

**VARIABILIDAD DE LA FRECUENCIA CARDIACA EN RATAS WISTAR
EXPUESTAS A DOS NIVELES DE ILUMINACIÓN AMBIENTAL BAJO EL
EFECTO DEL DIAZEPAN**

HEIDY VANESSA TORRES CASTIBLANCO



**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE BIOLOGÍA
BUCARAMANGA
2013**

**VARIABILIDAD DE LA FRECUENCIA CARDIACA EN RATAS WISTAR
EXPUESTAS A DOS NIVELES DE ILUMINACIÓN AMBIENTAL BAJO EL
EFECTO DEL DIAZEPAN**

HEIDY VANESSA TORRES CASTIBLANCO

**Trabajo de grado presentado como requisito para optar al título de
Bióloga**

**Director:
CARLOS CONDE COTES MD; PHD
Laboratorio de Neurociencias y Comportamiento UIS-UPB
Departamento de Ciencias Básicas**

**Codirectora:
DIANA MARTÍNEZ RANGEL MSC.
Laboratorio de Neurociencias y Comportamiento UIS-UPB
Departamento de Ciencias Básicas**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE BIOLOGÍA
BUCARAMANGA**

2013

Dedicado a:

Mi mamá Doris Castiblanco, por su larga espera, gracias por creer en mis sueños, sueños locos sí, pero....Ya ves mamá, tarde o temprano algún sueño se cumple....

A nuestras largas y alegres charlas, a nuestras tristezas compartidas, al silencio y amor que nos unen.

A mi abuelita Reina Rodríguez por pensar en mí....Te recuerdo siempre de colores, de sedas y perfumes !Abuelita eres como el mar!

A mi hermano Juan Pablo por su sencillez, y sentido del humor que me hacen tan feliz.

AGRADECIMIENTOS

Al doctor Carlos Conde Cotes, por las segundas oportunidades, la sencillez de sus explicaciones, su buen ánimo y paciencia.

A la Bióloga Diana Martínez, por la orientación recibida, comprensión y calidad humana.

Al Ingeniero Electrónico Alberto Grimaldos, por su oportuna ayuda.

Al técnico del Bioterio Jesús Rodríguez, por su disposición constante.

Al Biólogo Carlos Prada, Yesith Toloza y Andrea Navas compañeros de charlas, risas y academia.

A todos gracias también por su tiempo.

CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCIÓN	15
1. MATERIALES Y MÉTODOS	21
1.1 SUJETOS	21
1.2 MANIPULACIÓN Y MARCAJE	21
1.3 PESAJE DE ANIMALES E INSERCIÓN DE ELECTRODOS	22
1.4 MEDICAMENTOS ADMINISTRADOS	23
1.5 REGISTRO DEL ECG	23
1.6 ANÁLISIS DE ECG	25
1.7 EVALUACIÓN DEL COMPORTAMIENTO	26
1.8 ANÁLISIS DEL COMPORTAMIENTO	26
1.8.1 Quieto	26
1.8.2 Camina	26
1.8.3 Levanta	26
1.8.4 Escarba	26
1.9 PROCEDIMIENTO	27
1.9.1 Legislación bioética	28
1.9.2 Estadísticos	29
2. RESULTADOS	31
2.1 RESULTADOS ELECTROCARDIOGRAFÍA	31
2.2 RESULTADOS COMPORTAMENTALES	34
3. DISCUSIÓN	38
4. CONCLUSIONES	40
BIBLIOGRAFÍA	41
ANEXOS	45

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Sistema de Conducción eléctrica del corazón.	17
Figura 2. Nervios simpáticos y parasimpáticos cardiacos. Los nervios vagos que se dirigen al corazón son nervios parasimpáticos.	18
Figura 3. Ondas básicas del electrocardiograma.	19
Figura 4. Variación de la Frecuencia Cardiaca (FC) latido a latido. A Partir del ECG, se calcula el intervalo entre picos R-R y se expresa la VFC en segundos (s) y la FC en latidos por minuto (p/m). Circulos azules corresponden a los picos R.	20
Figura 5. Disposición de electrodos según convenciones de Einthoven en la rata.	23
Figura 6. Cable coaxial usado para la toma del ECG.	24
Figura 7. Montaje general del experimento.	25
Figura 8. Promedio \pm un error estándar de los cambios de la mediana de los intervalos R-R con respecto al basal obtenidas de las cuatro fases. *Diferencias significativas entre SS-LUZ y SS-OSC, ° Diferencias significativas entre DZP-OSC y SS-OSC, # Diferencias significativas entre DZP-LUZ y SS-LUZ (Test de Bonferroni, $p < 0,05$).	31
Figura 9. El promedio \pm un error estándar de las diferencias pareadas de los rangos de los intervalos R-R con respecto al basal. "Diferencias significativas atribuibles al diazepam comparado con salina independiente del nivel de iluminación, (Test de Bonferroni, $p < 0,05$).	32
Figura 10. Promedio \pm un error estándar de las diferencias pareadas de RMSSD con respecto al basal. *Diferencias significativas entre SS-LUZ y SS-OSC, °Diferencias significativas entre SS-OSC y DZP-OSC (Test de Bonferroni, $p < 0,05$).	33

Figura 11. Promedios \pm un error estándar de las frecuencias y tiempos relativos de los comportamientos registrados.	34
Figura12. Promedios \pm un error estándar de las frecuencias y tiempos relativos con actividad locomotora.	35

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Fases experimentales, tiempos de los diferentes grupos y animales usados en cada grupo.	28
Tabla 2. Distribución del peso de los animales por grupo experimental.	28
Tabla 3. Parámetros de análisis de la VFC en el dominio del tiempo.	30
Tabla 4. Análisis de regresión lineal múltiple para la mediana R-R con $P < 0,05$.	36
Tabla 5. Análisis de regresión lineal múltiple para el RMSSD con $P < 0,05$.	36
Tabla 6. Análisis de regresión lineal múltiple para los rangos de los intervalos R-R con $P < 0,05$.	37

LISTA DE ANEXOS

	Pág.
ANEXO A. Resultados de Regresión lineal múltiple de la mediana R-R.	45
ANEXO B. Resultados de la regresión lineal múltiple del RMSSD	46
ANEXO C. Resultados de la regresión lineal múltiple respecto a los rangos R-R	47

RESUMEN

TITULO: Variabilidad de la frecuencia cardiaca en ratas Wistar expuestas a dos niveles de iluminación ambiental bajo los efectos del diazepam*

AUTOR: Heidy Torres**

PALABRAS CLAVE: Laberinto en cruz elevado (LCE), variabilidad de la frecuencia cardiaca (VFC), Intervalo R-R, taquicardia, bradicardia.

CONTENIDO

Algunas investigaciones sugieren que las ratas Wistar evaluadas en condición de oscuridad presentan mayor exploración de los brazos abiertos del laberinto en cruz elevado (LCE), asociando esta respuesta comportamental con menores índices de ansiedad. Sin embargo recientes estudios afirman que las ratas evaluadas en oscuridad, sí presentan aversión a los brazos abiertos del laberinto en cruz elevado, cuando son expuestas un mayor tiempo a éste. El objetivo del presente trabajo es evaluar el efecto de dos niveles de iluminación y de un ansiolítico sobre la variabilidad de la frecuencia cardiaca, como un indicador de la respuesta autonómica producto de una condición de ansiedad asociada con la iluminación. Se sometieron 30 ratas macho de la cepa Wistar a dos condiciones farmacológicas y de iluminación en una caja de plástico, y se calculó la magnitud y la variabilidad de los intervalos R-R, junto con variables de actividad locomotora. Los resultados muestran que durante la condición de oscuridad el animal presenta mayor variabilidad de la frecuencia cardiaca. Adicionalmente el ansiolítico disminuye la variabilidad de la frecuencia cardiaca y la actividad locomotora independientemente de las condiciones de iluminación. Se concluye que bajo estas condiciones experimentales la oscuridad induce la taquicardia y el ansiolítico a la bradicardia en las ratas.

* Proyecto de grado

** Facultad de Ciencias. Escuela de Biología. Director: Carlos Arturo Conde Cotes Ph.D. Fisiología. Codirectora: Diana Martínez Rangel, M.Sc.

ABSTRACT

TITLE: Heart rate variability in Wistar rats exposed to two levels of ambient lighting under the effect of diazepam*

AUTHOR: Heidy Torres**

KEYWORDS: Elevated plus maze (PME), heart rate variability (HRV), intervals R-R, tachycardia, bradycardia.

CONTENT

Some research suggests that Wistar rats evaluated in dark condition present higher increase in the exploration of the open arms of the elevated plus maze (LCE), associating this behavioral response to lower levels of anxiety. However, recent studies claim that rats evaluated in darkness have an aversion to the open arms of the elevated plus maze, when they are exposed more time to it. The aim of this study is to evaluate the effect of two illumination and anxiolytic levels in heart rate variability, as an indicator of autonomic response, product of anxiety associated with lighting. 30 Wistar rats underwent two pharmacological and lighting conditions in a plastic box, in which we calculated the magnitude and variability of RR intervals, along with variables of locomotor activity. The results show that during the dark condition the animal presents an increase in heart rate variability. In addition, anxiolytic reduces the variability of the heart rate and locomotor activity independently of lighting conditions. We conclude that under these experimental conditions the darkness induced tachycardia and the anxiolytic induce bradycardia in rats.

