

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR

Facultad de Ciencias Naturales y Matemática

Escuela de Biología



**“Efecto antidepresivo y toxicidad del veneno de sapo
sabanero (*Rhinella marina*) en ratones de laboratorio”**

Estudiantes:

Karla Yessenia López Álvarez

Daniel Isaí Alvarenga Laínez

Asesores:

MSc. Ana Martha Zetino

Lic. Miguel Ángel Moreno Mendoza

Ciudad Universitaria, febrero de 2017.

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMATICA
ESCUELA DE BIOLOGIA

**Efecto antidepresivo y toxicidad del veneno de sapo sabanero
(*Rhinella marina*) en ratones de laboratorio”**

Trabajo de Graduación presentado por:

KARLA YESSENIA LÓPEZ ÁLVAREZ

DANIEL ISAÍ ALVARENGA LAÍNEZ

PARA OPTAR AL GRADO DE

LICENCIADO EN BIOLOGIA

JURADO EVALUADOR:

Ciudad Universitaria, febrero 2017

**UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
AUTORIDADES UNIVERSITARIAS**

**RECTOR INTERINO:
LIC. JOSE LUIS ARGUETA ANTILLON**

**SECRETARIA GENERAL INTERINO:
DRA. ANA LETICIA ZA VALETA DE AMAYA**

**FISCAL GENERAL INTERINO:
LIC. NORA BEATRIZ MELENDEZ**

**AUTORIDADES DE LA FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y
MATEMÁTICA**

**DECANO:
LIC. MAURICIO HERNAN LOVO**

**VICEDECANO:
LIC. CARLOS ANTONIO QUINTANILLA APARICIO**

**SECRETARIA:
LICDA. DAMARIS MELANY HERRERA TURCIOS**

**DIRECTORA DE LA ESCUELA DE BIOLOGIA:
M.Sc. ANA MARTHA ZETINO CALDERON**

Ciudad Universitaria, febrero 2017

DEDICATORIA

A nuestro Padre Celestial y a nuestros padres porque han estado con nosotros en cada paso que damos, cuidándonos y dándonos fortaleza para continuar, quienes a lo largo de nuestra vida han velado por nuestro bienestar y educación siendo un gran apoyo en todo momento.

Con mucho amor y cariño les dedicamos todo nuestro esfuerzo y trabajo puesto para la realización de esta tesis.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar a Dios por habernos guiado por el mejor camino brindándonos sabiduría hasta llegar al triunfo; en segundo lugar a nuestros padres que han sido un apoyo incondicional por sus consejos y confianza en nosotros en todo momento que nos han ayudado y llevado hasta donde estamos ahora. Además a los amigos de diferentes áreas de la ciencia que aportaron con un grano de conocimiento y ánimo a lo largo y ancho de este trabajo de investigación. Finalmente a nuestros asesores de tesis quienes nos ayudaron en todo momento, por sus consejos y paciencia, MSc. Ana Martha Zetino y Lic. Miguel Ángel Moreno, de la misma manera a todos los catedráticos que tuvieron siempre consideración y apoyo en nuestra formación profesional la cual sin ellos no podríamos haber culminado.

Karla Yessenia López Álvarez

Daniel Isaí Alvarenga Laínez

ÍNDICE

Contenido	Pág.
RESUMEN	i
I. INTRODUCCIÓN	1
II. OBJETIVOS	3
III. MARCO TEORICO.	4
3.1. Contexto.....	4
3.2. Antecedentes.	5
3.2.1. Tratamientos naturales de enfermedades mentales.	8
3.3. Distribución geográfica (mundial, regional y local) de <i>Rhinella marina</i>	9
3.4. Taxonomía de <i>Rhinella marina</i>	9
3.5. Ecología y comportamiento de <i>Rhinella marina</i>	10
3.6. Veneno de Anfibios.....	10
3.6.1. Glándulas paratoides y principios activos del veneno.....	12
3.7. Modelos de experimentación.	13
3.8. Depresión como trastorno mental en humanos.	14
3.8.1. Tipos de depresión: Principales características.....	16
3.9. Signos y evaluación de la depresión en animales de laboratorio.....	17
IV. METODOLOGIA	19
4.1. Ubicación geográfica del lugar donde se realizó la colecta de los sapos para la obtención del veneno.....	19
4.2. Obtención del veneno: sustancia de ensayo.....	19
4.3. Animales de experimentación.	20
4.4. Ensayos previos.....	20
4.4.1. Ensayo de toxicidad aguda oral de 14 días Para la obtención de la Dosis Letal media (DL50)	21
4.4.2. Estandarización del modelo de Estrés Leve Crónico (ELC).	22
4.4.3 Test de Nado Forzado (TNF).....	23

4.4.4 Comprobación de Estrés Leve Crónico (ELC), determinación de la dosis de Citalopram, Test de Consumo de Sacarosa.	24
4.5. Evaluación de la actividad antidepresiva del veneno de <i>Rhinella Marina</i>	25
4.6. Análisis estadístico.....	27
V. RESULTADOS.....	28
5.1 Toxicidad aguda Oral 14 Días. Para la obtención de la Dosis Letal media (DL50).....	28
5.2 Resultados del Test de Consumo de Sacarosa en el establecimiento de la dosis de Citalopram.	28
5.3 Resultados de actividad biológica del veneno (Test de Consumo de Sacarosa y Test de Nado Forzado)	31
VI. DISCUSION.	36
VII. CONCLUSIONES.	42
VIII. RECOMENDACIONES.	44
IX. BIBLIOGRAFIA.	45
X. ANEXOS	54

INDICE DE TABLAS

Pág.

Tabla 1: Promedio y relación entre pesos corporales (g) de ratones hembra al inicio y final de la prueba.....	33
Tabla 2: Tiempos promedios (seg.) de los grupos de ratones hembra sometidos a evaluación de efecto antidepresivo del veneno de <i>R. marina</i>	33

INDICE DE FIGURAS

Pág.

Figura 1. Estructura de la Bufotenina. Imagen tomada de la revista en línea Psychotropicon (2013).	13
Figura 2. Estructura de la serotonina. Imagen tomada de Subiabre A. (2012).13	
Figura 3. Ubicación geográfica del lugar de colecta del veneno de sapo <i>Rhinella marina</i> . Frontera entre El Salvador y Honduras, municipio de Citalá, Chalatenango. Imagen tomada de Google Maps (2013).....	19
Figura 4: Inmovilizadores de ratones, fabricados con tubos cónicos de policarbonato de la marca Becton Dickinson Falcon de 50 ml de capacidad (30x115mm).....	22
Figura 5: Test de Nado Forzado en beakers de 3500 ml. (En el cual se midió el tiempo de inmovilización).....	23
Figura 6: Esquema para la determinación de la dosis de Citalopram y comprobación del modelo del Estrés Leve Crónico (ELC).....	25
Figura 7: Esquema para la evaluación de la actividad antidepresiva del veneno de <i>Rhinella marina</i>	27

INDICE DE GRAFICOS

Pág.

Gráfico 1 Promedio del consumo de sacarosa y agua del grupo control positivo (G1 H ₂ O), durante la determinación de la dosis de Citalopram en ratones hembra.	29
Gráfico 2 Promedio del consumo de sacarosa y agua del grupo control negativo sometido a estrés (G2 E+H ₂ O), durante la comprobación de Estrés Leve Crónico y la determinación de la dosis de Citalopram en ratones hembra.	29
Gráfico 3: Promedio del consumo de sacarosa y agua del grupo sometido a estrés más Citalopram 10 mg/kg (G3 E+Cit), durante la comprobación de Estrés Leve Crónico y la determinación de la dosis de Citalopram en ratones hembra.	30
Gráfico 4: Promedio del consumo de sacarosa y agua del grupo sometido a estrés más Citalopram 20 mg/kg (G4 E+Cit), durante la comprobación de Estrés Leve Crónico y la determinación de la dosis de Citalopram en ratones hembra.	30
Gráfico 5: Promedio del consumo de sacarosa y agua del grupo sometido a estrés más Citalopram 40 mg/kg (E+Cit), durante la comprobación de Estrés Leve Crónico y la determinación de la dosis de Citalopram en ratones hembra.	31
Gráfico 6: Consumo semanal de sacarosa de los grupos G1 H ₂ O= grupo blanco sin estrés (más agua); G2 E+H ₂ O= grupo control negativo (estrés más agua); G3 E+Cit= grupo control positivo (estrés mas Citalopram); G4 E+V50= grupo tratamiento estrés más dosis baja (50 mg/kg) de veneno; G5 E+100= grupo tratamiento estrés más dosis media (100 mg/kg) de veneno; G6 E+200= grupo tratamiento estrés más dosis alta (200 mg/kg) de veneno, en la evaluación de actividad biológica del veneno de <i>R. marina</i> en ratones hembra.....	32
Gráfico 7: Tiempo de inmovilización ratones hembra (segundos) al finalizar las pruebas de estrés y Test de Nado Forzado. por grupo: G1 H ₂ O= grupo control blanco (agua sin estrés); G2 E+ H ₂ O= grupo control negativo (estrés más agua); G3 E+Cit= grupo control tratamiento (Citalopram mas estrés); G4 E+V50= grupo tratamiento (estrés más 50mg/kg de veneno) G5 E+V100= grupo tratamiento (estrés más 100mg/kg de veneno); G6 E+V200= grupo tratamiento (estrés más 200mg/kg de veneno) en ratones hembras.....	34

RESUMEN

Algunos estudios determinan que por lo menos cinco de cada diez personas sufren episodios depresivos por distintas razones. Sin embargo la mayoría de medicamentos utilizados en el tratamiento de depresión causan efectos secundarios, entre estos están el aumento o pérdida de peso, disfunciones sexuales, náuseas, vómitos, diarreas, retención urinaria, confusión, sedación, debilidad, fatiga, delirio, convulsiones tónico-clónicas, hipomanía, entre otros. Es por ello la importancia de buscar medicamentos de origen natural para evitar complicaciones en los tratamientos contra la depresión.

En la presente investigación se buscó determinar el efecto antidepresivo del veneno de sapo sabanero que contiene la Bufotenina, sustancia química que por su parecido molecular a la serotonina tenga la posibilidad que presente los mismos efectos neurofarmacológicos. Las pruebas se realizaron en ratones de laboratorio de la cepa NIH (National Institute of Health), procedentes del laboratorio de Experimentación Animal del Centro de Investigación y Desarrollo en Salud (CENSALUD) de la Universidad de El Salvador (UES). La toxicidad del veneno de sapo sabanero o sapo común (*Rhinella marina*) se reporta a una dosis letal media (DL50) de 400 mg/kg en ratones. Para evaluar el posible efecto antidepresivo del veneno se utilizó el modelo de Estrés Leve Crónico (ELC), para inducir a los animales de experimentación a un estado depresivo. Se utilizó Citalopram como fármaco antidepresivo de control a una concentración de 20 mg/kg. Mientras que la concentración utilizada del veneno como antidepresivo fue de 50, 100 y 200 mg/kg. Las evaluaciones para validar el modelo de Estrés Leve Crónico, así como para evaluar el efecto antidepresivo de la sustancia de estudio se realizaron con la Test de Consumo de Sacarosa (TCS) a una concentración de 1.5% y con el Test de Nado Forzado (TNF). Los resultados de la prueba arrojan que el modelo de Estrés Leve Crónico utilizado es efectivo para la inducción a depresión, sin embargo, para la actividad biológica del veneno de *R. marina* se descarta su posible acción antidepresiva.

I. INTRODUCCIÓN

De acuerdo con estimaciones de salud a nivel mundial, alrededor de 450 millones de personas padecen de trastornos mentales. Una de cada cuatro personas desarrollará uno o más trastornos mentales a lo largo de su vida (OMS, 2001). Así mismo, se ha demostrado que los trastornos de depresión y cuadros de ansiedad son de las principales causas de discapacidad en el desarrollo cotidiano de las personas y representan una proporción cada vez mayor de la carga de morbilidad en América Latina y el Caribe (OMS, 2006; Cañoles, 2007).

En El Salvador, las enfermedades mentales como la depresión, no han recibido la importancia y atención adecuada por parte de las instituciones competentes. Este padecimiento se ha marginado y solo cuando ha existido gravedad en los pacientes, a los que muchas veces no se les da un diagnóstico acertado, se intenta subsanar esta problemática. Esto es debido a la poca información con la que se cuenta en el país sobre enfermedades mentales. En los últimos años, se ha notado un incremento en los casos de personas con depresión, lo que lleva a un desequilibrio social por episodios de violencia, alcoholismo, delincuencia, homicidios entre otros (Effective Health Care 2009).

Al no existir diagnósticos adecuados para el tratamiento de padecimientos mentales como la depresión, los psiquiatras se limitan a tratar las enfermedades con diferentes medicamentos antidepresivos que producen efectos secundarios que generan trastornos en el organismo de los pacientes.

A la fecha se han desarrollado un gran número de medicamentos para tratar los cuadros depresivos y los trastornos de ansiedad (Mora *et al.*, 2005; Mora *et al.*, 2006) y sin embargo, sus efectos adversos a la salud (Dos Santos, 2001; Bhattamisra *et al.*, 2008), han generado un continuo interés en el

aislamiento de nuevas sustancias de origen natural con actividad antidepresiva. Tal es el caso del veneno de sapo sabanero *Rhinella marina*, que por poseer una sustancia llamada Bufotenina, se hace importante la comprobación de su posible uso como medicina natural para el tratamiento de estos trastornos de carácter depresivo.

Se realizaron diversas pruebas para evaluar la posible actividad biológica de esta sustancia, las cuales comprenden: la evaluación de la toxicidad del veneno de sapo, la definición de la dosis del fármaco Citalopram utilizado como control positivo dentro de un modelo de Estrés Leve Crónico (ELC) utilizadas por Nasir (2011) y Subiabre (2012). Además de un Test de Consumo de Sacarosa para determina la efectividad del modelo. Finalmente y una vez ajustado el modelo ELC, se evaluó la actividad biológica del veneno de *R. marina* a 3 concentraciones (50 mg, 100 mg y 200 mg) y posteriormente evaluando lo resultados en el Test de Nado Forzado y el Test de Consumo de Sacarosa.

II. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL:

Evaluar el efecto antidepresivo y toxicidad del veneno de sapo sabanero (*Rhinella marina*) en ratones de laboratorio.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Identificar los signos de la toxicidad del veneno de sapo sabanero (*Rhinella marina*) tras su administración en ratones de laboratorio.
- Estandarizar el método de estrés leve crónico tras la aplicación de tres estresores (hacinamiento, inmovilización, e inclinación de la caja a 45°) a utilizar en ratones de laboratorio.
- Comparar el efecto antidepresivo del Citalopram (fármaco antidepresivo) con el efecto del veneno de sapo sabanero en ratones de laboratorio.
- Determinar la posible actividad antidepresiva del veneno de sapo sabanero *Rhinella marina*, por medio de la prueba de consumo de sacarosa.
- Demostrar el efecto del veneno de sapo sabanero como antidepresivo en ratones de laboratorio, por medio de la prueba del Test de Nado Forzado.

III. MARCO TEORICO.

3.1. Contexto.

Según el informe de salud mental elaborado por la Organización Mundial de la Salud (OMS, 2001), entre el 25% y el 50% de la población mundial ha presentado alguna vez en su vida un trastorno de tipo mental. Periago (2005) informó que las estadísticas indican que los trastornos mentales representan una proporción cada vez mayor de la carga de morbilidad en América Latina y el Caribe.

Gutiérrez en 2010, menciona que en 1990 había en las Américas unos 114 millones de personas que padecían algún tipo de trastorno mental. Por ejemplo la Esquizofrenia, el mal de Parkinson y el mal de Alzheimer; problemas como la depresión son más bien como cambios en la conducta social del individuo por trastornos psíquicos reversibles, ya que al ser tratadas con fármacos los individuos vuelven a presentar un nivel de salud óptimo. Tras esto se debe tomar en cuenta las enfermedades mentales como un problema de salud pública al que se debe prestar atención (Chávez 2004).

Estudios realizados por la OMS en 2006, sobre la carga mundial de enfermedades, han demostrado que la depresión unipolar es la principal causa de discapacidad en el desarrollo cotidiano de las personas. Al mismo tiempo, Gutiérrez (2010), menciona en relación a la depresión, que el 28,8% de su muestra de estudio realizado en El Salvador presentó síntomas de depresión de estos, 17,1% son mujeres; mientras que 11,7% son hombres. Lo que indica que la depresión es más prevalente en las mujeres.

Es de vital importancia conocer una forma para intentar contrarrestar los efectos de la depresión, desde el punto de vista de la investigación científica a favor de la sociedad. La opción para la búsqueda de medicamentos de origen

natural como el veneno de sapo común (*Rhinella marina*), se convierte en una alternativa válida para tratar de curar la depresión, ya que tiene potenciales propiedades medicinales, conteniendo en su veneno el componente llamado bufotenina que es estructuralmente similar a la serotonina, sustancia utilizada comúnmente por nuestro cuerpo para estabilizar los estados de ánimo y otras funciones del organismo como la ira, la agresión, la temperatura corporal, el humor, el sueño, el vómito, la sexualidad, y el apetito (Godoy *et al.*, 2005).

Los fármacos utilizados en el tratamiento de esta enfermedad dentro de los cuales podemos citar: Citalopram ($C_{20}H_{21}N_2FO$), Fluoxetina ($C_{17}H_{18}NF_3O$), Paroxetina ($C_{19}H_{20}NFO_3$), Sertralina ($C_{17}H_{17}NCl_2 \cdot HCl$), Nefazodona ($C_{25}H_{32}ClN_5O_2$), causan efectos secundarios en los pacientes, como: aumento o pérdida de peso, náuseas, vómitos y diarrea (Effective Health Care 2009); Por esta razón, la opción para la búsqueda de medicamentos de origen natural como el veneno de sapo (*R. marina*), se convierte en una alternativa válida para intentar contrarrestar los efectos de la depresión. Para tal fin se realizó la evaluación de la toxicidad para establecer una dosis terapéutica que permitió conocer el posible efecto antidepresivo del veneno de sapo sabanero.

3.2. Antecedentes.

Existen muy pocas investigaciones realizadas en la temática de venenos en El Salvador, sin embargo existen otros estudios relacionados con venenos de anfibios y reptiles y más en específico con sapos, y en algunos casos están relacionados a tratamientos alternativos para curar enfermedades en humanos y en animales.

Chen & Chen en 1933, realizaron un estudio con cinco especies de sapos de Norteamérica, estos fueron: *Bufo vallicep*, *Bufo fowleri*, *Bufo alvarius*, *Bufo quercicus* y *Bufo americanus*, analizaron las secreciones venenosas de

estos descubriendo que todos ellos tenían la bufotenina ($C_{12}H_{16}N_2O$), cuya sustancia presenta un comportamiento semejante al de la serotonina.

Para Arango *et al.* (1990), la serotonina ejerce importante acción sobre la conducta, movimiento, apreciación del dolor, actividad sexual, apetito, secreciones endocrinas, funciones cardíacas y el ciclo de sueño y vigilia en el organismo.

Los sapos de la familia Bufonidae han tenido lugar en las mitologías humanas y medicamentos en todo el mundo desde tiempos arcaicos; se ha utilizado por los pueblos antiguos para una variedad de propósitos. Sus efectos más espectaculares, según la tradición, implican usos mágicos y chamánicos u ocultos para lanzar hechizos y para la adivinación (Lyttle *et al.*, 1996).

En la Edad Media, los sapos del género *Bufo* fueron destacados como una panacea (medicamento al que se atribuye eficacia para curar diversas enfermedades) y perseguido por su potente veneno. Más recientemente, en la década de los 60's esta especie fue estudiada como un icono de la contracultura, por la gente que lamía o fumaba las secreciones para drogarse (Lyttle *et al.*, 1996).

Según Alguacil *et al.* (1996), la depresión constituye uno de los trastornos psiquiátricos más comunes y es uno de los problemas médicos más frecuentes. Un informe de la OMS, consideró a la depresión como una de las condiciones médicas que provoca mayor agobio en el mundo, situándola en cuarto lugar, de acuerdo a los años de vida perdidos por muerte prematura o vividos con una discapacidad severa y de larga duración. A pesar de esta realidad, un importante número de personas afectadas no recibe un diagnóstico y un tratamiento apropiado

Tamargo & Delpón (2003) encontraron que para las especies de *Bufo vallicep*, *Bufo fowleri*, *Bufo alvarius*, las secreciones actúan como una

droga similar al digital¹ La especie de sapo *R. marina*, se ha estudiado con respecto a su actividad biológica, con el fin de investigar el efecto de la actividad antimicrobiana y antidepresiva que tiene su veneno.

Ante la deficiencia de la serotonina se produce un decaimiento anímico en el organismo en muchas ocasiones, la cual se considera como un caso depresivo (Heaton, 2003).

La problemática de salud mental y emocional se ha venido intensificando en los últimos años, siendo un factor destacado los casos de depresión, violencia, etc., que tienen un impacto negativo en la sociedad salvadoreña los cuales deben ser considerados para poder sobrellevar cualquiera de estos padecimientos (Chávez, 2004).

Una investigación realizada por Godoy *et al.* (2005) menciona, que dentro de los componentes de la secreción de las glándulas paratoides del sapo, se encuentran los principios activos del veneno; de estos, los más relevantes son la bufotoxina y la bufotenina, mencionándose que la bufotenina actúa similar a la serotonina.

La piel de los anfibios posee glándulas alveolares o tubulares las cuales segregan sustancias tóxicas que repelen o matan a los depredadores, y también para eliminar patógenos microbianos (Garg *et al.*, 2008). Las secreciones de la mayoría de los sapos, especialmente la del género *Bufo* contiene compuestos farmacológica y terapéuticamente significativos que pueden utilizarse en la producción de analgésicos, fármacos antimicrobianos, antivirales y fármacos anticancerosos; estas toxinas ejercen efectos sobre las actividades neurológicas. La bufotenina, contiene factores que son inductores

¹Son glucósidos heterósidos de estructura química similar que se encuentran en diversas plantas, especialmente en las hojas de la *Digitali lanatay* de la *D. purpurea*, por lo que, de forma genérica, se los denomina también glucósidos digitálicos o simplemente digitálicos (Tamargo y Delpón J. 2003).

del sueño probablemente por la alteración de los niveles de aminas biogénicas del cerebro como lo son: la monoaminoxidasa y el triptófano hidroxilasa (Garg *et al.*, 2008).

Además, en las observaciones hechas por Pinto *et al.* (2009), hubo actividad antimicrobiana leve para colonias de bacterias, tanto de *Escherichia coli* como *Staphylococcus aureus*. De esta manera, uno de los posibles usos del veneno de la especie *Rhinella marina*, puede ser la elaboración de nuevos fungicidas y bactericidas que logren combatir la resistencia de algunas bacterias y microorganismos.

3.2.1. Tratamientos naturales de enfermedades mentales.

Estudios realizados por Pulido (2009), menciona que la rana dardo (*Dendrobates histrionicus*) produce una sustancia denominada histrionicotoxina. Esta no la produce directamente la rana, sino que es un grupo de alcaloides que son absorbidos y almacenados por las glándulas cutáneas de la rana a partir de su dieta. La histrionicotoxina es una toxina que actúa sobre las células del sistema nervioso, alterando la conducción de mensajes, produciendo dificultades en la locomoción y paralizando los músculos esqueléticos. En dosis adecuadas, la histrionicotoxina puede ser aplicada en tratamiento de problemas mentales como el Alzheimer y el Síndrome de Down. Según la investigación realizada, algunas tribus en la Amazonia han utilizado el veneno de la rana dardo como analgésico al momento de realizar alguna operación. Según este autor, esto es solo el principio de las investigaciones que se realizan, por lo que es cuestión de tiempo el que se puedan descubrir nuevas fuentes de fármacos para evitar o atenuar diversas enfermedades principalmente neurológicas.

3.3. Distribución geográfica (mundial, regional y local) de *Rhinella marina*.

El sapo sabanero es nativo de América, se distribuye desde el sur de Texas hasta el Amazonas central y sudeste de Perú; por lo que se incluye en ambientes tropicales y semiáridos. La densidad del sapo sabanero dentro de su distribución nativa es significativamente más baja que la de su distribución inducida. Para Sudamérica, se han registrado densidades de 20 adultos por cada 100 metros de litoral, en Australia fue introducido y se tiene que por cada 100 metros de Litoral hay de 1000 a 2000 adultos (Zug 1979). Para Centroamérica se tiene que se encuentra presente en toda la región y más específicamente para El Salvador se encuentra distribuido desde los 0 hasta los 2730 metros sobre el nivel del mar (Köhler 2006) sin especificaciones de su densidad poblacional.

3.4. Taxonomía de *Rhinella marina*.

Clasificación taxonómica del sapo común o sabanero:

Reino: Animalia

Phylum: Chordata

Clase: Amphibia

Orden: Anura

Familia: Bufonidae.

Género: *Rhinella*.

Especie: *marina*.

3.5. Ecología y comportamiento de *Rhinella marina*.

Los sapos sabaneros al sentirse amenazados, secretan un fluido blanco alcaloide, conocido como: bufotoxina, que contiene componentes que resultan tóxicos para muchos animales. Incluso, se han reportado muertes de seres humanos, intoxicados al tratar de capturarlos y consumirlos. El sapo sabanero es capaz de inflar sus pulmones, alzando su cuerpo para parecer más grande ante un depredador (Zug 1979).

Muchos anuros identifican una presa por sus movimientos; los sapos sabaneros pueden además localizar comida usando su sentido del olfato. Ellos no se limitan por consiguiente a cazar presas y pueden comer plantas, carroña, comida de perros y desechos, aparte de la alimentación normal de éstos, basada en vertebrados e invertebrados pequeños (Zug 1979).

El nombre científico *Rhinella marina*, sugieren un enlace con la vida marina; sin embargo no hay tal enlace. Los sapos sabaneros adultos son completamente terrestres, aventurándose en el agua dulce sólo para reproducirse, y los renacuajos se encuentran solamente tolerando concentraciones salinas equivalentes al 15% del agua de mar. Huevos y renacuajos son tóxicos para muchos animales. Esta protección tóxica la pierden por un período después de la metamorfosis hasta el desarrollo de las glándulas paratiroideas. Los sapos sabaneros no habitan en prados abiertos, generalmente evitando áreas forestales; esto inhibe su extensión en muchas de las regiones en las cuales fueron introducidos (Zug 1979).

3.6. Veneno de Anfibios.

Distintas especies animales han desarrollado estrategias para asegurar su supervivencia. Una forma de garantizar el dominio sobre la víctima es la mezcla de sustancias capaces de generar en la presa afectación de procesos vitales tales como la transmisión neuromuscular, la circulación sanguínea y la

permeabilidad de las membranas. Esta mezcla de sustancias se conoce como veneno. Las herramientas moleculares capaces de lograr dichas acciones y en el orden correcto, son las toxinas. La mayoría son proteínas y sustancias de bajo peso molecular, peptídicas o no, que tienen como sitio blanco de acción en general las enzimas, los receptores, los canales iónicos y las membranas (Castañeda, 2000).

El desarrollo del veneno en los animales está dotado con una ventaja de supervivencia crucial contra una variedad de depredadores. En los animales tóxicos, como las ranas y los sapos, los venenos corresponden a conjuntos de moléculas bioactivas dirigidos a afectar rutinas fisiológicas esenciales (por ejemplo, la conducción nerviosa, la nocicepción (percepción del dolor), la homeostasis, la frecuencia cardíaca y de la motilidad gastrointestinal). A diferencia de las ranas, los sapos han desarrollado un mecanismo distinto de la defensa que no depende de polipéptidos bioactivos. En su lugar, estos animales utilizan una variedad de pequeñas moléculas con la capacidad de alterar el sistema cardiovascular de sus depredadores (Morales, 2010).

Uno de los grupos de animales que desarrollaron veneno para su defensa fueron los anfibios, de los cuales se estiman unas 4,780 especies de ranas y sapos viviendo en el mundo, de este número de especies, 27 se encuentran en El Salvador y de estas, 5 pertenecen a la familia Bufonidae, y el representante más abundante y característico de esta familia es *Rhinella marina* antes conocido con el género *Bufo marinus* (Medeiros, 2008).

