



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y
ZOOTECNIA**

**GUÍA DE APOYO PARA LA REALIZACIÓN DE
PRUEBAS CONDUCTUALES DE AGRESIÓN Y
ANSIEDAD EN RATONES**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA**

PRESENTA:

DIEGO LÓPEZ OROZCO

ASESORAS:

MVZ. MARICELA ORTEGA VILLALOBOS

QFB. FRANCISCA PEREZ SEVERIANO



Ciudad Universitaria, Cd. Mx., 2023



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

DEDICATORIAS

Quiero dedicar este trabajo de tesis:

A mi madre Blanca Estela Orozco por todo su apoyo durante esta travesía que su hijo decidió empezar hace tiempo, dándome ánimos y motivarme siempre a ser mejor.

A mi padre Artemio López por apoyarme a seguir adelante con mis estudios y permitirme crecer en ese ámbito.

A mis hermanas Jessyca, Andrea y Ángeles que siempre han estado ahí conmigo, viendo como su hermano y apoyándome a su manera siempre en días donde necesitaba una distracción.

A mis sobrinos Leo y Quetzalli que llegaron durante este tiempo y me han enseñado que uno puede volver a ser creativo e inspirador si se da un tiempo para jugar y divertirse aún en días malos.

A todos mis amigos (y fututos colegas) durante la carrera que se quedaron conmigo aun cuando no fui la mejor persona para todos ellos, pero que sin duda sacaron la mejor versión de mí. Principalmente a Arin que somos como hermanos pero más cercanos, a Diana que me ha enseñado a yolear en la vida, Beto que me enseñó que se puede llegar lejos si te lo propones, a Irais que sabe que con nuestra determinación y carácter hemos conseguido cosas increíbles a pesar de las adversidades, a Ali que hemos visto cumplir nuestros sueños paso a paso mientras describimos nuestra vida con canciones de Taylor Swift, a Lorna, Jess, Ale, Gaby, Constanza, Luis, Rebe, Liz y todos los demás que me faltan nombrar pero con quien pase momentos irrepetibles durante la carrera.

A mi amiga y esposa de trabajo Aimee y mi amigo Samuel que han estado conmigo en todos estos años y que hemos visto nuestras vidas cambiar a lo largo de este tiempo.

A todo el equipo de taekwondo cachorros de prepa 2, que a lo largo de esta travesía me dieron fuerza para no rendirme jamás.

Por último, dedico este trabajo a todos aquellos animales que me permitieron llevar a cabo este trabajo y forjarme como el profesionalista que soy el día de hoy.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a la Dra. Francisca Pérez Severiano y al laboratorio de Neurofarmacología Molecular y Nanotecnología (LNFM y N) del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía "MNS" por recibirme con las puertas abiertas y permitirme realizar este trabajo durante todo este tiempo, apoyándose incondicionalmente a lo largo de estos años y dándome libertad de aportar parte de mi conocimiento para la mejora de los trabajos en el laboratorio, este trabajo resulto gracias a la confianza que tuvieron en mí.

A todos mis compañeros del LNFM y N: Especialmente a Qutezalli y Adriana por alentarme a terminar este trabajo cuando pensaba que no podría más, también a Abraham, Marian y Pablo por compartirme todos sus conocimientos en estos años y enseñarme cosas nuevas para poder formarme como un profesional.

A la Dra. Maricela Ortega Villalobos por aceptarme desde hace tiempo y darme toda su experiencia, paciencia y conocimientos para llevar a cabo este trabajo, a pesar de todas las dificultades que pase, jamás me dejo solo y eso me motivo a seguir adelante.

A la Dra. Anne Sisto por todos sus comentarios, gracias a ello supe que este trabajo había valido la pena.

Al Dr. Miguel Ángel Martínez por sus palabras de aliento y su apoyo para seguir adelante en esta área de los animales de laboratorio, sus consejos me hicieron ver que estoy tomando el camino correcto.

A la Dra. Marisol Rivera por permitirme tener una de las mejores practica en mi carrera y por todos sus consejos durante la realización de este trabajo.

A la Dra. Anayantzin Heredia por todas las clases que me dio y que me hicieron darme cuenta que el mundo de los animales de laboratorio es muy enriquecedor, este trabajo surgió gracias a esa motivación y se complementó muy bien con todos sus comentarios.

A la maestra Ma. De Lourdes Roque Hernández, gracias a ella decidí formar parte del mundo de la investigación desde antes de iniciar mi carrera universitaria, sin duda alguna no sería el profesional que soy hoy en día si no fuera por ella y sus clases.

A mis amigos de la UAT en Reynosa por permitirme enseñarles acerca del mundo e los animales de laboratorio, lo que me inspiro a realizar este trabajo.

CONTENIDO

	Páginas
RESUMEN	1
Introducción	1
El comportamiento como respuesta	2
El papel de la neuroetología en los estudios del comportamiento	3
Pruebas conductuales en la neuroetología.....	3
Selección y clasificación de pruebas conductuales.....	4
Revisión sistemática.....	5
Principales pruebas utilizadas en los diversos tipos de estudios de neurociencias:	5
Pruebas de agresión	5
Pruebas de ansiedad.....	8
El ratón como modelo de comportamiento en la investigación	11
Estereotipias en ratones	13
Recomendaciones de manejo no aversivo durante la realización de pruebas conductuales con ratones.....	13
Técnica de manejo con tubos	15
Enriquecimiento ambiental	16
Análisis de la información.....	18
Pruebas de ansiedad	18
Características generales del comportamiento de tipo ansioso en ratones de laboratorio.....	18
Comportamiento ansioso en ratones de laboratorio durante las pruebas.....	20
Pruebas de ansiedad en ratones	23
Prueba de luz/obscuridad	23
Aspectos generales.....	23
Fundamento etológico	24
Consideraciones antes de efectuar la prueba	26
Materiales requeridos.....	27
Fase de preparación.....	28

Fase de evaluación.....	30
Fase de final de la prueba.....	31
Prueba de enterramiento de canicas	32
Aspectos generales.....	32
Fundamento etológico	33
Consideraciones antes de efectuar la prueba	33
Materiales requeridos.....	34
Fase de preparación.....	35
Fase de evaluación.....	37
Fase final de la prueba	39
Pruebas de agresión.....	42
Características generales de la conducta agresiva	42
Comportamiento de tipo agresivo en ratones de laboratorio.....	45
Intención.....	46
Ritualización	47
Pre-escalación/agresión mediada	48
Agresión escalada.....	49
Pruebas de agresión en ratones.....	50
Arena neutral.....	50
Aspectos generales.....	50
Fundamento etológico	51
Consideraciones antes de efectuar la prueba	52
Materiales requeridos.....	52
Fase de preparación.....	53
Fase de evaluación.....	55
Fase final de prueba.....	55
Prueba Intruso/Residente	57
Aspectos generales.....	57
Fundamento etológico	58
Consideraciones antes de efectuar la prueba	59
Materiales	60
Fase de preparación.....	60
Fase de evaluación.....	61
Fase final de la prueba	62
Prueba de dominancia en tubo.....	63

Aspectos generales.....	63
Fundamento etológico	64
Consideraciones antes de efectuar la prueba	64
Materiales:.....	65
Fase de habituación/entrenamiento.....	66
Fase de evaluación.....	68
Fase de final de la prueba.....	69
Conclusiones.....	70
Anexos	72
Referencias.....	73

RESUMEN

LÓPEZ OROZCO DIEGO. Guía para la realización de pruebas conductuales de agresión y ansiedad en ratones (bajo la dirección de: MVZ. Maricela Ortega Villalobos y QFB. Francisca Pérez Severiano).

El estudio del comportamiento es de suma importancia en el área de las neurociencias, gracias a que permite contrastar hipótesis y encontrar explicaciones relacionadas con el desarrollo del comportamiento, afectaciones en las diversas vías y mecanismos fisiológicos cuando uno o más factores particulares son modificados o bien caracterizar el comportamiento de una especie en particular. Desde este punto de vista, la realización de pruebas conductuales en modelos animales como los ratones ha permitido obtener resultados, procurando que el comportamiento a estudiar sea etológicamente relevante, fácilmente accesible sin la necesidad estímulos y condicionamientos previos, garantizando su bienestar y cuidado. La realización de pruebas conductuales requiere de preparación para que los procedimientos puedan ser practicados de forma que existan pocas alteraciones en los resultados, es en este punto donde el papel de los médicos veterinarios zootecnistas toma relevancia, gracias a que sus conocimientos sobre cuidado, comportamiento y bienestar animal les permite brindar asesorías y capacitación en estos temas, por lo que el presente trabajo se propone a ofrecer material didáctico para servir como referencia para la formación de futuros médicos veterinarios interesados en participar en esta área, además de incluir formas para una mejor ejecución de pruebas conductuales de frecuente utilización en estudios de neurociencias, para lograr dichos objetivos se realizó una recopilación de información relevante por medio de buscadores académicos (PubMed, Elsevier, etc.) y con la colaboración del Laboratorio de Neurofarmacología Molecular y Nanotecnología se proporcionan imágenes y videos ilustrativos que ilustran la realización y evaluación de las pruebas conductuales en ratones.

Introducción

El estudio del comportamiento animal y sus componentes, al igual que muchos otros fenómenos en la naturaleza, ha sido objetivo de investigaciones en diversos campos de la ciencia. Históricamente, el interés científico para el estudio detallado del comportamiento animal se inicia en el siglo XX, con el surgimiento del conductismo y la etología. La primera de estas dos vertientes fue adoptada por los psicólogos de la época, quienes estudiaban la conducta bajo condiciones y ambientes controlados, siguiendo la teoría del condicionamiento clásico planteada por Pavlov, como base para buscar la objetividad en el análisis de las respuestas expresadas por los animales (1). Sin embargo dicha vertiente recibió críticas y fue cuestionada por generar una metodología rígida y la obtención de resultados que dejaban de lado importantes factores que moldean la conducta, como son diversos ambientes del hábitat natural de los animales y sus interacciones con el mismo (2).

Por su lado, la etología como vertiente para el estudio del comportamiento, surgió a partir de los trabajos de Niko Tinbergen, Konrad Lorenz y Karl von Frisch. Estos autores describieron los principios del enfoque etológico para estudiar el comportamiento (3), caracterizaron esta vertiente para tratar de responder a alguna de las cuatro cuestiones fundamentales del comportamiento: el mecanismo/causalidad inmediata (causas), el desarrollo ontogénico (ontogenia), la historia filogenética (evolución) y el significado adaptativo (función) (4). El enfoque etológico impactó de manera significativa la forma en que se estudiaba la conducta, ya que buscaba que esta fuera estudiada en condiciones similares a como se expresaría en su hábitat natural, evitando en la medida de lo posible la perturbación por parte del experimentador (5). De esta manera se discrepaba de las investigaciones conductistas, en las que se buscaba controlar todas las variables posibles e inducir el comportamiento por medio de estímulos, dejando de lado cuestiones relacionadas con la expresión de las conductas típicas de la especie estudiada.

Por los diversos datos que permite obtener, hoy en día el enfoque etológico es el más comúnmente elegido en los estudios de comportamiento animal, ya que incluso permite profundizar en el análisis de los resultados obtenidos sobre las bases conductistas, lo cual ofrece una complementariedad que enriquece el conocimiento (6)(5)(7)(8). Actualmente, se considera a la etología como una ciencia consolidada encargada de estudiar el comportamiento animal (9).

El comportamiento como respuesta

Se ha definido al comportamiento como el conjunto de acciones que realiza un organismo vivo para interactuar con su entorno ante diversas situaciones (10), está constituido por acciones y secuencias de acciones (patrones) características que se presentan como respuesta ante diversos factores en su ambiente, que se conjuntan con procesos anatómicos y fisiológicos, la función neuronal y la carga genética presente en los animales para poder darse. Por ejemplo para detectar la presencia de un nuevo elemento en su entorno (como otro ser vivo), se activan de diversos aparatos y sistemas en los animales que generan acciones como observar, caminar, vocalizar o mover alguna parte de su cuerpo, en situaciones más complejas, como una interacción entre dos o más individuos, buscar zonas de refugio, cuidar de sus crías, etc., estas respuestas se conjuntan para formar patrones que permiten a los animales dar lugar a las formas de comportarse, generando adaptaciones que permiten mantener su supervivencia en el ambiente actual (11)(12)(4).

Las respuestas conductuales de los animales han sido reconocidas dada su importancia para diversos campos de la investigación. Gracias a la información recabada a través de la observación del comportamiento, se han enriquecido áreas como la ganadería, mejorando aspectos de alojamiento, manejo y alimentación (13) o la conservación de especies animales a través de programas de enriquecimiento ambiental y adecuación de los recintos para su resguardo (11)(14). Otras disciplinas como las neurociencias han evaluado y cuantificado conductas de diversos animales, obteniendo resultados que ayudan a comprender diversas cuestiones relacionadas con el comportamiento y el sistema nervioso de los organismos (5).

El papel de la neuroetología en los estudios del comportamiento

Las neurociencias trabajan en conjunto con diversas disciplinas científicas, para estudiar distintos aspectos del sistema nervioso de los organismos animales como su estructura (neuroanatomía), funcionamiento (neurofisiología) o las patologías que lo afectan (neuropatología) (15). Una de estas conjunciones disciplinarias es la neuroetología, encargada de estudiar las bases neuronales del comportamiento de los animales (16), implementando los conceptos y técnicas propuestas por la etología (17). El enfoque de la neuroetología, radicó en desarrollar una metodología y criterios de uniformidad a la hora de realizar evaluaciones conductuales, priorizando que el comportamiento a analizar sea simple, robusto, fácilmente accesible, etológicamente relevante y que pueda ser evocado sin dificultad, ni la necesidad de ejercer estímulos constantes en los animales a evaluar (16). Con ello, la neuroetología ha generado conocimientos integrales de los mecanismos del comportamiento, como una manifestación visible de la actividad del sistema nervioso central (18)(19), logrando que se enfatice al comportamiento como uno de los objetivos principales en las investigaciones, y así caracterizar e identificar sus determinantes para comprender los mecanismos cerebrales involucrados en su modulación (17). Las mediciones de comportamiento también han permitido detectar cambios en la función cerebral, producidos por enfermedades, lesiones neuronales, modificaciones genéticas o exposición a varios agentes y tratamientos (7).

Pruebas conductuales en la neuroetología

Desde el surgimiento de la neuroetología, han sido esenciales las pruebas conductuales, cuya implementación ha logrado que las mediciones del comportamiento se adapten en escenarios experimentales, gracias a que las pruebas conductuales toman sus fundamentos con base en lo observado en estudios previos realizados en campo, dotándoles de un significado etológico (21). Actualmente se cuenta con una variedad de pruebas aplicables a los modelos animales empleados en las neurociencias, los cuales son útiles para evaluar procesos cerebrales y fenotipos conductuales (22), es decir, observar la expresión de patrones de conducta en diversas condiciones, como estados de enfermedades neurodegenerativas, de igual forma permite obtener datos

que ayudan a responder cuestionamientos como el surgimiento y desarrollo de alteraciones del comportamiento, desde una perspectiva neuronal y de la integración de los procesos del sistema nervioso central (23)(24).

Selección y clasificación de pruebas conductuales

Una prueba conductual debe ser seleccionada con base en el comportamiento de interés a estudiar y en el modelo animal a utilizar, cuidando que este último, sea el adecuado para representar el comportamiento buscado (25). Seleccionar la prueba adecuada es de vital importancia a la hora de estructurar los trabajos de investigación, dado que condicionan aspectos metodológicos como el establecimiento del tamaño de la muestra, las edades de evaluación o el sexo de los individuos (26)(25).

Las pruebas conductuales se catalogan con base en el comportamiento que evalúan, existiendo un vasto repertorio de pruebas para estudiar la gama comportamientos existentes (27), por ejemplo, pruebas como el laberinto acuático de Morris o la prueba de campo abierto, están clasificadas como pruebas estándar gracias a que permiten evaluar diversas formas de expresión del comportamiento de modelos animales como los roedores (rata, ratón), posibilitando observar conductas de tipo exploratorias, conductas motoras, de memoria y aprendizaje, entre otras (28). Para los casos de conductas específicas, como la agresión o la interacción social, se emplean pruebas que permiten la valoración particular de la expresión de esos comportamientos (29). Por ejemplo, para visualizar conductas agresivas, se cuenta con las pruebas llamadas intruso/residente y dominancia en tubo las cuales se basan en la interacción entre dos o más individuos y favorecen la expresión de conductas agresivas propias de la especie empleada (30)(31). Por su parte, para estudiar las conductas de tipo ansioso, se han utilizado las pruebas de luz/oscuridad y enterramiento de canicas que permiten observar estos comportamientos complejos, en respuesta a diferentes variables (32)(33) o bien pruebas de coordinación motora (por ejemplo rotarod) que posibilitan la observación de cambios en la locomoción y coordinación de los animales ante numerosos factores (34).

Revisión sistemática

Principales pruebas utilizadas en los diversos tipos de estudios de neurociencias

Pruebas de agresión

El comportamiento agresivo, es uno de los más investigados en neurociencias, estudiando los procesos implicados que se desarrollan en el sistema nervioso central (SNC), así como los factores que alteran su expresión (35)(36). Las investigaciones que se enfocan en la agresión se apoyan con gran frecuencia de la utilización de la prueba intruso/residente que permite la expresión innata de agresión en roedores machos (modelos de investigación más usados) (37), constituyendo la prueba estándar para investigaciones relacionadas con agresividad y estrés por derrota social (SDS) (38).

Los ratones machos al mantenerse alojados en condiciones “semi naturales” de un laboratorio, tienden a desarrollar de manera espontánea conductas de agresión, tanto ofensivas como defensivas, las cuales serán manifestadas durante la realización de la prueba intruso/residente. Esto ocurre gracias a la señalización olfativa que los ratones machos establecen en un espacio determinado para marcar su territorio (semejando el marcaje olfativo en vida libre). El tipo de respuesta ante la señalización olfativa depende de cada ratón y su contexto, si un ratón es residente, atacará a los machos desconocidos (intrusos) que se coloquen en su territorio, mostrando respuestas ofensivas, a la par los ratones intrusos serán los que muestran respuestas defensivas hacia los ratones residentes (39)(40). Se observa así la conducta agresiva en un contexto que permite evaluar la naturaleza de las agresiones, y los cambios resultantes de la modificación de diversas variables de interés para las investigaciones, por ejemplo, las condiciones de alojamiento (aislando ratones), el uso de ratones machos anestesiados, castrados o bien el empleo de ratones hembra (41).

Existe una prueba complementaria de la prueba intruso/residente, llamada prueba de arena neutral, la cual tiene un fundamento similar, observar el comportamiento social innato de los roedores en un espacio determinado, la diferencia radica en que se omite el marcaje olfativo en el territorio, por tanto las conductas expresadas suelen ser diversas, pudiendo observar conductas

de interacción social, de tipo exploratorio, de reconocimiento e incluso de tipo ansioso (42)(43). La utilidad de la prueba de arena neutral es que permite conocer el comportamiento de los sujetos experimentales cuando se desconoce su antecedente conductual, orientando hacia otras pruebas de comportamiento que se pueden realizar a partir de los cambios observados. Ambas pruebas son complementarias para analizar el comportamiento agresivo en ratones, gracias a que se puede realizar una primera evaluación con la prueba de arena neutral y posteriormente repetir la evaluación con la prueba intruso/residente.

Entre las principales restricciones de la prueba intruso/residente, se encuentra la relacionada con el sexo de los animales, puesto que fue diseñada basándose únicamente en el comportamiento de ratones macho, por lo que el uso de hembras queda limitado. El empleo de ratones hembra requiere de modificaciones que suelen ser poco prácticas y que generan un mayor estrés a los animales, ejemplo de ello es el emplear hembras intrusas contra hembras lactantes residentes para que estas defiendan a sus crías (conducta materna), o aplicar a las hembras intrusas orina de un macho diferente al macho residente para propiciar la conducta agresiva (41). Otra limitación es que la prueba intruso/residente es aversiva para los ratones, llegando a generar heridas graves causadas por las peleas, o en casos extremos, la muerte de alguno de los individuos durante el periodo de evaluación, por lo que establecer los tiempos adecuados de duración de la prueba y los manejos pre/post evaluación es de vital importancia para el bienestar de los animales (5). Estas cuestiones siempre deben de ser analizadas y en su caso aprobada la pertinencia de la realización de la prueba por los respectivos comités de ética de las instituciones, buscando tanto de la validez de las evaluaciones como procurando mantener en la medida de lo posible el bienestar de los sujetos experimentales.

Otra prueba que ha tomado auge para la evaluación de la conducta agresiva es la prueba de dominancia en tubo, como su nombre lo indica, permite observar el comportamiento agresivo a través de la dominancia social por parte de los ratones (44)(31). Los ratones son animales sociales que establecen colonias tanto en vida libre como bajo condiciones de laboratorio (45), por lo que

desarrollan jerarquías para mantener una convivencia armónica en el alojamiento, la cual se logra gracias a la expresión de comportamiento agonístico de los machos dominantes. El establecimiento de un estatus social dentro de una colonia formada, influye en el estado de salud de los individuos que habitan en ella, determinando cuáles sujetos tienen acceso prioritario a recursos como el alimento o los lugares de descanso, evitando de esta forma peleas constantes (46)(47).

La estabilidad de la dominación social puede ser determinada por medio del número de encuentros que gana un individuo dentro de una colonia, acto que ocurre cuando las prioridades motivacionales (obtener comida, refugio, espacio, etc.) de dos o más individuos son incompatibles, lo que genera un punto de conflicto social que se resuelve a través de un encuentro agonístico (usualmente una pelea) entre los oponentes, dando como resultado el establecimiento de los sujetos dominantes y los sumisos (48).

