



Casa abierta al tiempo
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
METROPOLITANA
Unidad Xochimilco

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD XOCHIMILCO



DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
LICENCIATURA EN QUÍMICA FARMACÉUTICA BIOLÓGICA

**Validación y estandarización de dos modelos murinos para
evaluar depresión**

Proyecto genérico:

Efecto neuroprotector de la administración simultánea de fenobarbital y metalotioneína sobre el daño neuronal y las crisis inducidas por el ácido kaínico en ratas.

Asesores internos: Dra. Tomasa Verónica Barón Flores

Dr. Luis Alfonso Moreno Rocha.

Alumno: Rodolfo Ignacio Romero

Matrícula: 2173066265

Lugar y periodo de realización: Laboratorio de Neurofarmacología Molecular en la Unidad Interdisciplinaria de Docencia, Investigación y Servicio de la Universidad Autónoma Metropolitana unidad Xochimilco, del 25 de Julio de 2022 al 25 de enero de 2023.

Índice

1. Introducción	3
2. Objetivo general	3
3. Objetivos específicos	3
4. Antecedentes	3
4.1 Suspensión de la cola y nado forzado en murinos	4
4.1.1 Prueba de suspensión de la cola	4
4.1.2 Prueba de nado forzado	4
4.1.3 TST como alternativa FST	4
4.2 Depresión y ansiedad	5
4.3 Validación de las pruebas de TST y FST	6
5. Metodología	6
5.1 Selección de artículos	6
5.2 Prueba de suspensión de la cola en ratones	7
5.3 Prueba de nado forzado en ratones	7
6. Actividades realizadas	8
7. Objetivos y metas alcanzados	8
8. Resultados	8
8.1 Prueba de suspensión de la cola	8
8.1.1 Sesión 1	9
8.1.2 Sesión 2	10
8.1.3 Sesión 3	12
8.1.4 Sesión 4	13
8.1.5 Sesión 5	14
9. Conclusiones	15
10. Recomendaciones	16
11. Referencias	16

1. INTRODUCCIÓN.

Las pruebas de nado forzado y suspensión de la cola en ratones son métodos ampliamente utilizados en la evaluación, así como en la detección de compuestos potencialmente antidepresivos. Ambas pruebas parten del mismo concepto en el que el murino se somete a estrés para posteriormente colocarlo en una situación en la que sienta la necesidad de escapar, pero sin tener la capacidad de hacerlo. Estas pruebas se pueden dividir en dos etapas, la primera en la que el ratón lucha por escapar denominada etapa de agitación, pero, al verse incapacitado, eventualmente deja de hacerlo y se resigna, etapa denominada inmovilidad. Sin embargo, a pesar de ser pruebas clásicas, en estudios recientes, se sugiere que la prevalencia acumulada en investigaciones preclínicas irreproducibles en ciencias de la vida, supera el 50 % de los resultados publicados, por ello, en este trabajo se realizará la validación y estandarización de ambos métodos con el fin de determinar su reproducibilidad y repetibilidad para la evaluación de fármacos con efectos antidepresivos.

2. OBJETIVO GENERAL.

Estandarizar y validar los modelos murinos de nado forzado y suspensión de la cola para evaluar depresión.

3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

- Realizar la prueba de suspensión de la cola en murinos.
- Evaluar la reproducibilidad y repetibilidad del modelo de suspensión de la cola en ratones.
- Realizar la prueba de nado forzado en ratones.
- Evaluar el efecto antidepresivo de un fármaco mediante los modelos TST y FST.
- Hacer una curva dosis respuesta

4. ANTECEDENTES.

4.1 Suspensión de la cola y nado forzado en murinos.

Suspensión de la cola (TST por sus siglas en inglés) y nado forzado en murinos (FST por sus siglas en inglés).

Estas pruebas son complementarias entre sí, utilizándose como modelos para la detección y estimación de los efectos de fármacos depresores del sistema nervioso central, ansiolíticos y antidepresivos¹.

Generalmente, la TST tiene una duración de seis minutos a diferencia de FST debido a que se ha observado que los ratones tienden a manifestar inmovilidad antes que en la FST².

4.1.1 Prueba de suspensión de la cola.

La prueba de suspensión de la cola en ratones es ampliamente utilizada para la detección de compuestos potencialmente antidepresivos, así como para evaluar los síntomas no motores en los modelos animales de desórdenes del movimiento como la enfermedad de Parkinson o de Huntington¹.

Esta prueba consiste en fijar únicamente la cola de los ratones a un soporte fijo de tal forma que no escapen y no puedan apoyarse a superficies cercanas, para ello, se requiere de una caja o sistema de suspensión, cinta, una barra de suspensión, un cronómetro, un dispositivo de video, generador de ruido blanco, artículos de limpieza, y, opcionalmente, tubos de policarbonato².

4.1.2 Prueba de nado forzado.

Esta es una prueba antecesora a TST, propuesta por Porsolt *et. al.* a finales de los años 70's e inicios de los 80's. En esta prueba, se evalúan los mismos aspectos que en TST; la diferencia radica en que, en este caso, el ratón es colocado en agua, viéndose obligado a nadar, pero sin la posibilidad de escapar³.