Los anuros no atacan, no poseen garras ni dientes para defenderse. A cambio poseen glándulas distribuidas en todo el cuerpo responsable de la producción del veneno. El veneno es expulsado cuando estas glándulas son presionadas; por tal razón, en el caso de la especie *R. marina* existen ocasiones en que son reportados perros que han sido intoxicados por las secreciones de estos anfibios, dado a que estos son los más propensos a verse

afectados por el veneno de los sapos, debido a las actividades de los perros y sus encuentros con éstos (Godoy *et al.*, 2005).

3.6.1. Glándulas parotoides y principios activos del veneno

Las glándulas parotoides del sapo se ubican en ambos lados del cuello. Estas se encargan de expulsar una sustancia venenosa de un color blanco ocre (Godoy *et al.*, 2005).

El veneno contiene numerosas sustancias tóxicas entre estas, bufotoxinas como: Bufodienoles, Bufoteninas y además de los esteroides no cardíacos los cuales se describen a continuación.

Bufotoxina (C₄₀H₆₀N₄O₁₀): Su acción se observa a nivel enzimático inhibiendo la ATPasa de la Bomba de Na⁺-K⁺ de la fibra del músculo cardíaco, bloqueando la actividad en los canales de Na⁺, eleva la concentración de Ca⁺⁺ intracelular, causando un aumento de la contracción del corazón y por lo tanto una reducción en la frecuencia cardíaca (Godoy *et al.*, 2005).”

Bufadienolidos (C₂₄H₃₄O₂) - Bufaginas (C₂₄H₃₄O₅): son sustancias esteroideas cardioactivas sintetizadas por las glándulas parotoides a partir del colesterol, con acción semejante a los digitálicos. Estos glucósidos cardíacos poseen un núcleo esteroide, con un anillo lactona en su carbono 17, esencial para su actividad selectiva sobre el corazón, a nivel del carbono 3 se produce los enlaces glucosídicos que le dan las propiedades físicas de solubilidad en alcohol y liposolubilidad, la potencia y unión con proteínas plasmáticas, eliminación y duración del efecto (Godoy *et al.*, 2005).

Bufotenina (5-OH-DMT): Es una triptamina (figura 1) relacionada con el neurotransmisor serotonina. Dentro de esta se encuentran un grupo numeroso de bufoteninas, las cuales tienen un efecto vasopresor (Godoy *et al.*, 2005).

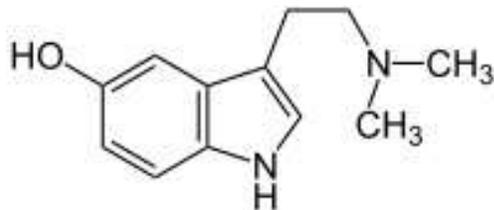


Figura 1. Estructura de la Bufotenina. Imagen tomada de la revista en línea Psychotropicon (2013).

Otra clasificación de los compuestos de las secreciones de los sapos de la familia *Bufo* los agrupa en: Las aminas biogénicas, bufadienolides, los alcaloides, esteroides, péptidos y proteínas (Clarke, 1997). De las cuales los más abundantes son las aminas biogénicas y péptidos, de estas la más importante es la bufotenina (Garg *et al.*, 2008).

3.7. Modelos de experimentación.

La serotonina o 5- Hidroxitriptamina (figura 2), se ha reconocido por más de 50 años como medicamento que fomenta la agregación plaquetaria y como neurotransmisor del sistema nervioso central, la problemática de la depresión se trata con medicamentos que afectan o estimulan las sinapsis de las células nerviosas cerebrales; de esta función se encarga la serotonina (5-HT) de manera natural (Goodman & Gilman, 2007).

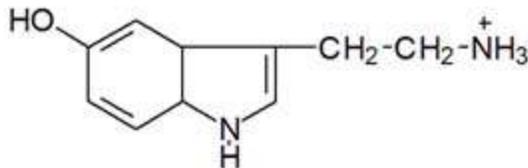


Figura 2. Estructura de la serotonina. Imagen tomada de Subiabre A. (2012).

La bufotenina es un compuesto cuyo efecto es similar a esta hormona y que pudiera ser utilizada como sustituto o de manera alternativa para contrarrestar episodios depresivos (Godoy *et al.*, 2005).

Existen varios modelos de experimentación animal (ratas y ratones) para la inducción a depresión, como los de sometimiento a estrés, indefensión aprendida (pérdida del deseo de las actividades que puedan generar algún tipo de placer), desesperanza conductual, estrés crónico, aislamiento, lesiones o manipulaciones cerebrales, entre otras (Mangieri 2008). Además de la administración de sustancias depresivas como la reserpina ($C_{33}H_{40}N_2O_9$).

Los modelos animales de estrés crónico han brindado información muy importante, sin embargo, aún existe un porcentaje significativo de la población humana que no responde al tratamiento antidepresivo actual. Por esta razón, es importante destacar que mientras más cercano sea el modelo animal a las alteraciones conductuales que se desarrollan en los humanos afectados con estrés psicosocial o un episodio depresivo, mejores resultados se obtendrán en un estudio farmacológico (Subiabre, 2012).

Para la evaluación del efecto antidepresivo de sustancias experimentales en animales de laboratorio previamente deprimidos, uno de los más utilizados es el Test de Nado Forzado (TNF) descrito por Porsolt *et al.* (1977). Es uno de los modelos más ampliamente utilizados para detectar actividad antidepresiva en un gran número de sustancias que se cree tienen propiedades para curar la depresión (Ruge, 2007).

También existe el Test del Consumo de Sacarosa (TCS) que es otro método para medir el efecto antidepresivo de sustancias que se cree tienen propiedades antidepresivas administradas a animales experimentales previamente deprimidos (Subiabre, 2012).

3.8. Depresión como trastorno mental en humanos.

La depresión es un trastorno altamente complejo del estado anímico, en el cual los sentimientos de tristeza, pérdida, ira o frustración interfieren con la vida diaria durante un período prolongado, que afecta a un porcentaje elevado

de la población general y a pesar de los abundantes estudios clínicos y experimentales, aún se desconocen diversos aspectos implicados en su fisiopatología y en las acciones de las terapias farmacológicas utilizadas en su manejo (Ruge, 2007).

Se calcula que más del 20% de la población mundial, sufrirá de depresión en algún momento de sus vidas (Valles, 2002). Las personas con depresión se caracterizan por presentar una serie de síntomas como la pérdida de interés y motivación, disminución de su vitalidad, cansancio extremo al realizar un esfuerzo mínimo, disminución de la atención, pérdida de confianza en sí mismo y la prevalencia de sentimientos de inferioridad (Gutiérrez, 2004).

La disfunción social u ocupacional, o un nivel elevado de angustia distinguen la depresión de la tristeza transitoria, que es una consecuencia de la vida normal. En personas con tristeza, los niveles de angustia y funcionalidad, son proporcionales al evento vital desencadenante. Entre las claves que distinguen la depresión, se incluyen haber sufrido un episodio depresivo previo o intento de suicidio, una historia familiar de alteraciones del comportamiento, ausencia de apoyo social, haber atravesado situaciones de la vida estresantes, abuso del alcohol u otras sustancias adictivas y, la concurrencia de enfermedad crónica, dolor o discapacidad. No se dispone de pruebas de laboratorio ni marcadores biológicos que puedan utilizarse como medio para la detección rutinaria para diagnosticar la depresión. En su lugar se dispone de diversas escalas de autoevaluación, que realiza el propio paciente (Zung, BDI, GDS, etc)² que permiten identificar síntomas y circunstancias presentes o no en un

² **Zung Self-Rating Depression Scale.** diseñado por la Universidad de Duke psiquiatra Dr. William WK Zung para evaluar el nivel de depresión en los pacientes con diagnóstico de trastorno depresivo.

Inventario de Depresión de Beck (BDI , BDI-II), creado por el Dr. Aaron T. Beck , es un Test de 21 pregunta de opción múltiple de auto-reporte, uno de los instrumentos más utilizados para medir la gravedad de la depresión.

Escala de Depresión Geriátrica (GDS) es un test de 30 temas de auto-reporte de evaluación utilizado para identificar la depresión en los ancianos.

determinado paciente, y se utilizan para diagnosticar o descartar la presencia de depresión (CADIME 1999).

3.8.1. Tipos de depresión: Principales características.

La clasificación de la depresión es muy variable, dependiendo de los autores y puntos de vista de los especialistas en la salud mental, los cuales consideran muchos factores, incluyendo el estado de ánimo, uso de fármacos, entorno social, etc. (Acosta *et al.*, 2010). De manera general los diferentes tipos de alteraciones anímicas son las siguientes:

- Depresión mayor: Uno o más episodios depresivos. Ésta puede ser causada por desequilibrios químicos en el cerebro, provocados por el estrés, que experimentan una pérdida personal, o una experiencia traumática (Heaton, 2003).
- Alteraciones distímica: Al menos 2 años de comportamiento predominantemente depresivo con otros síntomas depresivos, pero sin encontrarse criterios diagnósticos de depresión mayor.
- Trastorno bipolar I: Al menos un episodio maníaco, usualmente acompañado de episodios de depresión mayor.
- Trastorno bipolar II: Uno o más episodios de depresión mayor y al menos un episodio hipomaníaco.
- Depresión debida a la condición médica general: Directamente relacionada con la alteración fisiológica provocada por una condición médica identificada.
- Depresión debida a sustancias químicas: Directamente relacionada con la alteración fisiológica provocada por una toxina, medicación o droga.
- Depresión sin especificar: Depresión significativa que no sigue los criterios del trastorno depresivo mayor (MASSON ©, 1995).

Las formas de tratamiento dependen del tipo de depresión y origen del mismo, estos pueden ser tratados con terapia psicológica, ocupacional, y en casos de problemas más marcados o diagnosticados de problemas cerebrales, son tratados con medicamentos (Iruela *et al.*, 2009).

3.9. Signos y evaluación de la depresión en animales de laboratorio.

Los modelos para inducción a estrés son utilizados para generar conductas depresivas, se produce una serie de alteraciones en el comportamiento de los animales experimentales que son expuestos a dichos modelos de estrés, como la disminución de la motivación, cambios en el ciclo circadiano y alteraciones en el sueño, aumento de la agresividad y la ansiedad, disminución de la capacidad sexual y aumento del comportamiento de sumisión y disminución de la interacción social (Cryan & Holmes, 2005; Insel, 2007; Krishnan & Nestler, 2011).

Katz en 1981 y sus colaboradores fueron los primeros científicos en desarrollar un modelo de conductas depresivas en ratas, ellos usaron varios estresores que fueron cambiando durante 21 días. Este procedimiento fue modificado posteriormente por Willner en el 2005 y sus colaboradores, ellos aumentaron el periodo de tiempo de la aplicación de los estresores y disminuyeron su intensidad. Luego de esto se pudo disminuir en los animales de experimentación significativamente la preferencia al consumo de una solución de sacarosa, lo que es considerado como anhedonia³ en las ratas, este efecto se previno solo con la aplicación de antidepresivos y no con neurolepticos o ansiolíticos.

³**Anhedonia:** La incapacidad para experimentar placer. se encuentra en pacientes diagnosticados de esquizofrenia, depresión, trastorno obsesivo compulsivo, en algunas enfermedades neurológicas y como efecto secundario de determinados fármacos.

A partir de estos experimentos se desarrollaron muchas variantes en los modelos de estrés crónico para producir anhedonia (Moreau *et al.*, 1995; Wood *et al.*, 2008). Lamentablemente muchos de estos modelos produjeron resultados contradictorios, ya que por un lado producían anhedonia y por otro lado afectaban significativamente la actividad locomotora de los animales.

IV. METODOLOGIA

4.1. Ubicación geográfica del lugar donde se realizó la colecta de los sapos para la obtención del veneno.

Los sapos fueron colectados en el río Lempa, en el sector fronterizo entre El Salvador y Honduras, en el municipio de Citalá con coordenadas 14°22'43.10"N y 89°12'42.69"O en el Departamento de Chalatenango, El Salvador (figura 3.) se seleccionó este lugar debido a la abundancia de estos anfibios y por ser una zona menos contaminada. Los sapos se buscaron en las primeras horas de la noche y se capturaron manualmente.

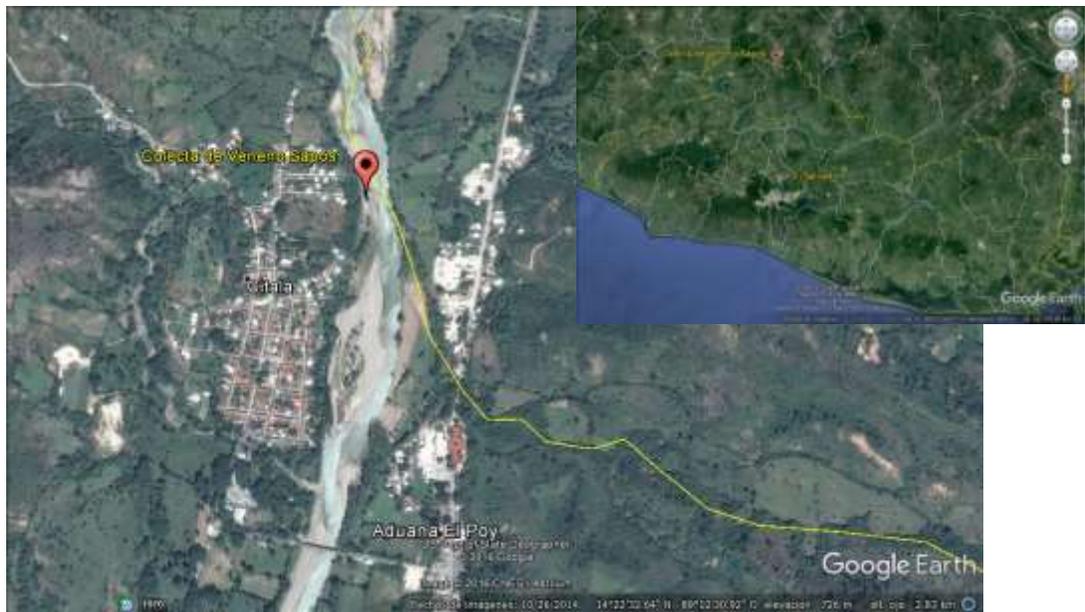


Figura 3. Ubicación geográfica del lugar de colecta del veneno de sapo *Rhinella marina*. Frontera entre El Salvador y Honduras, municipio de Citalá, Chalatenango. Imagen tomada de Google Maps (2013).