* Thesis

** Faculty of Sciences. Biology Department. Director: Carlos Arturo Conde Cotes Ph.D. Physiology
Codirector: Diana Martínez Rangel, MSc

ABREVIATURAS

AV: Nódulo auriculoventricular

BDZ: Benzodiacepinas

ECG: Electrocardiograma

EPM: Elevated plus maze

FC: Frecuencia cardíaca

HRV: Heart rate variability

LCE: Laberinto en cruz elevado.

Ms: Milisegundos

Ref: Referencia

SA: Nódulo sinusal o sinoauricular

SNA: Sistema nervioso autónomo

VFC: Variabilidad de la frecuencia cardíaca

INTRODUCCIÓN

Los modelos animales son dispositivos experimentales desarrollados para el estudio de fenómenos comportamentales, fisiológicos y farmacológicos. Estos modelos incluyen la investigación con primates, peces, felinos y caninos, entre otras especies, siendo la rata común de laboratorio (*Rattus norvegicus*) la que ha favorecido la investigación por más de un siglo (Blanchard et al, 2008). El análisis del comportamiento defensivo en estos roedores frente a predadores, ha llevado a asociarlos con ansiedad y a entender ésta última como una respuesta comportamental y fisiológica, generada por un ambiente novedoso o amenazante para su supervivencia. Los comportamientos descritos en los roedores han sido agachar, estirar el cuerpo, abrir los ojos, levantar orejas, olfatear constantemente y retraer la cabeza de forma vigorosa, acompañado de cambios en la frecuencia cardíaca, presión sanguínea, frecuencia respiratoria y cambios en la conductancia de la piel (Graeff, 1994; Depino y Gross 2007).

Dentro de los modelos animales para estudiar la ansiedad no condicionada se destaca el laberinto en cruz elevado (LCE) que evalúa la libre exploración de roedores en ambientes novedosos, consta de dos brazos abiertos y dos brazos cerrados (Griebel, et al; 1993). En este modelo el animal maneja un conflicto entre la tendencia por explorar el ambiente novedoso y evitar el peligro potencial, entrando y saliendo de los brazos abiertos y cerrados del LCE (Pereira, et al; 2004). A partir de lo anterior, se consideran las entradas y tiempo de permanencia en los brazos como un índice de ansiedad, a mayor ansiedad menor número de entradas y permanencia en los brazos abiertos (Garcia, et al; 2005). Ansiolítico clásicos evaluados en LCE han sido las benzodiazepinas (BDZ), que reducen la aversión por los brazos abiertos, promoviendo que el animal explore más en ellos (De Araújo, et al; 2007).

Si bien, se ha hablado de los aspectos comportamentales y farmacológicos en relación a la ansiedad en roedores, hay investigaciones que se han orientado a comprender el(los) evento(s) que “disparan” la tendencia a explorar o evitar los brazos abiertos del LCE, estos estudios han sumado evidencia experimental demostrando que al exponer los animales durante cinco minutos (tiempo estándar) en oscuridad, hay un aumento significativo en tiempos de permanencia y frecuencias de entrada a los brazos abiertos del LCE (Bertoglio y Carobrez, 2002; Jones y King, 2001). Adicionalmente se ha reportado que estas condiciones de oscuridad impiden ver el efecto del clordiazepóxido (ansiolítico derivado de la benzodiazepina) en los brazos abiertos (García, et al., 2011).

El proyecto donde se anida esta investigación, permitió una exposición de los animales al LCE por quince minutos, evaluándolos en luz y oscuridad total. Los resultados muestran que los animales aunque sean evaluados en oscuridad presentan aversión por los espacios abiertos (Martínez, 2013). Este trabajo también evaluó la activación de sustratos neuronales, así como los niveles de corticosterona relacionados al fenómeno, pero no evaluó la respuesta autonómica.

Estudios en animales y humanos, han informado sobre la influencia de los estímulos estresantes en las respuestas autonómicas (Zhang, *et al*; 2004). Los cambios inducidos por estrés en el sistema nervioso autónomo alteran la frecuencia cardíaca, siendo la variabilidad la frecuencia cardíaca (VFC) un método no invasivo para evaluar dicha alteración (Sgoifoa, *et al*; 1999). Es así como se pretende aportar a la discusión existente, realizando la medición de VFC que tienen lugar cuando los animales están en oscuridad con y sin el efecto del ansiolítico. Con este fin se formularon las siguientes preguntas básicas:

¿Cuándo los animales son evaluados en oscuridad aumenta o disminuye la variabilidad de la frecuencia cardíaca?

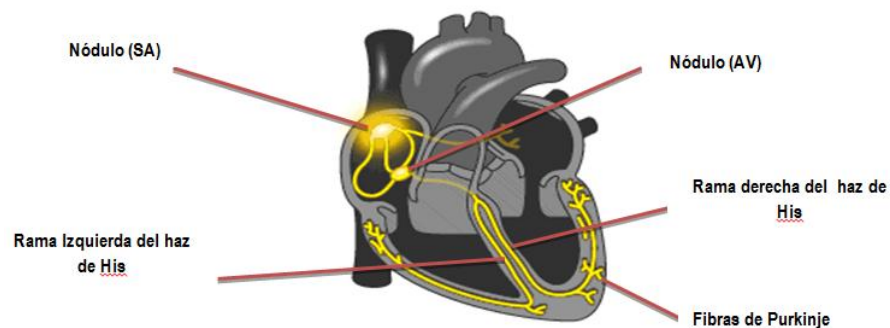
¿Cuándo los animales son evaluados en oscuridad bajo la benzodiacepina qué sucede con la variabilidad de la frecuencia cardiaca?

Es muy difícil medir de forma simultánea los comportamientos de tipo ansioso y las respuestas autonómicas cardiacas asociadas a ellos sin afectar la validez del LCE, por tal razón la medición de la VFC no se realizó en este modelo sino en cajas plásticas (plexiglás). Adicionalmente, la locomoción de las ratas puede afectar la variabilidad de la frecuencia cardiaca independientemente de la condición lumínica y farmacológica. Por tal razón se midió la locomoción simultáneamente con el registro electrocardiográfico en las cajas plásticas.

REGISTRO Y ANÁLISIS DE LA VARIABILIDAD EN LA FRECUENCIA CARDIACA.

El funcionamiento del corazón depende de un sistema propio de generación y transmisión del impulso eléctrico que provoca la contracción del músculo cardíaco. Los componentes más importantes de esta excitación y sistema de conducción especializados se muestran en la figura 1. Hacen parte el nódulo sinusal o sinoauricular (SA), el nódulo auriculoventricular (AV), el fascículo de His con su rama derecha e izquierda y las fibras de Purkinje

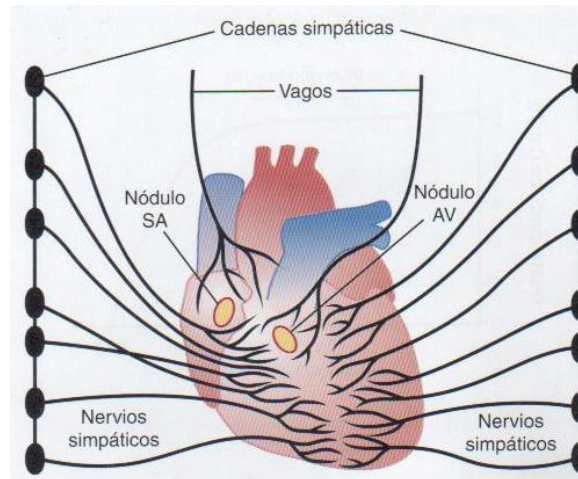
Figura 1. Sistema de Conducción eléctrica del corazón.



Fuente: <http://www.fisiomedicvalencia.com/imgs/fotos/69.jpg>

El control neural de la actividad cardíaca está a cargo de la división simpática y parasimpática del sistema nervioso autónomo. Los nervios simpáticos liberan noradrenalina aumentando la frecuencia de contracciones del corazón, la fuerza de las contracciones y la velocidad de conducción del impulso eléctrico, mientras que los nervios parasimpáticos liberan acetilcolina disminuyendo la frecuencia de contracciones del corazón, la contractilidad cardíaca y la velocidad de conducción del mismo (Luca, 1997). La actividad eléctrica que se desarrolla en el corazón, es lo suficientemente potente para propagarse por todo el organismo y captarse desde la superficie de la piel en puntos distantes del corazón mediante el llamado electrocardiograma (ECG).

Figura 2. Nervios simpáticos y parasimpáticos cardíacos. Los nervios vagos que se dirigen al corazón son nervios parasimpáticos.



