíneos alrededor del tumor que ayuden a mantener la expansión neoplásica (Hanahan y Folkman, 1996).
6. *Activar la invasión y la metástasis.* La invasión y la metástasis se da en diferentes pasos conocido como la cascada de invasión-metástasis (Fidler, 2003; Talmadge y Fidler, 2010). Comienza con una invasión local hasta que las células cancerosas invaden los vasos sanguíneos y linfáticos cercanos pasando así al sistema hematológico y linfático. Posteriormente, estas células escapan de los lúmenes de estos vasos hacia el parénquima de tejidos más alejados. Estos forman pequeños nódulos de células cancerosas y finalmente las lesiones micrometastásicas se convierten en tumores macroscópicos.

1.3.1.1.1. El melanoma maligno.

Existen muchos tipos de cánceres, y entre ellos el melanoma maligno ha sido el elegido como modelo tumoral experimental para este trabajo. Es un tumor de piel canceroso, formado por células de aspecto estrellado o dendrítico (melanocitos) que poseen la capacidad de elaborar y secretar melanina.

De todos los cánceres de piel, el melanoma es de los menos frecuentes, pero el más peligroso, especialmente cuando ya se ha extendido. Este tumor fue descrito por primera vez en 1787 por John Hunter, y desde entonces su incidencia ha ido incrementando paulatinamente en ambos sexos. Durante el año 2018 se diagnosticaron 287.723 nuevos casos de melanoma en todo el mundo, representando aproximadamente el 1,6% de los tumores, y hubo 60.712 muertes relacionadas con el melanoma (Bray *et al.*, 2018). Según los datos de la Sociedad Española de Oncología Médica (SEOM, 2017), en España durante el año 2017 se diagnosticaron 5.186 nuevos casos de melanoma, lo que supone una incidencia de 9.7 casos por 100.000 habitantes. La supervivencia ha mejorado en los últimos años, situándose en torno al 75% para los hombres y al 84% para las mujeres. Esto se debe a la precocidad de los diagnósticos más que a auténticas mejoras en el tratamiento, aunque también podría reflejar cambios poblacionales en cuanto a los hábitos de exposición solar.

A pesar de que las razones del crecimiento de este tumor no están claras, se sabe que la exposición a la luz ultravioleta podría desempeñar un papel clave en su desarrollo. Por otro lado, el riesgo de padecer un melanoma es mayor si familiares de primer grado (madre, padre, hermano/a, hijo/a) han tenido melanoma, y se ha observado que aproximadamente un 10% de todas las personas con melanoma tienen antecedentes familiares de esta enfermedad. Esto podría deberse a que estos familiares compartieron un estilo de vida de exposición frecuente al sol, que sea una familia de piel muy blanca, que haya ciertos cambios genéticos que son más frecuentes en una familia, o lo que es más probable, que haya una combinación de estos factores (American Cancer Society, 2019).

La evolución del melanoma ha suscitado gran interés entre los investigadores debido a su imprevisibilidad. Por un lado, se distingue por ser uno de los tumores más virulentos, con una diseminación rápida y evolución fatal en pocas semanas o meses, y

en cambio, en otras ocasiones puede evolucionar de manera relativamente benigna. Así, en la progresión del melanoma se reconocen tanto, tumores benignos, intermedios y completamente malignos, lo cuales son fácilmente visualizados en la piel. En consecuencia, las lesiones se suelen clasificar en un espectro cuyos extremos serían “totalmente benigno” y “totalmente maligno”, y es por ello que las lesiones intermedias presentan dificultades en su diagnóstico ya que contienen características tanto de lesiones benignas como malignas (Elder, 2016).

En el 20% de los pacientes el tumor invade tejidos blandos (piel, tejido celular subcutáneo y ganglios linfáticos) y en el 80% restante se disemina a nivel visceral (hígado, pulmón y hueso), viéndose afectado el 45% de los pacientes con metástasis a nivel del SNC durante algún momento de la evolución de la enfermedad. El tratamiento y el pronóstico varían según la etapa de desarrollo que se encuentre la enfermedad, siendo la cirugía un tratamiento efectivo en los estadios precoces. Por el contrario, el melanoma metastásico, es prácticamente una enfermedad incurable, con una supervivencia de 6-9 meses (Tsao *et al.*, 2004), donde para su tratamiento además de la cirugía, se usa la quimioterapia, radioterapia y la inmunoterapia, tanto individualmente como en diferentes combinaciones (Atallah y Flaherty, 2005).

El melanoma es especialmente inmunogénico (capaz de inducir respuesta inmunitaria mediada por células). A pesar de que el melanoma maligno supone sólo el 1,8% de todos los cánceres, cuenta con el 11% de regresiones espontáneas (entre cinco y seis veces más de lo esperado). La regresión espontánea supone la desaparición completa o parcial del tumor maligno sin ningún tipo de tratamiento y la mayoría de los datos sugieren que existe un mecanismo inmunitario implicado en la regresión del tumor. Por todo ello, la inmunoterapia es un tratamiento habitual en los casos de melanoma.

Una parte importante del sistema inmunológico tiene la capacidad de evitar por sí solo el ataque a células normales en el cuerpo mediante “puntos de control” y en ocasiones, las células del melanoma usan estos puntos de control para evitar ser atacadas por el sistema inmunológico. Por ello, la inmunoterapia, inhibe los puntos de control inmunitario haciendo que el sistema inmunológico reconozca y destruya las células cancerosas con más eficacia. Pero este tratamiento también tiene efectos secundarios, y estos pueden ser leves, como cansancio, tos, náusea, comezón, sarpullido en la piel,

disminución del apetito, estreñimiento, dolores en las articulaciones y diarrea, o graves, ya que pueden causar que el sistema inmunológico ataque a otras partes del cuerpo, conduciendo a graves problemas en los intestinos, el hígado, las glándulas productoras de hormonas, los nervios, la piel, los ojos u otros órganos. En algunas personas, estos efectos secundarios han sido fatales (American Cancer Society, 2019; Hodi *et al.*, 2014; Robert *et al.*, 2015; Scortegagna *et al.*, 2015; Topalian *et al.*, 2012; Wolchok *et al.*, 2013). Por otra parte, la administración de citocinas, como el interferón-alfa y la interleucina-2 (IL-2), pueden ayudar a reducir el tamaño de los melanomas avanzados en un 10%-20% de los pacientes cuando son usados solos, y sus síntomas secundarios pueden incluir dolencias parecidas a las que se presentan con la gripe, tal como fiebre, escalofríos, dolores, cansancio intenso, somnolencia y bajos recuentos sanguíneos (American Cancer Society, 2019).

1.3.2. CÁNCER, SISTEMA INMUNITARIO Y DEPRESIÓN.

1.3.2.1. Sistema inmunitario frente al cáncer.

La relación del sistema inmunitario en el desarrollo de tumores fue primeramente observada por William B. Coley en 1891, quien observó la remisión completa de un tumor en un paciente que presentaba una infección bacteriana. Este cirujano del hospital Memorial de Nueva York, concluyó que la infección bacteriana había instrumentado la regresión tumoral (Coley, 1893) y así se ponía en marcha la idea de que el SI podía frenar el desarrollo del cáncer. Más adelante, Ehrlich (1909) propuso que el sistema inmunitario analizaba el cuerpo y prevenía el crecimiento de carcinomas que de otro modo se daría con una alta frecuencia. En 1957 Macfarlane Burnett propuso su teoría de la inmunovigilancia del cáncer, donde apoyaba la idea de que el sistema inmunitario puede reorganizar y eliminar el tumor y proponía que antígenos nuevos específicos del tumor podían suscitar una inmunidad protectora (Burnet, 1957a, 1957b).

Actualmente, existen numerosos ejemplos que muestran cómo el sistema inmunitario es capaz de reconocer los antígenos del tumor y eliminar o controlar el crecimiento de las células cancerosas y su propagación. Como hemos visto en el apartado 1.1.2. *Sistema inmunitario*, la distinción entre lo propio y lo extraño por parte del SI, se basa en el reconocimiento de las moléculas que se encuentran en la superficie de todas las células de nuestro organismo y que se denominan Complejo Mayor de Histocompatibilidad (CMH I y CMH II). Su objetivo final es proteger al organismo de la acción bélica de su propio sistema de defensa frente a invasores extraños.

Para que ocurra una reacción inmunitaria frente al tumor, en primer lugar, las células presentadoras de antígenos (CPA) deben captar el antígeno tumoral, procesarlo en pequeños fragmentos peptídicos y re-expresarlo en la membrana celular dentro de la huella de una molécula CMH. Cuando el antígeno procesado se presenta sobre una molécula CMH-I, el complejo es reconocido por un linfocito T citotóxico CD8+, y cuando se presenta sobre una molécula CMH-II, es reconocido por el receptor de una célula T cooperadora CD4+. Los receptores de las células T (TCR) deben adecuarse tanto a la huella de la molécula CMH como al péptido que portan.

Aun así, en muchas ocasiones, los tumores son capaces de escapar del control del sistema inmunitario dando lugar al inicio y desarrollo del cáncer. Este escape de la vigilancia del sistema inmunitario es el resultado de cambios inducidos por el propio tumor sobre las mismas células cancerosas, pero también sobre los tejidos del estroma adyacentes y sobre el sistema inmunitario. Se ha visto que el cáncer utiliza diferentes mecanismos para evitar, suprimir y polarizar ambas respuestas inmunes, la respuesta “anti-tumor” innata y la adquirida, por lo que ambas respuestas estarían disfuncionales en el microentorno del tumor (Malyguine *et al.*, 2013).

Por otra parte, las células asesinas naturales (NK) poseen una capacidad de destrucción celular bien demostrada y constituyen una parte importante tanto de la inmunidad innata como de la inmunidad adquirida. Como parte del sistema de inmunidad innata tienen capacidad para sacrificar tejidos malignos, células infectadas por virus, o células injertadas incompatibles que son reconocidas como diferentes del tejido propio.

La citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (CCDA) también actúa como una herramienta importante para eliminar patógenos intracelulares y células tumorales. Para ello, las citocinas IL-1 (secretada por macrófagos) e IL-2 (secretada por linfocitos T helper 1 (Th1)), junto con el estímulo de las citocinas IL-4, IL-5 (factores estimuladores de la proliferación de células B) e IL-6 (factor diferenciador de las células B) activan las células B (Park *et al.*, 2009) y hacen que estas se diferencien y se expandan clónicamente en forma de células plasmáticas secretoras de anticuerpo (Casadevall y Pirofski, 2003), o actúen directamente sobre la célula tumoral tras reconocer, por parte del anticuerpo, las estructuras críticas para la proliferación celular (Candolfi *et al.*, 2011).

1.3.2.2. Tumor, citocinas y depresión.

El estudio de la relación entre el cáncer y la depresión ha cobrado importancia estos últimos años, ya que los resultados aportados por diferentes investigaciones han revelado datos que son difíciles de ignorar. La depresión mayor es un trastorno común entre los pacientes de cáncer, en los cuales se observa una prevalencia entre el 15% y el 30% (Cardoso *et al.*, 2016), es decir, cuatro veces mayor que en la población general

(Lutgendorf y Andersen, 2015). Además, aquellos pacientes que desarrollan síntomas depresivos tienen más hospitalizaciones y más duraderas, lo que reduce su calidad de vida y la adhesión al tratamiento (Pelletier *et al.*, 2002), y conduce a un peor pronóstico y mayor mortalidad (Satin *et al.*, 2009). Por el contrario, el tratamiento de la depresión se ha visto asociado a una mayor supervivencia en mujeres con cáncer metastásico (Giese-Davis *et al.*, 2011).

Esta relación entre el cáncer y la depresión, puede ser debida a varios factores, tales como el estrés, el estrés psicológico debido al diagnóstico, el tratamiento, etc. Sin embargo, las evidencias que indican que los síntomas pueden aparecer antes del establecimiento de un diagnóstico de cáncer (Cosci *et al.*, 2015; Schrepf *et al.*, 2015), sugieren la posibilidad de que compartan un comportamiento biológico común (Bortolato *et al.*, 2017). En las últimas décadas se ha hipotetizado sobre la activación inmune como mecanismo biológico común en ambas enfermedades (Hughes *et al.*, 2014; Jehn *et al.*, 2015; Kurz *et al.*, 2011; Lebeña *et al.*, 2014; Wei *et al.*, 2009). Además, en el microambiente de tumores sólidos, las células tumorales y no-tumorales secretan mediadores inflamatorios que promueven su propio crecimiento, desarrollo y metástasis (Santos y Pyter, 2018; Schrepf *et al.*, 2015; Sheu *et al.*, 2008; Valpione *et al.*, 2015), y que pueden comunicar con el cerebro a través de vías neuronales y humorales (Langgartner *et al.*, 2019) dando lugar a una neuroinflamación que puede influir en la conducta (Jehn *et al.*, 2015; Schrepf *et al.*, 2015).

Estudios en humanos han encontrado una estrecha relación entre factores inflamatorios y depresión en pacientes con cáncer. Por un lado, se ha observado que los enfermos de cáncer muestran elevados niveles de citocinas proinflamatorias circulantes (Jehn *et al.*, 2015; Lamkin *et al.*, 2011; Massie, 2004). Además, se ha podido establecer una correlación positiva entre conductas depresivas y los niveles de citocinas proinflamatorias en pacientes de cáncer que se someten a tratamientos de quimioterapia, los cuales conllevan un aumento de citocinas proinflamatorias (Raison y Miller, 2003). También se ha podido observar esta relación en pacientes que no se han sometido al tratamiento de quimioterapia. Así, Bouchard *et al.* (2016) encontraron una relación entre una mayor sintomatología depresiva y niveles elevados de TNF- α , IL-1 β e IL-6 en pacientes con cáncer de mama que todavía no habían sido sometidos a dicho

tratamiento. Cabe recordar que precisamente estos datos representan una de las evidencias de la hipótesis inflamatoria de la depresión.

Con la utilización de modelos animales se pretende ahondar en este conocimiento, ya que permiten la diferenciación de factores biopsicosociales y el estudio empírico de los mecanismos subyacentes. Esencialmente, los modelos de tumor en roedores son comparables a los pacientes con cáncer antes del diagnóstico. La mayoría de los estudios han encontrado un aumento en conductas de tipo-depresivas y de citocinas proinflamatorias en un amplio rango de modelos de tumor sólido. Lamkin *et al.* (2011) observaron un incremento de los niveles de la citocina IL-6 en plasma y una disminución en el consumo de sacarosa, conducta característica de la anhedonia, en ratones con cáncer de ovario. Pyter *et al.* (2009) también observaron estos mismos síntomas de anhedonia en ratas con tumores mamarios. En otros estudios realizados en nuestro laboratorio con cáncer de melanoma, se detectó un incremento en la expresión de ARNm de IL-6 y TNF- α en el hipocampo y del nivel de IL-6 en plasma, acompañado de una pérdida de peso y mayor inmovilidad en la prueba de suspensión por la cola (Tail suspensión test) (Lebeña *et al.*, 2014), características de la conducta tipo-depresiva. En la misma línea, Norden *et al.* (2015) encontraron que los sujetos inoculados con células tumorales de colon, permanecían más tiempo inmóviles en la prueba de natación forzada y mostraban niveles elevados de la expresión de la citocina IL-1 β en el hipocampo. Hay que señalar que cada vez son más abundantes las evidencias que indican que el incremento central de citocinas se debe a las citocinas periféricas producidas por las propias células tumorales, más que a las producidas por el propio huésped en presencia del tumor (Baltgalvis *et al.*, 2010; Candido y Hagemann, 2013; Norden *et al.*, 2015; Rebeca *et al.*, 2008).

1.3.3. ESTRÉS, DESARROLLO TUMORAL Y DEPRESIÓN.

Aunque no existe una clara evidencia sobre la relación entre el estrés crónico con el inicio del cáncer, numerosos estudios han encontrado una relación entre el estrés crónico y la progresión del cáncer, tanto en humanos (Palesh *et al.*, 2007; Spiegel *et al.*, 2007), como en animales (Frick *et al.*, 2009; Sommershof *et al.*, 2017; Thaker *et al.*, 2006).

Un gran número de evidencias preclínicas y clínicas apoyan la idea de que las sustancias liberadas en situaciones de estrés pueden afectar bien directa o indirectamente a la biología del tumor, a través de receptores de glucocorticoides y catecolaminas presentes tanto en células tumorales (o de su microambiente) como en células inmunitarias. Los glucocorticoides, además de producir un aumento sostenido de la inflamación (Antoni y Dhabhar, 2019), estimulan el crecimiento tumoral mediante la inhibición de la vía de las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK) que protegen las células tumorales de la apoptosis (Wu *et al.*, 2005). Por otra parte, el aumento de la transmisión adrenérgica promueve la angiogénesis, la cual estimula la producción de citocinas inflamatorias y el factor vascular de crecimiento endotelial (VEGF) (Armaiz-Pena *et al.*, 2013). Además, la activación de los receptores adrenérgicos (ADRs), que se expresan en cantidades considerables en las células tumorales y en el microentorno del tumor, puede frenar la apoptosis de las células tumorales y la reparación del ADN (Jin Shin *et al.*, 2016). Recientemente, Antoni y Dhabhar (2019), han propuesto que, los efectos que el estrés crónico tienen sobre el sistema inmunitario, como la supresión de números aspectos de la inmunidad protectora, la activación de mecanismos inmunosupresores y el incremento de la inflamación crónica, podrían incrementar la susceptibilidad al cáncer. Se ha observado que el estrés crónico puede suprimir la respuesta mediada por linfocitos T (Sephton *et al.*, 2009) y la citotoxicidad de las células NK (Lutgendorf *et al.*, 2005), y aumentar el número y reclutamiento de células T supresoras hacia el microambiente del tumor, donde suprimen la inmunidad protectora antitumoral (Boucek *et al.*, 2010; Saul *et al.*, 2005). Más recientemente, se ha considerado que la inflamación crónica inducidas por el estrés puede ser un factor crítico en el crecimiento y la progresión tumoral (Lutgendorf y Andersen, 2015), ya que aumentan el estrés oxidativo, inducen mutaciones del ADN y aumentan la liberación de diferentes factores que permiten la invasión tumoral e inducen angiogénesis y metástasis del tumor (Coussens y Werb, 2010; Il'yasova *et al.*, 2005; Lu, 2006).

Por tanto, el incremento de la inflamación inducida por el estrés psicosocial, además de aumentar la vulnerabilidad a la depresión en individuos sin enfermedad orgánica, puede afectar al desarrollo tumoral, contribuyendo a un aumento de la vulnerabilidad al desarrollo de depresión en pacientes con cáncer. Estos datos sugieren la existencia de una conexión entre diferentes vías bioconductuales, que unen estrés, depresión y progresión del cáncer mediante un mecanismo biológico común, la inflamación (Bortolato *et al.*, 2017).

Como ya hemos visto, los cambios neuroendocrinos e inmunitarios asociados a la respuesta de estrés pueden variar en función de la estrategia de afrontamiento de cada individuo y, por tanto, es de esperar que estas influyan sobre el desarrollo tumoral. Varios estudios señalan que la actitud a la hora de hacer frente al estrés puede influir sobre el curso de la enfermedad (Greer *et al.*, 1979; Temoshok, 1985). Penninx *et al.* (1998) observaron que la desesperación y la depresión podrían predecir la mortalidad en enfermos de cáncer. Esta relación entre diferencias individuales y desarrollo tumoral podría estar mediada por la actividad de las citocinas proinflamatorias. Esta hipótesis ha sido apoyada por estudios recientes, donde han encontrado que las mujeres supervivientes de cáncer de mama con estrategias más pasivas, caracterizadas por conductas de evitación y autofocalización negativa, muestran niveles más elevados de TNF α en plasma (Pérez-Tejada *et al.*, 2019). Estos datos dejan en evidencia la importancia de las intervenciones psicológicas que permitan adquirir las estrategias adecuadas que favorezcan la supervivencia. Varios meta-análisis donde se analizan diferentes estudios acerca de la influencia de intervenciones psicosociales en la supervivencia de enfermos con cáncer, encontraron que los grupos que recibieron una intervención psicosocial obtuvieron mejores resultados en términos de supervivencia en comparación a los grupos que recibieron algún otro tipo de intervención o los que no recibieron ninguna (Fu *et al.*, 2016). Estudios en animales realizados en nuestro laboratorio, mostraron que los sujetos expuestos a estrés agudo, caracterizados por altos niveles de inmovilidad y baja exploración, presentaban un mayor desarrollo tumoral (melanoma B16F10) que los sujetos activos (Vegas *et al.*, 2006). Otros estudios también han proporcionado datos similares. Por ejemplo, se encontró un mayor número de focos metastásicos grandes de tumor subcutáneo (MADS 106) en ratas caracterizadas por su pasividad en una situación de campo abierto (Sajti *et al.*, 2004) y un menor desarrollo de tumores de sarcoma

inducidos por virus en aquellos sujetos que mostraban conductas de lucha espontáneas cuando se alojaban en grupo (Amkraut y Solomon, 1972).

Entender las causas de estas diferencias individuales y sus consecuencias en términos de capacidad adaptativa y vulnerabilidad individual a patologías es uno de los mayores cambios en la investigación biomédica moderna. Esta nueva visión está dando lugar a nuevos estudios para intentar identificar los mecanismos neurales que subyacen a las diferencias en la capacidad de respuesta de los individuos al estrés, ya que pueden proporcionar nueva información sobre los mecanismos de regulación del estrés en el cerebro e identificar la fisiología de diferentes trastornos relacionados con el estrés, y, por tanto, ayudar a identificar nuevos objetivos que ayuden a mitigar los efectos negativos del estrés (McEwen, 2008).

BLOQUE II.

OBJETIVOS E HIPÓTESIS

Estudios recientes indican que el 4,4% de la población general es diagnosticada de depresión cada año (OMS, 2017), siendo esta la complicación más común en casi todas las condiciones médicas serias y enfermedades crónicas, como el cáncer (Ivbijaro, 2010). Los datos hallados en humanos vienen corroborados por estudios con animales que muestran que animales inoculados con células tumorales presentan cambios conductuales característicos de un estado depresivo (Lebeña *et al.*, 2014; Pyter *et al.*, 2009).

A pesar de la amplia investigación llevada a cabo durante las últimas décadas, la comprensión de la etiología de la depresión sigue siendo incompleta. En los últimos años se ha establecido una correlación positiva entre síntomas de depresión y niveles de citocinas proinflamatorias (Dowlati *et al.*, 2010; Haapakoski *et al.*, 2015). La relación entre depresión y cáncer, y la implicación de procesos inflamatorios en ambas patologías, explica la aparición de la denominada “hipótesis inflamatoria de la depresión” (Maes, 1995). Según esta hipótesis, la inflamación observada en presencia de células tumorales y/o en pacientes deprimidos (con o sin comorbilidad), sería la responsable de las anomalías centrales observadas en la depresión. Investigaciones realizadas hasta la actualidad han propuesto una serie de mediadores regulados por las citocinas y/o glucocorticoides, entre los que se encuentran las enzimas IDO/TDO e iNOS, como posibles mecanismos a través de los cuales, la inflamación altera la actividad del SNC y la conducta (Peng *et al.*, 2012; Qin *et al.*, 2018).

La investigación clínica y preclínica reconoce que el estrés social crónico derivado de las interacciones personales puede jugar un papel crítico en el desarrollo de trastornos depresivos, existiendo, además, numerosas evidencias que sugieren una estrecha relación entre estrés psicosocial e inflamación, tanto en humanos como en animales. Uno de los modelos animales de estrés social más utilizado es el modelo de derrota social en el que un individuo pierde la confrontación debido a la exposición ineludible a un animal coespecífico agresivo (dominante) (Hollis y Kabbaj, 2014). Varios estudios han encontrado que la derrota social induce un aumento de citocinas inflamatorias, junto a conductas tipo-depresivas (Finnell *et al.*, 2017; Hammels *et al.*, 2015). La pérdida de estatus inducida por la derrota social en animales se ha propuesto como un modelo de pérdida de autoestima y depresión en humanos (Deussing, 2006). Pero hay que tener en cuenta que no todos los sujetos que se someten a situaciones de estrés social desarrollan

patología, por lo que resulta de gran interés estudiar las diferencias individuales que harán a un sujeto más susceptible o resiliente ante situaciones de estrés social. El impacto del estrés dependerá de la manera en que el sujeto perciba, afronte y module la situación, siendo esto observable en la respuesta conductual que cada sujeto manifiesta ante una misma situación estresante. Por ello, durante las últimas décadas numerosos autores han intentado determinar y clasificar a estos animales según sus estilos de afrontamiento ante un estresor (de Boer *et al.*, 2017; Koolhaas *et al.*, 2010; Koolhaas *et al.*, 1999; Korte *et al.*, 1992) y el modelo de estrés por derrota social ha demostrado ser un modelo válido para observar las diferentes estrategias de afrontamiento, y poder así, examinar su implicación en las consecuencias fisiológicas y conductuales del estrés social crónico (Bartolomucci *et al.*, 2005; Koolhaas *et al.*, 1997; Kudryavtseva *et al.*, 1991). Estudios realizados en nuestro laboratorio han observado diferencias en la actividad inmunitaria en función de la estrategia de afrontamiento manifestadas tras una derrota social crónica (Gómez-Lázaro *et al.*, 2011; Pérez-Tejada *et al.*, 2016).

Por último, la relación entre estrés, desarrollo tumoral y citocinas inflamatorias resulta compleja, ya que los factores psicosociales pueden a su vez afectar a la progresión del cáncer (Armaiz-Pena *et al.*, 2013; Feller *et al.*, 2019; Moreno-Smith *et al.*, 2010; Payne, 2014). Estudios previos realizados en nuestro laboratorio han demostrado que el estrés social incrementa el desarrollo metastático pulmonar de melanoma B16, y apuntan a la existencia de diferencias en función de la estrategia de afrontamiento empleada (Vegas *et al.*, 2006).

Teniendo en cuenta estos datos, el objetivo general de este trabajo es analizar los efectos del estrés, tanto agudo como crónico, sobre el desarrollo tumoral, la actividad inmunitaria y neuroendocrina, y sobre la conducta tipo-ansioso/depresiva, en función de las distintas estrategias conductuales observadas en la interacción social. Se pretende también analizar los efectos del tumor y de su interacción con el estrés sobre las mismas variables inmunitarias, neuroendocrinas y conductuales.

Para abordar dicho objetivo se plantean los siguientes objetivos específicos:

1. Establecer diferentes estrategias de afrontamiento en los sujetos derrotados de forma aguda y crónica, en función de las respuestas conductuales que adoptan ante la primera confrontación social.
2. Evaluar los cambios conductuales que se puedan producir en interacción social tras 9 días de derrota social.
3. Estudiar los efectos del estrés social agudo y crónico sobre diferentes variables biológicas, en función de la estrategia de afrontamiento utilizada por los sujetos:
 - Actividad del eje HPA: analizando los niveles de corticosterona en sangre basales y los obtenidos a lo largo del experimento.
 - Actividad inmunitaria: analizando el peso del bazo y los niveles de expresión de las enzimas IDO e iNOS, y las citocinas proinflamatorias IL-6 y TNF- α en el estriado e hipocampo una vez finalizado el procedimiento experimental.
 - Nivel de expresión de la enzima TDO en el estriado e hipocampo una vez finalizado el procedimiento experimental.
4. Evaluar los efectos del estrés social agudo y crónico sobre la conducta tipo-ansioso/depresiva analizada mediante el test de preferencia de sacarosa, el test de natación forzada, la prueba de campo abierto y la prueba de interacción social, en función de la estrategia de afrontamiento utilizada por los sujetos.
5. Analizar los efectos del estrés social agudo y crónico sobre el desarrollo tumoral, en función de la estrategia de afrontamiento utilizada por los sujetos.
6. Estudiar los efectos producidos por el desarrollo tumoral y por la interacción de este con el estrés social, sobre la conducta tipo-ansioso/depresiva y las variables biológicas antes mencionadas.

Hipótesis:

En este trabajo esperamos encontrar sujetos con un patrón fisiológico y conductual diferencial para cada estrategia manifestada frente al estrés social, indicativo de una diferente vulnerabilidad al desarrollo de conductas depresivas y de metástasis tumorales. Además, esperamos que el estrés social crónico produzca mayor impacto que el estrés agudo sobre el eje HPA, el desarrollo tumoral y los marcadores inflamatorios, que será diferente en función de las estrategias de afrontamiento. Esperamos, también, que el desarrollo tumoral incremente tanto los niveles de expresión de marcadores inflamatorios, como la sintomatología tipo-ansioso/depresiva en los ratones inoculados con células tumorales B16F10.

BLOQUE III.

MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. INSTALACIONES, ANIMALES UTILIZADOS Y CONDICIONES GENERALES DE MANTENIMIENTO.

Los experimentos descritos a continuación, junto con el aprendizaje de las capacidades y técnicas necesarias para su realización, se llevaron a cabo en el laboratorio de psicobiología de la Universidad del País Vasco.

En ambos experimentos se usaron ratones macho OF1, línea no-consanguínea (Charles River, Oncins, Francia). A su llegada al estabulario, los animales fueron alojados individualmente en cajas de plástico transparentes de 24.5 x 45.5 x 15 cm³, donde permanecieron en condiciones estables de 22 ± 1°C, una humedad relativa de 55 % y un ciclo artificial de iluminación revertido, para asegurar que los ensayos conductuales se realizaran en la fase activa de los animales correspondiente al ciclo de oscuridad (12 horas de oscuridad, 07:00 - 19:00, y 12 horas de luz, 19:00 - 07:00). Para la realización de los procedimientos en la fase de oscuridad se empleó una tenue luz roja en una sala cercana. Asimismo, todos los animales tuvieron en todo momento libre acceso a agua y comida.

Todos los procedimientos de manipulación animal se llevaron a cabo respetando la Directiva Europea sobre protección de animales utilizados con fines científicos (2010/63/UE), siendo además aprobados y controlados por el Comité Ético de Bienestar Animal de la Universidad del País Vasco (CEBA) y por la Diputación Foral de Guipúzcoa (PRO-AE-SS-062).

3.2. DISEÑO EXPERIMENTAL.

3.2.1. 1ª FASE EXPERIMENTAL.

Tras el periodo de habituación (8 días), se obtuvieron muestras basales de sangre mediante punción submandibular y cuatro días después se dividieron aleatoriamente los animales (n = 123) en dos grupos en función de que fueran inoculados (n = 69) o no (n=54) con células de melanoma B16F10. Seis días después de la inoculación, ambos grupos se dividieron en otros dos subgrupos, estresados (n = 99) y no-estresados (n = 24). El grupo de los estresados (que incluía animales con tumor y sin tumor) fueron expuestos a un modelo de estrés social mediante contacto sensorial durante 24 horas (Kudryavtseva *et al.*, 1991) . Para ello, los sujetos fueron introducidos en la jaula de otro animal previamente seleccionado y entrenado para que fuese agresivo (Ver apartado 3.4.1.). Durante este tiempo se realizaron tres interacciones directas de 5 minutos y el resto del tiempo se mantuvieron separados con un separador perforado de metacrilato mediante el cual se podían oler y ver (manteniendo así el contacto sensorial), pero permanecían protegidos de ataques físicos (Ver apartado 3.4.2.1.). Tras 40 minutos de la última interacción directa (día 7, coincidiendo con el final del periodo de estrés) y 7 días después de finalizar el periodo de estrés (día 14) se obtuvieron muestras de sangre mediante punción submandibular. Para la evaluación de la conducta tipo-ansioso/depresiva se aplicaron tres pruebas: la prueba de preferencia de sacarosa (SPT), 17 días después de la inoculación; el test de campo abierto (OFT), 18 días tras la inoculación; y el test de natación forzada (FST), 21 días después de la inoculación. Tras finalizar la prueba FST, los animales fueron sacrificados y se procedió a la extracción del estriado y el hipocampo para determinar las variables biológicas (*Figura 4*).

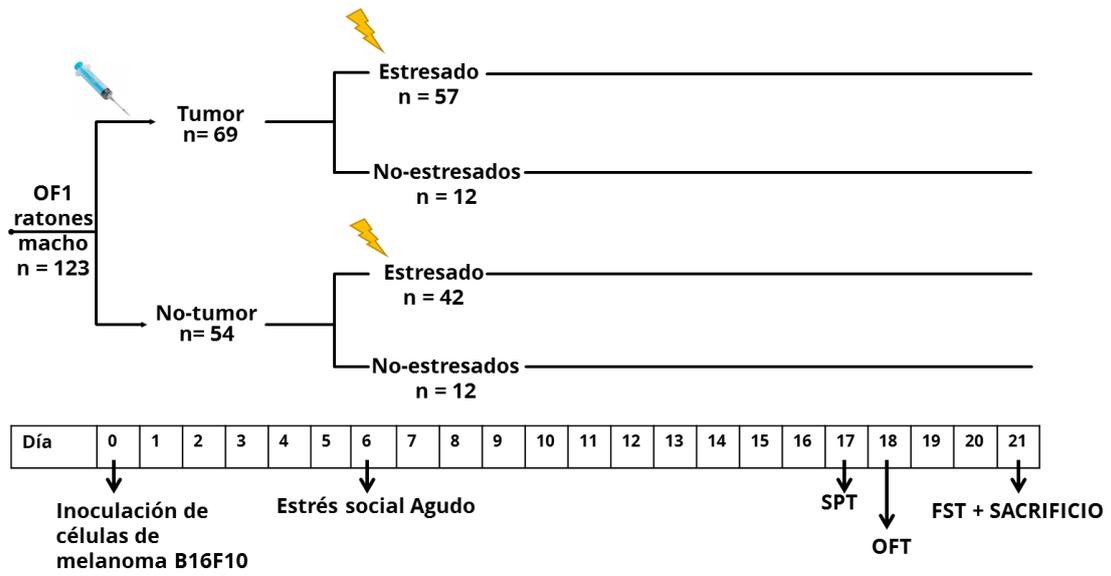


Figura 4. Cronograma del 1^a diseño experimental.

3.2.2. 2ª FASE EXPERIMENTAL.

Del mismo modo que en la 1ª fase experimental, en esta 2ª fase también se obtuvieron muestras de sangre basales tras el periodo de habituación (n = 102), y cuatro días después fueron divididos en dos grupos en función de que fueran inoculados (n=51) o no (n=51) con células de melanoma B16F10. Al día siguiente a la inoculación un subgrupo de cada grupo (grupo estresado, n = 73) se enfrentó a su primera exposición directa (5 minutos) con el animal agresivo y seguidamente tuvieron otros 5 minutos de interacción indirecta, donde el animal agresivo fue bloqueado con un contenedor perforado, permitiendo así al sujeto experimental moverse con libertad por la caja. Tras los 10 minutos de interacción, la caja se dividió en dos mitades mediante el separador perforado de metacrilato que permitía el contacto sensorial. Los animales permanecieron en estas condiciones durante 18 días (Ver apartado 3.4.2.2.). Todos los días rotaron de caja, enfrentándose así a un oponente agresivo nuevo cada día, con el cual interaccionaban de forma directa por un periodo muy breve (que finalizaba con el primer ataque) y se volvían a separar. Se realizó otra nueva interacción directa de 5 minutos, seguida por otra interacción indirecta de otros 5 minutos el día 9. El día 18 solo se llevó a cabo una interacción indirecta de 5 minutos como prueba de Interacción social (IS) (Ver apartado 3.5.4.). Todas las interacciones fueron grabadas y 40 minutos después de las mismas se obtuvieron muestras de sangre mediante punción submandibular. Los animales no-estresados (n = 29) fueron alojados individualmente durante todo el experimento. La conducta tipo-ansioso/depresiva fue evaluada del mismo modo que en la 1ª fase; SPT, el día 19; OFT, el día 20; y FST, el día 21. Entre 5 y 10 minutos después de finalizar la prueba FST se obtuvieron muestras de sangre por punción submandibular y seguidamente se procedió al sacrificio de los animales (*Figura 5*). Una vez sacrificados, se extrajeron el estriado y el hipocampo para determinar las variables biológicas.

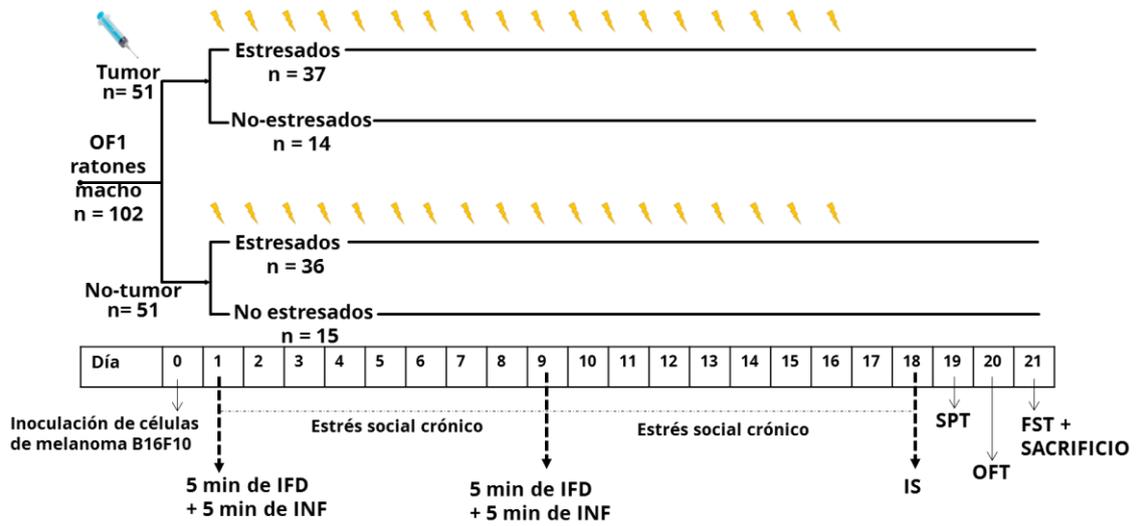


Figura 5. Cronograma del 2^a diseño experimental.

3.3. CÉLULAS DE MELANOMA B16F10

3.3.1. CULTIVO DE CÉLULAS.

Los cultivos celulares llevados a cabo durante los dos experimentos fueron manipulados dentro de una campana de flujo laminar Cultair BC 100 (Cultair S. L., Madrid, España). Las células de melanoma B16F10 se descongelaron y se mantuvieron *in vitro* a 37°C en una estufa de cultivo (Jouan, Saint Herblain, Francia), en una atmósfera humidificada al 5% de CO₂ a una concentración de 10⁵ células/ml en frascos de cultivo de 75 cm³ (Corning Inc., Corning, NY, EE.UU.) en un medio de cultivo RPMI-1640 con HEPES y L-glutamina (Lonza, Basilea, Suiza). Dada su propiedad adherente, estas células de melanoma permanecen adheridas a la base del frasco de cultivo, por ello para ser despegadas fueron expuestas a una solución de PBS al 0,02% de ácido exilien diamino tetracético (EDTA) durante 5 minutos. Inmediatamente después, se les añadió 40 ml de medio RPMI-1640 y se centrifugaron a 400 x g y a 4°C durante 5 minutos. Se eliminó todo el líquido sobrenadante y las células se volvieron a resuspender en 1ml de medio, para posteriormente contar la cantidad de células que había en 50µl y así estimar la cantidad total de células y ajustar las concentraciones a 1 x 10⁵ células/ml en el caso de seguir manteniendo el cultivo, o a 5 x 10⁵ células/ml en caso de proceder a la inoculación tumoral. Esta selección tuvo como objetivo fundamental producir un desarrollo tumoral moderado, cumpliendo con una de las sugerencias de los principios de las tres erres de la experimentación animal, el refinamiento.

3.3.2. CONTEO CELULAR.

Estos análisis se realizaron mediante una cámara cuentaglobulos Bürker (Brand, Wertheim/Main, Alemania), con un área cuadrículada de dimensiones conocidas y un microscopio invertido (Olympus CK2. Tokio. Japón). Una muestra de la suspensión celular (50µl) se diluyó en 200µl de medio (dilución 1:5) y tras resuspender esta dilución se volvieron a coger 50µl para diluirlos en otros 50µl de tinción azul tripán (dilución 1:10) (Sigma-Aldrich, Madrid, España). Por último, esta dilución fue colocada en la cámara de recuento para proceder al conteo de 3 áreas, para posteriormente obtener una media. El

azul tripán es una molécula coloreada de gran peso molecular que sólo es capaz de entrar en las células que tienen la membrana alterada, de esta manera que permite identificar y contar las células vivas (incoloras por dentro, y con bordes azules).

3.3.3. INOCULACIÓN TUMORAL.

Las células de melanoma fueron inoculadas de forma intravenosa (iv). Para ello, los animales fueron pesados y anestesiados vía intraperitoneal (ip) con Nembutal (pentobarbital sódico; 60 mg/kg). Tras asegurar una sedación completa, se procedió a la inoculación de 50.000 células de melanoma B16F10 en 0,1 ml de medio en la vena lateral de la cola, calentada previamente con una almohadilla térmica para facilitar la vasodilatación. Para la inyección se utilizaron agujas de calibre 30½. Para asegurar el éxito de la inoculación tumoral, se eliminaron del experimento a todos aquellos sujetos que habían recibido más de dos pinchazos hasta alcanzar la vena caudal o no recibieron la dosis de forma completa durante el primer pinchazo. Los animales que no fueron inoculados con tumor (grupos sin-tumor) también recibieron la misma dosis de anestesia.

3.3.4. CUANTIFICACIÓN DEL DESARROLLO TUMORAL.

Para determinar del número y área de los focos metastásicos pulmonares, tras su extracción, los pulmones fueron introducidos en una solución de Bouin que dado el componente acuoso del ácido pícrico, tiene una gran propiedad de fijación. Esto permitió destacar los focos tumorales (negros-grisáceos) sobre un fondo amarillo intenso, facilitando la determinación final del número de focos metastásicos pulmonares. Tras varios días en solución de Bouin, un lóbulo pulmonar fue separado cuidadosamente para realizar el recuento de los focos metastásicos visibles bajo una lupa binocular (Zoom Estereo Olympus SZ30) (*Figura 6*).



Figura 6. Desarrollo tumoral. Ejemplos de las imágenes obtenidas del lóbulo superior del pulmón izquierdo (anverso y reverso), de un sujeto sin desarrollo tumoral (izquierda) y otro con desarrollo de melanoma pulmonar (derecha).

3.4. MODELO DE ESTRÉS SOCIAL POR CONTACTO SENSORIAL.

3.4.1. SELECCIÓN Y ENTRENAMIENTO DE RATONES AGRESIVOS.

Los ratones que se utilizaron fueron los mismos que los experimentales, ratones machos de la cepa OF1, que, además, se caracterizan por su alto nivel de agresividad. En primer lugar, se enfrentaron parejas de ratones al azar en una caja neutra, hasta observar las primeras conductas de ataque por parte de uno de los contrincantes. Una vez establecida la jerarquía (dominantes vs sumisos), se llevó a cabo un segundo enfrentamiento, en el cual los sumisos se enfrentaron como intrusos a los dominantes, con el objetivo de registrar la latencia de ataque de estos últimos. Se establecieron tres grupos de ratones en función de la latencia de ataque; ratones que atacaban en menos de 15 segundos, ratones que tardaban más en atacar (pero siempre en menos de 1 minuto) y ratones sumisos. Con el objetivo de igualar la latencia de ataque, se llevó a cabo un entrenamiento de la agresividad de los sujetos dominantes que tardaban en atacar, que consistió en enfrentar los ratones dominantes con los sumisos siendo estos últimos los intrusos. Así, se afianzó esta conducta de ataque en todos los dominantes, con una latencia inferior a los 10 segundos, previo a la primera interacción directa con el sujeto experimental. Por lo tanto, los animales seleccionados y entrenados tenían de media 7 experiencias previas de victorias acumuladas, mientras que el grupo experimental no tenía ninguna. De esta forma, se logró homogeneizar las características del estímulo estresor agresivo, que posteriormente iba a ser utilizado como residente durante la situación de estrés social, frente a un ratón experimental.

3.4.2. ESTRÉS SOCIAL MEDIANTE EL MODELO DE CONTACTO SENSORIAL.

3.4.2.1. 1ª fase experimental (estrés agudo).

Se realizaron interacciones residente-intruso utilizando el modelo de contacto sensorial propuesto por Kudryavtseva *et al.* (1991) y modificado por Vegas *et al.* (2004). Los animales del grupo estresado se enfrentaron como intrusos a animales agresivos residentes, que habían sido previamente entrenados, durante un período de 24 horas (*Figura 7*). Durante este período de tiempo, los animales fueron sometidos a interacción física- directa (IFD) sólo en tres intervalos de 5 minutos cada uno. (8:00h-8:05h, 20:00h-20:05h y al día siguiente 8:00h-8:05h). El resto del tiempo, los animales intrusos experimentales fueron físicamente protegidos de los animales agresivos residentes mediante un separador de metacrilato perforado, que permitía que el enfrentamiento continuase de una manera sensorial-indirecta en la misma jaula del sujeto dominante. De esta manera, los ratones se olían y se veían, pero no podían agredirse, con lo cual evitamos que se produjeran heridas que pudiesen poner en marcha el sistema inmunitario e interfiriesen en los resultados. A pesar de que, durante las interacciones con el sujeto agresivo, los sujetos experimentales recibieron algunas mordeduras, la mayoría de ellos no mostraron heridas visibles. Los períodos de interacción física-directa se llevaron a cabo en una habitación contigua al estabulario, en la que las conductas manifestadas por los sujetos experimentales durante las dos primeras sesiones de 5 minutos de interacción social fueron grabadas con una cámara de video digital (JVC, GZ-MG77E). Con la introducción del separador de metacrilato terminaba la interacción directa, y los sujetos eran trasladados al estabulario para continuar en interacción sensorial-indirecta. La aplicación de este modelo de estrés por interacción social física y sensorial de 24 horas, se denominará estrés agudo como en estudios previos realizados en nuestro laboratorio, y además, en este trabajo en contraposición al modelo de estrés crónico aplicado en el segundo experimento. Aunque existe un mayor acuerdo sobre la denominación de estrés crónico, la denominación de estrés agudo incluye multitud de modelos que varían en la intensidad y tiempo de aplicación, no siendo equiparable nuestro modelo de estrés agudo a un estrés puntual.

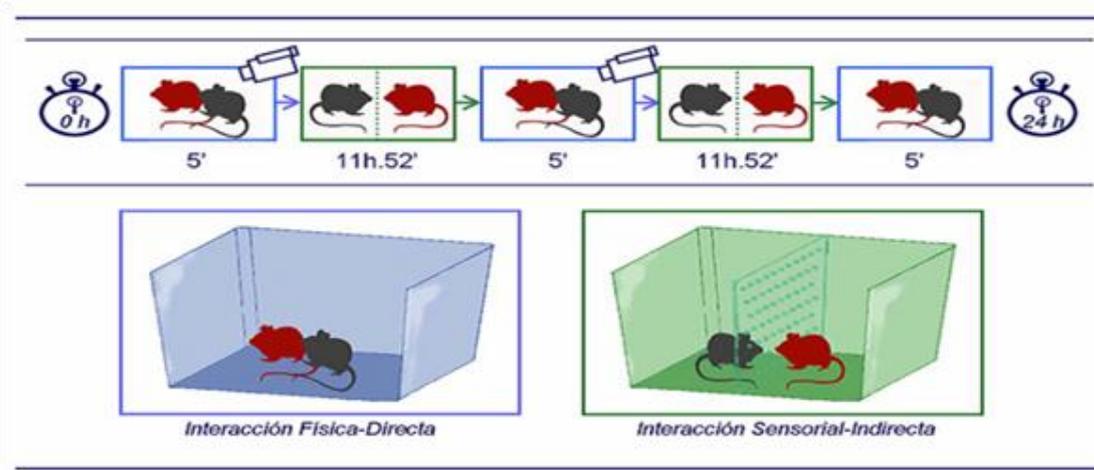


Figura 7: Representación del Modelo de Estrés Social Agudo. [Ratón rojo] Animal Experimental Intruso; [Ratón negro] Animal Agresivo Residente; [Cámara] Filmación.

3.4.2.2. 2ª fase experimental (estrés crónico).

Basándonos en el mismo modelo de estrés social por contacto sensorial utilizado para el estrés agudo, los animales sometidos a estrés permanecieron en las jaulas de los agresivos durante 18 días (Figura 8). Los animales estresados cambiaban de oponente y por lo tanto de jaula (ya que los estresados siempre eran los intrusos) todos los días. El cambio comenzaba con una IFD (entre las 8:00h – 9:00h) que se cortaba tras el primer ataque para posteriormente permanecer separados mediante la barrera perforada de metracrilato durante las siguientes 24 horas. Además, los días 1 y 9, la IFD duró 5 minutos, y tras este periodo, se volvió a registrar la conducta de los animales estresados durante otros 5 minutos en una interacción no-física (INF): los sujetos agresivos fueron cubiertos con un cubilete perforado que les impedía atacar al sujeto experimental. Así se pudo evaluar la conducta del animal experimental sin que el agresivo interfiriese sobre el mismo. Esta interacción no-física se volvió a llevar a cabo el día 18, justo antes de la finalización del periodo de estrés crónico. Del mismo modo que en el estrés agudo, las IFD y INF que fueron grabadas se llevaron a cabo en una habitación separada, mientras que las interacciones directas breves y el resto del tiempo permanecieron en el estabulario.

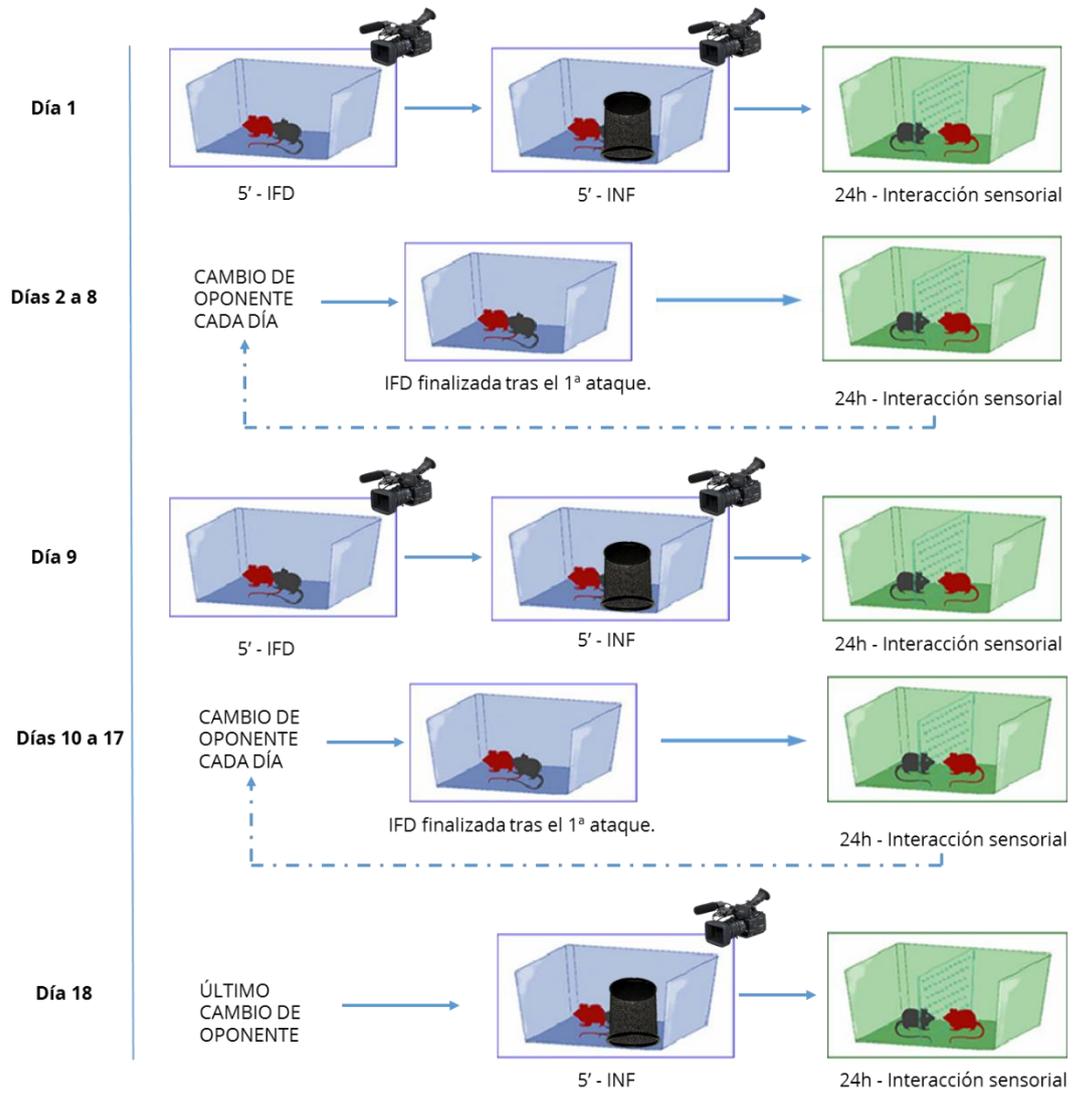


Figura 8: Representación del Modelo de Estrés Social Crónico. [Ratón rojo] Animal Experimental Intruso; [Ratón negro] Animal Agresivo Residente; [Cámara] Filmación.