4.2. Obtención del veneno: sustancia de ensayo.

La extracción de veneno fue *ex situ*, éste se extrajo del sapo *R. marina* presionando la glándula parotoide, procurando que el chorro de veneno expulsado cayera dentro de una caja Petri esterilizada, el veneno total fue

transportado en cadena de frío (en hielera) por 12 horas, hasta la mañana siguiente a las instalaciones del Centro de Investigación y Desarrollo en Salud (CENSALUD) ubicado en la Universidad de El Salvador (13°43'6"N y 89°12'11"O), donde se recogió por raspado del vidrio de la caja de Petri para su pesaje y posterior preparación de las concentraciones y su uso en los ensayos (Gracielle *et al.*,2009).

4.3. Animales de experimentación.

Para los ensayos se utilizaron ratones NIH de ambos sexos, con un peso corporal entre 20 y 25 g, con aproximadamente 5 semanas de nacidos, todos pertenecientes al Laboratorio de Experimentación Animal de CENSALUD, se mantuvieron en condiciones de temperatura y humedad relativa controlada de $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ y entre 50-60% respectivamente, con un ciclo luz - oscuridad de 12/12 horas, los ratones fueron marcados con ácido pícrico para su identificación individual, todos fueron examinados clínicamente previo a cada ensayo para certificar su estado de salud. Se alimentaron a base de concentrado peletizado para roedores y agua a voluntad.

4.4. Ensayos previos.

En los ensayos previos se realizó la toxicidad aguda con la finalidad de definir la concentración de la sustancia. Para esto se realizó un ensayo de 14 días a dosis repetidas siguiendo el Procedimiento Normalizado de Trabajo de "toxicidad aguda oral" del LEA (2010). Se estandarizó el método para la inducción de depresión en ratones, mediante un protocolo de Estrés Leve Crónico (ELC), tomado de las metodologías descritas por Nasir (2011) y Subiabre (2012). Se realizaron ensayos con base a las metodologías utilizadas por Rygula *et al.* (2005), Ruge (2007) & Subiabre (2012) para determinar si el modelo de depresión utilizado por Nasir (2011) & Subiabre (2012) son efectivos para deprimir a los ratones de nuestra investigación de acuerdo a las

condiciones del lugar de trabajo. También se elaboraron ensayos para el ajuste de dosis del control positivo del fármaco de referencia (Citalopram) basado en el estudio llevado a cabo por Rygula *et al.* (2005).

4.4.1. Ensayo de toxicidad aguda oral de 14 días Para la obtención de la Dosis Letal media (DL50)

Para la toxicidad aguda oral de 14 días, que determinar la Dosis Letal Media (DL50); se llevó a cabo conforme a lo establecido en los Protocolos de las guías de la Canadian Council on Animal Care (CCAC, 1998) para el cuidado y uso de los animales de experimentación y lo establecido en las guías 420 y 407 de la Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD 1995, 2001)

La prueba consistió en la búsqueda de la concentración mínima del veneno que empezara a causar signos de toxicidad en los animales experimentales. Se dio inicio con la concentración de 5 mg/kg de peso corporal, administrado a un grupo de 3 ratones machos y otro grupo igual con ratones hembra.

Al no observarse mortalidad ni signos de toxicidad, se aumentó la concentración a 50 mg/kg administrada para igual número de ratones. Como no se observó un deterioro general en la salud general de los animales, nuevamente se aumentó la concentración para que de esta manera se pudiera encontrar la concentración mínima toxica o la dosis letal media (DL50). La sustancia se administró empleando una cánula intragástrica con un volumen de 0.2 ml, que es la cantidad estándar de administración de sustancias para ratones según protocolo.

Los animales se observaron después de la canulación al menos durante los primeros 30 minutos, periódicamente durante las primeras 24 horas con especial énfasis durante las primeras 4 horas (ver anexo 1). Se tomó nota de los

signos clínicos diariamente, permaneciendo en observación los animales durante 14 días, (ver anexo 2) luego de este proceso los animales experimentales fueron sacrificados por el método eutanásico de dislocación cervical.

4.4.2. Estandarización del modelo de Estrés Leve Crónico (ELC).

Se utilizaron 3 estresores de depresión en roedores mediante un protocolo de Estrés Leve Crónico (ELC), para 5 grupos de 5 ratones hembra, los cuales se sometieron a prueba dos veces al día, de 7:00 - 8:00 am, 2:00 – 3:00 pm; por un período de 4 semanas.

El primer modelo se efectuó teniendo a los roedores en hacinamiento (aglomeración en un mismo lugar). Se mantuvieron en una jaula pequeña adecuada para 2 ratones. El segundo estresor aplicado en los grupos experimentales; fue la inmovilización de roedores, el cual consiste en que los animales de experimentación (excepto el grupo control) fueron agrupados bajo condiciones controladas y colocados por una hora en inmovilizadores (ver figura 4) con el fin de obtener animales deprimidos, provocando estrés y una serie de alteraciones funcionales y del comportamiento. Los inmovilizadores fueron fabricados utilizando tubos cónicos de policarbonato de la marca Becton Dickinson Falcon de 50 ml de capacidad (30x115mm).



Figura 4: Inmovilizadores de ratones, fabricados con tubos cónicos de policarbonato de la marca Becton Dickinson Falcon de 50 ml de capacidad (30x115mm).

El tercer estresor consistió, en mantener las jaulas inclinadas a 45° conteniendo a los grupos experimentales, durante 1 hora, posterior a la aplicación del estresor de inmovilización. Los tres modelos de depresión estuvieron a prueba de manera simultánea.

4.4.3 Test de Nado Forzado (TNF)

El TNF se aplicó a los 5 grupos experimentales, se colocó a un ratón en un cilindro de 35 cm de altura y con un diámetro de 24 cm aproximadamente, el cual contenía 3500 ml de agua (Ver figura 5). Esto se realizó durante 15 minutos y se observó su conducta. Se registró el tiempo de latencia, el cual corresponde al tiempo de nado del animal desde el momento que se coloca en la superficie del agua, hasta que queda inmóvil. Todos los resultados se anotaron en un cuadro de coleta de datos (ver anexo 4). Se considera inmóvil cuando el ratón realiza los movimientos mínimos para mantener la cabeza fuera del agua (inmovilidad total). Entre menos tiempo dure el nado de los animales experimentales, más se considera que se encuentran en un estado depresivo, Porsolt *et al.* (1977).



Figura 5: Test de Nado Forzado en beakers de 3500 ml. (En el cual se midió el tiempo de inmovilización).

4.4.4 Comprobación de Estrés Leve Crónico (ELC), determinación de la dosis de Citalopram, Test de Consumo de Sacarosa.

Antes del inicio del sometimiento a las semanas bajo el ELC, todos los animales se sometieron al Test de Nado Forzado para tener un dato inicial de su estado depresivo.

El sometimiento a ELC se llevó a cabo durante 5 semanas; se dividieron 5 grupos de 5 animales hembra cada uno de la siguiente manera: El grupo 1, tratado con agua destilada sin sometimiento a estrés; el grupo 2, tratado con agua destilada y sometido a estrés (Hacinamiento, inmovilización e inclinación de las jaulas a 45°), los grupo 3, 4 y 5 fueron sometidos a estrés más las diferentes dosis de Citalopram (10, 20 y 40 mg/kg de peso respectivamente). Dicha sustancia fue administrada por vía oral a volúmenes de 0.2 ml, durante un mes (figura 5).

En la primera semana los grupos 2, 3, 4 y 5 fueron sometidos solamente a estrés, sin ningún tratamiento, a partir del día 8, a estos grupos se les comenzó a administrar agua destilada (grupo 2) y con las diferentes dosis de Citalopram a los demás grupos.

Durante todo el proceso se realizó una prueba por semana del consumo de sacarosa, esto permite analizar si los animales poseen comportamientos depresivos. La preferencia de agua, en lugar de la solución de sacarosa, indica características depresivas. Esta prueba consistió en exponer a los animales durante 24 horas a dos opciones de bebida una solución de sacarosa al 1.5 % y otra de agua, para que cada animal decidiera que líquido bebería, y cada 12 horas se cambió la posición de las botellas a modo de determinar la preferencia de consumo de sacarosa. Una vez que los animales fueron entrenados en el consumo de una solución de sacarosa este fue monitoreado en un cuadro a

través del peso de la botella que contenía la solución de sacarosa, al inicio y al término de la prueba (ver anexo 3)

24 horas después de finalizadas las 5 semanas, se comenzó con el TNF para cada uno de los animales de cada grupo, para evaluar el estado depresivo de los mismos, validando si funciona o no el sometimiento a ELC. Además se obtuvo la dosis apropiada de Citalopram adecuada para el ensayo principal.

Finalmente se llevaron a cabo las pruebas para medir la actividad antidepresiva: TCS y el TNF, con base a las metodologías utilizadas por Rygula *et al.* (2005), Ruge (2007) y Subiabre (2012).

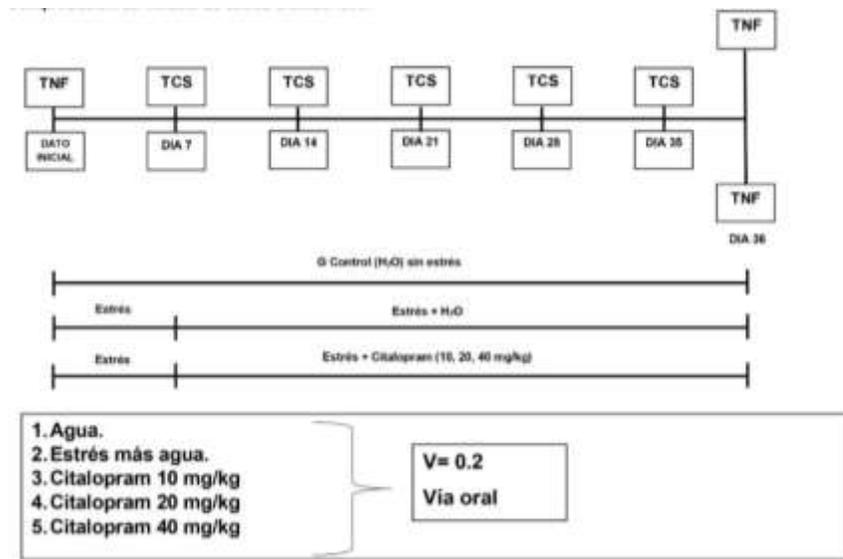


Figura 6: Esquema para la determinación de la dosis de Citalopram y comprobación del modelo de Estrés Leve Crónico (ELC).

4.5. Evaluación de la actividad antidepresiva del veneno de *Rhinella Marina*.

Se formaron 6 nuevos grupos de 5 ratones cada uno en los cuales el Test de Nado Forzado fue aplicado antes de que los animales fueran expuestos al modelo de ELC y antes del tratamiento con las dosis definidas de veneno de sapo y la dosis del fármaco antidepresivo (Citalopram). Finalmente se aplicó el

TNF al terminar las 5 semanas de exposición a estrés y las dosis del veneno y dosis del fármaco Citalopram para evaluar su funcionamiento. De la misma manera se tomó un dato inicial de consumo de sacarosa para cada uno de los animales de experimentación.

El ensayo principal de la actividad biológica del veneno se llevó a cabo durante 5 semanas y la disposición de los grupos experimentales fue de la siguiente forma:

El grupo 1 fue tratado solamente con agua, sin sometimiento a estrés. Del grupo 2 en adelante fueron todos sometidos a estrés sin administración de ninguna sustancia durante la primera semana. Posterior a esto el grupo 2 se inició a tratar con agua destilada más los estresores, el grupo 3 con Citalopram, y finalmente los grupos 4, 5 y 6 se les administro las tres diferentes dosis del veneno de *R. marina*. Cada semana se realizó el TCS con la descripción antes mencionada (figura 6).

Para el sometimiento a estrés se utilizaron 3 estresores de depresión en roedores mediante un protocolo de ELC. El primer estresor se efectuó manteniendo a los roedores en hacinamiento, cada grupo experimental se mantuvo en una jaula adecuada para dos individuos, y se dejaron en estas condiciones durante 5 semanas.

El segundo estresor que se aplicó en los 5 grupos experimentales fue el de inmovilización, y se efectuó de la siguiente manera: Los animales de experimentación (excepto el grupo control), fueron agrupados bajo condiciones controladas por dos horas en inmovilizadores de ratones, 2 veces al día, de 7:00 - 8:00 am, 2:00 – 3:00 pm; para obtener animales deprimidos, provocando estrés y una serie de alteraciones funcionales y del comportamiento. El tercer estresor consistió, en mantener a los 5 grupos experimentales en las jaulas inclinadas a 45° durante 1 hora. Finalizadas las cinco semanas de prueba, cada ratón pasó por el TNF, para evaluar la actividad del posible efecto antidepresivo del veneno de *R marina*.

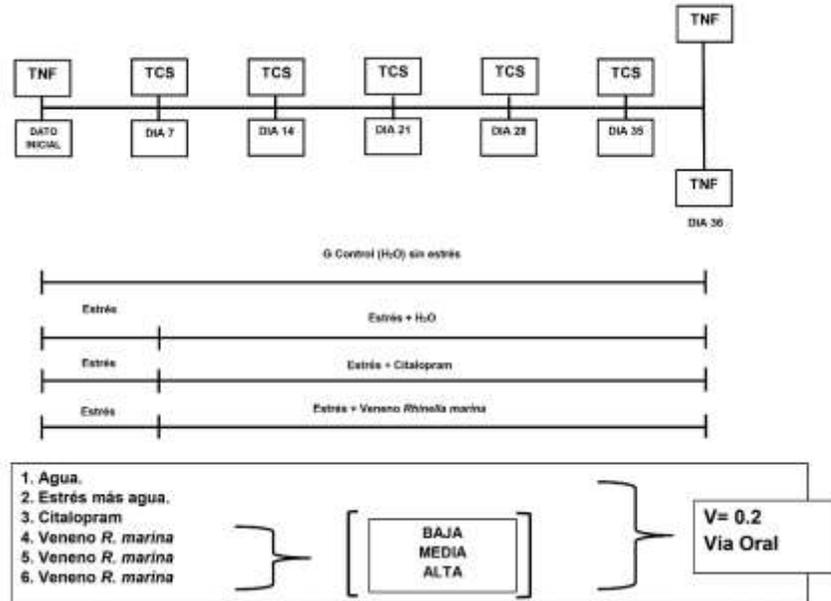


Figura 7: Esquema para la evaluación de la actividad antidepresiva del veneno de *Rhinella marina*.