Fuente: Fisiología de Guyton, decimoprimer edición

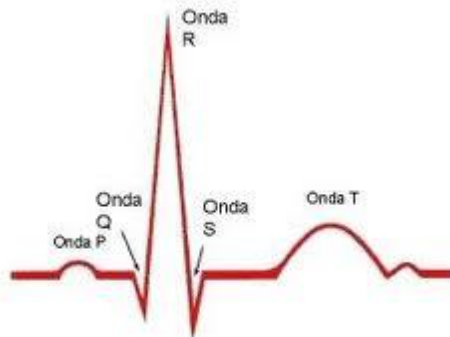
Cuando esta señal de tipo bioeléctrico, esto es, cuando tiene su origen en los fenómenos eléctricos existentes en las membranas celulares, la captación se realiza mediante sensores denominados electrodos. Las convenciones para el registro y análisis de ECG lo encabezan los procedimientos de tres derivaciones bipolares estándar, llamadas convenciones electrocardiográficas de Einthoven. La elección de una derivación u otra tiene repercusiones tanto en la forma de la señal

como en la amplitud de sus distintos componentes. La derivación tipo II es la más utilizada, dado que aporta una onda R de cuya detección depende la obtención del periodo cardiaco expresada en milisegundos y su recíproco que es la frecuencia cardiaca (Castelar y Guerra, 2009).

El electrocardiograma requiere el uso de filtros de paso de banda que permiten el paso de los componentes de frecuencia que caen dentro de un rango determinado, atenuando los que caen fuera de los límites (Luca, 1997), también necesita el factor de amplificación, que suele oscilar entre mil y cinco mil veces el valor de la señal original, y finalmente la frecuencia de muestreo dependiente de los componentes de frecuencia de la señal que se desea registrar. Una vez filtrada y amplificada, la señal presenta unas ondas -----P, Q, R, S, T----- que reflejan los sucesos que ocurren en el corazón en cada latido. Resumidos así:

- -Despolarización eléctrica auricular (onda p)
- -Despolarización eléctrica de los ventrículos (complejo QRS)
- -Repolarización ventricular (onda T).

Figura 3. Ondas básicas del electrocardiograma.

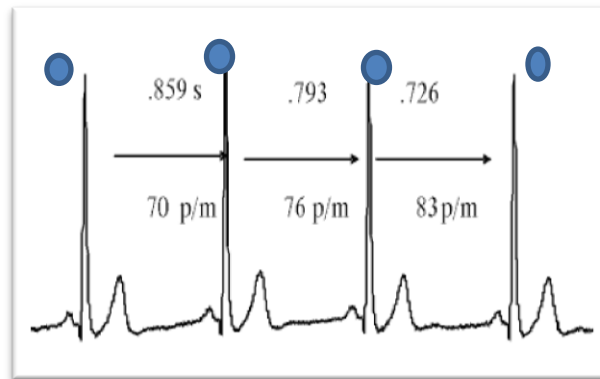


Fuente: <http://www.eccpn.aibarra.org/temario/seccion4/capitulo54/6.jpg>

El análisis de la señal cardiaca se puede hacer en términos de frecuencia cardiaca (latidos por minuto) o período (milisegundos), pero de manera secuencial latido a

latido. El tiempo que transcurre entre un latido y otro muestra sutiles diferencias de duración, estos cambios en el tiempo se le conoce como estudio de la variabilidad de la frecuencia cardíaca o VFC. La variabilidad de la frecuencia cardiaca se mide a partir del ECG, y el punto de referencia que se utiliza es el pico de la onda R, por esta razón es frecuente que los tiempos entre latidos sean referidos como intervalos R-R (Migliaro *et al*; 2001). La interacción entre las células del (SA) o células marcapasos es responsable de una primera forma de variabilidad, muy pequeña, si se le compara con los grandes cambios vía sistema nervioso autónomo (SNA). Vistos por separado la división parasimpática aumenta la duración de los intervalos R-R, mientras que la división simpática los disminuye.

Figura 4. Variación de la Frecuencia Cardíaca (FC) latido a latido. A Partir del ECG, se calcula el intervalo entre picos R-R y se expresa la VFC en segundos (s) y la FC en latidos por minuto (p/m). Círculos azules corresponden a los picos R.



Fuente: Rodas, *et al*; 2007).

Existen diferentes métodos para analizar la VFC, que permiten obtener múltiples y variados parámetros. Actualmente, los métodos más utilizados son los que se basan en el dominio del tiempo. Definimos las variables de tiempo como los diferentes parámetros estadísticos que resultan de la medición electrocardiográfica de los intervalos RR normales en el tiempo (Rodas, *et al*; 2008).

1. MATERIALES Y MÉTODOS

1.1 SUJETOS

Treinta ratas macho (*Rattus norvegicus*) más conocida como rata Wistar de tres meses de edad y pesos comprendidos entre 250- 373 g fueron usadas. Estos animales se criaron en el bioterio del laboratorio de Neurociencias y Comportamiento de la Universidad Industrial de Santander. Alojados en grupos de cuatro, en cajas de acero inoxidable con dimensiones (40x30x17cm) y piso con cascarilla de arroz o tamo, el cual se cambia cada tres días garantizando las condiciones higiénicas del medio; una rejilla del mismo material de la caja, la tapa y asegura, a la vez que permite la ubicación de los tarros de agua y comida al libre consumo. Los animales son mantenidos en ciclos de luz/oscuridad de 12 horas cada uno (Mechiel, et al; 1990) empezando luz a las 7 a.m.; a una temperatura promedio de 23 °C, humedad relativa de $66 \pm 5\%$ y poco ruido.

1.2 MANIPULACIÓN Y MARCAJE

Diariamente se ubicó una caja con cuatro ratas en el estante que están en un cuarto separado en la zona de experimentación, con agua y comida al libre consumo y condiciones ambientales controladas similares a las del Bioterio. Cada una de las ratas fue manipulada tres días antes del experimento durante un minuto por el experimentador, el control del tiempo se llevó a cabo con un cronómetro (Procalc), finalizado el minuto se les hizo una marca en la cola con marcador indeleble y se devolvieron al estante dentro de la caja. La manipulación y marcaje se realizó entre las 6:15 y 6:30 p.m.

1.3 PESAJE DE ANIMALES E INSERCIÓN DE ELECTRODOS

Cada caja se sacó del estante y se llevó cuidadosamente al mesón del laboratorio donde se pesaron los animales en una balanza mecánica de triple brazo (Ohaus), una vez pesadas se les ubicó los electrodos.

El cobre se caracteriza por ser uno de los mejores conductores de la electricidad, debido a ello, se extrajo de un alambre eléctrico (ref.: TFF 16) hilos de cobre de 10 cms. Cada hilo se metió en un extremo de una aguja hipodérmica Rymco calibre 23G (25X 0,6 mm), con una pinza quirúrgica se aseguró la aguja y se insertó con el bisel hacia arriba en la piel del animal, después que el hilo atraviesa la piel se retira la aguja y se unen las dos puntas del hilo. Este hilo de cobre funciona como electrodo de la señal bioeléctrica procedente de las membranas celulares del miocardio.

En cada rata se implantaron tres hilos, el primero en la región escapular derecha de la rata, el segundo en la región escapular izquierda, y el tercero en la región lumbar (Delgado, 2008). Esta ubicación corresponde a la convención del triángulo de Einthoven.

Insertados los tres electrodos por rata, se devolvieron a su caja y se llevaron al estante nuevamente. Tanto el pesaje como la ubicación de los hilos de cobre se realizaron entre las 6:30 y 8:30 a.m.

Figura 5. Disposición de electrodos según convenciones de Einthoven en la rata.



Fuente: Autora

1.4 MEDICAMENTOS ADMINISTRADOS

El medicamento usado en este estudio fue diazepam. El vehículo y control para el diazepam fue solución salina al 0.9% (p/v). Las inyecciones se aplicaron intraperitonealmente, el diazepam a una dosis de 2 mg/Kg de peso en un volumen de 1 ml/Kg de peso y la solución salina al 0.9% (p/v) en un volumen de 1 ml/Kg de peso.

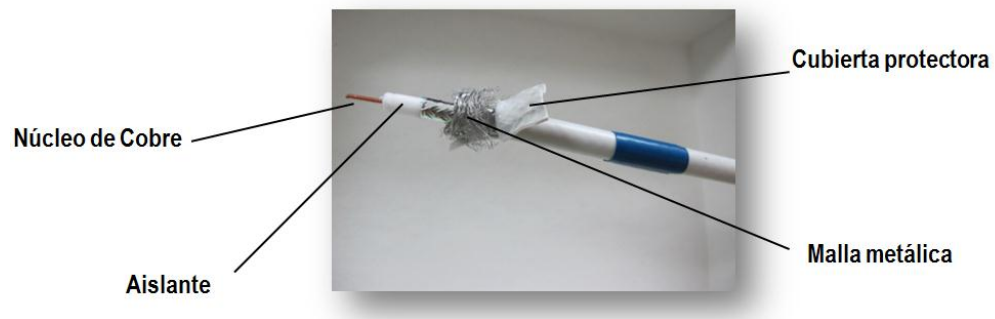
1.5 REGISTRO DEL ECG

Para la toma del registro ECG fue necesario la elaboración de un sistema eléctrico compuesto por tres cables coaxiales (ref.: RG6U) de 6,24 mts de largo, al extremo de los cables se soldaron tres cables de menor tamaño (ref.: TFF 77), de 60 cms, estos cables tienen en sus puntas caimanes, los cuales se conectaron a los electrodos implantados en la rata utilizando adicionalmente un gel conductor para mejorar la conductividad en el contacto de estas partes, se adoptó el color amarillo

para identificar el cable que conecta al electrodo positivo, el color verde que conecta al electrodo negativo y el azul al electrodo a tierra. Al otro extremo de los cables se soldaron tres cables (ref.: AWG 1X14) de 70 cms, terminados en broches metálicos diferenciados por los mismos colores que van conectados al amplificador de señal Power Lab 16/30.