La prueba de tubo se desarrolló como un paradigma para observar el dominio social por medio de un conflicto poco aversivo (derecho de paso). La colocación de dos ratones en los extremos de un tubo estrecho transparente, quienes al avanzar dentro del tubo y llegar a un punto medio, genera que se tengan que enfrentar entre sí para obtener el derecho de pasar al otro extremo, esto lo hacen empujando al contrincante buscando que se retire (49), el ratón ganador es quien consigue permanecer dentro del tubo y se considera el dominante del encuentro. Cuando se trata de un grupo, se puede aplicar un arreglo de encuentros sucesivos donde al final se han enfrentado todos contra todos, si los mismos ratones consiguen ganar repetidamente un número determinado de encuentros, se consideran los dominantes de su grupo respectivo (31).

Se ha señalado que el dominio social y la conducta agresiva son proporcionales, y existe una asociación entre los comportamientos agresivos y el rango de dominio (50). Otros autores destacan que cuando existen jerarquías poco estables, por ejemplo, en cajas con un grupo numeroso de ratones, hay un aumento en la conducta agresiva, pues los animales tratan constantemente de establecer una dominancia, lo cual puede ser observado con frecuencia durante los procesos de cambios de cajas (51), lo que

concuenda con la observación de que la agresividad se reduce a un nivel bajo en los ratones alojados en grupos reducidos con rangos estables, gracias a que se anteponen las necesidades de supervivencia en grupo y se previenen de luchas innecesarias (52).

Entre las limitantes más importantes de la prueba de dominancia en tubo, se encuentra la relativamente larga duración de la prueba, ya que además del tiempo necesario para la evaluación propiamente dicha, se requiere un período de habituación por parte de los ratones al tubo. Asimismo, pueden surgir complicaciones cuando se requiere evaluar repetidamente ratones a edades determinadas, dado que será necesario considerar su peso para asegurarse que pueden entrar y avanzar sin complicaciones adicionales a través del tubo. A pesar de estas dificultades, la prueba de dominancia en tubo sigue siendo considerada útil para determinar la posición jerárquica de los ratones, así como la observación y valoración de alteraciones en la conducta agresiva.

Pruebas de ansiedad

Otra conducta estudiada frecuentemente en el campo de las neurociencias es la conducta de tipo ansioso, debido a su relación con diversas afectaciones del SNC y enfermedades neurodegenerativas, lo que ha generado la creación de modelos murinos para replicar dicho estado conductual, los cuales permiten observar cambios por medio de pruebas de comportamiento. Entre las más usadas para evaluar la conducta ansiosa, se encuentran los laberintos (en cruz, en Y, elevado), la prueba de luz/obscuridad y la prueba de enterramiento de canicas (42)(53). Estas pruebas permiten evaluar la conducta de tipo ansioso en diversas cepas de ratones, al estar fundamentadas en aspectos etológicos, como sus hábitos nocturnos, su evitación innata a espacios abiertos e iluminados y su capacidad para excavar en diferentes terrenos (54).

Una de las consideraciones que se deben tener al elegir las pruebas para evaluar la ansiedad, es sin duda, la practicidad. En el caso de los laberintos, se puede señalar que son pruebas útiles, pero requieren de un espacio grande y exclusivo para mantener funcionales las estructuras que los conforman, lo que implica necesariamente la movilización de los animales hacia el espacio donde

se ubican los laberintos, aspecto que puede tener efectos sobre las manifestaciones conductuales (26).

Una opción viable para los laboratorios que no poseen las estructuras de los laberintos y en los casos en que se prefiere no movilizar a los animales es la prueba de luz/obscuridad, dicha prueba requiere solamente la utilización de una caja de acrílico transparente con una zonas oscurecida (los detalles y medidas serán abordadas más adelante). El transporte de estas cajas adaptadas para la prueba hacia el alojamiento de los ratones resulta una medida práctica, que reduce el estrés por movilización en los animales (55). La prueba de luz/obscuridad se basa en la aversión natural de los ratones hacia áreas iluminadas y abiertas, lo que desencadena, de forma espontánea, expresiones del comportamiento ansioso en estos animales (55)(32).

Otra opción viable para evaluar ansiedad es la prueba de enterramiento de canicas, la cual permite observar y analizar diferentes tipos de trastornos compulsivos y repetitivos, que son manifestaciones de conductas de ansiedad. Dicha prueba utiliza la respuesta innata de los ratones que consiste en enterrar y con ello hacer desaparecer de su entorno objetos amenazantes o perturbadores (56). La cantidad de objetos enterrados depende en gran medida de la intensidad de respuesta de excavación del ratón. Se ha observado que ante la presencia prolongada de un objeto, la respuesta de excavar tiende a disminuir con el tiempo, por lo que una conducta de excavación repetitiva o "compulsiva" ha podido ser asociada a estados patológicos de ansiedad (57). Al igual que la prueba de luz/obscuridad, al tratarse de una prueba de conducta innata, realizarla es sencillo, requiriendo solo de objetos pequeños (p.ej. canicas) y del sustrato de las cajas de alojamiento.

Las pruebas de luz/obscuridad y de canicas son útiles para realizar evaluaciones de la conducta de tipo ansioso, proporcionando una gama de variables que se pueden correlacionar con otros factores modificadores de los estados de ansiedad. Al igual que otras pruebas, también tienen sus limitantes, siendo la principal de ellas la frecuencia de evaluación, solo permiten realizar un máximo de dos sesiones de evaluación por animal, ya que fácilmente se puede generar una habituación en ellos, lo que provoca que la expresión del

comportamiento ansioso sea menor, porque los ratones dejan de considerar la situación de cada prueba como algo estresante.

Tanto para las pruebas de agresión como de ansiedad, han sido concebidos software para evaluar las conductas. A principios de esta década, las plataformas comerciales especializadas en rastreo de roedores comenzaron a ofrecer paquetes de software que permiten la cuantificación automatizada de algunos comportamientos etológicos como el aseo o la crianza en pruebas como campo abierto o la inmersión de la cabeza en el laberinto elevado (58). No obstante, el consenso actual es que estos sistemas comerciales funciona de manera limitada para ciertas pruebas y cuantifican solo algunas medidas etológicas, en comparación con las observaciones y evaluaciones humanas (59), sin mencionar que los equipos automatizados requieren de la implementación de habilidades computacionales avanzadas y una inversión de capital inicial (60). A pesar de ello, está creciendo la implementación de los estudios conductuales usando softwares (16), los cuales se realizan en conjunto con la puntuación humana, como el estándar más aceptado para coleccionar los datos de las pruebas de comportamiento (19).

Por ende una manera de comenzar esta sofisticación en laboratorios donde el acceso a los softwares especializados es limitado, es implementando el uso de cámaras de video, las cuales resultan dispositivos prácticos y accesibles que mejoran la capacidad de los investigadores para identificar, registrar e interpretar visualmente cambios de comportamiento relevantes en tiempo real.

Esta alternativa permite validar las pruebas, al obtener un registro en video de la realización de las mismas, lo que da la posibilidad de repetir las observaciones grabadas, permitiendo que la observación de cambios por parte de los investigadores sea más detallada y completa.

Por último, es importante destacar la necesidad de utilizar prácticas de manejo no aversivos durante la realización de estas pruebas, ya que algunas conductas, como las de tipo ansioso, son más sensibles a la presencia de factores que produzcan estrés en los animales, por lo que se debe vigilar que los ratones se encuentren con los niveles mínimos de estrés para evitar alteraciones a la hora de realizar cualquier evaluación.

El ratón como modelo de comportamiento en la investigación

Uno de los puntos importantes en las investigaciones de la neuroetología, es la elección de la especie animal a usar como modelo. Anteriormente los animales a evaluar se elegían con base en las consideraciones técnicas y la facilidad para obtener resultados, dejando en segundo plano lo que realmente se quería evaluar, es decir, el comportamiento de interés (16). El animal elegido como modelo debe expresar patrones conductuales definidos para que puedan ser analizados, sumado a que pueda ser mantenido y/o criado bajo condiciones de laboratorio (61). El modelo animal que por excelencia ha sido elegido son los ratones (*Mus musculus*), especie que posee una gran diversidad de cepas, que se han logrado caracterizar a nivel genético y fenotípico, con lo que disminuyen las variaciones que pueden afectar los resultados de los experimentos (62). Los ratones constituyen un modelo pertinente para estudiar los mecanismos neuronales que subyacen en el comportamiento, gracias a que se conoce cada vez mejor sobre los circuitos cerebrales involucrados en comportamiento expresados bajo las condiciones de laboratorio (50)(63).

Los ratones son usados ampliamente en los estudios del comportamiento por poseer una gran adaptabilidad al medio ambiente, cuestión que favorece su crianza bajo condiciones de laboratorio (62). Son animales sociales que viven en grupos/colonias (64), han sido catalogados como animales “presa”, porque en vida libre, suelen ser cazados por otros animales como felinos, aves, reptiles y roedores como las ratas (65), por lo que parte de su conducta está determinada por esta condición. Los ratones presentan patrones definidos de comportamiento, por ejemplo, se conoce que son de hábitos nocturnos/crepusculares, de manera que en esos periodos con una menor cantidad de luz, es cuando presentan una mayor actividad, a la par que reducen notablemente sus actividades durante el tiempo de luz brillante (8). Estos animales son activos, exploradores, muy ágiles y capaces de realizar múltiples actividades como excavar, buscar comida, trepar, construir nidos, roer, jugar, acicalarse o hacer montas entre individuos (tanto machos como hembras) (68)(8), sin embargo, suelen evitar los espacios abiertos (66) y poseen la tendencia a permanecer cerca de las paredes (tigmotaxis) (67). La capacidad de roer es importante para su bienestar físico, ya que sus incisivos

al poseer una raíz abierta crecen continuamente a un ritmo de 1-2 mm por semana (69).

La crianza de los ratones como animal de laboratorio ha permitido mejoras continuas en sus cuidados y manejos, buscando su bienestar antes, durante y después de su permanencia en los protocolos experimentales (70). Abordar el bienestar de los ratones en entornos del laboratorio, requiere considerar sus comportamientos naturales y brindar la oportunidad de que esos comportamientos se expresen cuando sea apropiado (71), por ejemplo, permitir un contacto social con congéneres compatibles es uno de los factores que promueven las actividades como agruparse/acurrucarse en el nido, que ayudan a reducir la aparición de comportamientos anormales, como lo son las estereotipias (72)(73)(74).

Al establecer grupos de ratones en condiciones de cautiverio, se deben considerar sus características biológicas. Un grupo puede conformarse de un macho dominante, machos subordinados y hembras reproductoras (75)(76), o bien de machos emparentados y hembras emparentadas, tomando en cuenta la capacidad de alojamiento de las jaulas, dado que si esta es sobrepasada, puede perturbarse la convivencia dentro del grupo, al verse trastocada la jerarquía y establecerse un ambiente de competencia constante (76). La estructura del entorno de un ratón juega un papel relevante en su capacidad para manifestar comportamientos naturales, es así que, la disponibilidad de recursos y refugio dentro de la jaula puede condicionar en la presentación de algunos comportamientos como el sexual o conductas sociales. Por ejemplo, en una jaula donde se carece de materiales para construir nido y de espacios de resguardo, el ratón dominante, al tratar constantemente de conservar su territorio, puede responder con agresividad hacia los ratones subordinados y provocar un ambiente que genere un estrés dentro del alojamiento, ante la imposibilidad de los subordinados para huir o salir del territorio de un ratón dominante, como ocurre en el entorno natural (77), lo que a largo plazo podría desencadenar conductas estereotipadas en los ratones subordinados.

Estereotipias en ratones

El comportamiento estereotipado es una alteración de los estados basales de conducta y se genera por una respuesta cerebral asociada a una frustración motivacional derivada de un estado constante de estrés, por lo que, la presencia de estereotipias se considera como un signo de bienestar animal deficiente (78). Los ratones con estereotipias presentan alteraciones que repercuten en los resultados de las investigaciones, por lo que además de las razones éticas para procurar el bienestar animal, es importante detectar a los ratones que presentan comportamiento alterados, por ejemplo, aquellos que muerden barrotes de las cajas, saltan constantemente, dan vueltas unidireccionales sin algún propósito claro o trituran excesivamente con sus dientes los alimentos (79). Es conveniente señalar que se ha encontrado que algunas cepas son más susceptibles a desarrollar estereotipias que otras, como el caso de la cepa BALB/c, en la cual el acicalamiento y el montaje repetitivo son estereotipias comunes (80).

La prevención de estereotipias puede ser tomada como indicativo de que las condiciones de alojamiento y manejo en los ratones son idóneas y que los procedimientos practicados como parte de los protocolos experimentales son adecuados para mantener el bienestar animal. Es importante destacar este aspecto ante las personas que cuidan a los animales y para enriquecer la formación científica de quienes realizan los procedimientos experimentales, resaltando la importancia de una adecuada manipulación y sujeción durante los periodos de duración de los experimentos (81).

Recomendaciones de manejo no aversivo durante la realización de pruebas conductuales con ratones

Las técnicas más comúnmente utilizadas para el manejo de ratones de laboratorio fueron establecidas fundamentalmente sobre la base de la practicidad para los manejadores, siendo la sujeción a partir de la base de la cola la forma estándar de manipulaban de estos animales (82). Dicho manejo es practicado y enseñado en la actualidad en muchas instituciones públicas donde se trabaja con animales, además de ser referenciado en múltiples protocolos (83). Sin embargo, los conocimientos actuales permiten evidenciar que el sujetar y recoger a los ratones por la base de la cola, lejos de ser

práctico y seguro, es estresante para ellos y repercute en su estado de salud. En un estudio realizado por Hurst y colaboradores en 2010 (84) se compararon tres formas diferentes de manejo rutinario en ratones de las cepas C57BL/6, BALB/c e ICR (CD-1), concluyendo que sujeción por la base de la cola induce aversión y mucha ansiedad en dichas cepas, dado que su naturaleza como animal presa los hace desarrollar reacciones de alerta para evitar la restricción y captura. Los autores describieron que al sujetar a los ratones por la cola hay una mayor reacción de evitación del contacto con la mano del sujetador, aumento de las respuestas de micción y defecación ante la manipulación, mayor frecuencia de posturas de protección, huida y de resistencia al manejo; además usando la prueba del laberinto en cruz elevado, observaron un aumento de las conductas ansiosas posterior al manejo por la cola. Estos hallazgos fueron la base para el estudio de Gouveia y Hurst en 2013 (85), en búsqueda de una alternativa de manejo de rutina, surgió la utilización de túneles y la técnica de “mano ahuecada”, observando que en ratones de la cepa C57BL/6 se generó una habituación voluntaria a este tipo de manejo, que mejoraba la interacción con los manipuladores y presentaba una reducción de la ansiedad durante la prueba de laberinto en cruz. El procedimiento para usar las técnicas de manejo con túnel o de mano ahuecada es sencillo de implementar en los laboratorios, gracias a la capacidad de habituación de los ratones a dichos manejo. Esta habituación se puede realizar de forma rutinaria con los cambios de caja o durante procesos de aclimatación en cuarentena, además de que llevarlo a cabo requiere de pasos simples que se pueden enseñar a cualquier persona que maneje ratones en sus investigaciones (81).

Por su parte, Ghosal y colaboradores (86), utilizaron los métodos de manejo no aversivo de tubo y “mano ahuecada” en sus trabajos con ratones, reportaron una reducción del comportamiento de tipo ansioso y de los niveles de corticosterona en sangre, aportando así evidencia fisiológica de que dichas formas de manejo contribuyen a mejorar el bienestar animal en los ratones de laboratorio.

Mejorar y fomentar las técnicas no aversivas de manejo y sujeción son parte importante del bienestar de los animales en la investigación, especialmente cuando se trata de procedimientos rutinarios como los cambios de caja, que

afectan de manera repetida y cotidiana a los animales. El empleo de este tipo de técnicas favorece que las investigaciones se realicen aproximándose de manera creciente al cumplimiento de los principios de las 3 R's, que buscan el Reemplazo de animales en investigación con el uso de alternativas, la Reducción de la cantidad de animales empleados en la investigación y el Refinamiento de los cuidados y manejos para mantener el dolor, el estrés y el sufrimiento al mínimo (87).

Técnica de manejo con tubos

Para el manejo de los ratones con la utilización de tubos, se sugiere que éstos sean de plástico o acrílico transparente, de manera que sea posible visualizar a los animales cuando son recogidos, sin embargo, el uso de tubos de cartón es una alternativa económica y funcional.

Los pasos para llevar a cabo este tipo de manejo son los siguientes:

1. Colocar la caja con ratones en una mesa de trabajo despejada y disponer a la par una caja limpia para realizar el cambio de cajas.
2. Sostener el túnel con una mano a un costado de las paredes de la caja con ratones.

Nota: Evitar colocar el tubo en medio de la caja, porque ello puede ocasionar que los ratones eviten entrar en él.

3. Con la mano libre se debe guiar al ratón (sin forzarlo) hacia el túnel, tratando de que el tubo este pegado a la pared de la caja.

Nota: No se debe de perseguir al ratón con el tubo por toda la caja.

4. Una vez que el ratón este dentro del tubo, se colocan las manos en los extremos del tubo para tapar los orificios del mismo.
5. Una vez tapados los orificios con las manos, se debe levantar el tubo con suavidad para evitar que el ratón salga del mismo.
6. Procediendo con delicadeza, se deposita al ratón en la jaula nueva destapando un orificio e inclinándolo ligeramente el tubo para que este caiga suavemente sobre el piso de la caja. En algunos casos es posible colocar al animal en la mano del manejador antes de colocarlo en la caja nueva.
7. El procedimiento se repite con cada ratón en las cajas de alojamiento.

Este manejo se debe realizar con cautela y tranquilidad, pero con movimientos firmes y rápidos.

Nota: Para un mejor entendimiento del proceso de manipulación y cambio con tubos se pueden revisar los vídeos 1, 2 y 3 incluidos en los anexos de este trabajo.

Enriquecimiento ambiental

La mejora constante en el manejo y el bienestar de los ratones se respaldan con la colocación de materiales de enriquecimiento ambiental, este término hace referencia a cualquier objeto o práctica que provoque la estimulación física y mental positiva de los animales en condiciones de cautiverio, lo que favorece su calidad de vida (88)(89)(90). Anteriormente se tenía la idea de que proporcionar enriquecimiento ambiental alteraba las evaluaciones conductuales a pesar de no contar con una evidencia clara de ello, hoy en día se conoce que el enriquecimiento, lejos de perjudicar, reduce los niveles de estrés al satisfacer las necesidades básicas de los animales en investigación, previniendo la aparición de estereotipias y facilitando el manejo de las personas encargadas de su cuidado (91)(92).

El enriquecimiento ambiental actualmente es considerado esencial en el manejo de los ratones de laboratorio, porque aporta beneficios tanto para los animales como para las investigaciones.

Para mayor información se sugiere consultar las referencias 89,90,91,92,93 y 94 sobre enriquecimiento ambiental en ratones de laboratorio incluidas en este trabajo. Es importante tener en consideración los puntos tratados en este apartado para que las personas interesadas en realizar proyectos de investigación donde se practiquen pruebas de conducta en ratones tengan conocimientos para llevar a cabo sus evaluaciones con los menores contratiempos.

En los siguientes capítulos se abordarán las metodologías que han sido implementadas para la ejecución de pruebas de agresión y ansiedad que se utilizan actualmente en ratones de laboratorio.

Imágenes



Imagen 1.- Habituación de ratones de laboratorio.



Imagen 2.- Manejo no aversivo en ratones de laboratorio con el uso de tubos.



Imagen 3.- Cambio de caja en ratones de laboratorio con la técnica de mano abierta.

Análisis de la información

Pruebas de ansiedad

Características generales del comportamiento de tipo ansioso en ratones de laboratorio

El término ansiedad (del latín “*anxietas*”), hace referencia a una respuesta adaptativa, que proporciona al organismo un mecanismo de “alarma” que lo prepara para enfrentarse a una situación de posible riesgo y prevenir situaciones potenciales de peligro (95)(96). La conducta ansiosa se caracteriza por la combinación de distintas manifestaciones fisiológicas ante la percepción de un estímulo amenazante, en las que se ponen en juego diversas señales a nivel del SNC, que permiten al individuo en cuestión, el afrontamiento de una situación inesperada, a través de respuestas conductuales (97)(98). Cuando la conducta de tipo ansioso se vuelve persistente, por causa de una alteración en la expresión de las respuestas ansiosas, cambia su utilidad adaptativa por una cuestión patológica, siendo esto denominado como trastorno de ansiedad (100). Los trastornos de ansiedad son afectaciones mentales donde se genera una constante aparición de una respuesta conductual ansiosa, aún en ausencia de algún estímulo desencadenante. Existen clasificaciones para nombrar a los diferentes tipos de trastornos de acuerdo a la forma en la que se desarrollan: de ansiedad generalizada (TAG), de pánico (TP), ansiedad social (TAS), estrés post-traumático (TEPT), obsesivo-compulsivo (TOC), etc. (101), siendo el TAG uno de los principales estados patológicos que afectan significativamente la salud y las actividades diarias de los sujetos que lo padecen (99).

Por su carácter anticipatorio, el comportamiento de tipo ansioso que expresan los ratones, es considerado un comportamiento funcional y se concibe como un mecanismo biológico adaptativo(99). Las expresiones del comportamiento ansioso de los ratones son similares a las de otros mamíferos como los humanos, ya que se mantienen patrones característicos considerados respuestas adaptativas de la conducta ansiosa, por ejemplo, presentan conductas de hipervigilancia, intranquilidad, evitación y escape. Cuando dichas respuestas se vuelven exacerbadas, los ratones generan trastornos de ansiedad semejantes a los estudiados en humanos, lo que ha llevado a que se empleen como modelos animales para recabar información sobre este tipo de

trastornos. Gracias a ello, existen diversas cepas de ratones que son clave para ayudar a estudiar y comprender las respuestas expresadas durante diversas fases del comportamiento ansioso, permitiendo esclarecer procesos fisiológicos y bioquímicos involucrados durante la manifestación de dichos trastornos, además de apoyar en el desarrollo de tratamientos farmacológicos (25)(102).