Este experimento se realiza con ayuda de un cilindro transparente, el cual, es llenado con agua hasta el punto en dónde el murino deja de tocar la superficie inferior del cilindro, pero sin la posibilidad de escapar⁴.

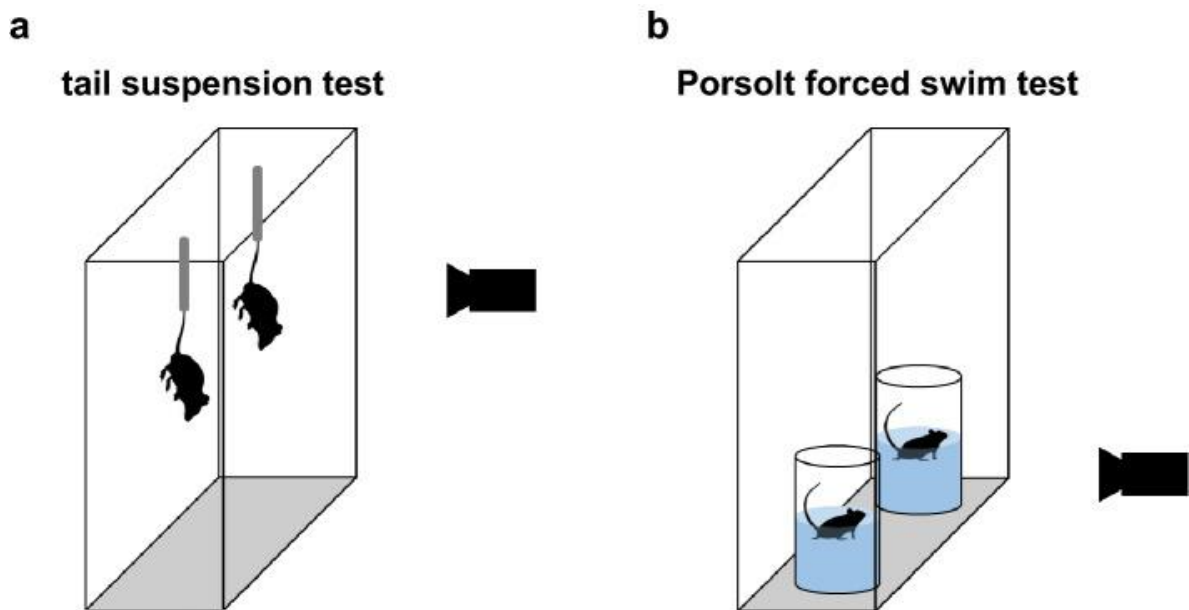


Figura 1. Diagrama de los experimentos; Suspensión de la cola de ratón y prueba de nado forzado⁴

4.1.3 TST como alternativa a FST.

Se puede considerar a la TST como una versión alternativa a la prueba de nado forzado. Ambas pruebas parten de la misma idea y se han convertido en pruebas

clásicas y comunes para evaluar el efecto que tienen los fármacos, generalmente antidepresivos, en ratas o ratones¹.

Steru *et. al.* propusieron por primera vez la técnica de TST como un método innovador para la detección de antidepresivos en ratones. En ambas pruebas, la duración total de la prueba se puede dividir en dos etapas:

Agitación: Periodo en el que el murino se encuentra en constante movimiento tratando de escapar. Durante este periodo, el murino puede realizar diferentes movimientos, dependiendo de la prueba; por ejemplo, cuando se trata de TST, el murino se puede balancear hacia un lado o hacia el otro simulando el movimiento pendular, se puede mover en círculos o de adelante hacia atrás, tratará de alcanzar su propia cola, y de alcanzar a sostenerse en alguna superficie cercana incluido su propio cuerpo. Por otro lado, en FST, el murino nadará hacia un lado o hacia el otro, generalmente, en círculos, y tratará de escalar por el recipiente.

Inmovilidad: Periodo que transcurre desde que el ratón deja de intentar escapar^{2,5}.

Entre los fármacos que Steru *et. al.* estudió para la validación de TST se encuentran varios psicofármacos como anfetamina, atropina, viloxazina, entre otros, y se determinó que los antidepresivos, los psicoestimulantes y la atropina disminuyeron el periodo de inmovilidad⁵.

4.2 Depresión y ansiedad.

Durante los últimos años, el campo de estudio de enfermedades mentales ha ido incrementando gradualmente, dejando lentamente de ser afecciones subestimadas y tomándose más en serio, principalmente, aquellas que afectan a gran parte de la población como la depresión y la ansiedad; condiciones mentales que pueden llegar a ser altamente debilitantes e incapacitantes, además, suelen ir de la mano, desencadenando una a la otra⁶.

Por un lado, la depresión se caracteriza por una tristeza, falta de ánimo o interés por actividades cotidianas o actividades que, comúnmente, se disfrutarían y, aunque en algunos casos podría desaparecer en cuestión de semanas, en otros, el problema podría agravarse a tal grado de que el individuo que la padece comienza a cambiar drásticamente de sentir o pensar⁷.