El cable coaxial posee un núcleo de cobre envuelto por un material aislante, además tiene una pieza de metal trenzado, el cual realiza la absorción de ruidos y protege la información que viaja por él y una cubierta de plástico la cual no tiene capacidad de conducción.

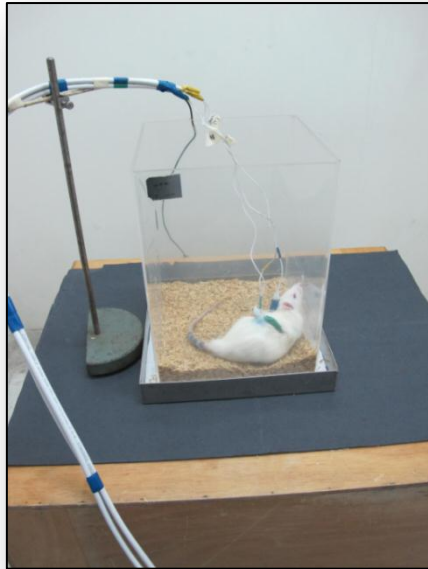
Figura 6. Cable coaxial usado para la toma del ECG.



Fuente: Autora

El registro computarizado se obtuvo mediante el software Lab Chart 6 en un computador (Dell optiplex 740), a una tasa de muestreo de 2 Kilohercios y con un filtro de paso de banda entre 1Hz y 1KHz.

Figura 7. Montaje general del experimento.



Fuente: Autora

1.6 ANÁLISIS DE ECG

Mediante el software LabChart 6 en un computador (Dell Optiplex740) se registró la frecuencia cardíaca a partir de la onda R, la más estable y de mayor amplitud. El análisis consiste en medir el intervalo temporal entre ondas R sucesivas (un ciclo cardíaco), lo que proporciona una medida del período cardíaco de un latido. La disminución de tiempo entre ciclos consecutivos suelen asociarse principalmente a la actividad parasimpática y el aumento de los mismos a la actividad simpática del SNA (Mechiel, *et al*; 1990).

En el programa Excel se realizó el cálculo de las diferencias de los intervalos R-R, además de los otros parámetros estadísticos en el dominio del tiempo, se tomaron los valores que estuvieron por dentro de tres desviaciones estándar del conjunto de datos, los demás fueron descartados porque generalmente correspondían a defectos en la claridad del registro.

1.7 EVALUACIÓN DEL COMPORTAMIENTO

El registro del comportamiento se logró mediante una video-cámara con sensor de infrarrojo, ubicada en un cuarto de la zona experimental a una altura de 2 metros aproximadamente de la caja de plexiglás donde está el animal conectado. En la habitación adyacente se pudo monitorear y grabar de los movimientos de la rata en cada fase del experimento, mediante el editor de video Cyber Link Power Director, en un computador (Dell optiplex 740).

1.8 ANÁLISIS DEL COMPORTAMIENTO

Fue necesario escoger y describir previamente los movimientos corporales a evaluar (Martin y Bateson, 1993).

1.8.1 Quieto. El animal permanece en una posición fija en la caja, aunque mueva la cabeza hacia los lados, olfatee, se acicale o levante la cabeza.

1.8.2 Camina. El animal se desplaza con sus cuatro patas hacia adelante o hacia atrás, también si el animal realiza un giro completo quedando en el mismo lugar.

1.8.3 Levanta. Cuando el animal se levanta sobre sus dos patas traseras, así camine apoyando sus patas delanteras alrededor de la caja de plexiglás.

1.8.4 Escarba. Cuando el animal introduce las patas delanteras o traseras y escarba en el tamo de forma profunda y rápida, así lo haga caminando.

Se midió el número de veces y la duración de cada uno de ellos con el programa PROSTCOM (conde, et al; 2000), a través de cada fase experimental.

1.9 PROCEDIMIENTO

El nivel de iluminación se midió con un luxómetro (YF-172 digital light meter), el cual registró en luz 308 lumen/m² y en oscuridad 000 lumen/m².

Las ratas se asignaron aleatoriamente a cuatro grupos, llamados G1, G2, G3 Y G4, cada grupo con un orden diferente de las fases experimentales excepto la fase llamada basal que fue común para todos y al comienzo de cada experimento. El tiempo de registro del ECG fue de 60 minutos para cada rata en los diferentes grupos.

Se ubicó la rata en una caja de plexiglás de (23x23x33), con piso en acero inoxidable cubierto con cascarilla de arroz (tamo) sobre una plataforma de madera que separa la caja de plexiglás del piso a una altura de 70 cms, se agregó gel electrolítico (Parker ref.: 15-60) a los caimanes electrónicos y a los electrodos antes de conectarlos con el fin de mejorar la conductividad de la corriente eléctrica procedente del animal, se inició el registro del ECG, con su respectiva filmación. Cada uno de los grupos se compone de una fase basal de 10 minutos, pasado este tiempo se aplicó la primera inyección de solución salina, se continuó con cinco minutos de luz y cinco minutos de oscuridad en el orden que lo indicó el grupo, se inyectó con diazepam y se registró 30 minutos en luz u oscuridad según correspondiera, se registró cinco minutos más de la fase anterior y por último cinco minutos en luz si la fase anterior era oscuridad, o luz si la fase era oscuridad.

Mediante el software LabChart6 es posible dejar una marca con el nombre de cada fase en el registro de ECG en tiempo real.

Una vez terminado el registro de la primera rata, se desconectó de los cables y se regresó a la caja junto con las otras ratas, se apagó el video y se grabó con el mismo código la filmación y su registró electrocardiográfico.

Se sometió a prueba cuatro ratas por día entre las 2 p.m. y 6:00 p.m.

Diariamente, antes de iniciar con una nueva caja, se revisaron las conexiones de los cables y se limpiarán con alcohol al 70 % los caimanes de residuos de gel electrolítico y de grasa, también se cambió la cascarilla de arroz (tamo) de la caja de plexiglás.

En total fueron 28 ratas se descartaron dos por problemas técnicos.

Tabla 1. Fases experimentales, tiempos de los diferentes grupos y animales usados en cada grupo.

Fases de una sesión	Fase1	Fase2	Fase3	Fase4	Fase5	Fase6	# animales
Fármaco	Basal	Salina	Dzp				
Minutos de la fase	10	5	5	30	5	5	
Grupo 1	Luz	Luz	Oscuridad	Luz	Luz	Oscuridad	6
Grupo 2	Luz	Oscuridad	Luz	Oscuridad	Oscuridad	Luz	9
Grupo 3	Luz	Luz	Oscuridad	Oscuridad	Oscuridad	Luz	7
Grupo 4	Luz	Oscuridad	Luz	Luz	Luz	Oscuridad	6
Total de animales							28

Fuente: Autora

Tabla 2. Distribución del peso de los animales por grupo experimental.

Grupos	G1	G2	G3	G4
Prom±SD	321,17±24,64	301,22±26,04	314,71±20,87	325,67±35,97
n	6	9	7	6

Fuente: Autora

1.9.1 Legislación bioética. Todos los procedimientos realizados a los animales dentro de este proyecto de investigación, están de acuerdo al estatuto nacional de protección de los animales en la ley 84 de 1989 del Congreso de Colombia, y a la resolución N° 008430 de 1993 del Ministerio de salud, así como a la directiva 2010/63/UE del parlamento europeo y del consejo del 22 de septiembre de 2010 relativa a la protección de animales para fines científicos, también a la aprobación

del comité de ética para proyectos de investigación de la Universidad Industrial de Santander para el proyecto identificado con código CB12005.

1.9.2 Estadísticos. A partir de los registros de ECG exportados a Excel, se identificaron los periodos o tiempos entre cada pico R-R, durante las diferentes fases experimentales o tratamientos a lo largo del registro. En Excel se calculó para cada animal el promedio de la mediana, el rango, y el índice RMSSD en cada fase experimental. Si bien, este abordaje aporta información acerca de las tendencias centrales y de dispersión de los intervalos R-R, la variabilidad individual incluida en el análisis global de los diferentes segmentos, puede “ocultar” diferencias atribuibles a los tratamientos y a características propias de cada animal, por tal motivo, con cada rata, se procedió a realizar un análisis de las diferencias pareadas con respecto al basal de las promedios de las medianas, rangos y RMSSD de cada uno de los animales, de manera que se obtuvieron índices de la proporción en que cada variable cambió con respecto a la misma variable en el segmento basal. Utilizando la siguiente fórmula.

$$(V_{sp} - V_b)/V_b = \textit{Diferencias pareadas respecto al basal}$$

Donde

V_{sp}: Representa el valor de la variable en el segmento problema (por ejemplo en condición de salina - oscuridad ó diazepam - luz) y

V_b: Representa el valor de la misma variable en la fase llamada basal.