4.6. Análisis estadístico.

Todos los datos fueron estadísticamente evaluados con los softwares SPSS y STATGRAPHICS Centurión XVI.I, con apoyo de Microsoft Excel 2013. Los análisis incluyeron una prueba T para muestras relacionadas, para evaluar el peso de los animales, el análisis de varianza de una sola vía (ANDEVA), seguida de un test de Dunnett para comparaciones múltiples en la actividad biológica. Se consideró que la diferencia entre los grupos tratados y el grupo control era significativa, cuando $p < 0,05$. Todos los resultados fueron expresados como la Media \pm la Desviación Estándar de los grupos experimentales.

V. RESULTADOS.

5.1 Toxicidad aguda Oral 14 Días. Para la obtención de la Dosis Letal media (DL50)

La dosis a la que los animales de experimentación mostraron signos de fue de 400 mg/kg de peso, donde los ratones mostraron inicialmente piloerección, y dolor abdominal, posteriormente perdida de reacción a estímulos, vaso contricción periférica, temores, convulsiones (ver anexo 1) y finalmente la muerte alrededor de dos horas después de suministrado el veneno de *R. marina* (ver anexo 2).

5.2 Resultados del Test de Consumo de Sacarosa en el establecimiento de la dosis de Citalopram.

En las pruebas realizadas durante la comprobación de ELC y la determinación de la dosis de Citalopram, se obtuvo que la dosis del fármaco de referencia, que se usaría para la posterior evaluación del efecto antidepresivo del veneno de *R. marina*, sería de 20 mg/kg ya que esta dosis fue la que presento menos fluctuación en el protocolo; según el comportamiento de los sujetos de experimentación que se describen a continuación.

Al final del TCS del grupo tratado con agua se comportó de manera similar, (grafico 1) con un dato inicial de 29 y 26 gramos de peso de la botella respectivamente con la mayor variación en la segunda semana en donde consumieron más sacarosa, y manteniendo una diferencia menos marcada en el resto de las semanas de prueba. Esto refleja la tendencia de interés en la sustancia que les genera satisfacción a los ratones y por ende menos características depresivas aunque de manera leve.

Debido al mayor consumo de agua, el peso de la botella es menor en el grupo 2 (grafica 2) las características depresivas se vuelven notorias por la anhedonia, evitando la sacarosa que les produce placer, y mostrando lo esperado para este grupo. (A mayor consumo de sacarosa, menor depresión).

Para los últimos tres grupos (Graficas 3, 4 y 5) la tendencia fue siempre la preferencia de consumir sacarosa por sobre el agua, mencionando que el Citalopram funciono según lo esperado, eligiendo así la dosis promedio del fármaco de 20 mg/kg, ya que fue la que presento menos variación en el protocolo.

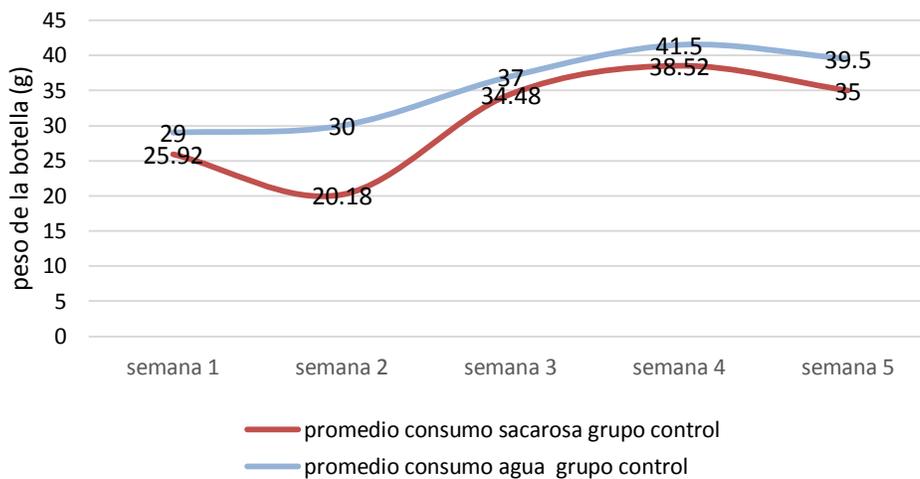


Gráfico 1 Promedio del consumo de sacarosa y agua del grupo control positivo (G1 H₂O), durante la determinación de la dosis de Citalopram en ratones hembra.

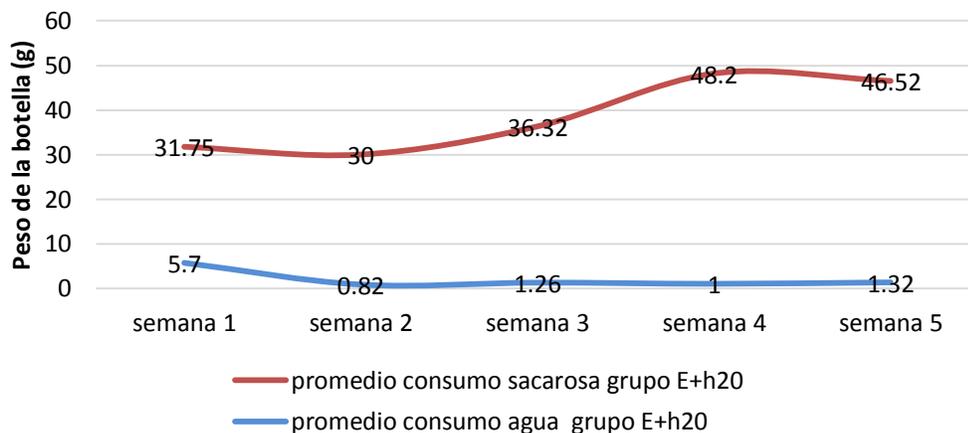


Gráfico 2 Promedio del consumo de sacarosa y agua del grupo control negativo sometido a estrés (G2 E+H₂O), durante la comprobación de Estrés Leve Crónico y la determinación de la dosis de Citalopram en ratones hembra.

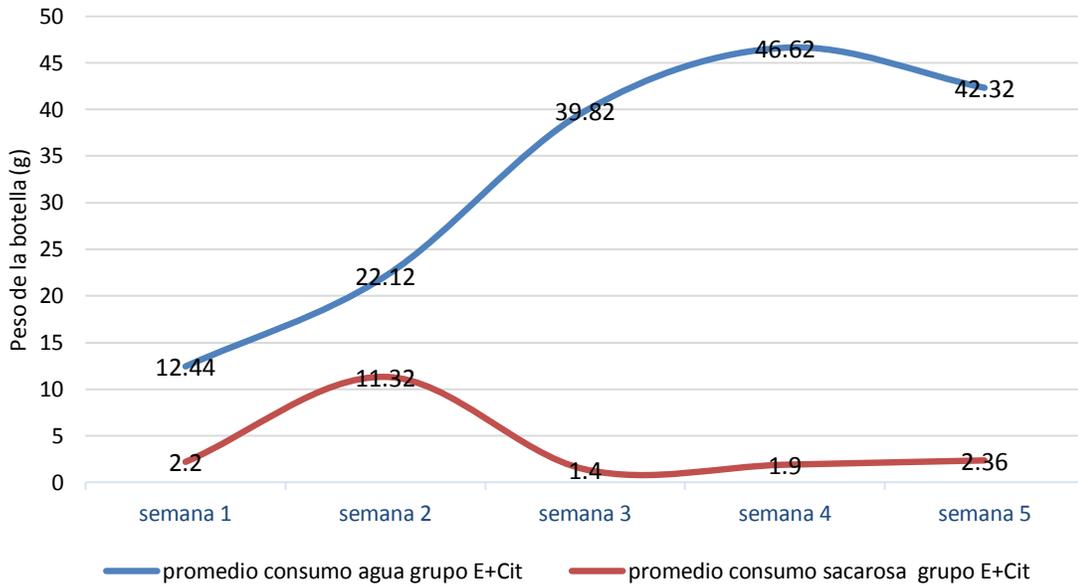


Gráfico 3: Promedio del consumo de sacarosa y agua del grupo sometido a estrés más Citalopram 10 mg/kg (G3 E+Cit), durante la comprobación de Estrés Leve Crónico y la determinación de la dosis de Citalopram en ratones hembra.

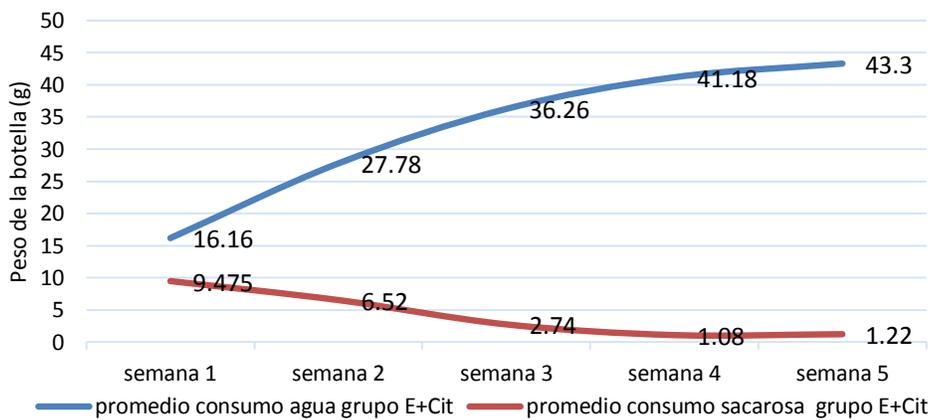


Gráfico 4: Promedio del consumo de sacarosa y agua del grupo sometido a estrés más Citalopram

20 mg/kg (G4 E+Cit), durante la comprobación de Estrés Leve Crónico y la determinación de la dosis de Citalopram en ratones hembra.

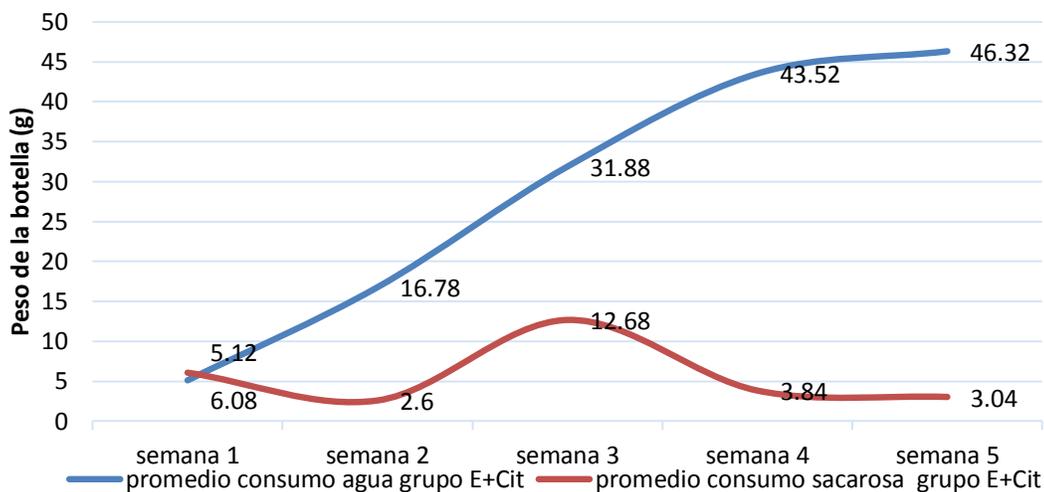


Gráfico 5: Promedio del consumo de sacarosa y agua del grupo sometido a estrés más Citalopram 40 mg/kg (E+Cit), durante la comprobación de Estrés Leve Crónico y la determinación de la dosis de Citalopram en ratones hembra.

5.3 Resultados de actividad biológica del veneno (Test de Consumo de Sacarosa y Test de Nado Forzado)

Los resultados de las pruebas bajo el modelo de Estrés Leve Crónico fueron evaluados con la TCS y el TNF para evaluar la efectividad antidepressiva del veneno de sapo (*R. marina*). En los resultados para el consumo de sacarosa (grafico 6) se puede observar que para el grupo control blanco que no fue sometido al protocolo de ELC muestra que los animales consumieron mayor cantidad de la solución de sacarosa (menor peso de la botella), por ende se puede decir que los animales de este grupo se encontraban sin indicios de una conducta depresiva, dado a que mayor consumo de sacarosa menor características depresivas. En cuanto a los demás grupos que fueron sometidos al ELC y que tenían el veneno de *R. marina* se puede notar que para la primera semana todos iniciaron consumiendo más sacarosa, teniendo mediciones de entre 2.56 y 7.5 g (peso de la botella), pero al transcurso de las semanas comenzaron a perder el interés (anhedonia) por la solución azucarada lo que refleja que se lograron individuos con características depresivas.