El conocimiento del patrón conductual de los ratones ha sido de gran utilidad para el estudio de las respuestas ansiosas, una respuesta clara de estos animales ante una situación de estrés es la de evitar los espacios abiertos y desprotegidos en un entorno desconocido, siendo esto una variable a medir en múltiples pruebas de ansiedad (96). El comportamiento de exploración es otra variable para evaluar los estados de ansiedad en ratones, ya que la exploración se inhibe gradualmente ante estados ansiosos constantes (53). Otra variable característica durante las pruebas de conducta ansiosa es la tigmotaxis, la cual es una forma de exploración donde los ratones tienden a permanecer pegados a las paredes de la zona de evaluación. La tigmotaxis disminuye conforme se reducen los estados de ansiedad, pasando de explorar únicamente cerca de las paredes a la inclusión de las zonas céntricas en la exploración que realiza este animal, lo cual es útil para diferenciar estados normales de ansiedad de estados alterados (103).

Otra expresión conductual de los ratones, que es utilizada para observar cambios en la ansiedad es la excavación, el cual es un comportamiento innato que expresan estos animales y que les permite operar en diferentes sustratos para la búsqueda de alimentos o para la creación de nidos (104). La conducta de excavación se ha estudiado en condiciones de laboratorio, donde se relacionó una actividad aumentada con problemas de hiperactividad y compulsividad, signos característicos de trastornos de ansiedad como el TOC (57). Tanto el estudio diferenciado de cada una de estas expresiones conductuales, como el análisis conjunto de los patrones conductuales señalados, permiten ahondar en el conocimiento de los trastornos de ansiedad y establecer puntos de referencia para proponer posibles blancos terapéuticos en el tratamiento de los problemas relacionados con la conducta ansiosa (105).

Comportamiento ansioso en ratones de laboratorio durante las pruebas

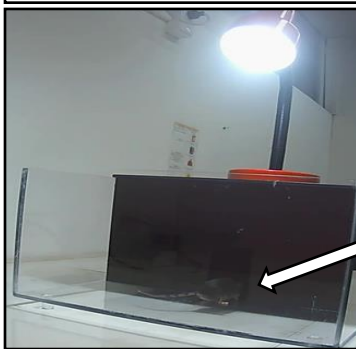
Las pruebas que evalúan el comportamiento de tipo ansioso de los ratones permiten observar los patrones conductuales ansiosos característicos, como la tigmotaxis o la excavación, de igual forma se pueden registrar durante los periodos de evaluación, parámetros como tiempos de permanencia, latencias y número de huidas a zonas determinadas, lo que aporta datos que pueden ser analizados estadísticamente enriqueciendo los trabajos de investigación.

Los patrones mencionados se caracterizan por posturas identificables, útiles para dar interpretaciones que permitan determinar si existen alteraciones del comportamiento, asociado a efectos farmacológicos, genéticos o ambientales. Por tanto en este apartado se da una descripción gráfica de los patrones conductuales comúnmente observados en pruebas de evaluación de la ansiedad en ratones, que se pueden identificar y registrar durante la realización de las mismas en un laboratorio.

Posturas observadas durante las evaluaciones de comportamiento de tipo ansioso

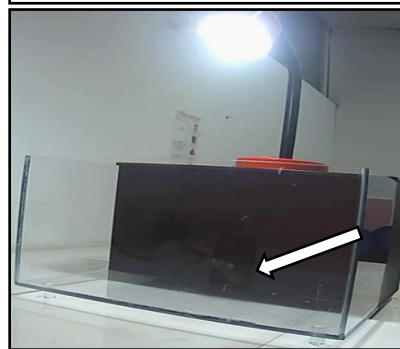
Los patrones de conducta ansiosa de los ratones siguen una secuencia determinada, lo que permite la observación, identificación y registro de los mismos. En el siguiente ejemplo, se describe el patrón expresado por ratones de la cepa C57BL/6 durante una prueba de luz/obscuridad, la cual es usada en las investigaciones relacionadas con la ansiedad (Imágenes 4, 5, 6, 7 y 8).

Imagen 4.- Escape



La respuesta normal de ansiedad de un ratón ante un estímulo aversivo es resguardarse en una zona oscura y cubierta, para evitar posibles peligros. Se considera un escape cuando el ratón coloca las cuatro patas en la zona oscura/segura.

Imagen 5.-Hipervigilancia



Una vez en la zona "segura", el ratón mantendrá una hipervigilancia sacando y levantando la cabeza para captar olores, pero dejando el cuerpo en la zona oscura, evitando salir de dicho lugar.

Imagen 6.- Exploración



Cuando un ratón comienza a disminuir su conducta ansiosa, suele salir de la zona oscura para explorar y volver al lado "seguro". La postura de exploración se caracteriza por una bipedestación, de esta forma consiguen visualizar mejor su entorno y captar mejor los olores en búsqueda de señales que indiquen posible peligro.

Imagen 7.-Tigmotaxis



La tigmotaxis es una respuesta esperada durante la expresión de la conducta ansiosa. Es una forma de exploración donde un ratón recorre toda la periferia pegado a las paredes.

Imagen 8.-Exploración céntrica



Pasado el tiempo, el ratón deja de expresar la tigmotaxis y comienza a explorar las zonas más céntricas, permanece más tiempo en las zonas iluminadas y abiertas, lo que es indicativo de que la conducta ansiosa finalizó.

Posturas observadas durante las evaluaciones de comportamiento de tipo ansioso

En otro tipo de pruebas, como la de enterramiento de canicas, el conteo de canicas enterradas, las veces que un ratón muestra una postura de excavación y el tiempo que realiza dicha respuesta hacia las canicas o el sustrato son variables de registro e interpretación para determinar si existe una alteración de los estados ansiosos (Imágenes 9,10,11,12,13).

Imagen 9.-Postura de excavación



La postura de excavación se inicia cuando un ratón coloca las dos patas delanteras frente a él, levantando la cola y separando las patas traseras.

Imagen 10.- Postura de excavación



Posteriormente mueve las patas delanteras de forma repetida para mover el sustrato, que pasa por debajo de su cuerpo.

Imagen 11.- Postura de excavación



El encorvamiento del ratón es común, de esta forma el ratón mueve el sustrato de un lado a otro.

Imagen 12.- Postura de excavación



El levantar la cola durante la excavación también es característico en los ratones, de esta forma ellos dirigen hacia donde expulsan el sustrato.

Imagen 13.- Nivel de excavación



Otra forma de medir el grado de excavación, es observando la caja una vez que se retira al ratón. Se puede observar que tan profundo y repetido excavó en un lugar determinado al verse un cúmulo más grande de sustrato de un lado de la caja que de otro.

Pruebas de ansiedad en ratones

Prueba de luz/obscuridad

Aspectos generales

La prueba de luz/obscuridad, también conocida como prueba de preferencia claro/oscuro o caja luz/obscuridad, es una de las más utilizadas para estudiar el comportamiento de tipo ansioso en ratones bajo condiciones de laboratorio. Desarrollada por Crawley y Goodwin (1966), surgió como una evaluación de la respuesta innata de los ratones a factores estresantes leves (ambientes y luz novedosos) que desencadenan conductas de tipo ansioso, teniendo la particularidad de no requerir un condicionamiento previo de los animales, lo que hace sencillo y práctico su empleo.

La base de esta prueba radica en la aversión innata de los ratones a la luz brillante y los espacios abiertos. Al ser sometidos a un conflicto, en este caso, ser expuestos durante un periodo corto de tiempo a un área abierta e iluminada, cuando a la par se les proporciona una zona oscura y cerrada, se desencadena una serie de respuestas por parte de los ratones, en las que se observan sus tendencias a explorar lugares nuevos y evitar los lugares abiertos. Se conoce que los ratones (debido a sus hábitos nocturnos) preferirán entrar a la zona oscura y posteriormente explorar la zona abierta e iluminada, evaluando la situación desde un entorno seguro. Durante este conflicto es donde se logra observar la conducta de tipo ansiosa, puesto que dicho comportamiento proveerá al ratón de la información necesaria para decidir salir hacia la zona iluminada o mantenerse en la zona oscura (32). Las variables como el número de transiciones de una zona a otra y el tiempo de permanencia en cada zona pueden ser relacionadas con los cambios en los estados de ansiedad.

La identificación y registro de esos patrones conductuales favorece la interpretación del impacto de las variables en estudio al compararlos con los cambios y respuestas que se presentan en estados ansiosos de los animales en vida libre. De esta manera la cantidad y diversidad de los datos obtenidos con esta prueba son fuente de enriquecimiento de los estudios. (26).

Utilizando la prueba de luz/obscuridad ha sido evaluada la actividad de tipo ansiolítico/ansiógeno de diversos fármacos y se ha logrado asimismo establecer el fenotipo de cepas transgénicas, al hacerse comparaciones de las repuestas entre cepas de ratones (107).

Esta prueba no requiere de un equipo grande y sofisticado (como es el caso de los laberintos), pues se pueden utilizar cajas de evaluación con diversas dimensiones, Bourin y Hascoet (32) registraron al menos 7 tamaños diferentes de caja para realizar la prueba, lo que permite evaluar ratones y pone de manifiesto su flexibilidad, adaptabilidad y portabilidad acorde a las capacidades de cada laboratorio.

Fundamento etológico

Los ratones son animales que tienen hábitos nocturnos, por tanto su mayor periodo de actividad se da cuando hay pocas horas luz, son considerados animales presa por ello sus estados de vigilancia y exploración están bien caracterizados, siendo la hipervigilancia, la captación de señales olfativas y los movimientos de escape parte de sus respuestas conductuales (108). Con base en lo anterior, se desarrolló la prueba de luz/obscuridad, al combinar la naturaleza exploratoria y la preferencia innata por zonas poco iluminadas en un espacio compartido con una zona abierta e iluminada (32). Al realizar la prueba, se genera un conflicto motivacional innato en los ratones, al darle la opción de tener una zona oscura para su resguardo y una zona para explorar, lo que permite visualizar estados de ansiedad sin necesidad de un estímulo condicionante, puesto que la respuesta presentada por los ratones durante el tiempo de evaluación se asemeja a la respuesta innata ante estímulos ansiogénicos conocidos en su ambiente (espacios abiertos, zonas brillantes, etc.). Es así que las opciones de conducta son menos estresantes para los ratones, ya que después de un tiempo determinado, ellos alcanzan una adaptación que les permite regresar a su estado basal (26). De esta manera, la situación recreada simula lo observado en ratones en vida libre, quienes desde su madriguera, realizan una evaluación de los estímulos en el ambiente, antes de realizar una exploración física del lugar.

Se ha reportado que existe una relación entre el tiempo de exploración y la presentación de diversas posturas, con alteraciones en los estados de ansiedad, por ejemplo, un ratón que pasa su mayor tiempo de permanencia en la zona oscura, sin realizar posturas de exploración, muestra un estado alterado de ansiedad, ya que la limitación de comportamiento exploratorio se ha correlacionado con estados de trastornos de ansiedad generalizada y trastornos de agorafobia (109). En el caso contrario, ha sido señalado que mientras existan transiciones de un ratón de una zona a otra y posturas de exploración y atención visibles en el ratón, se considera que se trata de una respuesta de conducta de tipo ansioso esperada, puesto que explorar a la par de que se resguarda en la zona segura es una respuesta común (27).

Con el fin de favorecer la identificación de las variables mencionadas, como el tiempo en que permanece un ratón en cada zona y las posturas características visibles durante esta prueba, se anexa una serie de videos cortos tomados durante la realización de la prueba en ratones bajo condiciones de laboratorio.

Consideraciones antes de efectuar la prueba

Las pruebas que evalúan el comportamiento de tipo ansioso son susceptibles a diversos factores, la caja de luz/obscuridad no es la excepción, por lo que se debe de tomar en consideración los siguientes puntos antes de iniciar la prueba:

- Aunque inicialmente fue desarrollada en ratones macho, esta prueba es útil para evaluar a ambos géneros sin complicación alguna.
- Las diferencias de cepa, peso, edad y tamaños entre los ratones influyen en los resultados de la prueba, por lo que es recomendable mantener estos parámetros lo más homogéneos posible.
- Los ciclos de luz en los alojamientos deben estar bien regulados, dado que la prueba solo se puede realizar durante los periodos con poca luz natural (generalmente antes de las 10:00 am y/o después de las 5 pm.)
- Factores macro/micro ambientales como el tipo de alojamiento, el ruido y la falta de enriquecimiento ambiental pueden alterar las respuestas de los ratones, al contribuir al estrés crónico y a la presentación de estereotipias, por lo que es necesario cuidar dichos factores y mantener condiciones estables que faciliten la interpretación de los resultados obtenidos en los estudios.
- Los factores de manejo y habituación por parte de los realizadores pueden tener repercusiones directas en los comportamientos expresados por los ratones, por lo que emplear manejos no aversivos es lo ideal para prevenir alteraciones conductuales.
- Identificar correctamente a los animales facilitará el seguimiento de los sujetos durante el periodo de prueba, para ello el marcaje de la cola es una opción recomendable.
- Cada evaluación de manera individual y debe de colocarse un solo ratón por evaluación en la caja de luz/oscuridad.
- Es aconsejable que las sesiones de prueba tengan una duración mínima de 5 min y máxima de 10 minutos, no deben realizarse más de DOS evaluaciones por ratón, dado que después de este tiempo los animales se habitúan a la caja, inhibiendo las respuestas ansiosas.

- El uso de una fuente extra de luz (lámpara de luz), para iluminar la zona abierta es de utilidad para generar un mejor efecto durante la prueba.
- Realizar videograbaciones de las pruebas realizadas genera un registro que permite analizar el comportamiento de manera repetida y más detallada, lo que favorece la validación de los resultados.
- Por razones éticas y de calidad de los experimentos (que favorecen que las respuestas basales sean las esperadas), es necesario asegurar el bienestar de los ratones durante todo el proceso de evaluación.

Materiales requeridos

- Caja de evaluación de acrílico con una zona oscura y una zona iluminada (Imagen 14).

Nota: El tamaño de la caja y la división de los compartimientos varía de acuerdo con los objetivos del estudio. Para fines de este trabajo se pondrá como ejemplo una caja de 46 cm x 27cm x 30 cm, medidas sugeridas por Hascoet y Bourin (32).

- Atomizador con alcohol al 70%
- 3 Cronómetros
- Cámara de video
- Marcador/plumón de tinta indeleble
- Hoja de registro
- Tubos de manejo para ratón(opcional)
- Lámpara de luz
- Contador de mano



Imagen 14.- Ejemplo de la caja de luz/obscuridad

Fase de preparación

Preparación de los animales

1. La presencia de otras personas influye en la expresión de algunos comportamientos al generar estrés en los animales, por lo que los observadores y/o manejadores deben de haber realizado y practicado una habituación con manejo no aversivo en los animales previamente a la realización de las pruebas (vídeos 1 y 2).
2. Marcar a los animales a evaluar con un marcador de tinta indeleble para la correcta identificación de los mismos.
3. Llevar a los animales al lugar de evaluación antes de iniciar cualquier prueba.

Nota: El lugar de evaluación debe ser diferente al cuarto de alojamiento, para evitar un estrés en los demás animales del alojamiento durante la prueba, esto debido a la posible existencia de vocalizaciones y olores durante la prueba, no debe de existir ruido excesivo y/o presencia de otros animales distintos a los que se van a evaluar en el cuarto de evaluación.

4. Dejar un lapso de al menos 30 minutos a los animales en el lugar de evaluación para permitir que retomen un estado estable previo a las evaluaciones (ver imagen 15).
5. Transcurrido este tiempo se procede a realizar la evaluación en la caja de luz/obscuridad.

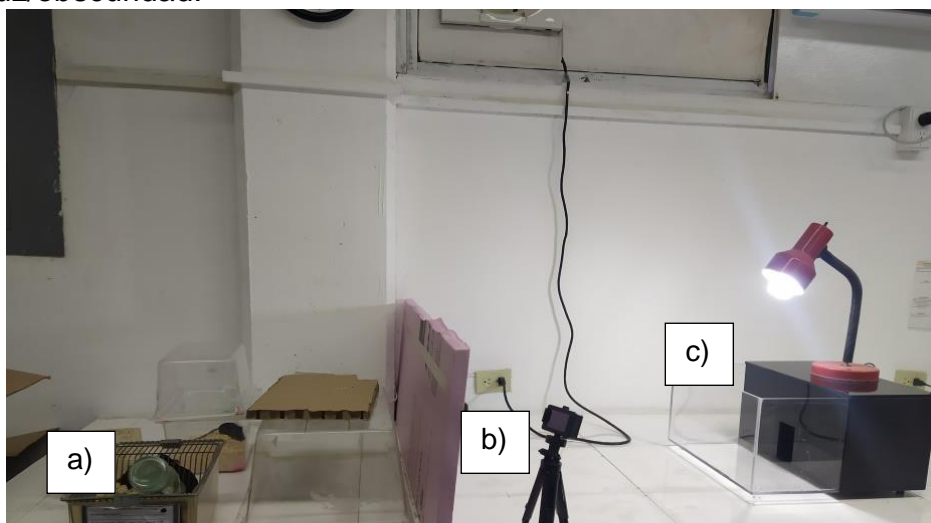


Imagen 15.- Montaje de la prueba luz/obscuridad en el cuarto de evaluación.
a) Se observa a los animales a evaluar en proceso de aclimatación b) Cámara de vídeo para grabar las pruebas
c) La caja de luz/obscuridad montada con una lámpara para generar la aversión a la luz.

Preparación de la caja de luz/oscuridad

1. Colocar la caja de luz/oscuridad en la mesa de evaluación y marcar la zona en la que es colocada (ver imagen 16).
2. En caso de usar una lámpara, este debe de ponerse encima de la zona oscura e iluminar en su totalidad la zona de luz para asegurar que se genere dicho estímulo.
3. Colocar la cámara de video de tal manera que se puedan visualizar las dos zonas sin mayor problema.
4. Una vez colocada la caja de evaluación, la lámpara y la cámara se puede proceder a realizar la evaluación de los animales.

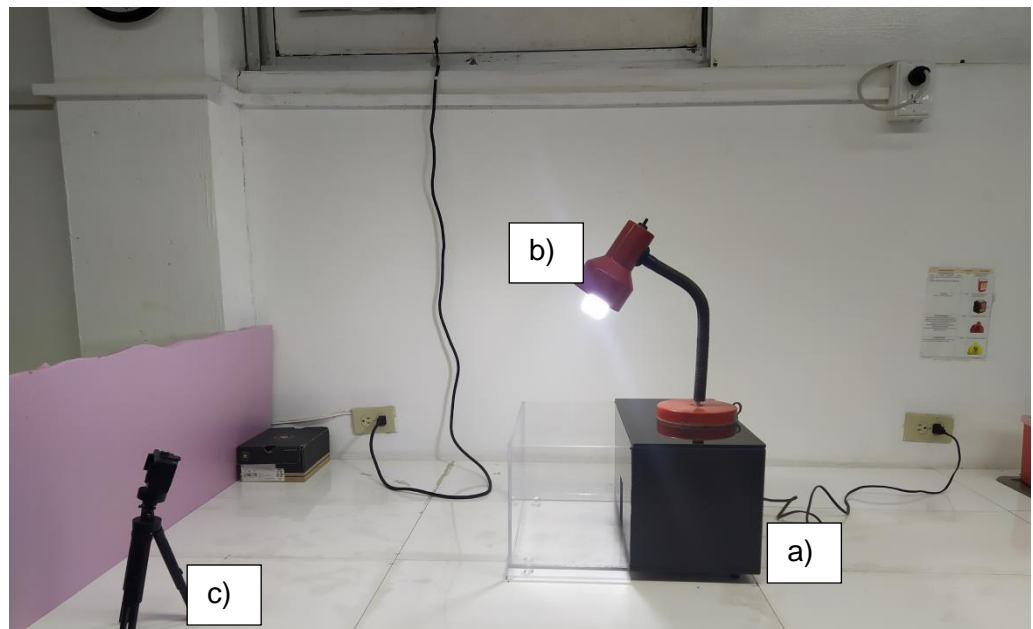


Imagen 16.-Preparación de la caja luz/oscuridad.

- a) La zona de la caja se encuentra marcada para asegurar que sea colocada en el siempre en el mismo lugar.
- b) La lámpara ilumina toda la zona descubierta lo que genera mayor presencia de luz.
- c) Para visualizar ambos compartimentos, la cámara de vídeo se dispone en un costado o frente a la caja, según la preferencia del evaluador.

Fase de evaluación

1. Con el uso de un tubo de manejo o con la técnica de la mano ahuecada se coloca a un solo ratón en el centro la zona iluminada (ver vídeo 1, 2 y 3).
2. El evaluador debe de colocarse en una posición tal que observe ambas zonas desde un punto medio, es decir, que se encuentre a la mitad de la caja, el será el encargado de monitorear y manejar los cronómetros para medir los tiempo en la zona luz y la zona oscura.

NOTA: Es necesario evitar que se maneje a los ratones sosteniéndolos de la base de la cola, puesto que esto induce estrés y genera alteraciones en las conductas ansiosas de los animales (ver vídeo 2 y 3).

3. La contabilización del tiempo de prueba es iniciada con un cronómetro, una vez que el ratón es colocado en la caja, usando una cuenta regresiva de 5 minutos (o 10 minutos según sea el caso) con un cronómetro, a la par se inicia la videograbación. La medición del tiempo que el ratón pasa en la zona iluminada (TL) se hace con otro cronómetro, que se inicia a la par de la cuenta regresiva.
4. Cuando un ratón tenga las cuatro patas dentro la zona oscura, se debe parar el conteo del tiempo en la zona iluminada y con otro cronómetro iniciar el conteo en la zona oscura (TO). Este paso debe repetirse cada que un ratón pase de una zona a otra.