Tabla 3. Parámetros de análisis de la VFC en el dominio del tiempo.

Parámetro	Unidad	Definición
R-R	ms	Intervalo entre dos latidos (picos de R en el ECG). Duración de un ciclo cardiaco.
MEDIANA R-R	ms	Representa el valor que divide la muestra de intervalos en frecuencias acumuladas del 50%. Ayuda a identificar la tendencia del efecto global de los tratamientos sobre la frecuencia cardiaca.
RANGO R-R	ms	Se define como la diferencia entre el mayor y el menor intervalo R-R. Informa sobre la variabilidad.
RMSSD	ms	Es la raíz cuadrada del promedio de las diferencias al cuadrado de los intervalos RR sucesivos. Informa sobre las variaciones a corto plazo de la frecuencia cardiaca.

Fuente: Autora

Se calcularon anovas de dos factores para saber si las diferencias son atribuibles a los factores fármaco o iluminación, o a la interacción de los dos. Cuando las anovas mostraron algún nivel de significancia, se realizaron las comparaciones múltiples corregidas mediante el test de Bonferroni.

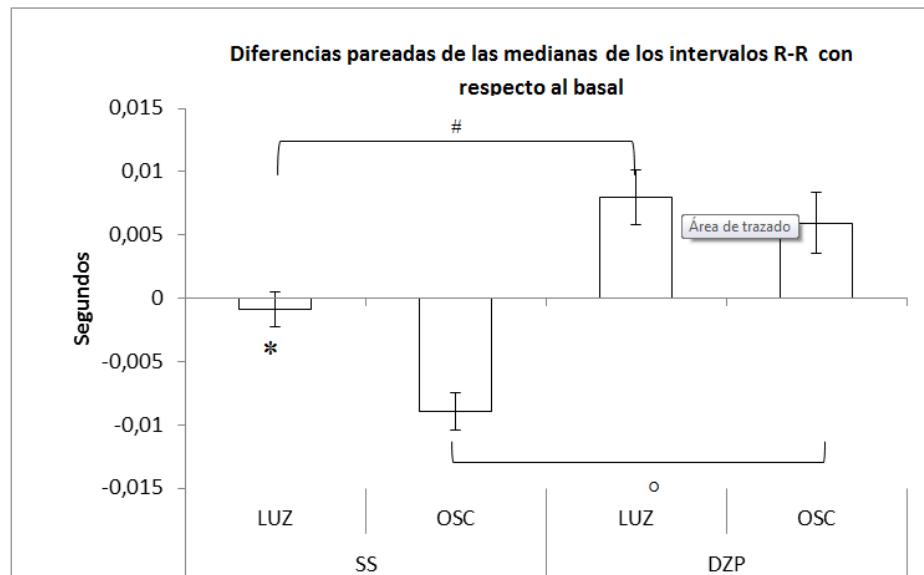
También se realizaron análisis de regresión lineal múltiple buscando estimar la magnitud del efecto de las variables explicatorias (iluminación, fármaco y comportamiento) sobre cada variable del ECG.

2. RESULTADOS

2.1 RESULTADOS ELECTROCARDIOGRAFÍA

Los resultados se agruparon teniendo en cuenta las cinco fases experimentales para la medición del electrocardiograma: Basal, salina (ss) luz, salina (ss) oscuridad, diazepam (Dzp) luz y diazepam (Dzp) oscuridad. Se realizó un análisis de los promedios de las diferencias pareadas de las medianas, rangos y RSSMD de cada fase experimental con respecto al basal en cada animal, con el fin de conocer las diferencias pareadas de los intervalos RR inducidas por cada tratamiento.

Figura 8. Promedio \pm un error estándar de las diferencias pareadas de la mediana de los intervalos R-R con respecto al basal obtenidas de las cuatro fases. *Diferencias significativas entre SS-LUZ y SS-OSC, ° Diferencias significativas entre DZP-OSC y SS-OSC, # Diferencias significativas entre DZP-LUZ y SS-LUZ (Test de Bonferroni, $p < 0,05$).

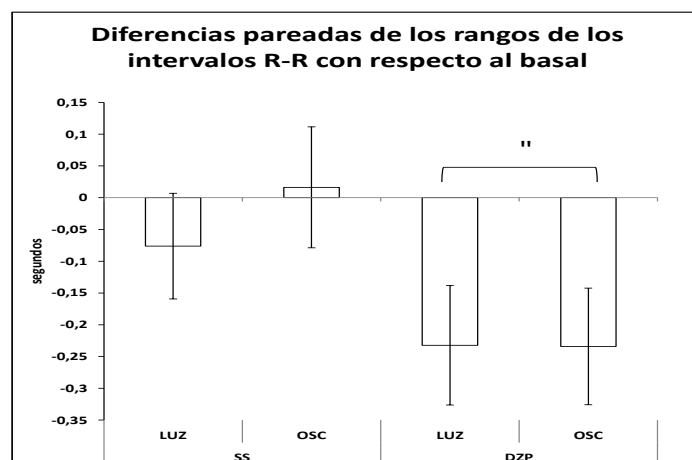


Fuente: Autora

Debido a que la mediana divide en dos partes iguales la distribución de frecuencias de las diferencias pareadas de los intervalos R-R con respecto al basal en la muestra, es por consiguiente útil para representar la tendencia central de los efectos de las diferentes fases experimentales sobre dichos intervalos, mucho más cuando los datos no presentan, como en nuestro caso, una distribución normal. A partir del promedio de las medianas se realizaron las siguientes observaciones.

La figura 8 indica que las diferencias pareadas de los intervalos R-R en la fase de salina oscuridad son más grandes respecto a la fase de salina luz, se deduce que el animal presentó una tendencia hacia la taquicardia bajo oscuridad (disminución de las distancias de los intervalos R-R). Pero al comparar salina oscuridad con diazepam oscuridad, las diferencias pareadas de los intervalos R-R son más grandes en esta última (aumento de las distancias entre los intervalos R-R), lo cual demuestra una tendencia hacia la bradicardia en el animal, que también se evidencia en diazepam luz comparado con salina luz.

Figura 9. El promedio \pm un error estándar de las diferencias pareadas de los rangos de los intervalos R-R con respecto al basal. "Diferencias significativas atribuibles al diazepam comparado con salina independiente del nivel de iluminación, (Test de Bonferroni, $p < 0,05$).

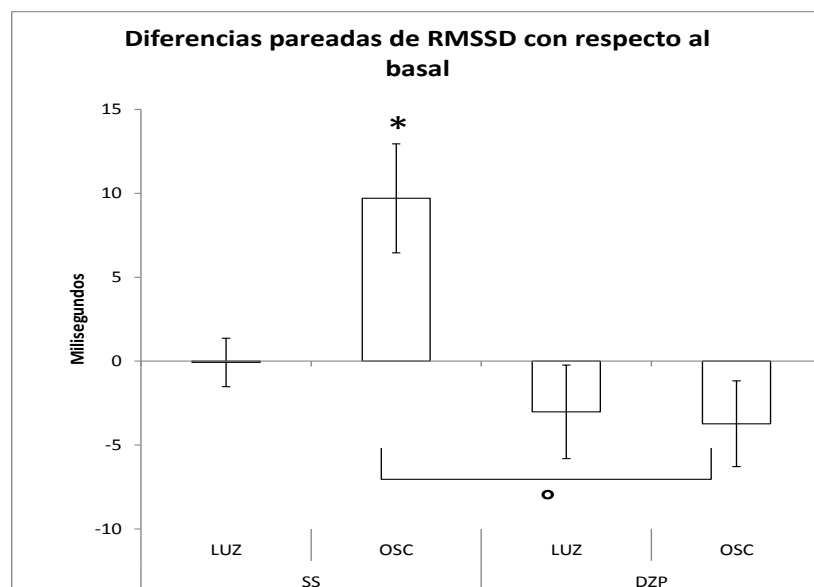


Fuente: Autora

Además de conocer la representatividad de la mediana de las diferencias de los intervalos RR respecto al basal, necesitamos un indicador que de alguna forma, nos cuantifique el grado de separación o dispersión de los valores de esta variable respecto a la mediana en cuestión. Para tal fin hallamos los rangos de las diferencias pareadas de los intervalos R-R respecto al basal durante cada fase experimental en todas las ratas. Esta medida es un indicador de la variabilidad de la frecuencia cardiaca.

La figura 9 señala que hay una disminución de las diferencias pareadas de los rangos de los intervalos R-R con respecto al basal en diazepam independiente de la condición de iluminación, en otras palabras disminuye la variabilidad de la frecuencia cardiaca por efecto del diazepam, en relación a salina luz y oscuridad.

Figura 10. Promedio \pm un error estándar de las diferencias pareadas de RMSSD con respecto al basal. *Diferencias significativas entre SS-LUZ y SS-OSC, °Diferencias significativas entre SS-OSC y DZP-OSC (Test de Bonferroni, $p < 0,05$).