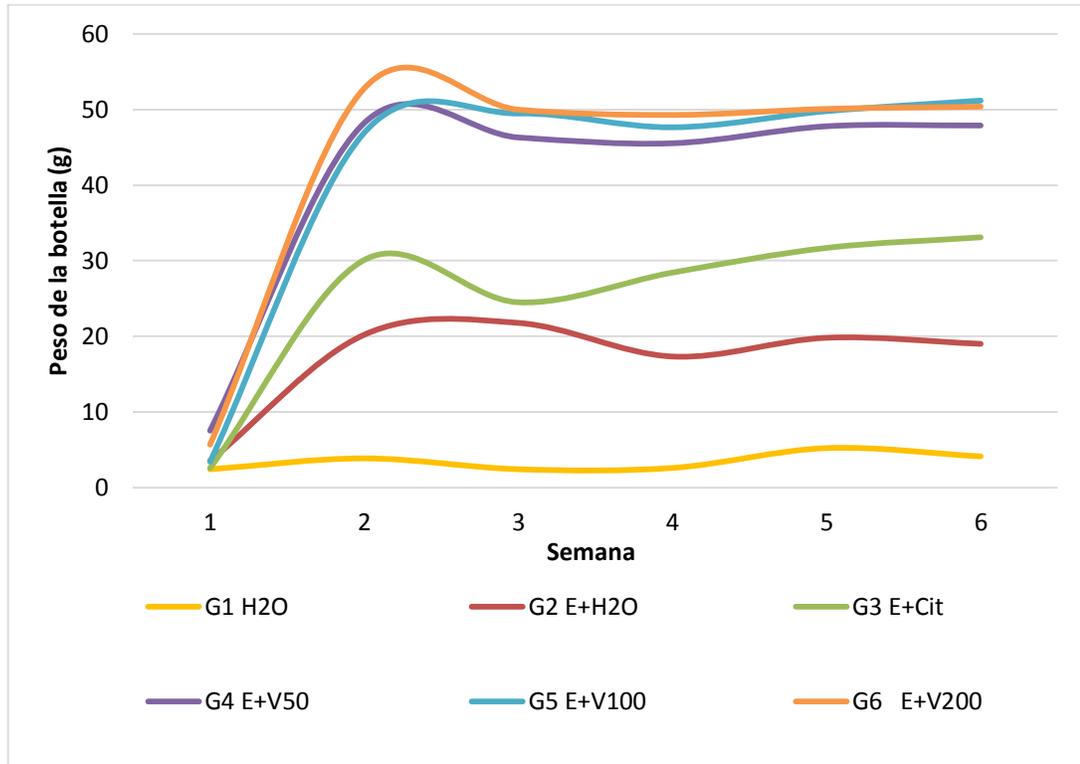


Gráfico 6: Consumo semanal de sacarosa de los grupos G1 H₂O= grupo blanco sin estrés (más agua); G2 E+H₂O= grupo control negativo (estrés más agua); G3 E+Cit= grupo control positivo (estrés mas Citalopram); G4 E+V50= grupo tratamiento estrés más dosis baja (50 mg/kg) de veneno; G5 E+100= grupo tratamiento estrés más dosis media (100 mg/kg) de veneno; G6 E+200= grupo tratamiento estrés más dosis alta (200 mg/kg) de veneno, en la evaluación de actividad biológica del veneno de *R. marina* en ratones hembra.

En el comportamiento de los pesos corporales en los ratones hembra (cuadro 1) se observa el impacto de la prueba al final del ELC en los grupos del 2 al 6 donde los animales no alcanzaron a desarrollar su peso óptimo, debido a la influencia de los estresores aplicados y comparándolos con los pesos iniciales. Para el grupo 1, que no fue sometido a estrés, logró aumentar su peso de manera normal, teniendo una gran diferencia significativa en relación con el peso inicial, tal como se aprecia en el p valor.

Tabla 1: Promedio y relación entre pesos corporales (g) de ratones hembra al inicio y final de la prueba.

Grupo	Peso Inicial	Peso Final	Aumento %	p valor
G1 H2O	18.5	25.26	36.54	0.000040*
G2 E+H2O	19.28	21.04	9.13	0.027888*
G3 E+Cit	19.3	16.72	-13.37	0.566518
G4 E+V50	20	21.5	7.50	0.058347
G5 E+V100	19.28	20.5	6.33	0.230691
G6 E+V200	19.6	21.78	11.12	0.055156

Los valores se expresan, peso inicial y peso final en aumento porcentual y *p valor ($p < 0.05$)

La evaluación de la actividad biológica antidepresiva del veneno de *R. marina*, con el TNF muestra a simple vista que no existe mucha diferencia entre los grupos 3, 4, 5 y 6 (tabla 2). En cuanto al grupo 3, no se comportó como el grupo 1. El comportamiento de los tratamientos con las dosis de veneno de *R. marina* son más similares a los del grupo 2, el cual fue sometido a agua y estrés.

Tabla 2: Tiempos promedios (seg.) de los grupos de ratones hembra sometidos a evaluación de efecto antidepresivo del veneno de *R. marina*.

Grupos	Media \pm D.S		
G1 H2O	31	\pm	22.22
G2 E+H2O	66.75	\pm	5.26
G3 E+Cit	95.75	\pm	34.62
G4 E+V50	122	\pm	28.28
G5 E+V100	112	\pm	23.82
G6 E+V200	125	\pm	1.22

Los valores se expresan como la media \pm la desviación estándar

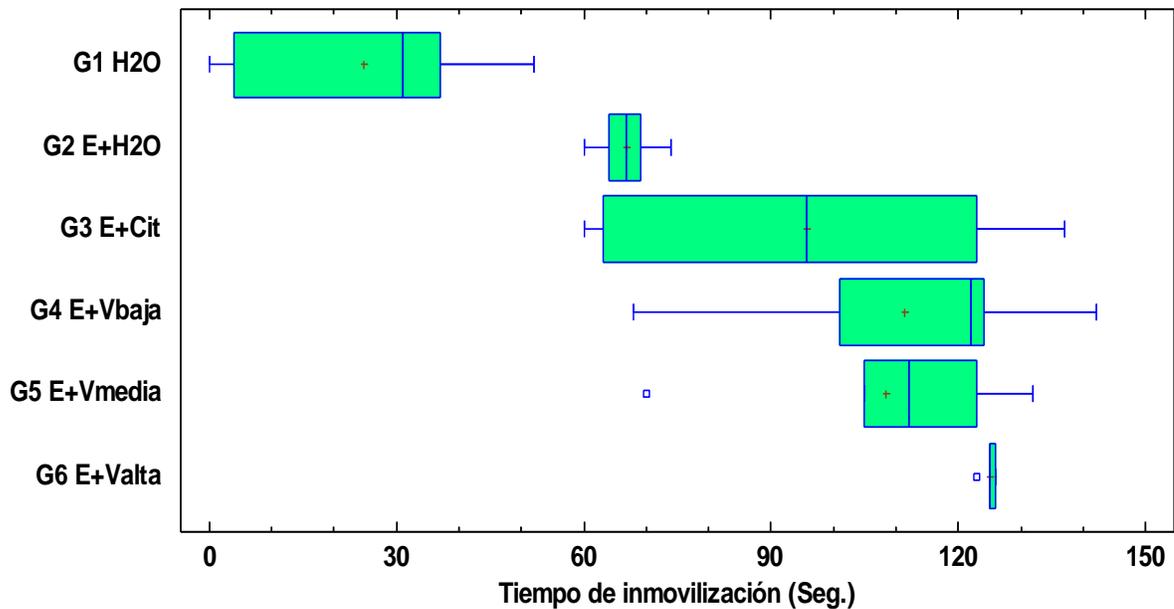


Gráfico 7: Tiempo de inmovilización ratones hembra (segundos) al finalizar las pruebas de estrés y Test de Nado Forzado. por grupo: G1 H₂O= grupo control blanco (agua sin estrés); G2 E+ H₂O= grupo control negativo (estrés más agua); G3 E+Cit= grupo control tratamiento (Citalopram mas estrés); G4 E+V50= grupo tratamiento (estrés más 50mg/kg de veneno) G5 E+V100= grupo tratamiento (estrés más 100mg/kg de veneno); G6 E+V200= grupo tratamiento (estrés más 200mg/kg de veneno) en ratones hembras.

Para comprobar la hipótesis se aplicó un análisis de varianza (ANDEVA) seguido de un test de Dunnett para comparaciones múltiples como lo muestra el Gráfico 7. El grupo control blanco presenta un menor tiempo de inmovilidad con un promedio de 24.8 segundos, teniendo un resultado que evidencia su falta de estrés en comparación al grupo 2, el cual sí se sometió al protocolo de ELC y muestra que los animales pertenecientes a este grupo permanecieron más tiempo sin movilidad (arriba de los 60 segundos). Al comparar con el tercer grupo control, el grupo 3 tratado con estrés más el Citalopram, el promedio de inmovilización fue mayor pero con animales que tuvieron periodos sin movimiento similares o iguales al grupo 2, lo que hace ubicar a éste grupo tratado con Citalopram con una conducta similar a la del agua.

En lo relacionado a los grupos tratados con las tres dosis de veneno se puede apreciar en el mismo grafico 7 que poseen un comportamiento de mayor inmovilidad, es decir que los ratones mantuvieron mayores periodos sin moverse, lo cual indican depresión y puede hacer referencia a que se comportaron como el grupo 2.

VI. DISCUSION.

La toxicidad de los sapos de la familia Bufonidae, a la cual pertenece *Rhinella marina* varía entre especies e inclusive entre diferentes poblaciones de una misma, debido a factores como la alimentación, la temperatura, etc. Cej, (1972) menciona que el más venenoso de esta familia de anuros es precisamente *R. marina*, produciendo así dolor, deshidratación, aceleración cardiaca y convulsiones principalmente. En cuanto a nuestros resultados, durante los ensayos preliminares de toxicidad aguda oral, se observaron signos de intoxicación en los ratones experimentales, estos fueron ataxia, piloerección, temores y convulsiones deshidratación (ver anexo 1 y 2) coincidiendo con lo descrito por dicho autor.

El veneno de esta especie, contiene numerosos sustancias toxicas tales como: bufotoxinas, Bufadienoles, Bufoteninas, , catecolamina: adrenalina y noradrenalina; y esteroides no cardíacos; que se sintetizan a base de colesterol en la glándula paratoide de esta especie, la cual está contenida en el veneno de los sapos utilizados en la presente investigación (Zelnik, 1965). La dosis toxica máxima del veneno de *R. marina* utilizada fue de 400 mg/kg, esto difiere de lo expresado por Godoy *et al.* (2005), quien manifiesta que la DL50 es de 100 mg/kg al menos para un perro de entre 9 a 14 kg. En comparación a la DL50 reportada en este documento resulta ser mayor para un ratón de entre 24 y 28 g de peso corporal, entendiéndose que es mucho menos toxico el veneno de *R. marina* colectado en el norte de El Salvador en comparación con los sapos evaluados por Godoy *et al.* en 2005.

Por su parte, Weils y Davis en 1994 exponen que se rechaza a *Bufo marinus* ahora *R. marina* como un candidato para uso alucinógeno debido a la toxicidad de su veneno. Sin embargo *Bufo alvarius* sí segrega grandes cantidades del potente alucinógeno conocido como 5-metoxi-N, N-dimetiltriptamina (5MeO-

DMT) con gran similitud a 5-dimetil-N-hidroxitriptamina (5-OH-DMT) o Bufotenina. Lo cual deja manifiesto su poco uso cultural como psicotrópico por e investigación, debido a que la DL50 se reporta a una alta concentración, contrastando igualmente con lo reportado en la presente investigación, ya que la DL50 de *R. marina* de El Salvador es menos toxica en relación a lo descrito por estos autores con esta especie.

Nunes *et al.* (2014) realizo pruebas de toxicidad en pollos, los cuales recibieron diferentes dosis (3, 6, 10 y 25 mg/kg) de la secreción de las glándulas paratoides *Rhinella jimi* y estos no mostraron signos clínicos de toxicidad, así como tampoco la presentaron los pollos que consumieron agua donde se mantuvieron a sapos de esta especie. Siendo esta evaluación de especies de la familia *Bufo* con baja toxicidad, similar a la que se reporta en el presente documento para la especie en estudio.

El peso corporal es un factor importante para determinar la acción de una sustancia en el organismo. Joseph & Gotari (s.a.) en 2007 mencionan que estados de balance energético negativo, tal como ocurre durante el ayuno, la desnutrición, las enfermedades entre otras, estas inducen a una serie de alteraciones neuroendocrinas que pueden además estar influenciadas negativamente por el estrés y dan como resultado una deficiencia energética que rondan el 10% de pérdida de peso corporal o hacen que un organismo no gane peso de manera adecuada y provocan una reducción de hasta 40% del gasto energético, haciendo a los individuos adaptar el gasto energetico para cubrir sus demandas metabólicas más esenciales. Estas indicaciones se adaptan a lo observado con la aplicación de las sustancias que afectan la capacidad emocional y cerebral bajo los estresores de las pruebas realizadas con Bufotenina. Los animales muestran alteraciones en el peso debido a la pérdida del apetito por estar sometidos a situaciones fuera de lo habitual.

Cárdenas *et al.* (2010) en su estudio de consumo de alimento, crecimiento y ansiedad, tras estrés por hacinamiento o aislamiento de ratas dice que el análisis del promedio de peso ganado por día reveló que la ganancia de este durante la segunda semana fue significativamente menor en los sujetos experimentales con respecto al control, manteniendo esta tendencia a lo largo de su investigación. Este resultado es semejante al observado en los ratones sometidos con los mismos estresores para evaluar la efectividad de la bufotenina.

Los resultados obtenidos en la presente investigación, fueron posibles debido a que las evaluaciones de conducta y estado de los animales de experimentación son aceptables para evaluar, en este caso condiciones depresivas, concordando con lo expuesto por Mangieri (2008) el cual menciona que utilizar un modelo de depresión en roedores mediante un protocolo de Estrés Crónico Moderado y/o Imprevisible (ECM/ECI), con una secuencia aleatoria de estrés leve (como privación de alimento o de agua, cambios en el ciclo de luz, hacinamiento, restricción física) provocado a diario en el transcurso de varias semanas, produce una serie de alteraciones funcionales y del comportamiento que recuerdan a las observadas en los seres humanos con depresión, incluyendo cambios del peso corporal, del funcionamiento cognitivo y de la capacidad de respuesta a las recompensas. Tal es el caso ocurrido en esta investigación, con algunas variantes en los estresores: hacinamiento, inmovilización y jaula inclinada.

El estrés tiene efectos negativos en la salud según Tafet & Bernardini, (2003), siendo el cerebro el órgano más sensible al estrés. McEwen & Chattarji, en 2004, narran que existen sólidas evidencias que demuestran que el estrés o estrés crónico deteriora áreas del cerebro que procesan la interpretación emocional de los estímulos que se perciben del medio ambiente, lo cual se pudo evidenciar en los animales sometidos a estrés en el presente proyecto de

investigación. Igualmente pudo observarse que, cuando se tergiversa la apreciación de su preferencia a la sacarosa descrita anteriormente, comienzan a presentar una conducta, en la que domina la anhedonia, encorvamiento al caminar y poca actividad física, que difiere considerablemente de animales sanos, que no han sido sometidos al estrés crónico.

Caso contrario a lo ocurrido con el modelo de Estrés Leve Crónico en el cual se concuerda con Nasir (2011) quien menciona que es posible inducir a roedores a depresión utilizando la metodología descrita en su estudio, y en esta investigación al inducir a características depresivas a los ratones de laboratorio y aplicando modificaciones a lo descrito por Subiabre (2012). Teniendo como resultado en ambas investigaciones, promedios del consumo menores de sacarosa, comparado con el consumo de agua, reflejando características depresivas, tal como se observa en el caso del grupo 2 durante la determinación de la dosis de Citalopram y los grupos del 2 al 6 durante la prueba de actividad biológica del veneno.