3.4.3. EVALUACIÓN CONDUCTUAL Y ESTABLECIMIENTO DE LAS ESTRATEGIAS DE AFRONTAMIENTO.

Los videos de las conductas manifestadas por los sujetos experimentales durante la primera sesión de interacción física directa y de la interacción no-física (este último solo en el segundo experimento), fueron evaluadas utilizando un programa informático THE OBSERVER 14.0 (Noldus, IT, Wageningen, Holanda). Este programa permite cuantificar el tiempo que cada sujeto dedica a cada una de las categorías conductuales establecidas. La evaluación se realizó en base al etograma del ratón elaborado por el investigador Brain (1972), y detalladamente descrito por Martinez *et al.* (1998). Dicho etograma contempla 52 pautas conductuales agrupadas en 11 categorías:

1. Escarbar
2. Exploración Social
3. Exploración a Distancia
4. Ataque
5. Amenaza
6. Evitación/Huida
7. Defensa/Sumisión
8. Inmovilidad
9. Autoaseo
10. Exploración No-social
11. Conducta Sexual

En el presente trabajo se evaluaron 12 conductas, ya que la evitación y la huida fueron evaluadas como 2 conductas diferentes (para la descripción detallada de cada una de las pautas conductuales evaluadas ver ANEXO I). Una vez finalizada la evaluación conductual, se obtuvo el porcentaje de tiempo dedicado a cada una de las categorías conductuales evaluadas para utilizar como variable de análisis.

3.5. EVALUACIÓN DE LA CONDUCTA TIPO-ANSIOSO/DEPRESIVA

3.5.1. PRUEBA DE NATACIÓN FORZADA (FORCED SWIMMING TEST - FST).

La prueba FST fue llevada a cabo siguiendo el modelo descrito por Duarte *et al.* (2006). Los ratones fueron introducidos individualmente en un recipiente cilíndrico (18,5 cm de altura y 12,5 cm de diámetro) que contenía 13,5 cm de agua a $25 \pm 1^\circ\text{C}$. El agua de los recipientes fue cambiada tras cada sesión. La prueba tuvo una duración de 5 minutos, los cuales fueron grabados (JVC, GZ-MG77E) para posteriormente evaluar el tiempo que los animales dedicaron a las conductas de inmovilidad, natación y escalada utilizando la versión 14 del software Observer (Noldus, ITC, Wageningen, Holanda). Los movimientos mínimos realizados con el objetivo de mantenerse a flote también fueron considerados como un estado de inmovilidad. La conducta de natación implica movimientos activos de las patas delanteras, bien en dirección horizontal cruzando el recipiente, o bien girando en círculo (Kaster *et al.*, 2012). Por último, la conducta de escalada se considera, cuando el animal realiza movimientos verticales intentado salir del recipiente. A la hora de realizar los análisis estadísticos se tuvo en cuenta el porcentaje de tiempo dedicado a cada conducta.

Probablemente, éste modelo de depresión sea el más utilizado a la hora de estudiar la efectividad de los tratamientos antidepresivos (Duman y Monteggia, 2006). Según este paradigma, el hecho de que los ratones estén más tiempo inmóviles indica un estado de indefensión que puede ser revertido con antidepresivos (Porsolt, 2000).

3.5.2. PRUEBA DE CAMPO ABIERTO (OPEN FIELD TEST - OFT).

El test de campo abierto inicialmente fue diseñado para estudiar la defecación de los roedores como síntoma de su “emocionalidad” (Hall, 1934). Más tarde, se usó para medir los cambios conductuales inducidos por diferentes intervenciones, como la administración de psicofármacos. Posteriormente, Broadhurst (1957, 1958), determinó que los movimientos durante la prueba de campo abierto sobre todo se daban por la

motivación de los roedores explorar. En 1977, Royce, incluyó el análisis de periferia centro, y concluyó que los animales que permanecían más tiempo en el centro de la caja indicaba una conducta menos ansiosa que aquellos sujetos que permanecían más tiempo en la periferia.

La prueba se llevó a cabo tal y como describe Zomkowski *et al.* (2002), con el objetivo de evaluar la actividad locomotora de los animales. El área del campo abierto consistió en una caja de plexiglás (40 x 40 x 30 cm). Al comenzar la prueba se colocó el ratón en el centro de la caja y se le permitió explorar libremente durante 5 minutos. La conducta fue grabada para posteriormente ser evaluada con la versión 4.96 del software ANY-maze© (Stoelting Europe, Dublín, Irlanda). Con la ayuda de este software, la caja fue virtualmente dividida en dos zonas (periferia y centro) para posteriormente determinar el tiempo (seg) que cada animal permanece en cada una de las zonas. Además, se tuvo en cuenta a qué distancia (m) del centro permanecían los animales de media, la distancia (m) recorrida por cada sujeto, así como el tiempo (seg) que cada sujeto permanecía inmóvil. La caja se limpió entre los ensayos con una solución de ácido acético al 0,5%.

3.5.3. PRUEBA DE PREFERENCIA DE SACAROSA (SUCROSE PREFERENCE TEST - SPT).

El consumo de sacarosa es una prueba diseñada para evaluar la sensibilidad a la recompensa, por lo que es indicativa de la conducta anhedónica, uno de los síntomas principales de la depresión mayor (Monleon *et al.*, 1995). En este caso, se ha utilizado un paradigma de doble botella, en el cual los ratones pueden elegir entre consumir de una botella de agua y de una botella que contiene una solución de sacarosa al 1%. Con el fin de evitar cualquier preferencia de lugar, la mitad de los animales de cada grupo tuvieron la botella con sacarosa en el lado izquierdo y la otra mitad en el derecho. La prueba se realizó en la propia jaula de los ratones, los cuales no fueron en ningún momento privados de comida ni de agua. Partiendo de la diferencia entre el peso de las botellas antes y después de cada sesión, se calcularon dos variables. Por un lado, el consumo de sacarosa (g), dividido por el peso corporal de cada ratón, que se expresó como la ratio de consumo por cada gramo de peso corporal mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Consumo de sacarosa} = \frac{\text{sacarosa consumida (g)}}{\text{Peso del animal (g)}} \times 100$$

Por otro lado, se determinó la preferencia de sacarosa mediante la relación entre la ingesta de sacarosa y la ingesta de agua, calculada de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$\text{Preferencia de sacarosa} = \frac{\text{sacarosa consumida (g)}}{\text{sacarosa consumida (g)} + \text{agua consumida (g)}} \times 100$$

3.5.4. PRUEBA DE INTERACCIÓN SOCIAL (IS).

El día 18 del estrés crónico, se llevó a cabo la prueba de interacción social, donde después de la última interacción física directa se permitió a los animales estresados explorar libremente el área y a su oponente habiendo bloqueado previamente al oponente mediante un cubilete perforado. En este caso se analizó el tiempo que los animales permanecieron inmóviles y el tiempo que estos pasaban cerca del animal oponente. Para ello, se limitó un área de 15cm alrededor del oponente y se registró el tiempo que permanecían dentro y fuera de esa área.

3.6. EXTRACCIÓN DE MUESTRAS BIOLÓGICAS.

3.6.1. EXTRACCIÓN DE SANGRE.

La extracción de sangre se llevó a cabo mediante dos técnicas diferentes. Por un lado, mediante punción submandibular, la cual permite extraer muestras sanguíneas de ratones in vivo. Esta técnica, consiste en un procedimiento propuesto por Golde *et al.* (2005), como una alternativa a técnicas más agresivas y que a menudo resultan complicadas. Esta técnica permite obtener volúmenes suficientes de sangre (100-250 μ l), de una manera muy rápida, realizando una punción sobre la vena submandibular (Figura 9) con una lanceta de 5 mm (Lancetas 5mm Goldenrod, Medipoint International Inc., EE.UU). Para ello únicamente es necesario inmovilizar al animal manualmente, sin necesidad de utilizar anestesia. Por otro lado, mediante punción cardíaca. En este caso, tras la dislocación cervical, los sujetos se colocan en posición dorsal y se desinfecta el área del pinchazo, posteriormente, se introduce la aguja en el segundo o tercer espacio intercostal del lado izquierdo, coincidiendo con el ventrículo izquierdo. Esta última técnica permite obtener volúmenes de sangre mayores (1 ml aprox.) pero solo se puede realizar en el momento del sacrificio. En ambos casos, la sangre fue recolectada en tubos revestidos con heparina, los cuales se mantuvieron 1 hora a temperatura ambiente para ser posteriormente centrifugados a 3000 x g durante 15 minutos a 4°C. El plasma resultante fue transferido a un microvial que fue almacenado a -80°C hasta su procesamiento y posterior análisis.



Figura 9: Ilustración de la vena submandibular de ratón. Las venas retro-orbital (arriba) y submandibular (abajo), procedentes de la vena yugular, drenan la cara del ratón. Imagen tomada de (Golde *et al.*, 2005).

3.6.2. EXTRACCIÓN DEL CEREBRO, ESTRUCTURAS CEREBRALES Y ÓRGANOS.

En una plataforma de aluminio colocada sobre hielo en escamas a 4°C, se extrajeron los bazo y pulmones de los sujetos. Posteriormente, los animales fueron decapitados para la extracción del cerebro y se procedió a diseccionar el hipocampo y el núcleo estriado (*Figura 10*). Cada estructura extraída fue guardada en viales libres de ARN que fueron primero congelados en nitrógeno líquido, y luego almacenados a -80°C para su posterior análisis.

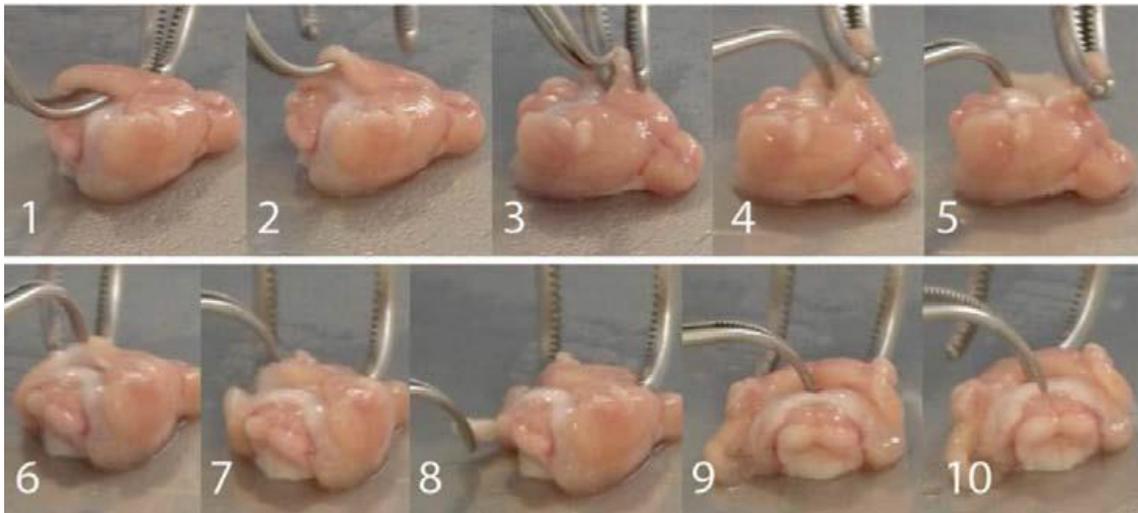


Figura 10: Ejemplo de la extracción de algunas estructuras cerebrales. En este caso, se ilustra la extracción del hipocampo. Imagen tomada de (Spijker, 2011).

3.7. ANÁLISIS DE MUESTRAS BIOLÓGICAS

3.7.1. EXPRESIÓN GÉNICA DE CITOCINAS PROINFLAMATORIAS IL-6 Y TNF- α Y DE LAS ENZIMAS IDO, TDO E iNOS EN EL CEREBRO (REAL TIME RT-PCR).

En todos los procedimientos que se describen a continuación se tomaron todas las medidas de esterilidad pertinentes con el fin de evitar la contaminación de las muestras. Así mismo, todo el material plástico utilizado está fabricado libre de ARNasa y ADNasa.

Extracción de ácido ribonucleico (ARN).

La extracción de ARN de cada estructura se llevó a cabo con el Kit NucleoSpin RNA Plus (Macherey Nagel, Alemania), con capacidad para procesar muestras de hasta 30 mg. Para empezar, se mezclaron bolas de óxido de circonio de 0,5 mm y 1 mm de diámetro en una proporción del 50%. Posteriormente, se añadieron a cada muestra una cantidad de bolas equivalente a su volumen junto con 350 μ l de buffer guanidina tiozianato y se introdujeron en el agitador Bullet Blender (BBY24M Bullet Blender Storm, Next, Advance, New York, USA), a una velocidad 8 durante 3 minutos para que las bolas rompiesen las células y homogeneizasen la muestra. A continuación, se centrifugó la muestra durante 1 minuto a 11000 x g (Microfuge 22R Centrifuge, Beckman Coulter). Tras la centrifugación se obtuvo un precipitado con dos fases. Una fase acuosa en la superficie que contiene el ARN de las muestras y una fase orgánica compuesta fundamentalmente por proteínas en el fondo. La fase acuosa de la superficie fue transferida a un nuevo tubo para eliminar el ADN genómico y se centrifugó durante 30 segundos a 11000 x g. Así, el ADN genómico se unió al filtro, mientras que el ARN fue precipitado al tubo colector. Este último fue mezclado con 100 μ l de Binding Solution y se pipeteó a un filtro con membrana de sílice, lo que hizo que el ARN se quedase unido a este filtro, mientras que el resto de material que no era ARN se precipitó al tubo, y permitió aislar el ARN. Por último, se incorporó un nuevo tubo colector al filtro de membrana de sílice, se añadieron 40 μ l de agua y se centrifugó durante 1 minuto a 11000 x g. De este modo se obtuvo el ARN disuelto en agua y las muestras fueron almacenadas a -80°C hasta el siguiente procedimiento.

Valoración de la calidad y la cantidad de ARN de las muestras procesadas por espectrofotometría.

Es recomendable conocer tanto la calidad como la cantidad del ARN obtenido antes de realizar el análisis de los ácidos nucleicos. Para ello, se depositaron 2 microlitros de cada muestra en una placa multivolumen Take 3 diseñada para la cuantificación de proteínas y ácidos nucleicos. Se introdujo la placa en un lector Synergy HT, y se analizó la cantidad de ARN mediante el programa Gen 5 1.11 (BioTek Instruments, Inc., Winooski, EE.UU). Así, se obtuvieron dos datos:

- *La calidad de las muestras:* mediante la división de los valores de absorbancia para cada longitud de onda (A_{260}/A_{280}) se obtuvo un índice que indica la calidad de nuestras muestras. Las muestras mostraron valores comprendidos entre 1,8 y 2. Índices menores indicarían la presencia de proteínas, fenol u otros contaminantes.
- *La cantidad de ARN en las muestras:* ésta fue calculada teniendo en cuenta que una unidad de absorbancia a 260 nm equivale aproximadamente a 40 mg/ml de ARN, por lo que se aplicó la siguiente fórmula para cada muestra: $(A_{260} \times 100 \times 40) / 1000 = \text{cantidad de ARN en } \mu\text{g/ml}$.

Por último, considerando que lo adecuado sería que todas las muestras partan de la misma cantidad de ARN en el proceso de amplificación, todas ellas fueron ajustadas a la misma concentración en un volumen de 8 μl utilizando la cantidad de agua libre de ARNasa y ADNasa necesaria para cada caso. La concentración elegida la determinó la muestra que presentaba menor cantidad de ARN. Finalmente, las muestras fueron almacenadas a -80°C hasta el siguiente procedimiento.

Reacción en cadena de la polimerasa en transcripción reversa.

El análisis por RT-PCR se realizó en dos etapas, primeramente, se realizó la retrotranscripción del ARN y posteriormente se realizó el proceso de amplificación, tal y como se explica a continuación. Sin embargo, antes de determinar la expresión génica es necesario seleccionar, diseñar y fabricar los cebadores o primers directos e inversos de cada gen a analizar. Para obtener la secuencia genómica de los genes a analizar se utilizó la base de datos GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank).

Una vez obtenida la secuencia, se procedió a la selección y al diseño de los cebadores utilizando el programa informático Primer Express 3.0 de Applied Biosystems. Para saber si los primers seleccionados eran específicos de cada uno de los genes a analizar se utilizó el programa BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). La fabricación de los cebadores se le encargó a Applied Biosystems. Los cebadores son entregados por la casa comercial en estado liofilizado en una concentración de 10 nM, por lo que es necesario reconstituirlos añadiendo agua libre de ARNasa y ADNasa consiguiendo una concentración final de 13 μ M.

- *Retrotranscripción del ARN*: En este proceso, parte del ARN de las muestras se transcribió a ADNc (ADN complementario). En primer lugar, se añadieron 8 μ l de las muestras a un nuevo tubo térmico especial para RT-PCR el cual contenía una mezcla compuesta por 16 μ l de tampón para el enzima retrotranscriptasa, 4 μ l del enzima Prime Script RT, 4 μ l de cebadores hexaméricos aleatorios (Random Primers), 4 μ l de cebador diseñado para iniciar la síntesis de ADNc (Oligo dT) y 44 μ l de agua libre de ADN y ARN (Takara, Madrid, España). A continuación, las muestras se introdujeron en la PCR y se puso en marcha la reacción de retrotranscripción en las siguientes condiciones: 37°C durante 15 minutos, 85°C durante 5 segundos y finalmente la muestra alcanza 4 °C, en ese momento las muestras fueron extraídas de la PCR y almacenadas a -20°C.

- *Amplificación del ADNc*: Una vez obtenido el ADNc mediante transcripción reversa, se determinó la expresión génica mediante PCR a tiempo real (PCR 7500 Real time PCR System, Applied Biosystems, Madrid, España). Para ello, se emplearon microplacas de 96 pocillos específicas para PCR y en cada pocillo se añadieron 25 μ l de la siguiente reacción: 9 μ l de agua libre de ARNasa y ADNasa, 12,5 μ l de QuantiTect SYBR Premix Ex Taq II como fluorocromo (Takara, Madrid, España), 0,5 μ l del fluorocromo ROX utilizado para normalizar la señal, 0,5 μ l del cebador directo y 0,5 μ l del cebador inverso, ambos específicos de cada gen analizado. Una vez completada la placa, se añadieron 2 μ l del ADNc de cada una de las muestras por triplicado. La placa fue sellada y centrifugada a 400 x g durante 3 minutos a temperatura ambiente. Tras la centrifugación, la placa se introdujo en la PCR y se dio comienzo al proceso de amplificación (*Figura 11*). Las condiciones de tiempo y temperatura utilizados fueron las mismas para todos los genes, excepto la temperatura de fusión (T_f) que es específica para cada gen. Así, las condiciones de amplificación fueron las siguientes: un primer ciclo de

30 segundos a 95°C, a continuación 40 ciclos de amplificación (5 segundos a 95°C, 34 segundos a Tf) y por último una fase para obtener la curva de fusión o melt curve (15 segundos a 95°C, un minuto a Tf y 15 segundos a 95°C).

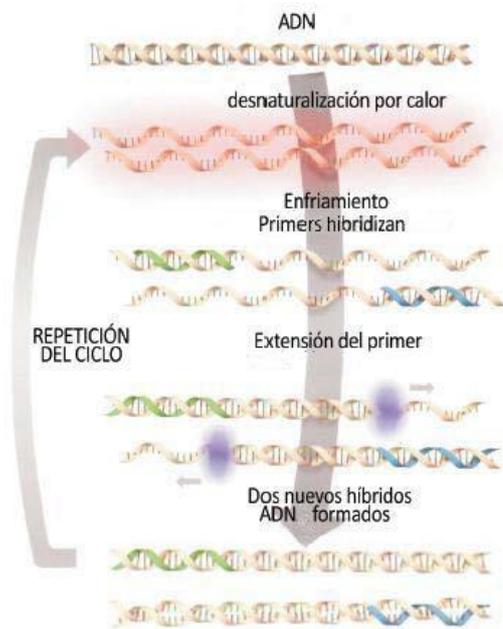


Figura 11. Amplificación del ADN en la PCR.

Siguiendo este protocolo, se determinó la expresión génica de los siguientes genes: IL-6, TNF- α , IDO, TDO e iNOS (Tabla 1). El GAPDH (gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa) y el HPRT (hipoxantina-guanina-fosforribosil-transferasa) se utilizaron como genes endógenos de control para todas las muestras.

Tabla 1.
Secuencia de los cebadores utilizados para la amplificación de los genes.

Gen	Descripción	Secuencia del cebador (5'-3')	GenBank n°
IL-6	Interleucina 6	F: GCCAGAGTCCTTCAGAGA R: CCTTAGCCACTCCTTCTGT	NM_031168.1
TNF α	Factor de Necrosis Tumoral Alfa	F: ACGTGGAAGTGGCAGAAGAG R: TGCCACAAGCAGGAATGAGA	NM_013693.2
iNOS	Óxido Nítrico Sintasa Inducible	F: GGATCTTCCCAGGCAACCA R: CAATCCACAACTCGCTCCAA	NM_010927.3
IDO	Indoleamina 2,3-dioxigenasa	F: AAAGCAATCCCCACTGTATCCA R: TGCCTTTTCCAATGCTTTCAG	BC049931.1
TDO	Triptófano 2,3-dioxigenasa	F: CGATCCAGGTCCCTTTC R: AGCCTTGGTGCCCAGCAT	
GAPDH	Gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa	F: CGGCCGCATCTTCTTG R: GTGACCAGGCGCCCAATAC	NM_008084.2
HPRT	Hipoxantina-guanina-fosforribosil-transferasa	F: TGGGAGGCCATCACATTGT R: TCCAGCAGGTCAGCAAAGAAC	NM_013556.2

Valoración de los resultados

La medida de la expresión génica del ARNm por medio de RT-PCR es una cuantificación relativa que se sustenta en la comparación entre el nivel de expresión del gen a estudiar y los genes endógenos de control. Para determinar la expresión relativa de los genes, se tuvieron en cuenta los valores de Ct correspondientes a la cantidad de ciclos necesarias para un incremento significativo de fluorescencia durante la reacción, y los datos obtenidos se procesaron mediante la aplicación del método $2^{-\Delta\Delta t}$ (Livak eta Schmittgen, 2001).

3.7.2. DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE CORTICOSTERONA EN PLASMA (ELISA).

La determinación de los niveles de corticosterona en plasma se realizó utilizando el kit comercial de ensayo inmunoenzimático competitivo DetectX de Arbor Assays (AntibodyBcn, Barcelona, España), tipo “sándwich” (ELISA). Cada kit contiene una placa de 96 pocillos pre-tratada con un anticuerpo policlonal de oveja específico para corticosterona. El ensayo fue llevado a cabo de acuerdo con las instrucciones recomendadas por el fabricante y únicamente fueron utilizados los reactivos que proporciona el kit, los cuales fueron estabilizados a temperatura ambiente 15 minutos antes de ser utilizados.

Preparación de los reactivos, los estándares y las muestras.

El tampón de ensayo fue previamente diluido, añadiendo una parte del mismo por cada cuatro partes de agua desionizada (dilución 1:5). Así mismo, el tampón de lavado también fue diluido añadiendo una parte de este por cada diecinueve partes de agua desionizada (dilución 1:20).

Para generar la curva estándar, el kit proporciona un vial de solución stock de corticosterona con una concentración de 200.000 pg/ml, a partir del cual, se prepararon 5 rangos de concentraciones: 20.000 pg/ml, 4.000 pg/ml, 800 pg/ml, 160 pg/ml y 22 pg/ml. Las muestras se diluyeron a una concentración de 1:300, para ello, se añadió 1 µl de muestra en 299 µl de buffer (Tris Buffered Saline).

Adición de la curva estándar y las muestras.

Primeramente, se diseñó la placa teniendo en cuenta el número de pocillos necesarios en función de la cantidad de muestras, estándares, pocillos de máxima unión (B0 - 0 pg / ml) y pocillos de unión no específica (NSB). De esta forma, se tuvieron identificados todos los pocillos durante todo el proceso. Se añadieron por duplicado 100 µl de cada uno de los estándares y de las muestras en sus pocillos correspondientes. Posteriormente, se pipetearon por duplicado 50 µl de tampón de ensayo en los pocillos NSB y 50 µl en los pocillos B0. Estos pocillos sirvieron de controles de la capacidad de unión de la corticosterona.

Incubación con el conjugado y el anticuerpo de corticosterona.

Una vez añadidas las muestras, los estándares y los controles, se añadieron 50 μ l del conjugado de corticosterona (corticosterona peroxidasa conjugada en una solución estabilizadora) a cada pocillo, utilizando una pipeta multicanal. Finalmente, se añadieron 50 μ l del anticuerpo policlonal de corticosterona a cada pocillo, excepto los pocillos NSB, para dar inicio a la unión. Posteriormente, la placa fue sellada y agitada durante una hora a temperatura ambiente en un agitador de placas a \sim 500 rpm (Minishaker, IKA). Durante este periodo de incubación, se produce el llamado “sándwich” anticuerpo-antígeno-anticuerpo.

Lavado y adición del sustrato.

Tras el periodo de incubación, todos los pocillos fueron lavados cuatro veces con 300 μ l de tampón de lavado. Tras el último lavado, la placa fue escurrida sobre papel absorbente y se añadieron 200 μ l del sustrato p-Npp (fosfato p-nitrofenol) en cada pocillo, el cual reacciona con el conjugado de corticosterona peroxidasa unido. Posteriormente, la placa fue incubada durante 30 minutos a temperatura ambiente.

Detención y revelado de la reacción enzimática.

Tras este último periodo de incubación, se añadieron 50 μ l de una solución de fosfato trisodio a todos los pocillos para detener la reacción enzimática. Seguidamente, la placa fue leída con un lector de placas Synergy HT micro-placa (Bio-Tek Instruments, Inc., Winooski, VE., EE.UU) con un filtro de absorbancia de 450 nm de longitud de onda, con el objetivo de detectar la intensidad del color generado por cada pocillo y obtener la densidad óptica (DO).

Valoración de los resultados.

En primer lugar, se calcularon las medias de las Dos de los pocillos duplicados para cada uno de los estándares, muestras y controles. A estas DO medias se les sustrajo la DO media de los pocillos NSB. Posteriormente estos valores fueron divididos por la DO media de los pocillos B0 y multiplicados por 100 (%B/B0). Con estos valores, se creó una curva estándar que tenía en consideración la concentración de corticosterona y el

porcentaje de unión según la DO. De tal forma que, a mayor porcentaje de unión, menor concentración de corticosterona y menor DO media. Partiendo de esta curva logística, se calcularon las concentraciones de corticosterona de cada una de las muestras con la ayuda de la aplicación online My assays (www.myassays.com/arbor-assays-corticosteroneenzyme-immunoassay-kit.assay). Posteriormente, los valores obtenidos fueron multiplicados por el factor de dilución de las muestras (1:100) y convertidos a ng/ml.

3.8. ANALISIS ESTADÍSTICOS

Previo al análisis de los datos correspondientes a cada experimento, se examinaron todas las variables dependientes con el objetivo de descartar valores atípicos y distribuciones no normales. Todos los análisis que se presentan a continuación se llevaron a cabo con el programa de análisis estadísticos SPSS 24.0 para Windows XP (SPSS Inc., Chicago, Illinois, EE.UU). En todos los casos se consideró un valor de $p \leq 0,05$ como estadísticamente significativo y se obtuvo el tamaño del efecto mediante la d de Cohen ($d = 0.2$: pequeño; $d = 0.5$: mediano; $d = 0.8$: grande) cuando se comparaba 2 grupos, y la ETA parcial al cuadrado ($\eta_p^2 = 0,01$: pequeño; $\eta_p^2 = 0.059$: mediano; $\eta_p^2 = 0.138$: grande) para los análisis factores con más de 2 categorías, interacciones y medidas repetidas. También se tuvieron en cuenta aquellos resultados que teniendo un p cercana a la significación ($p < 0.70$), obtenían un tamaño del efecto mediano grande (d de Cohen > 0.7 o $\eta_p^2 > 0.100$).

Para el establecimiento y caracterización de las estrategias de afrontamiento del estrés social crónico se realizó una combinación de análisis clúster y análisis discriminante. Para el análisis clúster se aplicó el Método de conglomeración de Ward. Con el objetivo de estudiar y confirmar la bondad de los clústeres obtenidos se realizaron un análisis de la varianza (ANOVA) de un factor y un análisis discriminante utilizando el método de inclusión por pasos Lambda de Wilks. Además, mediante un análisis de Chi-cuadrado se analizó la distribución de los sujetos en las diferentes estrategias (AA, ANA y PR) en función del tumor (tumor y no-tumor) y se obtuvo el tamaño del efecto mediante V de Cramer (V de Cramer = 0.00 - 0.01 insignificante; 0.10-0.20 débil; 0.20-0.40 moderado; 0.40-0.60 relativamente fuerte; 0.60-0.80 fuerte; 0.80-1.00 muy fuerte).

Para determinar si el estrés influyó sobre el desarrollo tumoral, se llevó a cabo un ANOVA de un factor en el cual el factor estrés agudo y crónico (estresados vs. no-estresados) constituyeron el factor intersujeto. Para el resto de variables conductuales y fisiológicos se usó un ANOVA de dos factores en el cual el tumor (tumor vs. no-tumor) y el estrés (estresados vs. no-estresados) constituyeron los factores intersujetos. Además, mediante este análisis se pudo establecer si existía una interacción entre estas variables: tumor x estrés, y posteriormente analizar las posibles diferencias entre los subgrupos (estresados con tumor / estresados sin tumor / no estresados con tumor / no estresados

sin tumor) mediante el análisis post hoc Tukey. Las posibles diferencias entre las estrategias de afrontamiento en las variables conductuales y fisiológicas se determinaron mediante un ANOVA de un factor en el cual las estrategias (NE vs. AA vs. ANA vs. PR) constituyeron el factor intersujeto. En el caso de que el análisis resultara significativo, se procedía a analizar las diferencias entre los cuatro grupos experimentales a través de la prueba post hoc HSD de Tukey para comparaciones múltiples. En el caso de encontrar diferencias significativas del factor tumor, se realizaron análisis independientes tanto en el grupo de animales con tumor como en el sin tumor en función de las estrategias. En el caso de la corticosterona y el peso corporal, se realizó un ANOVA de tres factores (tiempo x estrés x tumor) o dos factores (tiempo x estrategias) con medidas repetidas. Además, se realizaron análisis de correlaciones bivariadas de Pearson para estudiar las posibles relaciones entre los niveles de corticosterona con el desarrollo tumoral y con los niveles de TDO, y entre las enzimas IDO e iNOS y las citocinas. Se consideraron aquellos resultados que mostraron una $p < 0.05$ junto a una $r > 0.300$.

Por último, para las representaciones gráficas, se utilizaron los valores de la media \pm el error estándar de la media (E.E.M).

BLOQUE IV.

RESULTADOS

1° EXPERIMENTO

4.1.1. ANÁLISIS DE LAS DIFERENCIAS INDIVIDUALES EN EL AFRONTAMIENTO CONDUCTUAL DEL ESTRÉS SOCIAL.

Teniendo en cuenta que sólo el grupo de sujetos estresados es susceptible de ser evaluado y analizado conductualmente, se procedió a agrupar a los sujetos en función de las características conductuales manifestadas durante la primera interacción directa de 5 minutos. Para ello, se realizó un análisis clúster utilizando el porcentaje medio de tiempo dedicado a cada una de las conductas evaluadas y se obtuvieron tres grupos o conglomerados de sujetos, clúster 1, clúster 2 y clúster 3, con diferentes características conductuales. Para conocer las diferencias que presentan las variables conductuales en cada uno de los clústeres obtenidos, se realizó un análisis de la varianza (Figura 12). Todas las conductas mostraron diferencias significativas entre al menos dos grupos:

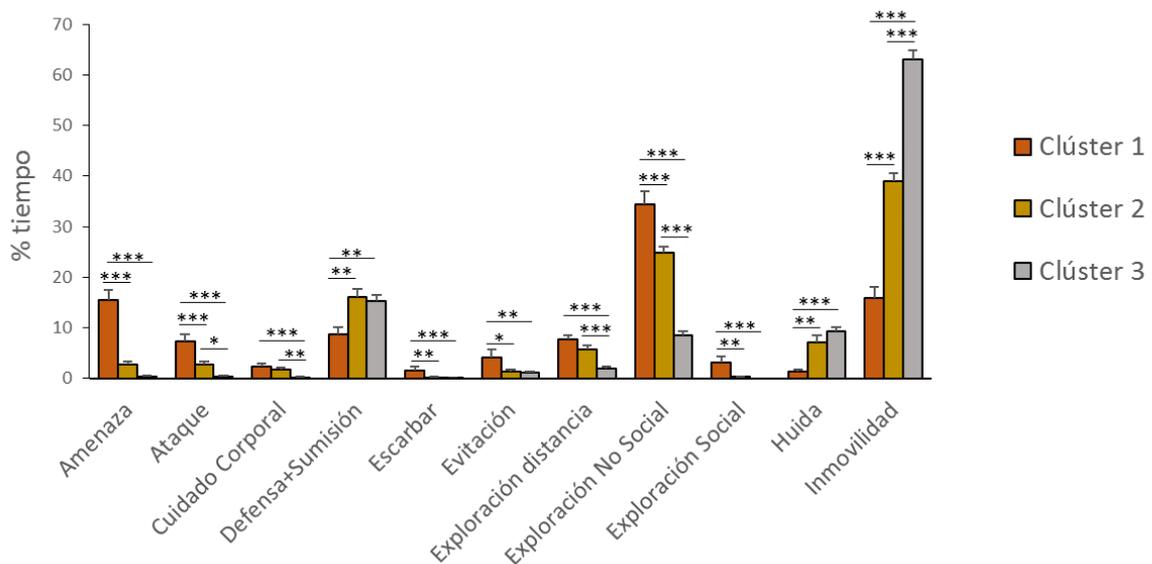


Figura 12. Porcentajes medios (\pm E.E.M.) de tiempo que dedican a cada conducta durante la primera interacción física directa, mediante los cuales se ha realizado la clasificación de los sujetos en el primer experimento. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

Para confirmar la validez estadística de los dos grupos obtenidos y determinar las variables conductuales más eficientes a la hora de discriminar entre ambos grupos, se aplicó un análisis discriminante utilizando el método *Lambda de Wilks* de inclusión por pasos. La conducta de inmovilidad resultó ser la variable conductual que mejor discriminaba entre los grupos, ya que fue la primera en ser seleccionada para su inclusión en el modelo discriminante. En las fases posteriores del procedimiento por pasos, el modelo explicativo fue incluyendo sucesivamente las conductas de

defensa/sumisión, exploración no social, exploración social, amenaza y escarbar, incrementando así la discriminación entre los grupos. El resto de conductas no fueron incluidas dentro del modelo explicativo debido a que no contribuyeron significativamente en esa discriminación, en función de los valores *Lambda de Wilks* (Tabla 2).

Tabla 2.
Resumen del análisis discriminante.

VARIABLES INCLUIDAS EN EL ANÁLISIS	ETAPA	LAMBDA	F PARA ENTRAR	SIGNIFICACIÓN
Inmovilidad	1	0,229	161,653	<0,001
Defensa/sumisión	2	0,157	72,266	<0,001
Exploración no-social	3	0,127	56,479	<0,001
Exploración social	4	0,114	45,501	<0,001
Amenaza	5	0,093	41,973	<0,001
Escarbar	6	0,085	36,906	<0,001

Nota. En cada etapa se introduce la variable que minimiza la Lambda de Wilks Global. La Lambda de Wilks es un estadístico que expresa el poder de discriminación del modelo. Su valor está comprendido entre 0 y 1. Un valor de Lambda cercano a cero significa poder perfecto de discriminación.

Esta función discriminante también fue utilizada para confirmar la validez de los clústeres obtenidos. Así, las estimaciones del modelo discriminante aplicado coinciden en el 97 % de los casos con la clasificación realizada por el análisis de conglomerados jerárquicos (Tabla 3).

Tabla 3.
Matriz de clasificación para el análisis discriminante.

	n real	Clúster de pertenencia pronosticado			% correctos
		Clúster 1	Clúster 2	Clúster	
Clúster 1	19	18	1	0	94.7
Clúster 2	35	2	33	0	94.3
Clúster 3	45	0	0	45	100

Una vez confirmada la descripción de los grupos mediante el análisis de la varianza y la función discriminante, procedimos a caracterizar los dos grupos de la siguiente manera (Figura 12):

- **Clúster 1, Activos/agresivos (AA)** (n=19: Tumor=13; No-tumor=6). Agrupa a los sujetos que frente a un oponente agresivo responden fundamentalmente con conductas de exploración (exploración no-social, exploración social y exploración a distancia) y agresividad (ataque y amenaza), mientras que dedican muy poco tiempo a las conductas de defensa/sumisión, huida e inmovilidad.

- **Clúster 2, Activos/no-agresivos (ANA)** (n=35: Tumor =;22 No-tumor=13). Agrupa a los sujetos que reaccionan con conductas de exploración (exploración no-social y exploración a distancia), altos niveles de defensa/sumisión y huida, y niveles intermedios de inmovilidad.
- **Clúster 3, Pasivos/reactivos (PR)** (n=45; Tumor=22; No-tumor=23). Agrupa a los sujetos que responden fundamentalmente con conductas de defensa/sumisión, huida e inmovilidad y que dedican muy poco tiempo a la exploración (exploración no-social, exploración social y exploración a distancia).

Cabe aclarar que el análisis estadístico Chi-cuadrado no mostró diferencias estadísticamente significativas en la distribución de los sujetos en las diferentes estrategias de afrontamiento en función del tumor ($X^2(2) = 2.705, p = 0.259; V \text{ de Cramer} = 0.165$).

4.1.1. EFECTO DEL ESTRÉS AGUDO Y DE LAS ESTRATEGIAS DE AFRONTAMIENTO AL ESTRÉS SOBRE EL DESARROLLO TUMORAL.

Con el objetivo de determinar los efectos del estrés agudo y de las estrategias de afrontamiento al estrés sobre el desarrollo tumoral (número de focos tumorales) 21 días después de la inoculación de las células, se realizó el análisis de varianza de un factor, el cuál no mostró diferencias significativas en función del estrés agudo ($F_{[1,67]}=0.018$; $p=0.894$; d Cohen=0.03) (Figura 13a), ni tampoco en función de las estrategias de afrontamiento al estrés ($F_{[3,65]}=0.896$; $p=0.448$; $\eta_p^2=0.002$) (Figura 13b).

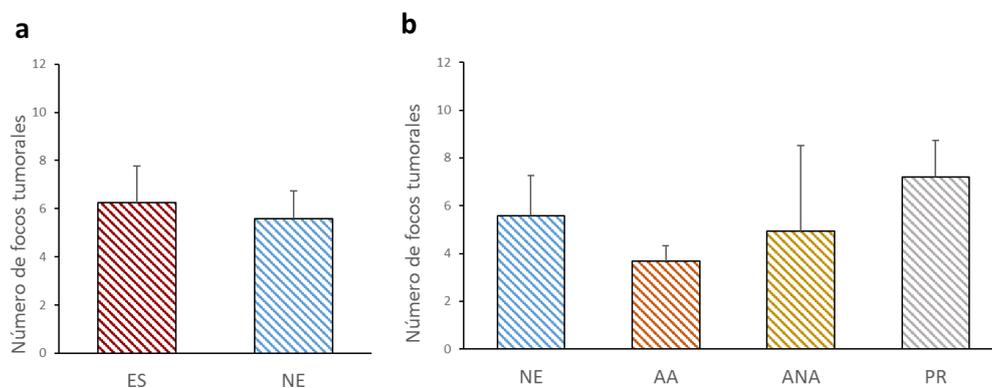


Figura 13. Valores medios (\pm E.E.M.) del número de focos tumorales encontrados de los sujetos estresados (ES) y no-estresados (NE) (a); y los animales no-estresados (NE) junto con los sujetos estresados clasificados en diferentes estrategias de afrontamiento: activos/agresivos (AA), activos/no-agresivos (ANA) y pasivos/reactivos (PR) (b).

4.1.2. ESTUDIO DEL ESTRÉS AGUDO SOBRE LA CONDUCTA ANSIOSO/DEPRESIVA EN ANIMALES INOCULADOS Y NO-INOCULADOS CON MELANOMA B16F10

4.1.2.1. Efecto del tumor, del estrés agudo y de las estrategias de afrontamiento al estrés sobre la preferencia de sacarosa.

El análisis de varianza con dos factores (tumor x estrés agudo) no mostró diferencias significativas en la preferencia de sacarosa ni del factor tumor ($F_{[1,119]}=0.234$; $p=0.629$; d Cohen=0.15), ni del factor estrés agudo ($F_{[1,119]}=0.877$; $p=0.351$; d Cohen=0.24), ni una interacción entre el tumor y estrés agudo ($F_{[1,119]}=3.461$; $p=0.065$; $\eta_p^2=0.028$). Además, el análisis post hoc no reveló diferencias significativas entre ninguno de los subgrupos. Al desglosar los estresados en estrategias de afrontamiento, tampoco se observaron diferencias en la preferencia de sacarosa ($F_{[3,119]}=0.864$; $p=0.462$; $\eta_p^2=0.016$).

En cuanto al consumo de sacarosa, tampoco se encontraron diferencias ni del factor tumor ($F_{[1,119]}=0.031$; $p=0.862$; d Cohen=0.06), ni del factor estrés agudo ($F_{[1,119]}=0.482$; $p=0.489$; d Cohen=0.16), ni una interacción entre el tumor y estrés agudo ($F_{[1,119]}=0.631$; $p=0.429$; $\eta_p^2=0.005$). Además, el análisis post hoc no reveló diferencias significativas entre ninguno de los subgrupos (*Figura 14a*). En este caso tampoco se encontraron diferencias en el consumo de sacarosa en función de la estrategia de afrontamiento ($F_{[3,119]}=0.705$; $p=0.551$; $\eta_p^2=0.010$) (*Figura 14b*).

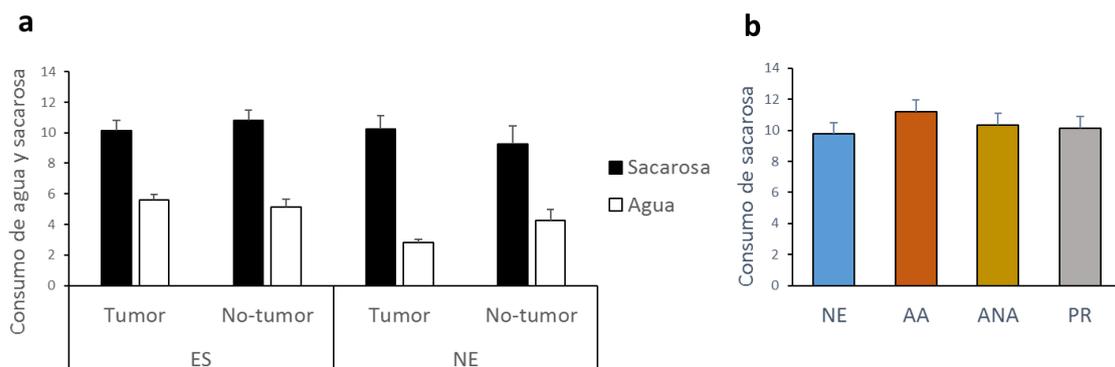


Figura 14. Porcentaje medio (\pm E.E.M.) de la sacarosa (g) y agua consumida (g) de los sujetos estresados (ES) con tumor y sin tumor, y de los sujetos no-estresados (NE) con tumor y sin tumor (**a**); y consumo de sacarosa los animales no-estresados (NE) junto con los sujetos estresados clasificados en diferentes estrategias de afrontamiento: activos/agresivos (AA), activos/no-agresivos (ANA) y pasivos/reactivos (PR) (**b**).

4.1.2.2. Efecto del tumor, del estrés agudo y de las estrategias de afrontamiento al estrés sobre la conducta en la prueba de natación forzada (FST).

El análisis de varianza de dos factores no mostró diferencias significativas en ninguna de las conductas del FST ni en función del tumor (inmovilidad: $F_{[1,116]}=0.192$; $p=0.662$; d Cohen=0.02 / natación: $F_{[1,116]}=0.543$; $p=0.463$; d Cohen=0.08 / escalada: $F_{[1,116]}=0.256$; $p=0.614$; d Cohen=0.03), ni del estrés agudo (inmovilidad: $F_{[1,116]}=0.586$; $p=0.445$; d Cohen=0.17 / natación: $F_{[1,116]}=1.982$; $p=0.162$; d Cohen=0.33 / escalada: $F_{[1,116]}=0.077$; $p=0.782$; d Cohen=0.03), ni una interacción entre el tumor y el estrés agudo (inmovilidad: $F_{[1,116]}=0.276$; $p=0.600$; $\eta_p^2=0.002$ / natación: $F_{[1,116]}=0.270$; $p=0.604$; $\eta_p^2=0.002$ / escalada: $F_{[1,116]}=0.013$; $p=0.911$; $\eta_p^2=0.001$). Además, el análisis post hoc no reveló diferencias significativas entre ninguno de los subgrupos (Figura 15).

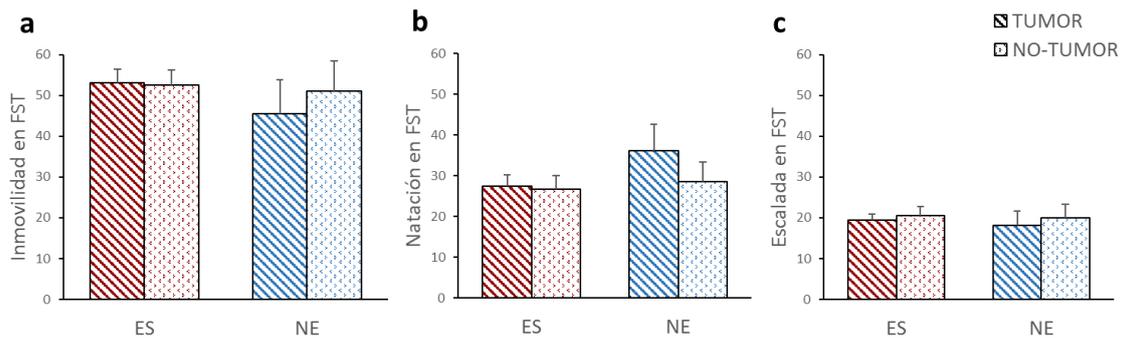


Figura 15. Porcentaje medio (\pm E.E.M.) de tiempo dedicado a la inmovilidad (a), natación (b) y escalada (c) en el test de natación forzada de los sujetos estresados (ES) con tumor y sin tumor, y de los sujetos no estresados (NE) con tumor y sin tumor.

Al desglosar los estresados en estrategias de afrontamiento, tampoco se observaron diferencias en el tiempo dedicado a cada conducta de FST (inmovilidad: $F_{[3,116]}=1.749$; $p=0.161$; $\eta_p^2=0.039$ / natación; $F_{[3,116]}=1.959$; $p=0.124$; $\eta_p^2=0.045$ / escalada: $F_{[1,116]}=0.435$; $p=0.729$; $\eta_p^2=0.008$) (Figura 16).

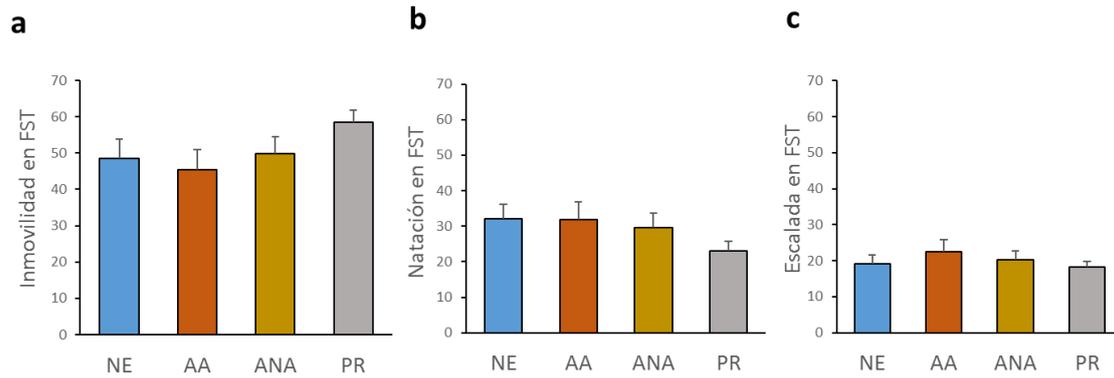


Figura 16. Porcentaje medio (± E.E.M.) de tiempo dedicado a la inmovilidad (a), natación (b) y escalada (c) en el test de natación forzada los animales no-estresados (NE) junto con los sujetos estresados clasificados en diferentes estrategias de afrontamiento; activos/agresivos (AA), activos/no-agresivos (ANA) y pasivos/reactivos (PR).

4.1.2.3. Efecto del tumor, del estrés agudo y de las estrategias de afrontamiento al estrés sobre la conducta en la prueba de campo abierto (OFT).

El análisis de varianza de dos factores no mostró diferencias significativas en el tiempo que los animales transcurren inmóviles ni del factor tumor ($F_{[1,118]}=1.911$; $p=0.169$; d Cohen=0.02), ni del factor estrés agudo ($F_{[1,118]}=0.276$; $p=0.601$; d Cohen=0.13). Sí se encontró una interacción entre las variables tumor y estrés agudo con un tamaño del efecto pequeño ($F_{[1,118]}=5.319$; $p=0.023$; $\eta_p^2=0.043$), sin embargo, el análisis post hoc no reveló diferencias significativas entre ninguno de los subgrupos (Figura 17a). Al desglosar a los estresados en las estrategias, el análisis de varianza de un factor no mostró diferencias en el tiempo que los animales permanecían inmóviles ($F_{[3,118]}=0.397$; $p=0.755$; $\eta_p^2=0.008$) (Figura 17b).

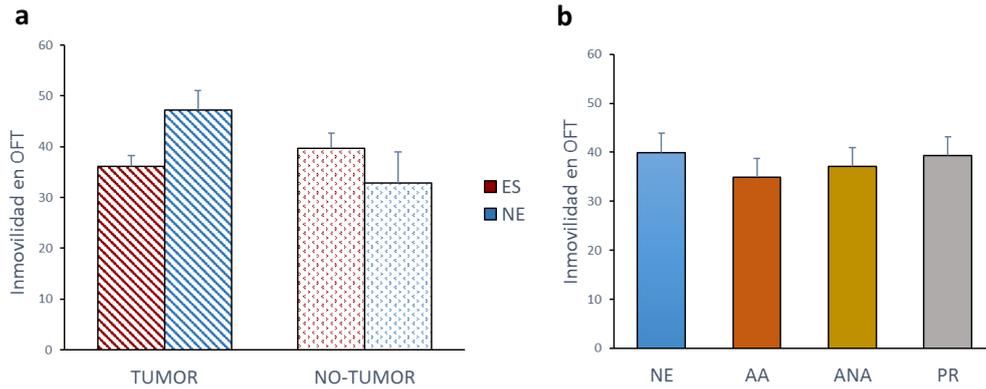


Figura 17. Promedio (\pm E.E.M.) de tiempo (seg) inmóvil de los sujetos estresados (ES) con tumor y sin tumor, y de los sujetos no-estresados (NE) con tumor y sin tumor (a); y los animales no-estresados (NE) junto con los sujetos estresados clasificados en diferentes estrategias de afrontamiento: activos/agresivos (AA), activos/no-agresivos (ANA) y pasivos/reactivos (PR) (b).

Los resultados son muy parecidos cuando analizamos la distancia recorrida. El análisis de varianza de dos factores (tumor \times estrés agudo) indicó que no había diferencias ni del factor tumor ($F_{[1,118]}=1.913$; $p=0.169$; d Cohen=0.04), ni del factor estrés agudo ($F_{[1,118]}=0.679$; $p=0.412$; d Cohen=0.18). Sí se observó una interacción entre el tumor y el estrés agudo ($F_{[1,118]}=4.266$; $p=0.041$; $\eta_p^2=0.060$), sin embargo, el análisis post hoc reveló que no había diferencias significativas entre ninguno de los subgrupos (Figura 18a). En este caso, tampoco se observaron diferencias cuando se analizó la distancia recorrida en función de las estrategias de afrontamiento ($F_{[3,118]}=0.395$; $p=0.757$; $\eta_p^2=0.006$) (Figura 18b).