Por otro lado, la ansiedad es la reacción al estrés, aunque de manera persistente. Se caracteriza por la sensación permanente de aprensión o temor. A pesar de ser una reacción al estrés, y éste, a su vez, es una respuesta física o mental a una causa externa que sucede una vez o varias veces durante un lapso prolongado, en ocasiones la ansiedad podría no desaparecer con el estímulo estresor, y comienza a interferir con la vida diaria, afectando al cuerpo de otras formas, desencadenando problemas

para dormir, debilitando el sistema inmune e incluso, provocando otras enfermedades mentales⁸.

Debido al creciente enfoque, se han requerido de modelos que permitan evaluar el comportamiento de individuos administrados con antidepresivos y ansiolíticos, por lo que también, se ha requerido de la validación de dichos métodos. Desde que se observó la reducción de la inmovilidad en murinos administrados con antidepresivos, éstos se han establecido en el estudio de la validez de ambas pruebas, como la fluoxetina y, principalmente, la Imipramina^{4,5,9}.

La Imipramina pertenece a la clase de los antidepresivos tricíclicos. Ha demostrado ser efectivo en la reducción de la inmovilidad tanto en TST como en FST⁷. Actúa inhibiendo la recaptación de serotonina y norepinefrina dentro de la sinapsis del sistema nervioso central (SNC), aumentando así, los niveles de dichos neurotransmisores¹⁰.

La Imipramina se metaboliza en dos principales metabolitos que tienen actividad antidepresiva igual a la de Imipramina; desipramina y 2-hidroxidesipramina¹¹.

La fluoxetina pertenece a la clase de antidepresivos inhibidores selectivos de la recaptación de la serotonina (ISRS). Actúa, justamente, inhibiendo la recaptación de serotonina, elevando los niveles de ésta en el cerebro¹².

4.3 Validación de las pruebas de FST y TST.

A pesar de lo ya mencionado y que, aunque ambos métodos son aceptados como modelos bien establecidos, aún queda mucho por estudiar, puesto que, no se ha ahondado mucho en las diferentes formas de llevar a cabo los experimentos. La variabilidad que hay entre observadores, el momento, el lugar o si existe alguna alteración al llevar a cabo el experimento con varios animales al mismo tiempo o de forma individual, así como la reproducibilidad, son aspectos que aún deben ser analizados cuidadosa y estrictamente para reafirmar la confianza que se le tienen a ambas pruebas^{1,4}.

En los últimos años, se ha prestado especial atención a la reproducibilidad y validez de los métodos, debido a las limitaciones que se presentan al momento de trabajar con modelos animales, tales como la imposibilidad de replicar síntomas humanos. Además de que, en recientes estudios, se sugiere que la prevalencia acumulada en investigaciones preclínicas irreproducibles en ciencias de la vida, supera el 50 % de los resultados publicados⁹.

5. Metodología.

5.1 Selección de artículos.

Realizar una revisión bibliográfica para la recopilación de antecedentes en la base de datos PubMed, aplicando un filtro de 5 años de antigüedad y de

investigaciones originales (pioneras en las pruebas que se describen), que incluyan aspectos importantes sobre las pruebas de nado forzado y suspensión de la cola en ratones, así como la validación de ambos métodos.

5.2 Prueba de suspensión de cola en ratones.

- Distinguir de entre dos grupos de animales un grupo control y un grupo de estrés e identificar a cada ratón como lo determina la NOM-062-ZOO-1999.
- Aclimatar a los animales durante un periodo establecido en la zona dónde se realiza la prueba.
- Realizar sesiones de estrés durante un periodo preestablecido limitando la movilidad de los ratones del grupo estrés dentro de tubos falcón perforados para una adecuada ventilación durante un predeterminado lapso y limitando el alimento.
- Montar el sistema de suspensión de la cola en ratones con ayuda de dos soportes universales, dos pinzas de tres dedos y una barra de suspensión.
- Colocar el sistema de video con ayuda de una cámara de video y un tripié para evitar el movimiento y la inestabilidad durante la grabación.
- Cortar un fragmento largo de cinta y sujetar un extremo en la cola de cada ratón de tal forma que la cinta no se resbale.
- Sujetar el otro extremo de la cinta a la barra de suspensión de tal forma que el ratón quede suspendido bocabajo y accionar el cronómetro.
- Analizar a cada ratón determinando el tiempo de agitación e inactividad que hubo a lo largo de 6 minutos.
- Construir las gráficas comparando el tiempo de agitación y de inmovilidad de cada grupo y realizar el análisis estadístico univariante y prueba t para evaluar la reproducibilidad y validez de esta prueba.
- Administrar solución saturada de carbón activado vía oral.
- Realizar el sacrificio y la recolección de muestras intestinales y evaluar y comparar el tránsito intestinal que tuvo el carbón activado entre los grupos control y estresado.