Fuente: Autora

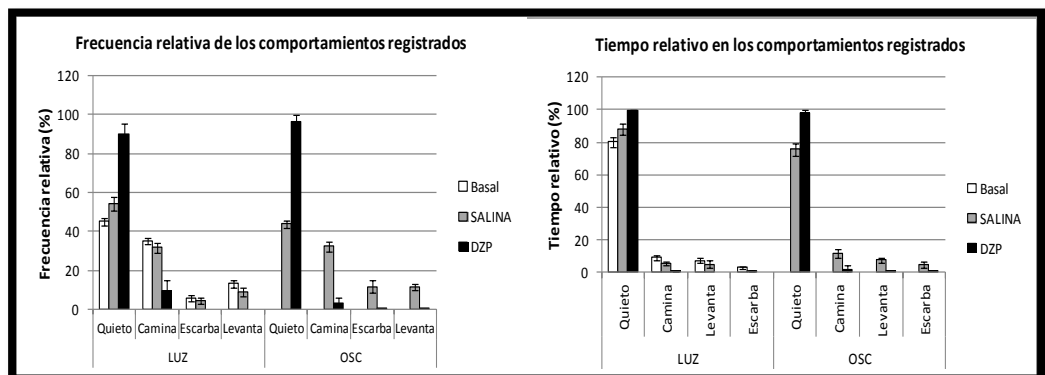
Otro indicador de la variabilidad de la frecuencia cardiaca, pero ahora entre ciclos consecutivos (variabilidad “instantánea” a corto plazo de la frecuencia cardiaca) es el RMSSD, es uno de los estadísticos más importantes en el dominio del tiempo, y representa la raíz cuadrada del valor medio de las diferencias al cuadrado de todos los intervalos R-R sucesivos a lo largo del registro electrocardiográfico.

En la figura 10 se observa que las mayores variaciones de RMSSD con respecto al basal se registran durante la fase salina oscuridad en relación con salina luz, donde no hubo diferencias de este índice con respecto al basal, y también en relación a diazepam oscuridad. En otras palabras la oscuridad se asocia más con los cambios en la variabilidad de la frecuencia cardiaca instantánea a corto plazo que el diazepam.

2.2 RESULTADOS COMPORTAMENTALES

Los resultados de los registros comportamentales, complementan la información procedente de los registros electrocardiográficos, para conocer si los cambios en la variabilidad de la frecuencia cardiaca están siendo afectados por la actividad locomotora.

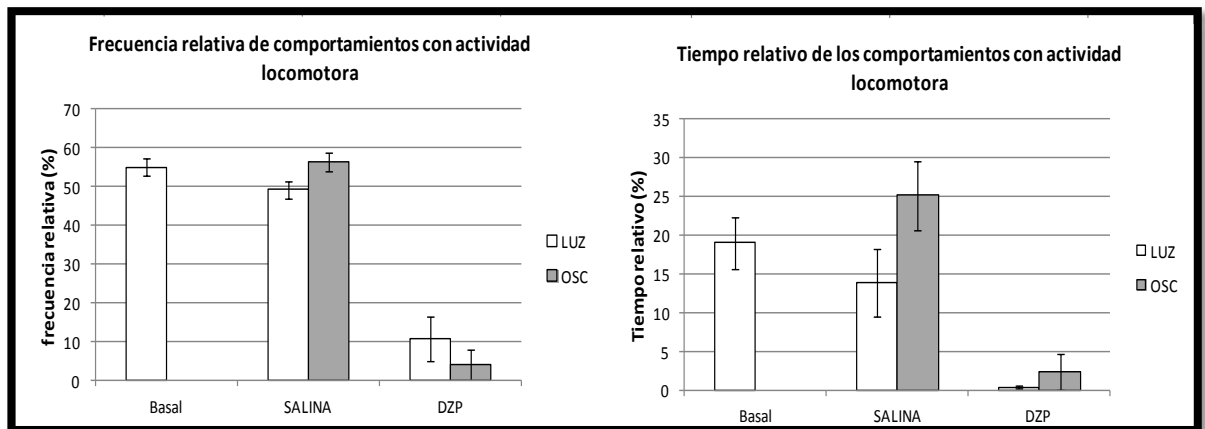
Figura 11. Promedios \pm un error estándar de las frecuencias y tiempos relativos de los comportamientos registrados.



Fuente: Autora

La figura 11 demuestra que los animales permanecieron más tiempo quietos en la fase de diazepam independiente del nivel de iluminación, y se movieron más en las fases basal y salina bajo luz y oscuridad predominantemente caminando, aunque también escarbaron y se levantaron pero en menor porcentaje.

Figura12. Promedios \pm un error estándar de las frecuencias y tiempos relativos con actividad locomotora.



Fuente: Autora

La figura 12 corrobora lo mencionado en el párrafo anterior, mostrando mayor actividad locomotora en las fases basal y salina independientemente del nivel de iluminación, comparado con una clara disminución de la misma en la fase diazepam bajo las mismas condiciones. En este caso, se llamó actividad locomotora a la suma de los comportamientos “camina”, “levanta” y “escarba”.

Con base en estas observaciones comportamentales preliminares, se realizaron análisis de regresiones múltiples lineales buscando identificar en qué medida, los cambios en las variables electrocardiográficas se podrían explicar por los indicadores comportamentales.

Tabla 4. Análisis de regresión lineal múltiple para la mediana R-R con P<0,05.

R-Mediana Adjusted R ² : 0,278			R-Mediana Adjusted R ² : 0,266			R-Mediana Adjusted R ² : 0,342		
variables	coefficients	p-value	variables	coefficients	p-value	variables	coefficients	p-value
intercept	-0,00862583	5,2293E-05	intercept	-0,00855862	7,79E-05	intercept	-0,0074	0,00023515
Iluminación	0,00749165	0,00263269	Iluminación	0,00709991	0,00417789	Iluminación	0,0055	0,01926564
Fármaco	0,00845365	0,0073874	Fármaco	0,01179538	1,008E-05	Fármaco	0,0076	0,00385045
%FA-Camina	-0,00011568	0,15766496	%FA-Escarba	9,8369E-05	0,39113939	%TA-Actividad	-0,00021375	0,00275126

Fuente: Autora

A partir de este análisis de regresión lineal múltiple, observados en la tabla 3, se deduce que los cambios en las medianas de los intervalos R-R se explican por las variables iluminación fármaco junto con el % de la actividad locomotora total respectivamente (en rojo los valores de p-value). El % de camina y el % de escarba no explican los cambios en la mediana de los intervalos.

Tabla 5. Análisis de regresión lineal múltiple para el RMSSD con P<0,05.

RMSSD Adjusted R ² 0,089			RMSSD Adjusted R ² 0,086			RMSSD Adjusted R ² 0,103		
variables	coefficients	p-value	variables	coefficients	p-value	variables	coefficients	p-value
intercept	6,3948	,0082	intercept	6,4527	,0084	intercept	6,2220	,0093
Iluminación	-5,6907	,0472	Iluminación	-5,9060	,0380	Iluminación	-5,3301	,0614
Fármaco	-7,8867	,0314	Fármaco	-6,2080	,0355	Fármaco	-4,6934	,1354
%FA-Camina	-0,0594	,5334	%FA-Escarba	0,0441	,7404	%TA-Actividad	0,1052	,2145

Fuente: Autora

Los cambios en el índice RMSSD se explican por la variables iluminación y fármaco solamente, no se ven afectados ni por el % de camina, ni el % de escarba ni el % total de actividad locomotora.

Tabla 6. Análisis de regresión lineal múltiple para los rangos de los intervalos R-R con $P < 0.05$.

RANGO Adjusted R ² 0,010			RANGO Adjusted R ² 0,016			RANGO Adjusted R ² 0,032		
variables	coefficients	p-value	variables	coefficients	p-value	variables	coefficients	p-value
intercept	-0,0598	,5300	intercept	-0,0708	,4605	intercept	-0,0739	0,4317
Iluminación	-0,0014	,9905	Iluminación	0,0031	,9779	Iluminación	0,0236	0,8341
Fármaco	-0,2342	,1097	Fármaco	-0,1954	,0966	Fármaco	-0,1415	0,2599
%FA-Camina	-0,0007	,8529	%FA-Escarba	0,0037	,4859	%TA-Actividad	0,0045	0,1865

Fuente: Autora

En este orden de ideas, se muestra los resultados para el rango de los intervalos R-R, cuyos cambios no se explican por ninguna de las variables de este análisis

3. DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos a partir del análisis de las diferencias pareadas de las medianas de los intervalos R-R respecto al basal, muestran que hay diferencias estadísticamente significativas entre salina oscuridad y salina luz asociadas con el nivel de iluminación, en estas condiciones el animal presentó una tendencia hacia la disminución de las distancias de los intervalos R.R, lo cual se relaciona con el aporte autonómico simpático y/o a una “retirada” parasimpática (Borell, *et al*; 2007) pero, las diferencias significativas entre la fase salina oscuridad y salina luz con diazepam oscuridad y diazepam luz, se asocian al fármaco, es decir, a la benzodiacepina administrada, y por ende los animales en esta fase aumentan la duración de los intervalos R-R, lo cual nos indicaría el aporte de tipo autonómico parasimpático (Sgoifo, *et al*; 1999).