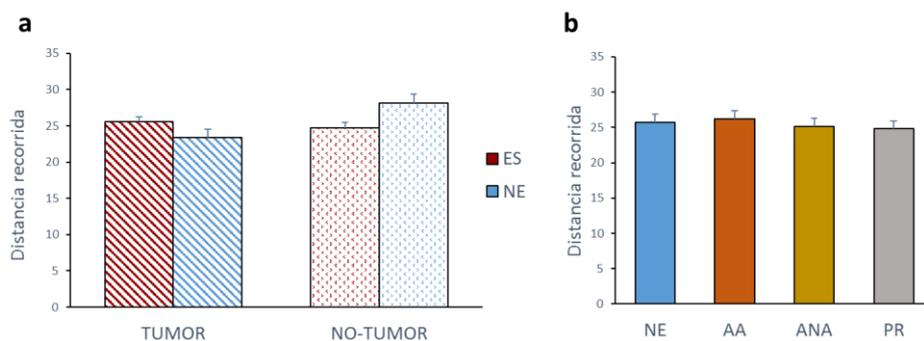


Figura 18. Promedio (\pm E.E.M.) de la distancia recorrida (m) de los sujetos estresados (ES) con tumor y sin tumor, y de los sujetos no-estresados (NE) con tumor y sin tumor (a); y los animales no-estresados (NE) junto con los sujetos estresados clasificados en diferentes estrategias de afrontamiento: activos/agresivos (AA), activos/no-agresivos (ANA) y pasivos/reactivos (PR) (b).

En cuanto al tiempo transcurrido en el centro de la caja y la distancia media desde el centro de la caja en la que permanecían los animales, no se encontraron diferencias ni del factor tumor (tiempo en el centro: $F_{[1,118]}=0.480$; $p=0.490$; d Cohen=0.08 / distancia media al centro: $F_{[1,118]}=1.388$; $p=0.241$; d Cohen=0.32), ni del factor estrés agudo (tiempo en el centro: $F_{[3,118]}=0.226$; $p=0.635$; d Cohen=0.12 / distancia media al centro: $F_{[3,118]}=0.437$; $p=0.510$; d Cohen=0.12), ni una interacción entre el tumor y el estrés agudo (tiempo en el centro: $F_{[1,118]}=0.389$; $p=0.534$; $\eta_p^2=0.003$ / distancia media al centro: $F_{[1,118]}=0.170$; $p=0.681$; $\eta_p^2=0.001$). Además, el análisis post hoc no reveló diferencias significativas entre ninguno de los subgrupos (*Figura 19a,c*). El análisis de varianza de un factor tampoco mostró diferencias en función de las estrategias de afrontamiento (tiempo en el centro $F_{[3,118]}=0.516$; $p=0.672$; $\eta_p^2=0.013$ / distancia media al centro: $F_{[3,118]}=0.430$; $p=0.732$; $\eta_p^2=0.000$) (*Figura 19b,d*).

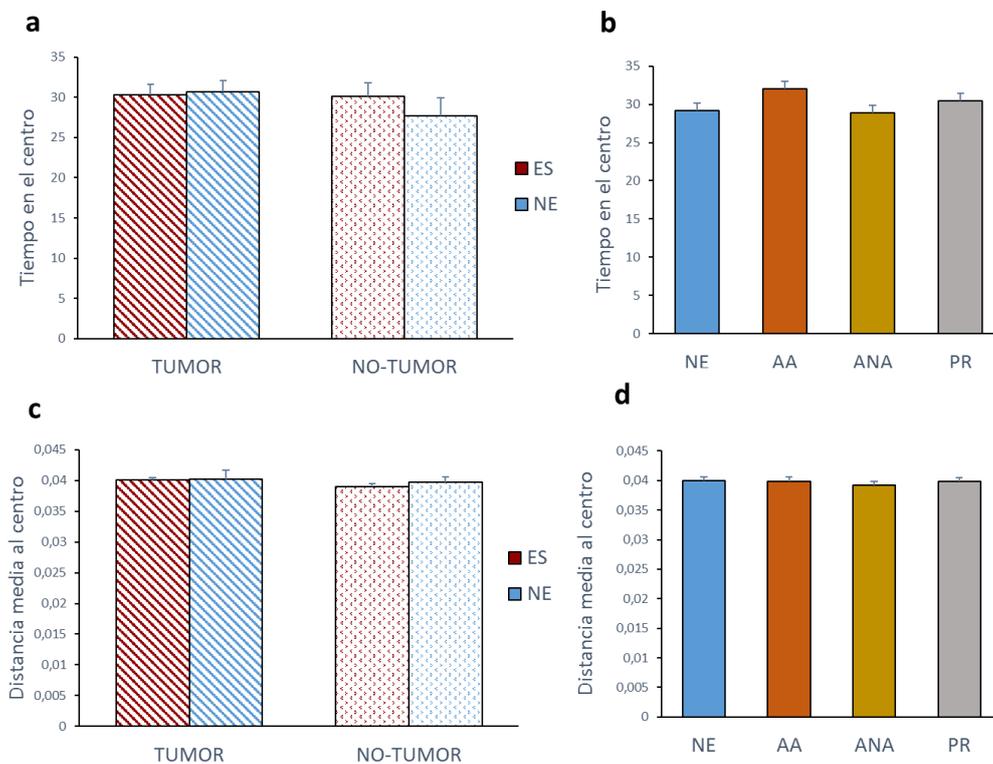


Figura 19. Promedio (\pm E.E.M.) de tiempo (seg) en el centro de la caja inmóvil de los sujetos estresados (ES) con tumor y sin tumor, y de los sujetos no-estresados (NE) con tumor y sin tumor (**a**); y los animales no-estresados (NE) junto con los sujetos estresados clasificados en diferentes estrategias de afrontamiento: activos/agresivos (AA), activos/no-agresivos (ANA) y pasivos/reactivos (PR) (**b**). Promedio (\pm E.E.M.) de distancia (m) al centro de la caja de los sujetos estresados (ES) con tumor y sin tumor, y de los sujetos no-estresados (NE) con tumor y sin tumor (**c**); y de los animales no-estresados (NE) junto con los sujetos estresados clasificados en diferentes estrategias de afrontamiento: activos/agresivos (AA), activos/no-agresivos (ANA) y pasivos/reactivos (PR) (**d**).

4.1.3. ESTUDIO DEL ESTRÉS AGUDO SOBRE VARIABLES FISIOLÓGICAS EN ANIMALES INOCULADOS Y NO-INOCULADOS CON MELANOMA B16F10.

4.1.3.1. Efecto del tumor, del estrés agudo y de las estrategias de afrontamiento del estrés sobre los niveles plasmáticos de corticosterona.

El análisis de varianza de tres factores (tiempo x estrés agudo x tumor) con medidas repetidas reveló diferencias significativas y un tamaño del efecto grande del factor tiempo ($F_{[1,48]}=8.738$; $p=0.005$; $\eta_p^2=0.154$) y tiempo x estrés agudo ($F_{[1,48]}=29.540$; $p<0.001$; $\eta_p^2=0.381$) entre los niveles de corticosterona basales y los obtenidos los días 7 y 14. Sólo los animales estresados mostraron un incremento de los niveles de corticosterona el día 7 ($F_{[1,119]}=14.919$; $p<0.001$; $\eta_p^2=0.111$), esto es, 40 minutos después de terminar las 24 horas de estrés agudo (*Figura 20*). Por el contrario, estos análisis no mostraron diferencias significativas en la interacción entre tiempo x tumor ($F_{[1,48]}=3.879$; $p=0.055$; $\eta_p^2=0.075$), ni tiempo x estrés x tumor ($F_{[1,48]}=0.251$; $p=0.618$; $\eta_p^2=0.005$). El análisis post hoc reveló que los dos subgrupos de estresados (tumor / no-tumor) mostraron un incremento de los niveles de corticosterona no observado en ambos subgrupos de no-estresados (tumor / no-tumor) tras finalizar el estrés (estresados con tumor - no estresados con tumor: $p<0.001$ d Cohen=0.85 / estresados con tumor - no estresados sin tumor: $p<0.001$ d Cohen=1.22 / estresados sin tumor - no estresados con tumor: $p=0.017$ d Cohen=0.77 / estresados sin tumor - no estresados sin tumor: $p=0.004$ d Cohen=1.14) (*Figura 20*). Por el contrario, no se encontraron diferencias significativas entre ningún grupo el día 14, es decir, 7 días después de finalizar el estrés.

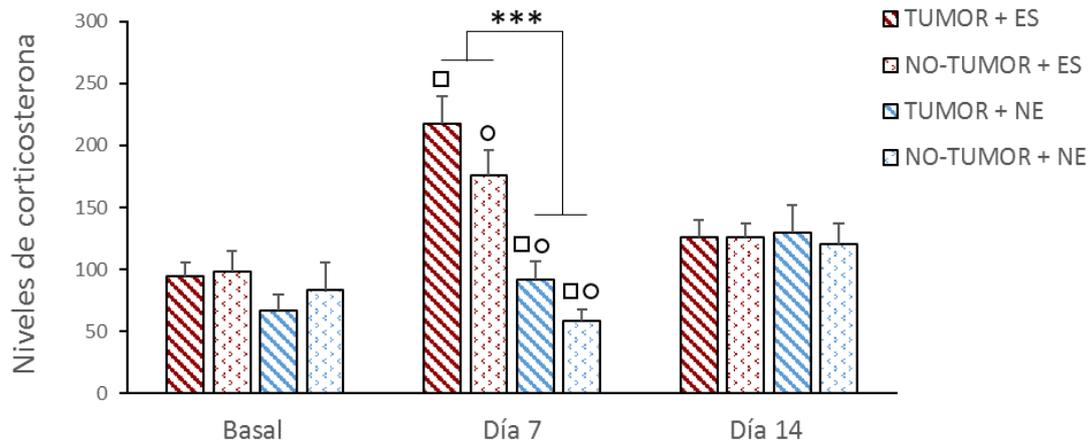


Figura 20. Niveles medios (\pm E.E.M.) de corticosterona en plasma (ng/ml) obtenidos por punción submandibular durante diferentes momentos del experimento de los sujetos estresados (ES) con tumor y sin tumor, y de los sujetos no-estresados (NE) con tumor y sin tumor. *** $p < 0.001$. □: Diferencias significativas entre los subgrupos $p < 0.001$; ○: Diferencias significativas entre los subgrupos $p < 0.001$.

El análisis de varianza de dos factores (tiempo x estrategias) con medidas repetidas reveló diferencias significativas de la interacción entre tiempo x estrategias ($F_{[3,48]}=10.417$; $p=0.001$; $\eta_p^2=0.394$) en los niveles de corticosterona. Pero en este caso, solo eran los animales no-estresados los que mostraron niveles menores de corticosterona que los animales AA ($p=0.015$; d Cohen=1.20), ANA ($p < 0.001$; d Cohen=1.22) y PR ($p < 0.001$; d Cohen=0.72) (Figura 21) tras el final del periodo de estrés, mientras que no se encontraron diferencias entre las tres estrategias de afrontamiento al estrés.

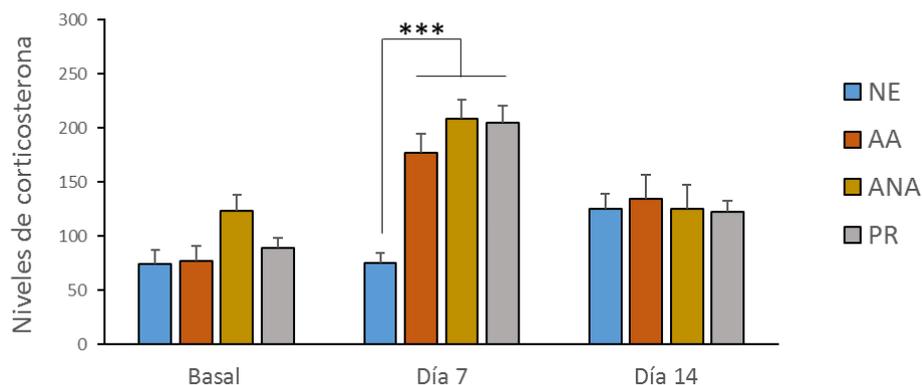


Figura 21. Niveles medios (\pm E.E.M.) de corticosterona en plasma (ng/ml) obtenidos por punción submandibular durante diferentes momentos del experimento de los animales no-estresados (NE) junto con los sujetos estresados clasificados en diferentes estrategias de afrontamiento: activos/agresivos (AA), activos/no-agresivos (ANA) y pasivos/reactivos (PR). *** $p < 0.001$.

4.1.3.2. Efecto del tumor, del estrés agudo y de las estrategias de afrontamiento del estrés sobre el peso del bazo.

El análisis de varianza de dos factores (tumor x estrés agudo) reveló que el bazo de los ratones estresados tenía un peso proporcional al peso corporal mayor que el bazo de los animales no-estresados. ($F_{[1,118]}=4.524$; $p=0.036$; d Cohen=0.51) (Figura 22a), mientras que no se encontraron diferencias ni del factor tumor ($F_{[1,118]}=0.066$; $p=0.798$; d Cohen=0.06), ni una interacción entre el tumor y el estrés agudo ($F_{[1,118]}=0.498$; $p=0.482$; $\eta_p^2=0.004$). Además, el análisis post hoc no reveló diferencias significativas entre ninguno de los subgrupos. El análisis de varianza con un factor mostró diferencias significativas en el peso del bazo en función de la estrategia de afrontamiento ($F_{[3,118]}=4.893$; $p=0.003$; $\eta_p^2=0.100$). El análisis post hoc reveló que los sujetos ANA eran los que tenían un bazo de mayor peso que los ratones AA ($p=0.016$; d Cohen=0.86) y que los sujetos no-estresados ($p=0.025$; d Cohen=0.74). Además, los valores fueron cercanos a la significación y mostraron un tamaño del efecto mediano, casi grande, al observar la diferencia entre los PR y los AA ($p=0.063$; d Cohen=0.73), por lo que el bazo de los sujetos PR podría ser mayor que el de los AA (Figura 22b).

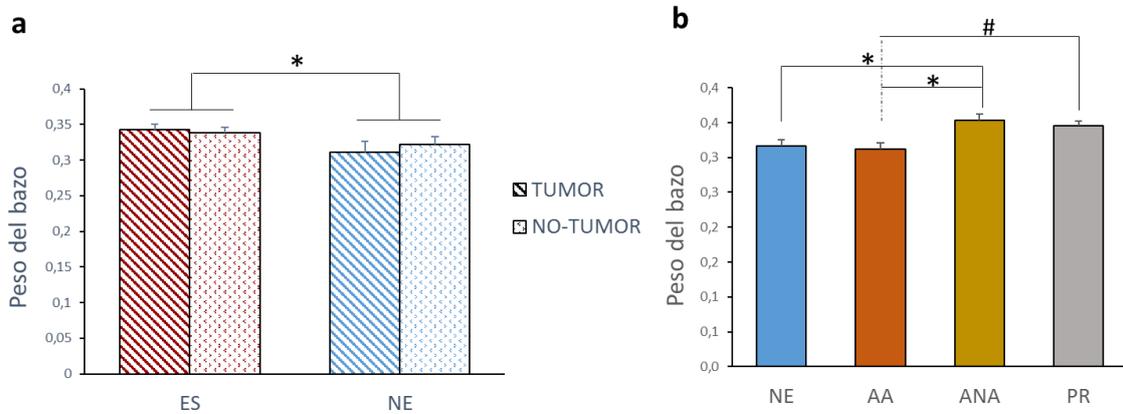


Figura 22. Peso medio (± E.E.M.) del bazo ((peso del bazo (g) / peso corporal (g)) * 100) de los sujetos estresados (ES) con tumor y sin tumor, y de los sujetos no-estresados (NE) con tumor y sin tumor (a), y los animales no-estresados (NE) junto con los sujetos estresados clasificados en diferentes estrategias de afrontamiento: activos/agresivos (AA), activos/no-agresivos (ANA) y pasivos/reactivos (PR) (b). * $p < 0.05$; # $p > 0.05$ pero d Cohen > 0.70 .

4.1.3.3. Efecto del tumor, del estrés agudo y de las estrategias de afrontamiento del estrés sobre el peso corporal.

El análisis de varianza de tres factores (tiempo x estrés agudo x tumor) con medidas repetidas reveló diferencias significativas del factor tiempo ($F_{[1,119]}=5.407$; $p=0.022$; $\eta_p^2=0.043$) y tiempo x estrés agudo ($F_{[1,119]}=12.940$; $p<0.001$; $\eta_p^2=0.098$) en el peso corporal de los animales. Los animales estresados tenían un menor peso corporal que los sujetos no-estresados tras las 24 horas del periodo de estrés ($F_{[1,121]}=17.959$; $p<0.001$; $\eta_p^2=0.129$) (Figura 23), pero los siguientes 7 días, es decir, entre los días 7 y 14, los estresados tuvieron un mayor incremento de peso ($F_{[1,121]}=15.088$; $p<0.001$; $\eta_p^2=0.111$). A partir de allí, la ganancia de peso no se diferenció entre los grupos ($F_{[1,121]}=0.015$; $p=0.902$; $\eta_p^2=0.000$). Por el contrario, estos análisis no mostraron diferencias significativas al analizar la interacción entre el tiempo x tumor ($F_{[1,119]}=0.821$; $p=0.367$; $\eta_p^2=0.007$), ni tiempo x estrés agudo x tumor ($F_{[1,119]}=0.745$; $p=0.390$; $\eta_p^2=0.006$).

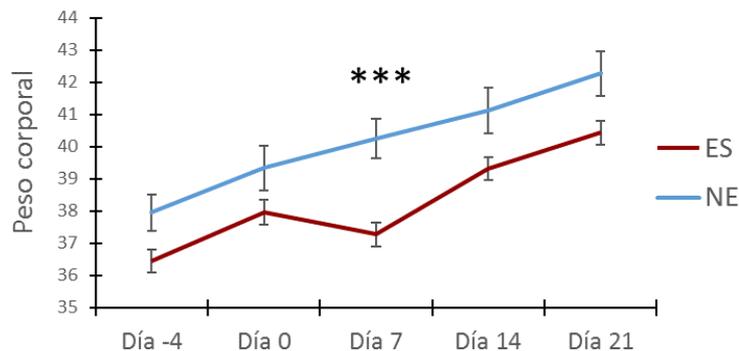


Figura 23. Peso (g) corporal medio (\pm E.E.M.) de los sujetos estresados (ES) y no-estresados (NE) durante diferentes momentos del experimento. *** $p<0.001$.

El análisis de varianza de dos factores (tiempo x estrategias) reveló diferencias entre tiempo x estrategias ($F_{[3,119]}=4.447$; $p=0.005$; $\eta_p^2=0.101$). El análisis post hoc reveló que fueron los animales no-estresados los que tuvieron un mayor incremento de peso el día 7 en comparación a los AA ($p<0.001$; d Cohen=1.50), ANA ($p<0.001$; d Cohen=1.64) y PR ($p<0.001$; d Cohen=1.33), mientras que no se encontraron diferencias entre las tres estrategias AA, ANA y PR (Figura 24).

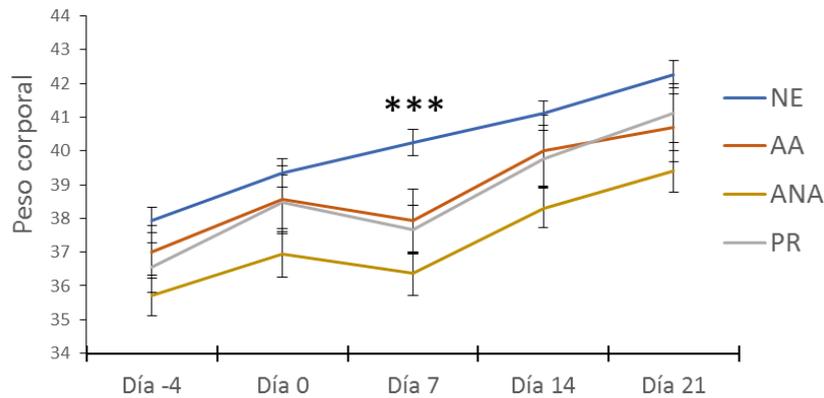


Figura 24. Peso (g) corporal medio (\pm E.E.M.) los animales no-estresados (NE) junto con los sujetos estresados clasificados en diferentes estrategias de afrontamiento: activos/agresivos (AA), activos/no-agresivos (ANA) y pasivos/reactivos (PR), durante diferentes momentos del experimento. ***Diferencias significativas de los animales NE con los AA, ANA y PR, $p < 0.001$.

4.1.3.4. Efecto del tumor, del estrés agudo y de las estrategias de afrontamiento del estrés sobre la expresión de la enzima IDO en el estriado y en el hipocampo.

Análisis de la expresión de la enzima IDO en el estriado.

El análisis de varianza de dos factores (tumor x estrés agudo) no mostró diferencias significativas ni del factor tumor ($F_{[1,119]}=0.183$; $p=0.670$; d Cohen=0.21), ni del factor estrés agudo ($F_{[1,119]}=0.505$; $p=0.479$; d Cohen=0.13). Sí se observó una interacción significativa entre ambos factores ($F_{[1,119]}=5.272$; $p=0.023$; $\eta_p^2=0.042$) con un tamaño del efecto pequeño, sin embargo, el análisis post hoc no reveló diferencias significativas entre ninguno de los subgrupos (Figura 25a). Por otro lado, el análisis de varianza de un factor no reveló diferencias significativas en cuanto a la estrategia de afrontamiento ($F_{[3,119]}=0.587$; $p=0.625$; $\eta_p^2=0.015$) (Figura 25b).

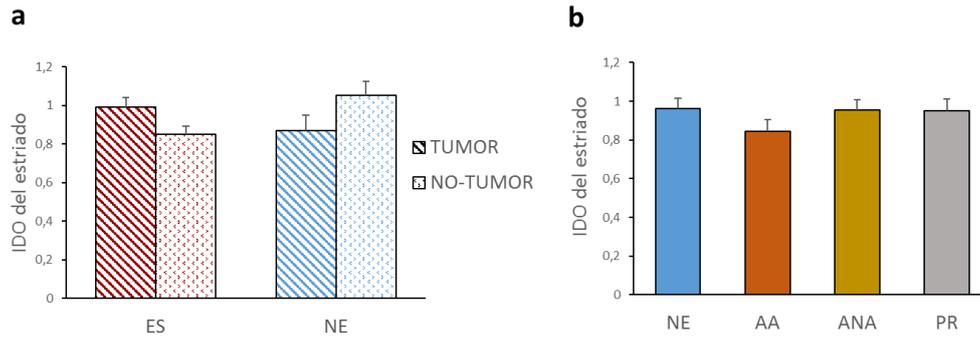


Figura 25. Niveles medios (\pm E.E.M.) de expresión génica de la enzima IDO en el estriado de los sujetos estresados (ES) con tumor y sin tumor, y de los sujetos no-estresados (NE) con tumor y sin tumor (a); y los animales no-estresados (NE) junto con los sujetos estresados clasificados en diferentes estrategias de afrontamiento: activos/agresivos (AA), activos/no-agresivos (ANA) y pasivos/reactivos (PR) (b).

Análisis de la expresión de la enzima IDO en el hipocampo.

El análisis de varianza de dos factores (tumor x estrés agudo) no reveló diferencias significativas ni del factor tumor ($F_{[1,118]}=1.872$; $p=0.174$; d Cohen=0.23), ni del factor estrés agudo ($F_{[1,118]}=0.016$; $p=0.900$; d Cohen=0.04), ni una interacción entre el tumor y el estrés agudo ($F_{[1,118]}=0.348$; $p=0.556$; $\eta_p^2=0.003$). Además, el análisis post hoc no reveló diferencias significativas entre ninguno de los subgrupos (Figura 26a). El análisis de varianza de un factor mostró que no había diferencias en función de las estrategias de afrontamiento ($F_{[3,118]}=1.077$; $p=0.361$; $\eta_p^2=0.025$) (Figura 26b).

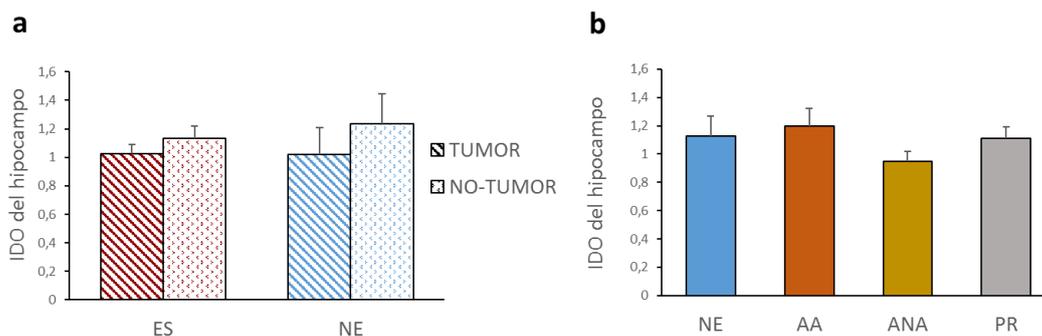


Figura 26. Niveles medios (\pm E.E.M.) de expresión génica de la enzima IDO en el hipocampo de los sujetos estresados (ES) con tumor y sin tumor, y de los sujetos no-estresados (NE) con tumor y sin tumor (a); y los animales no-estresados (NE) junto con los sujetos estresados clasificados en diferentes estrategias de afrontamiento: activos/agresivos (AA), activos/no-agresivos (ANA) y pasivos/reactivos (PR) (b).

4.1.3.5. Efecto del tumor, del estrés agudo y de las estrategias de afrontamiento del estrés sobre la expresión de la enzima TDO en el estriado e hipocampo.

Análisis de la expresión de la enzima TDO en el estriado.

No se llegó a detectar la expresión de TDO en el estriado mediante la técnica de RT-PCR.

Análisis de la expresión de la enzima TDO en el hipocampo.

El análisis de varianza de dos factores (tumor x estrés agudo) no reveló diferencias significativas ni del factor tumor ($F_{[1,118]}=1.177$; $p=0.280$; d Cohen=0.05), ni del factor estrés agudo ($F_{[1,118]}=1.166$; $p=0.283$; d Cohen=0.23), ni una interacción entre el tumor y el estrés agudo ($F_{[1,118]}=1.747$; $p=0.189$; $\eta_p^2=0.015$). Además, el análisis post hoc no reveló diferencias significativas entre ninguno de los subgrupos (Figura 27a). El análisis de varianza de un factor no mostró diferencias según la estrategia de afrontamiento utilizado ($F_{[3,118]}=0.558$; $p=0.644$; $\eta_p^2=0.013$) (Figura 27b).

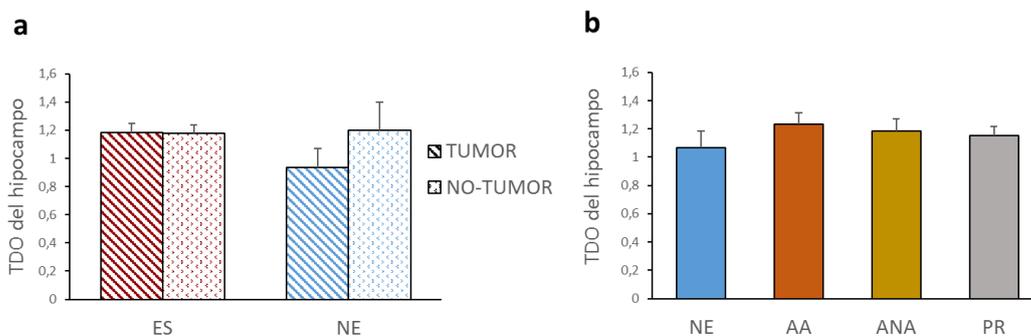


Figura 27. Niveles medios (\pm E.E.M.) de expresión génica de la enzima TDO en el hipocampo de los sujetos estresados (ES) con tumor y sin tumor, y de los sujetos no-estresados (NE) con tumor y sin tumor (a); y los animales no-estresados (NE) junto con los sujetos estresados clasificados en diferentes estrategias de afrontamiento: activos/agresivos (AA), activos/no-agresivos (ANA) y pasivos/reactivos (PR) (b).

4.1.3.6. Efecto del tumor, del estrés agudo y de las estrategias de afrontamiento del estrés sobre la expresión de la enzima iNOS en el estriado y en el hipocampo.

Análisis de la expresión de la enzima iNOS en el estriado.

El análisis de varianza de dos factores (tumor x estrés agudo) no reveló significativas ni del factor tumor ($F_{[1,119]}=2.418$; $p=0.123$; d Cohen=0.21), ni del factor estrés agudo ($F_{[1,119]}=3.383$; $p=0.068$; d Cohen=0.45), ni una interacción entre el tumor y el estrés agudo ($F_{[1,119]}=1.506$; $p=0.222$; $\eta_p^2=0.012$). Además, el análisis post hoc no reveló diferencias significativas entre ninguno de los subgrupos (Figura 28a). El análisis de varianza de un factor no mostró diferencias en función de la estrategia de afrontamiento utilizado ($F_{[3,119]}=1.524$; $p=0.212$; $\eta_p^2=0.037$) (Figura 28b).

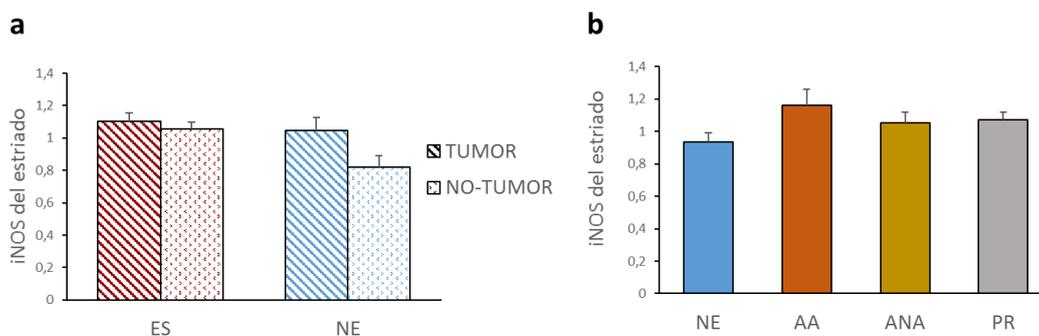


Figura 28. Niveles medios (\pm E.E.M.) de expresión génica de la enzima iNOS en el estriado de los sujetos estresados (ES) con tumor y sin tumor, y de los sujetos no estresados (NE) con tumor y sin tumor (a); y los animales no estresados (NE) junto con los sujetos estresados clasificados en diferentes estrategias de afrontamiento: activos/agresivos (AA), activos/no-agresivos (ANA) y pasivos/reactivos (PR) (b).

Análisis de la expresión de la enzima iNOS en el hipocampo.

El análisis de varianza de dos factores (tumor x estrés agudo) no reveló diferencias significativas ni del factor tumor ($F_{[1,118]}=0.043$; $p=0.837$; d Cohen=0.07), ni del factor estrés agudo ($F_{[1,118]}=0.007$; $p=0.933$; d Cohen=0.03), ni una interacción entre el tumor y el estrés agudo ($F_{[1,118]}=0.017$; $p=0.897$; $\eta_p^2=0.000$). Además, el análisis post hoc no reveló diferencias significativas entre ninguno de los subgrupos (Figura 29a). El análisis de varianza de un factor mostró que no había diferencias en función de la estrategia de afrontamiento utilizado ($F_{[3,118]}=1.083$; $p=0.359$; $\eta_p^2=0.026$) (Figura 29b).

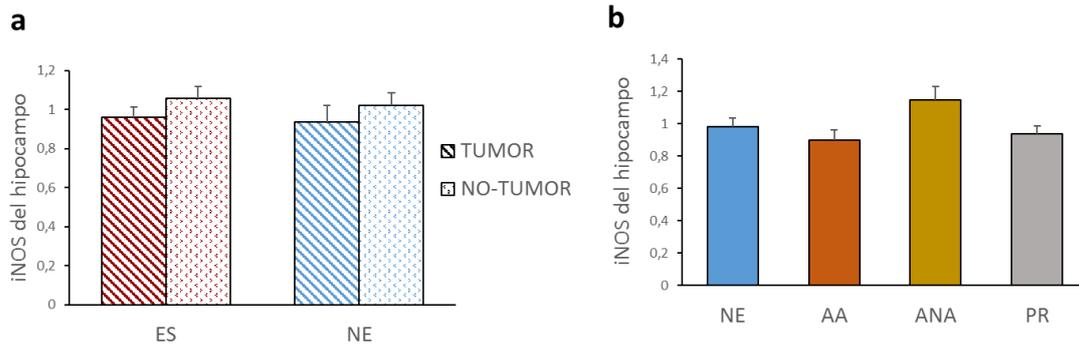


Figura 29. Niveles medios (\pm E.E.M.) de expresión génica de la enzima TDO en el hipocampo de los sujetos estresados (ES) con tumor y sin tumor, y de los sujetos no-estresados (NE) con tumor y sin tumor (a); y los animales no-estresados (NE) junto con los sujetos estresados clasificados en diferentes estrategias de afrontamiento: activos/agresivos (AA), activos/no-agresivos (ANA) y pasivos/reactivos (PR) (b).

4.1.3.7. Efecto del tumor, del estrés agudo y de las estrategias de afrontamiento del estrés sobre la expresión de la citocina IL-6 en el estriado y en el hipocampo.

Análisis de la expresión de la citocina IL-6 en el estriado.

El análisis de varianza de dos factores (tumor x estrés agudo) no reveló diferencias significativas ni del factor tumor ($F_{[1,119]}=0.445$; $p=0.506$; d Cohen=0.23), ni del factor estrés agudo ($F_{[3,119]}=0.348$; $p=0.556$; d Cohen=0.16,) ni una interacción entre el tumor y el estrés agudo ($F_{[1,119]}=0.269$; $p=0.605$; $\eta_p^2=0.002$). Además, el análisis post hoc no reveló diferencias significativas entre ninguno de los subgrupos (Figura 30a). El análisis de varianza de un factor no mostró diferencias en función de la estrategia de afrontamiento utilizado ($F_{[3,119]}=1.806$; $p=0.150$; $\eta_p^2=0.042$) (Figura 30b).

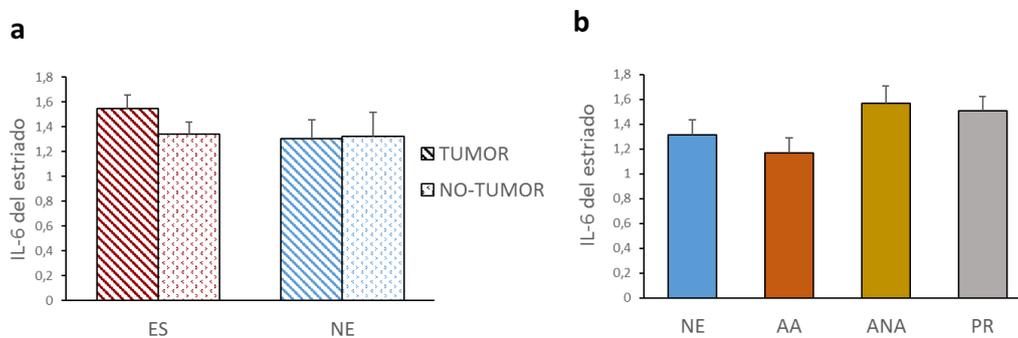


Figura 30. Niveles medios (\pm E.E.M.) de expresión génica de la citocina IL-6 en el estriado de los sujetos estresados (ES) con tumor y sin tumor, y de los sujetos no-estresados (NE) con tumor y sin tumor (a); y los animales no-estresados (NE) junto con los sujetos estresados clasificados en diferentes estrategias de afrontamiento: activos/agresivos (AA), activos/no-agresivos (ANA) y pasivos/reactivos (PR) (b).

Análisis de la expresión de la citocina IL-6 en el hipocampo.

El análisis de varianza de dos factores (tumor x estrés agudo) no reveló diferencias significativas ni del factor tumor ($F_{[1,118]}=0.023$; $p=0.879$; d Cohen=0.03), ni del factor estrés agudo ($F_{[1,118]}=1.803$; $p=0.182$; d Cohen=0.28), ni una interacción entre el tumor y el estrés agudo ($F_{[1,118]}=0.006$; $p=0.941$; $\eta_p^2=0.000$). Además, el análisis post hoc no reveló diferencias significativas entre ninguno de los subgrupos (Figura 31a). El análisis de varianza de un factor no mostró diferencias en función de la estrategia de afrontamiento utilizado ($F_{[3,118]}=0.642$; $p=0.589$; $\eta_p^2=0.016$) (Figura 31b).

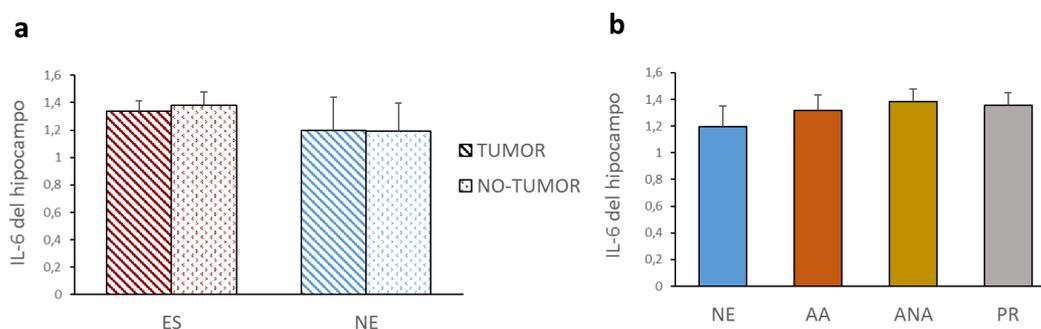


Figura 31. Niveles medios (\pm E.E.M.) de expresión génica de la citocina IL-6 en el hipocampo de los sujetos estresados (ES) con tumor y sin tumor, y de los sujetos no estresados (NE) con tumor y sin tumor (a); y los animales no estresados (NE) junto con los sujetos estresados clasificados en diferentes estrategias de afrontamiento: activos/agresivos (AA), activos/no-agresivos (ANA) y pasivos/reactivos (PR) (b).

4.1.3.8. Efecto del tumor, del estrés agudo y de las estrategias de afrontamiento del estrés sobre la expresión de la citocina TNF- α en el estriado y en el hipocampo.

Análisis de la expresión de la citocina TNF α en el estriado.

El análisis de varianza de dos factores (tumor x estrés agudo) no reveló diferencias significativas ni del factor tumor ($F_{[1,119]}=2.766$; $p=0.099$; d Cohen=0.34), ni del factor estrés agudo ($F_{[1,119]}=1.421$; $p=0.236$; d Cohen=0.31), ni una interacción entre el tumor y el estrés agudo ($F_{[1,119]}=0.174$; $p=0.678$; $\eta_p^2=0.001$). Además, el análisis post hoc no reveló diferencias significativas entre ninguno de los subgrupos (Figura 332a). El análisis de varianza de un factor no mostró diferencias en función de la estrategia de afrontamiento utilizado ($F_{[3,119]}=1.354$; $p=0.260$; $\eta_p^2=0.032$) (Figura 32b).

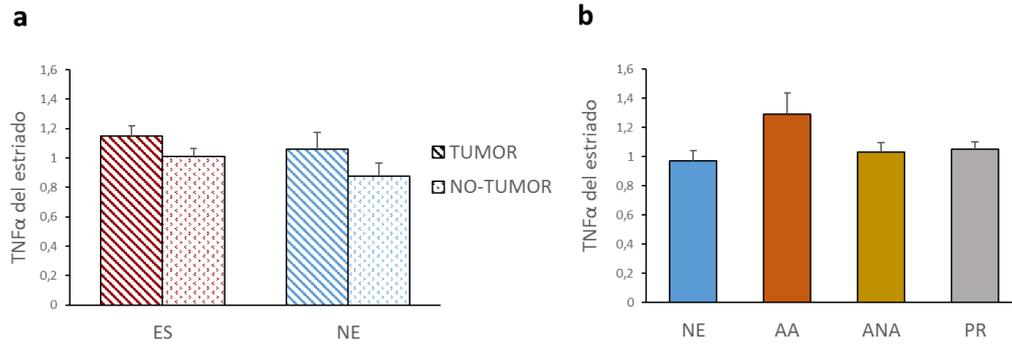


Figura 32. Niveles medios (\pm E.E.M.) de expresión génica de la citosina TNF α en el estriado de los sujetos estresados (ES) con tumor y sin tumor, y de los sujetos no-estresados (NE) con tumor y sin tumor (a); y los animales no-estresados (NE) junto con los sujetos estresados clasificados en diferentes estrategias de afrontamiento: activos/agresivos (AA), activos/no-agresivos (ANA) y pasivos/reactivos (PR) (b).

Análisis de la expresión de la citocina TNF α en el hipocampo.

El análisis de varianza de dos factores (tumor x estrés agudo) no reveló diferencias significativas ni del factor tumor ($F_{[1,118]}=2.473$; $p=0.119$; d Cohen=0.33), ni del factor estrés agudo ($F_{[1,118]}=0.654$; $p=0.420$; d Cohen=0.16), ni una interacción entre el tumor y el estrés agudo ($F_{[1,118]}=0.025$; $p=0.875$; $\eta_p^2=0.000$). Además, el análisis post hoc no reveló diferencias significativas entre ninguno de los subgrupos (Figura 33a). El análisis de varianza de un factor no mostró diferencias en función la estrategia de afrontamiento utilizado ($F_{[3,118]}=0.231$; $p=0.874$; $\eta_p^2=0.006$) (Figura 33b).

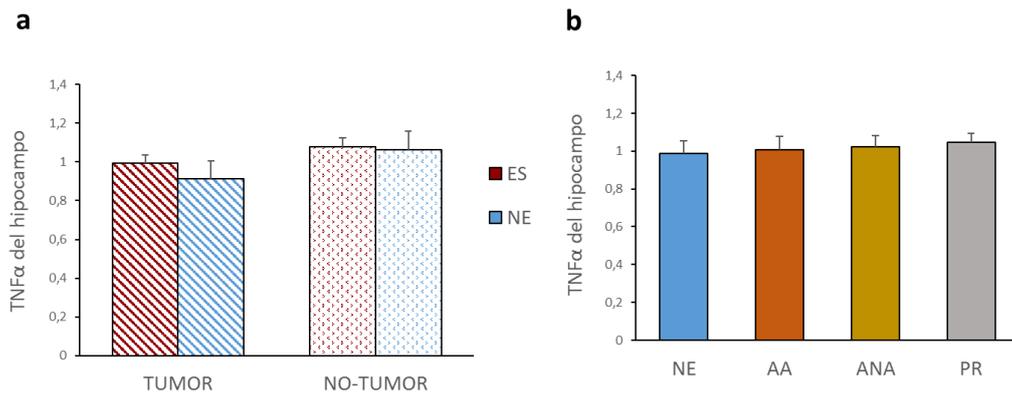


Figura 33. Niveles medios (\pm E.E.M.) de expresión génica de la citosina TNF α en el hipocampo de los sujetos estresados (ES) con tumor y sin tumor, y de los sujetos no-estresados (NE) con tumor y sin tumor (a); y los animales no-estresados (NE) junto con los sujetos estresados clasificados en diferentes estrategias de afrontamiento: activos/agresivos (AA), activos/no-agresivos (ANA) y pasivos/reactivos (PR) (b).

4.1.4. CORRELACIONES

4.1.4.1. Correlaciones entre los niveles de corticosterona y el desarrollo tumoral.

Las correlaciones bivariadas revelaron que no había relación entre los niveles de corticosterona basales y los obtenidos los días 7 y 14 del experimento con el número de focos encontrados el día 21 desde la inoculación (en todos los casos $p > 0.143$) (Tabla 4).

Tabla 4.
Correlaciones entre niveles de corticosterona y el número de focos tumorales del 1° experimento.

Grupo	Variable	Basal	Día 7 (post estrés)	Día 14
Estrés	Número de focos día 21	0,047	-0,024	0,403
No-estrés	Número de focos día 21	-0,229	0,442	0,202
Tumor	Número de focos día 21	0,017	0,107	0,295

4.1.4.2. Correlaciones entre los niveles de corticosterona y expresión de la enzima TDO en el hipocampo.

Las correlaciones bivariadas mostraron una correlación positiva entre los niveles de TDO en el hipocampo y los niveles de corticosterona del día 7 ($r=0.366$; $p=0.002$) entre los sujetos con tumor (Tabla 5).

Tabla 5.
Correlaciones entre niveles de corticosterona y niveles de TDO en el hipocampo del 1° experimento dentro de los animales estresados.

Grupo	Variable	Basal	Día 7 (post estrés)	Día 14
Estrés	TDO del hipocampo	-0,077	0,179	-0,108
No-estrés	TDO del hipocampo	-0,286	-0,156	0,001
Tumor	TDO del hipocampo	0,008	0,366**	0,224
No-tumor	TDO del hipocampo	-0,263	-0,104	-0,343
Todos	TDO del hipocampo	-0,102	0,159	-0,044

Nota. ** $p < 0.01$

4.1.4.3. Correlaciones entre los niveles de expresión de citocinas y de las enzimas IDO e iNOS.

El estudio de las correlaciones entre la expresión de las enzimas IDO e iNOS y las citocinas IL-6 y TNF α mostró una correlación positiva dentro de los animales estresados entre iNOS con TNF α ($r=0.432$; $p<0.001$) y con IL-6 ($r=0.302$; $p=0.002$) del estriado y entre INOS con IDO ($r=0.430$; $p<0.001$) y con TNF α ($r=0.532$; $p<0.001$) e, IDO con TNF α ($r=0.339$; $p=0.001$) en el hipocampo (Tabla 6).

Tabla 6.
Correlaciones entre niveles de citocinas y enzimas IDO e iNOS hipocampo del 1° experimento dentro de los animales estresados.

	iNOS Est	IDO Est	IL-6 Est	TNF α Est		iNOS HC	IDO HC	IL-6 HC	TNF α HC
iNOS Est	1	0.069	0.302**	0.432***	iNOS HC	1	0.430***	0.083	0.532***
IDO Est		1	0.110	0.033	IDO HC		1	0.011	0.339**
IL-6 Est			1	0.257*	IL-6 HC			1	0.066
TNF α Est				1	TNF α HC				1

Nota. ** $p<0.01$; *** $p<0.001$

En cuanto a los sujetos no estresados también se encontraron correlaciones, entre los niveles de INOS y TNF α ($r=0.775$; $p<0.001$) en el estriado y entre los niveles de INOS con IL-6 ($r=0.501$; $p=0.013$) y con TNF α ($r=0.453$; $p=0.026$) y entre IL-6 con IDO ($r=0.450$; $p=0.027$) y con TNF α ($r=0.490$; $p=0.015$) (Tabla 7).

Tabla 7.
Correlaciones entre niveles de citocinas y enzimas IDO e iNOS hipocampo del 1° experimento dentro de los animales no-estresados.

	iNOS Est	IDO Est	IL-6 Est	TNF α Est		iNOS HC	IDO HC	IL-6 HC	TNF α HC
iNOS Est	1	-0.197	-0.075	0.775***	iNOS HC	1	0.220	0.501*	0.453*
IDO Est		1	0.193	-0.042	IDO HC		1	0.450*	0.171
IL-6 Est			1	0.171	IL-6 HC			1	0.490*
TNF α Est				1	TNF α HC				1

Nota. * $p<0.05$; *** $p<0.001$

Entre los sujetos con tumor las correlaciones significativas observadas fueron entre INOS con IL-6 ($r=0.332$; $p=0.005$) y con TNF α ($r=0.508$; $p<0.001$) en el estriado y entre INOS con IDO ($r=0.468$; $p<0.001$) y con TNF α ($r=0.629$; $p<0.001$) e IDO con TNF α ($r=0.509$; $p<0.001$) en el hipocampo (Tabla 8).

Tabla 8.
Correlaciones entre niveles de citocinas y enzimas IDO e iNOS hipocampo del 1° experimento dentro de los animales con tumor.

	iNOS Est	IDO Est	IL-6 Est	TNF α Est	iNOS HC	IDO HC	IL-6 HC	TNF α HC
iNOS Est	1	0.068	0,332**	0.508***	iNOS HC	1	0,468***	0,129
IDO Est		1	0,179	0.066	IDO HC		1	-0.010
IL-6 Est			1	0.142	IL-6 HC			1
TNF α Est				1	TNF α HC			1
								0,629***
								0,509***
								0,178
								1

Nota. ** $p<0.01$; *** $p<0.001$

Además, entre los sujetos que no tuvieron una inoculación tumoral también se encontraron correlaciones positivas entre los niveles de TNF α con INOS ($r=0.457$; $p=0.001$) y con IL-6 ($r=0.367$; $p=0.006$) en el estriado y entre TNF α con INOS ($r=0.321$; $p=0.018$) e, IDO con IL-6 ($r=0.335$; $p=0.013$) en el hipocampo (Tabla 9).

Tabla 9.
Correlaciones entre niveles de citocinas y enzimas IDO e iNOS hipocampo del 1° experimento dentro de los animales sin tumor.

	iNOS Est	IDO Est	IL-6 Est	TNF α Est	iNOS HC	IDO HC	IL-6 HC	TNF α HC
iNOS Est	1	-0,095	0,091	0,457*	iNOS HC	1	0,251	0,219
IDO Est		1	-0,005	-0,101	IDO HC		1	0,335*
IL-6 Est			1	0,367**	IL-6 HC			1
TNF α Est				1	TNF α HC			1
								0,321*
								-0,093
								0,165
								1

Nota. * $p<0.05$; ** $p<0.01$

Por último, también observamos correlaciones positivas al realizar correlaciones bivariadas con todos los sujetos entre los niveles de INOS con TNF α en el estriado ($r=0.494$; $p<0.001$) y entre INOS con TNF α ($r=0.514$; $p<0.001$) e IDO ($r=0.388$; $p<0.001$) y TNF α con IDO ($r=0.305$; $p=0.001$) en el hipocampo (Tabla 10).

Tabla 10.

Correlaciones entre niveles de citocinas y enzimas IDO e iNOS hipocampo del 1° experimento en todos los sujetos.

	iNOS Est	IDO Est	IL-6 Est	TNF α Est	iNOS HC	IDO HC	IL-6 HC	TNF α HC
iNOS Est	1	0.020	0,246**	0,494***	iNOS HC	1	0,165	0,514***
IDO Est		1	0.119	0.018	IDO HC		1	0,305**
IL-6 Est			1	0.243**	IL-6 HC		1	0,171
TNF α Est				1	TNF α HC			1

Nota. ** $p<0.01$; *** $p<0.001$

EXPERIMENTO 2.

4.2.1. ANÁLISIS DE LAS DIFERENCIAS INDIVIDUALES EN EL AFRONTAMIENTO CONDUCTUAL DEL ESTRÉS SOCIAL.

Al igual que en el primer experimento, sólo el grupo de sujetos estresados fue susceptible de ser evaluado y analizado conductualmente, así, se procedió a agrupar a los sujetos en función de las características conductuales manifestadas durante la primera interacción física directa (IFD) y la primera interacción no-física (INF). Para ello, se realizó un análisis clúster utilizando el porcentaje medio de tiempo dedicado a cada una de las conductas evaluadas y se obtuvieron tres grupos o conglomerados de sujetos derrotados, clúster 1, clúster 2 y clúster 3, con diferentes características conductuales. Para conocer las diferencias que presentan las variables conductuales en cada uno de los clústeres obtenidos, se realizó un análisis de la varianza (Figura 34). El clúster se llevó a cabo con aquellas conductas que mostraron diferencias significativas entre al menos dos estrategias de afrontamiento:

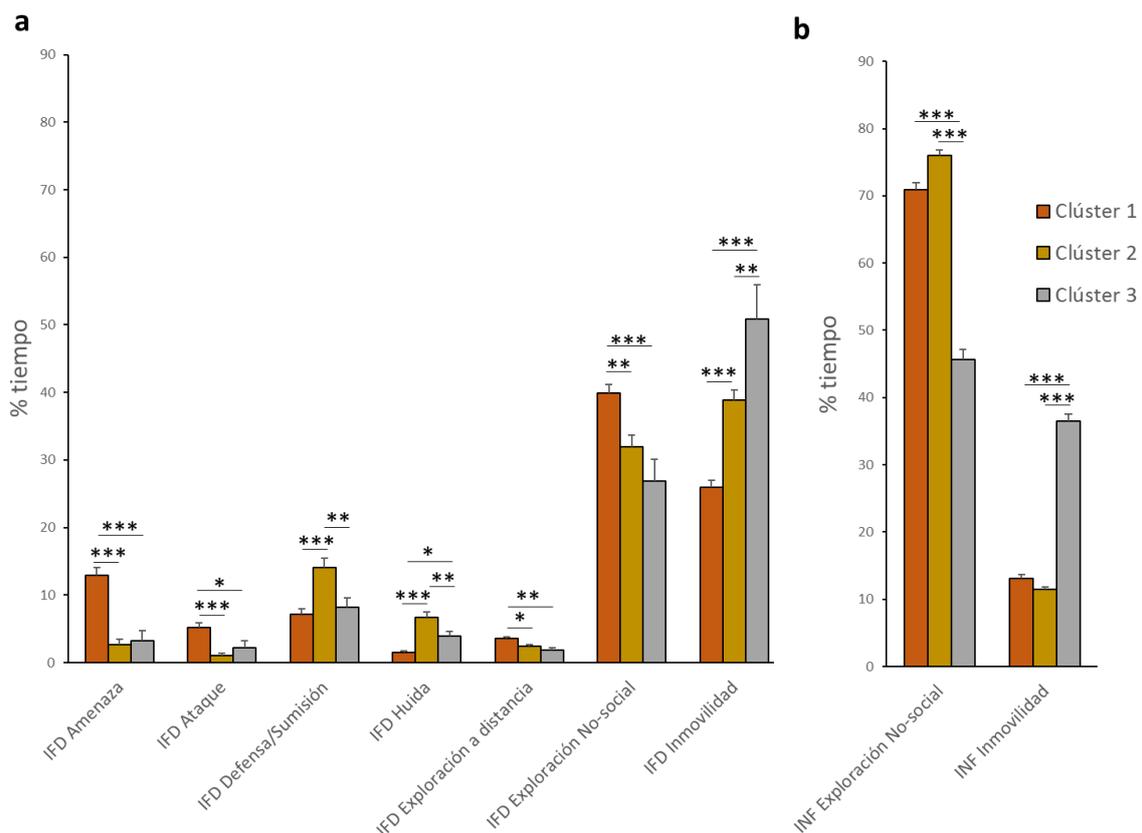


Figura 34. Porcentajes medios (\pm E.E.M.) de tiempo que dedican a cada conducta en las interacciones (Interacción Física Directa (IFD) e Interacción No-Física (INF)) del día 1, mediante los cuales se ha realizado la clasificación de los sujetos en el segundo experimento. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

Para confirmar la validez estadística de los dos grupos obtenidos y determinar las variables conductuales más eficientes a la hora de discriminar entre ambos grupos, se aplicó un análisis discriminante utilizando el método *Lambda de Wilks* de inclusión por pasos. La conducta de inmovilidad resultó ser la variable conductual que mejor discriminaba entre los grupos, ya que fue la primera en ser seleccionada para su inclusión en el modelo discriminante. En las fases posteriores del procedimiento por pasos, el modelo explicativo fue incluyendo sucesivamente las conductas de huida en IFD, exploración no social en IFD, defensa/sumisión en IFD, inmovilidad en INF y amenaza en IFD, incrementando así la discriminación entre los grupos. El resto de conductas no fueron incluidas dentro del modelo explicativo debido a que no contribuyeron significativamente en esa discriminación, en función de los valores *Lambda de Wilks* (Tabla 11).