NOTA: La primera pausa de tiempo cuando un ratón cruza por primera vez de la zona iluminada a la zona obscura se considera la latencia de entrada (LA), por lo que el evaluador debe de estar capacitado para identificar este momento.

5. Cada vez que un ratón pose las cuatro extremidades en una zona, se considerará un cruce, el cual debe ser registrado.

El registro de estas variables se representa en los vídeos 4, 5 y 6 del anexo de este trabajo.

Fase final de la prueba

1. Una vez que concluya el tiempo general de evaluación (5 o 10 min) se deben detener los cronómetros de registro y la videograbación.
2. Con un manejo no aversivo se debe de regresar al ratón evaluado a una caja de alojamiento limpia.
3. El registro completo de la prueba debe de incluir los tiempos en luz, los tiempos en oscuridad, la latencia de entrada, el número de cruces y las posturas que se observen en la videograbación.
4. Al término de cada evaluación, y una vez retirado el ratón de la caja de evaluación, se debe de proceder a limpiarla eliminando cualquier rastro de orina o heces y desinfectarla con alcohol al 70%.

NOTA: Estos pasos se deben realizarse cada que se termine una evaluación.

5. Cuando la caja esté limpia, se procederá a repetir los pasos de su preparación y los pasos de una nueva fase de evaluación.
6. Una vez concluidas todas las evaluaciones, se debe hacer una limpieza y desinfección la caja con alcohol al 70% y proceder a desmontar el cuarto de evaluación.

Anexo Prueba de caja luz/oscuridad

Para un mejor entendimiento del proceso de realización de esta prueba se pueden consultar los videos los vídeos 4, 5 y 6 incluidos en los anexos de este trabajo.

Prueba de enterramiento de canicas

Aspectos generales

La prueba de enterramiento de canicas, también llamada prueba de excavación, fue diseñada para observar y medir la modificación de esta conducta de los ratones en situaciones particulares o variables a las que se expone a los animales. La conducta de excavación compulsiva se ha asociado con la aparición de conductas repetitivas en modelos murinos, similares a las observadas en los trastornos obsesivo compulsivo (TOC) y trastornos del espectro autista (TEA) de los seres humanos (33).

La prueba se basa en la conducta innata de los ratones de excavar y enterrar objetos en diferentes sustratos, la cual es expresada como mecanismo de defensa ante objetos que consideran aversivos. Al colocar a un ratón en su caja con material de cama y un número determinado de objetos brillantes (canicas) se genera un conflicto en los ratones, quienes tienen aversión hacia la presencia de objetos desconocidos en su ambiente. Esto desencadena la expresión de conductas de excavación, que tiene la finalidad de ocultar dichos objetos, esta conducta es temporal, ya que normalmente finaliza transcurrido un tiempo, debido a que los ratones dejan de percibir el objeto como un estímulo aversivo. Sin embargo, está reportado que ante variables que desencadenan estados ansiosos persistentes, el número de canicas enterradas aumenta (57). Es así que el enterramiento excesivo de canicas es el punto de partida en la identificación de cambios en los estados ansiosos, ya que a través de esta prueba, se ha permitido valorar el efecto ansiolítico de diversos fármacos, cuya administración en modelos murinos fue correlacionada con la disminución de canicas enterradas (110).

Es considerada una prueba práctica, fácil de ejecutar y económica dado que no requiere de otro equipamiento especial más allá de las cajas de alojamiento, el sustrato de cama y canicas de vidrio. Gracias a su simplicidad, la capacidad de evaluar múltiples ratones a la vez y de generar datos útiles, es una opción en laboratorios que busquen iniciar un trabajo conductual relacionado con conductas de tipo ansioso (111).

Fundamento etológico

El comportamiento de excavar se ha observado de manera innata en ratones bajo condiciones de laboratorio, por ejemplo, en las cajas de alojamiento los ratones tienden a excavar el sustrato para construir nidos o bien para ocultar objetos como materiales de enriquecimiento, alimento e incluso se ha observado que realizan dicho comportamiento para esconder cadáveres de compañeros de caja (104). Este comportamiento es considerado como una respuesta sensible a diversos factores y se puede modificar por diversos tratamientos farmacológicos o lesiones a nivel cerebral, además de ser útil para realizar el fenotipo de diversas cepas de ratones (112). Njung'e y Handley han reportado que la excavación excesiva/repetitiva es un comportamiento estereotipado asociado a estados de ansiedad alterados, reportando que el diazepam, fármaco ansiolítico, administrado a diferentes dosis, redujo la acción de excavar en ratones (110). Al exponer a los ratones a un determinado número de objetos en sus cajas, se podrá visualizar el grado de excavación que expresan y determinar la existencia de alguna alteración en la respuesta conductual. Gracias a la base innata de este comportamiento, esta prueba es reconocida por no causar un daño, dolor o sufrimiento prolongado en los ratones que son evaluados, brindando la oportunidad de realizar evaluaciones conductuales simples pero significativas. Los datos obtenidos a partir de esta prueba, como el número de canicas enterradas, el tiempo de excavación y la profundidad de la excavación, se pueden medir y analizar para encontrar alteraciones a nivel conductual (111).

Consideraciones antes de efectuar la prueba

Las pruebas que evalúan el comportamiento de tipo ansioso son susceptibles a diversos factores, este caso no es la excepción, por lo que se debe de tomar en consideración los siguientes puntos antes de iniciar la prueba:

- Esta prueba se puede emplear de manera indistinta en ratones de ambos sexos
- Las diferencias de cepa, peso, edad y tamaños entre los ratones influyen en los resultados de la prueba, por lo que es recomendable mantener estos parámetros lo más homogéneos posible.

- Identificar correctamente a los animales facilitará el seguimiento de los sujetos durante el periodo de prueba, por lo que el marcaje de la cola es una buena opción para identificar a los ratones.
- Solo se puede realizar un máximo de 2 evaluaciones por ratón.
- Solo se debe colocar a un ratón por caja de evaluación, pero a diferencia de otras pruebas, se pueden colocar varios ratones de manera simultánea en diferentes cajas.
- El tiempo máximo y único de duración de esta prueba es de 30 minutos.
- Realizar videograbaciones de las pruebas permite generar un registro de las pruebas realizadas, para analizar con mayor detalle el comportamiento.
- El enriquecimiento ambiental ayuda a promover la excavación en los ratones, por lo que es recomendable que sea proporcionado antes y después de los periodos de prueba.

Materiales requeridos

- Cajas de alojamiento limpias
- Material de cama (preferible viruta de madera/aspen chip)
- Canicas de vidrio de 1.5 cm de diámetro
- Atomizador con alcohol al 70 %
- Bolsa de desechos de cama
- Tapas de caja transparentes
- Marcador plumón de tinta indeleble
- Cronómetro
- Hoja de registro
- Regla
- Cámara de foto/video

Fase de preparación

Preparación de los animales

1. La presencia de otras personas influye en la expresión de algunos comportamientos al generar estrés en los animales, por lo que los observadores y/o manejadores deben de haber realizado y practicado una habituación con manejo no aversivo en los animales previo a la realización de las pruebas (vídeos 1, 2,3).
2. Marcar a los animales a evaluar con un marcador de tinta indeleble para la correcta identificación de los mismos.
3. Llevar a los animales al lugar de evaluación antes de iniciar cualquier prueba.

Nota: El lugar de evaluación debe ser diferente al cuarto de alojamiento para evitar que los estímulos como ruidos, vocalizaciones u olores que se presentan durante la prueba, provoquen estrés en los demás animales del alojamiento.

4. Permitir que los animales transportados al lugar de realización de la prueba, tengan al menos 30 minutos en la nueva ubicación antes de iniciar la evaluación, para permitir que retomen un estado de tranquilidad.

Preparación de la caja de evaluación

1. Llenar una caja de alojamiento limpia con 5 cm del material de cama, aplanarlo con la mano dejando la superficie firme y uniforme (Imagen 17).
2. Colocar 20 canicas en hileras de 4 filas de 5 canicas cada una, distribuidas de manera uniforme sobre el material de cama por toda la superficie, procurando que ninguna se mueva o hunda (Imagen 18).
3. Una vez colocadas las canicas, tomar una foto vista desde arriba la cual será un registro previo que se utilizará para hacer una comparación al finalizar la prueba (Imagen 18).
4. Colocar la cámara de video de tal forma que se tenga una vista general de la caja (Imagen 19).

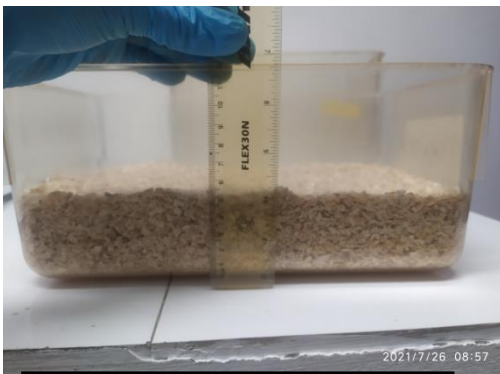


Imagen 17.-Caja con 5 cm de viruta/material de cama.



Imagen 18.- Ejemplo de caja con acomodo de canicas.

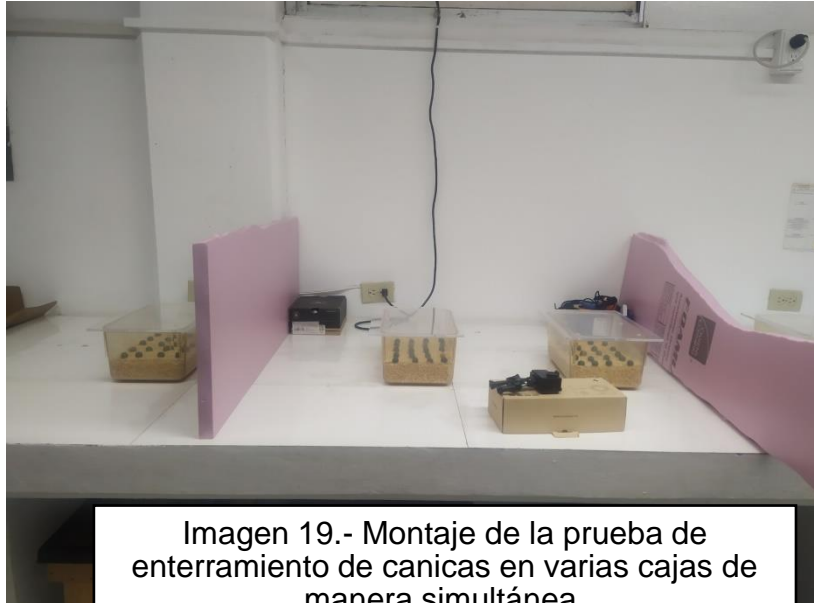


Imagen 19.- Montaje de la prueba de enterramiento de canicas en varias cajas de manera simultánea.

Fase de evaluación

1. Colocar al ratón en una de las esquinas de la caja, procurando no mover ninguna canica con esta acción (Imagen 20, 21) y colocar una tapa transparente para cubrir la caja.
2. Una vez que el ratón tiene las cuatro patas en la caja, se inicia el conteo del tiempo de duración de la prueba (30 min) con un cronómetro, a la par se inicia la videograbación.
3. Durante el tiempo de evaluación se puede registrar a la par con otros cronómetros el tiempo de excavación de cada animal.

Nota: La sencillez de esta prueba posibilita la evaluación simultánea de varios animales en cajas diferentes, en una sola ronda siguiendo los pasos de la preparación de caja y la fase de evaluación (Imagen 22).

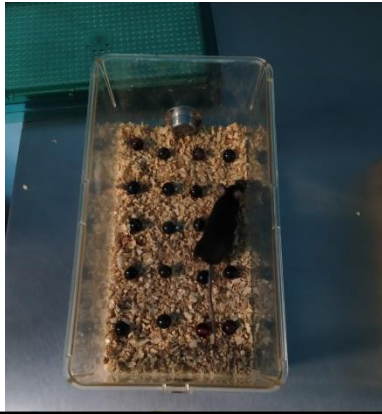


Imagen 20.-Colocación de un ratón para la prueba de enterramiento de canicas



Imagen 21.- Colocación de ratón para la prueba de enterramiento de canicas.

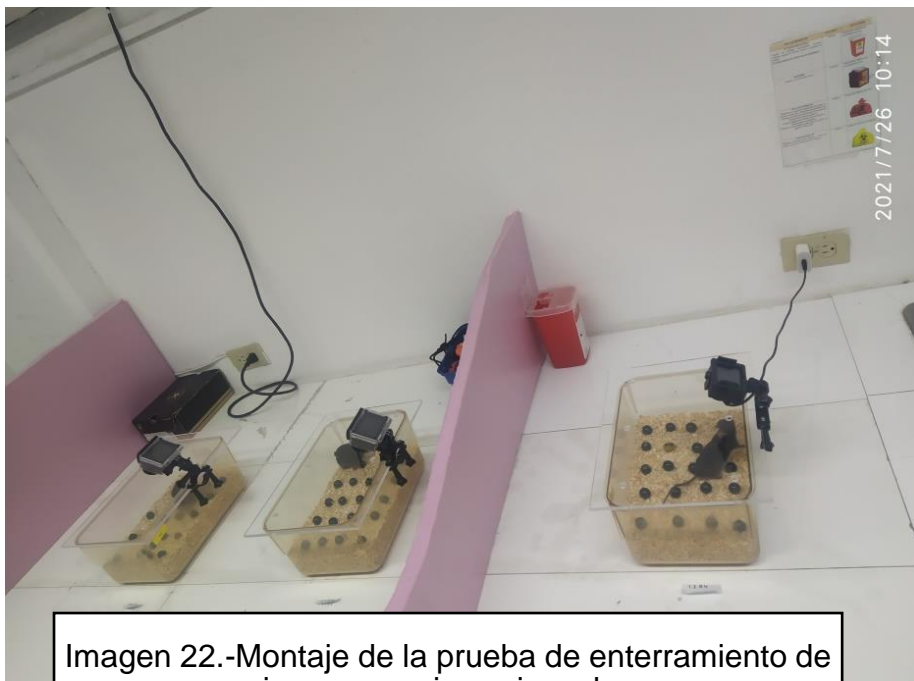


Imagen 22.-Montaje de la prueba de enterramiento de canicas con varias cajas a la vez.

Fase final de la prueba

1. Una vez concluido el tiempo de evaluación, se debe detener la videograbación y retirar a los ratones con sumo cuidado, evitando mover o alterar la posición de las canicas y de la excavación realizada por los mismos.
2. Antes del conteo de canicas enterradas y no enterradas, se debe de tomar una foto vista desde arriba, para poder realizar la comparación del antes y el después de la prueba (Imágenes 23, 24, 25,26).
3. En caso requerido, se puede hacer un registro del grado de excavación por caja antes de iniciar el conteo de canicas enterradas (Imagen 27).
4. Contabilizar y registrar el número de canicas enterradas por ratón.

NOTA: Una canica se considera enterrada cuando tres cuartas partes de su superficie están cubiertas por el material de cama (Imagen 28 y 29).

5. Una vez terminado el conteo, se retiran todas las canicas y se les lava y desinfecta con alcohol al 70%
6. Al final de la prueba, el material de cama en la caja debe desecharse, la caja debe limpiarse con alcohol al 70 % y colocarse con nuevo material de cama para ser utilizado una vez más
7. Se repiten los pasos de la fase de preparación, antes de proceder a una nueva evaluación.
8. Una vez concluidas todas las evaluaciones, se desecha apropiadamente todo el material de cama y se lavan todas las canicas usadas.

Anexo prueba de enterramiento de canicas

Para un mejor entendimiento del proceso de realización de esta prueba se pueden consultar los vídeos 7,8 y 9 incluidos en los anexos de este trabajo.

Imágenes Pruebas de enterramiento de canicas

Imagen 23.-Caja con canicas antes de iniciar la prueba

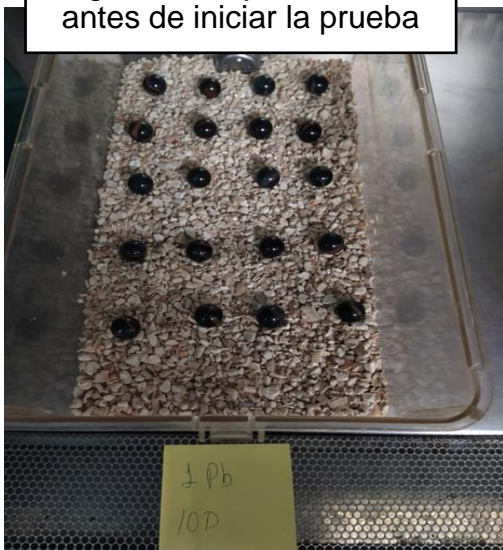


Imagen 24.- Caja con canicas después de la prueba



Imagen 25.- Caja con canicas antes de iniciar la prueba



Imagen 26.- Caja con canicas después de la prueba





Imagen 27.- Ejemplo del grado de excavación (indicado con una línea negra) en una caja de evaluación al finalizar la prueba de enterramiento de canicas.

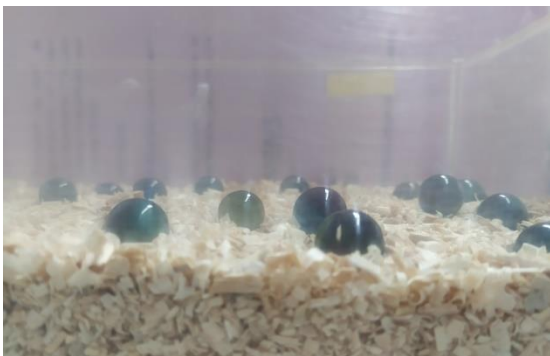


Imagen 28.- Canicas no enterradas colocadas en la superficie de la caja de evaluación.



Imagen 29.- Canicas enterradas después de realizada la prueba.

Pruebas de agresión

Características generales de la conducta agresiva

La conducta agresiva es concebida como parte del repertorio de comportamientos agonísticos presentes en los animales y pertenecen a una forma de interacción social, relacionados con enfrentamientos y oposiciones entre individuos (113). Históricamente en 1978, Lorenz describió la conducta de agresión desde un enfoque etológico, indicando que la misma deriva de una base fundamental de instintos e impulsos tradicionales asociados con la comunicación animal. Actualmente la etología centra su atención en explicar las causas y formas adaptativas de dicho comportamiento, resaltando que parte de las causas de la generación de la conducta agresiva están relacionadas con el establecimiento de ventajas biológicas en vida libre (114).

De manera general el término “violencia” se utiliza como sinónimo de “agresividad”, sin embargo, los estudios en animales sugieren que la agresión y la violencia son fenómenos distintos, por lo que es importante definir ambos términos para evitar confusiones (115). La conducta de agresión es una forma de interacción social que conduce a un punto donde una de las partes involucradas acepta un sometimiento y se obtiene una cierta ventaja en cuestión, por ejemplo, el acceso primordial a algún recurso. Por su parte, el término “violencia” no existe como tal en animales, si bien se reconoce el caso de animales que exhiben agresión escalada/patológica que se define como una forma exagerada de agresión que culmina en un daño extremo (116).

El comportamiento agresivo, al ser una forma de comunicación adaptativa, es parte de los repertorios conductuales normales de los animales, cada especie se caracteriza por poseer manifestaciones y despliegues propios de conducta agresiva, con patrones definidos que se pueden observar al existir un contacto entre oponentes (117). La manifestación considerada como la adecuada de la conducta agresiva depende del contexto en el que se desarrolla, de la especie en cuestión, de la biología y del estado de salud de los animales para expresarse de forma adecuada. Los patrones conductuales agresivos que se observan en los animales van desde posturas corporales, erizamiento del pelo, gruñidos y vocalizaciones para intimidar/ amenazar a otro sujeto, hasta ataques

físicos directos que incluyen mordidas, golpes, derribos y persecuciones (118)(119).

La clave para diferenciar la conducta agresiva normal de una conducta agresiva patológica está en describir la secuencia de patrones expresados en un encuentro entre un actor y su oponente (120). Natarajan y Caramasch (121) han descrito las secuencias cronológicas de la expresión de patrones conductuales agresivos, postulando que la presentación de una conducta agresiva incluye cuatro eventos sucesivos:

1. **Intención.** Cuando un animal tiene un encuentro con un oponente, ambos evalúan la situación a través de una serie dinámica de movimientos que incluyen la observación, olfateo y vocalización durante un breve periodo de tiempo. En una situación típica de encuentros agonísticos, esta parte permite estimar si el encuentro puede convertirse en pelea o bien reconocer que no hay necesidad de llegar a ello.
2. **Ritualización.** Es el siguiente paso en el patrón de conducta, se caracteriza por la expresión de acciones agonísticas discretas, transitorias y que no implican un contacto directo, dichas acciones suelen considerarse una advertencia del potencial del contrincante, ya que a menudo suelen exponer sus “armas” (dientes, garras, tamaño, realizar azotes de colas o extremidades, etc.). En este punto los encuentros agonísticos se pueden resolver sin una lucha, gracias a que el ritual de exponer su equipamiento de ofensa/defensa cumple la función de mandar una señal suficientemente clara para evitar una pelea.
3. **Pre-escalamiento/agresión mediada.** En esta etapa ocurre lo que se considera una agresión normal, en la cual se presenta el contacto físico directo entre los dos oponentes (pelea) y se exhiben empujones, patadas, golpes de cola, mordeduras, etc. Este paso concluye con la rendición por parte de uno de los contrincantes, y con el establecimiento de una dominancia entre los oponentes.
4. **Agresión escalada.** En una agresión animal normal, la pre-escalación suelen marcar la finalización de un encuentro, sin embargo, se dan casos donde ningún oponente se retira o bien existe una alteración de la

conducta, que comienza con la última secuencia del patrón conductual, marcada por acciones más enérgicas y potencialmente peligrosas (por ejemplo: morder puntos vitales o atacar zonas más sensibles como los genitales), este aumento progresivo de la intensidad del conflicto es denominado escalada y es considerado poco común en los encuentros agonísticos. Si en este punto cualquier participante se retira, la escalada se considera corta, pero de no ser así entonces el conflicto se resolverá hasta que alguno de los participantes ya no pueda continuar o en casos extremos pierda la vida.