5.3 Prueba de nado forzado en ratones.

- Distinguir entre dos grupos de animales; un control y un estresado.
- Identificar a cada ratón de acuerdo con la NOM-062-ZOO-1999.
- Realizar pruebas de estrés durante un periodo preestablecido, limitando el alimento y el agua al grupo control.
- Montar el sistema de video apoyándose con una videocámara y un tripié.
- Llenar el cilindro de vidrio a dos cuartas partes de su capacidad.
- Colocar a la rata en el recipiente y accionar el cronómetro.
- Determinar el tiempo de agitación de cada grupo.

- Construir gráficos que ayuden a la interpretación y comparación de los resultados de cada grupo y realizar el análisis estadístico univariante y prueba t para evaluar la reproducibilidad y validez de esta prueba.
- Administrar solución saturada de carbón activado vía oral.
- Realizar el sacrificio y la recolección de muestras intestinales y evaluar y comparar el tránsito intestinal que tuvo el carbón activado entre los grupos control y estresado.

6. Actividades realizadas.

- ❖ Limpieza de zona de trabajo, material y equipos utilizados.
- ❖ Prueba de suspensión de la cola en ratones.
- ❖ Cuantificación y construcción de gráficas que facilitan la observación y el análisis de resultados
- ❖ Análisis y observación sobre la prueba de suspensión de la cola.
- ❖ Administración vía oral de carbón activado a ratones.
- ❖ Sacrificio, disección y recolección de muestras cerebrales y gastrointestinales.

7. Objetivos y metas alcanzados.

Durante el ejercicio del servicio social se lograron acumular diferentes conocimientos prácticos y teóricos cómo la manipulación de murinos; la administración vía oral y parenteral de fármacos; la correcta ejecución de la prueba de suspensión de la cola en ratones; diferentes modelos de pruebas conductuales; la recolección de muestras biológicas; tipos de sacrificio y fármacos utilizados para este fin; entre otras actividades que ayudaron a desarrollar una mejor visión sobre el campo farmacológico.

8. Resultados.

8.1 Prueba de suspensión de la cola

Se realizaron 5 sesiones de suspensión de la cola de ratón, comparando un grupo control contra un grupo previamente estresado. Éste último, fue sometido a estrés limitando su movilidad dentro de tubos Falcón, modificados con orificios para una adecuada aireación a lo largo de diferentes sesiones en los que iba aumentando gradualmente el tiempo de limitación de movilidad. Cada grupo variaba en la cantidad de ratones. Cada ratón fue cronometrado durante 6 minutos, midiendo el tiempo que permanecían agitados e inactivos, y obteniendo el promedio de cada grupo a fin de determinar si el grupo sometido previamente a estrés se deprimían antes que los del grupo control, obteniéndose los siguientes resultados:

Sesión	Tiempo de actividad del grupo control en segundos	Tiempo de actividad del grupo estresado en segundos
1	196	223
2	229	207
3	186	223
4	202	238
5	280	259

Lo ideal es que el grupo estresado se deprima antes que el grupo control, debido a que, al someterse a previo estrés, el ratón habrá perdido el sentido de supervivencia y se quedaría inmóvil por más tiempo, sin embargo, en la mayoría de las sesiones (1, 3 y 4), el grupo control se deprimió antes que el grupo estresado, mientras que sólo se obtuvo el resultado esperado en las sesiones 2 y 5. Sin embargo, en ningún ensayo hubo una diferencia significativa entre ambos grupos, por lo que se puede intuir que el proceso de estrés no es el adecuado o no se ha realizado correctamente, además de que existieron contratiempos e inconvenientes que dificultaron el progreso del experimento.

Los resultados y conclusiones de cada sesión se detallan a continuación.

8.1.1 Sesión 1.

Durante esta sesión, se realizó la prueba de suspensión de la cola con la cepa C57/BL6 (Imagen 1). Sin embargo, debido a la naturaleza ansiosa de esta cepa, los resultados se han ignorado deliberadamente al ser animales no aptos para esta prueba.