Tabla 11.
Resumen del análisis discriminante.

VARIABLES INCLUIDAS EN EL ANÁLISIS	ETAPA	LAMBDA	F PARA ENTRAR	SIGNIFICACIÓN
Inmovilidad en IFD	1	0,483	36,360	<0,001
Huida en IFD	2	0,343	23,735	<0,001
Exploración no-social en IFD	3	0,171	31,271	<0,001
Defensa/sumisión en IFD	4	0,148	25,927	<0,001
Inmovilidad en INF	5	0,114	25,086	<0,001
Amenaza en IFD	6	0,102	22,446	<0,001

Nota. En cada etapa se introduce la variable que minimiza la Lambda de Wilks Global. La Lambda de Wilks es un estadístico que expresa el poder de discriminación del modelo. Su valor está comprendido entre 0 y 1. Un valor de Lambda cercano a cero significa poder perfecto de discriminación.

Esta función discriminante también fue utilizada para confirmar la validez de los clústers obtenidos. Así, las estimaciones del modelo discriminante aplicado coinciden en el 94.4 % de los casos con la clasificación realizada por el análisis de conglomerados jerárquicos (Tabla 12).

Tabla 12.
Matriz de clasificación para el análisis discriminante.

	n real	Clúster de pertenencia pronosticado			% correctos
		Clúster 1	Clúster 2	Clúster 3	
Clúster 1	32	31	1	0	96.9
Clúster 2	25	3	22	0	88
Clúster 3	14	0	0	14	100

Una vez confirmada la descripción de los grupos mediante el análisis de la varianza y la función discriminante, procedimos a caracterizar los dos grupos de la siguiente manera (Figura 34):

- **Clúster 1, Activos/agresivos (AA)** (n=32: Tumor=12; No-tumor=20). Agrupa a los sujetos que frente a un oponente agresivo responden fundamentalmente con conductas de exploración (exploración no-social y exploración a distancia) y agresividad (ataque y amenaza), mientras que dedican muy poco tiempo a las conductas de defensa/sumisión, huida e inmovilidad.
- **Clúster 2, Activos/no-agresivos (ANA)** (n=25: Tumor =17; No-tumor=8). Agrupa a los sujetos que reaccionan con conductas de exploración (sobre todo durante la exploración no-social en las INF), altos niveles de defensa/sumisión y huida, y niveles intermedios de inmovilidad durante la IFD.
- **Clúster 3, Pasivos/reactivos (PR)** (n=14; Tumor=6; No-tumor=8). Agrupa a los sujetos que responden fundamentalmente con conductas de inmovilidad y niveles intermedios de defensa/sumisión y huida, mientras que dedican muy poco tiempo a la exploración, tanto del medio (exploración no-social), como de su oponente (exploración a distancia).

Cabe aclarar que el análisis estadístico Chi-cuadrado no mostró diferencias estadísticamente significativas en la distribución de los sujetos en las diferentes estrategias de afrontamiento en función del tumor, ($X^2(2) = 5.513$, $p = 0.064$; V de cramer=0.279).

4.2.1.1. Estudio de los cambios conductuales producidos entre las interacciones del día 1 y 9.

El análisis de varianza de un factor (tiempo) con medidas repetidas llevado a cabo para cada una de las estrategias, mostró que el porcentaje de tiempo que dedicaban a conducta varió tras los 9 días de derrota social. Todas las estrategias redujeron el tiempo que dedicaron a la amenaza (AA: $F_{[1,30]}=133.210$, $p<0.001$, $\eta_p^2=0.816$; ANA: $F_{[1,24]}=11.139$, $p=0.003$, $\eta_p^2=0.317$; PR: $F_{[1,13]}=3.915$, $p=0.069$, $\eta_p^2=0.231$), ataque (AA: $F_{[1,30]}=57.514$, $p<0.001$, $\eta_p^2=0.657$; ANA: $F_{[1,24]}=8.046$, $p=0.009$, $\eta_p^2=0.251$; PR: $F_{[1,13]}=4.325$, $p=0.058$, $\eta_p^2=0.250$), exploración no-social (AA: $F_{[1,30]}=36.519$, $p<0.001$, $\eta_p^2=0.549$; ANA: $F_{[1,24]}=13.285$, $p=0.001$, $\eta_p^2=0.356$; y PR: $F_{[1,13]}=6.704$; $p=0.022$, $\eta_p^2=0.340$) e incrementaron el tiempo transcurrido inmóviles (AA: $F_{[1,30]}=163.141$, $p<0.001$, $\eta_p^2=0.845$; ANA: $F_{[1,24]}=118.256$, $p=0.001$, $\eta_p^2=0.831$; y PR: $F_{[1,13]}=17.801$, $p=0.001$, $\eta_p^2=0.578$) durante la IFD. Además, los animales AA también incrementaron la conducta de huida ($F_{[1,30]}=39.891$,

$p < 0.001$, $\eta_p^2 = 0.571$); mientras, el grupo ANA mostró niveles más bajos de defensa/sumisión ($F_{[1,24]} = 6.066$, $p = 0.021$, $\eta_p^2 = 0.202$) y exploración a distancia ($F_{[1,24]} = 7.651$, $p = 0.011$, $\eta_p^2 = 0.242$) durante la IFD. En cuanto a la INF, el grupo ANA mostró cambios grandes, incrementando la conducta de inmovilidad ($F_{[1,24]} = 16.784$, $p < 0.001$, $\eta_p^2 = 0.412$) y reduciendo la exploración no-social ($F_{[1,24]} = 27.894$, $p < 0.001$; $\eta_p^2 = 0.538$), mientras que no se observaron cambios para los grupos AA y PR (Tabla 13).

Tabla 13.
Cambios conductuales según las estrategias de afrontamiento al estrés.

	Estrategia	Día 1		Día 9		F	η_p^2	
		M	SD	M	SD			
Amenaza en IFD	AA	12.97	±1.14	>	0.05	±0.04	133.210***	0.816
	ANA	2.66	±0.80	>	0.00	±0.00	11.139**	0.317
	PR	3.21	±1.52	>	0.24	±0.18	3.915#	0.231
Ataque en IFD	AA	5.19	±0.72	>	0.02	±0.02	57.514***	0.657
	ANA	1.01	±0.35	>	0.00	±0.00	8.046**	0.251
	PR	2.20	±1.06	>	0.01	±0.01	4.325#	0.250
Defensa / sumisión en IFD	AA	6.74	±0.69	=	9.29	±0.90	2.361	0.073
	ANA	14.07	±1.39	>	9.63	±1.00	6.066*	0.202
	PR	8.20	±1.38	=	10.37	±1.99	0.901	0.065
Huida en IFD	AA	1.42	±0.27	<	6.96	±0.83	39.891***	0.571
	ANA	6.75	±0.74	=	5.41	±0.51	2.634	0.099
	PR	3.98	±0.65	=	4.75	±0.80	0.853	0.062
Exploración a distancia en IFD	AA	3.67	±0.30	>	1.41	±0.23	25.734***	0.462
	ANA	2.37	±0.26	>	1.43	±0.21	7.651*	0.242
	PR	1.88	±0.37	>	0.73	±0.24	12.129**	0.483
Exploración no-social en IFD	AA	40.20	±1.26	>	26.16	±1.90	36.519***	0.549
	ANA	31.96	±1.70	>	22.35	±2.42	13.285**	0.356
	PR	26.82	±3.25	>	17.86	±2.39	6.704*	0.340
Inmovilidad en IFD	AA	26.30	±1.11	<	54.93	±2.20	163.141***	0.845
	ANA	38.92	±1.41	<	59.77	±1.95	118.256***	0.831
	PR	50.91	±4.99	<	65.77	±3.22	17.801**	0.578
Exploración no-social en INF	AA	70.72	±1.86	=	67.59	±2.95	1.205	0.039
	ANA	75.99	±1.45	>	56.63	±3.29	27.894***	0.538
	PR	45.64	±2.69	=	50.08	±5.05	0.999	0.071
Inmovilidad en INF	AA	13.10	±1.34	=	15.88	±2.21	1.906	0.058
	ANA	11.49	±1.03	<	25.53	±3.29	16.784***	0.412
	PR	36.49	±2.74	=	32.68	±5.22	0.503	0.037

Nota. Porcentajes medios (\pm E.E.M.) de tiempo que dedican a cada conducta en las interacciones (IFD y INF) de los días 1 y 9 para cada estrategia de afrontamiento: activos/agresivos (AA), activos/no-agresivos (ANA) y pasivos/reactivos (PR). * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; # $p > 0.05$ pero $\eta^2 > 0.138$.

El análisis de varianza de un factor (estrategias) mostró que durante la interacción del día 9, seguía habiendo conductas en las que los sujetos de las diferentes estrategias dedicaban diferentes cantidades de tiempo. Las conductas en las que las estrategias mostraron diferencias fueron la exploración no social, tanto durante la IFD ($F_{[1,67]}=3.291, p=0.043; \eta_p^2=0.082$), como durante la INF ($F_{[1,67]}=6.081, p=0.004; \eta_p^2=0.133$), y la inmovilidad, en este caso también en ambas interacciones, IFD ($F_{[1,67]}=4.962, p=0.010; \eta_p^2=0.114$) y INF ($F_{[1,67]}=6.671, p=0.002; \eta_p^2=0.152$), y en todas ellas se encontraron diferencias significativas y un tamaño del efecto grande entre el grupo AA y PR (exploración no social en IFD: $p=0.039, d$ Cohen=0.89; exploración no social en INF: $p=0.007, d$ Cohen=0.97; inmovilidad en IFD: $p=0.008; d$ Cohen=0.93; inmovilidad en INF: $p=0.003; d$ Cohen=1.04) (Fig. 3). Pero, además, los ANA también se diferenciaron de los AA en las INF (Exploración no social en INF: $p=0.037; d$ Cohen=0.71; inmovilidad en INF: $p=0.016; d$ Cohen=0.79) (Figura 35).

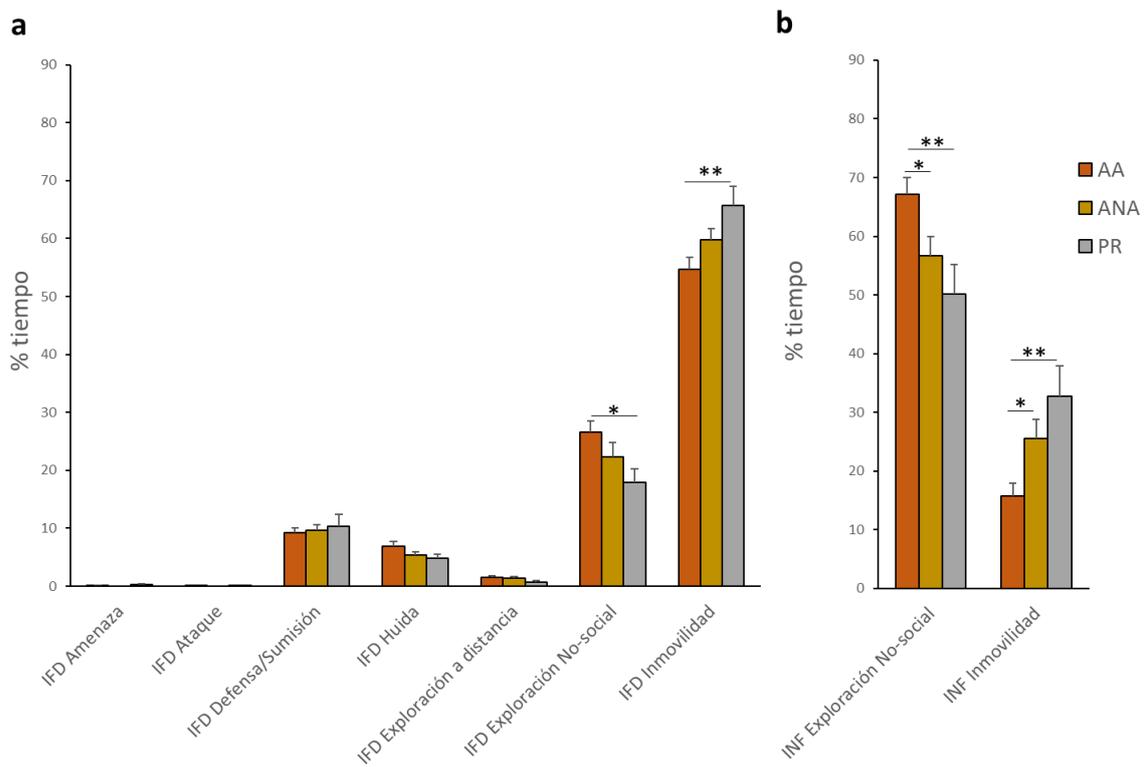


Figura 35. Porcentajes medios (\pm E.E.M.) de tiempo dedicado a cada una de las variables conductuales analizadas en la interacción física directa e interacción no-física del día 9 en el segundo experimento. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

Por otro lado, el análisis de varianza de dos factores (tiempo x tumor) mostró diferencias estadísticamente significativas para 3 de las conductas observadas durante las interacciones del día 1 y 9 en función del tumor; ataque ($F_{[1,71]}=11.666$, $p=0.001$, $\eta_p^2=0.143$) y huida ($F_{[1,71]}=4.376$, $p=0.040$, $\eta_p^2=0.058$) de la IFD y la exploración no-social de la INF ($F_{[1,68]}=6.500$, $p=0.013$, $\eta_p^2=0.087$) (Tabla 14).

Tabla 14.
Cambios conductuales según la presencia del tumor.

Conducta		Día 1		Día 9		Tiempo*Tumor	
		M	SD	MD	SD	F	η_p^2
IFD Amenaza	Tumor	6.41	±1,37	0.01	±0.01	0.358	0.005
	No-tumor	7.55	±0.97	0.13	±0.08		
IFD Ataque	Tumor	1.76	±0,41	0.00	±0.00	11.666**	0.143
	No-tumor	4.43	±0,72	0.02	±0.01		
IFD Defensa / sumisión	Tumor	10.21	±1.15	8.86	±0,83	1.348	0.019
	No-tumor	9.55	±0,96	10.46	±0,95		
IFD huida	Tumor	4.67	±0,55	5.39	±0,53	4.376*	0.058
	No-tumor	3.13	±0,58	6.49	±0,67		
IFD Exploración a distancia	Tumor	2.93	±0.30	1.46	±0.21	0.104	0.001
	No-tumor	2.80	±0,26	1.18	±0.19		
IFD Exploración No- social	Tumor	33.04	±1.62	21.40	±1.66	0.075	0.001
	No-tumor	35.88	±1.63	25.05	±1.99		
IFD inmovilidad	Tumor	39.15	±2.49	61.64	±2.01	0.081	0.001
	No-tumor	32.54	±1.91	55.88	±1.84		
INF Exploración No- Social	Tumor	69.48	±2.32	56.01	±2.68	6.500*	0.087
	No-tumor	65.65	±2.55	63.88	±3.24		
INF Inmovilidad	Tumor	18.15	±1.82	23.65	±2.20	0.019	0.000
	No-tumor	16.77	±2.24	22.02	±3.29		

Nota. Porcentajes medios (\pm E.E.M.) de tiempo que dedican a cada conducta en las interacciones (IFD y INF) de los días 1 y 9 en función del tumor. * $p<0.05$; ** $p<0.01$.

4.2.2. ESTUDIO DEL ESTRÉS CRÓNICO Y DE LAS ESTRATEGIAS DE AFRONTAMIENTO AL ESTRÉS SOBRE EL DESARROLLO TUMORAL.

El análisis de varianza de un factor (estrés crónico) indicó que 21 días después de la inoculación tumoral los animales estresados desarrollaron más focos tumorales que los animales no-estresados ($F_{[1,49]}=6.618$; $p=0.013$; d Cohen=0.91) (Figura 36a). Además, el análisis de varianza de un factor reveló diferencias según la estrategia de afrontamiento ($F_{[3,45]}=12.445$; $p<0.001$; $\eta_p^2=0.312$). El análisis post hoc indicó que eran los sujetos PR los que más focos tumorales tenían respecto a los animales no-estresados ($p<0.001$ d Cohen=4.53), los AA ($p=0.001$; d Cohen=1.79) y los ANA ($p=0.002$; d Cohen=2.73). Además, también se observó un mayor número de focos tumorales en los sujetos ANA en comparación con los no-estresados ($p=0.014$; d Cohen=1.44) (Figura 36b).

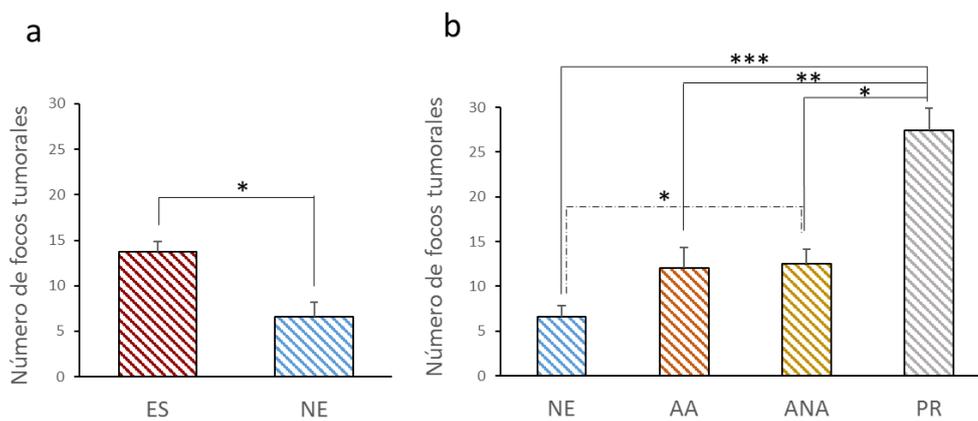


Figura 36. Valores medios (\pm E.E.M.) del número de focos tumorales encontrados de los sujetos estresados (ES) y no-estresados (NE) (a); y los animales no-estresados (NE) junto con los sujetos estresados clasificados en diferentes estrategias de afrontamiento: activos/agresivos (AA), activos/no-agresivos (ANA) y pasivos/reactivos (PR) (b). * $p<0.05$; ** $p<0.01$; *** $p<0.001$

4.2.3. ESTUDIO DEL ESTRÉS CRÓNICO SOBRE LA CONDUCTA ANSIOSO/DEPRESIVA EN ANIMALES INOCULADOS Y NO-INOCULADOS CON MELANOMA B16F10.

4.2.3.1. Efecto del tumor, del estrés crónico y de las estrategias de afrontamiento al estrés sobre SPT.

El análisis de varianza no mostró diferencias significativas ni del factor tumor ($F_{[1,97]}=0.890$; $p=0.348$; d Cohen=0.21), ni del factor estrés crónico, ($F_{[1,97]}=3.046$; $p=0.084$; d Cohen=0.45), ni una interacción entre el tumor y el estrés crónico ($F_{[1,97]}=0.010$; $p=0.921$; $\eta_p^2=0.000$) en la preferencia de sacarosa. Además, el análisis post hoc no reveló diferencias significativas en ninguno de los subgrupos. Por el contrario, sí se encontraron diferencias estadísticamente significativas y un tamaño del efecto grande en el consumo de sacarosa para el factor estrés crónico ($F_{[1,97]}=13.723$; $p<0.001$; d Cohen=0.80), siendo los sujetos estresados lo que menos sacarosa consumieron en comparación a los no estresados, mientras que no se observaron diferencias entre estos sujetos en cuanto al consumo de agua ($F_{[1,97]}=0.213$; $p=0.646$; d Cohen=0.13) (Figura 37a). En cuanto al tumor, tampoco se observaron diferencias estadísticamente significativas en el consumo de sacarosa ($F_{[1,97]}=1.427$; $p=0.235$; d Cohen=0.28), ni una interacción entre el tumor y estrés crónico ($F_{[1,97]}=0.004$; $p=0.952$; $\eta_p^2=0.000$). El análisis post hoc reveló que los animales no estresados sin tumor consumieron más sacarosa que los estresados con tumor ($p=0.003$; d Cohen=1.27) y que los estresados sin tumor ($p=0.047$; $d=0.91$), además también se encontró una diferencia cercana a la significación y con un tamaño del efecto mediano - alto entre los no estresados con tumor y los estresados con tumor ($p=0.052$; $d=0.70$) (Figura 37a).

El análisis de varianza de un factor (estrategias de afrontamiento) mostró diferencias significativas en el peso del bazo entre los 3 clústeres y los animales no estresados ($F_{[3,95]}=5.167$; $p=0.002$; $\eta_p^2=0.123$), es decir, los animales no estresados consumieron más sacarosa que los sujetos AA ($p=0.033$; d Cohen=0.74), ANA ($p=0.019$; d Cohen=0.76) y PR ($p=0.005$; d Cohen=1.01), mientras que no se observaron diferencias significativas entre las 3 estrategias AA, ANA y PR (Figura 37b).

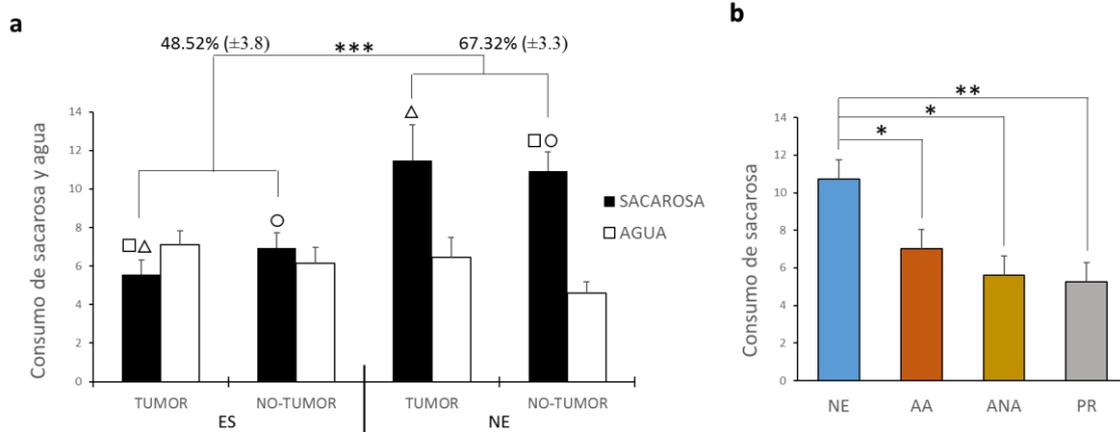


Figura 37. Porcentaje medio (\pm E.E.M.) de la sacarosa (g) y agua consumida (g) de los sujetos estresados (ES) con tumor y sin tumor, y de los sujetos no estresados (NE) con tumor y sin tumor (a); y consumo de sacarosa los animales no estresados (NE) junto con los sujetos estresados clasificados en diferentes estrategias de afrontamiento: activos/agresivos (AA), activos/no-agresivos (ANA) y pasivos/reactivos (PR) (b). * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$. Diferencias significativas entre los subgrupos $p < 0.001$; \square : Diferencias significativas entre los subgrupos $p < 0.01$; \circ : Diferencias significativas entre los subgrupos $p < 0.05$; Δ : Diferencias significativas pero con un tamaño del efecto grande entre los subgrupos.

4.2.3.2. Efecto del tumor, del estrés crónico y de las estrategias de afrontamiento al estrés sobre la conducta en FST.

El análisis de varianza de dos factores (tumor x estrés crónico) para el tiempo que permanecieron inmóviles en la prueba de FST no mostró diferencias ni del factor tumor ($F_{[1,98]}=1.326$; $p=0.252$; d Cohen=0.37), ni del factor estrés crónico ($F_{[1,98]}=0.236$; $p=0.628$; d Cohen=0.10), ni una interacción entre el tumor y el estrés crónico ($F_{[1,98]}=1.576$; $p=0.212$; $\eta^2=0.016$). Además, el análisis post hoc no reveló diferencias significativas entre ninguno de los subgrupos (Figura 38a). Por otro lado, el análisis de varianza de un factor reveló diferencias entre las estrategias de afrontamiento ($F_{[3,96]}=3.181$; $p=0.027$; $\eta^2=0.083$). El análisis post hoc indicó que estas diferencias se debían a que los animales PR permanecieron más tiempo inmóviles en la prueba de natación forzada que los sujetos AA ($p=0.023$; d Cohen=1.18) y los ANA ($p=0.040$; d Cohen=0.89) (Figura 38d).

Los resultados fueron muy similares en la conducta de natación. No se observaron diferencias ni del factor tumor ($F_{[1,98]}=0.413$; $p=0.522$; d Cohen=0.27), ni del factor estrés crónico ($F_{[1,98]}=0.000$; $p=0.989$; d Cohen=0.003), ni una interacción entre el tumor y el estrés crónico ($F_{[1,98]}=1.962$; $p=0.164$; $\eta^2=0.020$). Además, el análisis post hoc no reveló diferencias significativas entre ninguno de los subgrupos (Figura 38b). En este caso, al igual que en la conducta de inmovilidad, se encontraron diferencias en cuanto a las estrategias de afrontamiento ($F_{[3,96]}=5.536$; $p=0.002$; $\eta^2=0.129$). En este caso el análisis

post hoc reveló que los animales PR nadaron durante menos tiempo que los sujetos AA ($p=0.002$; d Cohen=1.41), los ANA ($p=0.002$; d Cohen=1.37) y los no-estresados ($p=0.008$; d Cohen=1.07) (Figura 38e).

Por último, el análisis de varianza no reveló diferencias significativas en la conducta de escalada ni del factor tumor ($F_{[1,98]}=1.676$, $p=0.167$; d Cohen=0.26), ni del factor estrés crónico ($F_{[1,98]}=0.523$, $p=0.471$; d Cohen=0.16), ni una interacción entre el tumor y el estrés crónico ($F_{[1,98]}=0.108$, $p=0.743$; $\eta_p^2=0.001$). Además, el análisis post hoc no reveló diferencias significativas entre ninguno de los subgrupos (Figura 38c). Tampoco se encontraron diferencias en la conducta de escalada para las diferentes estrategias de afrontamiento al estrés ($F_{[3,96]}=0.676$, $p=0.569$; $\eta_p^2=0.020$) (Figura 38f).

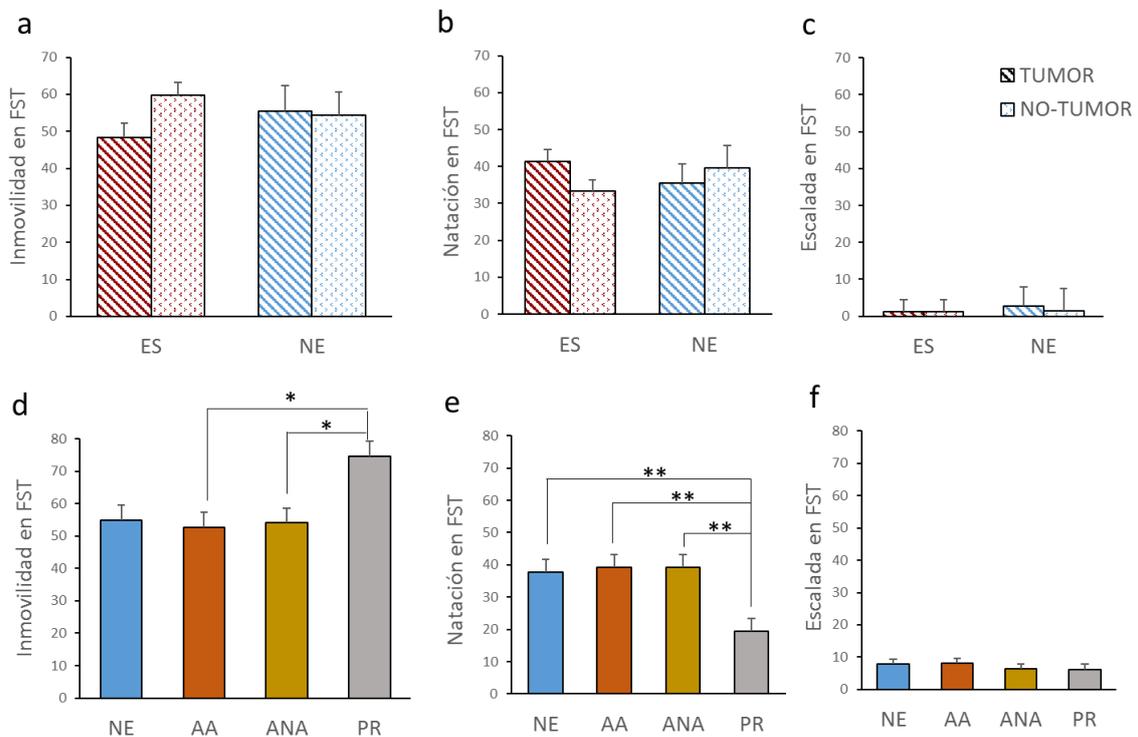


Figura 38. Porcentaje medio (\pm E.E.M.) de tiempo dedicado a la inmovilidad (a), natación (b) y escalada (c) en el test de natación forzada de los sujetos estresados (ES) con tumor y sin tumor, y de los sujetos no-estresados (NE) con tumor y sin tumor. Porcentaje medio (\pm E.E.M.) de tiempo dedicado a la inmovilidad (d), natación (e) y escalada (f) en el test de natación forzada de los animales no-estresados (NE) junto con los sujetos estresados clasificados en diferentes estrategias de afrontamiento; activos/agresivos (AA), activos/no-agresivos (ANA) y pasivos/reactivos (PR). * $p<0.05$; ** $p<0.01$.

4.2.3.3. Efecto del tumor, del estrés crónico y de las estrategias de afrontamiento al estrés sobre la conducta en el OFT.

El análisis de varianza de dos factores (tumor x estrés crónico) para el tiempo que los animales permanecieron inmóviles en la prueba de OFT no mostró diferencias ni del factor tumor ($F_{[1,98]}=0.720$; $p=0.398$; d Cohen=0.15), ni del factor estrés crónico ($F_{[1,98]}=2.248$; $p=0.137$; d Cohen=0.34), ni una interacción entre el tumor y el estrés crónico ($F_{[1,98]}=0.098$; $p=0.755$; d Cohen=0.001). Además, el análisis post hoc no reveló diferencias significativas entre ninguno de los subgrupos (Figura 39a). Por el contrario, al desglosar a los sujetos estresados en estrategias, sí se observaron diferencias significativas ($F_{[3,96]}=4.260$; $p=0.007$; $\eta_p^2=0.105$). El análisis post hoc reveló que los animales PR permanecieron más tiempo inmóviles que los sujetos no-estresados ($p=0.018$; d Cohen=0.94) y los AA ($p=0.015$; d Cohen=1.02) (Figura 39b).

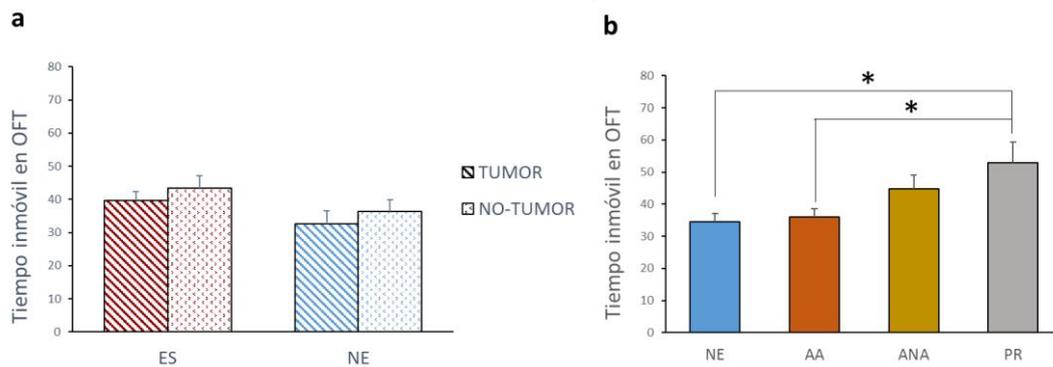


Figura 39. Promedio (\pm E.E.M.) de tiempo (seg) inmóvil de los sujetos estresados (ES) con tumor y sin tumor, y de los sujetos no-estresados (NE) con tumor y sin tumor (a); y de los animales no-estresados (NE) junto con los sujetos estresados clasificados en diferentes estrategias de afrontamiento: activos/agresivos (AA), activos/no-agresivos (ANA) y pasivos/reactivos (PR) (b). * $p<0.05$.

Los resultados fueron muy similares en cuanto a la distancia recorrida. No se observaron diferencias del factor tumor ($F_{[1,98]}=0.064$; $p=0.800$; d Cohen=0.08), ni del factor estrés crónico ($F_{[1,98]}=3.385$; $p=0.069$; d Cohen=0.42), ni una interacción entre el tumor y el estrés crónico ($F_{[1,98]}=0.032$; $p=0.859$; $\eta_p^2=0.000$). Además, el análisis post hoc no reveló diferencias significativas entre ninguno de los subgrupos (Figura 40a). Al igual que en el tiempo inmóvil, sí se encontraron diferencias en función de las estrategias de afrontamiento ($F_{[3,96]}=3.527$; $p=0.018$; $\eta_p^2=0.090$). El análisis post hoc reveló que los animales PR recorrieron menos distancia que los sujetos no-estresados ($p=0.015$; d Cohen=1.00) y los AA ($p=0.046$; d Cohen=0.89) (Figura 40b).

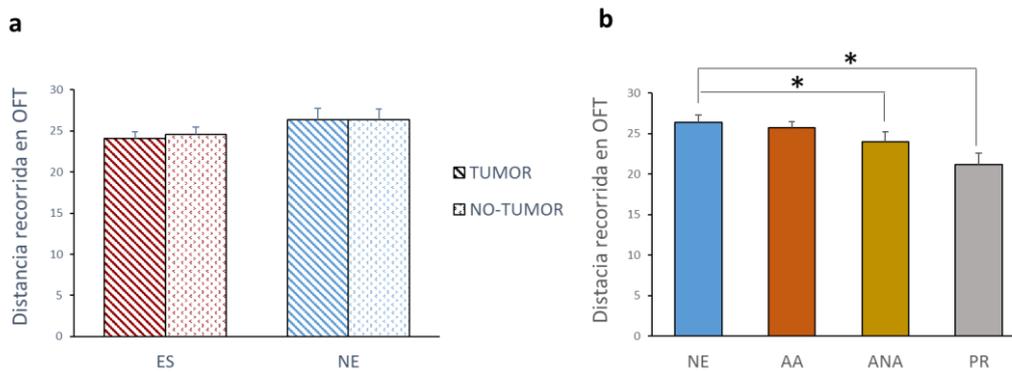


Figura 40. Promedio (± E.E.M.) de la distancia recorrida (m) de los sujetos estresados (ES) con tumor y sin tumor, y de los sujetos no estresados (NE) con tumor y sin tumor (a); y de los animales no estresados (NE) junto con los sujetos estresados clasificados en diferentes estrategias de afrontamiento: activos/agresivos (AA), activos/no-agresivos (ANA) y pasivos/reactivos (PR) (b). * $p < 0.05$.

Por otro lado, con el objetivo de observar la conducta tipo-ansiosa de los ratones, se analizó el tiempo transcurrido en el centro de la caja y la distancia media en la que los animales se mantuvieron del centro. El análisis de varianza de dos factores (tumor x estrés crónico) mostró diferencias significativas para el factor tumor en el tiempo transcurrido en el centro de la caja ($F_{[1,98]}=6.943$; $p=0.010$; d Cohen=0.46) y en la distancia media al centro de la caja ($F_{[1,98]}=14.006$; $p < 0.001$; $Cohen-en d=0.96$), siendo los animales con tumor los que menos tiempo pasaron y más lejos permanecieron del centro en comparación a los animales sin tumor (Figura 41a,c). Por el contrario, no se encontraron diferencias en el tiempo transcurrido en el centro del factor estrés crónico (Tiempo en el centro: $F_{[1,98]}=0.356$; $p=0.552$; d Cohen=0.11 / Distancia media al centro: $F_{[1,98]}=2.505$; $p=0.117$; d Cohen=0.33), ni una interacción entre el tumor y el estrés crónico (Tiempo en el centro: $F_{[1,98]}=1.589$; $p=0.211$; $\eta_p^2=0.016$ / Distancia media al centro: $F_{[1,98]}=2.177$; $p=0.143$; $\eta_p^2=0.022$). El análisis post hoc reveló diferencias significativas entre los subgrupos en la distancia medial al centro, siendo los animales estresados con tumor lo que más lejos permanecen del centro en comparación a los animales estresados-sin tumor ($p < 0.001$; d Cohen=1.17) y a los no estresados-sin tumor ($p=0.001$; d Cohen=1.11) (Figura 41a,c).

En cuanto a las estrategias de afrontamiento, no se encontraron diferencias en el tiempo transcurrido en el centro ($F_{[3,96]}=0.660$; $p=0.579$; $\eta_p^2=0.020$), ni en la distancia media que mantuvieron del centro de la caja ($F_{[3,96]}=2.386$; $p=0.074$; $\eta_p^2=0.064$) (Figura 41b,d). Además, tampoco se encontraron diferencias estadísticamente significativas en función de las estrategias al analizar sólo los sujetos con tumor (Tiempo en el centro: $F_{[3,45]}=0.939$; $p=0.430$; $\eta_p^2=0.056$ / Distancia media al centro: $F_{[3,45]}=1.484$; $p=0.323$;

$\eta_p^2=0.083$) o sólo a los no-tumor (Tiempo en el centro: $F_{[3,47]}=0.220$; $p=0.882$; $\eta_p^2=0.014$ / Distancia media al centro: $F_{[3,47]}=0.685$; $p=0.566$; $\eta_p^2=0.040$).

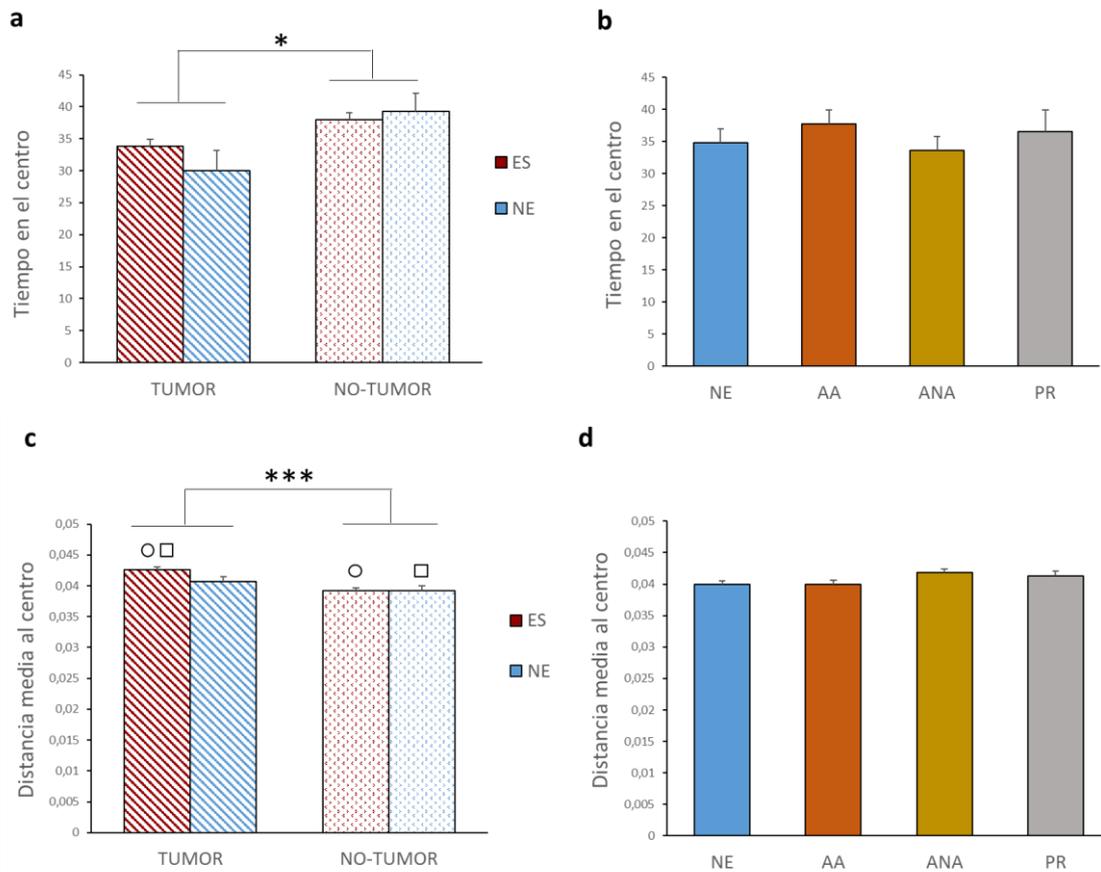


Figura 41. Promedio (\pm E.E.M.) de tiempo (seg) en el centro de la caja inmóvil de los sujetos estresados (ES) con tumor y sin tumor, y de los sujetos no estresados (NE) con tumor y sin tumor (a); y los animales no estresados (NE) junto con los sujetos estresados clasificados en diferentes estrategias de afrontamiento: activos/agresivos (AA), activos/no-agresivos (ANA) y pasivos/reactivos (PR) (b). Promedio (\pm E.E.M.) de distancia (m) al centro de la caja de los sujetos estresados (ES) con tumor y sin tumor, y de los sujetos no estresados (NE) con tumor y sin tumor (c); y de los animales no estresados (NE) junto con los sujetos estresados clasificados en las diferentes estrategias de afrontamiento: activos/agresivos (AA), activos/no-agresivos (ANA) y pasivos/reactivos (PR) (d). * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$. ○: Diferencias significativas entre los subgrupos $p < 0.001$; □: Diferencias significativas entre los subgrupos $p < 0.01$.

4.2.3.4. Efecto del tumor y de las estrategias de afrontamiento al estrés sobre la conducta en la prueba de IS.

Con el objetivo de observar el efecto del tumor sobre la conducta tras el periodo de estrés crónico, se analizó el tiempo que los animales estresados permanecían cerca del oponente durante la interacción no-física llevada a cabo el último día de estrés (día 18). El análisis de varianza de un factor (tumor) reveló que los animales con tumor permanecieron menos tiempo cerca del animal oponente durante esta prueba

($F_{[1,70]}=8.477$; $p=0.005$; d Cohen=0.76) (Figura 42a). Por otra parte, no se encontraron diferencias para esta variable en función de las estrategias de afrontamiento ($F_{[2,67]}=1.165$; $p=0.318$; $\eta_p^2=0.032$) (Figura 42b). Tampoco se encontraron diferencias en función de las estrategias dentro de los animales con tumor ($F_{[2,32]}=0.414$; $p=0.664$; $\eta_p^2=0.025$) y sin tumor ($F_{[2,32]}=0.719$; $p=0.495$; $\eta_p^2=0.041$).

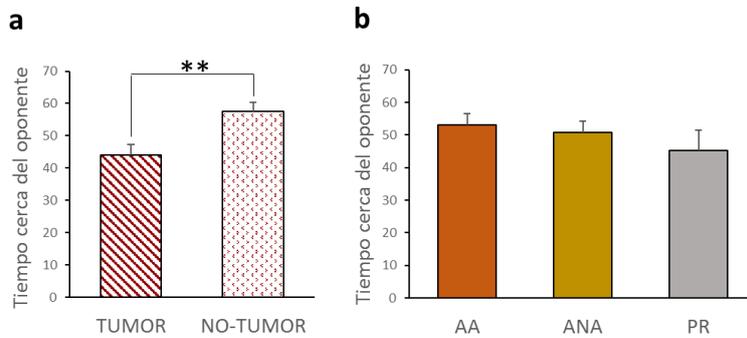


Figura 42. Porcentaje medio (\pm E.E.M.) de tiempo (seg) dentro del área del oponente durante la interacción no-física del día 18 de los animales estresados con tumor y sin tumor, y de (a); y de los sujetos estresados clasificados en las diferentes estrategias de afrontamiento: activos/agresivos (AA), activos/no-agresivos (ANA) y pasivos/reactivos (PR) (b). $**p<0.01$.

Por otro lado, también se analizó el tiempo que los animales estresados permanecían inmóviles durante esta prueba, en la cual, no se encontraron diferencias en función del tumor ($F_{[1,70]}=1.637$; $p=0.205$; d Cohen=0.30) (Figura 43a), pero sí en función de las estrategias ($F_{[2,67]}=7.716$; $p=0.001$; $\eta_p^2=0.158$). El análisis post hoc reveló que los sujetos PR estuvieron más tiempo inmóviles que los animales AA ($p=0.001$; d Cohen=1.25). Además, los ratones ANA, también permanecieron más tiempo inmóviles que los animales AA ($p=0.046$; d Cohen=0.71) (Figura 43b).

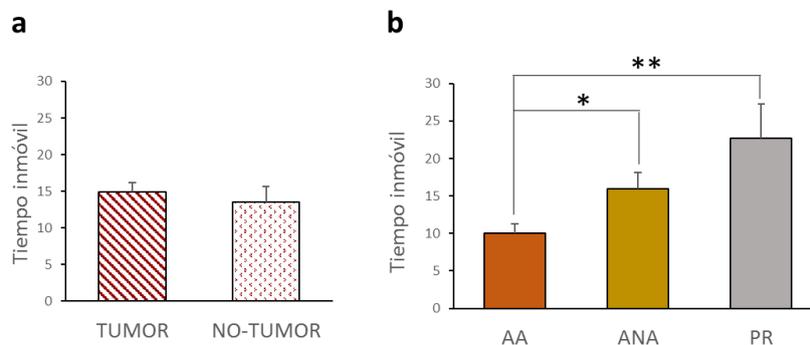


Figura 43. Porcentaje medio (\pm E.E.M.) de tiempo (seg) dedicados a la inmovilidad durante la interacción no-física del día 18 de los animales estresados con tumor y sin tumor, y de (a); y de los sujetos estresados clasificados en las diferentes estrategias de afrontamiento: activos/agresivos (AA), activos/no-agresivos (ANA) y pasivos/reactivos (PR) (b). $*p<0.05$; $**p<0.01$.

4.2.4. ESTUDIO DEL ESTRÉS CRÓNICO SOBRE VARIABLES FISIOLÓGICAS EN ANIMALES INOCULADOS Y NO-INOCULADOS CON MELANOMA B16F10.

4.2.4.1. Efecto del tumor, del estrés crónico y de las estrategias de afrontamiento del estrés sobre los niveles plasmáticos de corticosterona.

El análisis de varianza de tres factores (tiempo x estrés crónico x tumor) con medidas repetidas reveló diferencias significativas y un tamaño del efecto grande del factor tiempo ($F_{[1,93]}=91.736$; $p<0.001$; $\eta_p^2=0.497$) y tiempo x estrés crónico ($F_{[1,93]}=74.192$; $p<0.001$; $\eta_p^2=0.444$) entre los niveles de corticosterona basales y los obtenidos 40 minutos después de las interacciones de los días 1 y 9. Los animales estresados mostraron mayores niveles de corticosterona que los sujetos no-estresados tras las interacciones (Figura 44a), siendo los niveles del día 9 significativamente inferiores que los del día 1 ($F_{[1,93]}=241.512$; $p<0.001$; $\eta_p^2=0.711$). Por el contrario, estos análisis no mostraron diferencias significativas al analizar la interacción entre tiempo x tumor ($F_{[1,93]}=2.253$; $p=0.137$; $\eta_p^2=0.024$), ni la interacción entre tiempo x tumor x estrés ($F_{[1,93]}=0.127$; $p=0.722$; $\eta_p^2=0.001$). Además, el análisis post hoc reveló que los dos subgrupos de estresados (tumor / no-tumor) mostraron un mayor incremento de los niveles de corticosterona que ambos grupos de no-estresados (tumor / no-tumor) tanto después de la interacción del día 1 (estresados con tumor - no estresados con tumor: $p<0.001$ d Cohen=2.76 / estresados con tumor - no estresados sin tumor: $p<0.001$ d Cohen=2.81 / estresados sin tumor - no estresados con tumor: $p<0.001$ d Cohen=0.84 / estresados sin tumor - no estresados sin tumor: $p<0.001$ d Cohen=2.63), como del día 9 (estresados con tumor - no estresados con tumor: $p<0.001$ d Cohen=2.55 / estresados con tumor - no estresados sin tumor: $p<0.001$ d Cohen=2.28 / estresados sin tumor - no estresados con tumor: $p<0.001$ d Cohen=2.64 / estresados sin tumor - no estresados sin tumor: $p<0.001$ d Cohen=2.39) (Figura 44a).

Por último, con el objetivo de obtener un nivel final de corticosterona, se extrajeron las muestras a todos los sujetos antes del sacrificio de los mismos, esto es, 5-10 minutos después de la prueba FST. El análisis de varianza de dos factores (tumor y estrés crónico) mostró diferencias significativas en función del estrés crónico, siendo los

sujetos estresados los que tenían mayores niveles de corticosterona en comparación a los animales no-estresados ($F_{[1,96]}=11.933$; $p=0.001$; d Cohen=0.77) (Figura 44b). Por el contrario, no se encontraron diferencias en función del tumor ($F_{[1,96]}=1.325$; $p=0.253$; d Cohen=0.12), ni una interacción entre el tumor y el estrés crónico ($F_{[1,96]}=1.156$; $p=0.285$; $\eta_p^2=0.012$). El análisis post hoc reveló que los animales no-estresados con tumor, tenían niveles menores que los sujetos estresados con tumor ($p=0.012$; d Cohen=1.04) y los estresados sin tumor ($p=0.011$; d Cohen=1.00) (Figura 44b).

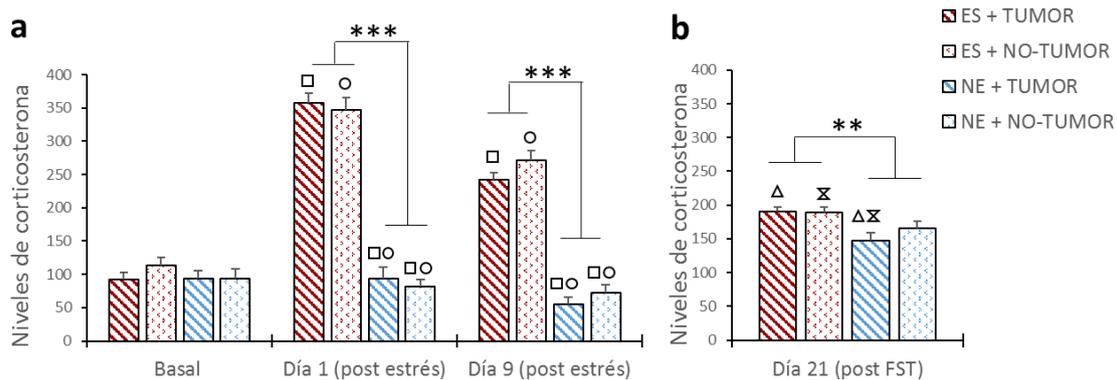


Figura 44. Niveles medios (\pm E.E.M.) de corticosterona en plasma (ng/ml) obtenidos por punción submandibular antes del estrés y los días 1 y 9 de estrés (a) y tras la prueba FST del día 21 (b) de los sujetos estresados (ES) con tumor y sin tumor y los sujetos no-estresados (NE) con tumor y sin tumor. $**p<0.01$; $***p<0.001$. □ : Diferencias significativas entre los subgrupos $p<0.001$; ○ : Diferencias significativas entre los subgrupos $p<0.001$; △ : Diferencias significativas entre los subgrupos $p<0.05$; ✕ : Diferencias significativas entre los subgrupos $p<0.05$.