La agresión escalada no suele presentarse en todas las peleas de la vida del animal. Su ocurrencia puede verse favorecida en situaciones extraordinarias, por ejemplo: cuando existe una limitación de recursos, un riesgo de mantener/obtener estatus social o bien algún factor externo que genere una alteración de la agresividad

Resumiendo, la agresividad normal/mediada es un comportamiento adaptativo, funcional, dinámico, flexible y con un grado de estructura logrado mediante un patrón de acciones/reacciones entre los oponentes en conflicto, su fin es causar solo el daño estrictamente necesario para alcanzar un objetivo, a diferencia de la agresión escalada, considerada una alteración conductual que suele ser descontrolada al grado de causar daños irreversibles hacia el oponente sin un objetivo funcional (121).

Es importante considerar estos criterios en los estudios donde se evalúa la agresión en los diversos modelos animales. Es conocido que los ratones presentan una cadena de conducta agresiva bien caracterizada bajo condiciones de laboratorio, lo que ha permitido generar diversos modelos para el estudio de la agresión(29)(123). Comprender y conocer la “cadena de comportamiento agresivo” que poseen dichos modelos, es fundamental, como referencia para juzgar lo que se considera una conducta normal (122) y diferenciarlo de algún cambio relacionado con alguna variable en el estudio.

El conocimiento de la cadena del comportamiento agresivo de los ratones durante un encuentro agonístico ha permitido establecer pruebas conductuales con diversas variables de agresión, por el contrario el desconocimiento de las secuencias de agresión puede generar confusión e interpretaciones erróneas entre la agresión mediada y las formas anormales de agresividad. En la actualidad se cuentan con los resultados de investigaciones que se han enfocado a describir cuestiones de la heredabilidad del comportamiento agresivo, de los genes involucrados en su modulación, de los factores ambientales que podrían modificarlo y las diversas áreas del cerebro que se relacionan con su expresión (126).

Se han establecido además, criterios para seleccionar a las cepas de ratones que resultan más adecuadas como modelos de agresividad, siendo las cepas C3H,CBA y CD1 las que muestran una mayor prevalencia de conducta agresiva, mientras que las cepas C57BL/6 y BALB/c exhiben una prevalencia baja. Por otro lado, la crianza selectiva de ratones con deficiencia de receptores de serotonina del tipo 5-HT (1A) involucrados en la modulación de la conducta agresiva ha permitido el desarrollo de diversas líneas de ratones agresivos (TA) y líneas no agresivas (TNA)(124), así como de ratones salvajes (WT) con latencias cortas (SAL) y largas (LAL) de ataque (125). Las interacciones agonísticas de estas líneas coinciden con la secuencia descrita por Natarajan y Caramasch (121).

Comportamiento de tipo agresivo en ratones de laboratorio

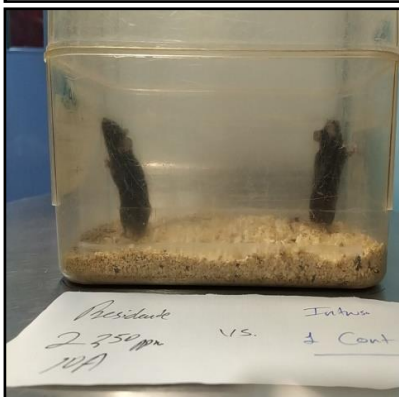
Como hemos señalado, para obtener e interpretar los resultados de las evaluaciones de conducta agresiva es necesario identificar correctamente los patrones en cada parte de la cadena de comportamiento agresivo en ratones, para ello resultan de gran utilidad los trabajos como el de Mackintosh y Grant (127), que describieron un patrón de posturas de conducta social en diferentes roedores, incluidos los ratones, y el desarrollado por el Dr. Joseph Garner de la Universidad de Stanford, quien publicó el "Etograma del ratón" que, con el apoyo de diversos vídeos, muestra diferentes comportamientos de la especie (123). Sin embargo, es necesario señalar que en ambos casos la parte de agresividad es desarrollada de manera general y sin una descripción de los patrones que se presentan durante un encuentro agonístico.

Por lo anterior, tomando como referencia la secuencia descrita por Natarajan y Caramasch, en este apartado se describirá los patrones conductuales agresivos del ratón y las variables identificadas en los encuentros agonísticos durante las pruebas de agresión practicadas para la elaboración del presente trabajo, las cuales son descritas en el siguiente apartado.

Intención

Es el inicio de la cadena de conducta agresiva, se expresan en combinación con la conducta exploratoria (Imagen 30), la cual permite a los ratones evaluar la zona en la que se encuentran. Puede ir acompañada de interacciones sociales con olfateos ano-genitales (OAG) (Imagen 31), por parte de ambos ratones, siendo esta una variable a registrar. En algunas ocasiones se puede observar el denominado “*all-grooming*” (Imagen 32) en ambos ratones como parte de una interacción social. En este punto ambos ratones consideran si se procede o no con el encuentro agonístico.

Imagen 30.-Exploración



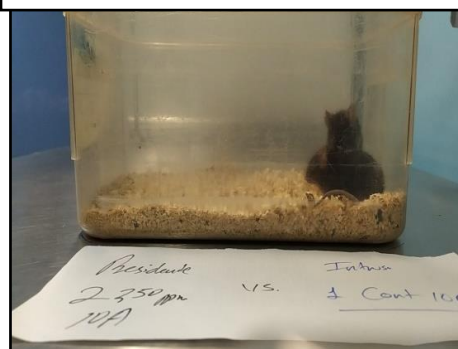
Los ratones exploran primero el área, antes de cualquier interacción, mostrando posturas en dos patas como una manera de identificar olores.

Imagen 31.- Olfateo Ano-genital



Posterior a la exploración, los ratones realizan un olfateo ano-genital como una forma de interacción para determinar si existe un reconocimiento entre ellos.

Imagen 32.- All-grooming

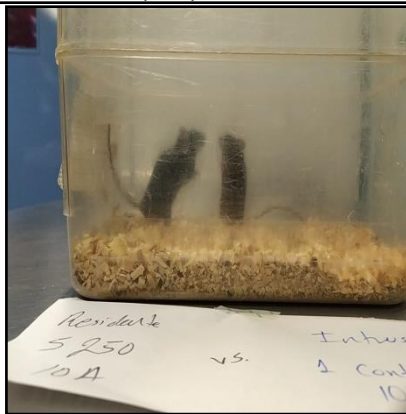


El “*all grooming*” o acicalamiento excesivo se observa en los ratones como otra forma de interacción social, donde uno o ambos se acicalan diferentes zonas del cuerpo de forma repetida.

Ritualización

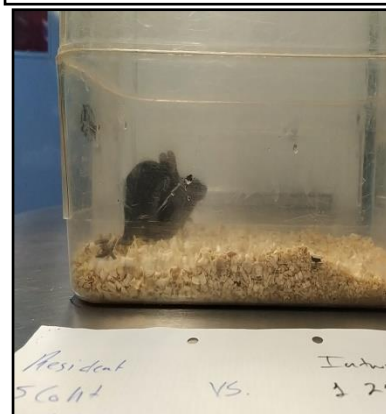
El siguiente paso es la ritualización, en la cual los ratones expresan posturas de amenaza, siendo los traqueteos de cola (TC) (Imagen 33) una variable de registro, porque se ha observado que anteceden a un ataque. Las montas (Imagen 34) son otra variable que se llega a observar en este punto, que suele presentarse en los machos tanto en la conducta agresiva como en la conducta sexual. En las jerarquías estables, las amenazas bastan para generar la sumisión y/o huida por parte de uno de los contrincantes, con lo que finaliza el encuentro. En algunos casos durante esta fase se pueden presentar mordidas (Imagen 35) y persecuciones (Imagen 36), aunque suelen ser poco frecuentes.

Imagen 33.-Traqueteo de Cola (TC)



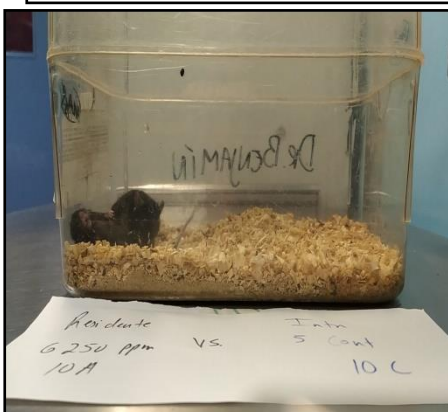
El traqueteo de cola (TC) se observa como un movimiento constante de la cola para generar un ruido de advertencia para anunciar un ataque al contrincante.

Imagen 34.-Montas



Las montas (MO) son otra forma de dominancia presente en machos, pero poco frecuentes durante un encuentro.

Imagen 35.- Mordidas



Las mordidas (MOR) son observadas durante un ataque. Van dirigidas a zonas específicas como el dorso o los genitales.

Imagen 36.- Persecución



Las persecuciones (PER) se caracterizan por seguir a un contrincante en la caja durante un ataque y son parte del patrón de conducta agresiva.

Pre-escalación/agresión mediada

La agresión mediada representa la gran mayoría de las interacciones agonísticas de los ratones, siendo los dominantes los que expresan la conductas ofensivas de la agresión que incluyen posturas de “*Parryng*” (PA) (Imagen 37), postura que consta de caminar y “aumentar” su tamaño, seguidas de posturas de “*Boxing*” (BX) (Imagen 38), donde realizan movimientos intencionados combinados con golpes y patadas alternados hacia el oponente, acompañados con mordeduras agresivas (MO) hacia zonas específicas: dorso, abdomen y zona genital. Los ratones contrincantes muestran la parte defensiva de la conducta de agresión, que consta de posturas de “*Clinch*”, donde parado sobre sus patas traseras, el animal estira las patas delanteras a modo de evitar/alejar el ataque del ratón que exhibe los patrones ofensivos. De manera general este punto del patrón de defensa termina con una postura de sumisión (PS) (Imagen 39) por parte del ratón defensivo, que consiste en colocarse en posición erguida con las patas delanteras retraídas y el vientre expuesto. Una vez mostrada la sumisión por parte de un ratón, las interacciones agonistas finalizan inmediatamente generando un estado de dominio-subordinación. Todas las variables mencionadas se pueden contabilizar como parte de las evaluaciones de agresión normal de los ratones.

Imagen 37.-“*Parryng*”



Las posturas de *parryng* son evidentes cuando ambos animales se muestran alertas y dispuestos a pelear.

Imagen 38.- Pelea/"*Boxing*"



Los ratones usan sus patas para golpear y se mantienen erguidos para buscar someter a su oponente.

Imagen 39.- Postura de sumisión

La agresión termina cuando un ratón muestra una postura de susmisión, retrayendo las manos, mostrando el abdomen en señal de rendición.



Agresión escalada

Esta situación ocurre cuando las interacciones aumentan de intensidad al grado de convertirse en peleas que ponen en riesgo la vida de los oponentes. Los ratones muestran alteraciones en esta parte de la cadena de agresión, dado que no existe sumisión por parte de algún oponente o bien existe una alteración por parte del agresor. Los ataques son constantes (Imagen 41) con mordidas hacia zonas vitales, aun cuando uno de ellos haya mostrado ya una postura de sumisión, o un sometimiento total (Imagen 40), el ratón atacante continuará exhibiendo conductas agresivas, en el mejor de los casos aceptara la sumisión del otro individuo, sin embargo al ser un estado poco común, la constante expresión de agresividad puede desencadenar otras conductas en el ratón sumiso (de miedo por ejemplo) (Imagen 42). En este punto todas las formas de ataque son muy variadas, por lo que se pueden contabilizar para determinar la alteración en la conducta agresiva, aunque se debe tener extrema precaución durante este evento puesto que la agresión puede llegar a ser peligrosa para los ratones al provocarles lesiones graves en diversas zonas del cuerpo (como una castración) o en el peor de los casos terminar en la muerte del ratón sumiso.

Imagen 40.-Sometimiento

Aún cuando un ratón expresa una postura sumisa, el otro busca seguir con el sometimiento y los ataques de forma constante.

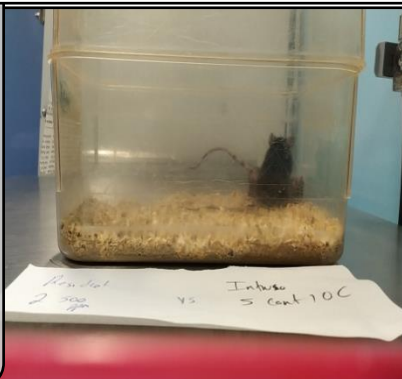


Imagen 41.-Ataque constante

Aunque un ratón muestre una postura de sumisión, el otro sigue atacando de forma constante.

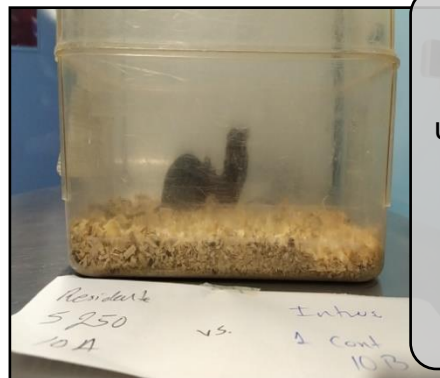
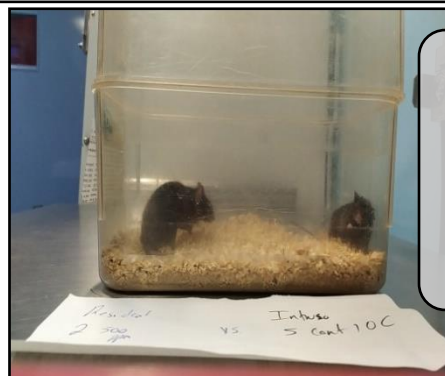


Imagen 42.- Amenaza constante

El ataque puede ser tan grave que algunos ratones llegan a expresar posturas de miedo.



Pruebas de agresión en ratones

Arena neutral

Aspectos generales

La prueba de arena neutral , también conocida como prueba de oponente estándar (128), es una evaluación que posibilita la identificación en los roedores de una gama amplia de comportamientos sociales (donde se incluye la agresión), por lo que se utiliza como prueba de comportamiento estándar, a partir de la cual, sobre la base de conductas observadas en esta prueba puede elegirse una prueba más específica (129). La diferencia principal entre la prueba de arena neutral y la prueba de intruso/residente, radica en la ausencia de señales olfativas por parte de los ratones en un lugar determinado, lo que la hace ideal para que estos puedan expresar una amplia gama de conductas sociales (130).

El fundamento de esta prueba es la observación durante un periodo corto de tiempo, del comportamiento social innato de los roedores al interactuar en un área nueva, en la que se ha eliminado el marcaje olfativo de los participantes (de aquí el nombre de arena neutral) para favorecer la expresión de las interacciones sociales (130). Esta prueba es útil para revisar el comportamiento, cuando no se tiene algún antecedente conductual, de ratones de cepas nuevas o mutantes de laboratorio (12). Al realizar una primera evaluación con la prueba de arena neutral se observan las interacciones de los ratones bajo condiciones imparciales, lo que permite establecer un estándar de la conducta. Lo anterior dicho, facilita la posterior evaluación con la prueba de intruso/residente, debido a que funge como prueba basal que descarta alteraciones previas a la evaluación detallada del comportamiento agresivo (30). Es importante recalcar que la prueba de arena neutral se ha empleado para caracterizar la agresividad en los ratones (131), sin embargo, no debe considerarse la única evaluación para esta conducta, puesto que al ser una prueba para el comportamiento social, los patrones de conducta observados durante su ejecución son variados, lo que dificulta visualizar conductas específicas, como lo es la conducta agresiva (123).

Fundamento etológico

Gracias a que el comportamiento de los ratones está definido y es replicable en diversas condiciones, su empleo es pertinente para la visualización de conductas sociales derivadas de su tendencia de establecer jerarquías. Dado que los contextos cambian la forma de expresión de la conducta social de los ratones, el proporcionar un entorno neutral permite que las diversas interacciones sean posibles entre dos individuos (123).

La adaptabilidad de los ratones de laboratorio los volvió gregarios facultativos, es decir, pueden interactuar entre ellos en sus cajas de alojamiento sin necesidad de ser agresivos (132). De acuerdo con autores como Crawley (133) y Wahlsten (34), se conoce que los ratones al encontrarse en un entorno nuevo, siempre expresan conductas exploratorias y de interacción con algún individuo de su especie, gracias a sus habilidades sensoriales logran realizar un reconocimiento por medio de conductas como el olfateo, el seguimiento y el acicalamiento, con la finalidad de determinar, si es necesario, pasar por un encuentro agonístico (en el caso de los machos), lo que daría paso a la presentación de la conducta agresiva por ambas partes para el establecimiento de una dominancia en una zona neutral.

Los patrones de conducta observados durante esta prueba son variados, cada interacción cambia acorde a la situación (123), de esta manera puede existir un contacto que varía de significado conforme a la situación, por ejemplo: un ratón puede agacharse para expresar una conducta, si el ratón receptor responde atacando, se considera como un patrón agresivo, por el contrario, si el ratón receptor realiza un acicalamiento como respuesta, entonces el patrón cambia a ser un reconocimiento social (122). Por ende es de suma importancia conocer y diferenciar entre los distintos patrones de comportamiento de los ratones durante esta prueba y establecer el repertorio de conductas a contabilizarse, para ello una vez iniciada la prueba se procede a realizar una contabilización de los comportamientos de interés observando los diferentes patrones y posturas que expresan los individuos.

En el presente trabajo se presentan en los vídeos 10 y 11 los principales patrones de conducta exploratorio y de interacción social que desarrollan los

ratones durante la prueba de arena neutral, tal manera que se facilite la correcta identificación de los mismos y el registro de los resultados para su posterior interpretación. El patrón de conducta agresiva será descrito a detalle en la prueba de intruso/residente.

Consideraciones antes de efectuar la prueba

Para llevar a cabo esta prueba es importante tomar en consideración los siguientes puntos:

- Las diferencias de cepa, peso, edad y tamaño entre los ratones influyen en los resultados de la prueba, por lo que es recomendable mantener estos parámetros lo más homogéneos posible.
- Identificar correctamente a ambos oponentes facilitará el seguimiento de los sujetos durante el periodo de prueba, para este fin, el marcaje de la cola es una buena opción que permite fácilmente discriminar a cada participante durante la prueba.
- Las sesiones de prueba deben tener una duración máxima de 10 minutos, pero por razones, en caso de presentarse ataques y/o mordidas intensos, la prueba debe darse por terminada antes de concluir este período, para garantizar la integridad de los animales.
- La realización de videograbaciones de las pruebas permite generar un registro que puede ser revisado repetidas ocasiones y de manera detallada, incluso por varios evaluadores, lo que favorece un mejor análisis de los resultados.

Materiales requeridos

- Cajas de alojamiento estándar limpias
- Material de cama limpio
- Cubierta o tapa de caja transparente
- Atomizador con alcohol al 70%
- Cronómetro
- Cámara de video
- Bolsa para desecho para material de cama
- Hoja de registro

- Marcador/plumón de tinta indeleble
- Tubos de manejo para ratón (opcional)
- Contador de mano (opcional)

Fase de preparación

Preparación de los animales

1. La presencia de otras personas influye en la expresión de algunos comportamientos la generar estrés en los animales, por lo que los observadores y/o manejadores deben de haber realizado una habituación con manejo no aversivo en los animales previo a la realización de las pruebas (vídeos 1,2 y 3).
2. Marcar a los animales a evaluar con un marcador de tinta indeleble para la correcta identificación de los mismos.
3. Llevar a los animales al lugar de evaluación antes de iniciar cualquier prueba, procurando que no exista un contacto previo entre los grupos a evaluar.

Nota: El lugar de evaluación debe ser diferente al cuarto de alojamiento para evitar un estrés hacia los demás animales en el alojamiento durante la prueba, esto debido a que pueden existir vocalizaciones y ruidos de los animales durante la prueba que generan estrés, además no debe de existir ruido excesivo y/o presencia de otros animales distintos a los que se van a evaluar en el cuarto de evaluación.

4. Dejar un lapso de al menos 30 minutos a los animales en el lugar de evaluación para permitir que retomen un estado de tranquilidad previo a las evaluaciones.
5. Transcurrido el tiempo anterior se procede con la evaluación en la arena neutral.

Preparación de la Arena Neutral

- 1.- Colocar en una caja limpia material de cama nuevo hasta tener al menos 1 cm de espesor para formar la arena neutral (Imagen 43).
- 2.- Marcar la zona en la que se colocará la arena neutral, la cual, antes del inicio de la prueba, debe estar fuera de la vista de los animales (Imagen 44).
- 3.- Para realizar una videograbación se debe colocar el dispositivo frente a la arena, impidiendo que pueda ensuciarse por encontrarse demasiada cerca de la misma.
- 4.- Para cada evaluación es necesario preparar una nueva arena neutral repitiendo el paso 1.



Imagen 43.- Caja de alojamiento convertida en arena neutral. La caja debe estar completamente limpia y sin algún tipo de distractor, se debe llenar con material de cama limpio hasta cubrir un 1 cm de espesor.



Imagen 44.- Ejemplo de montaje y colocación de la arena neutral en el lugar de evaluación. El lugar preciso donde se coloca la caja debe ser marcado para evitar modificaciones con cada maniobra.

Fase de evaluación

Una vez montada la arena neutral, la cámara de vídeo y terminado el tiempo de aclimatación de los animales se procede a realizar la evaluación con los siguientes pasos:

1.-Colocar al mismo tiempo a los sujetos a evaluar en la arena neutral, evitando una sujeción inadecuada (ver vídeos10, 11,12), e instalar la tapa inmediatamente después de colocar ambos ratones en la arena.