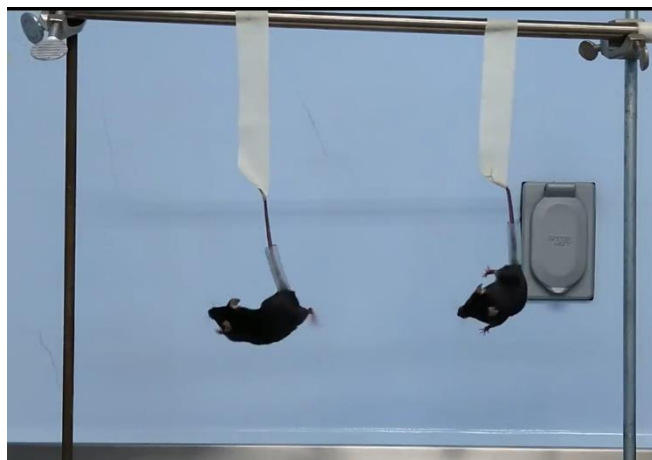
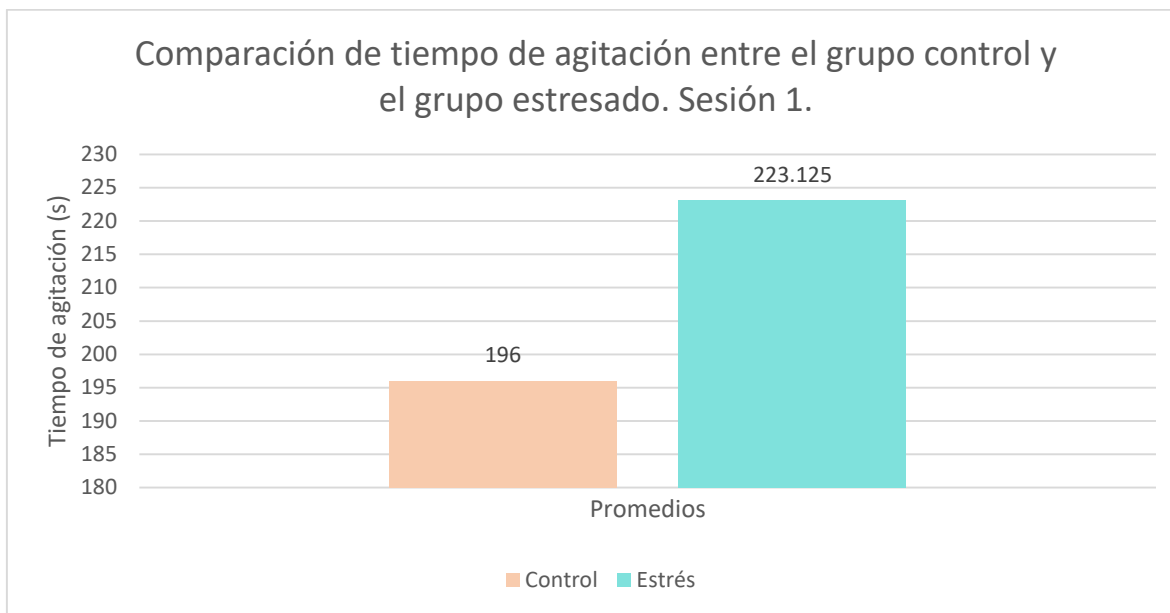


Imagen 1. Sesión 1 de prueba de suspensión de la cola con la cepa C57/BL6



Prueba t para dos muestras suponiendo varianzas desiguales		
	<i>Agitación control</i>	<i>Agitación estrés</i>
Media	196	223.125
Varianza	3364	6186.410714
Observaciones	5	8
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	11	
Estadístico t	-0.713296976	
P(T<=t) una cola	0.245259214	
Valor crítico de t (una cola)	1.795884819	
P(T<=t) dos colas	0.490518428	
Valor crítico de t (dos colas)	2.20098516	

Análisis de varianza de un factor				
RESUMEN				
<i>Grupos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>
Agitación control	5	980	196	3364
Agitación estrés	8	1785	223.125	6186.410714

ANÁLISIS DE VARIANZA						
<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	2263.894231	1	2263.894231	0.438732429	0.521370816	4.844335675
Dentro de los grupos	56760.875	11	5160.079545			
Total	59024.76923	12				

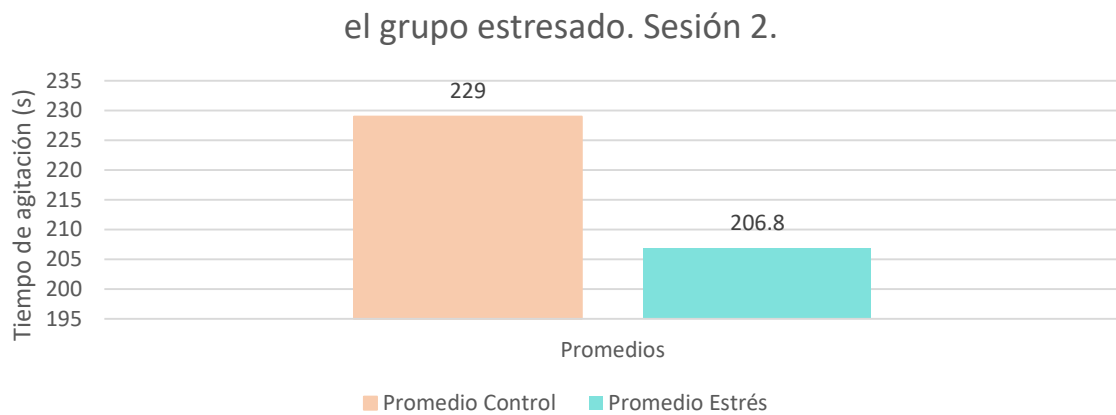
8.1.2 Sesión 2.

Durante esta sesión, la cepa C57/BL6 fue reemplazada por la cepa BALB/c (fig. 2), una cepa de naturaleza más tranquila, que permitió dar certeza y seguridad para no descartar el experimento por animales inadecuados. El proceso de estrés previo al que se sometió el grupo estresado fue a lo largo de una semana, aumentando cada

día 30 minutos las sesiones de inmovilidad. Se analizaron un total de 9 ratones; 4 del grupo control y 5 del grupo de estrés. A pesar de que las mediciones del tiempo de agitación fueron las esperadas, el análisis estadístico no arrojó diferencias significativas.