En la investigación de Ruge (2007), el antidepresivo utilizado fue la Fluoxetina, según el análisis estadístico realizado, no se encontró el efecto esperado como antidepresivo, esto lo atribuye a la carencia de efecto que ésta sustancia tiene contra la depresión, caso similar a lo ocurrido con el Citalopram en el presente estudio. En el caso de este autor, concluye que es por las fallas del fármaco, el cual podría ser aplicado para Citalopram, pero agudizado por la procedencia del medicamento el cual no es calidad reactivo. Agregado a lo anteriormente mencionado, tanto Fluoxetina y Citalopram pertenecen al mismo grupo de los fármacos que actúa inhibiendo selectivamente la recaptación de la serotonina (ISRS). El Citalopram es de los más selectivos, lo cual significa que no actuó como se esperaba en el bioensayo principal, pese a que si reaccionó en las pruebas de sacarosa.

Benoit *et al.* en 2005, evaluó la actividad antidepresiva con el Test de Nado Forzado de algunos medicamentos, comprobando que solo uno de tres fármacos evaluados dio un resultado significativo para la prueba de Porsolt *et al.* (1977) como un real antidepresor. Esta poca efectividad, concuerda con los resultados encontrados con Citalopram en la presente investigación, en tanto que no redujo la anhedonia, ni los tiempos de inmovilidad en los animales tratados con este medicamento.

Walker & Woodruff para el año de 1972 manifiestan que no hay evidencias de que la bufotenina actué como un agente neurotransmisor en el sistema nervioso, pero si manifiesta que la bufotenina también conocida como N-Dimetil-5-Hidroxitriptamina (5-OH-DMT) actúa en las neuronas del tálamo, promoviendo la relajación y el sueño ya que induce una actividad cerebral pasiva, dato que si concuerda con lo observado en nuestros resultados, en cuanto a los animales tratados con el veneno de *R. marina* mostraron una actividad relajada y pasiva al momento de la evaluación en el TNF, lo que puede corroborarse con los mayores tiempos de inmovilidad de estos animales comparados con los tiempos de inmovilidad observados en los demás grupos. Contrario a lo anterior, Walker & Woodruff, mencionan que la bufotenina estimula la actividad cardiaca, lo que contradice por completo la referencia a la relajación en los animales. En este caso y a la luz de nuestros resultados en la prueba TNF, los animales experimentales se identifican más con un efecto relajante (inmovilidad) del veneno de *R. marina*, que con el aumento de la actividad equivalente al efecto antidepresivo.

Del conjunto de sustancias presentes en el veneno de *R. marina*, la Bufotenina es la que presenta similitud con la serotonina, la denominada hormona de la felicidad según manifiesta Shen. *et al.*, (2010) y Fozard & Mobarok en 1978 manifiesta que la Bufotenina causa muchos cambios fisiológicos y conductuales, estimula el ritmo y la fuerza de la contracción

cardíaca siendo un estimulante fuerte de tensión del ventrículo-atrial; sumado a la acción de la adrenalina y noradrenalina por lo que debería actuar más como un antidepresor. Sin embargo, en el presente caso, no actuó como se planteó la hipótesis, ya que no aumenta la actividad anímica, ni fisiológica de los animales ante una inducción a depresión; una de las razones probables de no obtener el resultado esperado, podría ser debido a que la Bufotenína no fue aislada para los tratamientos en los bioensayos.

Por otro lado, Winter *et al.*, (2011), menciona que el control de estímulos por 5-metoxi-N,N-dimetiltriptamina (5-MeO-DMT) en ratones no hicieron diferir en la sensibilidad a los efectos depresores, es decir que la ésta controla la sensibilidad a estímulos depresores. En tanto que los grupos de ratones en sus ensayos, mostraron un aumento de la actividad motora, lo cual discrepa con lo observado en los ratones tratados con dosis de veneno de *R. marina* en el presente trabajo; esto pese a que dicha sustancia contiene 5-OH-DMT (bufotenína), que por su similitud con 5-MeO-DMT se esperaría una acción análoga.

VII. CONCLUSIONES.

Las pruebas de toxicidad mostraron que el veneno del sapo común o sapo sabanero *Rhinella marina* de El Salvador, presenta una DL50 de 400mg/kg.

El modelo para inducción a depresión fue un éxito, ya que al evaluarlos con la Test de Consumo de Sacarosa, mostrando una inhibición en la conducta, con características depresivas en los individuos sometidos al protocolo de Estrés Leve Cronico.

Los animales mostraron un comportamiento irregular en relación al peso corporal durante la prueba con el veneno de esta especie, debido a alteraciones provenientes del estrés crónico aplicado lo que indica que los individuos poseían un grado depresivo, que era el necesario para el desarrollo de la evaluación del veneno como antidepresivo.

Por otro lado la determinación de la dosis del fármaco (Citalopram) bajo el modelo presentado, resulto adecuado, pero luego mostró un comportamiento no esperado en el ensayo principal, por esta razón se concluye que el Citalopram posee una limitada acción como tal, dado a que pudo observarse que no se comportó como un verdadero antidepresivo en los animales evaluados. Sin embargo, se retoma lo ocurrido en el Test de Consumo de Sacarosa, donde si actuó como se esperaba lo cual abre un debate con relación a este hecho.

En conclusión, el veneno de *R. marina* no posee efecto antidepresivo, dado a que en la evaluación de la actividad antidepresiva del veneno con el Test de Consumo de Sacarosa los animales mostraron pérdida del interés de la sustancia que le produce placer es decir el veneno, no logró reducir la anhedonia en los animales. Mientras que en el Test de Nado Forzado los

ratones perdieron la voluntad de seguir en movimiento mientras nadaban en el recipiente, Lo que se traduce como la pérdida en la voluntad de vivir.

Dado a lo expresado en la discusión de la presente investigación, es posible que este veneno pueda tener alguna otra propiedad, ya que mostró reducir la actividad de los ratones. Probablemente y bajo ciertas circunstancias, la Bufotenína en conjunto con los demás compuestos de las secreciones de la glándula parotoide de *R. marina*, puedan tener una actividad ansiolítica, dado a que se observó que los ratones bajaban su actividad física en el TNF, posiblemente no solo por la depresión generada en ellos sino más bien en la actividad de la bufotenina (5-OH-DMT) con mayor similitud a la 5-metoxi-N,N-dimetiltriptamina (un ansiolítico de estructura similar a la bufotenína) que a la serotonina (5-HT).

VIII. RECOMENDACIONES.

Para futuras investigaciones relacionadas al tema de actividades biológicas de sustancias procedentes de animales, se recomienda aislar lo más posible el compuesto o principio activo que se desea evaluar. En algunas investigaciones, es importante evaluar la química completa de la sustancia. Sería importante la creación de un extracto del veneno como tratamiento previo de la sustancia.

Deben seguirse realizando este tipo de investigaciones con énfasis en problemáticas de salud que impactan a una sociedad, como en este caso la depresión, es decir, que se continúe investigando sustancias de origen natural que aporten a la medicina en general y controlar de mejor manera enfermedades de cualquier índole, pero en este caso, más a padecimientos de la salud mental.

Es recomendable la utilización del modelo para inducción a depresión descrito en el presente trabajo de grado, dado a que si se obtuvieron los resultados esperados para poder evaluar el veneno de origen animal, en ratones hembra de laboratorio.

Para la utilización de fármacos de referencia ya existentes en el mercado es importante que se seleccione el más idóneo, según las características descritas para cada uno y además que se hagan esfuerzos para obtenerlos en calidad reactivos, para evitar sesgos o una acción no esperada del medicamento que se utilice.

Deben realizarse la mayor cantidad de repeticiones en los ensayos, utilizando animales de ambos sexos y aumentando el número en cada grupo dentro del modelo experimental que se elabore, esto debido a que las pruebas conductuales son más difíciles de evaluar en la experimentación animal, teniendo en cuenta el principio de las 3Rs.

IX. BIBLIOGRAFIA.

1. Acosta. F.J., J. L. Hernandez, J. Pereira, A. Mateos, C.L. Díaz, M.A. Gutierrez, M. & M. Suares. 2010. "Antidepresivos en el tratamiento de la depresión". Boletín Canario de uso racional de medicamentos de SCS. Gobierno de Canarias, España. Vol 2, No 1. 8 p.
2. Alguacil F.L., Alamo C. & Iglesias V. 1996. Contribución de los estudios preclínicos, los acontecimientos y terapéutica de la depresión. *Psicothema*. 8(3): 657-667.
3. Arango V., Ernsberger V., Markuz P.M., Chen I.S., Tierney H., Stanley M., Reis D.J. & Mann J.J. 1990. Autoradiographic demonstration of increased serotonin 5-HT₂ and b-adrenergic receptor binding sites in the brain of suicides victims. *Archives general psychiatry*. 47:1038-47.
4. Benoit P. D., Cheng, F. & Bourin, M. 2005. Forced Swimming Test in the Mice Review of Antidepressive Activity. *Psicopharmacology* (2005) 117: 245-255.
5. Bhattamisra, S., Khanna, V., Agrawal, A., Singh, P. & Singh, S. 2008. Antidepressant activity of standardised extract of *Marsilea minuta* Linn. *Journal of Ethnopharmacology* 117, 51-57.
6. CADIME, Centro Andaluz de Información de Medicamentos. 1999. "Tratamiento farmacológico de la depresión mayor en la atención primaria". Granada, España. No 16. 24 p.

7. Castañeda P.O. 2000. "Toxinas animales: acciones facilitadoras de la transmisión colinérgica". *Revista Biológica*, Vol. 14. No 1. 15 p.
8. Cárdenas–Villalvazo, A., A. López–Espinoza, A. G. Martínez, K. Franco, F. Díaz, V. Aguilera, & E. Valdez. 2010. Consumo de alimento, crecimiento y ansiedad, tras estrés por hacinamiento o aislamiento de ratas. *Revista mexicana de análisis de la conducta*, Vol. 36 No 2. Mexico
9. CCAC.1998. Manual sobre el Cuidado y Uso de los Animales de Experimentación.
10. Cañoles, N. E. 2007. Significado y consecuencias de la violencia doméstica en las historias de vida de mujeres con depresión y/o trastornos de ansiedad. Tesis de grado, Escuela de Obstetricia y Puericultura. Facultad de Medicina. Universidad Austral de Chile, 119 pp.
11. Cei J.M. 1972. Bufo of South America. In: Blair WF. Evolution in the genus Bufo. Dallas: University of Texas Press,,: 82-92.
12. Chávez E. R. 2004. "La enfermedad mental un grave problema de salud pública escondido, subregistrador y subestimado". *Clínica Integral de Psiquiatría. Médicos de El Salvador* 13 p.
13. Chen K.K. & A. L. Chen. 1933. "A study of the poisonous secretions of five North American species of toads". *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*. JPET 12 vol. 49 no. 4 526-542.

14. Clarke B.T. 1997. "La historia natural de secreciones de la piel de anfibios, su funcionamiento normal y las posibles aplicaciones médicas". Biol. Rev. Camb. Philos. Soc. 72 365-379.
15. Cryan J. & Holmes A. 2005. The ascent of mouse: advances in modeling human depression and anxiety. Nat Rev Drug Discov. 4:775-790.
16. Dos Santos M. S. A. 2001. "farmacología: antidepresivos". J Psych, 168, 164 pp.
17. Effective Health Care. 2009. "Medicamentos antidepresivos". Guía para adultos con depresión" AHRQ. 12 p.
18. Fozard J. R. & Mobarok A. T. 1978 "Dual mechanism of the stimulant action of N,N-dimethyl-5-hydroxy-tryptamine (bufotenine) on cardiac sympathetic nerves". Eur J Pharmacol. 1;49(1):25-30
19. Garg A.D., R. Hippargi, & A.N. Gandhare. 2008. "Toad skin-secretions: Potent source of pharmacologically and therapeutically significant compounds". Journal of Pharmacology. Volume 5 Number 2. DOI: 10.5580/18b6.
20. Godoy L., Ortiz L., Teibler P. & Acosta O. 2005. "Toxicidad de la secreción da las glándulas paratoides en sapo". Comunicaciones Científicas y Tecnológicas, Universidad del Nordeste Argentina. V-20. 4p.
21. Goodman & Gilman. 2007. Las bases farmacológicas de la terapéutica. 11° edición. Editoriales Mc Graw Hill. Interamericana.

22. Gutiérrez J. R. 2004. "Prevalencia de síntomas de alteraciones mentales en la población de El Salvador". Revista Internacional de Psicología. ISSN 1818-1023. Vol.5 No 2. 8 p.
23. Gutiérrez J. R. 2010. "Prevalencia de alteraciones afectivas: depresión y ansiedad en la población salvadoreña". La palabra Universitaria. Universidad Tecnológica de El Salvador.
24. Gracielle, E. P., A. C. Felipe, D. Nadaletto, V. L. Mores & R. M. Marques. 2009. Investigación de la actividad antimicrobiana de la icterica veneno *Rhinella* (Amphibia, Anura) Rev. Inst. Adolfo Lutz (Impr.) São Paulo. vol.68 no.3.
25. Heaton J. 2003. Major depressive disorder: what are the fact? All Psych Journal.
26. Insel T. R. 2007. From animal models to model animals. Biol Psychiatry, 15:1337-1339.
27. Iruela L. M, Picazo Zappino J. & Peláez Fernández C. 2009. "Tratamiento farmacológico de la depresión en niños y adolescentes. Sistema nacional de salud". Vol. 33., No 2. 4 p.
28. Joseph-Bravo, P. & P. Gortari. s.a. 2007. El estrés y sus efectos en el metabolismo y el aprendizaje. Instituto Nacional de Psiquiatría. Biotecnología V14 CS3.indd 65-76 pp.
29. Köhler G; V. Milan. & E. Greenbaum; 2006. "The Amphibians and Reptiles of El Salvador". Editorial Krieger, Malabar, Florida. 25-145 pp.