En cuanto a las estrategias de afrontamiento al estrés, en análisis de varianza de un factor mostró diferencias significativas entre el factor tiempo x estrategias ($F_{[3,91]} = 29.427$; $p<0.001$; $\eta_p^2=0.492$). El análisis post hoc reveló que los animales no estresados tenían niveles menores que las tres estrategias de afrontamiento tanto después de la interacción del día 1 (AA: $p<0.001$; d Cohen=2.62 / ANA: $p<0.001$; d Cohen=2.89 / PR: $p<0.001$; d Cohen=2.84) como tras la interacción del día 9 (AA: $p<0.001$; d Cohen=2.44 / ANA: $p<0.001$; d Cohen=2.52 / PR: $p<0.001$; d Cohen=2.94) y además, los sujetos ANA mostraron mayores niveles de corticosterona en comparación con los animales AA tras la interacción del día 1 ($p=0.028$; d Cohen=0.66) (Figura 45a). Por último, también se encontraron diferencias significativas en los niveles de corticosterona el día 21 en función de las estrategias ($F_{[3,94]} = 3.913$; $p=0.011$; $\eta_p^2=0.111$), siendo otra vez los sujetos con estrategias ANA los únicos que mostraron niveles más elevados de corticosterona en comparación a los no-estresados el día 21 ($p=0.012$; d Cohen=0.91) (Figura 45b).

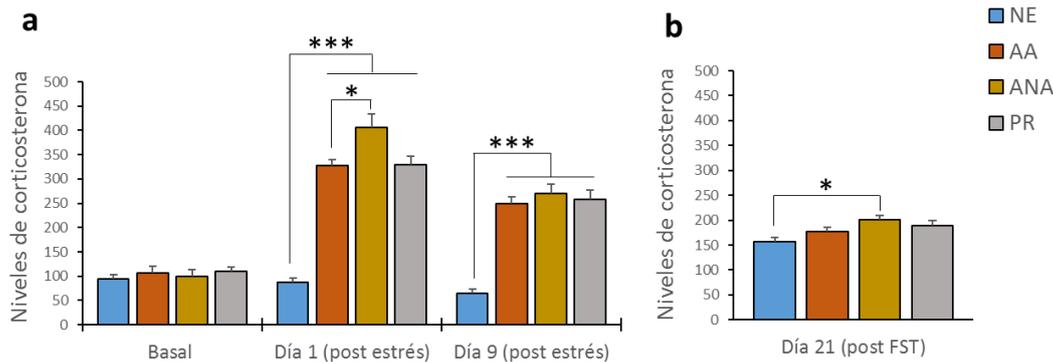


Figura 45. Niveles medios (\pm E.E.M.) de corticosterona en plasma (ng/ml) obtenidos por punción submandibular antes del estrés y los días 1 y 9 de estrés (a) y tras la prueba FST del día 21 (b) de los sujetos no-estresados (NE) junto con los sujetos estresados clasificados en las diferentes estrategias de afrontamiento: activos/agresivos (AA), activos/no-agresivos (ANA) y pasivos/reactivos (PR). * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$.

4.2.4.2. Efecto del tumor, del estrés crónico y de las estrategias de afrontamiento del estrés sobre el peso del bazo.

El análisis de varianza de dos factores (tumor x estrés crónico) reveló que el bazo de los animales estresados tenía un peso proporcional al peso corporal mayor que el bazo de los sujetos no-estresados ($F_{[1,98]}=47.480$; $p < 0.001$; $\eta_p^2=0.326$) (Figura 46a), mientras que no se encontraron diferencias del factor tumor ($F_{[1,98]}=0.048$; $p=0.828$; d Cohen=0.05), ni una interacción entre el tumor y el estrés crónico ($F_{[1,98]}=0.215$; $p=0.644$; $\eta_p^2=0.002$). El análisis post hoc reveló que los dos subgrupos de estresados (tumor / no-tumor) mostraron un menor consumo de sacarosa que ambos grupos de no-estresados (tumor / no-tumor) (estresados con tumor - no estresados con tumor: $p < 0.001$; d Cohen=2.20 / estresados con tumor - no estresados sin tumor: $p < 0.001$; d Cohen=1.78 / estresados sin tumor - no estresados con tumor: $p < 0.001$; d Cohen=1.21 / estresados sin tumor - no estresados sin tumor: $p < 0.001$; d Cohen=1.65) (Figura 46a). El análisis de varianza de un factor (estrategias de afrontamiento) mostró diferencias en el peso del bazo ($F_{[3,96]}=15.697$; $p < 0.001$; $\eta_p^2=0.248$), siendo los sujetos no-estresados los que tenían un menor peso del bazo en comparación a los AA ($p < 0.001$; d Cohen=1.52), ANA ($p < 0.001$; d Cohen=1.30) y PR ($p < 0.001$; d Cohen=1.33), mientras que no se observaron diferencias significativas entre las estrategias AA, ANA y PR (Figura 46b).

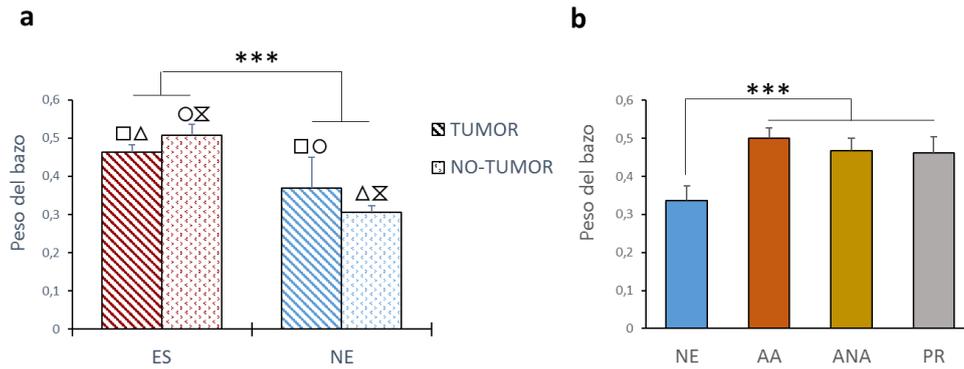


Figura 46. Peso (g) medio (\pm E.E.M.) del bazo de los sujetos estresados (ES) con tumor y sin tumor y los sujetos no-estresados (NE) con tumor y sin tumor (a); y de los sujetos no-estresados (NE) junto con los sujetos estresados clasificados en las diferentes estrategias de afrontamiento: activos/agresivos (AA), activos/no-agresivos (ANA) y pasivos/reactivos (PR) (b). *** $p < 0.001$. □: Diferencias significativas entre los subgrupos $p < 0.001$; ○: Diferencias significativas entre los subgrupos $p < 0.001$. Δ: Diferencias significativas entre los subgrupos $p < 0.001$; X: Diferencias significativas entre los subgrupos $p < 0.001$

4.2.4.3. Efecto del tumor, del estrés crónico y de las estrategias de afrontamiento del estrés sobre el peso corporal.

El análisis de varianza de tres factores (tiempo x estrés crónico x tumor) con medidas repetidas reveló diferencias significativas del factor tiempo ($F_{[1,98]}=24.197$; $p < 0.001$; $\eta_p^2=0.198$) y tiempo x estrés crónico ($F_{[1,98]}=23.823$; $p < 0.001$; $\eta_p^2=0.196$) en el peso corporal de los animales. Los ratones estresados mostraron un menor incremento del peso corporal que los sujetos no-estresados tras 9 días de estrés ($F_{[1,102]}=37.068$; $p < 0.001$; $\eta_p^2=0.267$). Del día 9 al día 21, no se encontraron diferencias significativas en el incremento del peso en función del estrés ($F_{[1,85]}=0.000$, $p=0.994$, $\eta_p^2=0.000$), por lo que los animales estresados tuvieron un menor incremento del peso corporal durante todo el experimento ($F_{[1,85]}=22.231$, $p < 0.001$, $\eta_p^2=0.207$) (Figura 47). Por el contrario, estos análisis no mostraron diferencias significativas al analizar la interacción entre tiempo x tumor ($F_{[1,98]}=1.799$; $p=0.183$; $\eta_p^2=0.018$), aunque sí se observó una interacción entre tiempo x estrés crónico x tumor con un tamaño del efecto pequeño ($F_{[1,98]}=4.291$; $p=0.041$; $\eta_p^2=0.042$). El análisis post hoc reveló que los animales no estresados con tumor tuvieron un incremento mayor que los animales estresados con tumor ($p=0.001$; d Cohen=1.21) y los estresados sin tumor ($p < 0.001$; d Cohen=1.75).

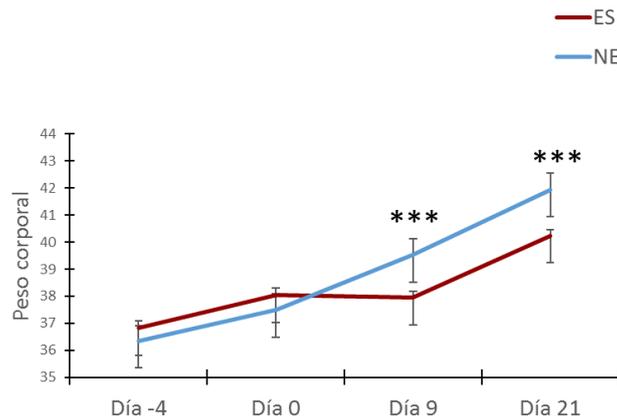


Figura 47. Peso corporal (g) medio (\pm E.E.M.) de los sujetos estresados (ES) y los sujetos no-estresados (NE) durante diferentes momentos del experimento. *** $p < 0.001$.

El análisis de varianza de dos factores (tiempo x estrategias) reveló diferencias significativas en la interacción tiempo x estrategias ($F_{[3,96]}=7.436$; $p < 0.001$; $\eta_p^2=0.189$) en el incremento del peso corporal, pero el análisis post hoc reveló que eran los no estresados los que aumentaban más de peso el día 9 en comparación a los AA ($p < 0.001$; d Cohen=1.48), ANA ($p < 0.001$; d Cohen=1.14) y PR ($p=0.003$; d Cohen=1.31), mientras que no se encontraron diferencias entre las tres estrategias AA, ANA y PR. Además, como ocurría con el factor estrés, se encontraron diferencias en el peso aumentado desde el inicio hasta el final del experimento en función de las estrategias ($F_{[3,96]}=7.805$; $p < 0.001$; $\eta_p^2=0.196$), pero el análisis post hoc reveló que solo los animales no estresados tuvieron un mayor incremento de peso corporal en comparación a los AA ($p < 0.001$; d Cohen=1.10) y ANA ($p=0.011$; d Cohen=0.90) (Figura 48).

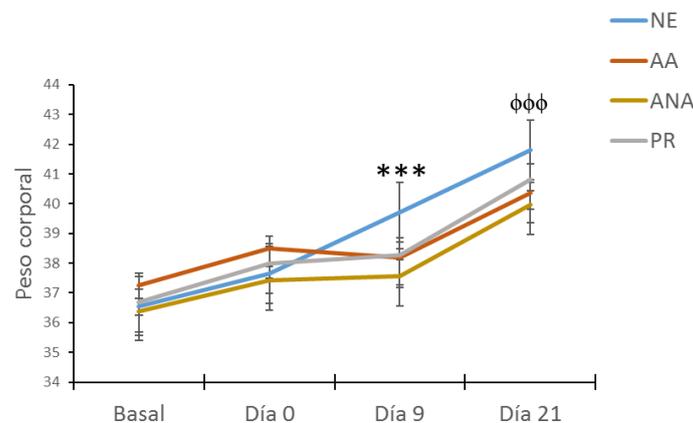


Figura 48. Peso corporal (g) medio (\pm E.E.M.) de los sujetos no-estresados (NE) junto con los sujetos estresados clasificados en las diferentes estrategias de afrontamiento: activos/agresivos (AA), activos/no-agresivos (ANA) y pasivos/reactivos (PR), durante diferentes momentos del experimento. ***Diferencias significativas de los animales NE con los AA, ANA y PR, $p < 0.01$. ΦΦΦDiferencias significativas de los animales NE con los AA y ANA, $p < 0.05$.

4.2.4.4. Efecto del tumor, del estrés crónico y de las estrategias de afrontamiento del estrés sobre la expresión de la enzima IDO en el estriado y en el hipocampo.

Análisis de la expresión de la enzima IDO en el estriado.

El análisis de varianza de dos factores (tumor x estrés crónico) no mostró diferencias significativas ni del factor tumor ($F_{[1,96]}=0.307$; $p=0.581$; d Cohen=0.24), ni del factor estrés crónico ($F_{[1,96]}=0.023$; $p=0.879$; d Cohen=0.03), ni una interacción entre el tumor y el estrés crónico ($F_{[1,96]}=1.355$; $p=0.247$; $\eta_p^2=0.014$). Además, el análisis post hoc no reveló diferencias significativas entre ninguno de los subgrupos (Figura 49a). El análisis de varianza de un grupo no reveló diferencias significativas referentes a la estrategia de afrontamiento al estrés ($F_{[3,94]}=1.973$; $p=0.123$; $\eta_p^2=0.056$) (Figura 49b).

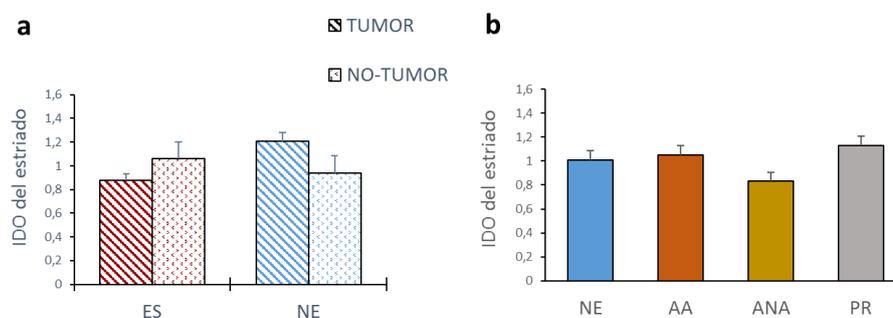


Figura 49. Niveles medios (\pm E.E.M.) de expresión génica de la enzima IDO en el estriado de los sujetos estresados (ES) con tumor y sin tumor y los sujetos no-estresados (NE) con tumor y sin tumor (a); y de los sujetos no-estresados (NE) junto con los sujetos estresados clasificados en las diferentes estrategias de afrontamiento: activos/agresivos (AA), activos/no-agresivos (ANA) y pasivos/reactivos (PR) (b).

Análisis de la expresión de la enzima IDO en el hipocampo.

El análisis de varianza de dos factores (tumor x estrés crónico) mostró que los animales con tumor tenían mayores niveles de la enzima IDO en el hipocampo que los animales sin tumor ($F_{[1,97]}=13.456$; $p<0.001$; d Cohen=0.77) (Figura 50a). Mientras que no se observaron diferencias en función ni del factor estrés crónico ($F_{[1,97]}=3.188$; $p=0.077$; d Cohen=0.35), ni una interacción entre el tumor y el estrés crónico ($F_{[1,97]}=0.132$; $p=0.717$; $\eta_p^2=0.001$). El análisis post hoc mostró que los sujetos estresados-sin tumor tenían niveles menores de IDO en el hipocampo que los estresados con tumor ($p=0.012$; d Cohen=0.79) y que los no estresados-con tumor ($p=0.001$; d Cohen=1.03) (Figura 50a). El análisis de varianza de un factor indicó que no había diferencias en función de las estrategias de afrontamiento ($F_{[3,95]}=0.953$; $p=0.418$; $\eta_p^2=0.028$) (Figura 50b). Además, tampoco se

encontraron diferencias en función de las estrategias dentro los animales con tumor ($F_{[3,45]}=1.862$; $p=0.150$; $\eta_p^2=0.099$) y dentro de los animales sin tumor ($F_{[3,46]}=0.355$; $p=0.785$; $\eta_p^2=0.022$).

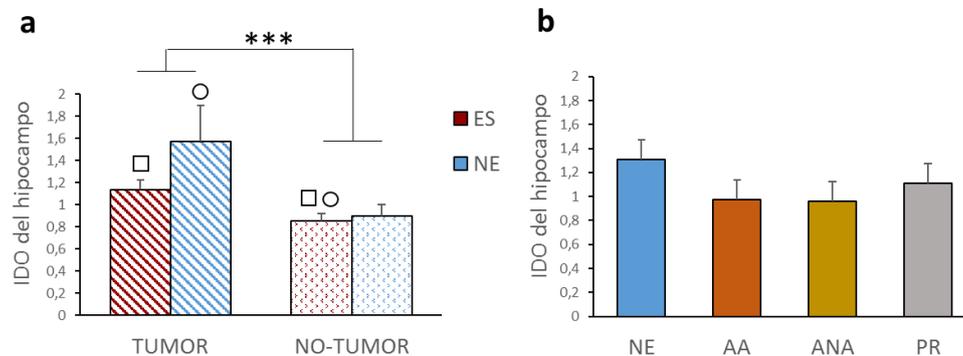


Figura 50. Niveles medios (\pm E.E.M.) de expresión génica de la enzimaIDO en el hipocampo de los sujetos estresados (ES) con tumor y sin tumor y los sujetos no estresados (NE) con tumor y sin tumor (a); y de los sujetos no estresados (NE) junto con los sujetos estresados clasificados en las diferentes estrategias de afrontamiento: activos/agresivos (AA), activos/no-agresivos (ANA) y pasivos/reactivos (PR) (b). *** $p<0.001$. O: Diferencias significativas entre los subgrupos $p<0.01$; □: Diferencias significativas entre los subgrupos $p<0.05$.

4.2.4.5. Efecto del tumor, del estrés crónico y de las estrategias de afrontamiento del estrés sobre la expresión de la enzima TDO en el estriado y en el hipocampo.

Análisis de la expresión de la enzima TDO en el estriado.

El análisis de varianza de dos factores (tumor x estrés crónico) mostró que los animales con tumor tenían mayores niveles de la enzima TDO en el estriado que los animales sin tumor ($F_{[1,98]}=15.802$; $p<0.001$; d Cohen=1.02) (Figura 51a). Mientras que no se observaron diferencias ni del factor estrés crónico ($F_{[1,98]}=0.020$; $p=0.887$; d Cohen=0.01), ni una interacción entre el tumor y el estrés crónico ($F_{[1,98]}=2.338$; $p=0.130$; $\eta_p^2=0.023$). El análisis post hoc mostró que los animales estresados sin tumor tenían niveles más bajos de TDO en el estriado que los sujetos estresados con tumor ($p<0.001$; d Cohen=1.23) y los no estresados-con tumor ($p=0.025$; d Cohen=1.07). Además, los ratones estresados con tumor tenían niveles más elevados que los animales no estresados sin tumor ($p=0.035$; d Cohen=0.73) (Figura 51a). El análisis de varianza de un grupo reveló que no había diferencias significativas referentes a la estrategia de afrontamiento al estrés ($F_{[3,96]}=0.403$; $p=0.751$; $\eta_p^2=0.012$) (Figura 51b). Tampoco se encontraron diferencias en función de las estrategias entre los sujetos con tumor ($F_{[3,45]}=0.673$; $p=0.573$; $\eta_p^2=0.041$) y sin tumor ($F_{[3,47]}=0.597$; $p=0.620$; $\eta_p^2=0.035$).

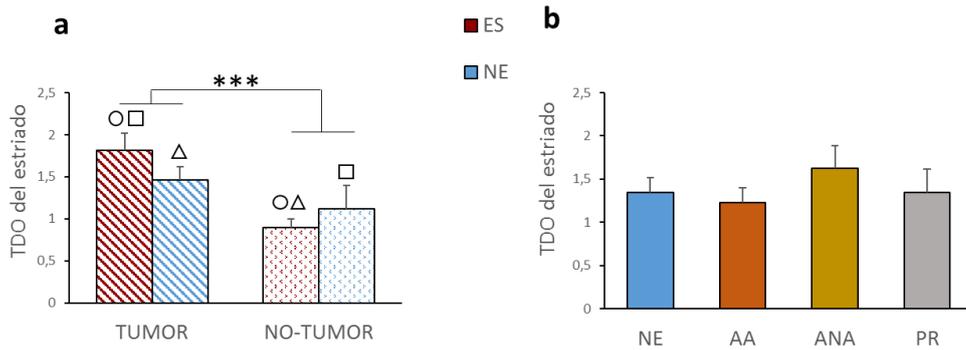


Figura 51. Niveles medios (\pm E.E.M.) de expresión génica de la enzima TDO en el estriado de los sujetos estresados (ES) con tumor y sin tumor y los sujetos no-estresados (NE) con tumor y sin tumor (a); y de los sujetos no-estresados (NE) junto con los sujetos estresados clasificados en las diferentes estrategias de afrontamiento: activos/agresivos (AA), activos/no-agresivos (ANA) y pasivos/reactivos (PR) (b). *** $p < 0.001$. ○: Diferencias significativas entre los subgrupos $p < 0.001$; □: Diferencias significativas entre los subgrupos $p < 0.05$; △: Diferencias significativas entre los subgrupos $p < 0.05$.

Análisis de la expresión de la enzima TDO en el hipocampo.

El análisis de varianza de dos factores (tumor x estrés crónico) no mostró diferencias significativas ni del factor tumor ($F_{[1,95]}=0.879$; $p=0.351$; d Cohen=0.04), ni del factor estrés crónico ($F_{[1,95]}=0.488$; $p=0.487$; d Cohen=0.16), ni una interacción entre el tumor y el estrés crónico ($F_{[1,95]}=2.579$; $p=0.112$; $\eta_p^2=0.026$). Además, el análisis post hoc no reveló diferencias significativas entre ninguno de los subgrupos (Figura 52a). El análisis de varianza de un grupo mostró diferencias significativas en función de las estrategias de afrontamiento al estrés ($F_{[3,94]}=5.762$; $p=0.001$; $\eta_p^2=0.134$), siendo los animales ANA los que tenían niveles más bajo de TDO del hipocampo en comparación a los sujetos PR ($p=0.001$; d Cohen=1.38) (Figura 52b).

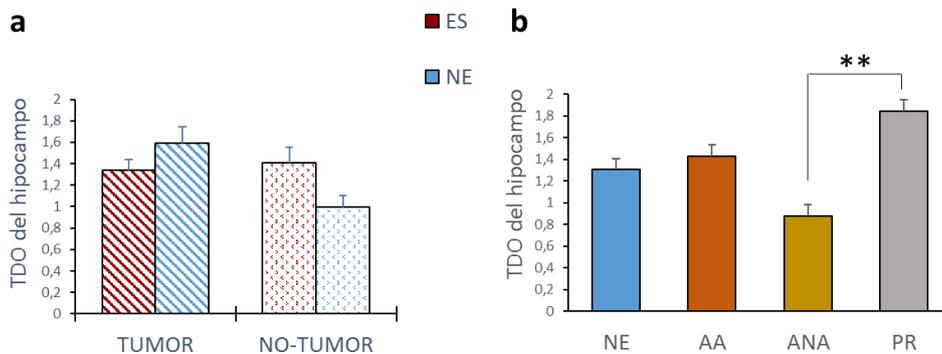


Figura 52. Niveles medios (\pm E.E.M.) de expresión génica de la enzima TDO en el hipocampo de los sujetos estresados (ES) con tumor y sin tumor y los sujetos no-estresados (NE) con tumor y sin tumor (a); y de los sujetos no-estresados (NE) junto con los sujetos estresados clasificados en las diferentes estrategias de afrontamiento: activos/agresivos (AA), activos/no-agresivos (ANA) y pasivos/reactivos (PR) (b). ** $p < 0.01$.

4.2.4.6. Efecto del tumor, del estrés crónico y de las estrategias de afrontamiento del estrés sobre la expresión de la enzima iNOS en el estriado y en el hipocampo.

Análisis de la expresión de la enzima iNOS en el estriado.

El análisis de varianza de dos factores (tumor x estrés crónico) no mostró diferencias significativas ni del factor tumor ($F_{[1,98]}=1.001$; $p=0.320$; d Cohen=0.23), ni del factor estrés crónico ($F_{[1,98]}=2.974$; $p=0.088$; d Cohen=0.39), ni una interacción entre el tumor y el estrés crónico ($F_{[1,98]}=0.007$; $p=0.933$; $\eta_p^2=0.000$). Además, el análisis post hoc no reveló diferencias significativas entre ninguno de los subgrupos (Figura 53a). El análisis de varianza de un grupo reveló diferencias significativas en función de las estrategias de afrontamiento al estrés crónico ($F[3,96]=0.403$; $p=0.041$; $\eta_p^2=0.076$). El análisis post hoc reveló que los animales ANA tenían niveles más altos de iNOS del estriado que los sujetos no-estresados ($p=0.031$; d Cohen=0.72) (Figura 53b).

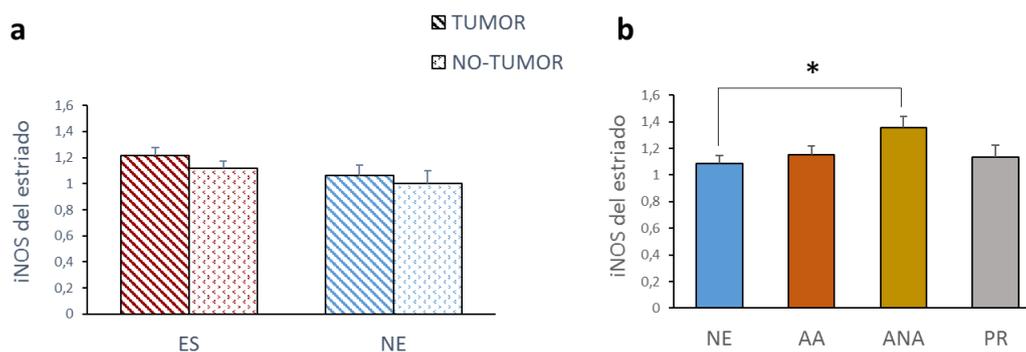


Figura 53. Niveles medios (\pm E.E.M.) de expresión génica de la enzima iNOS en el estriado de los sujetos estresados (ES) con tumor y sin tumor, los sujetos no-estresados (NE) con tumor y sin tumor y los animales (a); y de los sujetos no-estresados (NE) junto con los sujetos estresados clasificados en las diferentes estrategias de afrontamiento: activos/agresivos (AA), activos/no-agresivos (ANA) y pasivos/reactivos (PR)(b). * $p<0.05$.

Análisis de la expresión de la enzima iNOS en el hipocampo.

El análisis de varianza de dos factores (tumor x estrés crónico) mostró diferencias estadísticamente significativas en función del factor estrés crónico ($F_{[1,96]}=6.653$; $p=0.011$; d Cohen=0.56). Los animales estresados tenían niveles de iNOS del hipocampo más elevado que los sujetos no-estresados (Figura 54a). Mientras, no se observaron diferencias ni del factor tumor ($F_{[1,96]}=2.598$; $p=0.110$; d Cohen=0.41), ni una interacción entre el tumor y el estrés crónico ($F_{[1,96]}=0.343$; $p=0.559$; $\eta_p^2=0.004$). El análisis post hoc mostró que los animales estresados sin tumor tenían niveles más elevados de iNOS en

el hipocampo que los sujetos no estresados-con tumor ($p=0.020$; d Cohen=0.92) (Figura 54a). El análisis de varianza de un grupo no reveló diferencias significativas referentes a la estrategia de afrontamiento al estrés ($F_{[3,96]}=2.357$; $p=0.077$; $\eta_p^2=0.065$) (Figura 54b).

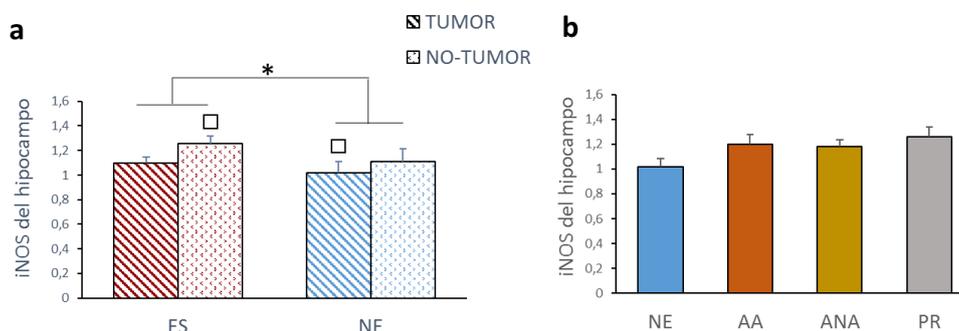


Figura 54. Niveles medios (\pm E.E.M.) de expresión génica de la enzima iNOS en el hipocampo de los sujetos estresados (ES) con tumor y sin tumor y los sujetos no-estresados (NE) con tumor y sin tumor (a); y de los sujetos no-estresados (NE) junto con los sujetos estresados clasificados en las diferentes estrategias de afrontamiento: activos/agresivos (AA), activos/no-agresivos (ANA) y pasivos/reactivos (PR) (b). * $p<0.05$. □: Diferencias significativas entre los subgrupos $p<0.05$.

4.2.4.7. Efecto del tumor, del estrés crónico y de las estrategias de afrontamiento del estrés sobre la expresión de la citocina IL-6 en el estriado y en el hipocampo.

Análisis de la expresión de la citocina IL-6 en el estriado.

El análisis de varianza de dos factores (tumor x estrés crónico) mostró que los animales con tumor tenían mayores niveles de la citocina IL-6 en el estriado que los animales sin tumor ($F_{[1,98]}=18.402$; $p<0.001$; d Cohen=0.87) (Figura 55a). Mientras que no se observaron diferencias ni del factor estrés crónico ($F_{[1,98]}=3.120$; $p=0.080$; d Cohen=0.38), ni una interacción entre el tumor y el estrés crónico ($F_{[1,98]}=0.533$; $p=0.467$; $\eta_p^2=0.005$). El análisis post hoc mostró que los animales estresados con tumor tenían niveles más elevados de IL-6 que los sujetos estresados sin tumor ($p=0.006$; d Cohen=0.76) y los no estresados sin tumor ($p<0.001$; d Cohen=1.27). Además, los ratones no estresados con tumor tenían niveles más elevados de IL-6 que los no estresados sin tumor ($p=0.019$; d Cohen=1.22) (Figura 55a). El análisis de varianza de un factor no reveló diferencias significativas en función de las estrategias de afrontamiento al estrés ($F_{[3,96]}=2.095$; $p=0.106$; $\eta_p^2=0.058$) (Figura 55b). Tampoco se encontraron diferencias en función de las estrategias entre los sujetos con tumor ($F_{[3,45]}=0.694$; $p=0.561$; $\eta_p^2=0.042$) y sin tumor ($F_{[3,47]}=1.359$; $p=0.267$; $\eta_p^2=0.074$).

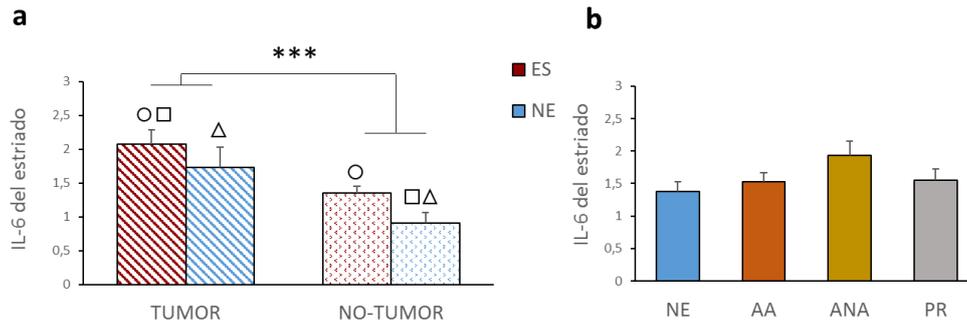


Figura 55. Niveles medios (\pm E.E.M.) de expresión génica de la ciclotina IL-6 en el estriado de los sujetos estresados (ES) con tumor y sin tumor y los sujetos no-estresados (NE) con tumor y sin tumor (a); y de los sujetos no-estresados (NE) junto con los sujetos estresados clasificados en las diferentes estrategias de afrontamiento: activos/agresivos (AA), activos/no-agresivos (ANA) y pasivos/reactivos (PR) (b). *** $p < 0.001$. □: Diferencias significativas entre los subgrupos $p < 0.001$; ○: Diferencias significativas entre los subgrupos $p < 0.01$; Δ: Diferencias significativas entre los subgrupos $p < 0.05$.

Análisis de la expresión de la citocina IL-6 en el hipocampo.

El análisis de varianza de dos factores (tumor x estrés crónico) no mostró diferencias significativas ni del factor tumor ($F_{[1,91]}=0.030$; $p=0.862$; d Cohen=0.20), ni del factor estrés crónico ($F_{[1,91]}=0.492$; $p=0.485$; d Cohen=0.17). Sí se observó una interacción entre el tumor y el estrés crónico, con un tamaño del efecto pequeño ($F_{[1,91]}=5.072$; $p=0.027$; $\eta_p^2=0.053$), sin embargo, el análisis post hoc reveló que no había diferencias significativas entre ninguno de los subgrupos (Figura 56a). El análisis de varianza de un factor no reveló diferencias significativas en función de las estrategias de afrontamiento al estrés ($F_{[3,89]}=0.651$; $p=0.584$; $\eta_p^2=0.021$) (Figura 56b).

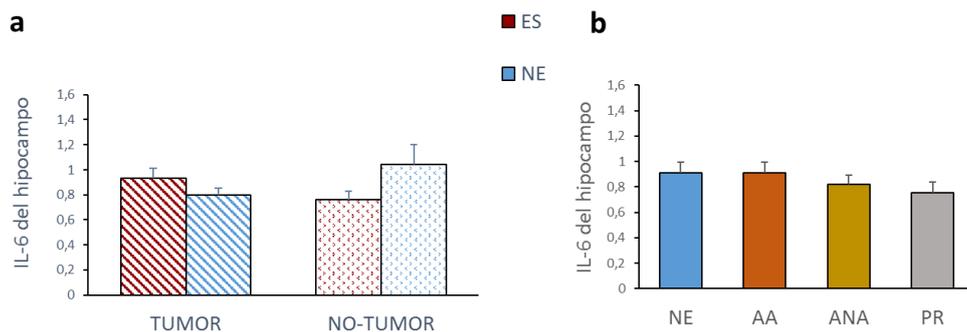


Figura 56. Niveles medios (\pm E.E.M.) de expresión génica de la citosina IL-6 en el hipocampo de los sujetos estresados (ES) con tumor y sin tumor y los sujetos no-estresados (NE) con tumor y sin tumor (a); y de los sujetos no-estresados (NE) junto con los sujetos estresados clasificados en las diferentes estrategias de afrontamiento: activos/agresivos (AA), activos/no-agresivos (ANA) y pasivos/reactivos (PR) (b).

4.2.4.8. Efecto del tumor, del estrés crónico y de las estrategias de afrontamiento del estrés sobre la expresión de la citocina TNF- α en el estriado y en el hipocampo.

Análisis de la expresión de la citocina TNF α en el estriado.

El análisis de varianza de dos factores (tumor x estrés crónico) mostró diferencias estadísticamente significativas en función del factor estrés crónico ($F_{[1,98]}=6.394$; $p=0.013$; d Cohen=0.54). Los estresados tenían niveles de TNF α del estriado más elevado que los no-estresados (*Figura 57a*). Por el contrario, no se observaron diferencias ni del factor tumor ($F_{[1,98]}=0.562$; $p=0.455$; d Cohen=0.26), ni una interacción entre el tumor y el estrés crónico ($F_{[1,98]}=0.909$; $p=0.343$; $\eta_p^2=0.009$). Además, el análisis post hoc no reveló diferencias significativas entre ninguno de los subgrupos. El análisis de varianza de un factor reveló diferencias significativas referentes a la estrategia de afrontamiento al estrés ($F_{[3,96]}=4.628$; $p=0.005$; $\eta_p^2=0.112$), siendo los animales ANA los que tenían niveles mayores de TNF α del estriado en comparación al grupo de los no-estresados ($p=0.015$; d Cohen=0.84) y los PR ($p=0.065$; d Cohen=0.94), aunque en este último los valores no llegaron a la significación, mostraron un tamaño del efecto grande (*Figura 57b*).

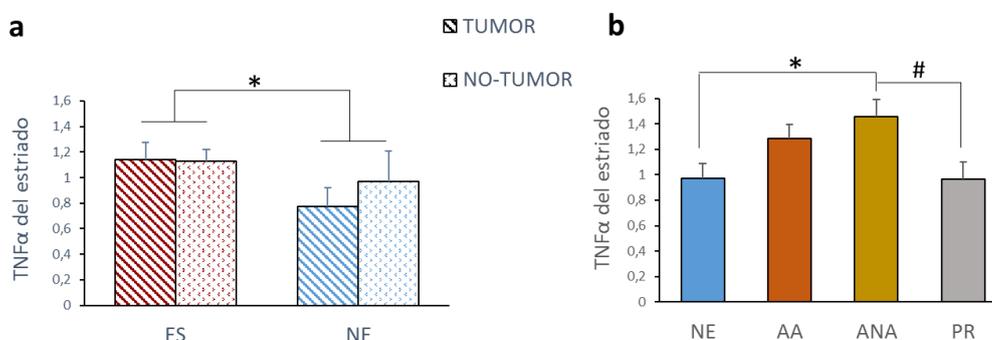


Figura 57. Niveles medios (\pm E.E.M.) de expresión génica de la citocina TNF α en el estriado de los sujetos estresados (ES) con tumor y sin tumor y los sujetos no-estresados (NE) con tumor y sin tumor (**a**); y de los sujetos no-estresados (NE) junto con los sujetos estresados clasificados en las diferentes estrategias de afrontamiento: activos/agresivos (AA), activos/no-agresivos (ANA) y pasivos/reactivos (PR) (**b**). * $p<0.05$; # $p>0.05$ pero d Cohen >0.70 .

Análisis de la expresión de la citocina TNF α en el hipocampo.

El análisis de varianza de dos factores (tumor x estrés crónico) no mostró diferencias significativas ni del factor tumor ($F_{[1,96]}=3.178$; $p=0.078$; d Cohen=0.36), ni del factor estrés crónico ($F_{[1,96]}=0.139$; $p=0.710$; d Cohen=0.08), ni una interacción entre el

tumor y el estrés crónico ($F_{[1,96]}=0.067$; $p=0.797$; $\eta_p^2=0.001$). Además, el análisis post hoc no reveló diferencias significativas entre ninguno de los subgrupos (Figura 58a). El análisis de varianza de un factor reveló que no había diferencias significativas en función de la estrategia de afrontamiento al estrés ($F_{[3,94]}=2.132$; $p=0.303$; $\eta_p^2=0.036$) (Figura 58b).

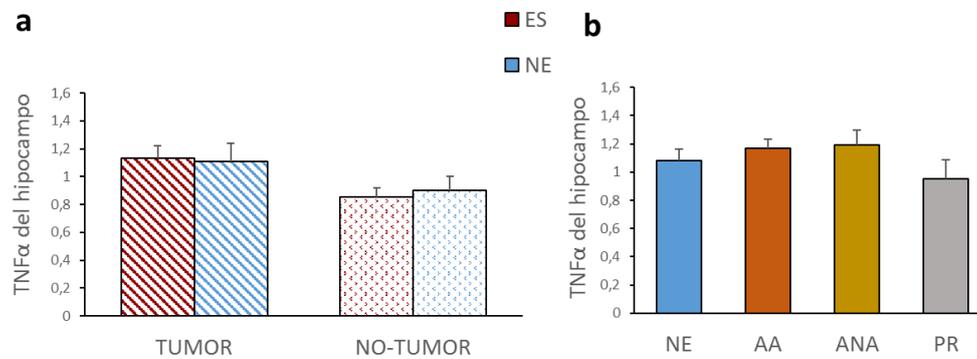


Figura 58. Niveles medios (\pm E.E.M.) de expresión génica de la citosina TNF α en el hipocampo de los sujetos estresados (ES) con tumor y sin tumor y los sujetos no-estresados (NE) con tumor y sin tumor (a); y de los sujetos no-estresados (NE) junto con los sujetos estresados clasificados en las diferentes estrategias de afrontamiento: activos/agresivos (AA), activos/no-agresivos (ANA) y pasivos/reactivos (PR) (b).

4.2.5. CORRELACIONES

4.2.5.1. Correlaciones entre los niveles de corticosterona y el desarrollo tumoral.

Las correlaciones bivariadas realizadas en todos los animales con tumor mostraron una correlación positiva entre el número de focos tumorales y los niveles de corticosterona obtenidos tras las interacciones sociales del día 1 ($r=0.425$; $p=0.002$) y día 9 ($r=0.473$; $p=0.001$) (Tabla 15).

Tabla 15.

Correlaciones entre niveles de corticosterona y número de focos tumorales del 2° experimento.

Grupo	Variable	Basal	Día 1 (post estrés)	Día 9 (post estrés)	Día 21 (post FST)
Estrés	Número de focos día 21	0,123	0,145	0,166	-0,271
No-estrés	Número de focos día 21	0,018	-0,157	0,206	0,204
Tumor	Número de focos día 21	0,072	0,425**	0,473**	0,061

Nota: ** $p<0.01$

4.2.5.2. Correlaciones entre los niveles de corticosterona y los niveles de TDO en el hipocampo y estriado.

Entre los animales estresados, se observó una correlación negativa entre los niveles de corticosterona obtenidos el día 9 y los niveles de TDO en el estriado ($r=-0.341$; $p=0.003$), mientras que los niveles de corticosterona del día 1 correlacionaron negativamente con los niveles de TDO del hipocampo ($r=-0.325$; $p=0.005$) (Tabla 16).

Tabla 16.

Correlaciones entre niveles de corticosterona y niveles de TDO en el estriado e hipocampo del 2° experimento.

Grupo	Tiempo corticosterona	Basal	Día 1 (post estrés)	Día 9 (post estrés)	Día 21 (post FST)
Estrés	TDO del estriado	-0,121	-0,92	-0,341**	-0,227
	TDO del hipocampo	0,063	-0,325**	-0,111	-0,142
No-estrés	TDO del estriado	0,010	0,333	-0,338	-0,092
	TDO del hipocampo	-0,039	0,232	-0,373	-0,057
Tumor	TDO del estriado	0,149	0,099	-0,136	-0,125
	TDO del hipocampo	0,074	-,293*	-0,115	-0,100
No-tumor	TDO del estriado	-0,259	-0,193	-,281*	-0,207
	TDO del hipocampo	0,020	0,032	-0,025	-0,098
Todos	TDO del estriado	-0,111	0,004	-0,246*	-0,233*
	TDO del hipocampo	0,043	-0,110	-0,060	-0,074

Nota: ** $p<0.01$; * $p<0.05$

4.2.5.3. Correlaciones entre los niveles de citocinas y la expresión de las enzimas IDO e iNOS.

El estudio de correlaciones entre la expresión de las enzimas IDO e iNOS y las citocinas IL-6 y TNF α , únicamente mostró una correlación positiva entre los niveles de iNOS con TNF α ($r=0.358$; $p=0.011$) en el hipocampo entre los sujetos con tumor (Tabla 19).

Tabla 17.
Correlaciones entre niveles de citocinas y enzimas IDO e iNOS hipocampo del 2° experimento dentro de los animales estresados.

	iNOS Est	IDO Est	IL-6 Est	TNF α Est		iNOS HC	IDO HC	IL-6 HC	TNF α HC
iNOS Est	1	0,064	0,189	0,231*	iNOS HC	1	0,104	-0,043	0,256*
IDO Est		1	-0,030	-0,068	IDO HC		1	0,179	0,098
IL-6 Est			1	0,135	IL-6 HC			1	0,153
TNF α Est				1	TNF α HC				1

Nota; * $p<0.05$

Tabla 18.
Correlaciones entre niveles de citocinas y enzimas IDO e iNOS hipocampo del 2° experimento dentro de los animales no-estresados.

	iNOS Est	IDO Est	IL-6 Est	TNF α Est		iNOS HC	IDO HC	IL-6 HC	TNF α HC
iNOS Est	1	-0,251	0,167	0,244	iNOS HC	1	-0,285	-0,009	0,290
IDO Est		1	0,013	0,079	IDO HC		1	0,068	0,129
IL-6 Est			1	0,051	IL-6 HC			1	0,010
TNF α Est				1	TNF α HC				1

Resultados
2° experimento

Tabla 19.
Correlaciones entre niveles de citocinas y enzimas IDO e iNOS hipocampo del 2° experimento dentro de los animales con tumor.

	iNOS Est	IDO Est	IL-6 Est	TNFα Est		iNOS HC	IDO HC	IL-6 HC	TNFα HC
iNOS Est	1	-0,087	0.152	0,256	iNOS HC	1	-0,026	0,037	,358*
IDO Est		1	-0,001	-0,025	IDO HC		1	0,085	0,066
IL-6 Est			1	0,202	IL-6 HC			1	0,204
TNFα Est				1	TNFα HC				1

Nota: * $p < 0.05$

Tabla 20.
Correlaciones entre niveles de citocinas y enzimas IDO e iNOS hipocampo del 1° experimento dentro de los animales sin tumor.

	iNOS Est	IDO Est	IL-6 Est	TNFα Est		iNOS HC	IDO HC	IL-6 HC	TNFα HC
iNOS Est	1	0,055	0,181	0,252	iNOS HC	1	-0,018	-0,137	0,149
IDO Est		1	0,058	0,000	IDO HC		1	0,171	0,097
IL-6 Est			1	0,012	IL-6 HC			1	0,007
TNFα Est				1	TNFα HC				1

Tabla 21.
Correlaciones entre niveles de citocinas y enzimas IDO e iNOS hipocampo del 1° experimento en todos los sujetos.

	iNOS Est	IDO Est	IL-6 Est	TNFα Est		iNOS HC	IDO HC	IL-6 HC	TNFα HC
iNOS Est	1	-0.066	0,093	0,182	iNOS HC	1	-0.035	-0.005	0,247**
IDO Est		1	-0,022	0,001	IDO HC		1	0,155	0,073
IL-6 Est			1	0,101	IL-6 HC			1	0,083
TNFα Est				1	TNFα HC				1

Nota: ** $p < 0.01$.

BLOQUE V.

DISCUSIÓN

El análisis de la conducta llevada a cabo en los sujetos estresados durante la primera interacción social en ambos experimentos permitió clasificar a los ratones en tres grupos diferentes según sus estrategias de afrontamiento al estrés, independientemente de la inoculación tumoral. Un grupo de sujetos, al que denominamos activo/agresivo (AA), presentó un patrón conductual reflejo claro de una estrategia proactiva, ya que, en interacción directa, era el grupo que más tiempo invertía en conductas de ataque y amenaza. De acuerdo con muchos autores los niveles de agresividad de los animales, reflejan estilos generales de afrontamiento en otras situaciones (de Boer *et al.*, 2017; Koolhaas *et al.*, 1999, 2007), siendo la agresión abierta parte de un conjunto mayor de características de comportamiento que componen la estrategia de afrontamiento proactiva (Koolhaas *et al.*, 1999). A este respecto, una mayor dedicación a la conducta de exploración no-social y menor a la de inmovilidad fueron también características distintivas de este clúster. Otro grupo de sujetos, además de no manifestar conductas de ataque y amenaza, presentó una baja exploración no-social y dedicó más tiempo que el resto de los grupos a la conducta de inmovilidad. A este grupo con una estrategia reactiva, se le denominó pasivo/reactivo (PR). Finalmente, el clúster definió un tercer grupo intermedio de sujetos, al que denominamos activo/no-agresivo (ANA), el cual, sin manifestar conductas de ataque y amenaza, mantuvo un nivel de actividad mayor que el grupo PR. Es importante señalar, de acuerdo con diversos autores, que la estrategia proactiva puede no expresarse con igual claridad en todas las situaciones de reto (de Boer *et al.*, 2017). En esta línea, y de acuerdo con la hipótesis de Homberg (2012), podríamos pensar que, en nuestro modelo, la situación de sumisión generada por la imposibilidad de resultar dominantes, no coincida con la estrategia de afrontamiento, más bien proactiva, del grupo ANA. Así, la inclusión en el segundo experimento de la interacción indirecta, en la que los sujetos no presentaban riesgo de ser agredidos, confirmó la existencia de este tercer grupo. Cuando se les permitió moverse con libertad, sin riesgo de ser agredidos, los sujetos ANA, exploraron el entorno y permanecieron muy poco tiempo inmóviles, al igual que los sujetos AA. Por tanto, este grupo correspondería a sujetos que podrían agruparse en un grupo intermedio, con características tanto del grupo AA como del grupo PR.

Mediante la aplicación del estrés crónico, en el segundo experimento, pudimos observar los cambios conductuales que manifestaron los sujetos tras 9 días de estrés social. Tras la derrota repetida todos los grupos modificaron su conducta hacia

conductas menos activo/agresivas, reduciéndose las diferencias conductuales observadas durante la primera interacción social. Sin embargo, en nuestro caso no podemos descartar la influencia del desarrollo tumoral, junto al estrés social crónico, en el cambio conductual observado, ya que algunas conductas se vieron afectadas por este (ataque y huida de la IFD y exploración no-social de la INF). Aunque, independientemente del tumor, en todas las estrategias se observó un incremento significativo de la inmovilidad tras 9 días de estrés crónico, solo el grupo ANA mostró un incremento significativo de la inmovilidad en la INF, igualándose al grupo PR. Esto podría indicar un cambio o una transición de estrategia de afrontamiento del grupo ANA hacia un afrontamiento más reactivo. En esta línea, Paul *et al.* (2011) refieren que la derrota social repetida resultó en un cambio desde conductas de afrontamiento proactivo hacia conductas de afrontamiento reactivo. Por otro lado, es importante señalar que durante la interacción del día 9, ya no se observaron conductas de amenaza y ataque, lo que indica que todos los sujetos fueron sometidos por los ratones residentes. Numerosos estudios han encontrado cambios en relación a la conducta de los ratones subordinados tras la derrota social repetida, observando una disminución de la interacción social (Avgustinovich *et al.*, 1997; Kudryavtseva, 1994; Kudryavtseva *et al.*, 1991; Meerlo *et al.*, 1996; Van de Poll *et al.*, 1982). Aunque Albonetti y Farabollini (1994) no encontraron diferencias en la interacción social, sí existe un acuerdo general en que la derrota continua reduce los niveles de agresividad (Albonetti y Farabollini, 1994; Andrade *et al.*, 1989; Flanneliy y Lore, 1975; Flannelly *et al.*, 1984), e incrementa la conducta de defensa/sumisión (Andrade *et al.*, 1989; Flannelly *et al.*, 1984; Kudryavtseva *et al.*, 1991; Tornatzky y Miczek, 1994).

En cuanto a los efectos del estrés social sobre el desarrollo tumoral, los resultados de los experimentos llevados a cabo en este trabajo muestran efectos diferentes en función de su aplicación aguda o crónica.

Al igual que en trabajos anteriores realizados en nuestro laboratorio con ratones C57BL6 (Lebeña *et al.*, 2017), el estrés agudo no afectó al desarrollo tumoral. Sin embargo, en trabajos previos sí encontramos un efecto significativo de este modelo de estrés agudo sobre el desarrollo metastático pulmonar (Vegas *et al.*, 2006). Estas diferencias de resultados se deben probablemente al menor desarrollo tumoral inducido en el presente trabajo al seleccionar específicamente líneas celulares con menor índice proliferativo (ver página 83). Estos resultados sugieren que, además de variables como la cepa o la edad

del sujeto, también el grado de inducción tumoral puede ser un factor importante a la hora de observar efectos del estrés agudo sobre el desarrollo del tumor.