Figura 2. Sesión 2 de prueba de suspensión de la cola con la cepa BALB/c



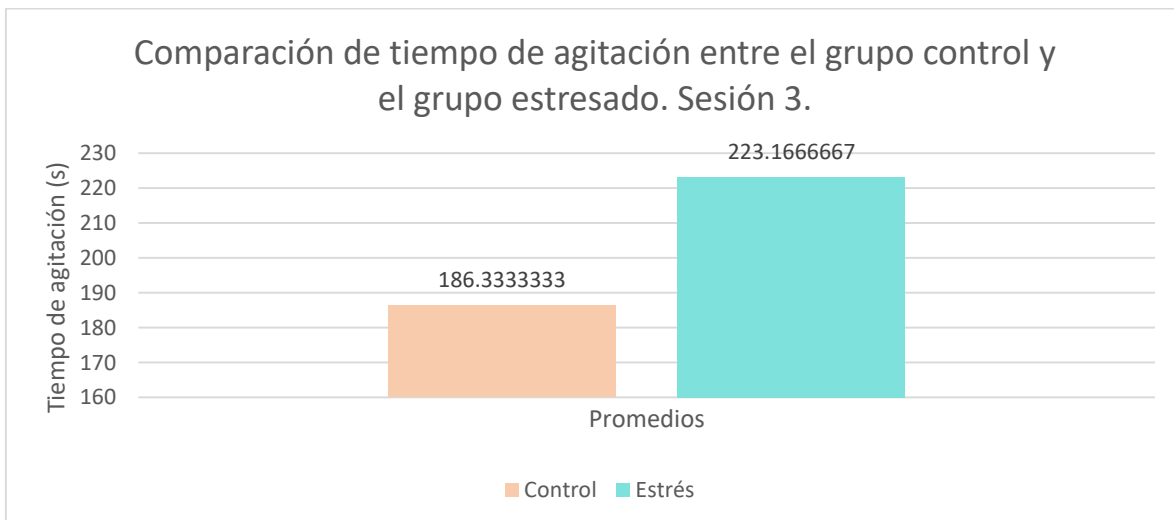
Prueba t para dos muestras suponiendo varianzas desiguales		
	<i>Agitación control</i>	<i>Agitación estresado</i>
Media	229	206.8
Varianza	2616	3535.7
Observaciones	4	5
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	7	
Estadístico t	0.601729878	
P(T<=t) una cola	0.283162118	
Valor crítico de t (una cola)	1.894578605	
P(T<=t) dos colas	0.566324235	
Valor crítico de t (dos colas)	2.364624252	

Análisis de varianza de un factor				
RESUMEN				
<i>Grupos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>
Agitación control	4	916	229	2616
Agitación estresado	5	1034	206.8	3535.7

ANÁLISIS DE VARIANZA						
<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	1095.2	1	1095.2	0.34861851	0.573455792	5.591447851
Dentro de los grupos	21990.8	7	3141.542857			
Total	23086	8				

8.1.3 Sesión 3.

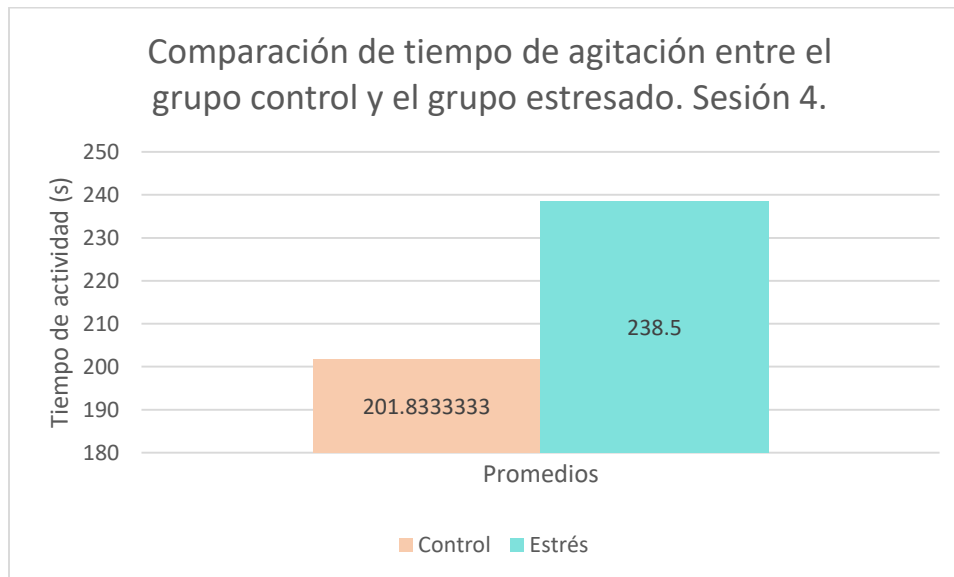
En esta sesión se analizaron un total de 12 ratones, dividiendo cada grupo en 6, sin modificar las sesiones de estrés previo para el grupo correspondiente. Los resultados de las mediciones de ambos grupos fueron inesperados, debido a que el grupo estresado obtuvo mayores tiempos de agitación.