Estas tendencias se ven mejor reflejadas en el análisis de las diferencias pareadas de los rangos con respecto al basal, donde se evidenció claramente la disminución de la variabilidad de la frecuencia cardiaca en diazepam oscuridad y diazepam luz asociados al fármaco como tal, de manera independiente al nivel de iluminación. Esta disminución de la variabilidad de la frecuencia cardiaca, se relaciona con un mayor aporte de tipo parasimpático y con el efecto bradicardico en los sujetos evaluados.

El análisis con las diferencias pareadas respecto al basal del RMSSD, muestra como la oscuridad se asocia con mayores cambios en la variabilidad instantánea de la frecuencia cardíaca a corto plazo, asociadas posiblemente con la actividad del sistema vagal (Bernfried, *et al*; 1996). En este caso se compara salina oscuridad con salina luz, donde no se presentaron cambios con respecto a este parámetro de la variabilidad, pero la variabilidad instantánea en salina oscuridad disminuye drásticamente en diazepam oscuridad, sugiriendo un menor efecto de tipo parasimpático por parte del fármaco. Es interesante notar que no hubo

cambios en la variabilidad instantánea de la frecuencia cardiaca en salina luz comparada con su fase basal o de control, donde se ha encontrado que la inyección intraperitoneal de salina tiene un efecto ansiogénico (Lapin, 1995).

Finalmente los análisis de regresión lineal múltiple los cuales incluyen (además de las variables anteriormente mencionadas) los registros de los comportamientos de los animales durante cada fase de registro, nos confirman que, las tendencias de la variabilidad de la frecuencia cardiaca son afectados por los niveles de iluminación, el fármaco y la actividad locomotora en general, pero la variabilidad instantánea de la frecuencia cardiaca (RMSSD) sólo se ve afectada por la iluminación y el fármaco. Los análisis de regresión lineal también indican que en los fenómenos analizados en esta investigación hay muchas más variables que deben ser evaluadas ya que el R ajustado no supera el 50 %.

4. CONCLUSIONES

Sobre la base de los datos obtenidos y su posterior procesamiento estadístico se puede concluir que la condición de salina-oscuridad produce cambios electrocardiográficos y comportamentales en los animales mostrando taquicardia o disminución de las distancias de los intervalos R-R, lo que produce el aumento de la variabilidad de la frecuencia cardiaca, asociadas a una mayor actividad locomotora. Por el contrario los animales expuestos a las condiciones de diazepam muestran la misma tendencia de las variables electrocardiográficas y comportamentales tanto bajo la condición de luz como de oscuridad, mostrando una tendencia a la bradicardia o aumentos de las distancias de los intervalos R-R, lo que conlleva a una disminución de la variabilidad de la frecuencia cardiaca, asociadas a un menor actividad locomotora.

Los animales bajo la condición de salina-luz parecen no diferenciarse de la condición basal, lo cual resulta favorable para experimentos en los que los animales controles reciben salina como solución vehículo.

Los análisis de regresión lineal múltiple también nos indican que asociados a este fenómeno hay muchas más variables que deben ser evaluadas, no obstante el conocimiento que el RMSSD fue afectado por iluminación y fármaco sin actividad locomotora, aporta información útil para el diseño de futuros experimentos enfocados en comprender los agentes “activadores” de la ansiogenicidad de las ratas asociadas a los brazos abiertos del LCE.

BIBLIOGRAFÍA

BERTOGLIO, L.J.; CAROBREZ, AP. Behavioral profile of rats submitted to session 1- session 2 in the elevated plus-maze during diurnal/nocturnal phases and under different illumination conditions. *Behavioural Brain Research*. 2002. 132: 135-143. (está en físico)

BLANCHARD, C. BLANCHARD, R. Defensive behaviors, fear, and anxiety. En R.J Blanchard, D.C Blanchard, G. Griebel and D. Nutt (Eds.), *Handbook of Anxiety and Fear*. 2008. pp. 81-92. Amsterdam, Netherlands: Elsevier.

BORELL, E.V; LANGBEI, J; DESPRÉS, G; HANSEN, S; LETERRIER, C; et al. Heart rate variability as a measure of autonomic regulation of cardiac activity for assessing stress and welfare in farm animals — A review. *Physiology & Behavior*. 2007. 92, 293–316.

CASTELAR, J; y GUERRA, P. El proceso de obtención de los índices psicofisiológicos. En J. Castelar; y P. Guerra (Eds.), *Introducción a la psicofisiología clínica*. 2009. pp. 54-56. Granada: Ediciones Pirámide. ESTÁ EN FÍSICO

CONDE, C.A; V. COSTA, and C. TOMAZ. PROSTCOM: Un conjunto de programas para registro y procesamiento de registro de datos comportamentales en investigaciones de fisiología y farmacología. *Biotemas*. 2000. 13: 145-159.

DE ARAÚJO, MA; MENEGHINI, L; APARECIDA, ML; MESQUITA, F.R; SAKAE, DY; et al. An approach to evaluate the ability of rats to discriminate levels of illumination in the plus maze test: Effects of scopolamine. *Behavioural Brain Research*. 2007. 180, 86-94. Está en físico

DELGADO, H.D. *Efectos del bloqueo del sistema nervioso autónomo periférico sobre la memoria emocional y la ansiedad evaluadas en el laberinto en cruz elevado*. 2008. Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, Colombia.

DEPINO, A. M; & GROSS, C. Simultaneous assessment of autonomic function and anxiety-related behavior in BALB/c and C57BL/6 mice. *Behavioural Brain Research*. 2006. 177, 254-260.

GARCÍA, AMB; CÁRDENAS, FP; MORATO, S. Effect of different illumination levels on rat behavior in the elevated plus maze. *Physiology & Behavior*. 2005. 85, 265-270.

GRAEFF, F. Neuroanatomy and neurotransmitter regulation of defensive and related emotions in mammals. *Brazilian j Med Biol Res*. 1994. 27, 811-829. Es de Diana

GRIEBEL G, MOREAU JL, JENCK F, MARTIN JR, MISSLIN R. Some critical determinants of the behavior of rats in the elevated plus-maze. *Behavioural Processes*. 1993. 29:37-48. Es de Diana

GUYTON, A; HALL, J. Tratado de Fisiología médica. En A. Guyton; y A. Hall (Eds.), *Músculo cardíaco: El corazón como bomba y la función de las válvulas cardíacas*. pp. 113.

JONES N, KING SM. Influence of circadian phase and test illumination on pre-clinical models of anxiety. *Physiology & Behavior*. 2001. 72:99-106. De Diana

LAPIN, I.P. Only Controls: Effect of Handling, Sham Injection, and Intraperitoneal Injection of saline on Behavior of Mice in an Elevated Plus-Maze. *Journal of pharmacologic and Toxicological Methods*. 1995. 34, 73-77. Está en Físico

LUCA, J.I. Actividad de la piel. En J.I. Luca (Ed.), *Psicofisiología: Fundamentos metodológicos*. 1997. (pp. 221-226). Madrid: Ediciones Pirámide. físico

MARTÍN, P; y BATESON, P. Preliminary stomeasurement. En P. Martín; y P. Bateson (eds.), *Measuring behaviour: An introductory guide*. 1993. (pp. 56-61). Cambridge: Cambridge universitypress. físico

MARTÍNEZ, DP. *Patrón de activación de sustratos neuronales (evidenciado por la expresión de la proteína Fos) en ratas Wistar expuestas a dos niveles de iluminación ambiental en el Laberinto en Cruz Elevado bajo el efecto de una benzodiazepina*. Tesis de maestría no publicada, Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, Colombia. 2013.

MECHIEL, S; KOOLHASS, J; SCHUURMAN, T; TRABER; J; y BOHUS, B. Anxiolytics and stress-induced behavioural and cardiac responses: a study of Diazepam and ipsapirone (TVX Q 7821). *European journal of pharmacology*. 1990. 179, 393-401.FÍSICO

MIGLIARO, E.R; CANETTI, R; CONTRERAS, P; HAKAS, M; EIREA, G; et al. Procesamiento de señales para el estudio de la Variabilidad de la Frecuencia Cardíaca. *Procesamiento de señales e imágenes: Teoría y aplicaciones*. 2001. 189-204.

PEREIRA, LO; DA CUNHA, IC; NETO, JM; PASCHOALINI, MA; & FARIA, MS. The gradient of luminosity between open/enclosed arms, and not the absolute level of Lux, predicts the behaviour of rats in the plus maze. *Behavioural Brain Research*. 2004. 159, 55-61. Físico

RODAS, G; PEDRET, C; RAMOS, C; CAPDEVILLA, L. Heart rate variability: Definition measurement and clinical relation aspects (1). *Archivos de medicina del deporte*. 2008. 123, 41-47.

SGOIFOA, A. KOOLHAASA, J. De BOERA, S; MUSSOB, E; STILLIB, B; et al. Social stress, autonomic neural activation, and cardiac activity in rats. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*. 1999. 23, 915-923.