La aplicación del modelo de estrés social de forma crónica sí produjo un aumento significativo del desarrollo tumoral de los animales que fueron inoculados con células de melanoma B16F10, confirmando estudios previos que han revelado que el estrés psicosocial crónico puede ser un potente modulador de la progresión del cáncer en diferentes modelos de tumor (Armaiz-Pena *et al.*, 2013; Feller *et al.*, 2019; Moreno-Smith *et al.*, 2010; Payne, 2014). Además, el desarrollo tumoral mostró diferencias en función de las estrategias de afrontamiento manifestadas ante el estrés social. Así, fue la estrategia PR la que presentó un mayor desarrollo tumoral frente a los sujetos estresados AA y ANA, así como frente a los NE. Sajti *et al.* (2004) también encontraron un mayor número de focos metastáticos de tumor subcutáneo en ratas caracterizadas por su pasividad en el test de campo abierto. En el presente estudio, los sujetos AA no se vieron afectados en relación al desarrollo tumoral, en línea con lo hallado por Amkraut y Solomon (1972), donde los animales que mostraban lucha espontánea desarrollaron tumores de sarcoma más pequeños que aquellos que no luchaban. Vegas *et al.* (2006) además de encontrar un mayor desarrollo tumoral en los ratones estresados, también observaron que emplearse en conductas de ataque y presentar altos niveles de exploración del entorno en situación de conflicto social, estaba relacionado con menores niveles de desarrollo tumoral. Estos datos sugieren que la estrategia proactiva, acompañada de respuestas ofensivas y gran actividad exploratoria protege de los efectos del estrés crónico sobre el desarrollo tumoral. En cuanto a los sujetos ANA, que no manifestaron conductas ofensivas, pero sí actividad exploratoria, mostraron un desarrollo tumoral moderado. Así, nuestros resultados sugieren que la estrategia activa y no específicamente la conducta agresiva manifestada podría proteger a los ratones de un mayor desarrollo tumoral. Estos resultados ponen de relieve la importancia que las diferentes estrategias de afrontamiento al estrés tienen sobre los efectos negativos observados del estrés crónico en el desarrollo tumoral y señalan un mejor pronóstico para aquellos sujetos con estrategias activas, no necesariamente agresivas. Estos datos experimentales subrayan la importancia de abordar el estudio de las características individuales de los sujetos para promover intervenciones psicosociales adecuadas que puedan paliar los efectos negativos del estrés en pacientes con cáncer (Antoni y Dhabhar, 2019; Pérez-Tejada *et al.*, 2019; Reynolds *et al.*, 2000).

La derrota social produjo una intensa activación del eje HPA tras las interacciones directas tanto ante el estrés agudo, como ante un estrés crónico. Mientras que tras varios días de haber finalizado el estrés agudo desaparecieron las diferencias en los niveles de corticosterona, en el caso de estrés crónico estas diferencias se mantuvieron tres días después del final de la exposición al estrés social, al igual que lo encontrado por otros autores (Becker *et al.*, 2008; Ruis *et al.*, 1999). El menor incremento de los niveles de corticosterona observado tras 9 días de estrés, podría sugerir una adaptación del eje HPA ante el estrés repetido (Macedo *et al.*, 2018), sin embargo resultados hallados por otros autores no apoyan esta idea. Gómez-Lázaro *et al.* (2011) y Pérez-Tejada *et al.* (2013) encontraron niveles igualmente altos incluso tras 21 días de estrés mediante un modelo de estrés social similar al utilizado en este trabajo. Los niveles más elevados de corticosterona hallados en los estresados justo después de la prueba FST, es decir, 3 días después de la finalización del estrés social, podrían indicar una alteración del eje HPA como consecuencia de la derrota repetida, aunque su análisis tras esta prueba conductual no permite descartar un restablecimiento o una disminución de los niveles basales transcurridos varios días desde cualquier manipulación del animal (Gómez-Lázaro *et al.*, 2011; Macedo *et al.*, 2018).

Por otra parte, es interesante destacar que fue el grupo ANA quien presentó los mayores niveles de corticosterona tras la primera interacción social y tras la prueba FST, tres días después de finalizar el estrés crónico. Estos sujetos no presentaron conductas de lucha, como ataque y amenaza, que pudieran moderar la respuesta del eje HPA, tal y como se ha observado en otros trabajos (Walker *et al.*, 2009). Es posible que, en sujetos con una predisposición proactiva, al no tener oportunidad de manifestar tales conductas, la derrota sea para ellos más estresante, presentando una mayor reactividad al estrés y una mayor respuesta del eje en la primera interacción. Este resultado apoyaría la idea de que los estilos de afrontamiento pueden influir en las consecuencias de experimentar estrés por subordinación social (Boersma *et al.*, 2017). Aunque los niveles de corticosterona se igualaron en todos los grupos tras nueve días de estrés, no podemos descartar que la mayor reactividad previa del eje HPA observada en el grupo ANA haya producido un impacto a largo plazo en este grupo. En este sentido, y como discutiremos más adelante, este grupo presentó un perfil alterado específico de la expresión de algunos marcadores inflamatorios.

Aunque no se observaron diferencias significativas en los niveles de corticosterona en función del tumor, la correlación observada entre los niveles de esta hormona y el desarrollo tumoral tras el estrés crónico no permite descartar una implicación del eje HPA en la progresión del tumor. Sin embargo, nuevas evidencias apuntan a que no sólo los glucocorticoides, sino también las catecolaminas liberadas durante la respuesta de estrés, juegan un papel importante en distintas etapas del proceso metastático, a través de los cambios que estas producen en la actividad inmunitaria (Armaiz-Pena *et al.*, 2013; Feller *et al.*, 2019; Wu *et al.*, 2005). Es por tanto posible que el mayor desarrollo tumoral observado en los sujetos PR esté mediado también por las catecolaminas, u otros mecanismos y vías relacionadas con el estrés (Vegas *et al.*, 2009; Wu *et al.*, 2005; Xia *et al.*, 2019).

Cuando se analizaron las consecuencias del estrés y del desarrollo tumoral sobre la conducta, se observaron efectos diferentes en función de cada factor. El estrés crónico redujo el consumo de sacarosa, indicativo de conducta tipo-depresiva, en todos los ratones estresados, independientemente de la estrategia. Aunque la mayoría de los estudios refieren una reducción de la preferencia de sacarosa por estrés crónico (Covington *et al.*, 2010; Tang *et al.*, 2018; Yu *et al.*, 2011), también hay trabajos que no encuentran dicha reducción (ver Hammels *et al.*, 2015). Estas discrepancias pueden ser debidas a diferencias en el protocolo utilizado, pero también a la duración del estresor, ya que en el primer experimento, en el que se aplicó un estrés agudo, no se observa una reducción en el consumo de sacarosa al igual que en otros trabajos donde la derrota se limitó a cinco días (Croft *et al.*, 2005) o a un día (Razzoli *et al.*, 2011).

Los resultados de este trabajo con ratones macho OF1 inoculados con células de melanoma indican que el tumor no afectó al consumo de sacarosa, tal vez debido al moderado desarrollo tumoral alcanzado por los sujetos experimentales. Sin embargo, otros factores como la especie, el sexo o el tipo tumoral utilizado también podrían influir en los resultados. Así, mientras algunos autores encontraron una reducción del consumo de sacarosa en ratonas C57BL/6 con tumor de ovario (Lamkin *et al.*, 2011) y BALB/c con tumor mamario (Nashed *et al.*, 2015), otros no encontraron diferencias en ratonas hembra BALB/c x DBA/2 F1 (CD2F1) con tumor de colon (Norden *et al.*, 2015), ni en ratas hembra con tumores mamarios (Pyter *et al.*, 2009).

La conducta manifestada en FST, comúnmente utilizado para determinar conductas tipo-depresivas en roedores, no se vio afectada por efecto del estrés agudo o crónico. Los resultados obtenidos en relación a los efectos del estrés crónico sobre la conducta tipo-depresiva, concuerdan con los estudios llevados a cabo por Stepanichev *et al.* (2016), quienes observaron una menor preferencia de sacarosa, pero no encontraron diferencias en el tiempo transcurrido inmóviles en la prueba FST tras aplicar varios tipos de estresores crónicos. De acuerdo con la literatura, los efectos del estrés sobre la conducta en el FST parecen ser más consistentes en el caso de las ratas, donde se ha descrito un aumento de inmovilidad tras la derrota social aguda o crónica (Becker *et al.*, 2008; Hayashida *et al.*, 2010), pero en ratones los resultados no son tan robustos y parecen variar en función del procedimiento utilizado (Gómez-Lázaro *et al.*, 2011, 2012; Kinsey *et al.*, 2007; Krishnan *et al.*, 2007; Tang *et al.*, 2018). En el presente trabajo, aunque las conductas de inmovilidad y natación no se vieron alteradas por efecto del estrés, pertenecer a un determinado grupo de estrategias conductuales, sí determinó una respuesta diferente cuando los animales eran sometidos a un estrés crónico. Concretamente, los PR mostraron más inmovilidad y menos natación que los sujetos pertenecientes a los grupos AA o ANA, e incluso, en el caso de la natación, fueron los únicos que se diferenciaron del grupo de no-estresados. Así, las consecuencias del estrés crónico sobre las conductas en el FST, asociadas a la depresión, parecen ser más intensas en los sujetos con una estrategia inicial PR. Varios autores han sugerido que las manifestaciones conductuales desplegadas por los animales en esta prueba podrían ser propias de una estrategia conductual más que indicativas de conductas tipo-depresivas (Commons *et al.*, 2017; de Boer *et al.*, 2017; Koolhaas *et al.*, 2010), de manera que una mayor inmovilidad sería una característica de una estrategia pasiva (Commons *et al.*, 2017; De Kloet y Molendijk, 2016). Sin embargo, esta idea no parece sustentarse en el presente trabajo, ya que cuando se aplicó un estrés agudo, los sujetos del grupo PR no presentaron diferencias en inmovilidad y natación en relación a los otros grupos, como cabría esperar si estas conductas fueran características de la estrategia.

La presencia del tumor no alteró la conducta de los ratones en el FST, a diferencia de otros estudios (Nashed *et al.*, 2015; Norden *et al.*, 2015). Esta discrepancia puede ser atribuida, bien a las diferencias en el sujeto experimental o modelo tumoral utilizado, o bien al moderado desarrollo tumoral mencionado anteriormente.

En relación al OFT, utilizado tanto para determinar los niveles de ansiedad como para medir la actividad motora en roedores, (Crawley, 1985), se han encontrado diferentes resultados en función del parámetro analizado. El estrés por derrota, no produjo cambios en los parámetros indicativos de ansiedad (tiempo en el centro) al igual que lo hallado por otros autores en ratas (Liu *et al.*, 2017) y en oposición a otros estudios (Di *et al.*, 2016; Kinsey *et al.*, 2007; Patki *et al.*, 2013). Del mismo modo, no se encontraron diferencias significativas en el tiempo inmóvil y en la distancia recorrida en función del estrés. A este respecto también existen datos contradictorios, ya que mientras algunos autores no encontraron diferencias (Kinn *et al.*, 2008; Mercier *et al.*, 2003; Trainor *et al.*, 2011), otros observan tanto un incremento (Venzala *et al.*, 2012) como una disminución (Ricciardella *et al.*, 2010; Rygula *et al.*, 2005) de la actividad locomotora en roedores estresados. Es posible que el método, el periodo del procedimiento de estrés por derrota, así como la especie utilizada haya dado lugar a resultados contradictorios. Al igual que en el FST, sin embargo, sí se observaron diferencias en función de las estrategias tras el estrés crónico, siendo de nuevo el grupo PR quien mostró mayor inmovilidad, y junto con los ANA, también, menor distancia recorrida. Estos resultados indicarían de nuevo una mayor afectación del grupo PR, así como un leve efecto en el grupo ANA, que solo se muestra tras el estrés crónico.

En cuanto al efecto del tumor, pudimos observar que no redujo la distancia recorrida en ninguno de los experimentos, es decir, la actividad motora no fue alterada, en concordancia con lo observado por otros autores con otros modelos de tumor (Norden *et al.*, 2015; Pyter *et al.*, 2017). Aunque la fatiga sí es uno de los síntomas observados en pacientes con cáncer, de acuerdo con Norden *et al.* (2015), esta no iría necesariamente asociada a la actividad locomotora general. En cuanto a las conductas indicativas de ansiedad, no se encontraron diferencias en función del tumor durante el primer experimento, pero sí en el segundo, donde se observó un mayor desarrollo tumoral. Concretamente, fueron los animales portadores de tumor los que menos tiempo permanecieron en el centro y los que se situaron más cerca de la periferia, en comparación a los animales sin tumor. Estos datos sugieren que el mayor desarrollo tumoral observado en el segundo experimento podría contribuir a la aparición de sintomatología tipo-ansiosa.

En el caso de la conducta de acercamiento social, prueba que se llevó a cabo únicamente en sujetos crónicamente estresados, el tumor produjo una reducción del

tiempo dentro del área del oponente. Esta conducta que ha sido interpretada por otros autores como una inhibición social asociada a la susceptibilidad a los efectos del estrés y a la depresión (Dadomo *et al.*, 2011; Lagace *et al.*, 2010; Venzala *et al.*, 2012), sugiere la presencia de sintomatología tipo-depresiva en sujetos con desarrollo tumoral. Aunque no se encontraron diferencias en función de las estrategias en el tiempo transcurrido cerca del oponente, sí se observaron en la inmovilidad, siendo los sujetos PR y ANA quienes mostraron mayor inmovilidad. La menor actividad motora de estos sujetos podría reflejar junto con los resultados encontrados en el FST y OFT, mayor conducta tipo-depresiva.

En cuanto a la actividad inmunitaria, en este trabajo se midieron diferentes parámetros (las enzimas IDO, TDO e iNOS y las citocinas IL-6 y TNF α del estriado e hipocampo) para observar los mecanismos inmunitarios que pueden ser alterados a nivel del SNC por la presencia de células tumorales periféricas, situaciones estresantes y/o las diferentes estrategias empleadas para hacer frente a situaciones de estrés. Los resultados parecen indicar que los cambios observados en estos parámetros indicativos de la actividad inmunitaria varían diferencialmente en función del tumor o del estrés. Este efecto específico de cada factor se vio reflejado también en los cambios conductuales observados.

El estrés agudo produjo un incremento en el peso del bazo que podría ser indicativo de una mayor actividad inmunitaria dirigida por este órgano, encargado de diferentes funciones inmunitarias (ver revisión de Bronte y Pittet, 2013). Además, las diferencias observadas en función de la estrategia, sugieren que este efecto se debe al mayor peso del bazo observado en las estrategias PR y ANA. Puesto que los niveles de corticosterona fueron similares en todos los grupos estresados, es posible que una mayor actividad simpática (u otro mecanismo independiente de glucocorticoides) sea la responsable del mayor peso de bazo observado en estos grupos. El aumento del tamaño del bazo no se tradujo en alteraciones inmunitarias a nivel central, ya que no se encontró ningún efecto del estrés agudo, ni de las estrategias, sobre los niveles de expresión de IDO, iNOS e interleucinas. A este respecto se han encontrado datos contradictorios, ya que algunos muestran un aumento de citocinas proinflamatorias junto a la disminución de antiinflamatorias (Blandino *et al.*, 2006; Nguyen *et al.*, 1998; Ostrowski *et al.*, 1999; Savignac *et al.*, 2011), y otros indican lo contrario (Elenkov y Chrousos, 2002). Además, en los trabajos en los que se aplica un estrés agudo a roedores con tumor se han

encontrado cambios inmunitarios mínimos (Pyter, 2016). Por otro lado, aunque se observó un aumento en los niveles de corticosterona plasmática tras el estrés agudo, no se encontraron diferencias en los niveles de TDO a nivel central. Esta ausencia de diferencias en parámetros analizados en función del estrés agudo podría justificar la ausencia de cambios conductuales observada en el primer experimento.

Tras el estrés crónico se produjo una hipertrofia del bazo mayor a la observada tras el estrés agudo. Esto podría indicar una mayor actividad del sistema inmunitario periférico que en el caso del estrés agudo, aunque para confirmarlo hubiera sido necesario determinar parámetros inmunitarios periféricos.

A nivel central, el estrés crónico produjo un aumento en los niveles de expresión de la enzima iNOS en el hipocampo y de la citocina TNF α en el estriado en todos los sujetos estresados. Estos datos van en la misma línea que lo encontrado por otros autores que observaron niveles más elevados de expresión de iNOS (Olivenza *et al.* 2000) y TNF α (Munhoz *et al.*, 2004) en la corteza cerebral de las ratas sometidas a varias semanas de estrés mediante inmovilización. Además, el incremento significativo en el grupo ANA de los niveles de expresión de TNF α e iNOS del estriado, revela que existe un efecto del estrés crónico sobre estas variables dependientes de las estrategias. En un estudio previo en nuestro laboratorio también se encontraron diferencias en los niveles de expresión de iNOS y TNF α en la corteza prefrontal en función de la estrategia observada en sujetos derrotados, pero no en el hipocampo (Pérez-Tejada *et al.*, 2016). Esta diferencia en la expresión de citocinas proinflamatorias en función del área cerebral también ha sido observada en diferentes trabajos, y podría deberse a que las diferentes vías activadas en distintas situaciones de estrés y/o en función de la estrategia podrían actuar sobre estructuras cerebrales específicas y activar diferentes genes relacionados con la expresión de citocinas (Johnson *et al.*, 2005; Kolmus *et al.*, 2015; Rohleder, 2011). Aun así, no podemos descartar otros factores como las posibles diferencias entre el intervalo de tiempo de expresión de cada una de las citocinas y el tiempo elegido para su análisis (Gibb *et al.*, 2011; Johnson *et al.*, 2005).

Por otro lado, nuestro estudio mostró que los animales sometidos a un estrés crónico con un perfil conductual ANA, tuvieron niveles de expresión de la enzima TDO del hipocampo más bajos que los sujetos PR. Esto podría ser debido a que los niveles más elevados de corticosterona encontrados a lo largo del experimento en el grupo ANA

estén generando una resistencia a los glucocorticoides en estos sujetos que podría ser perjudicial si se prolonga en el tiempo (Dhabhar y McEwen, 1997). La resistencia a los glucocorticoides propuesta, viene apoyada por la correlación negativa observada en los animales estresados entre los niveles de corticosterona y expresión de TDO.

El aumento de la expresión de TNF α en el estriado y de iNOS en el hipocampo, estructuras implicadas en el sistema de refuerzo (Haber y Knutson, 2010; Jiang *et al.*, 2010; Russo y Nestler, 2013), pueden ser responsables de la anhedonia observada en los sujetos estresados. El grupo de Peng *et al.* (2012) observó un aumento de la expresión de iNOS en la corteza cerebral en sujetos sometidos a estrés crónico leve impredecible junto con una menor preferencia de sacarosa. El grupo ANA, siendo el subgrupo con niveles más elevados de expresión de iNOS y TNF α en el estriado, solo mostró una menor actividad motora en el OFT, y junto al PR en la prueba de IS, no alcanzando diferencias significativas en anhedonia con respecto a las demás estrategias. Por otra parte, los PR, pese a no mostrar una alteración inmunitaria diferencial respecto a los no-estresados, fueron los que mayor alteración conductual presentaron, tanto en el OFT como FST. A estas diferencias conductuales entre las estrategias ANA y PR podrían contribuir los niveles significativamente más bajos de TDO observados en el hipocampo del grupo ANA. Es posible que la resistencia a los glucocorticoides sugerida anteriormente en el grupo ANA, se presente inicialmente como un mecanismo adaptativo en esta estrategia y modere su respuesta conductual. Así, los datos sugieren que, además de las características conductuales, la estrategia ANA presenta unas características fisiológicas específicas. Aunque para confirmar la relación entre estas características conductuales y fisiológicas sería necesario determinar si los cambios en parámetros inmunitarios y en TDO observados en esta estrategia han conseguido alterar los metabolitos del triptófano y la disponibilidad del cofactor BH₄, como señala la hipótesis inflamatoria de la depresión. Por otra parte, la peor respuesta en FST manifestada por los sujetos PR, señalada anteriormente, no puede ser atribuida a cambios en estos parámetros fisiológicos inducidos por el estrés, puesto que el grupo PR no presentó un perfil específico de cambios en los mismos, a excepción de la diferencia observada en los niveles de expresión de TDO en relación al grupo ANA. No obstante, no podemos descartar la existencia de diferencias en otras estructuras y/o parámetros no analizados en este trabajo y que podrían contribuir a los cambios en la conducta tipo-depresiva observada en el grupo PR, tales como la corteza prefrontal y la amígdala (Audet *et al.*,

2011; Piser, 2010), o las catecolaminas liberadas por el sistema SAM (Koolhaas, 2008; Koolhaas *et al.*, 2007; Sgoifo *et al.*, 1996).

Por otra parte, era de esperar que la propia presencia del tumor aumentara la actividad inmunitaria periférica (Landskron *et al.*, 2014; Pyter *et al.*, 2009) que a través de vías de comunicación con el cerebro incrementara la liberación de citocinas en el SNC (Pyter *et al.*, 2009; Yang *et al.*, 2014). Sin embargo, en el primer experimento no observamos diferencias ni en el peso del bazo, ni en los niveles de citocinas, ni en la expresión de IDO e iNOS. Tampoco se encontraron diferencias en la expresión de la enzima TDO, lo cual era de esperar dado que los niveles de corticosterona no fueron diferentes en función del tumor. La ausencia de los efectos del tumor sobre el sistema inmunitario, podrían deberse a que el reducido desarrollo tumoral inducido no consigue activar los parámetros inmunitarios analizados. Si bien, la estabulación conjunta en este primer experimento de los animales con y sin tumor ha podido influir en los resultados, tal y como otros autores han observado en animales que cohabitaban en la misma jaula (Alves *et al.*, 2010; Tomiyoshi *et al.*, 2009), el bajo desarrollo tumoral inducido en este trabajo minimiza esta posibilidad.

Por el contrario, sí se observaron cambios en los parámetros inmunitarios centrales en función del tumor cuando el experimento incluyó el estrés crónico. Esto podría ser debido al mayor desarrollo tumoral que encontramos tras el estrés crónico, ya que en este caso la cantidad de focos tumorales fue más del doble que tras un estrés agudo. Los animales con tumor, mostraron niveles más elevados de la expresión de la enzima IDO en el hipocampo y de la citocina IL-6 en el estriado, además de la enzima TDO en esta última estructura. La correlación encontrada entre el desarrollo tumoral y los niveles de corticosterona en el segundo experimento podría explicar el aumento de los niveles de expresión de TDO en sujetos con tumor, de la misma manera, que la falta de correlación encontrada en el primer experimento podría explicar la ausencia de estas diferencias. Trabajos realizados en nuestro laboratorio también encontraron un incremento de la expresión de IL-6 (Lebeña *et al.*, 2014), pero en el hipocampo y solo en aquellos sujetos con gran desarrollo tumoral. La condición de un gran desarrollo tumoral para poder observar estos cambios, unido al menor desarrollo tumoral inducido en este experimento podría explicar la falta de diferencias observables en el hipocampo. Sin embargo, el incremento observado en los niveles de expresión de IDO en los sujetos con tumor en el hipocampo sugiere la existencia de una inflamación moderada producida

por el tumor. Este efecto del tumor en el hipocampo podría deberse a otras citocinas, ya que además de las analizadas en este estudio, el IFN γ , el INF α y la IL-1 β , también tienen la capacidad de inducir la enzima IDO (Babcock y Carlin, 2000; Maes *et al.*, 2011; Shirey *et al.*, 2006; Wichers y Maes, 2004). Estas alteraciones a nivel de sistema nervioso central podrían explicar la conducta ansioso-depresiva observada en el OFT y en la prueba de IS en los sujetos con desarrollo tumoral, quienes permanecieron más tiempo en la periferia y alejados del oponente.

En general, podemos concluir que tanto el estrés crónico como el tumor produjeron cambios inmunitarios y conductuales diferentes en función de cada uno de estos factores. Además, los datos indican que para observar estos efectos del tumor es necesario alcanzar un determinado desarrollo tumoral, observado únicamente en condiciones de estrés crónico. Por otro lado, a pesar de que la derrota repetida vaya igualando el perfil conductual en interacción social de todos los sujetos hacia una conducta de subordinación en todos los sujetos, las consecuencias del estrés crónico son diferentes en función de la estrategia inicial, indicando que las diferencias individuales a la hora de hacer frente al estrés repercuten en sus efectos. Así, la estrategia PR resultó ser la más vulnerable a los efectos del estrés crónico con un mayor desarrollo tumoral y mayor afectación conductual. Sin embargo, estos sujetos no mostraron los cambios inmunitarios esperados en sujetos con una mayor afectación conductual. Es posible que la fisiología particular de cada estrategia repercuta en el intervalo de tiempo entre el final del estrés y la expresión de citocinas, y que además este intervalo sea diferente en función de la citocina y de la estructura cerebral analizada. Por otra parte, hubiera sido interesante analizar estas diferencias individuales en función de la presencia de tumor, pero esta ha sido la mayor limitación encontrada en este trabajo debido a que el número de sujetos perteneciente a cada subgrupo no lo permitió. El procedimiento para la clasificación de los sujetos en clústeres basados en un etograma completo es una metodología consolidada por su gran validez etológica, pero no permite establecer a priori el número de sujetos en cada grupo. Además, al analizar trabajos en este campo se hacen evidentes las diferencias en metodología a la hora de aplicar modelos de estrés y de desarrollo tumoral, y en la muestra (sexos, razas, cepas, etc.), que pueden contribuir a las discrepancias en resultados.

BLOQUE VI.

CONCLUSIONES

En las siguientes líneas se presentan las principales conclusiones que podemos extraer de los datos presentados en este trabajo de investigación:

1. El desarrollo tumoral leve de melanoma B16F10 inducido experimentalmente se incrementa sólo tras la aplicación de un estrés social crónico y no tras la aplicación de un estrés agudo, lo que reduce la probabilidad de observar diferencias en función del tumor tras un estrés agudo.
2. En interacción social los ratones macho OF1 muestran diferentes estrategias de afrontamiento que, en función de la actividad y/o agresividad, pueden clasificarse en: activa/agresiva (AA), activa/no-agresiva (ANA) y pasiva/reactiva (PR).
3. El efecto observado del estrés crónico sobre el desarrollo tumoral muestra diferencias en función de las estrategias de afrontamiento, siendo los sujetos PR los que presentan un mayor desarrollo tumoral. Aunque el estrés social incrementa también el desarrollo tumoral en los sujetos ANA, estos no se diferencian de los AA, revelando que la estrategia fundamentalmente activa y no específicamente la conducta agresiva manifestada podría proteger a los ratones de un mayor desarrollo tumoral.
4. El modelo de estrés social utilizado, tanto agudo como crónico, produce una activación del eje HPA indicativa de una respuesta fisiológica de estrés, así como un aumento del peso del bazo, sin embargo, sólo el estrés crónico produce alteraciones conductuales e inmunitarias en el SNC.
5. El estrés crónico produce un incremento de la expresión de iNOS en el hipocampo y de TNF α en el estriado, acompañado de conducta anhedónica.

6. Los sujetos sometidos a estrés social crónico presentan un perfil inmunitario, neuroendocrino y conductual diferente en función de su estrategia de afrontamiento.
 - 6.a. Los sujetos ANA muestran un perfil fisiológico diferente al de los grupos AA y PR, con mayores niveles de expresión de iNOS y TNF α en el estriado y mayor actividad del eje HPA, y manifestando además de anhedonia, una disminución de la actividad locomotora (OFT, IS).
 - 6.b. Los sujetos PR muestran mayor conducta tipo-depresiva, presentando además de anhedonia y una menor actividad locomotora (OFT, IS), más conductas indicativas de depresión en FST, no atribuible a ninguno de los parámetros inmunitarios y/o neuroendocrinos analizados.
 - 6.c. Los sujetos AA son los que presentan una menor vulnerabilidad a los efectos observados del estrés crónico.
7. El desarrollo tumoral generado tras el estrés crónico produce cambios en la actividad inmunitaria central, con un incremento de los niveles de la expresión de la enzima IDO en el hipocampo y de la citocina IL-6 en el estriado, así como un aumento de la expresión de TDO en el estriado, acompañado de conductas indicativas de ansiedad (OFT) y depresión (IS).
8. La evaluación de las estrategias se revela como un factor fundamental a la hora de estudiar los efectos que el estrés tiene sobre la salud, ya que las diferencias conductuales y fisiológicas asociadas a cada una de ellas desaparecen cuando estas no son tenidas en cuenta.

BLOQUE VII.

REFERENCIAS

- Adams, J. M. y Cory, S. (2007). The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy. *Oncogene*, 26(9), 1324-1337. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210220>
- Ader, R. y Cohen, N. (1975). Behaviorally conditioned immunosuppression. *Psychosomatic Medicine*, 37(4), 333-340. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1162023>
- Ader, R., Felten, D. L. y Cohen, N. (1991). *Psychoneuroimmunology (2nd edition)*. San Diego, CA.: Academic Press.
- Albonetti, M. E. y Farabollini, F. (1994). Social stress by repeated defeat: effects on social behaviour and emotionality. *Behavioural Brain Research*, 62(2), 187-193. [https://doi.org/10.1016/0166-4328\(94\)90027-2](https://doi.org/10.1016/0166-4328(94)90027-2)
- Altonsy, M. O., Sasse, S. K., Phang, T. L. y Gerber, A. N. (2014). Context-dependent cooperation between nuclear factor κ B (NF- κ B) and the glucocorticoid receptor at a TNFAIP3 intronic enhancer: A mechanism to maintain negative feedback control of inflammation. *Journal of Biological Chemistry*, 289(12), 8231-8239. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.545178>
- Alves, G. J., Vismari, L., Lazzarini, R., Luis, J., Merusse, B. y Palermo-neto, J. (2010). Odor cues from tumor-bearing mice induces neuroimmune changes. *Behavioural brain research*, 214(2), 357-367. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2010.06.003>
- American Cancer Society. *Facts & Figures 2019*. American Cancer Society. Atlanta, Ga. 2019.
- American Psychiatric Association. (2013). *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*. American Psychiatric Association. <https://doi.org/10.1176/appi.books.9780890425596>
- Amkraut, A. y Solomon, G. F. (1972). Stress and murine sarcoma virus (Moloney)-induced tumors. *Cancer Research*, 32(7), 1428-1433. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4337829>
- Anderson, G., Kubera, M., Duda, W., Lason, W., Berk, M. y Maes, M. (2013). Increased

- IL-6 trans-signaling in depression: focus on the tryptophan catabolite pathway, melatonin and neuroprogression. *Pharmacological Reports: PR*, 65(6), 1647-1654.
- Andrade, M. L., Kamal, K. B. H. y Brain, P. F. (1989). Effects of positive and negative fighting experiences on behaviour in adult male mice. En Brain, P. F.; Mainardi, D.; Parmigiani, S., (Ed.), *House Mouse Aggression: A Model for Understanding the Evolution of Social Behaviour* (pp 223-232). Chur, Switzerland, Harwood Academic Publishers. https://www.academia.edu/21620834/Andrade_M.L._Kamal_K.B.H._and_Brain_P.F._1989_.Effects_of_positive_and_negative_fighting_experiences_on_behaviour_in_adult_male_mice._pp_223-232_In_House_Mouse_Aggression_A_Model_for_Understanding_the_Evolution_of_Social
- Antoni, M. H. y Dhabhar, F. S. (2019). The impact of psychosocial stress and stress management on immune responses in patients with cancer. *Cancer*, 125(9), 1417-1431. <https://doi.org/10.1002/cncr.31943>
- Armaiz-Pena, G. N., Cole, S. W., Lutgendorf, S. K. y Sood, A. K. (2013). Neuroendocrine influences on cancer progression. *Brain, Behavior, and Immunity*, 30, S19-S25. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2012.06.005>
- Atallah, E. y Flaherty, L. (2005). Treatment of metastatic malignant melanoma. *Current Treatment Options in Oncology*, 6(3), 185-193. <https://doi.org/10.1007/s11864-005-0002-5>
- Audet, M. C., Jacobson-Pick, S., Wann, B. P. y Anisman, H. (2011). Social defeat promotes specific cytokine variations within the prefrontal cortex upon subsequent aggressive or endotoxin challenges. *Brain, Behavior, and Immunity*, 25(6), 1197-1205. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2011.03.010>
- Avgustinovich, D. F., Gorbach, O. V. y Kudryavtseva, N. N. (1997). Comparative analysis of anxiety-like behavior in partition and plus-maze tests after agonistic interactions in mice. *Physiology & Behavior*, 61(1), 37-43. [https://doi.org/10.1016/S0031-9384\(96\)00303-4](https://doi.org/10.1016/S0031-9384(96)00303-4)
- Avitsur, R., Stark, J. L. y Sheridan, J. F. (2001). Social stress induces glucocorticoid

- resistance in subordinate animals. *Hormones and Behavior*, 39(4), 247–257.
<https://doi.org/10.1006/hbeh.2001.1653>
- Azpiroz, A., De Miguel, Z., Fano, E. y Vegas, O. (2008). Relations between different coping strategies for social stress, tumor development and neuroendocrine and immune activity in male mice. *Brain, Behavior, and Immunity*, 22(5), 690–698.
<https://doi.org/10.1016/j.bbi.2007.10.007>
- Babcock, T. A. y Carlin, J. M. (2000). Transcriptional activation of indoleamine dioxygenase by interleukin 1 and tumor necrosis factor α in interferon-treated epithelial cells. *Cytokine*, 12(6), 588–594. <https://doi.org/10.1006/cyto.1999.0661>
- Baltgalvis, K. A., Berger, F. G., Peña, M. M. O., Mark Davis, J., White, J. P. y Carson, J. A. (2010). Activity level, apoptosis, and development of cachexia in *Apc^{Min/+}* mice. *Journal of Applied Physiology*, 109(4), 1155–1161.
<https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00442.2010>
- Baltrusch, H. J., Stangel, W. y Titze, I. (1991). Stress, cancer and immunity. New developments in biopsychosocial and psychoneuroimmunologic research. *Acta Neurologica*, 13(4), 315–327. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1781308>
- Banks, W. (2005). Blood-Brain Barrier Transport of Cytokines: A Mechanism for Neuropathology. *Current Pharmaceutical Design*, 11(8), 973–984.
<https://doi.org/10.2174/1381612053381684>
- Barnum, C. J., Blandino, P. y Deak, T. (2008). Social status modulates basal IL-1 concentrations in the hypothalamus of pair-housed rats and influences certain features of stress reactivity. *Brain, Behavior, and Immunity*, 22(4), 517–527.
<https://doi.org/10.1016/j.bbi.2007.10.004>
- Bartolomucci, A., Palanza, P., Sacerdote, P., Panerai, A. E., Sgoifo, A., Dantzer, R. y Parmigiani, S. (2005). Social factors and individual vulnerability to chronic stress exposure. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 29(1), 67–81.
<https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2004.06.009>

- Bay-Richter, C., Linderholm, K. R., Lim, C. K., Samuelsson, M., Träskman-Bendz, L., Guillemin, G. J., Erhardt, S. y Brundin, L. (2015). A role for inflammatory metabolites as modulators of the glutamate N-methyl-d-aspartate receptor in depression and suicidality. *Brain, Behavior, and Immunity*, 43, 110–117. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2014.07.012>
- Beck, A. (1967). Depression: Clinical, experimental, and theoretical aspects. *New York: Hoeber Medical Division*. https://books.google.es/books?hl=es&lr=&id=6rigrtdo0u2UC&oi=fnd&pg=PA3&dq=depression:+clinical,+experimental+and+theoretical+aspects&ots=T39iJ8G11J&sig=U995a_pYMTH8V4jxR4FKmLW3rCE
- Becker, C., Zeau, B., Rivat, C., Blugeot, A., Hamon, M. y Benoliel, J. J. (2008). Repeated social defeat-induced depression-like behavioral and biological alterations in rats: Involvement of cholecystinin. *Molecular Psychiatry*, 13(12), 1079–1092. <https://doi.org/10.1038/sj.mp.4002097>
- Bekhhbat, M., Rowson, S. A. y Neigh, G. N. (2017). Checks and balances: The glucocorticoid receptor and NFκB in good times and bad. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 46(5), 15–31. <https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2017.05.001>
- Bell, A. M. (2007). Animal personalities. *Nature*, 447(7144), 539–540. <https://doi.org/10.1038/447539a>
- Benus, R. F., Den Daas, S., Koolhaas, J. M. y Van Oortmerssen, G. A. (1990). Routine Formation and Flexibility in Social and Non-Social Behaviour of Aggressive and Non-Aggressive Male Mice. *Behaviour*, 112(3–4), 176–193. <https://doi.org/10.1163/156853990X00185>
- Benus, R. F., Koolhaas, J. M. y Van Oortmerssen, G. A. (1987). Individual Differences in Behavioural Reaction To a Changing Environment in Mice and Rats. *Behaviour*, 100(1–4), 105–121. <https://doi.org/10.1163/156853987X00099>
- Bereshchenko, O., Bruscoli, S. y Riccardi, C. (2018). Glucocorticoids, sex hormones, and immunity. *Frontiers in Immunology*, 9(6), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01332>

- Berton, O., Aguerre, S., Sarrieau, A., Mormede, P. y Chaouloff, F. (1998). Differential effects of social stress on central serotonergic activity and emotional reactivity in Lewis and spontaneously hypertensive rats. *Neuroscience*, 82(1), 147-159. [https://doi.org/10.1016/s0306-4522\(97\)00282-0](https://doi.org/10.1016/s0306-4522(97)00282-0)
- Binder, E. B. y Nemeroff, C. B. (2010). The CRF system, stress, depression and anxiety – insights from human genetic studies. *Molecular Psychiatry*, 15(6), 574-588. <https://doi.org/10.1038/mp.2009.141>
- Blandino, P., Barnum, C. J., Solomon, L. G., Larish, Y., Lankow, B. S. y Deak, T. (2009). Gene expression changes in the hypothalamus provide evidence for regionally-selective changes in IL-1 and microglial markers after acute stress. *Brain Behavior and Immunity*, 23(7), 958-968. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2009.04.013>
- Blandino, P., Barnum, C. J. y Deak, T. (2006). The involvement of norepinephrine and microglia in hypothalamic and splenic IL-1 β responses to stress. *Journal of Neuroimmunology*, 173(1-2), 87-95. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2005.11.021>
- Blatt, S. J. (2004). *Experiences of depression: Theoretical, clinical, and research perspectives*. American Psychological Association. <https://doi.org/10.1037/10749-000>
- Boersma, G. J., Smeltzer, M. D., Scott, K. A., Scheurink, A. J., Tamashiro, K. L. y Sakai, R. R. (2017). Stress coping style does not determine social status, but influences the consequences of social subordination stress. *Physiology and Behavior*, 178, 126-133. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2016.12.041>
- Bonaz, B., Sinniger, V. y Pellissier, S. (2016). Anti-inflammatory properties of the vagus nerve: potential therapeutic implications of vagus nerve stimulation. *The Journal of Physiology*, 594(20), 5781-5790. <https://doi.org/10.1113/JP271539>
- Bonaz, B., Sinniger, V. y Pellissier, S. (2017). The Vagus Nerve in the Neuro-Immune Axis: Implications in the Pathology of the Gastrointestinal Tract. *Frontiers in Immunology*, 8, 1452. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01452>
- Bortolato, B., Hyphantis, T. N., Valpione, S., Perini, G., Maes, M., Morris, G., Kubera, M.,

- Köhler, C. A., Fernandes, B. S., Stubbs, B., Pavlidis, N. y Carvalho, A. F. (2017). Depression in cancer: The many biobehavioral pathways driving tumor progression. *Cancer Treatment Reviews*, 52, 58-70. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2016.11.004>
- Boucek, J., Mrkvan, T., Chovanec, M., Kuchar, M., Betka, J., Boucek, V., Hladikova, M., Betka, J., Eckschlager, T. y Rihova, B. (2010). Regulatory T cells and their prognostic value for patients with squamous cell carcinoma of the head and neck. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 14(1-2), 426-433. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2008.00650.x>
- Bouchard, L. C., Antoni, M. H., Blomberg, B. B., Stagl, J. M., Gudenkauf, L. M., Jutagir, D. R., Diaz, A., Lechner, S., Glück, S., Derhagopian, R. P. y Carver, C. S. (2016). Postsurgical depressive symptoms and proinflammatory cytokine elevations in women undergoing primary treatment for breast cancer. *Psychosomatic Medicine*, 78(1), 26-37. <https://doi.org/10.1097/PSY.0000000000000261>
- Brain, P. F. (1972). Endocrine and behavioral differences between dominant and subordinate male house mice housed in pairs. *Psychonomic Science*, 28(5), 260-262. <https://doi.org/10.3758/BF03328732>
- Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A. y Jemal, A. (2018). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 68(6), 394-424. <https://doi.org/10.3322/caac.21492>
- Brites, D. y Fernandes, A. (2015). Neuroinflammation and Depression: Microglia Activation, Extracellular Microvesicles and microRNA Dysregulation. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 9(12), 476. <https://doi.org/10.3389/fncel.2015.00476>
- Broadhurst, P. L. (1957). Determinants of emotionality in the rat. *British Journal of Psychology*, 48(1), 1-12. <https://doi.org/10.1111/j.2044-8295.1957.tb00594.x>
- Broadhurst, P. L. (1958). Determinants of emotionality in the rat. II. Antecedent factors. *British Journal of Psychology*, 49(1), 12-20.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13536301>

Bronte, V. y Pittet, M. J. J. (2013). The spleen in local and systemic regulation of immunity. *Immunity*, 39(5), 806–818. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.10.010>

Brown, G. y Harris, T. (Eds.). (2012). *Social origins of depression: A study of psychiatric disorder in women* (Vol. 2). Routledge. <https://content.taylorfrancis.com/books/download?dac=C2004-0-13464-&isbn=9781135644963&format=googlePreviewPdf>

Bunney, W. E. y Davis, J. M. (1965). Norepinephrine in Depressive Reactions: A Review. *Archives of General Psychiatry*, 13(6), 483–494. <https://doi.org/10.1001/archpsyc.1965.01730060001001>

Burnet, M. (1957a). Cancer – A Biological Approach: I. The Processes Of Control. II. The Significance of Somatic Mutation. *British Medical Journal*, 1(5022), 779. <https://doi.org/10.1136/BMJ.1.5022.779>

Burnet, M. (1957b). Biology and medicine. *The Eugenics Review*, 49(3), 127–135. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21260738>

Buwalda, B., Kole, M. H. P., Veenema, A. H., Huininga, M., de Boer, S. F., Korte, S. M. y Koolhaas, J. M. (2005). Long-term effects of social stress on brain and behavior: a focus on hippocampal functioning. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 29(1), 83–97. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2004.05.005>

Calvo, N., Cecchi, M., Kabbaj, M., Watson, S. J. y Akil, H. (2011). Differential effects of social defeat in rats with high and low locomotor response to novelty. *Neuroscience*, 183, 81–89. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2011.03.046>

Candido, J. y Hagemann, T. (2013). Cancer-Related Inflammation. *Journal of Clinical Immunology*, 33(S1), 79–84. <https://doi.org/10.1007/s10875-012-9847-0>

Candolfi, M., Curtin, J. F., Yagiz, K., Assi, H., Wibowo, M. K., Alzadeh, G. E., Foulad, D., Muhammad, A. G., Salehi, S., Keech, N., Puntel, M., Liu, C., Sanderson, N. R.,

- Kroeger, K. M., Dunn, R., Martins, G., Lowenstein, P. R. y Castro, M. G. (2011). B cells are critical to T-cell-mediated antitumor immunity induced by a combined immune-stimulatory/conditionally cytotoxic therapy for glioblastoma. *Neoplasia*, 13(10), 947-960. <https://doi.org/10.1593/neo.11024>
- Cannon, W. B. (1915). *Bodily changes in pain, hunger, fear and rage: An account of recent researches into the function of emotional excitement*. D Appleton & Company. <https://doi.org/10.1037/10013-000>
- Capuron, L. y Miller, A. H. (2004). Cytokines and psychopathology: Lessons from interferon- α . *Biological Psychiatry*, 56(11), 819-824. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2004.02.009>
- Capuron, L. y Miller, A. H. (2011). Immune system to brain signaling: Neuropsychopharmacological implications. *Pharmacology and Therapeutics*, 130(2), 226-238. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2011.01.014>
- Capuron, L., Pagnoni, G., Drake, D. F., Woolwine, B. J., Spivey, J. R., Crowe, R. J., Votaw, J. R., Goodman, M. M. y Miller, A. H. (2012). Dopaminergic Mechanisms of Reduced Basal Ganglia Responses to Hedonic Reward During Interferon Alfa Administration. *Archives of General Psychiatry*, 69(10), 1044-1053. <https://doi.org/10.1001/archgenpsychiatry.2011.2094>
- Cardoso, G., Graca, J., Klut, C., Trancas, B. y Papoila, A. (2016). Depression and anxiety symptoms following cancer diagnosis: a cross-sectional study. *Psychology, Health & Medicine*, 21(5), 562-570. <https://doi.org/10.1080/13548506.2015.1125006>
- Carney, R. M. y Freedland, K. E. (2003). Depression, mortality, and medical morbidity in patients with coronary heart disease. *Biological psychiatry*, 54(3), 241-247.
- Carvalho, L. A. y Pariante, C. M. (2008). In vitro modulation of the glucocorticoid receptor by antidepressants. *Stress*, 11(6), 411-424.
- Casadevall, A. y Pirofski, L. (2003). Antibody-mediated regulation of cellular immunity and the inflammatory response. *Trends in Immunology*, 24(9), 474-478.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12967670>

Celik, C., Erdem, M., Cayci, T., Ozdemir, B., Ozgur Akgul, E., Kurt, Y. G., Yaman, H., Isintas, M., Ozgen, F. y Ozsahin, A. (2010). The association between serum levels of neopterin and number of depressive episodes of major depression. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 34(2), 372–375. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2010.01.002>

Chao, H. M., Choo, P. H. y McEwen, B. S. (1989). Glucocorticoid and Mineralocorticoid Receptor mRNA Expression in Rat Brain. *Neuroendocrinology*, 50(4), 365–371. <https://doi.org/10.1159/000125250>

Charmandari, E., Tsigos, C. y Chrousos, G. (2005). Endocrinology of the stress response. *Annual Review of Physiology*, 67(1), 259–284. <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.67.040403.120816>

Chen, B., Dowlathshahi, D., MacQueen, G. M., Wang, J. F. y Young, L. T. (2001). Increased hippocampal BDNF immunoreactivity in subjects treated with antidepressant medication. *Biological Psychiatry*, 50(4), 260–265. [https://doi.org/10.1016/S0006-3223\(01\)01083-6](https://doi.org/10.1016/S0006-3223(01)01083-6)

Cherry, N. M., Chen, Y. y McDonald, J. C. (2006). Reported incidence and precipitating factors of work-related stress and mental ill-health in the United Kingdom (1996–2001). *Occupational Medicine*, 56(6), 414–421. <https://doi.org/10.1093/occmed/kql041>

Chiang, J. J., Eisenberger, N. I., Seeman, T. E. y Taylor, S. E. (2012). Negative and competitive social interactions are related to heightened proinflammatory cytokine activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(6), 1878–1882. <https://doi.org/10.1073/pnas.1120972109>

Chrousos, G. P. y Gold, P. W. (1992). The concepts of stress and stress system disorders. Overview of physical and behavioral homeostasis. *JAMA*, 267(9), 1244–1252. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1538563>

- Chrousos, G. P. (1998). Stressors, stress, and neuroendocrine integration of the adaptive response the 1997 Hans Selye memorial lecture. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 851(1), 311–335. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1998.tb09006.x>
- Clark, S. M., Michael, K. C., Keegan, A. D. y Tonelli, L. H. (2013). Basic Principles in Immunology: Relevance for Studies in Psychoneuroimmunology. *The Wiley-Blackwell Handbook of Psychoneuroimmunology*, 1–23. <https://doi.org/10.1002/9781118314814.ch1>
- Cohen, S., Janicki-Deverts, D. y Miller, G. E. (2007). Psychological Stress and Disease. *JAMA*, 298(14), 1685–1687. <https://doi.org/10.1001/jama.298.14.1685>
- Cole, S. W., Conti, G., Arevalo, J. M. G., Ruggiero, A. M., Heckman, J. J. y Suomi, S. J. (2012). Transcriptional modulation of the developing immune system by early life social adversity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(50), 20578–83. <http://doi.org/10.1073/pnas.1218253109>
- Coley, W. B. (1893). The treatment of malignant tumors by repeated inoculations of erysipelas. With a report of ten original cases. 1893. *The American Journal of the Medical Sciences*, 105(6), 487. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1984929>
- Commons, K. G., Cholanians, A. B., Babb, J. A. y Ehlinger, D. G. (2017). The Rodent Forced Swim Test Measures Stress-Coping Strategy, Not Depression-like Behavior. *ACS Chemical Neuroscience*, 8(5), 955–960. <https://doi.org/10.1021/acschemneuro.7b00042>
- Coppen, A. (1967). The biochemistry of affective disorders. *The British Journal of Psychiatry: The Journal of Mental Science*, 113(504), 1237–1264. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4169954>
- Cosci, F., Fava, G. A. y Sonino, N. (2015). Mood and Anxiety Disorders as Early Manifestations of Medical Illness: A Systematic Review. *Psychotherapy and Psychosomatics*, 84(1), 22–29. <https://doi.org/10.1159/000367913>
- Coussens, L. M. y Werb, Z. (2010). Inflammation and cancer. *Nature*, 420(6917), 860–867. <https://doi.org/10.1038/nature01322>. Inflammation

- Covington, I., Herbert, E., Maze, I., Laplant, Q. C., Vialou, V. F., Ohnishi, Y. N., Berton, O., Fass, D. M., Renthal, W., Rush Iii, A. J., Wu, E. Y., Ghose, S., Krishnan, V., Russo, S. J., Tamminga, C., Haggarty, S. J. y Nestler, E. J. (2010). Antidepressant actions of histone deacetylase inhibitors. *Epigenomics*, 2(2), 184–185. <https://doi.org/10.2217/epi.10.15>
- Cowen, P. J., Sharp, T. y Lau, J. Y. (Eds.). (2014). *Behavioral neurobiology of depression and its treatment* (Vol. 14). Springer Science & Business Media.
- Crawford, L. K., Rahman, S. F. y Beck, S. G. (2013). Social stress alters inhibitory synaptic input to distinct subpopulations of raphe serotonin neurons. *ACS Chemical Neuroscience*, 4(1), 200–209. <https://doi.org/10.1021/cn300238j>
- Crawley, J. N. (1985). Exploratory behavior models of anxiety in mice. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 9(1), 37–44. [https://doi.org/10.1016/0149-7634\(85\)90030-2](https://doi.org/10.1016/0149-7634(85)90030-2)
- Croft, A. P., Brooks, S. P., Cole, J. y Little, H. J. (2005). Social defeat increases alcohol preference of C57BL/10 strain mice; effect prevented by a CCKB antagonist. *Psychopharmacology*, 183(2), 163–170. <https://doi.org/10.1007/s00213-005-0165-6>
- Cunnington, C. y Channon, K. M. (2010). Tetrahydrobiopterin: pleiotropic roles in cardiovascular pathophysiology. *Heart*, 96(23), 1872–1877. <https://doi.org/10.1136/hrt.2009.180430>
- Czéh, B., Fuchs, E., Wiborg, O. y Simon, M. (2016). Animal models of major depression and their clinical implications. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 64, 293–310. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2015.04.004>
- Dadomo, H., Sanghez, V., Di Cristo, L., Lori, A., Ceresini, G., Malinge, I., Parmigiani, S., Palanza, P., Sheardown, M. y Bartolomucci, A. (2011). Vulnerability to chronic subordination stress-induced depression-like disorders in adult 129SvEv male mice. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 35(6), 1461–1471. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2010.11.016>
- Dantzer, R. (2012). Depression and inflammation: an intricate relationship. *Biological*

- Psychiatry*, 71(1), 4–5. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2011.10.025>
- Dantzer, R. (2017). Role of the kynurenine metabolism pathway in inflammation-induced depression: Preclinical approaches. *Current Topics in Behavioral Neurosciences*, 31, 117-138. https://doi.org/10.1007/7854_2016_6
- Dantzer, R., Cohen, S., Russo, S. J. y Dinan, T. G. (2018). Resilience and immunity. *Brain, Behavior, and Immunity*, 74, 28–42. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2018.08.010>
- Dantzer, R., O'Connor, J. C., Freund, G. G., Johnson, R. W. y Kelley, K. W. (2008). From inflammation to sickness and depression: when the immune system subjugates the brain. *Nature Reviews. Neuroscience*, 9(1), 46–56. <https://doi.org/10.1038/nrn2297>
- de Boer, S. F., Buwalda, B. y Koolhaas, J. M. (2017). Untangling the neurobiology of coping styles in rodents: Towards neural mechanisms underlying individual differences in disease susceptibility. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 74, 401–422. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2016.07.008>
- De Bosscher, K., Berghe, W. Vanden, Vermeulen, L., Plaisance, S., Boone, E. y Haegeman, G. (2000). Glucocorticoids repress NF- κ B-driven genes by disturbing the interaction of p65 with the basal transcription machinery, irrespective of coactivator levels in the cell. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(8), 3919–3924. <https://doi.org/10.1073/pnas.97.8.3919>
- De Kloet, E. R. y Molendijk, M. L. (2016). Coping with the Forced Swim Stressor: Towards Understanding an Adaptive Mechanism. *Neural Plasticity*, 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/6503162>
- De La Garza, R. (2005). Endotoxin- or pro-inflammatory cytokine-induced sickness behavior as an animal model of depression: focus on anhedonia. *Neurosci Biobehav Rev*, 29(4-5), 761-770.
- De Miguel, Z. (2010). *Caracterización de diferentes estrategias de afrontamiento del estrés social: consecuencias sobre la actividad neuroendocrina, inmunitaria y el desarrollo tumoral en ratones* [tesis doctoral, Universidad del País Vasco]. Repositorio UPV/EHU.