Análisis de varianza de un factor						
RESUMEN						
Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza		
Agitación control	6	1118	186.3333333	4561.866667		
Agitación estresado	6	1339	223.1666667	1862.566667		
ANÁLISIS DE VARIANZA						
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	4070.083333	1	4070.083333	1.267063762	0.28660793	4.964602744
Dentro de los grupos	32122.16667	10	3212.216667			
Total	36192.25	11				

8.1.4 Sesión 4.

En esta sesión nuevamente se analizaron 6 ratones por cada grupo, fue modificado el periodo de previo estrés, con un total de tres semanas, incrementando gradualmente, partiendo de 30 minutos y hasta 2 h. Pero, el error se mantuvo y nuevamente el grupo estrés fue mayormente activo.



Prueba t para dos muestras suponiendo varianzas desiguales		
	<i>Control</i>	<i>Estrés</i>
Media	201.8333333	238.5
Varianza	3904.966667	3729.1
Observaciones	6	6
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	10	
Estadístico t	-1.027943114	
P(T<=t) una cola	0.164099307	
Valor crítico de t (una cola)	1.812461123	
P(T<=t) dos colas	0.328198613	
Valor crítico de t (dos colas)	2.228138852	

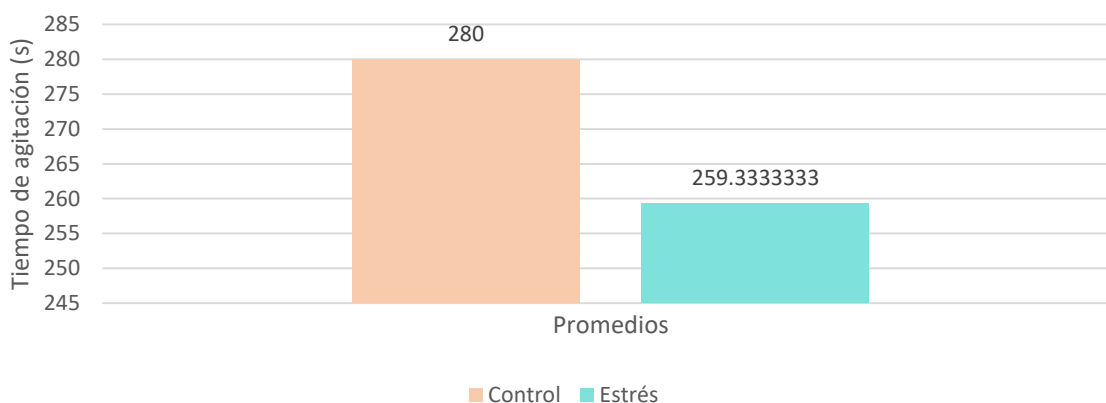
RESUMEN				
<i>Grupos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>
Agitación Control	6	1211	201.8333333	3904.97
Agitación Estresado	6	1431	238.5	3729.1

ANÁLISIS DE VARIANZA						
<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	4033.333333	1	4033.333333	1.05667	0.328198613	4.964602744
Dentro de los grupos	38170.33333	10	3817.033333			
Total	42203.66667	11				

8.1.5 Sesión 5.

Durante esta sesión, el número de animales se mantuvo, pero el proceso de estrés previo se modificó nuevamente, por lo que se llevó a cabo durante 2 semanas, con el mismo régimen de tiempo (30 minutos – 2 h). Finalmente, las mediciones del tiempo de agitación favorecieron el experimento, obteniendo mayor agitación en el grupo control. Sin embargo, las diferencias siguen sin ser significativas.

Comparación de tiempo de agitación entre el grupo control y el grupo estresado. Sesión 5.



Prueba t para dos muestras suponiendo varianzas desiguales			
	Agitación control	Agitación estrés	
Media	280	259.3333333	
Varianza	3435.2	2074.666667	
Observaciones	6	6	
Diferencia hipotética de las medias	0		
Grados de libertad	9		
Estadístico t	0.681986088		
P(T<=t) una cola	0.256207441		
Valor crítico de t (una cola)	1.833112933		
P(T<=t) dos colas	0.512414881		
Valor crítico de t (dos colas)	2.262157163		
Agitación control		Agitación estrés	
Nivel de confianza(95.0%)	61.50803074	Nivel de confianza(95.0%)	47.80022863

Análisis de varianza de un factor				
RESUMEN				
Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
Agitación control	6	1680	280	3435.2
Agitación estrés	6	1556	259.3333	2074.67

ANÁLISIS DE VARIANZA						
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	1281.333333	1	1281.333333	0.4651	0.5107342	4.964602744
Dentro de los grupos	27549.33333	10	2754.933333			
Total	28830.66667	11				