2.-Comenzar a contar el tiempo de evaluación con ayuda del cronómetro cuando ambos animales estén en la arena. Este debe ser un mínimo de 5 minutos y un máximo de 10 minutos.

NOTA: En caso de que se produzca un encuentro agonístico y este sea de una magnitud considerable, por ejemplo, exista sangrado en algún individuo, inmovilidad constante después de un ataque o lesiones graves visibles se debe de parar la prueba en ese momento para mantener el bienestar de los sujetos experimentales.

3.- Observar a ambos sujetos y contabilizar los patrones de conducta que sean de interés (interacciones sociales, interacciones agonísticas, conductas exploratorias, etc.)

Fase final de prueba

1.-Terminado el tiempo de prueba se debe de retirar a ambos ratones de la arena neutral.

2.-Realizar un examen físico general a ambos ratones para constatar la ausencia de lesiones graves en los individuos.

3.-Regresar a los animales a cajas de alojamiento limpias, con material de cama limpio, material de enriquecimiento ambiental y trasladarlos al cuarto de alojamiento.

Nota: En caso de haber presenciado conductas agresivas durante las evaluaciones, se recomienda, dado el estrés provocado por el encuentro, alojar

a los ratones evaluados de manera individual para evitar peleas posteriores en el alojamiento.

4.-Limpiar toda la zona de evaluación con alcohol al 70% para evitar contaminación por olores previo a iniciar una nueva evaluación.

5.-Proceder a repetir los pasos desde la preparación de la arena neutral para realizar una nueva evaluación.

Anexo prueba de arena neutral

Para la facilitar la visualización e interpretación del comportamiento de los animales durante esta tipo de evaluación, se agregan los vídeos 10 y 11 en la parte de anexos de este trabajo.

Prueba Intruso/Residente

Aspectos generales

La prueba intruso/residente es considerada de elección para observar las conductas agresivas en ratones de laboratorio, siendo una evaluación estandarizada para medir tanto agresión ofensiva como defensiva bajo un entorno similar al natural. A diferencia de la prueba de arena neutral, con este paradigma se permite la expresión espontánea e innata de la agresión por parte de los ratones participantes (30).

El fundamento de esta prueba es la introducción de un ratón desconocido (intruso) a la caja de otro ratón (residente), donde a partir de la existencia del marcaje olfativo por parte del residente, se genera un conflicto entre ambos animales que suscita la expresión del comportamiento agresivo (134)(135). Es así que se observan diversos patrones y posturas exclusivas del comportamiento agresivo de los ratones. A partir del registro de estas posturas exclusivas, de las latencias y frecuencias de los ataques, pueden ser revelada la existencia de alteraciones en dicho comportamiento, lo cual es de gran utilidad en los estudios que evalúan fármacos sobre la agresión (136).

No obstante su utilidad, ha sido señalado como un importante inconveniente de la prueba la inadecuada diferenciación entre agresión ofensiva y defensiva, lo que dificulta el análisis de los resultados y da pie a errores interpretativos en las evaluaciones (137).

Además, es importante remarcar que aun cuando la prueba intruso/residente es de elección para medir agresión en diversas especies de roedores, además del ratón, se debe tener conocimiento sólido sobre las características propias de la conducta agresiva en las especies evaluadas, dado que los patrones conductuales cambian entre ellas y es necesario evitar confusiones. En este trabajo se incluyen vídeos descriptivos con el patrón de conducta agresiva propia del ratón (vídeos 12 al 17 del anexo).

Fundamento etológico

Desde un punto de vista etológico, la expresión señales físicas hacia un oponente forma parte de las interacciones agonísticas típicas (138), y el comportamiento agresivo es considerado una forma funcional de comunicación en los ratones, siendo una manera de resolver conflictos en situaciones particulares (como mantener un territorio). En el caso particular de los ratones machos, se han descrito patrones específicos durante un encuentro agonístico, los cuales siguen una secuencia de amenazas y ataques, que se expresan en mayor medida durante su alojamiento dentro de los laboratorios, contrastando con los ratones hembras que suelen ser más sociales y menos agresivas en este aspecto, razón por la cual el uso de ratones de sexo masculino en esta prueba es importante(129). Las señales olfativas que generan los machos son esenciales para el desarrollo de la conducta agresiva, al ser una forma de comunicación e interacción, que hace posible la expresión de la agresividad sin necesidad de condicionamientos previos (40).

La forma más común de generar agresividad en los ratones es a través del asilamiento de los animales que fungirán como residentes. Se ha comprobado que alojar a los ratones residentes de manera individual (por un periodo de 7 días), sin limpiar su material de cama ni realizar algún tipo de manejo, es suficiente para que se establezca una señalización olfativa en la caja de alojamiento, que constituye en un marcaje detectable por parte de los ratones intrusos, a partir del cual se despliegan como respuesta las conductas agresivas de tipo ofensivo por parte de los ratones residentes. De esta manera, la confiabilidad de la prueba para medir agresividad se sustenta en la simulación de las condiciones que se presentan en vida libre, cuando un ratón entra la territorio de otro (139)(140)(141).

Consideraciones antes de efectuar la prueba

Para llevar a cabo esta prueba es importante tener en cuenta las siguientes cuestiones:

- Al ser una prueba para visualizar agresión se debe ser consciente de que los ratones a evaluar pasarán forzosamente por un periodo de estrés y su bienestar animal se verá comprometido por lo que esta prueba solo debe ser practicada un máximo de dos veces en un mismo animal.
- El tiempo recomendado de duración de la prueba varía según la fuente que se consulte, pero suele señalarse un mínimo de 5 minutos y una duración máxima de 10 minutos para cada encuentro.
- En caso de que algunos de los ratones combatientes sufra una lesión grave que ponga en riesgo su integridad física se debe detener la prueba en ese momento con la finalidad de evitar un mayor sufrimiento generar del animal.
- Las diferencias de cepa, peso, edad y tamaños entre los ratones influyen en los resultados de la prueba, por lo que es recomendable mantener estos parámetros lo más homogéneos posible.
- Identificar correctamente a ambos oponentes facilitará el seguimiento de los sujetos durante el periodo de prueba, el marcaje de la cola es una buena opción para identificar a los ratones.
- La presencia de otras personas influye en la expresión de algunos comportamientos, por tanto los observadores y/o manejadores deben de haber realizado una habituación de los animales previo a la realización de las pruebas.
- Realizar videograbaciones de las pruebas a la par permite analizar el comportamiento más a detalle y generar un registro de las pruebas realizadas.
- Puesto que el asilamiento provoca en los animales un mayor estrés, se debe contemplar que el alojamiento grupal después de la realización de las pruebas es poco práctico dado que puede dar origen a más peleas entre compañeros de caja, por lo que se sugiere que esta prueba sea la

última en realizarse en caso de hacerse más evaluaciones durante los proyectos de investigación.

- Los protocolos indican que para realizar la prueba intruso/residente, se debe tener una evaluación previa al aislamiento de los ratones, siendo recomendada para ese efecto la prueba de arena neutral permite obtener los parámetros basales necesarios.

Materiales

- Cajas de alojamiento estándar limpias y sin uso previo
- Material de cama limpio
- Cubierta o tapa de caja transparente
- Atomizador con alcohol al 70%
- Cronómetro
- Cámara de vídeo
- Bolsa para desecho de cama
- Hoja de registro
- Marcador/plumón de tinta indeleble
- Tubos de manejo (opcional)
- Contador de mano (opcional)

Fase de preparación

Aislamiento de los ratones residentes para inducir agresión

1. Seleccionar de manera aleatoria a los ratones que serán asignados como residentes y como intrusos para la prueba.
 - a. **NOTA:** Solamente los ratones residentes requieren aislamiento, los ratones intrusos pueden mantenerse alojados en grupo.
2. Llenar una caja de alojamiento limpia con al menos 1 cm de material de cama y tapar los lados de la caja con hojas para evitar la visualización de otros ratones.
3. Colocar 1 solo ratón en la caja preparada. En el momento que se introduce al ratón corresponderá al inicio del día 1 de aislamiento.

- a. **Nota:** Al estar un único ratón alojado se le debe de proporcionar de forma obligada material de anidación y enriquecimiento, de tal manera que se evite el estrés térmico por asilamiento.
4. Por período máximo de 7 días no se debe cambiar el material de cama de la caja de alojamiento ni realizar ningún tipo de manejo de los animales residentes con la finalidad de que realicen un marcaje olfativo, el agua y alimento se proporciona de manera *ad libitum*.
5. Concluidos los 7 días de aislamiento, el período de evaluación puede ser iniciado.

Fase de evaluación

Para dar inicio con la fase de evaluación de la prueba, se procede de la siguiente manera:

- 1.- Colocar la caja de alojamiento del ratón residente en el cuarto de evaluación asignado y cambiar la rejilla por una tapa transparente.
- 2.- Retirar temporalmente el material de enriquecimiento ambiental para permitir una mejor visualización de los animales durante la prueba.
- 3.- Colocar por medio de un manejo no aversivo al ratón que fungirá como intruso (ver vídeos de manejos y arena neutral).

Nota: El ratón intruso no debe de haber tenido interacciones previas con el ratón residente, por lo que se debe de contar con un registro de los encuentros entre los diversos individuos para asegurarse de no repetir contrincantes.

- 4.- Una vez colocado el ratón intruso se comienza a contar el tiempo de prueba a la par que su videograbación.
- 5.- Durante este tiempo se debe contabilizar las posturas de interés (agresión ofensivas/defensivas) de uno o ambos animales (vídeos 18,19).
- 6.- Al concluir el tiempo de prueba, se debe retirar el ratón intruso y colocarlo en una caja limpia con enriquecimiento, mientras que el ratón

residente se mantiene en su caja, devolviendo el material enriquecimiento que fue retirado

Nota: De manera similar a lo señalado previamente en otras pruebas, en caso de que las peleas sean muy intensas se debe de detener la evaluación para conservar la integridad de los ratones.

7.- Limpiar toda la zona de evaluación con alcohol al 70% para evitar la contaminación por olores previo a iniciar una nueva evaluación.

8.- Repetir pasos 1 al 6 para iniciar una nueva evaluación con un ratón residente diferente.

Fase final de la prueba

Para la facilitar la visualización e interpretación de las posturas de comportamiento durante esta prueba se anexa un listado de videos en los que se ilustran y describen las principales posturas observadas durante un encuentro agonístico, así como una comparación entre agresión normal y agresión escalada/aumentada.

Anexo prueba de intruso/residente

Para facilitar la visualización e interpretación de la conducta agresiva, se cuenta con los vídeos 12,13,14,15,16 y 17 en el apartado de anexos donde se ejemplifica el patrón de conducta agresiva y se muestra una comparación entre agresión normal y agresión escalada/aumentada.

Prueba de dominancia en tubo

Aspectos generales

La prueba de dominancia en tubo es otra manera de evaluar el comportamiento agresivo a través del dominio social, donde en comparación con las pruebas anteriores, es utilizado un procedimiento más simple, que no implica la presentación de ataques físicos entre individuos durante un tiempo prologando (31). La prueba parte de colocar a dos ratones en lados opuestos de un tubo estrecho transparente, a través del cual, ambos caminarán, hasta encontrarse en un punto medio, lo que provocará un conflicto por el derecho de paso. Al darse dicho conflicto, los oponentes buscarán pasar al otro lado, empujando a su contrincante a través del tubo, el ratón que logra sacar a su oponente durante los períodos de prueba es considerado ganador y dominante (44).

Los materiales comúnmente utilizados para los tubos son el cartón y los plásticos, componentes que los ratones aceptan fácilmente en su entorno, es gracias a lo mencionado que se logró el desarrollo de esta prueba (145). La prueba de dominancia cambia los tubos de cartón por un tubo transparente, lo permite una simulación del derecho de paso de forma controlada para la obtención del uso del tubo, sin la necesidad de forzar una pelea, lo que consigue un acuerdo armónico entre los ratones (52).

Los resultados que se obtienen en esta prueba sirven para determinar las tendencias de dominancia social, lo que permite, por ejemplo, caracterizar el fenotipo de ratones genéticamente modificados. Los ratones ganadores en la prueba de tubo suelen ser los dominantes en las pruebas de arena neutral e intruso/residente, lo que respalda la validez de los resultados (142).

Esta prueba es más amigable y menos estresante para los ratones, sin embargo, se debe tomar en cuenta que, para ser realizada de forma correcta, es requerido un periodo corto de habituación y entrenamiento de todos los ratones participantes, haciendo que los tiempos de prueba sean más largos. A pesar de esa cuestión, sigue siendo una prueba simple, robusta y confiable para cuantificar comportamientos relacionados con la dominancia social (50)

Fundamento etológico

La dominancia social es considerada parte de un comportamiento natural de los ratones, que permite la formación de jerarquías en colonias, tanto en estado salvaje como en condiciones de laboratorio. Dentro de los grupos animales, el establecimiento de una jerarquía es relevante porque evita luchas agresivas y constantes en su interior; bajo esa jerarquía es determinado el acceso primordial a recursos como comida, reproducción y espacio/alojamiento (46) incluidos los materiales de enriquecimiento ambiental en la caja de alojamiento, que son utilizados como refugio por parte de los ratones dominantes.

La prueba de tubo toma como base el recurso del espacio, desencadenando una confrontación en la que los animales dominantes son quienes obtienen el derecho de paso durante el encuentro (142). Empleando recintos semi naturales, ha sido observado que varios ratones machos pueden ocupar una misma área y convivir sin confrontaciones, manteniendo una relación dominante subordinado (143). De esta manera, existe un reconocimiento hacia los ratones subordinados, por el cual los animales dominantes aceptan compartir con ellos los recursos disponibles, sin la necesidad de pelear (144).

Al existir una dominancia marcada, las peleas y agresiones físicas entre ratones macho son menos frecuentes que cuando una jerarquía es inestable, en la que se generan peleas constantes para establecer quién es el dominante. Bajo esta premisa, puede constatarse que en los alojamientos dentro de los laboratorios, los ratones tienden a conservar dichas jerarquías al verse obligados a convivir en un espacio determinado (47).

Consideraciones antes de efectuar la prueba

Para llevar a cabo esta prueba se deben considerar las siguientes cuestiones:

- La duración de esta prueba es corta en comparación de las otras pruebas, ya que se desarrolla en un máximo de 3 minutos. A diferencia de las formas de evaluación previamente descritas, esta prueba requiere de un mínimo de 3 días de entrenamiento para habituar a los ratones a

pasar por el tubo y evitar que, el tránsito por el mismo sea forzado durante la prueba y constituya un evento estresante.

- Para esta prueba, se deben realizar al menos 4 días de evaluación consecutivos, tiempo en el cual se determina si una jerarquía es estable dentro de un grupo determinado.
- Las diferencias de cepa, peso, edad y tamaño entre los ratones influyen en los resultados de la prueba, por lo que es recomendable mantener la homogeneidad posible de estos parámetros.
- Identificar correctamente a ambos oponentes facilitará el seguimiento de los sujetos durante el período de prueba, el marcaje de la cola es una buena opción para identificar a los ratones.
- La presencia de otras personas influye en la expresión de algunos comportamientos, por tanto los observadores y/o manejadores deben de haber realizado una habituación de los animales previo a la realización de las pruebas.
- Realizar videograbaciones de las pruebas a la par permite analizar el comportamiento más a detalle y generar un registro de las pruebas realizadas.
- El tubo debe tener diámetro interno de 4 cm. para asegurar que los ratones puedan caminar sin atorarse y sin poder darse la vuelta, se tiene que asegurar que lo animales no tengan un peso mayor 40 gr. Para que puedan entrar sin mayor dificultad dentro del tubo.

Materiales:

- Tubo de prueba: Tubo de acrílico transparente de 30 cm de largo y un diámetro interno de 4 cm.
- Tubo de entrenamiento: Tubo de acrílico transparente de 15 cm de largo y un diámetro interno de 4 cm.
- Atomizador con alcohol al 70%.
- Varilla de plástico/vidrio de 30 cm de largo
- Gasa o papel absorbente
- Cronómetro

- Cámara de vídeo
- Hoja de registro.
- Cinta adhesiva transparente

Fase de habituación/entrenamiento

Durante el tiempo de duración del protocolo, se puede llevar a cabo la fase habituación durante los cambios de caja rutinarios, siguiendo el ejemplo de los videos de manejo no aversivo. El uso de tubos de cartón como material de enriquecimiento en las cajas de alojamiento y como forma de sujeción rutinaria facilita el posterior entrenamiento con el tubo de acrílico. Sin embargo, en caso de que la habituación rutinaria sea complicada de seguir durante los cambios de caja, se puede proseguir de la siguiente manera.

Tres días previos a la prueba se debe de seguir los siguientes:

Día 1.-Habituación:

Los realizadores de la prueba deben de manejar a los animales durante al menos 1 minuto, usando la técnica de mano ahuecada o el uso de tubos, para prevenir el estrés por manejo durante la fase prueba. Esto se debe de hacer con todos los animales que van a ser evaluados.

Nota: Durante este paso puede comenzar a realizar el marcaje de cola para optimizar tiempos.

Día 2.- Entrenamiento de los ratones con el tubo de 15 cm.

1. Se debe de llevar a los ratones al cuarto de evaluación y dejar que se aclimaten durante al menos 30 minutos.
2. Limpiar con alcohol al 70 % el interior del tubo de acrílico de 15 cm y la mesa de evaluación para prevenir contaminación por olores.
3. Fijar el tubo a la mesa limpia con ayuda de cinta adhesiva transparente, de tal manera que no se mueva ni se gire.
4. Retirar al ratón a entrenar de su caja de alojamiento y colocarlo sobre la mesa de entrenamiento.
5. Permitir al ratón la exploración en la mesa durante al menos 1 minuto.

6. Con una mano se debe de guiar al ratón para que entre por uno de los extremos del tubo, de tal manera que no se presione ni se fuerce la entrada del mismo.
7. Bloquear con la mano el lado por donde entro el ratón para evitar que este retroceda y/o se salga del tubo. El ratón debe pasar de un lado al extremo contrario del tubo sin ser forzado ni presionado.

Nota: En caso de que un ratón se quede inmóvil o retroceso dentro del tubo, se puede dar un ligero toque con la varilla en la zona dorsal para estimular su caminata.

8. Una vez que un ratón salga por el extremo contrario al que entro, se debe de repetir el mismo procedimiento del punto 7 y repetir esta acción por lo menos 10 veces seguidas.
9. Cuando cada ratón pase 10 veces de un lado a otro en el tubo sin dificultad, se concluye el primer día de entrenamiento.

Nota: Cada que se entrene a un ratón nuevo, se debe de limpiar el interior del tubo con alcohol al 70% para evitar una contaminación por olores

Día 3.- Entrenamiento de los ratones con el tubo de 30 cm.

Para este día se repiten los mismo pasos que el día 2, pero utilizando el tubo de 30 cm de largo

1. Se debe de llevar a los ratones al cuarto de evaluación y dejar que se aclimaten durante al menos 30 minutos.
2. Limpiar con alcohol al 70 % el interior del tubo de acrílico de 30 cm y la mesa de evaluación para prevenir contaminación por olores.
3. Fijar el tubo a la mesa limpia con ayuda de cinta adhesiva transparente, de tal manera que no se mueva ni se gire.
4. Retirar al ratón a entrenar de su caja de alojamiento y colocarlo sobre la mesa de entrenamiento.
5. Permitir al ratón la exploración en la mesa durante al menos 1 minuto.
6. Con una mano se debe de guiar al ratón para que entre por uno de los extremos del tubo, de tal manera que no se presione ni se fuerce la entrada del mismo.

7. Bloquear con la mano el lado por donde entro el ratón para evitar que este retroceda y/o se salga del tubo. El ratón debe pasar de un lado al extremo contrario del tubo sin ser forzado ni presionado.

Nota: En caso de que un ratón se quede inmóvil o retroceda dentro del tubo, se puede dar un ligero toque con la varilla en la zona dorsal para estimular su caminata.

8. Una vez que un ratón salga por el extremo contrario al que entro, se debe de repetir el mismo procedimiento del punto 7 y repetir esta acción por lo menos 5 veces seguidas.
9. Cuando cada ratón pase 5 veces de un lado a otro en el tubo sin dificultad, se concluye el entrenamiento de los ratones y se procede a la fase de prueba.

Nota: Cada que se entrene a un ratón nuevo, se debe de limpiar el interior del tubo con alcohol al 70% para evitar una contaminación por olores

Fase de evaluación

Una vez concluido los 3 días de habituación y entrenamiento se procede con los días de evaluación, se sugiere que la fase de prueba sea durante al menos 4 días seguidos para poder obtener datos de un rango estable de dominancia por grupo.

Los pasos a seguir para la evaluación son los siguientes:

1. Se debe llevar a los ratones al cuarto de evaluación y dejar que se aclimaten durante al menos 30 minutos.
2. Limpiar con alcohol al 70% el tubo de acrílico de 30 cm y la mesa de evaluación para evitar contaminación por olores.
3. Marcar en una línea justo en la mitad del tubo como punto de referencia.
4. Fijar el tubo a la mesa con cinta adhesiva transparente y colocar la cámara de video en un punto donde se observe el tubo completo.
5. Retirar a los ratones a evaluar de su caja de alojamiento y colocarlos en la mesa de evaluación, permitiéndoles explorar por al menos 1 minuto.
6. Colocar un ratón en cada extremo del tubo, procurando que ninguno entre antes que otro.

7. Con la mano se debe guiar a los ratones a entrar al tubo al mismo tiempo, sin presionar ni forzar su entrada.

Nota: Se debe de cuidar en extremo que ambos ratones entren al mismo tiempo para evitar que uno tome ventaja al recorrer más una parte del tubo

8. Una vez que algún ratón se encuentre en la mitad del tubo, se comienza a correr el tiempo de prueba con el cronómetro y la videograbación.
9. El encuentro termina cuando alguno de los ratones tiene sus cuatro patas fuera del tubo, el ratón que queda dentro del tubo es declarado ganador y el que queda fuera del tubo es declarado perdedor.