<https://dialnet.unirioja.es/servlet/tesis?codigo=157517>

- Delgado, P. L. (2000). Depression: The case for a monoamine deficiency. *Journal of Clinical Psychiatry*, 61(6), 7-11. <https://psycnet.apa.org/record/2000-03492-002>
- Derijk, R. H., Petrides, J., Deuster, P., Gold, P. W. y Sternberg, E. M. (1996). Changes in Corticosteroid Sensitivity of Peripheral Blood Lymphocytes after Strenuous Exercise in Humans. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolsm Copyright*, 81(1), 228-235. <https://academic.oup.com/jcem/article-abstract/81/1/228/2649454>
- Deussing, J. M. (2006). Animal models of depression. *Drug discovery today: disease models*, 3(4), 375-383. <https://doi.org/10.1016/j.ddmod.2006.11.003>
- Deverts, D. J., Cohen, S., Kalra, P. y Matthews, K. A. (2012). The prospective association of socioeconomic status with C-reactive protein levels in the CARDIA study. *Brain, Behavior, and Immunity*, 26(7), 1128-1135. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2012.07.017>
- Dhabhar, F. S., Satoskar, A. R., Bluethmann, H., David, J. R. y McEwen, B. S. (2000). Stress-induced enhancement of skin immune function: A role for gamma interferon. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(6), 2846-2851. <https://doi.org/10.1073/pnas.050569397>
- Dhabhar, F. S. (2014). Effects of stress on immune function: The good, the bad, and the beautiful. *Immunologic Research*, 58(2-3), 193-210. <https://doi.org/10.1007/s12026-014-8517-0>
- Dhabhar, F. S. y McEwen, B. S. (1997). Acute stress enhances while chronic stress suppresses cell-mediated immunity in vivo: A potential role for leukocyte trafficking. *Brain, Behavior, and Immunity*, 11(4), 286-306. <https://doi.org/10.1006/brbi.1997.0508>
- Dhabhar, F. S. y McEwen, B. S. (1999). Enhancing versus suppressive effects of stress hormones on skin immune function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(3), 1059-1064. <https://doi.org/10.1073/PNAS.96.3.1059>

- Di, S., Itoga, C. A., Fisher, M. O., Solomonow, J., Roltsch, E. A., Gilpin, N. W. y Tasker, J. G. (2016). Acute Stress Suppresses Synaptic Inhibition and Increases Anxiety via Endocannabinoid Release in the Basolateral Amygdala. *Journal of Neuroscience*, 36(32), 8461–8470. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2279-15.2016>
- Diamond, M., Kelly, J. P. y Connor, T. J. (2006). Antidepressants suppress production of the Th1 cytokine interferon- γ , independent of monoamine transporter blockade. *European Neuropsychopharmacology*, 16(7), 481–490. <https://doi.org/10.1016/j.euroneuro.2005.11.011>
- Dinan, T. G. y Cryan, J. F. (2012). Regulation of the stress response by the gut microbiota: Implications for psychoneuroendocrinology. *Psychoneuroendocrinology*, 37(9), 1369–1378. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2012.03.007>
- Dowlati, Y., Herrmann, N., Swardfager, W., Liu, H., Sham, L., Reim, E. K. y Lanctôt, K. L. (2010). A meta-analysis of cytokines in major depression. *Biological Psychiatry*, 67(5), 446–457. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2009.09.033>
- Duarte, F. S., Andrade, E. da S., Vieira, R. A., Uieara, M., Nunes, R. J. y de Lima, T. C. M. (2006). Synthesis and antidepressant-like action of stereoisomers of imidobenzenesulfonylaziridines in mice evaluated in the forced swimming test. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 14(15), 5397–5401. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2006.03.036>
- Duclot, F. y Kabbaj, M. (2013). Individual Differences in Novelty Seeking Predict Subsequent Vulnerability to Social Defeat through a Differential Epigenetic Regulation of Brain-Derived Neurotrophic Factor Expression. *The Journal of Neuroscience*, 33(27), 11048. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0199-13.2013>
- Duman, R. S. y Monteggia, L. M. (2006). A Neurotrophic Model for Stress-Related Mood Disorders. *Biological Psychiatry*, 59(12), 1116–1127. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2006.02.013>
- Dunn, A. J. (2005). Cytokine activation of the hypothalamo–pituitary–adrenal axis. *Techniques in the Behavioral and Neural Sciences*, 15, 157–174.

[https://doi.org/10.1016/S0921-0709\(05\)80054-9](https://doi.org/10.1016/S0921-0709(05)80054-9)

Dunn, A. J., Swiergiel, A. H. y Beaurepaire, R. de. (2005). Cytokines as mediators of depression: What can we learn from animal studies? *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 29(4-5), 891-909. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2005.03.023>

Dwivedi, Y., Rizavi, H. S., Roberts, R. C., Conley, R. C., Tamminga, C. A. y Pandey, G. N. (2001). Reduced activation and expression of ERK1/2 MAP kinase in the post-mortem brain of depressed suicide subjects. *Journal of Neurochemistry*, 77(3), 916-928. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2001.00300.x>

Ehrlich, P. (1909). Über den jetzigen Stand der Chemotherapie. *Berichte Der Deutschen Chemischen Gesellschaft*, 42(1), 17-47. <https://doi.org/10.1002/cber.19090420105>

Ek, M., Engblom, D. y Saha, S. (2001). Inflammatory response: Pathway across the blood-brain barrier. *Nature*, 410(6), 827. <https://doi.org/10.1038/35068632>

Elder, D. E. (2016). Melanoma progression. *Pathology*, 48(2), 147-154. <https://doi.org/10.1016/J.PATHOL.2015.12.002>

Elenkov, I. J. y Chrousos, G. P. (2002). Stress hormones, proinflammatory and antiinflammatory cytokines, and autoimmunity. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 966(1), 290-303. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2002.tb04229.x>

Engel, G. L. y Schmale, A. H. (1972). Conservation-withdrawal: a primary regulatory process for organismic homeostasis. *Ciba Foundation Symposium*, 8, 57-75. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4144967>

Ericsson, A., Kovács, K. J. y Sawchenko, P. E. (1994). A functional anatomical analysis of central pathways subserving the effects of interleukin-1 on stress-related neuroendocrine neurons. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 14(2), 897-913. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8301368>

Eysenck, H. J. (1989). El lugar de las diferencias individuales en la psicología científica. *Estudios de Psicología*, 10(39-40), 159-206.

<https://doi.org/10.1080/02109395.1989.10821126>

- Felger, J. C. y Lotrich, F. E. (2013). Inflammatory cytokines in depression: Neurobiological mechanisms and therapeutic implications. *Neuroscience*, 246, 199–229. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2013.04.060>
- Felger, J. C., Li, L., Marvar, P. J., Woolwine, B. J., Harrison, D. G., Raison, C. L. y Miller, A. H. (2013a). Tyrosine metabolism during interferon-alpha administration: Association with fatigue and CSF dopamine concentrations. *Brain, Behavior, and Immunity*, 31, 153–160. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2012.10.010>
- Felger, J. C., Mun, J., Kimmel, H. L., Nye, J. A., Drake, D. F., Hernandez, C. R., Freeman, A. A., Rye, D. B., Goodman, M. M., Howell, L. L. y Miller, A. H. (2013b). Chronic interferon- α decreases dopamine 2 receptor binding and striatal dopamine release in association with anhedonia-like behavior in nonhuman primates. *Neuropsychopharmacology*, 38(11), 2179–2187. <https://doi.org/10.1038/npp.2013.115>
- Feller, L., Khammissa, R. A. G., Ballyram, R., Chandran, R. y Lemmer, J. (2019). Chronic Psychosocial Stress in Relation to Cancer. *Middle East Journal of Cancer*, 10(1), 1–8. <https://doi.org/10.30476/MEJC.2019.44680>
- Fidler, I. J. (2003). The pathogenesis of cancer metastasis: the “seed and soil” hypothesis revisited. *Nature Reviews Cancer*, 3(6), 453–458. <https://doi.org/10.1038/nrc1098>
- Finnell, J. E., Lombard, C. M., Melson, M. N., Singh, N. P., Nagarkatti, M., Nagarkatti, P., Fadel, J. R., Wood, C. S. y Wood, S. K. (2017). The protective effects of resveratrol on social stress-induced cytokine release and depressive-like behavior. *Brain, Behavior, and Immunity*, 59, 147–157. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2016.08.019>
- Flannelly, K. y Lore, R. (1975). Dominance- subordination in cohabiting pairs of adult rats: Effects on Aggressive behavior. *Aggressive Behavior*, 1(4), 331–340. [https://doi.org/10.1002/1098-2337\(1975\)1:4<331::AID-AB2480010406>3.0.CO;2-8](https://doi.org/10.1002/1098-2337(1975)1:4<331::AID-AB2480010406>3.0.CO;2-8)
- Flannelly, K. J., Flannelly, L. y Blanchard, R. J. (1984). Adult experience and the

- expression of aggression: a comparative analysis. *Progress in Clinical and Biological Research*, 169, 207–259. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6542671>
- Fokkema, D. S., Koolhaas, J. M. y van der Gugten, J. (1995). Individual characteristics of behavior, blood pressure, and adrenal hormones in colony rats. *Physiology and Behavior*, 57(5), 857–862. [https://doi.org/10.1016/0031-9384\(94\)00333-Z](https://doi.org/10.1016/0031-9384(94)00333-Z)
- Folkman, S. y Moskowitz, J. T. (2004). Coping: Pitfalls and Promise. *Annual Review of Psychology*, 55(1), 745–774. <https://doi.org/10.1146/annurev.psych.55.090902.141456>
- Forkosh, O., Karamihalev, S., Roeh, S., Alon, U., Anpilov, S., Touma, C., Nussbaumer, M., Flachskamm, C., Kaplick, P. M., Shemesh, Y. y Chen, A. (2019). Identity domains capture individual differences from across the behavioral repertoire. *Nature Neuroscience*, 22(12), 2023–2028. <https://doi.org/10.1038/s41593-019-0516-y>
- Frank, M. G., Thompson, B. M., Watkins, L. R. y Maier, S. F. (2012). Glucocorticoids mediate stress-induced priming of microglial pro-inflammatory responses. *Brain, Behavior, and Immunity*, 26(2), 337–345. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2011.10.005>
- Frick, L. R., Rapanelli, M., Bussmann, U. A., Klecha, A. J., Arcos, M. L. B., Genaro, A. M. y Cremaschi, G. A. (2009). Involvement of thyroid hormones in the alterations of T-cell immunity and tumor progression induced by chronic stress. *Biological Psychiatry*, 65(11), 935–942. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2008.12.013>
- Friedman, M. y Rosenman, R. H. (1971). Type A Behavior Pattern: its association with coronary heart disease. *Annals of Clinical Research*, 3(6), 300–312. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5156890>
- Friedman, M. y Rosenman, R. H. (1959). Association of specific overt behavior pattern with blood and cardiovascular findings. *Journal of the American Medical Association*, 169(12), 1286–1296. <https://doi.org/10.1001/jama.1959.03000290012005>
- Fu, W. W., Popovic, M., Agarwal, A., Milakovic, M., Fu, T. S., McDonald, R., Fu, G., Lam, M., Chow, R., Cheon, S., Pulezas, N., Lam, H., DeAngelis, C. y Chow, E. (2016).

- The impact of psychosocial intervention on survival in cancer: A meta-analysis. *Annals of Palliative Medicine*, 5(2), 93–106. <https://doi.org/10.21037/apm.2016.03.06>
- Fujigaki, H., Saito, K., Fujigaki, S., Takemura, M., Sudo, K., Ishiguro, H. y Seishima, M. (2006). The signal transducer and activator of transcription 1 α and interferon regulatory factor 1 are not essential for the induction of indoleamine 2,3-dioxygenase by lipopolysaccharide: Involvement of p38 mitogen-activated protein kinase and nuclear factor- κ B. *Journal of Biochemistry*, 139(4), 655–662. <https://doi.org/10.1093/jb/mvj072>
- Fulgini, A. J., Telzer, E. H., Bower, J., Cole, S. W., Kiang, L. y Irwin, M. R. (2009). A Preliminary Study of Daily Interpersonal Stress and C-Reactive Protein Levels Among Adolescents From Latin American and European Backgrounds. *Psychosomatic Medicine*, 71(3), 329–333. <https://doi.org/10.1097/PSY.0b013e3181921b1f>
- Furtado, M. y Katzman, M. a. (2015). Examining the role of neuroinflammation in major depression. *Psychiatry Research*, 229(1–2), 27–36. <https://doi.org/10.1016/j.psychres.2015.06.009>
- Garcia-Bueno, B., Madrigal, J. L. M., Lizasoain, I., Moro, M. A., Lorenzo, P. y Leza, J. C. (2005). The anti-inflammatory prostaglandin 15d-PGJ(2) decreases oxidative/nitrosative mediators in brain after acute stress in rats. *Psychopharmacology*, 180(3), 513–522. <https://doi.org/10.1007/s00213-005-2195-5>
- García-Lecea, M., Gasanov, E., Jedrychowska, J., Kondrychyn, I., Teh, C., You, M.-S. y Korzh, V. (2017). Development of Circumventricular Organs in the Mirror of Zebrafish Enhancer-Trap Transgenics. *Frontiers in Neuroanatomy*, 11, 114. <https://doi.org/10.3389/fnana.2017.00114>
- Garnefski, N., Legerstee, J., Kraaij, V., Van Den Kommer, T. y Teerds, J. (2002). Cognitive coping strategies and symptoms of depression and anxiety: A comparison between adolescents and adults. *Journal of Adolescence*, 25(6), 603–611. <https://doi.org/10.1006/jado.2002.0507>

- Gaynes, B. N. (2009). Identifying difficult-to-treat depression: Differential diagnosis, subtypes, and comorbidities. *Journal of Clinical Psychiatry, 70*, 10–15. <https://doi.org/10.4088/JCP.8133su1c.02>
- Gibb, J., Hayley, S., Poulter, M. O. y Anisman, H. (2011). Effects of stressors and immune activating agents on peripheral and central cytokines in mouse strains that differ in stressor responsivity. *Brain, Behavior, and Immunity, 25*(3), 468–482. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2010.11.008>
- Giese-Davis, J., Collie, K., Rancourt, K. M. S. S., Neri, E., Kraemer, H. C. y Spiegel, D. (2011). Decrease in depression symptoms is associated with longer survival in patients with metastatic breast cancer: A secondary analysis. *Journal of Clinical Oncology, 29*(4), 413–420. <https://doi.org/10.1200/JCO.2010.28.4455>
- Gil, S. y Caspi, Y. (2006). Personality Traits, Coping Style, and Perceived Threat as Predictors of Posttraumatic Stress Disorder After Exposure to a Terrorist Attack: A Prospective Study. *Psychosomatic Medicine, 68*(6), 904–909. <https://doi.org/10.1097/01.psy.0000242124.21796.f8>
- Gimeno, D., Brunner, E. J., Lowe, G. D. O., Rumley, A., Marmot, M. G. y Ferrie, J. E. (2007). Adult socioeconomic position, C-reactive protein and interleukin-6 in the Whitehall II prospective study. *European Journal of Epidemiology, 22*(10), 675–683. <https://doi.org/10.1007/s10654-007-9171-9>
- Golde, W. T., Gollobin, P. y Rodriguez, L. L. (2005). A rapid, simple, and humane method for submandibular bleeding of mice using a lancet. *Lab Animal, 34*(9), 39–43. <https://doi.org/10.1038/labani1005-39>
- Golden, J., O'Dwyer, A. M. y Conroy, R. M. (2005). Depression and anxiety in patients with hepatitis C: Prevalence, detection rates and risk factors. *General Hospital Psychiatry, 27*(6), 431–438. <https://doi.org/10.1016/j.genhosppsy.2005.06.006>
- Gómez-Lázaro, E., Arregi, A., Beitia, G., Vegas, O., Azpiroz, A. y Garmendia, L. (2011). Individual differences in chronically defeated male mice: Behavioral, endocrine, immune, and neurotrophic changes as markers of vulnerability to the effects of

- stress. *Stress*, 14(5), 537–548. <https://doi.org/10.3109/10253890.2011.562939>
- Gómez-Lázaro, E., Garmendia, L., Beitia, G., Pérez-Tejada, J., Azpiroz, A. y Arregi, A. (2012). Effects of a putative antidepressant with a rapid onset of action in defeated mice with different coping strategies. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 38(2), 317–327. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2012.04.019>
- Gotlib, I. H. y Joormann, J. (2010). Cognition and Depression: Current Status and Future Directions. *Annual Review of Clinical Psychology*, 6(1), 285–312. <https://doi.org/10.1146/annurev.clinpsy.121208.131305>
- Gouin, J. P., Glaser, R., Malarkey, W. B., Beversdorf, D. y Kiecolt-Glaser, J. (2012). Chronic stress, daily stressors, and circulating inflammatory markers. *Health Psychology*, 31(2), 264–268. <https://doi.org/10.1037/a0025536>
- Green, A. R. y Curzon, G. (1968). Decrease of 5-hydroxytryptamine in the brain provoked by hydrocortisone and its prevention by allopurinol. *Nature*, 220(5172), 1095–1097. <https://doi.org/10.1038/2201095a0>
- Greer, S., Morris, T. y Pettingale, K. W. (1979). Psychological response to breast cancer: effect on outcome. *Lancet*, 2(8146), 785–787. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(79\)92127-5](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(79)92127-5)
- Grigor'yan, G. A. y Gulyaeva, N. V. (2017). Modeling Depression in Animals: Behavior as the Basis for the Methodology, Assessment Criteria, and Classification. *Neuroscience and Behavioral Physiology*, 47(2), 204–216. <https://doi.org/10.1007/s11055-016-0386-7>
- Gururajan, A., Wouw, M. Van De, Boehme, M., Becker, T., Connor, R. O., Bastiaanssen, T. F. S. S., Moloney, G. M., Lyte, J. M., Paula, A., Silva, V., Merckx, B., Dinan, T. G., Cryan, J. F., van de Wouw, M., Boehme, M., Becker, T., O'Connor, R., Bastiaanssen, T. F. S. S., Moloney, G. M., ... Cryan, J. F. (2019). Resilience to chronic stress is associated with specific neurobiological, neuroendocrine and immune responses. *Brain, Behavior, and Immunity*, 80(4), 583–594. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2019.05.004>

- Haapakoski, R., Mathieu, J., Ebmeier, K. P., Alenius, H. y Kivimäki, M. (2015). Cumulative meta-analysis of interleukins 6 and 1 β , tumour necrosis factor α and C-reactive protein in patients with major depressive disorder. *Brain, Behavior, and Immunity*, 49, 206–215. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2015.06.001>
- Haber, S. N. y Knutson, B. (2010). The reward circuit: Linking primate anatomy and human imaging. *Neuropsychopharmacology*, 35(1), 4–26. <https://doi.org/10.1038/npp.2009.129>
- Hale, K. D., Weigent, D. A., Gauthier, D. K., Hiramoto, R. N. y Ghanta, V. K. (2003). Cytokine and hormone profiles in mice subjected to handling combined with rectal temperature measurement stress and handling only stress. *Life Sciences*, 72(13), 1495–1508. [https://doi.org/10.1016/S0024-3205\(02\)02415-3](https://doi.org/10.1016/S0024-3205(02)02415-3)
- Hall, C. S. (1934). Emotional behavior in the rat. I. Defecation and urination as measures of individual differences in emotionality. *Journal of Comparative Psychology*, 18(3), 385–403. <https://doi.org/10.1037/h0071444>
- Haller, J., Tóth, M., Halasz, J. y De Boer, S. F. (2006). Patterns of violent aggression-induced brain c-fos expression in male mice selected for aggressiveness. *Physiology & Behavior*, 88(1–2), 173–182. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2006.03.030>
- Hammels, C., Pishva, E., Vry, J. De, Hove, D. L. A. Van Den, Prickaerts, J., Winkel, R. Van, Selten, J. P., Lesch, K. P., Daskalakis, N. P., Steinbusch, H. W. M. M., Os, J. Van, Kenis, G., Rutten, B. P. F. F., De Vry, J., van den Hove, D. L. a., Prickaerts, J., van Winkel, R., Selten, J. P., Lesch, K. P., ... Rutten, B. P. F. F. (2015). Defeat stress in rodents: From behavior to molecules. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 59, 111–140. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2015.10.006>
- Hanahan, D. y Folkman, J. (1996). Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell*, 86(3), 353–364. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8756718>
- Hanahan, D. y Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*, 144(5), 646–674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>

- Hardingham, G. E., Fukunaga, Y. y Bading, H. (2002). Extrasynaptic NMDARs oppose synaptic NMDARs by triggering CREB shut-off and cell death pathways. *Nature Neuroscience*, 5(5), 405–414. <https://doi.org/10.1038/nn835>
- Haroon, E., Raison, C. L. y Miller, A. H. (2012). Psychoneuroimmunology meets neuropsychopharmacology: translational implications of the impact of inflammation on behavior. *Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, 37(1), 137–162. <https://doi.org/10.1038/npp.2011.205>
- Hart, B. L. (1988). Biological basis of the behavior of sick animals. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 12, 123-37.
- Hayashi, R., Wada, H., Ito, K. y Adcock, I. M. (2004). Effects of glucocorticoids on gene transcription. *European Journal of Pharmacology*, 500(1-3), 51–62. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2004.07.011>
- Hayashida, S., Oka, T., Mera, T. y Tsuji, S. (2010). Repeated social defeat stress induces chronic hyperthermia in rats. *Physiology & Behavior*, 101(1), 124–131. <https://doi.org/10.1016/J.PHYSBEH.2010.04.027>
- Henry, J. P., Liu, Y. Y., Nadra, W. E., Qian, C. G., Mormede, P., Lemaire, V., Ely, D. y Hendley, E. D. (1993). Psychosocial stress can induce chronic hypertension in normotensive strains of rats. *Hypertension*, 21(5), 714–723.
- Henry, J. P. y Stephens, P. M. (1977). The Social Environment and Essential Hypertension in Mice: Possible Role of the Innervation of the Adrenal Cortex. *Progress in Brain Research*, 47, 263–276. [https://doi.org/10.1016/S0079-6123\(08\)62731-4](https://doi.org/10.1016/S0079-6123(08)62731-4)
- Hiles, S. A., Baker, A. L., de Malmanche, T. y Attia, J. (2012). A meta-analysis of differences in IL-6 and IL-10 between people with and without depression: Exploring the causes of heterogeneity. *Brain, Behavior, and Immunity*, 26(7), 1180–1188. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2012.06.001>
- Hino, T., Unno, A. y Nakano, S. (2002). Prey distribution and foraging preference for tits. *Ornithological science*, 1(1), 81–87. <https://doi.org/10.2326/osj.1.81>

- Hodes, G. E., Pfau, M. L., Leboeuf, M., Golden, S. A., Christoffel, D. J., Bregman, D., Rebusi, N., Heshmati, M., Aleyasin, H., Warren, B. L., Lebonoté, B., Horn, S., Lapidus, K. A., Stelzhammer, V., Wong, E. H. F., Bahn, S., Krishnan, V., Bolaños-Guzman, C. A., Murrrough, J. W., ... Russo, S. J. (2014). Individual differences in the peripheral immune system promote resilience versus susceptibility to social stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(45), 16136–16141. <https://doi.org/10.1073/pnas.1415191111>
- Hodi, F. S., Lee, S., McDermott, D. F., Rao, U. N., Butterfield, L. H., Tarhini, A. A., Leming, P., Puzanov, I., Shin, D. y Kirkwood, J. M. (2014). Ipilimumab Plus Sargramostim vs Ipilimumab Alone for Treatment of Metastatic Melanoma. *JAMA*, 312(17), 1744. <https://doi.org/10.1001/jama.2014.13943>
- Höglund, E., Korzan, W. J., Watt, M. J., Forster, G. L., Summers, T. R., Johannessen, H. F., Renner, K. J. y Summers, C. H. (2005). Effects of L-DOPA on aggressive behavior and central monoaminergic activity in the lizard *Anolis carolinensis*, using a new method for drug delivery. *Behavioural Brain Research*, 156(1), 53–64. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2004.05.009>
- Hollis, F. y Kabbaj, M. (2014). Social defeat as an animal model for depression. *ILAR Journal*, 55(2), 221–232. <https://doi.org/10.1093/ilar/ilu002>
- Hollis, F., Wang, H., Dietz, D., Gunjan, A. y Kabbaj, M. (2010). The effects of repeated social defeat on long-term depressive-like behavior and short-term histone modifications in the hippocampus in male Sprague–Dawley rats. *Psychopharmacology*, 211(1), 69–77. <https://doi.org/10.1007/s00213-010-1869-9>
- Holsboer, F. y Barden, N. (1996). Antidepressants and hypothalamic-pituitary-adrenocortical regulation. *Endocrine Reviews*, 17(2), 187–205. <https://doi.org/10.1210/edrv-17-2-187>
- Homberg, J. R. (2012). The stress-coping (mis)match hypothesis for nature × nurture interactions. *Brain Research*, 1432, 114–121. <https://doi.org/10.1016/J.BRAINRES.2011.11.037>

- Howren, M. B., Lamkin, D. M. y Suls, J. (2009). Associations of Depression With C-Reactive Protein, IL-1, and IL-6: A Meta-Analysis. *Psychosomatic Medicine*, 71(2), 171-186. <https://doi.org/10.1097/PSY.0b013e3181907c1b>
- Hughes, S., Jaremka, L. M., Alfano, C. M., Glaser, R., Povoski, S. P., Lipari, A. M., Agnese, D. M., Farrar, W. B., Yee, L. D., Carson, W. E., Malarkey, W. B. y Kiecolt-Glaser, J. K. (2014). Social support predicts inflammation, pain, and depressive symptoms: Longitudinal relationships among breast cancer survivors. *Psychoneuroendocrinology*, 42, 38-44. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2013.12.016>
- Il'yasova, D., Colbert, L. H., Harris, T. B., Newman, A. B., Bauer, D. C., Satterfield, S. y Kritchevsky, S. B. (2005). Circulating Levels of Inflammatory Markers and Cancer Risk in the Health Aging and Body Composition Cohort. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, 14(10), 2413-2418. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-05-0316>
- Ivbijaro, G. O. (2010). Mental health and chronic physical illnesses: The need for continued and integrated care - World Mental Health Day 2010. *Mental Health in Family Medicine*, 7(3), 127.
- Jehn, C. F., Becker, B., Flath, B., Nogai, H., Vuong, L., Schmid, P. y Lüftner, D. (2015). Neurocognitive function, brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and IL-6 levels in cancer patients with depression. *Journal of Neuroimmunology*, 287, 88-92. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2015.08.012>
- Jentsch, M. C., Van Buel, E. M., Bosker, F. J., Gladkevich, A. V, Klein, H. C., Oude Voshaar, R. C., Ruhé, H. G., Eisel, U. L. M., Schoevers, R. A., Ruhe, E. G., Eisel, U. L. M. y Schoevers, R. A. (2015). Biomarker approaches in major depressive disorder evaluated in the context of current hypotheses. *Biomarkers in Medicine*, 9(3), 277-297. <https://doi.org/10.2217/bmm.14.114>
- Jiang, Y., Jakovcevski, M., Bharadwaj, R., Connor, C., Schroeder, F. A., Lin, C. L., Straubhaar, J., Martin, G. y Akbarian, S. (2010). Setdb1 histone methyltransferase regulates mood-related behaviors and expression of the NMDA receptor subunit

- NR2B. *Journal of Neuroscience*, 30(21), 7152–7167.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1314-10.2010>
- Jin Shin, K., Jin Lee, Y., Ryoul Yang, Y., Park, S., Suh, P.-G., Yung Follo, M., Cocco, L. y Ho Ryu, S. (2016). Molecular Mechanisms Underlying Psychological Stress and Cancer. *Current Pharmaceutical Design*, 22(16), 2389–2402.
<https://doi.org/10.2174/1381612822666160226144025>
- Joëls, M. y Baram, T. Z. (2009). The neuro-symphony of stress. *Nature Reviews. Neuroscience*, 10(6), 459. <https://doi.org/10.1038/NRN2632>
- Johnson, J. D., Campisi, J., Sharkey, C. M., Kennedy, S. L., Nickerson, M., Greenwood, B. N. y Fleshner, M. (2005). Catecholamines mediate stress-induced increases in peripheral and central inflammatory cytokines. *Neuroscience*, 135(4), 1295–1307.
<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2005.06.090>
- Johnson, J. D., Barnard, D. F., Kulp, A. C. y Mehta, D. M. (2019). Neuroendocrine Regulation of Brain Cytokines After Psychological Stress. *Journal of the Endocrine Society*, 3(7), 1302–1320. <https://doi.org/10.1210/js.2019-00053>
- Kar, N. y Bastia, B. K. (2006). Post-traumatic stress disorder, depression and generalised anxiety disorder in adolescents after a natural disaster: a study of comorbidity. *Clinical Practice and Epidemiology in Mental Health*: 2(1), 17.
<https://doi.org/10.1186/1745-0179-2-17>
- Karege, F., Perret, G., Bondolfi, G., Schwald, M., Bertschy, G. y Aubry, J. M. (2002). Decreased serum brain-derived neurotrophic factor levels in major depressed patients. *Psychiatry Research*, 109(2), 143–148. [https://doi.org/10.1016/S0165-1781\(02\)00005-7](https://doi.org/10.1016/S0165-1781(02)00005-7)
- Karege, F., Vaudan, G., Schwald, M., Perroud, N. y La Harpe, R. (2005). Neurotrophin levels in postmortem brains of suicide victims and the effects of antemortem diagnosis and psychotropic drugs. *Molecular Brain Research*, 136(1–2), 29–37.
<https://doi.org/10.1016/j.molbrainres.2004.12.020>

- Kaster, M. P., Gadotti, V. M., Calixto, J. B., Santos, A. R. S. y Rodrigues, A. L. S. (2012). Depressive-like behavior induced by tumor necrosis factor- α in mice. *Neuropharmacology*, 62(1), 419–426. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2011.08.018>
- Kendler, K. S., Karkowski, L. M. y Prescott, C. A. (1999). Causal Relationship Between Stressful Life Events and the Onset of Major Depression. *American Journal of Psychiatry*, 156(6), 837–841. <https://doi.org/10.1176/ajp.156.6.837>
- Kent, S., Bluthé, R. M., Kelley, K. W. y Dantzer, R. (1992). Sickness behavior as a new target for drug development. *Trends in Pharmacological Sciences*, 13(1), 24–28. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1542935>
- Kerfoot, S. M., D’Mello, C., Nguyen, H., Ajuebor, M. N., Kubes, P., Le, T. y Swain, M. G. (2006). TNF- α -secreting monocytes are recruited into the brain of cholestatic mice. *Hepatology*, 43(1), 154–162. <https://doi.org/10.1002/hep.21003>
- Kessler, R. C. (1997). The effects of stressful life events on depression. *Annual Review of Psychology*, 48(1), 191–214. <https://doi.org/10.1146/annurev.psych.48.1.191>
- Kinn, A. M., Grønli, J., Fiske, E., Kuipers, S., Ursin, R., Murison, R. y Portas, C. M. (2008). A double exposure to social defeat induces sub-chronic effects on sleep and open field behaviour in rats. *Physiology & Behavior*, 95(4), 553–561. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2008.07.031>
- Kinsey, S. G., Bailey, M. T., Sheridan, J. F., Padgett, D. A. y Avitsur, R. (2007). Repeated social defeat causes increased anxiety-like behavior and alters splenocyte function in C57BL/6 and CD-1 mice. *Brain, Behavior, and Immunity*, 21(4), 458–466. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2006.11.001>
- Kipnis, J. (2018). Immune system: The “seventh sense.” *The Journal of Experimental Medicine*, 215(2), 397–398. <https://doi.org/10.1084/jem.20172295>
- Kircanski, K., Joormann, J. y Gotlib, I. H. (2012). Cognitive Aspects of Depression. *Wiley Interdisciplinary Reviews. Cognitive Science*, 3(3), 301–313.

<https://doi.org/10.1002/wcs.1177>

Kirschbaum, C., Pirke, K. M. y Hellhammer, D. H. (1993). The “Trier social stress test” - A tool for investigating psychobiological stress responses in a laboratory setting. *Neuropsychobiology* 28(1-2), 76-81. <https://doi.org/10.1159/000119004>

Koelsch, S., Boehlig, A., Hohenadel, M., Nitsche, I., Bauer, K. y Sack, U. (2016). The impact of acute stress on hormones and cytokines, and how their recovery is affected by music-evoked positive mood. *Scientific Reports*, 6(1), 23008. <https://doi.org/10.1038/srep23008>

Köhler, C. A., Freitas, T. H., Maes, M., de Andrade, N. Q., Liu, C. S., Fernandes, B. S., Stubbs, B., Solmi, M., Veronese, N., Herrmann, N., Raison, C. L., Miller, B. J., Lanctôt, K. L. y Carvalho, A. F. (2017). Peripheral cytokine and chemokine alterations in depression: a meta-analysis of 82 studies. *Acta Psychiatrica Scandinavica*, 135(5), 373–387. <https://doi.org/10.1111/acps.12698>

Kolmus, K., Tavernier, J. y Gerlo, S. (2015). β 2-Adrenergic receptors in immunity and inflammation: Stressing NF- κ B. *Brain, Behavior, and Immunity*, 45, 297–310. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2014.10.007>

Komaki, G., Arimura, A. y Koves, K. (1992). Effect of intravenous injection of IL-1 beta on PGE2 levels in several brain areas as determined by microdialysis. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 262(2), E246–E251. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.1992.262.2.E246>

Koolhaas, J. M., de Boer, S. F., Buwalda, B. y Meerlo, P. (2017). Social stress models in rodents: Towards enhanced validity. *Neurobiology of Stress*, 6, 104–112. <https://doi.org/10.1016/j.ynstr.2016.09.003>

Koolhaas, J. M., de Boer, S. F., Coppens, C. M. M. y Buwalda, B. (2010). Neuroendocrinology of coping styles: Towards understanding the biology of individual variation. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 31(3), 307–321. <https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2010.04.001>

- Koolhaas, J. M. (2008). Coping style and immunity in animals: Making sense of individual variation. *Brain, Behavior, and Immunity*, 22(5), 662–667. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2007.11.006>
- Koolhaas, J. M. (1994). Individual Coping Strategies and Vulnerability to Stress Pathology. *Homeostasis in Health and Disease*, 35(1–2), 24–27. <https://psycnet.apa.org/record/1995-25198-001>
- Koolhaas, J. M., De Boer, S. F., De Ruiter, A. J., Meerlo, P. y Sgoifo, A. (1997). Social stress in rats and mice. *Acta Physiologica Scandinavica*, 161(February), 69–72.
- Koolhaas, J. M., De Boer, S. F., Buwalda, B. y Van Reenen, K. (2007). Individual variation in coping with stress: A multidimensional approach of ultimate and proximate mechanisms. *Brain, Behavior and Evolution*, 70(4), 218–226. <https://doi.org/10.1159/000105485>
- Koolhaas, J. M., Korte, S. M., De Boer, S. F., Van Der Vegt, B. J., Van Reenen, C. G., Hopster, H., De Jong, I. C., Ruis, M. A. W. y Blokhuis, H. J. (1999). Coping styles in animals: Current status in behavior and stress- physiology. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 23(7), 925–935. [https://doi.org/10.1016/S0149-7634\(99\)00026-3](https://doi.org/10.1016/S0149-7634(99)00026-3)
- Korte, S. M., Koolhaas, J. M., Wingfield, J. C. y McEwen, B. S. (2005). The Darwinian concept of stress: Benefits of allostasis and costs of allostatic load and the trade-offs in health and disease. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 29(1), 3–38. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2004.08.009>
- Korte, S. M., Ruesink, W. y Blokhuis, H. J. (1998). Heart Rate Variability During Manual Restraint in Chicks From High- and Low-Feather Pecking Lines of Laying Hens. *Physiology & Behavior*, 65(4–5), 649–652. [https://doi.org/10.1016/S0031-9384\(98\)00206-6](https://doi.org/10.1016/S0031-9384(98)00206-6)
- Korte, S. M., Beuving, G., Ruesink, W. y Blokhuis, H. J. (1997). Plasma catecholamine and corticosterone levels during manual restraint in chicks from a high and low feather pecking line of laying hens. *Physiology & Behavior*, 62(3), 437–441.

[https://doi.org/10.1016/s0031-9384\(97\)00149-2](https://doi.org/10.1016/s0031-9384(97)00149-2)

- Korte, S. M., Bouws, G. A., Koolhaas, J. M. y Bohus, B. (1992). Neuroendocrine and behavioral responses during conditioned active and passive behavior in the defensive burying/probe avoidance paradigm: effects of ipsapirone. *Physiology & Behavior*, 52(2), 355-361. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1355919>
- Korzan, W. J., Forster, G. L., Watt, M. J. y Summers, C. H. (2006). Dopaminergic activity modulation via aggression, status, and a visual social signal. *Behavioral Neuroscience*, 120(1), 93-102. <https://doi.org/10.1037/0735-7044.120.1.93>
- Krishnan, V., Han, M.-H., Graham, D. L., Berton, O., Renthal, W., Russo, S. J., LaPlant, Q., Graham, A., Lutter, M., Lagace, D. C., Ghose, S., Reister, R., Tannous, P., Green, T. A., Neve, R. L., Chakravarty, S., Kumar, A., Eisch, A. J., Self, D. W., ... Nestler, E. J. (2007). Molecular Adaptations Underlying Susceptibility and Resistance to Social Defeat in Brain Reward Regions. *Cell*, 131(2), 391-404. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2007.09.018>
- Krishnan, V. y Nestler, E. J. (2008). The molecular neurobiology of depression. *Nature*, 455(7215), 894-902. <https://doi.org/10.1038/nature07455>
- Kubera, M., Lin, A.-H., Kenis, G., Bosmans, E., Van Bockstaele, D. y Maes, M. (2001). Anti-Inflammatory Effects of Antidepressants Through Suppression of the interferon- γ /interleukin-10 production ratio. *Journal of Clinical Psychopharmacology*, 21(2), 199-206. https://journals.lww.com/psychopharmacology/Fulltext/2001/04000/Anti_Inflammatory_Effects_of_Antidepressants.12.aspx
- Kudryavtseva, N. N. (1994). Experience of defeat decreases the behavioural reactivity to conspecifics in the partition test. *Behavioural Processes*, 32(3), 297-304. [https://doi.org/10.1016/0376-6357\(94\)90049-3](https://doi.org/10.1016/0376-6357(94)90049-3)
- Kudryavtseva, N. N., Bakshtanovskaya, I. V. y Koryakina, L. A. (1991). Social model of depression in mice of C57BL/6J strain. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior*, 38(2), 315-320. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2057501>

- Kurz, K., Schroecksnadel, S., Weiss, G. y Fuchs, D. (2011). Association between increased tryptophan degradation and depression in cancer patients. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*, 14(1), 49–56. <https://doi.org/10.1097/MCO.0b013e328340d849>
- Lagace, D. C., Donovan, M. H., Decarolis, N. A., Farnbauch, L. A., Malhotra, S., Berton, O., Nestler, E. J., Krishnan, V. y Eisch, A. J. (2010). Adult hippocampal neurogenesis is functionally important for stress-induced social avoidance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(9), 4436–4441. <https://doi.org/10.1073/pnas.0910072107>
- Lamkin, D. M., Lutgendorf, S. K., Lubaroff, D., Sood, A. K., Beltz, T. G. y Johnson, A. K. (2011). Cancer induces inflammation and depressive-like behavior in the mouse: Modulation by social housing. *Brain, Behavior, and Immunity*, 25(3), 555–564. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2010.12.010>
- Landskron, G., De La Fuente, M., P., T., Thuwajit, C. y Hermoso, M. A. (2014). Chronic inflammation and cytokines in the tumor microenvironment. *Journal of Immunology Research*, 2014. <http://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&from=export&id=L373220828%5Cnhttp://dx.doi.org/10.1155/2014/149185%5Cnhttp://sfx.library.uu.nl/utrecht?sid=EMBASE&issn=23147156&id=doi:10.1155%2F2014%2F149185&atitle=Chronic+inflammation+and+cytoki>
- Langgartner, D., Lowry, C. A. y Reber, S. O. (2019). Old Friends, immunoregulation, and stress resilience. *Pflugers Archiv European Journal of Physiology*, 471(2), 237–269. <https://doi.org/10.1007/s00424-018-2228-7>
- Larson, S. J. y Dunn, A. J. (2001). Behavioral Effects of Cytokines. *Brain, Behavior, and Immunity*, 15(4), 371–387. <https://doi.org/10.1006/brbi.2001.0643>
- Latremoliere, A. y Costigan, M. (2011). GCH1, BH4 and Pain. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 12(10), 1728–1741. <https://doi.org/10.2174/138920111798357393>
- Lebeña, A. (2017). *Cáncer, inflamación y depresión: alteraciones conductuales, inmunitarias y neuroquímicas producidos por el desarrollo de melanoma B16 en ratones macho* [tesis

- doctoral, Universidad del País Vasco]. Repositorio UPV/EHU. <https://addi.ehu.es/handle/10810/22711>
- Lebeña, A., Vegas, O., Gómez-Lázaro, E., Arregi, A., Garmendia, L., Beitia, G. y Azpiroz, A. (2014). Melanoma tumors alter proinflammatory cytokine production and monoamine brain function, and induce depressive-like behavior in male mice. *Behavioural Brain Research*, 272, 83–92. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2014.06.045>
- Liu, J. (2018). Corticosterone Preexposure Increases NF- κ B Translocation and Sensitizes IL-1 β Responses in BV2 Microglia-Like Cells. *Frontiers in immunology*, 9, 1–12. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00003>
- Liu, Y., Ho, R. C. M. y Mak, A. (2012). Interleukin (IL)-6, tumour necrosis factor alpha (TNF- α) and soluble interleukin-2 receptors (sIL-2R) are elevated in patients with major depressive disorder: A meta-analysis and meta-regression. *Journal of Affective Disorders*, 139(3), 230–239. <https://doi.org/10.1016/j.jad.2011.08.003>
- Liu, Y. Y., Zhou, X. Y., Yang, L. N., Wang, H. Y., Zhang, Y. Q., Pu, J. C., Liu, L. X., Gui, S. W., Zeng, L., Chen, J. J., Zhou, C. J. y Xie, P. (2017). Social defeat stress causes depression-like behavior with metabolite changes in the prefrontal cortex of rats. *PLoS ONE*, 12(4), e0176725. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0176725>
- Livak, K. J. y Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *methods*, 25(4), 402–408.
- Lobo, N. A., Shimono, Y., Qian, D. y Clarke, M. F. (2007). The Biology of Cancer Stem Cells. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 23(1), 675–699. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.22.010305.104154>
- Lotrich, F. E., Sears, B. y McNamara, R. K. (2013). Elevated ratio of arachidonic acid to long-chain omega-3 fatty acids predicts depression development following interferon-alpha treatment: Relationship with interleukin-6. *Brain, Behavior, and Immunity*, 31, 48–53. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2012.08.007>
- Lowe, S. W., Cepero, E. y Evan, G. (2004). Intrinsic tumour suppression. *Nature*,

- 432(7015), 307–315. <https://doi.org/10.1038/nature03098>
- Lu, H. (2006). Inflammation, a Key Event in Cancer Development. *Molecular Cancer Research*, 4(4), 221–233. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-05-0261>
- Lutgendorf, S. K. y Andersen, B. L. (2015). Biobehavioral approaches to cancer progression and survival: Mechanisms and interventions. *American Psychologist*, 70(2), 186–197. <https://doi.org/10.1037/a0035730>
- Lutgendorf, S. K., Garand, L., Buckwalter, K. C., Reimer, T. T., Hong, S. Y. y Lubaroff, D. M. (1999). Life stress, mood disturbance, and elevated interleukin-6 in healthy older women. *Journals of Gerontology - Series A Biological Sciences and Medical Sciences*, 54(9), M434–M439. <https://doi.org/10.1093/gerona/54.9.M434>
- Lutgendorf, S. K., Sood, A. K., Anderson, B., McGinn, S., Maseri, H., Dao, M., Sorosky, J. I., De Geest, K., Ritchie, J. y Lubaroff, D. M. (2005). Social Support, Psychological Distress, and Natural Killer Cell Activity in Ovarian Cancer. *J Clin Oncol*, 23, 7105–7113. <https://doi.org/10.1200/JCO.2005.10.015>
- Macedo, G. C., Morita, G. M., Domingues, L. P., Favoretto, C. A., Suchecki, D. y Quadros, I. M. H. (2018). Consequences of continuous social defeat stress on anxiety- and depressive-like behaviors and ethanol reward in mice. *Hormones and Behavior*, 97, 154–161. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2017.10.007>
- Madrigal, J., Hurtado, O., Moro, M. A., Lizasoain, I., Lorenzo, P., Castrillo, A., Boscá, L. y Leza, J. C. (2002). The Increase in TNF- α Levels Is Implicated in NF- κ B Activation and Inducible Nitric Oxide Synthase Expression in Brain Cortex after Immobilization Stress. *Neuropsychopharmacology*, 26(2), 155–163. [https://doi.org/10.1016/S0893-133X\(01\)00292-5](https://doi.org/10.1016/S0893-133X(01)00292-5)
- Maes, M. (1995). Evidence for an immune response in major depression: A review and hypothesis. *Progress in Neuropsychopharmacology and Biological Psychiatry*, 19(1), 11–38. [https://doi.org/10.1016/0278-5846\(94\)00101-M](https://doi.org/10.1016/0278-5846(94)00101-M)
- Maes, M. (2001). The immunoregulatory effects of antidepressants. *Human*

- Psychopharmacology: Clinical and Experimental*, 16(1), 95–103.
<https://doi.org/10.1002/hup.191>
- Maes, M., Galecki, P., Verkerk, R. y Rief, W. (2011). Somatization, but not depression, is characterized by disorders in the tryptophan catabolite (TRYCAT) pathway, indicating increased indoleamine 2,3-dioxygenase and lowered kynurenine aminotransferase activity. *Neuro Endocrinology Letters*, 32(3), 264–273.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21712776>
- Maes, M., Lambrechts, J., Bosmans, E., Jacobs, J., Suy, E., Vandervorst, C., ... & Raus, J. (1992). Evidence for a systemic immune activation during depression: results of leukocyte enumeration by flow cytometry in conjunction with monoclonal antibody staining. *Psychological medicine*, 22(1), 45-53.
- Maes, M., Leonard, B. E. E., Myint, A. M. M., Kubera, M. y Verkerk, R. (2011). The new “5-HT” hypothesis of depression: cell-mediated immune activation induces indoleamine 2,3-dioxygenase, which leads to lower plasma tryptophan and an increased synthesis of detrimental tryptophan catabolites (TRYCATs), both of which contribute to th. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, 35(3), 702–721. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2010.12.017>
- Maes, M. y Rief, W. (2012). Diagnostic classifications in depression and somatization should include biomarkers, such as disorders in the tryptophan catabolite (TRYCAT) pathway. *Psychiatry Research*, 196(2-3), 243–249.
<https://doi.org/10.1016/j.psychres.2011.09.029>
- Malyguine, A., Umansky, V. y Shurin, M. R. (2013). Role of the Immunological Environment in Cancer Initiation, Development and Progression. En *The Tumor Immunoenvironment* (pp. 1–12). Springer, Dordrecht. https://doi.org/10.1007/978-94-007-6217-6_1
- Manjarrez-Gutierrez, G., Marquez, R. H., Mejenes-Alvarez, S. A., Godinez-Lopez, T. y Hernandez-R, J. (2009). Functional change of the auditory cortex related to brain serotonergic neurotransmission in type 1 diabetic adolescents with and without depression. *The World Journal of Biological Psychiatry*, 10(4-3), 877–883.

<https://doi.org/10.1080/15622970902717032>

Marin, T. J., Chen, E., Munch, J. A. y Miller, G. E. (2009). Double-Exposure to Acute Stress and Chronic Family Stress is Associated With Immune Changes in Children With Asthma. *Psychosomatic Medicine*, 71(4), 378–384. <https://doi.org/10.1097/PSY.0b013e318199dbc3>

Martinez, M., Calvo-Torrent, A. y Pico-Alfonso, M. A. (1998). Social defeat and subordination as models of social stress in laboratory rodents: A review. *Aggressive Behavior*, 24(4), 241–256. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2337\(1998\)24:4<241::AID-AB1>3.0.CO;2-M](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2337(1998)24:4<241::AID-AB1>3.0.CO;2-M)

Mason, J. W. (1972). A re-evaluation of the concept of "non-specificity" in stress theory. In *Principles, Practices, and Positions in Neuropsychiatric Research* (pp. 323–333). Pergamon. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-017007-7.50018-5>

Massie, M. J. (2004). Prevalence of Depression in Cancer Patients. *Monographs-National Cancer Institute*, 32, 57–71.