9. Conclusiones.

A lo largo de las sesiones de TST, se realizaron varios cambios en la metodología para poder descartar los errores que se presentaron, sin embargo, aún faltan cosas por corregir y replantear, puesto que en cada sesión hubo resultados no esperados, principalmente, el tiempo de agitación de los grupos estresados, el cuál fue mayor al tiempo de los grupos control, esto podría deberse a dos motivos principalmente; la predisposición del grupo estresado a las sesiones previas de estrés y a un exceso de interacción con el grupo control. Es decir, se sabe que los ratones suelen comunicarse entre ellos y aprender cuando son sometidos a un proceso regularmente, debido a esto, el grupo control ya estaba acostumbrado a las sesiones previas de estrés, por lo que aprendieron que, al final, saldrían ilesos, obteniendo el efecto contrario que se espera, por lo que se explicaría por qué obtuvieron menores índices de agitación. Por otro lado, el exceso de interacción del personal con los animales podría estresar demás al grupo control, lo que supone mayores índices de agitación en este grupo. Aunado a lo anterior mencionado, el hacinamiento es otro problema que presentaron ambos grupos. En cada sesión los animales de cada grupo, tanto hembras como machos, fueron puestos todos juntos en una transportadora, y, al ser de naturaleza gregaria, los ratones compiten por el dominio del espacio, la comida y el agua, lo que explicaría por qué las diferencias no son significativas.

Por otro lado, las pruebas de nado forzado tuvieron que ser canceladas debido a que los animales no fueron autorizados por el bioterio de la unidad.

10. Recomendaciones.

- Evitar la manipulación e interacción prolongada de ambos grupos de ratones, a fin de no estresarlos de forma similar.
- Reducir el tiempo de inducción de previo estrés para evitar el acondicionamiento de los ratones a las sesiones y así no aumente el periodo de actividad durante la prueba de suspensión de la cola.
- Mantener estrictos regímenes de acondicionamiento, como temperatura, alimentación e hidratación exclusivos para cada grupo.
- Evitar el hacinamiento.
- Separar hembras y machos.

11. Referencias.

1. Nandi A., Virmani G., Barve A., Marathe S. DBscorer: An Open-Source Software for Automated Accurate Analysis of Rodent Behavior in Forced Swim Test and Tail Suspension Test. *eNeuro*. 2021; 8(6) 1-10 Doi: 10.1523/ENEURO.0305-21.2021 (2021)
2. Can A., Dao D.T., Terrillion C.E., Piantadosi S.C., Bhat S., Gould T.D. The tail Suspension Test. *J. Vis. Exp.* 2012 (59), e3769, Doi: 10.3791/3769
3. Porsolt RD, Bertin A, Jalfre M. Behavioral despair in mice: a primary screening test for antidepressants. *Arch Int Pharmacodyn Ther.* 1977 Oct;229(2):327-36. PMID: 596982.

4. Ueno H, Takahashi Y, Murakami S, Wani K, Matsumoto Y, Okamoto M, Ishihara T. Effect of simultaneous testing of two mice in the tail suspension test and forced swim test. *Sci Rep.* 2022 Jun 2;12(1):9224. doi: 10.1038/s41598-022-12986-9. PMID: 35654971; PMCID: PMC9163059.
5. Steru L., Chermat R., Thierry B., Simon P. The tail suspension test: A new method for screening antidepressants in mice. *Psychopharmacology.* 1985; 85: 367-370. Doi: 10.1007/BF00428203
6. Beurel E, Toups M, Nemeroff CB. The Bidirectional Relationship of Depression and Inflammation: Double Trouble. *Neuron.* 2020 Jul 22;107(2):234-256. doi: 10.1016/j.neuron.2020.06.002. Epub 2020 Jun 17. PMID: 32553197; PMCID: PMC7381373.
7. Departamento de salud y servicios humanos de los Estados Unidos. Depresión. Institutos Nacionales de la salud. NIH. 2021; 21-MH-8079S
8. Departamento de salud y servicios humanos de los Estados Unidos. ¡Estoy tan estresado! Hoja informativa. Institutos Nacionales de la salud. NIH. 2021; 20-MH-8125S
9. Stukalin, Y., Lan, A., Einat, H. Revisiting the validity of the mouse tail suspension test: Systematic review and meta-analysis of the effects of prototypic antidepressants. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews.* 2020; 112: 39-47. Doi: 10.1016/j.neubiorev.2020.01.034
10. LiverTox: Clinical and Research Information on Drug-Induced Liver Injury [Internet]. Bethesda (MD): National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases; 2012-. Imipramine. 2018 Apr 25. PMID: 31643220.
11. Drugs and Lactation Database (LactMed®) [Internet]. Bethesda (MD): National Institute of Child Health and Human Development; 2006-. Imipramine. 2022 Apr 18. PMID: 30000239.
12. LiverTox: Clinical and Research Information on Drug-Induced Liver Injury [Internet]. Bethesda (MD): National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases; 2012-. Fluoxetine. [Updated 2018 Feb 2].