Nota: El tiempo máximo de duración de la prueba es de 3 minutos, si en ese lapso de tiempo ningún ratón ha salido del tubo se declara un empate.

10. Una vez que se termine el encuentro, se debe limpiar el interior del tubo con alcohol al 70% y repetir los pasos 4 al 9 para cada evaluación.
11. Todos estos pasos se deben de repetir durante los 4 días de evaluación consecutivos.

Fase de final de la prueba

- Una vez concluido todos los días de evaluación, se debe sacar el total de encuentros ganados y determinar que ratón es el dominante de cada grupo.
- La revisión de los videos post evaluación también permiten contabilizar otras variables que son de utilidad para determinar la jerarquía, por ejemplo: número de empujones, latencia de empuje, tiempo de empuje, etc.
- Por cada grupo se debe de sacar al menos a un ratón dominante y a partir de ahí establecer si existe una jerarquía en el grupo, para más detalles de las opciones estadísticas se sugiere revisar las referencias de este trabajo.

Anexos prueba de dominancia en tubo: Para ayudar a la realización e interpretación de la prueba de dominancia en tubo se cuentan con los vídeos 18 y 19 en esta prueba en el aparatado de anexos de este trabajo.

Conclusiones

Los trabajos de investigación requieren ejecución adecuada y buenas prácticas para garantizar el rigor científico metodológico en la búsqueda del conocimiento, considerando todos aquellos aspectos que real y potencialmente constituyen variables que pueden afectar los resultados que se generan.

Cuando se emplean modelos animales en los trabajos de investigación científica, dentro de los aspectos relevantes actualmente se considera que la vigilancia del bienestar animal debe estar incluida, no sólo por sus posibles repercusiones en los resultados, si no por el reconocimiento de la importancia que hoy en día se otorga a los aspectos éticos de las actividades humanas. Por lo que los trabajos científicos que se realizan en animales deben ser practicados con la mayor responsabilidad hacia estos seres vivos, asegurando que su bienestar se mantenga en los niveles idóneos. En este renglón, la formación curricular que actualmente adquiere el médico veterinario zootecnista le permite brindar orientación a los miembros de los grupos de investigación, que al provenir de diversas profesiones, frecuentemente pueden contar con escasa preparación en el tema.

Particularmente en las neurociencias, los estudios de investigación del comportamiento animal son elementos muy importantes, destacando las pruebas que se efectúan para evaluar las conductas de ansiedad y agresión. Si bien existen numerosos artículos publicados sobre el tema, en los que se anexa una descripción general de las pruebas utilizadas, los aspectos relativos al bienestar animal y sus posibles repercusiones en el comportamiento de los sujetos experimentales suelen pasarse por alto. El presente trabajo ofrece, a las personas que se integran al trabajo experimental en esta rama y otras afines, una guía para la realización e interpretación de las pruebas más comúnmente utilizadas para evaluar los comportamientos de ansiedad y agresión en ratones. Para ello, además del texto que describe los aspectos más importantes a tomar en cuenta en la planeación y ejecución de las pruebas, se incluyen materiales visuales (fotografías y vídeos) que ayudan a familiarizarse con las maniobras requeridas y destacan las precauciones y cuidados a tener presentes para vigilar el bienestar animal durante las mismas.

Adicionalmente, se abordan los diversos patrones conductuales expresados en forma natural por los animales, los que por su complejidad, puede ser complicado visualizar en el momento de la ejecución de la prueba, y que por lo mismo pueden ser ignorados durante las evaluaciones. La recopilación de referencias y de materiales videograbados para la observación de estos patrones del comportamiento de los ratones es útil para que los lectores puedan identificar y relacionar los posibles cambios en los comportamientos de interés, y de esta forma, desarrollar una interpretación enriquecida a la hora de analizar los resultados obtenidos. Este trabajo pretende que la información brindada contribuya a una mejor preparación de los actuales y futuros médicos veterinarios interesados en participar en los grupos de investigación donde se lleven a cabo pruebas en ratones. Con ese propósito se describen con detalle en él algunas rutinas para el manejo y preparación de los animales que participaran en las pruebas de comportamiento, buscando refinar las técnicas aprendidas y practicadas por los médicos veterinarios, de manera que, con la visión propia de la profesión, ellos las compartan con los usuarios que se capacitan en los laboratorios de investigación, ampliando el campo de ejercicio profesional, atendiendo lo establecido en la normativa NOM-062-ZOO-1999 que señala la obligatoriedad de contar con los servicios médicos veterinarios para garantizar la salud y bienestar de los animales empleados en protocolos de investigación. De manera resumida podemos concluir que este trabajo se ofrece pretendiendo: a) ser útil como una guía para el refinamiento de las técnicas utilizadas en la generación de conocimientos sobre comportamiento animal, dentro del campo de las neurociencias, b) contribuir en la promoción del bienestar de los animales en la investigación, atendiendo los principios éticos vigentes c) apoyar la formación de los futuros médicos veterinarios zootecnistas interesados en este rubro del ejercicio profesional. Finalmente, es necesario enfatizar que el estudio del comportamiento animal es complejo y requiere de una visión detallada y especializada por parte de las personas dedicadas a él, por lo que contar con información práctica sobre la manera y cuidados necesarios para efectuar las pruebas conductuales es sustancial para el desarrollo de los estudios neuroetológicos y la capacitación personal en este campo de la investigación.

Anexos

Habitación y manejos no aversivos

Vídeo 1.- [Habitación en ratones de laboratorio](#)

Vídeo 2.- [Manejo no aversivo en ratones de laboratorio con el uso de tubos](#)

Vídeo 3.- [Técnica de mano abierta](#)

Prueba luz/obscuridad

Vídeo 4.- [Colocación del ratón en la caja de evaluación](#)

Vídeo 5.- [Comparación de manejo tradicional y manejo con tubo](#)

Vídeo 6.- [Registro de variables durante la prueba de luz/obscuridad](#)

Prueba de enterramiento de canicas

Vídeos 7.- [Prueba de enterramiento de canicas](#)

Vídeo 8.- [Ejemplo de canicas enterradas y excavación](#)

Vídeo 9.- [Prueba de enterramiento de canicas: observación de la excavación](#)

Prueba de arena neutra

Vídeo 10.- [Colocación de animales en la arena neutra](#)

Vídeo 11.- [Postras de intención y exploración de ratones de laboratorio](#)

Prueba de intruso/residente

Vídeo 12.- [Patrón de olfateo ano-genital oblicuo](#)

Vídeo 13.- [Patrón de olfateo ano-genital](#)

Vídeo 14.- [Traqueteos de cola](#)

Vídeo 15.- [Patrón de ritualización](#)

Vídeo 16.- [Posturas de amenaza y ataque](#)

Vídeo 17.- [Comparación agresión normal vs. Agresión escalada](#)

Prueba de dominancia en tubo

Vídeo 18.- [Entrenamiento prueba de tubo](#) Vídeo 19.- [Prueba de dominancia en tubo](#)

Referencias

1. La psicología comparada - Psikipedia [Internet]. [cited 2021 Jul 1]. Available from: <https://psikipedia.com/libro/historia/3834-la-psicologia-comparada>
2. Álvarez F. Historia de la Etología. *J Chem Inf Model*. 2013;53:1689–99.
3. Tinbergen N. On aims and methods of Ethology [Internet]. Vol. 20, *Zeitschrift fur Tierpsychologie*. 1963. p. 410–33. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1439-0310.1963.tb01161.x>
4. Gómez JC, Colmenares F. Etología. Introducción a la ciencia del comportamiento [Internet]. Universidad de Extremadura. 1994. 1–591 p. Available from: Universidad de Extremadura
5. Peters SM, Pothuizen HHJ, Spruijt BM. Ethological concepts enhance the translational value of animal models [Internet]. Vol. 759, *European Journal of Pharmacology*. *Eur J Pharmacol*; 2015 [cited 2022 Jan 20]. p. 42–50. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25823814/>
6. Dennis EJ, Hady A El, Michaiel A, Clemens A, Gowan Tervo DR, Voigts J, et al. Systems Neuroscience of Natural Behaviors in Rodents. *J Neurosci* [Internet]. 2021 Feb 3 [cited 2021 Nov 16];41(5):911–9. Available from: <https://www.jneurosci.org/content/41/5/911>
7. Gomez-Marin A, Paton JJ, Kampff AR, Costa RM, Mainen ZF. Big behavioral data: Psychology, ethology and the foundations of neuroscience. *Nat Neurosci*. 2014;17(11):1455–62.
8. Olsson IAS, Sherwin CM. Behaviour of laboratory mice in different housing conditions when allowed to self-administer an anxiolytic. *Lab Anim*. 2006;40(4):392–9.
9. O. C de la, Montoya B. Biología del comportamiento animal : la etología como un puente en el estudio del comportamiento. *Darwin y las ciencias del Comport*. 2011;(21):137–58.
10. Cordoba U de. Introducción al estudio del comportamiento. Concepto y Defin Etol Objet la Etol Relación la Etol con la Vet y otras Ciencias Interpret la Conduct los Anim Métodos Estud la Conduct. 2014;(2):1–32.
11. Martín GO. Etología y comportamiento animal : principios de bienestar animal [Internet]. Publicaciones Facultad de Agronomía y Zootecnia de la Universidad Nacional de Tucumán. 2016. 4–32 p. Available from: https://www.produccion-animal.com.ar/etologia_y_bienestar/etologia_en_general/10-Etologia_y_comportamiento.pdf
12. Schlinger HD. Behavior analysis and behavioral neuroscience. *Front Hum Neurosci*. 2015 Apr 17;9(APR):1–4.
13. Cerrilla MEO, Danés AÁG. Aplicación del conocimiento de la conducta animal en la producción pecuaria. *Interciencia* [Internet]. 2006 [cited 2022

- Aug 15];31(12):844–8. Available from:
http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0378-18442006001200004&lng=es&nrm=iso&tlng=es
14. Braude, Stan & crews, janet & Stephenson, Carol & clardy terrilyn. The Ethogram and Animal Behavior Research. Washington University Science Outreach [Internet]. 2002 [cited 2022 Jan 10]; Available from: https://www.researchgate.net/publication/299586471_The_Ethogram_and_Animal_Behavior_Research
 15. Krakauer JW, Ghazanfar AA, Gomez-Marin A, Maclver MA, Poeppel D. Neuroscience Needs Behavior: Correcting a Reductionist Bias. *Neuron*. 2017 Feb 8;93(3):480–90.
 16. Zupanc GKH. Neuroethology. *Scholarpedia*. 2010 Oct 12;5(10):5306.
 17. Moreno CB, Muñoz-Delgado J. Account on the history of ethology AN ACCOUNT ON THE HISTORY OF ETHOLOGY. *Bogotá Suma Psicológica*. 2007;14:213–24.
 18. Sang P. Animal Behaviour course Fundamentals of Animal Behaviour. In: *Animal Biology and Care Ltd*. 2015. p. 16–8.
 19. Bohoslav JP, Wimalasena NK, Clausing KJ, Dai YY, Yarmolinsky DA, Cruz T, et al. DeepEthogram, a machine learning pipeline for supervised behavior classification from raw pixels. *Elife*. 2021 Sep 1;10.
 20. Institute for Laboratory Animal Research. National Research Council (US) Guidelines for the Care and Use of Mammals in Neuroscience and Behavioral Research [Internet]. National Academies Press (US). 2016 [cited 2021 Apr 19]. p. 1–6. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK43324/%0Apapers2://publication/uuid/57DFB579-2668-426B-A5DD-77B05A461914>
 21. Zilkha N, Sofer Y, Beny Y, Kimchi T. From classic ethology to modern neuroethology: Overcoming the three biases in social behavior research. Vol. 38, *Current Opinion in Neurobiology*. Elsevier Current Trends; 2016. p. 96–108.
 22. Teegarden S. Behavioral Phenotyping in Rats and Mice. *Mater Methods*. 2012 Jun 18;2.
 23. University TPS. Social, Maternal and Aggressive Behaviors in Rodents [Internet]. Animal Resource Program: Rodent Behavior and Behavioral Testing. 2016 [cited 2019 Nov 29]. Available from: <https://www.research.psu.edu/arp/experimental-guidelines/rodent-behavioral-tests-1/social-and-aggressive-behaviors-in-rodents.html#aggression-and-social-dominance>
 24. Kudryavtseva NN, Bondar NP, Avgustinovich DF. Association between experience of aggression and anxiety in male mice. *Behav Brain Res* [Internet]. 2002 Jun 15 [cited 2021 Mar 5];133(1):83–93. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0166432801004430>

25. Mora-Gallegos, Andrea & Salas S. View of animal models of fear and anxiety: neurobehavioral descriptions. *Actual en Psicol* [Internet]. 2014 [cited 2019 Dec 16];28(117):1–12. Available from: <https://revistas.ucr.ac.cr/index.php/actualidades/article/view/14595/16703>
26. Hölter SM, Einicke J, Sperling B, Zimprich A, Garrett L, Fuchs H, et al. Tests for Anxiety-Related Behavior in Mice. *Curr Protoc Mouse Biol* [Internet]. 2015 Dec 1 [cited 2021 Mar 23];5(4):291–309. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/9780470942390.mo150010>
27. Crawley JN. Exploratory behavior models of anxiety in mice. *Neurosci Biobehav Rev*. 1985 Mar 1;9(1):37–44.
28. Wotton JM, Ferragamo MJ. Using the Tools of Behavioral Neuroscience to Determine the Identity of Different Mouse Strains in a Laboratory Course. *J Undergrad Neurosci Educ* [Internet]. 2017 [cited 2022 Jan 11];16(1):A34–40. Available from: </pmc/articles/PMC5777835/>
29. Engineers M. Mouse Ethogram: Abnormal Behaviors [Internet]. *Conductscience*. 2019 [cited 2021 Nov 16]. p. 1 pp. Available from: <https://conductscience.com/maze/mouse-ethogram-abnormal-behaviors/>
30. Koolhaas JM, Coppens CM, de Boer SF, Buwalda B, Meerlo P, Timmermans PJA. The resident-intruder paradigm: a standardized test for aggression, violence and social stress. *J Vis Exp*. 2013;(77):1–7.
31. Fan Z, Zhu H, Zhou T, Wang S, Wu Y, Hu H. Using the tube test to measure social hierarchy in mice. *Nat Protoc* [Internet]. 2019 [cited 2019 Dec 30];14(3):819–31. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41596-018-0116-4>
32. Hascoët M, Bourin M. The mouse light-dark box test [Internet]. Vol. 42, *Neuromethods*. 2009. p. 197–223. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0014299903012743>
33. Fan M, Kane MJ, Briggs DI, Francescutti DM, Kuhn DM. Marble burying and nestlet shredding as tests of repetitive, compulsive-like behaviors in mice. *J Vis Exp* [Internet]. 2013 [cited 2020 Feb 20];82(82):50978. Available from: www.jove.comurl:<http://www.jove.com/video/50978><http://www.jove.com/video/50978/>
34. Wahlsten D. Tests of Mouse Behavior. In: *Mouse Behavioral Testing*. Elsevier; 2011. p. 39–51.
35. Ortega-Escobar J, Alcázar-Córcoles MÁ. Neurobiología de la agresión y la violencia. *Anu Psicol Juridica*. 2016 Jan 1;26(1):60–9.
36. Martínez-Lazcano JC, López-Quiroz A, Alcantar-Almaraz R, Montes S, Sánchez-Mendoza A, Alcaraz-Zubeldia M, et al. A hypothesis of the interaction of the nitrgergic and serotonergic systems in aggressive behavior induced by exposure to lead. *Frontiers in Behavioral Neuroscience Frontiers Media S.A.*; Sep 3, 2018.
37. Guillot PV, Chapouthier G. Intermale aggression and dark/light preference

- in ten inbred mouse strains. *Behav Brain Res.* 1996 May 1;77(1–2):211–3.
38. Martins de Carvalho L, Chen WY, Lasek AW. Epigenetic mechanisms underlying stress-induced depression. *Int Rev Neurobiol.* 2021 Jan 1;156:87–126.
 39. Moy SS, Nadler JJ, Perez A, Barbaro RP, Johns JM, Magnuson TR, et al. Sociability and preference for social novelty in five inbred strains: An approach to assess autistic-like behavior in mice. *Genes, Brain Behav.* 2004 Oct;3(5):287–302.
 40. G Gutiérrez-García A, M Contreras C. Algunos aspectos etológicos de la comunicación química en ratas y ratones de laboratorio. *Rev Biomédica.* 2002;13(3):189–209.
 41. Jacobson-Pick S, Audet MC, McQuaid RJ, Kalvapalle R, Anisman H. Social Agonistic Distress in Male and Female Mice: Changes of Behavior and Brain Monoamine Functioning in Relation to Acute and Chronic Challenges. *PLoS One* [Internet]. 2013 Apr 2 [cited 2022 Feb 2];8(4):e60133. Available from: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0060133>
 42. Spangenberg EMF, Wichman A. Methods for investigating the motivation of mice to explore and access food rewards. *J Am Assoc Lab Anim Sci* [Internet]. 2018 May 1 [cited 2021 Mar 23];57(3):244–52. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29720295/>
 43. Demas GE, Eliasson MJL, Dawson TM, Dawson VL, Kriegsfeld LJ, Nelson RJ, et al. Inhibition of neuronal nitric oxide synthase increases aggressive behavior in mice. *Mol Med.* 1997;3(9):610–6.
 44. Cylinder Test | Behavioral and Functional Neuroscience Laboratory | Stanford Medicine [Internet]. Stanford Medicine. 2018 [cited 2019 Nov 29]. Available from: <https://med.stanford.edu/sbfnl/services/bm/si/tube-dominance.html>
 45. Blanchard DC, Crawley JN, Arakawa H, Blanchard RJ. Social behaviors in wild and laboratory mice with a special emphasis on the C57BL/6J inbred strain. In: *Behavioral Genetics of the Mouse* [Internet]. Cambridge University Press; 2013 [cited 2021 Aug 17]. p. 205–17. Available from: <https://www.cambridge.org/core/books/behavioral-genetics-of-the-mouse/social-behaviors-in-wild-and-laboratory-mice-with-a-special-emphasis-on-the-c57bl6j-inbred-strain/D186E1877169419F43D09997A3382DAE>
 46. Horii Y, Nagasawa T, Sakakibara H, Takahashi A, Tanave A, Matsumoto Y, et al. Hierarchy in the home cage affects behaviour and gene expression in group-housed C57BL/6 male mice. *Sci Reports* 2017 71 [Internet]. 2017 Aug 1 [cited 2022 Jan 20];7(1):1–12. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41598-017-07233-5>
 47. Van Loo PLP, de Groot AC, Van Zutphen BFM, Baumans V. Do Male Mice Prefer or Avoid Each Other's Company? Influence of Hierarchy,

- Kinship, and Familiarity. *J Appl Anim Welf Sci*. 2001 Apr;4(2):91–103.
48. Pallé A, Zorzo C, Luskey VE, McGreevy KR, Fernández S, Trejo JL. Social dominance differentially alters gene expression in the medial prefrontal cortex without affecting adult hippocampal neurogenesis or stress and anxiety-like behavior. *FASEB J* [Internet]. 2019 Jun 1 [cited 2021 Jun 15];33(6):6995–7008. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30857420/>
 49. Wang F, Kessels HW, Hu H. The mouse that roared: Neural mechanisms of social hierarchy [Internet]. Vol. 37, *Trends in Neurosciences*. Elsevier; 2014 [cited 2022 Jan 17]. p. 674–82. Available from: <http://www.cell.com/article/S0166223614001210/fulltext>
 50. Wang F, Kessels HW, Hu H. The mouse that roared: neural mechanisms of social hierarchy. *Trends Neurosci* [Internet]. 2014 Nov 1 [cited 2022 Jan 17];37(11):674–82. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25160682/>
 51. Lindzey G, Winston H, Manosevitz M. Social dominance in inbred mouse strains. *Nature* [Internet]. 1961 Jul 1 [cited 2022 Feb 3];191(4787):474–6. Available from: <https://www.nature.com/articles/191474a0>
 52. Messeri P, Eleftheriou BE, Oliverio A. Dominance behavior: A phylogenetic analysis in the mouse. *Physiol Behav*. 1975;14(1):53–8.
 53. Rejón-Orantes J, Perdomo PP, Roldán D. Pruebas no condicionadas en ratones para evaluar la actividad ansiolítica de sustancias extraídas de plantas. *Univ Médica*. 2011;52(1):78–89.
 54. Parmigiani S, Palanza P, Rodgers J, Ferrari PF. Selection, evolution of behavior and animal models in behavioral neuroscience. *Neurosci Biobehav Rev*. 1999;23(7):957–70.
 55. Takao K, Miyakawa T. Light/dark transition test for mice. *J Vis Exp* [Internet]. 2006 Oct [cited 2022 Feb 3];(1):104. Available from: </pmc/articles/PMC2504462/>
 56. Angoa-Pérez M, Kane MJ, Briggs DI, Francescutti DM, Kuhn DM. Marble burying and nestlet shredding as tests of repetitive, compulsive-like behaviors in mice. *J Vis Exp*. 2013;(82):50978.
 57. Deacon RMJ. Digging in mice: Marble burying, burrowing, and direct observation reveal changes in mouse behavior. *Neuromethods* [Internet]. 2009 [cited 2021 Jul 14];42:37–45. Available from: https://link.springer.com/protocol/10.1007/978-1-60761-303-9_3
 58. Crispim Junior CF, Pederiva CN, Bose RC, Garcia VA, Lino-de-Oliveira C, Marino-Neto J. ETHOWATCHER: Validation of a tool for behavioral and video-tracking analysis in laboratory animals. *Comput Biol Med*. 2012 Feb 1;42(2):257–64.
 59. Schaefer AT, Claridge-Chang A. The surveillance state of behavioral automation. Vol. 22, *Current Opinion in Neurobiology*. Elsevier Current Trends; 2012. p. 170–6.