Matheson, F. I., Moineddin, R., Dunn, J. R., Creator, M. I., Gozdyra, P. y Glazier, R. H. (2006). Urban neighborhoods, chronic stress, gender and depression. *Social Science & Medicine*, 63(10), 2604–2616. <https://doi.org/10.1016/j.socscimed.2006.07.001>

Matheson, K. y Anisman, H. (2003). Systems of Coping Associated with Dysphoria, Anxiety and Depressive Illness: A Multivariate Profile Perspective. *Stress*, 6(3), 223–234. <https://doi.org/10.1080/10253890310001594487>

Mausbach, B. T., von Känel, R., Roepke, S. K., Moore, R., Patterson, T. L., Mills, P. J., Dimsdale, J. E., Ziegler, M. G., Ancoli-Israel, S., Allison, M. y Grant, I. (2011). Self-Efficacy Buffers the Relationship Between Dementia Caregiving Stress and Circulating Concentrations of the Proinflammatory Cytokine Interleukin-6. *The American Journal of Geriatric Psychiatry*, 19(1), 64–71. <https://doi.org/10.1097/JGP.0b013e3181df4498>

Mazure, C. M. (1998). Life stressors as risk factors in depression. *Clinical Psychology*:

- Science and Practice*, 5(3), 291-313. <https://doi.org/10.1111/j.1468-2850.1998.tb00151.x>
- McEwen, B. S. (1998). Stress, adaptation, and disease. Allostasis and allostatic load. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 840, 33-44. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9629234>
- McEwen, B. S. (2004). Protection and damage from acute and chronic stress - Allostasis and allostatic overload and relevance to the pathophysiology of psychiatric disorders. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1032(1), 1-7. <https://doi.org/10.1193/annals.1314.001>
- McEwen, B. S. (2008). Central effects of stress hormones in health and disease: Understanding the protective and damaging effects of stress and stress mediators. In *European Journal of Pharmacology*. 583(2-3), 174-185. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2007.11.071>
- Mcnamee, E. N., Grif, É. W., Ryan, K. M., Ryan, K. J., Heffernan, S., Harkin, A. y Connor, T. J. (2010). Noradrenaline acting at β -adrenoceptors induces expression of IL-1 β and its negative regulators IL-1ra and IL-1RII, and drives an overall anti-inflammatory phenotype in rat cortex. *Neuropharmacology* 59(1-2), 37-48. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2010.03.014>
- Meerlo, P., Overkamp, G. J. F., Daan, S., Van Den Hoofdakker, R. H. y Koolhaas, J. M. (1996). Changes in Behaviour and Body Weight Following a Single or Double Social Defeat in Rats. *Stress* 1(1), 21-32. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9807059>
- Menard, J. L., Champagne, D. L. y Meaney, M. J. P. (2004). Variations of maternal care differentially influence 'fear' reactivity and regional patterns of cFos immunoreactivity in response to the shock-probe burying test. *Neuroscience*, 129(2), 297-308. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2004.08.009>
- Mercier, S., Canini, F., Buguet, A., Cespuglio, R., Martin, S. y Bourdon, L. (2003). Behavioural changes after an acute stress: Stressor and test types influences. *Behavioural Brain Research*, 139(1-2), 167-175. <https://doi.org/10.1016/S0166->

4328(02)00265-6

- Meyers, C. A., Albitar, M. y Estey, E. (2005). Cognitive impairment, fatigue, and cytokine levels in patients with acute myelogenous leukemia or myelodysplastic syndrome. *Cancer*, 104(4), 788–793. <https://doi.org/10.1002/cncr.21234>
- Miller, A. H., Maletic, V. y Raison, C. L. (2009). Inflammation and Its Discontents: The Role of Cytokines in the Pathophysiology of Major Depression. *Biological Psychiatry*, 65(9), 732–741. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2008.11.029>
- Miller, A. H. y Raison, C. L. (2016). The role of inflammation in depression: from evolutionary imperative to modern treatment target. *Nature Reviews Immunology*, 16(1), 22–34. <https://doi.org/10.1038/nri.2015.5>
- Monleon, S., Parra, A., Simon, V. M., Brain, P. F., D'Aquila, P. y Willner, P. (1995). Attenuation of sucrose consumption in mice by chronic mild stress and its restoration by imipramine. *Psychopharmacology*, 117(4), 453–457. <https://doi.org/10.1007/BF02246218>
- Monroe, S. M., Slavich, G. M. y Georgiades, K. (2009). The social environment and life stress in depression. *Handbook of depression*, 2(1), 340–60.
- Moreno-Smith, M., Lutgendorf, S. K. y Sood, A. K. (2010). Impact of stress on cancer metastasis. *Future Oncology*, 6(12), 1863–1881. <https://doi.org/10.2217/fon.10.142>
- Motivala, S. J., Sarfatti, A., Olmos, L. y Irwin, M. R. (2005). Inflammatory Markers and Sleep Disturbance in Major Depression. *Psychosomatic Medicine*, 67(2), 187–194. <https://doi.org/10.1097/01.psy.0000149259.72488.09>
- Munhoz, C., Madrigal, J. L. M., García-Bueno, B., Pradillo, J. M., Moro, M. A., Lizasoain, I., Lorenzo, P., Scavone, C. y Leza, J. C. (2004). TNF- α accounts for short-term persistence of oxidative status in rat brain after two weeks of repeated stress. *European Journal of Neuroscience*, 20(4), 1125–1130. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2004.03560.x>

- Munshi, S., Loh, M. K., Ferrara, N., DeJoseph, M. R., Ritger, A., Padival, M., Record, M. J., Urban, J. H. y Rosenkranz, J. A. (2019). Repeated stress induces a pro-inflammatory state, increases amygdala neuronal and microglial activation, and causes anxiety in adult male rats. *Brain, Behavior, and Immunity*, 84, 180–199. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2019.11.023>
- Myint, A. M. M., Kim, Y. K., Verkerk, R., Scharpe, S., Steinbusch, H., Leonard, B., Scharpé, S., Steinbusch, H., Leonard, B., Scharpe, S., Steinbusch, H. y Leonard, B. (2007). Kynurenine pathway in major depression: evidence of impaired neuroprotection. *Journal of Affective Disorders*, 98(1–2), 143–151. <https://doi.org/10.1016/j.jad.2006.07.013>
- Nashed, M. G., Seidlitz, E. P., Frey, B. N. y Singh, G. (2015). Depressive-like behaviours and decreased dendritic branching in the medial prefrontal cortex of mice with tumors: A novel validated model of cancer-induced depression. *Behavioural Brain Research*, 294, 25–35. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2015.07.040>
- Neurauter, G., Schröcksnadel, K., Scholl-Bürgi, S., Sperner-Unterweger, B., Schubert, C., Ledochowski, M. y Fuchs, D. (2008). Chronic immune stimulation correlates with reduced phenylalanine turnover. *Current Drug Metabolism*, 9(7), 622–627. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18781914>
- Nguyen, K. T., Deak, T., Owens, S. M., Kohno, T., Fleshner, M., Watkins, L. R. y Maier, S. F. (1998). Exposure to Acute Stress Induces Brain Interleukin-1 Protein in the Rat. *Journal of Neuroscience*, 18(6), 2239–2246. <https://www.jneurosci.org/content/18/6/2239.short>
- Niraula, A., Wang, Y., Godbout, J. P. y Sheridan, X. F. (2018). Corticosterone Production during Repeated Social Defeat Causes Monocyte Mobilization from the Bone Marrow, Glucocorticoid Resistance, and Neurovascular Adhesion Molecule Expression. *Journal of Neuroscience*, 38(9), 2328–2340. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2568-17.2018>
- Norden, D. M., Bicer, S., Clark, Y., Jing, R., Henry, C. J., Wold, L. E., Reiser, P. J., Godbout, J. P. y McCarthy, D. O. (2015). Tumor growth increases neuroinflammation, fatigue

- and depressive-like behavior prior to alterations in muscle function. *Brain, Behavior, and Immunity*, 43, 76–85. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2014.07.013>
- Nutt, D. J. (2002). The neuropharmacology of serotonin and noradrenaline in depression. *International Clinical Psychopharmacology*, 17(1), 1–12. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12369606>
- Ohgidani, M., Kato, T. A., Sagata, N., Hayakawa, K., Shimokawa, N., Sato-Kasai, M. y Kanba, S. (2016). TNF-alpha from hippocampal microglia induces working memory deficits by acute stress in mice. *Brain Behavior and Immunity*, 55, 17–24. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2015.08.022>
- Olivenza, R., Moro, M. A., Lizasoain, I., Lorenzo, P., Fernández, A. P., Rodrigo, J., Boscá, L. y Leza, J. C. (2000). Chronic stress induces the expression of inducible nitric oxide synthase in rat brain cortex. *Journal of Neurochemistry*, 74(2), 785–791. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2000.740785.x>
- Organización Mundial de la Salud (23 de febrero de 2017). *En España 2,4 millones de personas sufren depresión, el 5,2 % de la población*. <https://www.efe.com/efe/espana/sociedad/en-espana-2-4-millones-de-personas-sufren-depresion-el-5-la-poblacion/10004-3188014>
- Organización Mundial de la Salud (4 de diciembre de 2019). *Depresión*. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/depression>
- Ostrowski, K., Rohde, T., Asp, S., Schjerling, P. y Pedersen, B. K. (1999). Pro- and anti-inflammatory cytokine balance in strenuous exercise in humans. *Journal of Physiology*, 515(1), 287–291. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7793.1999.287ad.x>
- Pace, T. W. W., Gaylord, R. I., Jarvis, E., Girotti, M. y Spencer, R. L. (2009). Differential glucocorticoid effects on stress-induced gene expression in the paraventricular nucleus of the hypothalamus and ACTH secretion in the rat. *Stress*, 12(5), 400–411. <https://doi.org/10.1080/10253890802530730>
- Pace, T. W. W., Hu, F. y Miller, A. H. (2007). Cytokine-effects on glucocorticoid receptor function: Relevance to glucocorticoid resistance and the pathophysiology and

- treatment of major depression. *Brain, Behavior, and Immunity*, 21(1), 9–19.
<https://doi.org/10.1016/j.bbi.2006.08.009>
- Pace, T. W. W., Negi, L. T., Sivilli, T. I., Issa, M. J., Cole, S. P., Adame, D. D. y Raison, C. L. (2010). Innate immune, neuroendocrine and behavioral responses to psychosocial stress do not predict subsequent compassion meditation practice time. *Psychoneuroendocrinology*, 35(2), 310–315.
<https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2009.06.008>
- Palesh, O., Butler, L. D., Koopman, C., Giese-Davis, J., Carlson, R. y Spiegel, D. (2007). Stress history and breast cancer recurrence. *Journal of Psychosomatic Research*, 63(3), 233–239. <https://doi.org/10.1016/j.jpsychores.2007.05.012>
- Pariante, C. M. y Lightman, S. L. (2008). The HPA axis in major depression: classical theories and new developments. *Trends in Neurosciences*, 31(9), 464–468.
<https://doi.org/10.1016/j.tins.2008.06.006>
- Park, E. J., Cho, W. S., Jeong, J., Yi, J., Choi, K. y Park, K. (2009). Pro-inflammatory and potential allergic responses resulting from B cell activation in mice treated with multi-walled carbon nanotubes by intratracheal instillation. *Toxicology*, 259(3), 113–121. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2009.02.009>
- Patki, G., Solanki, N., Atrooz, F., Allam, F. y Salim, S. (2013). Depression, anxiety-like behavior and memory impairment are associated with increased oxidative stress and inflammation in a rat model of social stress. *Brain Research*, 1539, 73–86.
<https://doi.org/10.1016/j.brainres.2013.09.033>
- Patten, S. B. (1999). Depressive symptoms and disorders, levels of functioning and psychosocial stress: an integrative hypothesis. *Medical Hypotheses*, 53(3), 210–216.
<https://doi.org/10.1054/mehy.1998.0747>
- Paul, E. D., Hale, M. W., Lukkes, J. L., Valentine, M. J., Sarchet, D. M. y Lowry, C. A. (2011). Repeated social defeat increases reactive emotional coping behavior and alters functional responses in serotonergic neurons in the rat dorsal raphe nucleus. *Physiology & Behavior*, 104(2), 272–282.

<https://doi.org/10.1016/J.PHYSBEH.2011.01.006>

Payne, J. K. (2014). State of the Science: Stress, Inflammation, and Cancer. *Oncology Nursing Forum*, 41(5), 533–540. <https://doi.org/10.1188/14.ONF.533-540>

Pelletier, G., Verhoef, M. J., Khatri, N. y Hagen, N. (2002). Quality of life in brain tumor patients: the relative contributions of depression, fatigue, emotional distress, and existential issues. *Journal of Neuro-Oncology*, 57(1), 41–49. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12125966>

Peng, Y.-L., Liu, Y.-N., Liu, L., Wang, X., Jiang, C.-L. y Wang, Y.-X. (2012). Inducible nitric oxide synthase is involved in the modulation of depressive behaviors induced by unpredictable chronic mild stress. *Journal of Neuroinflammation*, 9(1), 564. <https://doi.org/10.1186/1742-2094-9-75>

Penninx, B. W. J. H., Guralnik, J. M., Havlik, R. J., Pahor, M., Ferrucci, L., Cerhan, J. R. y Wallace, R. B. (1998). Chronically Depressed Mood and Cancer Risk in Older Persons. *JNCI Journal of the National Cancer Institute*, 90(24), 1888–1893. <https://doi.org/10.1093/jnci/90.24.1888>

Pérez-Tejada, J., Arregi, A., Gómez-Lázaro, E., Vegas, O., Azpiroz, A. y Garmendia, L. (2013). Coping with Chronic Social Stress in Mice: Hypothalamic-Pituitary-Adrenal/ Sympathetic-Adrenal-Medullary Axis Activity, Behavioral Changes and Effects of Antalarmin Treatment: Implications for the Study of Stress-Related Psychopathologies. *Neuroendocrinology*, 98(1), 73–88. <https://doi.org/10.1159/000353620>

Pérez-Tejada, J., Garmendia, L., Labaka, A., Vegas, O., Gómez-Lazaro, E. y Arregi, A. (2019). Active and Passive Coping Strategies: Comparing Psychological Distress, Cortisol, and Proinflammatory Cytokine Levels in Breast Cancer Survivors. *Clinical Journal of Oncology Nursing*, 23(6), 583–590. <https://doi.org/10.1188/19.CJON.583-590>

Pflanz, S. E. y Ogle, A. D. (2006). Job Stress, Depression, Work Performance, and Perceptions of Supervisors in Military Personnel. *Military Medicine*, 171(9), 861–865.

<https://doi.org/10.7205/milmed.171.9.861>

Pinto, V. L. M., de Souza, P. F. C., Brunini, T. M. C., Oliveira, M. B., Moss, M. B., Siqueira, M. A. de S., Ferraz, M. R. y Mendes-Ribeiro, A. C. (2012). Low plasma levels of l-arginine, impaired intraplatelet nitric oxide and platelet hyperaggregability: Implications for cardiovascular disease in depressive patients. *Journal of Affective Disorders*, 140(2), 187–192. <https://doi.org/10.1016/j.jad.2012.02.008>

Piser, T. M. (2010). Linking the cytokine and neurocircuitry hypotheses of depression: A translational framework for discovery and development of novel anti-depressants. *Brain, Behavior, and Immunity*, 24(4), 515–524. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2010.02.006>

Porsolt, R. D. (2000). Animal models of depression: utility for transgenic research. *Reviews in the Neurosciences*, 11(1), 53–58. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10716655>

Prinz, P., Hertrich, K., Hirschfelder, U. y de Zwaan, M. (2012). Burnout, depression and depersonalisation--psychological factors and coping strategies in dental and medical students. *GMS Zeitschrift Für Medizinische Ausbildung*, 29(1). <https://doi.org/10.3205/zma000780>

Psicología de las diferencias individuales. (2018-2019). http://portal.uned.es/portal/page?_pageid=93,61703783&_dad=portal&_schema=PORTAL&idAsignatura=62012031

Pyter, L. M. (2016). The influence of cancer on endocrine, immune, and behavioral stress responses. *Physiology and Behavior*, 166, 4–13. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2015.09.031>

Pyter, L. M., Pineros, V., Galang, J. A., McClintock, M. K. y Prendergast, B. J. (2009). Peripheral tumors induce depressive-like behaviors and cytokine production and alter hypothalamic-pituitary-adrenal axis regulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(22), 9069–9074. <https://doi.org/10.1073/pnas.0811949106>

- Pyter, L. M., Suarez-Kelly, L. P., Carson, W. E., Kaur, J., Bellisario, J. y Bever, S. R. (2017). Novel rodent model of breast cancer survival with persistent anxiety-like behavior and inflammation. *Behavioural Brain Research*, 330, 108–117. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2017.05.011>
- Qin, Y., Wang, N., Zhang, X., Han, X., Zhai, X. y Lu, Y. (2018). IDO and TDO as a potential therapeutic target in different types of depression. *Metabolic Brain Disease*, 33(6), 1787–1800. <https://doi.org/10.1007/s11011-018-0290-7>
- Quan, N., Whiteside, M., Kim, L. y Herkenham, M. (1997). Induction of inhibitory factor B mRNA in the central nervous system after peripheral lipopolysaccharide administration: An in situ hybridization histochemistry study in the rat. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94(20), 10985–10990. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.20.10985>
- Raison, C. L., Capuron, L. y Miller, A. H. (2006). Cytokines sing the blues: Inflammation and the pathogenesis of depression. *Trends in Immunology*, 27(1), 24–31. <https://doi.org/10.1016/j.it.2005.11.006>
- Raison, C. L. y Miller, A. H. (2003). Depression in cancer: New developments regarding diagnosis and treatment. *Biological Psychiatry*, 54(3), 283–294. [https://doi.org/10.1016/S0006-3223\(03\)00413-X](https://doi.org/10.1016/S0006-3223(03)00413-X)
- Raphael, B. y Wooding, S. (2006). Group intervention for the prevention and treatment of acute initial stress reactions in civilians. *Psychological Effects of Catastrophic Disasters: Group Approaches to Treatment*, 481–503.
- Rauch, A., Liebig, J. y Rosenbusch, N. (2007). Entrepreneurial Stress and Long Term Survival: Is there a causal link? *Frontiers of Entrepreneurship Research*. https://papers.ssrn.com/sol3/papers.cfm?abstract_id=1064681
- Razzoli, M., Carboni, L., Andreoli, M., Ballottari, A. y Arban, R. (2011). Different susceptibility to social defeat stress of BalbC and C57BL6/J mice. *Behavioural Brain Research*, 216(1), 100–108. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2010.07.014>

- Rebeca, R., Bracht, L., Noleto, G. R., Martinez, G. R., Cadena, S. M. S. C., Carnieri, E. G. S., Rocha, M. E. M. y de Oliveira, M. B. M. (2008). Production of cachexia mediators by Walker 256 cells from ascitic tumors. *Cell Biochemistry and Function*, 26(6), 731–738. <https://doi.org/10.1002/cbf.1497>
- Reul, J. M. H. M. y De Kloet, E. R. (1985). Two receptor systems for corticosterone in rat brain: Microdistribution and differential occupation. *Endocrinology*, 117(6), 2505–2511. <https://doi.org/10.1210/endo-117-6-2505>
- Reynolds, P., Hurley, S., Torres, M., Jackson, J., Boyd, P. y Chen, V. W. (2000). Use of coping strategies and breast cancer survival: Results from the black/white cancer survival study. *American Journal of Epidemiology*, 152(10), 940–949. <https://doi.org/10.1093/aje/152.10.940>
- Ricciardella, L. F., Bliley, J. M., Feth, C. C. y Woodley, S. K. (2010). Acute stressors increase plasma corticosterone and decrease locomotor activity in a terrestrial salamander (*Desmognathus ochrophaeus*). *Physiology and Behavior*, 101(1), 81–86. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2010.04.022>
- Risch, N., Herrell, R., Lehner, T., Liang, K.-Y., Eaves, L., Hoh, J., Griem, A., Kovacs, M., Ott, J. y Merikangas, K. R. (2009). Interaction between the serotonin transporter gene (5-HTTLPR), stressful life events, and risk of depression: a meta-analysis. *Jama*, 301(23), 2462–2471. <https://doi.org/10.1001/jama.2009.878>
- Robert, C., Long, G. V., Brady, B., Dutriaux, C., Maio, M., Mortier, L., Hassel, J. C., Rutkowski, P., McNeil, C., Kalinka-Warzocho, E., Savage, K. J., Hernberg, M. M., Lebbé, C., Charles, J., Mihalciou, C., Chiarion-Sileni, V., Mauch, C., Cognetti, F., Arance, A., ... Ascierto, P. A. (2015). Nivolumab in Previously Untreated Melanoma without BRAF Mutation. *New England Journal of Medicine*, 372(4), 320–330. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1412082>
- Rohleder, N., Wolf, J. M. y Kirschbaum, C. (2003). Glucocorticoid sensitivity in humans—interindividual differences and acute stress effects. *Stress—the International Journal on the Biology of Stress*, 6(3), 207–222. <https://doi.org/10.1080/1025389031000153658>

- Rohleder, N. (2011). Variability in stress system regulatory control of inflammation: A critical factor mediating health effects of stress. *Expert Review of Endocrinology and Metabolism*, 6(2), 269–278. <https://doi.org/10.1586/eem.11.8>
- Roitt, I., Brostoff, J. y Male, D. (1997). *Inmunología*. Madrid: Hartcourt Brace.
- Royce, J. R. (1977). On the construct validity of open-field measures. *Psychological Bulletin*, 84(6), 1098–1106. <https://doi.org/10.1037/0033-2909.84.6.1098>
- Ruis, M. A., te Brake, J. H., Buwalda, B., De Boer, S. F., Meerlo, P., Korte, S. M., Blokhuis, H. J. y Koolhaas, J. M. (1999). Housing familiar male wildtype rats together reduces the long-term adverse behavioural and physiological effects of social defeat. *Psychoneuroendocrinology*, 24(3), 285–300. [https://doi.org/10.1016/s0306-4530\(98\)00050-x](https://doi.org/10.1016/s0306-4530(98)00050-x)
- Russo, S. J. y Nestler, E. J. (2013). The brain reward circuitry in mood disorders. *Nature Reviews Neuroscience*, 14(9), 609–625. <https://doi.org/10.1038/nrn3381>
- Rygula, R., Abumaria, N., Flügge, G., Fuchs, E., Rütther, E. y Havemann-Reinecke, U. (2005). Anhedonia and motivational deficits in rats: Impact of chronic social stress. *Behavioural Brain Research*, 162(1), 127–134. <https://doi.org/10.1016/J.BBR.2005.03.009>
- Sabban, E. L. y Kvetnanský, R. (2001). Stress-triggered activation of gene expression in catecholaminergic systems: dynamics of transcriptional events. *Trends in Neurosciences*, 24(2), 91–98. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11164939>
- Sajti, E., Kavelaars, A., Meeteren, N. van, Teunis, M., Gispen, W. H. y Heijnen, C. (2004). Tumor angiogenesis and metastasis formation are associated with individual differences in behavior of inbred Lewis rats. *Brain, Behavior, and Immunity*, 18(6), 497–504. <https://doi.org/10.1016/J.BBI.2003.11.009>
- Saltzman, W., Prudom, S. L., Schultz-Darken, N. J., Wittwer, D. J. y Abbott, D. H. (2004). Social suppression of cortisol in female marmoset monkeys: role of circulating ACTH levels and glucocorticoid negative feedback. *Psychoneuroendocrinology*, 29(2),

- 141-161. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14604597>
- Sandin, B., Chorot, P., Santed, M. A. y Yaliente, R. M. (2004). Differences in negative life events between patients with anxiety disorders, depression and hypochondriasis. *Anxiety, Stress and Coping*, 17(1), 37-47. <https://doi.org/10.1080/10615800310001637134>
- Santos, J. C. y Pyter, L. M. (2018). Neuroimmunology of behavioral comorbidities associated with cancer and cancer treatments. *Frontiers in Immunology*, 9, 1195. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01195>
- Sapolsky, R. M., Romero, L. M. y Munck, A. U. (2000). How Do Glucocorticoids Influence Stress Responses? Integrating Permissive, Suppressive, Stimulatory, and Preparative Actions. *Endocrine Reviews*, 21(1), 55-89. <https://doi.org/10.1210/edrv.21.1.0389>
- Satin, J. R., Linden, W. y Phillips, M. J. (2009). Depression as a predictor of disease progression and mortality in cancer patients: A meta-analysis. *Cancer*, 115(22), 5349-5361. <https://doi.org/10.1002/cncr.24561>
- Saul, A. N., Oberyszyn, T. M., Daugherty, C., Kusewitt, D., Jones, S., Jewell, S., Malarkey, W. B., Lehman, A., Lemeshow, S. y Dhabhar, F. S. (2005). Chronic Stress and Susceptibility to Skin Cancer. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, 97(23), 1760-1767. <https://doi.org/10.1093/jnci/dji401>
- Savignac, H. M., Hyland, N. P., Dinan, T. G. y Cryan, J. F. (2011). The effects of repeated social interaction stress on behavioural and physiological parameters in a stress-sensitive mouse strain. *Behavioural Brain Research*, 216(2), 576-584. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2010.08.049>
- Savitz, J., Drevets, W. C., Wurfel, B. E., Ford, B. N., Bellgowan, P. S. F., Victor, T. A., Bodurka, J., Teague, T. K. y Dantzer, R. (2015). Reduction of kynurenic acid to quinolinic acid ratio in both the depressed and remitted phases of major depressive disorder. *Brain, Behavior, and Immunity*, 46, 55-59. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2015.02.007>

- Schildkraut, J. J. (1965). The catecholamine hypothesis of affective disorders: a review of supporting evidence. *The American journal of psychiatry*, 122(5), 509–522. <https://doi.org/10.1176/ajp.122.5.509>
- Schleimer, R. P. (1993). An overview of glucocorticoid anti-inflammatory actions. *European Journal of Clinical Pharmacology*, 45(1), 3–7. <https://doi.org/10.1007/BF01844196>
- Schrepf, A., Lutgendorf, S. K. y Pyter, L. M. (2015). Pre-treatment effects of peripheral tumors on brain and behavior: Neuroinflammatory mechanisms in humans and rodents. *Brain, Behavior, and Immunity*, 49, 1–17. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2015.04.010>
- Scortegagna, M., Lau, E., Zhang, T., Feng, Y., Sereduk, C., Yin, H., De, S. K., Meeth, K., Platt, J. T., Langdon, C. G., Halaban, R., Pellecchia, M., Davies, M. A., Brown, K., Stern, D. F., Bosenberg, M. y Ronai, Z. A. (2015). PDK1 and SGK3 Contribute to the Growth of BRAF-Mutant Melanomas and Are Potential Therapeutic Targets. *Cancer Research*, 75(7), 1399–1412. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-14-2785>
- Segerstrom, S. C. y Miller, G. E. (2004). Psychological stress and the human immune system: a meta-analytic study of 30 years of inquiry. *Psychological Bulletin*, 130(4), 601–630. <https://doi.org/10.1037/0033-2909.130.4.601>
- Selye, H. (1936). A syndrome produced by diverse nocuous agents. *Nature*, 138(3479), 32–32. <https://doi.org/10.1038/138032a0>
- Sephton, S. E., Dhabhar, F. S., Keuroghlian, A. S., Giese-Davis, J., McEwen, B. S., Ionan, A. C. y Spiegel, D. (2009). Depression, cortisol, and suppressed cell-mediated immunity in metastatic breast cancer. *Brain, Behavior, and Immunity*, 23(8), 1148–1155. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2009.07.007>
- Sforzini, L., Pariante, C. M., Palacios, J. E., Tylee, A., Carvalho, L. A., Viganò, C. A. y Nikkheslat, N. (2019). Inflammation associated with coronary heart disease predicts onset of depression in a three-year prospective follow-up: a preliminary study. *Brain, Behavior, and Immunity*, 81, 659–664.

<https://doi.org/10.1016/j.bbi.2019.07.023>

Sgoifo, A., De Boer, S. F., Haller, J. y Koolhaas, J. M. (1996). Individual differences in plasma catecholamine and corticosterone stress responses of wild-type rats: Relationship with aggression. *Physiology and Behavior*, 60(6), 1403–1407. [https://doi.org/10.1016/S0031-9384\(96\)00229-6](https://doi.org/10.1016/S0031-9384(96)00229-6)

Sheu, B. C., Chang, W. C., Cheng, C. Y., Lin, H. H., Chang, D. Y. y Huang, S. C. (2008). Cytokine regulation networks in the cancer microenvironment. *Frontiers in Bioscience*, 13(16), 6255–6268. <https://doi.org/10.2741/3152>

Shimizu, E., Hashimoto, K., Okamura, N., Koike, K., Komatsu, N., Kumakiri, C., Nakazato, M., Watanabe, H., Shinoda, N., Okada, S. I. y Iyo, M. (2003). Alterations of serum levels of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in depressed patients with or without antidepressants. *Biological Psychiatry*, 54(1), 70–75. [https://doi.org/10.1016/S0006-3223\(03\)00181-1](https://doi.org/10.1016/S0006-3223(03)00181-1)

Shirazi, S. N., Friedman, A. R., Kaufer, D. y Sakhai, S. A. (2015). Glucocorticoids and the brain: Neural mechanisms regulating the stress response. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 872, 235–252. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2895-8_10

Shirey, K. A., Jung, J.-Y., Maeder, G. S. y Carlin, J. M. (2006). Upregulation of IFN- γ Receptor Expression by Proinflammatory Cytokines Influences IDO Activation in Epithelial Cells. *Journal of Interferon & Cytokine Research*, 26(1), 53–62. <https://doi.org/10.1089/jir.2006.26.53>

Silverman, M. N., Pearce, B. D., Biron, C. A. y Miller, A. H. (2005). Immune modulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis during viral infection. *Viral Immunology*, 18(1), 41–78. <https://doi.org/10.1089/vim.2005.18.41>

Silverman, M. N., Pearce, B. D. y Miller, A. H. (2003). Cytokines and HPA Axis Regulation En *Cytokines and mental health* (pp. 85-122). Springer, Boston, MA. https://doi.org/10.1007/978-1-4615-0323-1_5

Slavich, G. M. y Irwin, M. R. (2014). From stress to inflammation and major depressive

- disorder: A social signal transduction theory of depression. *Psychological Bulletin*, 140(3), 774–815. <https://doi.org/10.1037/a0035302>
- Slavich, G. M., O'Donovan, A., Epel, E. S. y Kemeny, M. E. (2010). Black sheep get the blues: a psychobiological model of social rejection and depression. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 35(1), 39–45. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2010.01.003>
- Slavich, G. M., Thornton, T., Torres, L. D., Monroe, S. M. y Gotlib, I. H. (2009). Targeted rejection predicts hastened onset of major depression. *Journal of Social and Clinical Psychology*, 28(2), 223–243. <https://doi.org/10.1521/jscp.2009.28.2.223>
- Sociedad Española de oncología médica (2019). *Las cifras del cáncer en España / 2019*. <https://seom.org/dmccancer/las-cifras-del-cancer-en-espana-2019/>
- Solomon, G. F. y Moos, R. H. (1964). Emotions, Immunity, And Disease. *Archives of General Psychiatry*, 11(6), 657. <https://doi.org/10.1001/archpsyc.1964.01720300087011>
- Sommershof, A., Scheuermann, L., Koerner, J. y Groettrup, M. (2017). Chronic stress suppresses anti-tumor TCD8+ responses and tumor regression following cancer immunotherapy in a mouse model of melanoma. *Brain, Behavior, and Immunity*, 65, 140–149. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2017.04.021>
- Sonnentag, S. y Fritz, C. (2006). Endocrinological Processes Associated with Job Stress: Catecholamine and Cortisol Responses to Acute and Chronic Stressors. *Research in Occupational Stress and Well-Being*, 5, 1–59. [https://doi.org/10.1016/S1479-3555\(05\)05001-8](https://doi.org/10.1016/S1479-3555(05)05001-8)
- Southwick, S., Vythilingam, M. y Charney, D. (2005). The Psychobiology of Depression and Resilience to Stress: Implications for Prevention and Treatment. *Annual Review of Clinical Psychology*, 1(1), 255–291. <https://doi.org/10.1146/annurev.clinpsy.1.102803.143948>
- Sperner-Unterweger, B., Kohl, C. y Fuchs, D. (2014). Immune changes and

- neurotransmitters: Possible interactions in depression? *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 48, 268–276. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2012.10.006>
- Spiegel, D., Butler, L. D., Giese-Davis, J., Koopman, C., Miller, E., DiMiceli, S., Classen, C. C., Fobair, P., Carlson, R. W. y Kraemer, H. C. (2007). Effects of supportive-expressive group therapy on survival of patients with metastatic breast cancer. *Cancer*, 110(5), 1130–1138. <https://doi.org/10.1002/cncr.22890>
- Spijker, S. (2011). Dissection of Rodent Brain Regions. In *Neuroproteomics* (pp. 13–26). Humana Press, Totowa, NJ. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-111-6_2
- Stark, J. L., Avitsur, R., Padgett, D. A., Campbell, K. A., Beck, F. M. y Sheridan, J. F. (2001). Social stress induces glucocorticoid resistance in macrophages. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 280(6), R1799–R1805. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.2001.280.6.R1799>
- Stepanichev, M. Y., Tishkina, A. O., Novikova, M. R., Levshina, I. P., Freiman, S. V., Onufriev, M. V., Levchenko, O. A., Lazareva, N. A. y Gulyaeva, N. V. (2016). Anhedonia but not passive floating is an indicator of depressive-like behavior in two chronic stress paradigms. *Acta Neurobiologiae Experimentalis*, 76(4), 324–333. <https://doi.org/10.21307/ane-2017-031>
- Step toe, A., Willemsen, G., Owen, N., Flower, L. y Mohamed-Ali, V. (2001). Acute mental stress elicits delayed increases in circulating inflammatory cytokine levels. *Clinical Science*, 101(2), 185–192. <https://doi.org/10.1042/CS20010038>
- Step toe, A., Hamer, M. y Chida, Y. (2007). The effects of acute psychological stress on circulating inflammatory factors in humans: A review and meta-analysis. *Brain Behavior and Immunity*, 21(7), 901–912. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2007.03.011>
- Stitt, J. T. (1990). Passage of immunomodulators across the blood-brain barrier. *The Yale Journal of Biology and Medicine*, 63(2), 121–131. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2119089>

- Ströhle, A. y Holsboer, F. (2003). Stress Responsive Neurohormones in Depression and Anxiety. *Pharmacopsychiatry*, 36, 207–214. <https://doi.org/10.1055/s-2003-45132>
- Sublette, M. E., Galfalvy, H. C., Fuchs, D., Lapidus, M., Grunebaum, M. F., Oquendo, M. A., John Mann, J. y Postolache, T. T. (2011). Plasma kynurenine levels are elevated in suicide attempters with major depressive disorder. *Brain, Behavior, and Immunity*, 25(6), 1272–1278. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2011.05.002>
- Summers, C. H. y Winberg, S. (2006). Interactions between the neural regulation of stress and aggression. In *Journal of Experimental Biology* (Vol. 209, Issue 23, pp. 4581–4589). <https://doi.org/10.1242/jeb.02565>
- Swaab, D. F., Bao, A.-M. y Lucassen, P. J. (2005). The stress system in the human brain in depression and neurodegeneration. *Ageing Research Reviews*, 4(2), 141–194. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2005.03.003>
- Talmadge, J. E. y Fidler, I. J. (2010). AACR Centennial Series: The Biology of Cancer Metastasis: Historical Perspective. *Cancer Research*, 70(14), 5649–5669. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-1040>
- Tang, J., Yu, W., Chen, S., Gao, Z. y Xiao, B. (2018). Microglia Polarization and Endoplasmic Reticulum Stress in Chronic Social Defeat Stress Induced Depression Mouse. *Neurochemical Research*, 43(5), 985–994. <https://doi.org/10.1007/s11064-018-2504-0>
- Temoshok, L. (1985). Biopsychosocial studies on cutaneous malignant melanoma: Psychosocial factors associated with prognostic indicators, progression, psychophysiology and tumor-host response. *Social Science and Medicine*, 20(8), 833–840. [https://doi.org/10.1016/0277-9536\(85\)90338-7](https://doi.org/10.1016/0277-9536(85)90338-7)
- Thaker, P. H., Han, L. Y., Kamat, A. A., Arevalo, J. M., Takahashi, R., Lu, C., Jennings, N. B., Armaiz-Pena, G., Bankson, J. A., Ravoori, M., Merritt, W. M., Lin, Y. G., Mangala, L. S., Kim, T. J., Coleman, R. L., Landen, C. N., Li, Y., Felix, E., Sanguino, A. M., ... Sood, A. K. (2006). Chronic stress promotes tumor growth and angiogenesis in a mouse model of ovarian carcinoma. *Nature Medicine*, 12(8), 939–

944. <https://doi.org/10.1038/nm1447>

Thomas, A. J., Davis, S., Morris, C., Jackson, E., Harrison, R. y O'Brien, J. T. (2014). Increase in Interleukin-1 β in Late-Life Depression. *American Journal of Psychiatry*, 162(1), 175-177.

Thornton, L. M. y Andersen, B. L. (2006). Psychoneuroimmunology examined: The role of subjective stress. *Cellscience*, 2(4), 66-91. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18633462> <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC2473865>

Tomiyoshi, M. Y., Sakai, M., Baleeiro, R. B., Stankevicius, D., Massoco, C. O., Palermo-Neto, J. y Barbuto, J. A. M. (2009). Cohabitation with a B16F10 melanoma-bearer cage mate influences behavior and dendritic cell phenotype in mice. *Brain, Behavior, and Immunity*, 23(4), 558-567. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2009.02.006>

Topalian, S. L., Hodi, F. S., Brahmer, J. R., Gettinger, S. N., Smith, D. C., McDermott, D. F., Powderly, J. D., Carvajal, R. D., Sosman, J. A., Atkins, M. B., Leming, P. D., Spigel, D. R., Antonia, S. J., Horn, L., Drake, C. G., Pardoll, D. M., Chen, L., Sharfman, W. H., Anders, R. A., ... Sznol, M. (2012). Safety, Activity, and Immune Correlates of Anti-PD-1 Antibody in Cancer. *New England Journal of Medicine*, 366(26), 2443-2454. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1200690>

Tornatzky, W. y Miczek, K. A. (1994). Behavioral and autonomic responses to intermittent social stress: differential protection by clonidine and metoprolol. *Psychopharmacology*, 116(3), 346-356. <https://doi.org/10.1007/bf02245339>

Trainor, B. C., Pride, M. C., Villalon Landeros, R., Knoblauch, N. W., Takahashi, E. Y., Silva, A. L. y Crean, K. K. (2011). Sex Differences in Social Interaction Behavior Following Social Defeat Stress in the Monogamous California Mouse (*Peromyscus californicus*). *PLoS ONE*, 6(2), e17405. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0017405>

Tsao, H., Atkins, M. B. y Sober, A. J. (2004). Management of Cutaneous Melanoma. *New England Journal of Medicine*, 351(10), 998-1012.

<https://doi.org/10.1056/NEJMra041245>

Tsigos, C. y Chrousos, G. P. (1994). Physiology of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in health and dysregulation in psychiatric and autoimmune disorders. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America*, 23(3), 451-466. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7805648>

Unlap, T. y Jope, R. S. (1995). Inhibition of NFkB DNA binding activity by glucocorticoids in rat brain. *Neuroscience Letters*, 198(1), 41-44. [https://doi.org/10.1016/0304-3940\(95\)11963-W](https://doi.org/10.1016/0304-3940(95)11963-W)

Ursin, H. (1998). The psychology in psychoneuroendocrinology. *Psychoneuroendocrinology*, 23(6), 555-570. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9802127>

Ursin, H. y Olf, M. (1993). Psychobiology of Coping and Defence Strategies. *Neuropsychobiology*, 28(1-2), 66-71. <https://doi.org/10.1159/000119002>

Valpione, S., Martinoli, C., Fava, P., Mocellin, S., Campana, L. G., Quaglino, P., Ferrucci, P. F., Pigozzo, J., Astrua, C., Testori, A. y Chiarion-Sileni, V. (2015). Personalised medicine: Development and external validation of a prognostic model for metastatic melanoma patients treated with ipilimumab. *European Journal of Cancer*, 51(14), 2086-2094. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2015.06.130>

Van de Poll, N. E., De Jonge, F., Van Oyen, H. G. y Van Pelt, J. (1982). Aggressive behaviour in rats: Effects of winning or losing on subsequent aggressive interactions. *Behavioural Processes*, 7(2), 143-155. [https://doi.org/10.1016/0376-6357\(82\)90023-7](https://doi.org/10.1016/0376-6357(82)90023-7)

Van der Leek, A. P., Yanishevsky, Y. y Kozyrskyj, A. L. (2017). The Kynurenine Pathway As a Novel Link between Allergy and the Gut Microbiome. *Frontiers in Immunology*, 8, 1374. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01374>

Van Eekelen, J. A. M., Jiang, W., De Kloet, E. R. y Bohn, M. C. (1988). Distribution of the mineralocorticoid and the glucocorticoid receptor mRNAs in the rat hippocampus.

- Journal of Neuroscience Research*, 21(1), 88–94.
<https://doi.org/10.1002/jnr.490210113>
- Veenema, A. H., Meijer, O. C., de Kloet, E. R., Koolhaas, J. M. y Bohus, B. G. (2003). Differences in basal and stress-induced HPA regulation of wild house mice selected for high and low aggression. *Hormones and Behavior*, 43(1), 197–204.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12614650>
- Veenema, A. H. y Neumann, I. D. (2007). Neurobiological Mechanisms of Aggression and Stress Coping: A Comparative Study in Mouse and Rat Selection Lines. *Brain, Behavior and Evolution*, 70(4), 274–285. <https://doi.org/10.1159/000105491>
- Veening, J. G., Coolen, L. M., de Jong, T. R., Joosten, H. W., de Boer, S. F., Koolhaas, J. M. y Olivier, B. (2005). Do similar neural systems subserve aggressive and sexual behaviour in male rats? Insights from c-Fos and pharmacological studies. *European Journal of Pharmacology*, 526(1–3), 226–239.
<https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2005.09.041>
- Vegas, O., Beitia, G., Sanchez-Martin, J. R., Arregi, A. y Azpiroz, A. (2004). Behavioral and neurochemical responses in mice bearing tumors submitted to social stress. *Behavioural brain research*, 155(1), 125–134.
- Vegas, O., Garmendia, L., Arregi, A., Beitia, G. y Azpiroz, A. (2009). Effects of antalarmin and nadolol on the relationship between social stress and pulmonary metastasis development in male OF1 mice. *Behavioural Brain Research*, 205(1), 200–206. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2009.06.033>
- Vegas, O., Fano, E., Brain, P. F., Alonso, A. y Azpiroz, A. (2006). Social stress, coping strategies and tumor development in male mice: Behavioral, neuroendocrine and immunological implications. *Psychoneuroendocrinology*, 31(1), 69–79.
<https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2005.05.013>
- Venzala, E., García-García, A. L., Elizalde, N., Delagrangé, P. y Tordera, R. M. (2012). Chronic social defeat stress model: Behavioral features, antidepressant action, and interaction with biological risk factors. *Psychopharmacology*, 224(2), 313–325.

<https://doi.org/10.1007/s00213-012-2754-5>

Viljoen, M., Panzer, A., Roos, J. L. y Bodemer, W. (2003). Psychoneuroimmunology: From philosophy, intuition, and folklore to a recognized science. *South African Journal of Science*, 99(7-8), 332-336.

von Kanel, R., Dimsdale, J. E., Mills, P. J., Ancoli-Israel, S., Patterson, T. L., Mausbach, B. T. y Grant, I. (2006). Effect of Alzheimer Caregiving Stress and Age on Frailty Markers Interleukin-6, C-Reactive Protein, and D-Dimer. *The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences*, 61(9), 963-969. <https://doi.org/10.1093/gerona/61.9.963>

Walker, F. R., Masters, L. M., Dielenberg, R. A. y Day, T. A. (2009). Coping with defeat: acute glucocorticoid and forebrain responses to social defeat vary with defeat episode behaviour. *Neuroscience*, 162(2), 244-253. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2009.04.041>

Waters, R. P., Emerson, A. J., Watt, M. J., Forster, G. L., Swallow, J. G. y Summers, C. H. (2005). Stress induces rapid changes in central catecholaminergic activity in *Anolis carolinensis*: Restraint and forced physical activity. *Brain Research Bulletin*, 67(3), 210-218. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2005.06.029>

Watkins, L. R., Wiertelak, E. P., Goehler, L. E., Mooney-Heiberger, K., Martinez, J., Furness, L., Smith, K. P. y Maier, S. F. (1994). Neurocircuitry of illness-induced hyperalgesia. *Brain Research*, 639(2), 283-299. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(94\)91742-6](https://doi.org/10.1016/0006-8993(94)91742-6)

Wei, Y.-C., Zhou, F.-L., He, D.-L., Bai, J.-R., Ding, H., Wang, X.-Y. y Nan, K.-J. (2009). Oxidative stress in depressive patients with gastric adenocarcinoma. *The International Journal of Neuropsychopharmacology*, 12(08), 1089. <https://doi.org/10.1017/S1461145709000091>

West, D. y Maes, M. (1999). Major depression and activation of the inflammatory response system. *Ceska a Slovenska Psychiatrie*, 95(4), 233-243. https://doi.org/10.1007/978-0-585-37970-8_2

- Wichers, M. C. y Maes, M. (2004). The role of indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) in the pathophysiology of interferon- α -induced depression. *Journal of Psychiatry and Neuroscience*, 29(1), 11-17.
- Widner, B., Ledochowski, M. y Fuchs, D. (2000). Interferon gamma induced Tryptophan Degradation Neuropsychiatric and Immunological Consequences. *Current Drug Metabolism*, 1(2), 193-204. <https://doi.org/10.2174/1389200003339063>
- Widner, B., Laich, A., Sperner-Unterweger, B., Ledochowski, M. y Fuchs, D. (2002). Neopterin production, tryptophan degradation, and mental depression--what is the link? *Brain, Behavior, and Immunity*, 16(5), 590-595. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12401473>
- Wiepkema, P. R. y Schouten, W. G. P. (1992). Stereotypies in sows during chronic stress. *Psychotherapy and Psychosomatics*, 57(4), 194-195. <https://doi.org/10.1159/000288598>
- Willis, R. (1952). *The spread of tumours in the human body*. Londres: Butterworth & Co.
- Witorsch, R. J. (2016). Effects of elevated glucocorticoids on reproduction and development: relevance to endocrine disruptor screening. *Critical Reviews in Toxicology*, 46(5), 420-436. <https://doi.org/10.3109/10408444.2016.1140718>
- Wolchok, J. D., Kluger, H., Callahan, M. K., Postow, M. A., Rizvi, N. A., Lesokhin, A. M., Segal, N. H., Ariyan, C. E., Gordon, R.-A., Reed, K., Burke, M. M., Caldwell, A., Kronenberg, S. A., Agunwamba, B. U., Zhang, X., Lowy, I., Inzunza, H. D., Feely, W., Horak, C. E., ... Sznol, M. (2013). Nivolumab plus Ipilimumab in Advanced Melanoma. *New England Journal of Medicine*, 369(2), 122-133. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1302369>
- Wolf, J. M., Rohleder, N., Bierhaus, A., Nawroth, P. P. y Kirschbaum, C. (2009). Determinants of the NF-kappa B response to acute psychosocial stress in humans. *Brain Behavior and Immunity*, 23(6), 742-749. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2008.09.009>

- Wong, D. L. y Tank, A. W. (2007). Stress-induced catecholaminergic function: Transcriptional and post-transcriptional control. *Stress*, 10(2), 121–130. <https://doi.org/10.1080/10253890701393529>
- Wood, S. K., Wood, C. S., Lombard, C. M., Lee, C. S., Zhang, X. Y., Finnell, J. E. y Valentino, R. J. (2015). Inflammatory factors mediate vulnerability to a social stress-induced depressive-like phenotype in passive Coping Rats. *Biological Psychiatry*, 78(1), 38–48. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2014.10.026>
- Wu, W., Pew, T., Zou, M., Pang, D. y Conzen, S. D. (2005). Glucocorticoid receptor-induced MAPK phosphatase-1 (MPK-1) expression inhibits paclitaxel-associated MAPK activation and contributes to breast cancer cell survival. *Journal of Biological Chemistry*, 280(6), 4117–4124. <https://doi.org/10.1074/jbc.M411200200>
- Xia, Y., Wei, Y., Li, Z. Y., Cai, X. Y., Zhang, L. L., Dong, X. R., Zhang, S., Zhang, R. G., Meng, R., Zhu, F. y Wu, G. (2019). Catecholamines contribute to the neovascularization of lung cancer via tumor-associated macrophages. *Brain, Behavior, and Immunity*, 81, 111–121. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2019.06.004>
- Yamakawa, K., Matsunaga, M., Isowa, T., Kimura, K., Kasugai, K., Yoneda, M., Kaneko, H. y Ohira, H. (2009). Transient responses of inflammatory cytokines in acute stress. *Biological Psychology*, 82(1), 25–32. <https://doi.org/10.1016/j.biopsycho.2009.05.001>
- Yang, M., Kim, J., Kim, J. S., Kim, S. H., Kim, J. C., Kang, M. J., Jung, U., Shin, T., Wang, H. y Moon, C. (2014). Hippocampal dysfunctions in tumor-bearing mice. *Brain, Behavior, and Immunity*, 36, 147–155. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2013.10.022>
- Yehuda, R., Boisoneau, D., Mason, J. W. y Giller, E. L. (1993). Glucocorticoid receptor number and cortisol excretion in mood, anxiety, and psychotic disorders. *Biological Psychiatry*, 34(1–2), 18–25. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8373936>
- Yirmiya, R. (1996). Endotoxin produces a depressive-like episode in rats. *Brain Research*, 711(1–2), 163–174. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(95\)01415-2](https://doi.org/10.1016/0006-8993(95)01415-2)
- Yu, T., Guo, M., Garza, J., Rendon, S., Sun, X. L., Zhang, W. y Lu, X. Y. (2011). Cognitive

and neural correlates of depression-like behaviour in socially defeated mice: An animal model of depression with cognitive dysfunction. *International Journal of Neuropsychopharmacology*, 14(3), 303-317. <https://doi.org/10.1017/S1461145710000945>

Zomkowski, A. D. E., Hammes, L., Lin, J., Calixto, J. B., Santos, A. R. S. y Rodrigues, A. L. S. (2002). Agmatine produces antidepressant-like effects in two models of depression in mice. *Neuroreport*, 13(4), 387-391. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11930146>

Zozulya, A. A., Gabaeva, M. V., Sokolov, O. Y., Surkina, I. D. y Kost, N. V. (2008). Personality, Coping Style, and Constitutional Neuroimmunology. *Journal of Immunotoxicology*, 5(2), 221-225. <https://doi.org/10.1080/15476910802131444>

BLOQUE VIII.

ANEXOS

ANEXO I. CATEGORIAS CONDUCTUALES

A continuación se especifican las características que definen a cada una de las pautas conductuales del ratón (Martínez y cols., 1986):

1. CUIDADO CORPORAL:

- a) *Aseo abreviado*. El animal pasa las patas delanteras desde la parte posterior de la cabeza a la nariz.
- b) *Autoaseo*. El animal se lame la piel de los flancos, del abdomen y el rabo.
- c) *Lavado*. El animal se lame las patas delanteras y a continuación las pasa desde las orejas a la nariz.
- d) *Sacudida*. Un breve y ligero estremecimiento de todo el cuerpo.
- e) *Rascarse*. El animal se rasca con las patas traseras los flancos y la cabeza.

2. ESCARBAR:

- a) *Escarbar*. El animal remueve el serrín utilizando las patas delanteras.
- b) *Escarbar hacia atrás*. El animal tira el serrín hacia atrás utilizando para ello las patas traseras.
- c) *Escarbar hacia adelante*. El animal tira el serrín hacia adelante utilizando para ello las patas delanteras.

3. EXPLORACIÓN NO SOCIAL:

- a) *Exploración*. El animal deambula dirigiendo su atención, aparentemente, hacia el ambiente físico.
- b) *Salto*. El animal salta con las cuatro patas. **ANEXOS**

- c) *Erguido*. El animal explora el ambiente en postura bípeda.
- d) *Erguido apoyándose en la pared*. Postura similar a la anterior, excepto en que las patas delanteras las apoya en la pared de la jaula.
- e) *Ojear*. El animal en posición cuadrúpeda, mueve la cabeza de un lado a otro, dirigiendo su atención al ambiente y no hacia el oponente.

4. EXPLORACIÓN A DISTANCIA:

- a) *Aproximación*. El animal anda hacia el oponente dirigiendo su atención hacia éste.
- b) *Atención*. El animal dirige su atención hacia el oponente desde una distancia.
- c) *Círculo*. El animal hace un recorrido, acercándose y alejándose del oponente sin detenerse.
- d) *Atención extrema*. Postura similar a la atención, excepto en que el animal se inclina hacia delante estirando la cabeza y el cuello.
- e) *Cabeza orientada*. El animal gira la cabeza hacia el oponente.

5. EXPLORACIÓN SOCIAL:

- a) *Andando encima*. El animal pasa por encima del oponente, apoyando las patas delanteras sobre su lomo.
- b) *Andando debajo*. El animal mete la cabeza y parte anterior del cuerpo debajo del oponente.
- c) *Andando alrededor*. El animal se mueve alrededor del oponente con la cabeza dirigida hacia éste.
- d) *Seguimiento*. El animal camina detrás del oponente que se aleja.
- e) *Empujando*. Los dos animales, en un momento del recorrido, llegan a contactar lateralmente.
- f) *Aseo corporal*. El animal, usando la boca, asea al oponente en alguna región del cuerpo, excepto la cabeza.
- g) *Aseo de la cabeza*. El animal asea la cabeza del oponente.
- h) *Olfateo corporal*. El animal olfatea alguna región del cuerpo del oponente, excepto la cabeza.
- i) *Olfateo de la nariz*. El animal olfatea la cabeza o la nariz del oponente.
- j) *Olfateo ano-genital*. El animal olfatea la región ano-genital del oponente.

6. AMENAZA:

- a) *Aseo agresivo*. El animal asea rigurosamente al oponente, desde una posición lateral, con los dientes y patas delanteras.
- b) *Ofensa vertical*. El animal junto al oponente, en una postura bípeda y con el lomo encorvado e inclinado hacia éste, presenta los ojos entreabiertos y las orejas gachas, y a menudo el pelo erizado.
- c) *Ofensa lateral*. El animal amenaza al oponente, en una postura tripedal, desde una posición lateral, con los ojos entreabiertos y las orejas agachadas, presenta a menudo el pelo erizado
- d) *Golpeteo con el rabo*. El animal realiza rápidos movimientos con el rabo.

7. ATAQUE:

- a) *Ataque mordaz*. El animal muerde al oponente.
- b) *Persecución*. El animal corre detrás del oponente que huye.
- c) *Carga*. El animal corre hacia el oponente.
- d) *Embestida*. El animal se abalanza sobre el oponente, como si fuera a morderle, pero llegando solo a contacto lateral.

8. EVITACIÓN-HUIDA:

- a) *Alejamiento*. El animal deambula lejos del oponente.
- b) *Retirada*. El animal se aleja corriendo al aproximarse el oponente.
- c) *Salto*. El animal salta al acercarse el oponente
- d) *Rebote*. El animal salta apoyándose en las paredes de la jaula.
- e) *Sobresalto*. El animal realiza un súbito movimiento al acercarse el oponente.
- f) *Apretado contra la pared*. El animal en posición bípeda, se aprieta contra la pared de la jaula, con la superficie ventral de su cuerpo extendiendo los miembros delanteros.
- g) *Retroceso*. El animal retira rápidamente la cabeza ante el oponente.
- h) *Escape*. El animal mueve lentamente la parte anterior del cuerpo y/o cabeza, para evitar al oponente.
- i) *Girar*. El animal se vuelve de espaldas al acercarse el oponente.

9. DEFENSA-SUMISIÓN:

- a) *Defensa lateral*. El animal ante la cercanía del oponente, adopta una posición tripedal lateral a éste, con los ojos abiertos y las orejas extendidas.
- b) *Defensa vertical*. El animal ante la cercanía del oponente, adopta una posición bípeda, con los ojos abiertos y las orejas extendidas.
- c) *Sumisión vertical*. Es una forma extrema de “defensa vertical”, en la que el animal retira la cabeza hacia atrás.

10. CONDUCTA SEXUAL:

- a) *Intento de monta*. El animal intenta montar dorsalmente al oponente, pero de forma incompleta.
- b) *Monta*. El animal, situado encima del oponente y agarrado a los flancos de éste, realiza movimientos pélvicos.

11. INMOVILIDAD:

- a) *Agachado*. El animal permanece en completa inmovilidad, con las cuatro patas apoyadas en el suelo.
- b) *Arrastrarse*. Postura similar a la anterior, excepto en que el animal se apoya en las paredes de la jaula y se arrastra lejos del oponente.