ZHANG, W. N; MURPHY, C.A; FELDON, J. Behavioural and cardiovascular responses during latent inhibition of conditioned fear: measurement by telemetry and conditioned freezing. *Behavioural Brain Research*. 2004. 154, 199–209.

ZICKMANN, B; HOFMANN, C; POTTKAMPER, C. KNOTHE, C, BOLDT, J; et al. Changes in Heart Rate Variability During Induction of Anesthesia With Fentanyl and Midazolam. *Journal of Cardiothoracic and Vascular Anesthesia*. 1996. 110, 609-613.

ANEXOS

ANEXO A. Resultados de Regresión lineal múltiple de la mediana R-R.

Tabla 1. Con respecto al % de camina

Regression Analysis						
	R ²	0,306				
	Adjusted R ²	0,278				
	R	0,553				
	Std. Error	0,011				
	80 observations					
	3 predictor variables					
	R-Mediana is the dependent variable					
ANOVA table						
Source	SS	df	MS	F	p-value	
Regression	0,0038	3	0,0013	11,14	3,84E-06	
Residual	0,0085	76	0,0001			
Total	0,0123	79				
Regression output						
variables	coefficients	std. error	t (df=76)	p-value	confidence interval	
intercept	-0,0086	0,0020	-4,288	,0001	95% lower	95% upper
Luz	0,0075	0,0024	3,110	,0026	-0,0126	-0,0046
INYECC	0,0085	0,0031	2,753	,0074	0,0027	0,0123
%FA-Camina	-0,00011568	0,00008106	-1,427	,1577	-0,00027712	0,00004577

Tabla 2. Con respecto al % de escarba

Regression Analysis						
	R ²	0,294				
	Adjusted R ²	0,266				
	R	0,542				
	Std. Error	0,011				
	80 observations					
	3 predictor variables					
	R-Mediana is the dependent variable					
ANOVA table						
Source	SS	df	MS	F	p-value	
Regression	0,0036	3	0,0012	10,54	7,12E-06	
Residual	0,0087	76	0,0001			
Total	0,0123	79				
Regression output						
variables	coefficients	std. error	t (df=76)	p-value	confidence interval	
intercept	-0,0086	0,0020	-4,177	,0001	95% lower	95% upper
Luz	0,0071	0,0024	2,954	,0042	-0,0126	-0,0045
INYECC	0,0118	0,0025	4,732	1,01E-05	0,0023	0,0119
%FA-Escarba	0,00009837	0,00011405	0,862	,3911	0,0068	0,0168
					-0,00012879	0,00032553

Tabla 3. Con respecto al % de Tiempo de actividad total

Regression Analysis						
	R ²	0,367				
	Adjusted R ²	0,342				
	R	0,606				
	Std. Error	0,010				
	80 observations					
	3 predictor variables					
	R-Mediana is the dependent variable					
ANOVA table						
Source	SS	df	MS	F	p-value	
Regression	0,0045	3	0,0015	14,67	1,25E-07	
Residual	0,0078	76	0,0001			
Total	0,0123	79				
Regression output						
variables	coefficients	std. error	t (df=76)	p-value	confidence interval	
intercept	-0,0074	0,0019	-3,861	,0002	95% lower	95% upper
Luz	0,0055	0,0023	2,391	,0193	-0,0112	-0,0036
INYECC	0,0076	0,0026	2,982	,0039	0,0009	0,0101
%TA-Actividad	-0,00021375	0,00006905	-3,095	,0028	0,0025	0,0127
					-0,00035129	-0,00007622

ANEXO B. Resultados de la regresión lineal múltiple del RMSSD

Tabla 1. Con respecto al % de camina

Regression Analysis						
	R ²	0,124				
	Adjusted R ²	0,089				
	R	0,352				
	Std. Error	12,408				
	80 observations					
	3 predictor variables					
	RMSSD is the dependent variable					
ANOVA table						
Source	SS	df	MS	F	p-value	
Regression	1.651,1662	3	550,3887	3,58	,0178	
Residual	11.700,5383	76	153,9545			
Total	13.351,7045	79				
Regression output						
variables	coefficients	std. error	t (df=76)	p-value	confidence interval	
intercept	6,3948	2,3557	2,715	,0082	1,7031	11,0865
Luz	-5,6907	2,8210	-2,017	,0472	-11,3091	-0,0723
INYECC	-7,8867	3,5965	-2,193	,0314	-15,0497	-0,7237
%FA-Camina	-0,0594	0,0949	-0,626	,5334	-0,2485	0,1297

Tabla 2. Con respecto al % de escarba

Regression Analysis						
	R ²	0,120				
	Adjusted R ²	0,086				
	R	0,347				
	Std. Error	12,431				
	80 observations					
	3 predictor variables					
	RMSSD is the dependent variable					
ANOVA table						
Source	SS	df	MS	F	p-value	
Regression	1.607,9680	3	535,9893	3,47	,0202	
Residual	11.743,7365	76	154,5228			
Total	13.351,7045	79				
Regression output						
variables	coefficients	std. error	t (df=76)	p-value	confidence interval	
intercept	6,4527	2,3838	2,707	,0084	1,7050	11,2004
Luz	-5,9060	2,7969	-2,112	,0380	-11,4764	-0,3355
INYECC	-6,2080	2,9005	-2,140	,0355	-11,9849	-0,4310
%FA-Escarba	0,0441	0,1327	0,333	,7404	-0,2202	0,3084

Tabla 3. Con respecto al % de Tiempo de actividad total

Regression Analysis						
	R ²	0,137				
	Adjusted R ²	0,103				
	R	0,370				
	Std. Error	12,313				
	80 observations					
	3 predictor variables					
	RMSSD is the dependent variable					
ANOVA table						
Source	SS	df	MS	F	p-value	
Regression	1.828,4335	3	609,4778	4,02	,0104	
Residual	11.523,2710	76	151,6220			
Total	13.351,7045	79				
Regression output						
variables	coefficients	std. error	t (df=76)	p-value	confidence interval	
intercept	6,2220	2,3328	2,667	,0093	1,5758	10,8682
Luz	-5,3301	2,8073	-1,899	,0614	-10,9213	0,2611
INYECC	-4,6934	3,1096	-1,509	,1354	-10,8867	1,4998
%TA-Actividad	0,1052	0,0840	1,252	,2145	-0,0622	0,2726

ANEXO C. Resultados de la regresión lineal múltiple respecto a los rangos R-R

Tabla 1. Con respecto al % de camina

Regression Analysis						
R ²	0,047					
Adjusted R ²	0,010					
R	0,218					
Std. Error	0,499					
	80 observations					
	3 predictor variables					
	R-Rango is the dependent variable					
ANOVA table						
Source	SS	df	MS	F	p-value	
Regression	0,9443	3	0,3148	1,26	,2931	
Residual	18,9400	76	0,2492			
Total	19,8843	79				
Regression output						
variables	coefficients	std. error	t (df=76)	p-value	confidence interval	
intercept	-0,0598	0,0948	-0,631	,5300	-0,2486	0,1290
Luz	-0,0014	0,1135	-0,012	,9905	-0,2274	0,2247
INYECC	-0,2342	0,1447	-1,618	,1097	-0,5224	0,0540
%FA-Camina	-0,0007	0,0038	-0,186	,8529	-0,0083	0,0069

Tabla 2. Con respecto al % de escarba

Regression Analysis						
R ²	0,053					
Adjusted R ²	0,016					
R	0,231					
Std. Error	0,498					
	80 observations					
	3 predictor variables					
	R-Rango is the dependent variable					
ANOVA table						
Source	SS	df	MS	F	p-value	
Regression	1,0571	3	0,3524	1,42	,2428	
Residual	18,8271	76	0,2477			
Total	19,8843	79				
Regression output						
variables	coefficients	std. error	t (df=76)	p-value	confidence interval	
intercept	-0,0708	0,0954	-0,742	,4605	-0,2609	0,1193
Luz	0,0031	0,1120	0,028	,9779	-0,2199	0,2262
INYECC	-0,1954	0,1161	-1,683	,0966	-0,4267	0,0359
%FA-Escarba	0,0037	0,0053	0,700	,4859	-0,0069	0,0143

Tabla 3. Con respecto al % de Tiempo de actividad total

Regression Analysis

R² 0,069
 Adjusted R² 0,032
 R 0,262
 Std. Error 0,494
 80 observations
 3 predictor variables
 R-Rango is the dependent variable

ANOVA table

Source	SS	df	MS	F	p-value
Regression	1,3686	3	0,4562	1,87	,1414
Residual	18,5156	76	0,2436		
Total	19,8843	79			

Regression output

variables	coefficients	std. error	t (df=76)	p-value	confidence interval	
					95% lower	95% upper
intercept	-0,0739	0,0935	-0,790	-0,0739	-0,2602	0,1123
Luz	0,0236	0,1125	0,210	0,0236	-0,2005	0,2478
INYECC	-0,1415	0,1246	-1,135	-0,1415	-0,3898	0,1068
%TA-Actividad	0,0045	0,0034	1,333	0,0045	-0,0022	0,0112