60. von Ziegler L, Sturman O, Bohacek J. Big behavior: challenges and opportunities in a new era of deep behavior profiling [Internet]. Vol. 46, Neuropsychopharmacology. Nature Publishing Group; 2021 [cited 2021 Nov 19]. p. 33–44. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41386-020-0751-7>
61. Ellenbroek B, Youn J. Rodent models in neuroscience research: Is it a rat race? DMM Dis Model Mech [Internet]. 2016 Oct 1 [cited 2021 Jul 19];9(10):1079–87. Available from: </pmc/articles/PMC5087838/>
62. Johnson M. Laboratory Mice and Rats. Mater Methods. 2012 Oct 5;2.
63. Takahashi A, Miczek KA. Neurogenetics of aggressive behavior: Studies in rodents. Curr Top Behav Neurosci [Internet]. 2015 [cited 2021 Mar 23];17:3–44. Available from: </pmc/articles/PMC4092042/>
64. Berry RJ, Bronson FH. Life history and bioeconomy of the house mouse [Internet]. Vol. 67, Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society. John Wiley & Sons, Ltd; 1992 [cited 2022 Feb 3]. p. 519–50. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1469-185X.1992.tb01192.x>
65. McMillen BA, Chamberlain JK, DaVanzo JP. Effects of housing and muricidal behavior on serotonergic receptors and interactions with novel anxiolytic drugs. J Neural Transm [Internet]. 1988 Jun [cited 2022 Feb 3];71(2):123–32. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2894404/>
66. van der Meer M, Baumans V, Olivier B, van Zutphen BLM. Impact of transgenic procedures on behavioral and physiological responses in postweaning mice. Physiol Behav. 2001 May 1;73(1–2):133–43.
67. Simon P, Dupuis R, Costentin J. Thigmotaxis as an index of anxiety in mice. Influence of dopaminergic transmissions. Behav Brain Res [Internet]. 1994 Mar 31 [cited 2022 Feb 3];61(1):59–64. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7913324/>
68. Baumans V. Science-based assessment of animal welfare: Laboratory animals. OIE Rev Sci Tech. 2005;24(2):503–14.
69. Datos del ratón: hábitos, hábitat y tipos de ratones | Ciencia viva [Internet]. [cited 2021 Dec 28]. Available from: <https://www.livescience.com/28028-mice.html>
70. Olsson IAS, Nevison CM, Patterson-Kane EG, Sherwin CM, Van De Weerd HA, Würbel H. Understanding behaviour: The relevance of ethological approaches in laboratory animal science. In: Applied Animal Behaviour Science. 2003. p. 245–64.
71. Clark T. Guía de pruebas de comportamiento en ratones y ratas | Amuza Inc [Internet]. Behavioral Tests, Neuroscience. 2020 [cited 2021 Apr 19]. Available from: <https://amuzainc.com/blog/guide-to-behavioral-testing-in-mice-and-rats/>
72. Curley JP, Davidson S, Bateson P, Champagne FA. Social enrichment

- during postnatal development induces transgenerational effects on emotional and reproductive behavior in mice. *Front Behav Neurosci* [Internet]. 2009 Sep 15 [cited 2022 Feb 9];3(SEP). Available from: [/pmc/articles/PMC2759344/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16442135/)
73. Hunt C, Hambly C. Faecal corticosterone concentrations indicate that separately housed male mice are not more stressed than group housed males. *Physiol Behav* [Internet]. 2006 Mar 30 [cited 2022 Feb 9];87(3):519–26. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16442135/>
 74. Kercmar J, Tobet SA, Majdic G. Social isolation during puberty affects female sexual behavior in mice. *Front Behav Neurosci* [Internet]. 2014 [cited 2022 Feb 9];8(SEP). Available from: www.frontiersin.org
 75. Fernando J.Benavides; Jean-Louis Guénet. Biología y manejo reproductivo del ratón. In: *Manual de genética de roedores de laboratorio Principios básicos y aplicaciones* [Internet]. 2003 [cited 2021 Oct 18]. p. 59–83. Available from: <https://secal.es/wp-content/uploads/2014/10/02-GENETICA-Pba-2.pdf.pdf>
 76. Mason GJ, Latham NR. Can't stop, won't stop: Is stereotypy a reliable animal welfare indicator? [Internet]. Vol. 13, *Animal Welfare*. 2004 [cited 2022 Feb 9]. Available from: <http://www.fao.org>
 77. Van Loo PLP, Van Zutphen LFM, Baumans V. Male management: Coping with aggression problems in male laboratory mice [Internet]. Vol. 37, *Laboratory Animals*. SAGE PublicationsSage UK: London, England; 2003 [cited 2021 Nov 12]. p. 300–13. Available from: <https://journals.sagepub.com/doi/10.1258/002367703322389870>
 78. Manteca X, Salas M. Las estereotipias como indicadores de falta de bienestar en animales de zoológico. *Zoo Anim Welf Educ Cent*. 2015;4(1993):4–5.
 79. Clipperton-Allen AE, Page DT. Decreased aggression and increased repetitive behavior in Pten haploinsufficient mice. *Genes, Brain Behav*. 2015 Feb 1;14(2):145–57.
 80. Messeri P, Eleftheriou BE, Oliverio A. Dominance behavior: A phylogenetic analysis in the mouse. *Physiol Behav*. 1975 Jan 1;14(1):53–8.
 81. Association EAR. Manipulación y sujeción: Principios generales | NC3R [Internet]. 2021 [cited 2022 Feb 10]. Available from: <https://www.nc3rs.org.uk/3rs-resources/handling-and-restraint>
 82. Mourelle C, Herrero E, Ricca M. Recomendaciones para manipulación y sujeción de ratas y ratones de laboratorio. *Spei Domus* [Internet]. 2013 Dec 1;9(19):39–47. Available from: <https://revistas.ucc.edu.co/index.php/sp/article/view/708>
 83. Thiel College Institutional Animal Care and Use Committee. *Handling and Restraint of Small Laboratory Animals*. 2020;

84. Hurst JL, West RS. Taming anxiety in laboratory mice. *Nat Methods* [Internet]. 2010 Sep 12 [cited 2021 Jul 16];7(10):825–6. Available from: <https://www.nature.com/articles/nmeth.1500>
85. Gouveia K, Hurst JL. Optimising reliability of mouse performance in behavioural testing: The major role of non-aversive handling. *Sci Rep* [Internet]. 2017 Mar 21 [cited 2022 Jan 14];7. Available from: </pmc/articles/PMC5359560/>
86. Ghosal S, Nunley A, Mahbod P, Lewis AG, Smith EP, Tong J, et al. Mouse handling limits the impact of stress on metabolic endpoints. *Physiol Behav* [Internet]. 2015 [cited 2022 Feb 10];150:31–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.physbeh.2015.06.021>
87. Association EAR. Las 3R | NC3R [Internet]. 2021 [cited 2022 Feb 10]. Available from: <https://nc3rs.org.uk/who-we-are/3rs>
88. Baumans V. Environmental enrichment for laboratory rodents and rabbits: Requirements of rodents, rabbits, and research. *ILAR J* [Internet]. 2005 [cited 2022 Feb 10];46(2):162–70. Available from: <http://ilarjournal.oxfordjournals.org/>
89. Association EARH. Evaluating environmental enrichment | NC3Rs [Internet]. 3Rs resource library:HUSBANDRY. 2020 [cited 2022 Feb 11]. p. 1. Available from: <https://nc3rs.org.uk/3rs-resources/evaluating-environmental-enrichment>
90. Hobbiesiefken U, Mieske P, Lewejohann L, Diederich K. Evaluation of different types of enrichment - their usage and effect on home cage behavior in female mice. Branchi I, editor. *PLoS One* [Internet]. 2021 Dec 23 [cited 2021 Dec 28];16(12):e0261876. Available from: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0261876>
91. Moons CPH, Van Wiele P, Ödberg FO. To enrich or not to enrich: Providing shelter does not complicate handling of laboratory mice. *Contemp Top Lab Anim Sci*. 2004;43(4):18–21.
92. Kitchenham L, Nazal B, Adcock A, Nip E, MacLellan A, Mason G. Why does lifelong conventional housing reduce the sociability of female mice? *Appl Anim Behav Sci* [Internet]. 2022 Jan 1 [cited 2022 Jan 7];246:105532. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168159121003191>
93. André V, Gau C, Scheideler A, Aguilar-Pimentel JA, Amarie O V., Becker L, et al. Laboratory mouse housing conditions can be improved using common environmental enrichment without compromising data. *PLoS Biol* [Internet]. 2018 Apr 16 [cited 2022 May 3];16(4). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29659570/>
94. Bayne K. Environmental enrichment and mouse models: Current perspectives. *Anim Model Exp Med* [Internet]. 2018 Jun [cited 2022 May 3];1(2):82–90. Available from: </pmc/articles/PMC6388067/>
95. Sierra JC, Ortega V. Ansiedad, angustia y estrés: tres conceptos a diferenciar. *Rev Mal-estar e Subjetividade*. 2003;3(1):10–59.

96. Gómez C, Saldívar-González JA, Rodríguez R. Modelos animales para el estudio de la ansiedad: Una aproximación crítica. *Salud Ment.* 2002;25(1):14–24.
97. Steimer T. The biology of fear- and anxiety-related behaviors [Internet]. Vol. 4, *Dialogues in Clinical Neuroscience*. Les Laboratoires Servier; 2002 [cited 2021 Aug 23]. p. 231–49. Available from: [/pmc/articles/PMC3181681/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16594254/)
98. Bourin M, Petit-Demoulière B, Nic Dhonnchadha B, Hascöet M. Animal models of anxiety in mice [Internet]. Vol. 21, *Fundamental and Clinical Pharmacology*. John Wiley & Sons, Ltd; 2007 [cited 2021 Mar 5]. p. 567–74. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1472-8206.2007.00526.x>
99. Crawley J, Bailey K. Anxiety-Related Behaviors in Mice. In *CRC Press/Taylor & Francis*; 2008 [cited 2022 Mar 7]. p. 77–101. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK5221/>
100. Ohl F. Animal models of anxiety. *Handb Exp Pharmacol* [Internet]. 2005 [cited 2022 Mar 7];169(169):35–69. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16594254/>
101. Ranna P. ¿Qué son los trastornos de ansiedad? *Am Psychiatr Assoc* [Internet]. 2016 [cited 2021 Aug 23]; Available from: <https://www.psychiatry.org/patients-families/anxiety-disorders/what-are-anxiety-disorders>
102. Finn DA, Rutledge-Gorman MT, Crabbe JC. Genetic animal models of anxiety [Internet]. Vol. 4, *Neurogenetics*. Neurogenetics; 2003 [cited 2022 May 9]. p. 109–35. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12687420/>
103. Simon P, Dupuis R, Costentin J. Thigmotaxis as an index of anxiety in mice. Influence of dopaminergic transmissions. *Behav Brain Res.* 1994 Mar 31;61(1):59–64.
104. Sugiura K, Yoshimura H, Yokoyama M. An animal model of copulatory disorder induced by social stress in male mice: Effects of apomorphine and L-dopa. *Psychopharmacology (Berl)* [Internet]. 1997 [cited 2021 Jan 12];133(3):249–55. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s002130050398>
105. Sartori SB, Landgraf R, Singewald N. The clinical implications of mouse models of enhanced anxiety [Internet]. Vol. 6, *Future Neurology*. Future Medicine Ltd London, UK; 2011 [cited 2022 May 13]. p. 531–71. Available from: <https://www.futuremedicine.com/doi/full/10.2217/fnl.11.34>
106. Crawley J, Goodwin FK. Preliminary report of a simple animal behavior model for the anxiolytic effects of benzodiazepines. *Pharmacol Biochem Behav.* 1980 Aug 1;13(2):167–70.
107. Milner LC, Crabbe JC. Three murine anxiety models: Results from multiple inbred strain comparisons. *Genes, Brain Behav.* 2008 Jun;7(4):496–505.

108. Rodgers RJ, Cao BJ, Dalvi A, Holmes A. Animal models of anxiety: An ethological perspective [Internet]. Vol. 30, Brazilian Journal of Medical and Biological Research. Associação Brasileira de Divulgação Científica; 1997 [cited 2022 May 24]. p. 289–304. Available from: <http://www.scielo.br/j/bjmb/a/dpZnZjvR5NfpwdXY4RS4sQz/?lang=en>
109. Wahlsten D. Standardizing tests of mouse behavior: Reasons, recommendations, and reality. *Physiol Behav* [Internet]. 2001 [cited 2022 May 9];73(5):695–704. Available from: www.informatics.jax.org
110. Njung'e K, Handley SL. Evaluation of marble-burying behavior as a model of anxiety. *Pharmacol Biochem Behav* [Internet]. 1991 [cited 2022 May 24];38(1):63–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2017455/>
111. Deacon RMJ. Digging and marble burying in mice: Simple methods for in vivo identification of biological impacts. *Nat Protoc* [Internet]. 2006 Jun [cited 2021 Aug 17];1(1):122–4. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17406223/>
112. Hånell A, Marklund N. Structured evaluation of rodent behavioral tests used in drug discovery research. *Front Behav Neurosci*. 2014 Jul 22;8(JULY).
113. Crusio WE, Sluyter F, Gerlai RT. Ethogram of the mouse. *Behav Genet Mouse*. 2013;l:17–22.
114. van Staaden MJ, Searcy WA, Hanlon RT. Signaling aggression. In: *Advances in Genetics* [Internet]. Academic Press; 2011 [cited 2022 Feb 14]. p. 23–49. Available from: <http://www.elsevier.com/locate/permissionusematerial>
115. Haller J, Kruk MR. Normal and abnormal aggression: Human disorders and novel laboratory models. Vol. 30, *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*. Pergamon; 2006. p. 292–303.
116. de Boer SF. Untangling the neurobiology of escalated aggression in animals [Internet]. Paper presented at Canine Science Forum 2016. 2016 [cited 2022 Feb 17]. Available from: <https://www.rug.nl/research/portal/files/35628150/CSF2016.pdf>
117. Natarajan D, De Vries H, Saaltink DJ, De Boer SF, Koolhaas JM. Delineation of violence from functional aggression in mice: An ethological approach. *Behav Genet* [Internet]. 2009 Jan [cited 2022 Feb 14];39(1):73–90. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18972199/>
118. Collias NE. Aggressive Behavior among Vertebrate Animals. *Physiol Zool*. 1944;17(1):83–123.
119. Horwitz Debra; Gary Landsberg. Behavior Counseling Aggression - Introduction [Internet]. VCA Animal Hospitals. 2022 [cited 2022 Feb 15]. Available from: <https://vcahospitals.com/know-your-pet/behavior-counseling-aggression-introduction>
120. Nelson RJ, Trainor BC. Neural mechanisms of aggression [Internet]. Vol.

- 8, *Nature Reviews Neuroscience*. *Nat Rev Neurosci*; 2007 [cited 2022 Feb 17]. p. 536–46. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17585306/>
121. Natarajan D, Caramaschi D. Animal violence demystified. *Front Behav Neurosci*. 2010 Apr 5;4(APR):9.
 122. Joseph Garner et. al. Behavior Chain – Mouse Ethogram [Internet]. Stanford School of Medicine. 2021 [cited 2022 Feb 22]. Available from: <https://mousebehavior.org/behavior-chain/>
 123. Joseph Garner et. al. Etograma de ratón - Escuela de Medicina de Stanford [Internet]. Universidad Stanford. 2021 [cited 2021 Apr 14]. Available from: <https://mousebehavior.org/>
 124. Caramaschi D, de Boer SF, Koolhaas JM. Differential role of the 5-HT1A receptor in aggressive and non-aggressive mice: An across-strain comparison. *Physiol Behav* [Internet]. 2007 Mar 16 [cited 2022 Feb 28];90(4):590–601. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17229445/>
 125. Veenema AH, Neumann ID. Neurobiological mechanisms of aggression and stress coping: A comparative study in mouse and rat selection lines. *Brain Behav Evol* [Internet]. 2007 Sep [cited 2022 Feb 14];70(4):274–85. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17914259/>
 126. Miczek KA, Maxson SC, Fish EW, Faccidomo S. Aggressive behavioral phenotypes in mice. In: *Behavioural Brain Research* [Internet]. *Behav Brain Res*; 2001 [cited 2022 Feb 18]. p. 167–81. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11682108/>
 127. Mackintosh JH, Grant EC. A Comparison of the Social Postures of Some Common Laboratory Rodents. *Behaviour* [Internet]. 2008 [cited 2021 Jul 2];21(3–4):246–59. Available from: <https://www.jstor.org/stable/4533055>
 128. The Pennsylvania State University. Rodent Behavior and Behavioral Testing [Internet]. Experimental Guidelines. 2016 [cited 2022 Mar 17]. Available from: <https://www.research.psu.edu/animalresourceprogram/experimental-guidelines/rodent-behavior>
 129. Poole PB. Some Studies on the Use of “Standard Opponents” in Intermale Aggression Testing in TT Albino Mice. *Behaviour* [Internet]. 1974 [cited 2022 Mar 17];50(1/2):100–10. Available from: <https://www.jstor.org/stable/4533601>
 130. Crawley JN. Social Behavior Tests for Mice. What’s Wrong With My Mouse Behav Phenotyping Transgenic Knockout Mice. 2007;65–70.
 131. Klein SL, Kriegsfeld LJ, Hairston JE, Rau V, Nelson RJ, Yarowsky PJ. Characterization of sensorimotor performance, reproductive and aggressive behaviors in segmental trisomic 16 (Ts65Dn) mice. *Physiol Behav*. 1996 Oct 1;60(4):1159–64.
 132. Grieco F, Bernstein BJ, Biemans B, Bikovski L, Burnett CJ, Cushman JD,

- et al. Measuring Behavior in the Home Cage: Study Design, Applications, Challenges, and Perspectives [Internet]. Vol. 15, *Frontiers in Behavioral Neuroscience*. *Front Behav Neurosci*; 2021 [cited 2022 Feb 10]. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34630052/>
133. Crawley JN. *Social Behavior Tests for Mice*. 2007;
 134. Breed MD, Moore J. *Animal Behavior* [Internet]. *Animal Behavior*. Academic Press; 2012 [cited 2022 Apr 18]. 39–71 p. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128005118000022>
 135. Theil JH, Ahloy-Dallaire J, Weber EM, Gaskill BN, Pritchett-Corning KR, Felt SA, et al. The epidemiology of fighting in group-housed laboratory mice. *Sci Rep* [Internet]. 2020 Oct 6 [cited 2021 Nov 10];10(1):1–10. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41598-020-73620-0>
 136. UCSF. Resident Intruder IACUC Standard Procedure [Internet]. Office Research Institutional Animal Care and Use. 2021 [cited 2022 Apr 28]. Available from: [https://iacuc.ucsf.edu/sites/g/files/tkssra751/f/wysiwyg/STD PROCEDURE - Behavior - Resident Intruder.pdf](https://iacuc.ucsf.edu/sites/g/files/tkssra751/f/wysiwyg/STD_PROCEDURE-Behavior-Resident-Intruder.pdf)
 137. Blanchard RJ, Wall PM, Blanchard DC. Problems in the study of rodent aggression. In: *Hormones and Behavior* [Internet]. 2003 [cited 2022 Apr 29]. p. 161–70. Available from: www.sciencedirect.comwww.elsevier.com/locate/yhbeh
 138. Cohn DWH, De Sá-Rocha LC. Sickness and aggressive behavior in dominant and subordinate mice. *Ethology* [Internet]. 2009 Feb 1 [cited 2022 Apr 28];115(2):112–21. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1439-0310.2008.01608.x>
 139. Martín-López M, Infante S, Cavas M, Navarro J. Estudio de la instigación social en un modelo de agresión inducida por aislamiento: efectos de la administración de JNJ16259685, un antagonista de receptores mGlu1. *Univ Psychol*. 2014;13(3):1027–36.
 140. Chiavegatto S, Nelson RJ. Interaction of nitric oxide and serotonin in aggressive behavior. In: *Hormones and Behavior*. Academic Press Inc.; 2003. p. 233–41.
 141. Bloomsmith MA, Perlman JE, Hutchinson E, Sharpless M. Behavioral Management Programs to Promote Laboratory Animal Welfare. In: *Management of Animal Care and Use Programs in Research, Education, and Testing* [Internet]. CRC Press/Taylor & Francis; 2020 [cited 2022 Jan 11]. p. 63–82. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK500424/>
 142. Barabas AJ, Lucas JR, Erasmus MA, Cheng HW, Gaskill BN. Who's the Boss? Assessing Convergent Validity of Aggression Based Dominance Measures in Male Laboratory Mice, *Mus Musculus*. *Front Vet Sci*. 2021 Jul 9;8:744.
 143. Kunkel T, Wang H. Socially dominant mice in C57BL6 background show increased social motivation. *Behav Brain Res* [Internet]. 2018 Jan 15

[cited 2022 May 3];336:173–6. Available from:
[/pmc/articles/PMC5610949/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26284957/)

144. Freudenberg F, Carreño Gutierrez H, Post AM, Reif A, Norton WHJ. Aggression in non-human vertebrates: Genetic mechanisms and molecular pathways [Internet]. Vol. 171, American Journal of Medical Genetics, Part B: Neuropsychiatric Genetics. Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet; 2016 [cited 2022 Feb 18]. p. 603–40. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26284957/>
145. Horii Y, Nagasawa T, Sakakibara H, Takahashi A, Tanave A, Matsumoto Y, et al. Hierarchy in the home cage affects behaviour and gene expression in group-housed C57BL/6 male mice. Sci Rep [Internet]. 2017 Dec 1 [cited 2021 Mar 23];7(1):1–12. Available from: www.nature.com/scientificreports