30. Katz R. 1981. Animal models and human depressive disorders. *NeurosciBiobehav Rev.* 5:231-246.
31. Krishnan V. & Nestler E. 2011. J: Animal Models of Depression: Molecular Perspectives. *Curr Top Behav Neurosci.*
32. LEA 2010. Protocolo: Toxicidad por administración aguda oral. Laboratorio de Experimentación Animal. Identificación: PROC-NT-004.
33. Lyttle T., Goldstein D. & Gartz J. 1996. Bufo toads and bufotenine: fact and fiction surrounding an alleged psychedelic. *J Psycho active Drugs.* 28(3):267-90.
34. Mangieri., R. A., 2008. “Los estudios con animales ponen de manifiesto el potencial terapéutico de los cannabinoides para la depresión.” Departamento de Farmacología de la Universidad de Texas de Austin, Austin, TX 78712, EE.UU. *Cannabinoides* 2008; 3(2):4-7. Versión española 4 p.
35. MASSON S.A. © 1995. “Manual diagnóstico y estadístico de los trastornos mentales: trastornos del estado de ánimo”. MASSON. p 323-399.
36. McEwen B. & S, Chattarji S. 2004. “Molecular mechanisms of neuroplasticity and pharmacological implications: the example of tianeptine”. *Eur Neuropsychopharmacol.* 14 Suppl 5:S497-502.
37. Medeiros N. M., 2008. “Sistemática e Biogeografía do grupo *Rhinella marina* (Linneaus 1758) (Anura bufonidae)”. Univesidade de Brasília, Instituto de ciencias Biológicas departamento de Ciências Fisiológicas. Pos-graduação em Biología Animal. Brasilia. 182 p.

38. Mora, S., Díaz-Véliz, G., Millán, R., Lungenstrass, H., Quirós, S., Coto-Morales, T. & Hellión-Ibarola, M. 2005. Anxiolytic and antidepressant-like effects of the hydroalcoholic extract from *Aloysia polystacha* in rats. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* 82, 373-378.
39. Mora, S., Millan, R., Lungenstrass, H., Diaz-Veliz, G., Moran, J.A., Herrera-Ruiz, M. & Tortoriello, J. 2006. The hydroalcoholic extract of *Salvia elegans* induces anxiolytic and antidepressant-like effects in rats. *Journal of Ethnopharmacology* 106, 76-81.
40. Morales R. 2010. Chemical synthesis and pharmacological characterization of the frog Prokineticin Bv8 and study of the mechanism of chemical defence of cane toads (*Rhinella marina*). *Biological Sciences*, 208 pag.
41. Moreau J., Scherschlicht R., Jenck F. & Martin J. 1995. Chronic mild stress induced anhedonia model of depression; sleep abnormalities and curative effects of electroshock treatment. *Behav Pharmacol*, 6:682-687.
42. Nasir N. 2011. Effects of stress-induced acute depression and antidepressant drugs on CA3 region of hippocampus of albino rats. *Current Neurobiology*. 2 (1): 31-34.
43. Nunes I.C., J.M. De Lima, J.S. Batista, M. M. Melo. & B.Soto. 2014 "Toxicity Effects of Toad (*Rhinella jimi* Stevaux, 2002) Venom in Chicken (*Gallus gallus domesticus*)" Article ID 851473, 6 pp.
44. OECD. 1995. "Guideline for testing of chemicals". Repeated Dose 28-Day Oral Toxicity Study in Rodent.

45. OECD. 2001. "Guideline for testing of chemicals". Acute Oral Toxicity – Fixed Dose Procedure.
46. Organización Mundial de la Salud (OMS). 2001. Salud mental: nuevos conocimientos, nuevas esperanzas. En informe sobre la salud en el mundo, 2001: Ginebra.
47. Organización Mundial de la Salud (OMS). 2006. Carga mundial de enfermedades. Washington, DC.
48. Periago M. R. 2005. Incrementarán notablemente los trastornos mentales en América Latina y el Caribe comunicado de prensa. Organización Panamericana de la Salud.
49. Pinto, É. G., A. C. Felipe, D. Nadaletto, V. L. M. Rall & R. M. Martinez. 2009. "Investigação da atividade antimicrobiana do veneno de *Rhinella icterica* (Amphibia, Anura)". Revista do Instituto Adolfo Lutz. Vol. 68 No. 3 pp. 471-475.
50. Porsolt, R. D, Pichon, M. L. & Jalfre M. 1977. Depression: A new model sensitive to the antidepressant treatment. Nature. 266: 730-2.
51. Pulido-Baldeon B. P. 2009. "El uso del veneno de anfibios en medicina" Pazco. 5 p.
52. Rygula R. N. Abumaria, G. Flügge, C. Hiemke, E. Fuchs, E. Rüter & U. Havemann. 2005. Citalopram counteracts depressive-like symptoms evoked by chronic social stress in rats. J Behavioural Pharmacology. ISSN 0955-8810. Vol. 17 No 19. 29 p.

53. Ruge E. 2007. Discriminación de los efectos de Fluoxetina y Cocaína sobre la ejecución en el Test de Nado Forzado en ratas cepa Wistar.
54. Shen HW, X. L. Jiang, J.C. Winter & A.M. Yu. 2010. "Psychedelic 5-methoxy-N,N-dimethyltryptamine: metabolism, pharmacokinetics, drug interactions, and pharmacological actions". *Curr Drug Metab.* 11(8):659-66
55. Subiabre A. 2012. Modelos animales para el estudio del estrés y las conductas depresivas. *Rev. Farmacol.* 5(1):19.
56. Tafet G. E. & Bernardini R. 2003. Psychoneuroendocrinological links between chronic stress and depression. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 27(6):893-903.
57. Tamargo, J & Delpón, J. 2003. Farmacología de la insuficiencia cardiaca I. Glucósidos digitálicos y otros inotrópicos. En *Farmacología humana*. Flórez, J, Armijo, JA y Mediavilla, A. Barcelona. 4ª ed. Masson-Salvat. 255-279.
58. Valles-Fernández J. 2002. Depresión con Ansiedad. *Salud Mental, atención primaria, Salud Global*, 3,1-8
59. Weils A. T. & Davis W. 1994. *Bufo alvarius*: a potent hallucinogen of animal origin. *Journal of Ethnopharmacology* 41,1-8.
60. Willner P. 2005. Chronic mild stress (ELC) revisited: consistency and behavioural-neurobiological concordance in the effects of ELC. *Neuropsychobiol* 2005, 52:90-120.

61. Winter J.C., Amorosi D.J., Rice K.C., Cheng K. & Yu A.M. 2011. Stimulus control by 5-methoxy-N,N-dimethyltryptamine in wild-type and CYP2D6-humanized mice. *j.pbb.2011.05.015*. Epub 2011.
62. Walker R. J. & G. N. Woodruff. 1972. The effect of bufotenine, melatonin, psilocybin, and related compounds on the 5-hydroxytryptamine excitatory receptors of *Helix aspersa* neurons. *Comp. gen. Pharmac.* 1972 , 3, 27-4pp.
63. Wood GE, Norris E.H., Waters E, Stoldt J. & T.McEwen B.S. 2008. Chronic immobilization stress alters aspects of emotionality and associative learning in the rat. *Behav Neurosci*, 122:282-292
64. Zug G. & Zug P. 1979. The marine toad, *Bufo marinus*: A Nature History Resume of Native Populations. Smithsonian contributions to zoology, number 284, 58 pages.
65. Zelnik R.; (1965). A Natureza Quimica do veneno de sapo. *C. Cult. Sao Paulo*, 17, 10-14.

X. ANEXOS

Anexo 1: Hoja de colecta de datos de toxicidad.

DESCRIPCION GENERAL

PROTOCOLO: Toxicidad aguda oral 14 días SUSTANCIA DE ENSAYO: Veneno de sapo *Rhinella marina*

CONCENTRACION O DOSIS: 400 mg/kg FECHA INICIO: 23/06/2015 VIA ADMINISTRACION:

Oral

GRUPO: CONTROL TRATAMIENTO X CENTINELA

Clave: 0.5= Horas

: 0 NORMAL 1 AUSENTE 2 EXAGERADO

*: 0 NORMAL 1 ENROJECIMIENTO 2 SEQUEDAD 3 EXCESIVA HUMEDAD

PARAMETRO DE TOXICIDAD	ANIMAL 1						ANIMAL 2						ANIMAL 3						ANIMAL 4						ANIMAL 5					
	0.5	1.0	1.5	2.0	2.5	3.0	0.5	1.0	1.5	2.0	2.5	3.0	0.5	1.0	1.5	2.0	2.5	3.0	0.5	1.0	1.5	2.0	2.5	3.0	0.5	1.0	1.5	2.0	2.5	3.0
ATAXIA	a	a	a	a	a	a	a	p	p				a	p	p	p	p		a	p	p	p	p	p	a	p	p	p	a	a
PARALISIS	a	a	a	a	a	a	a	a	a				p	p	p	p	p		a	p	p	p	p	p	a	p	a	a	a	a
VASO CONSTRICCION PERIFERICA	a	a	a	a	a	a	a	a	a				a	a	a	a	a		a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a
VASO DILATACION PERIFERICA	a	a	a	a	a	a	a	p	a				a	a	a	a	a		a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a
PILO ERECCION	a	a	a	a	a	a	a	p	p				a	p	p	p	p		a	a	p	p	p	p	a	p	p	p	p	p
SIALORREA	a	a	a	a	a	a	a	a	p				a	a	p	p	p		a	a	a	a	p	p	a	p	a	a	a	a
TREMORES Y CONVULSIONES	a	a	a	a	a	a	a	p	p				a	p	p	p	p		p	p	p	p	p	p	a	p	p	a	a	a
DESHIDRATACION	a	a	a	a	a	a	a	p	p				a	p	p	p	p		a	p	p	p	p	p	a	p	p	p	p	p
DIARREA	a	a	a	a	a	a	a	a	a				a	a	a	a	a		a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a
ACTIVIDAD MOTORA <input type="checkbox"/>	0	0	0	0	0	0	0	1	1				0	1	1	1	1		0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0
REACCION A ESTIMULOS <input type="checkbox"/>	0	0	0	0	0	0	1	1	1				0	1	1	1	1		0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0
OJOS Y MEMBRANAS MUCOSAS*	0	0	0	0	0	0	0	3	1				0	3	3	3	3		0	3	3	3	3	3	0	0	0	0	0	0
APARIENCIA PIEL*	0	0	0	0	0	0	0	2	2				0	0	1	1	1		0	2	3	3	3	3	0	0	0	0	0	0

Responsable de a prueba: _____

Observaciones: los animales 2 y 3 murieron pasadas la hora treinta minutos y 2 horas 30 minutos respectivamente.

Anexo 2: Hoja de colecta de datos de toxicidad.

DESCRIPCION GENERAL

PROTOCOLO: Toxicidad aguda oral 14 días SUSTANCIA DE ENSAYO: Veneno de sapo *Rhinella marina*

CONCENTRACION O DOSIS: 400 mg/kg FECHA INICIO: 23/06/2015 VIA ADMINISTRACION:

Oral

GRUPO: CONTROL TRATAMIENTO X CENTINELA

Clave: D= Día a=ausencia p=presencia □: 0 NORMAL 1 AUSENTE 2EXAGERADO *:0 NORMAL 1ENROJECIMIENTO 2 SEQUEDAD 3EXCESIVA HUMEDAD

PARAMETRO DE TOXICIDAD	ANIMAL 1						ANIMAL 2						ANIMAL 3						ANIMAL 4						ANIMAL 5					
	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D1	D2	D3	D4	D5	D6
ATAXIA	a	p	p	a	a	a	p						p						a	p	p	p	p		a	p	p	p	a	a
PARALISIS	a	p	a	a	a	a	a						a						a	p	p	p	p		a	p	a	a	a	a
VASO CONSTRICCION PERIFERICA	a	a	p	a	a	a	a						a						a	a	a	a	a		a	a	a	a	a	a
VASO DILATACION PERIFERICA	a	a	a	a	a	a	a						a						a	a	a	a	a		a	a	a	a	a	a
PILO ERECCION	a	p	p	p	p	p	p						p						a	a	p	p	p		a	p	p	p	p	p
SIALORREA	a	p	a	p	a	a	p						p						a	a	a	a	p		a	p	a	a	a	a
TREMORES Y CONVULSIONES	a	a	p	p	a	a	p						p						p	p	p	p	p		a	p	p	a	a	a
DESHIDRATAACION	a	a	p	p	a	a	p						p						a	p	p	p	p		a	p	p	p	p	p
DIARREA	a	a	a	a	a	a	a						a						a	a	a	a	a		a	a	a	a	a	a
ACTIVIDAD MOTORA □	0	0	1	0	0	0	1						1						0	1	1	1	1		0	1	0	0	0	0
REACCION A ESTIMULOS □	0	1	0	0	0	0	1						1						0	1	1	1	1		0	1	0	0	0	0
OJOS Y MEMBRANAS MUCOSAS*	0	2	2	0	0	0	1						1						0	3	3	3	3		0	3	3	0	0	0
APARIENCIA PIEL*	0	0	0	0	0	0	2						2						0	2	3	3	3		1	2	1	0	0	0

Responsable de a prueba: Láinez Daniel, López Karla

Observaciones: Los animales 2 y 3 murieron en el primer día. Mientras que el animal 4 hasta el quinto día. Los restantes 2 animales sobrevivieron a la prueba.

DESCRIPCION GENERAL

PROTOCOLO: Toxicidad aguda oral 14 días SUSTANCIA DE ENSAYO: Veneno de sapo *Rhinella marina*

CONCENTRACION O DOSIS: 400 mg/kg FECHA INICIO: 23/06/2015 VIA ADMINISTRACION: Oral

GRUPO: CONTROL _____ TRATAMIENTO X CENTINELA _____

Clave: D= Día a=ausencia p=presencia □: 0 NORMAL 1 AUSENTE 2EXAGERADO *:0 NORMAL 1ENROJECIMIENTO 2 SEQUEDAD 3EXCESIVA HUMEDAD

PARAMETRO DE TOXICIDAD	ANIMAL 1						ANIMAL 2						ANIMAL 3						ANIMAL 4						ANIMAL 5											
	D7	D8	D9	D10	D11	D12	D7	D8	D9	D10	D11	D12	D7	D8	D9	D10	D11	D12	D7	D8	D9	D10	D11	D12	D7	D8	D9	D10	D11	D12						
ATAXIA	a	a	a	a	a	a																									a	a	a	a	a	a
PARALISIS	a	a	a	a	a	a																									a	a	a	a	a	a
VASO CONSTRICCION PERIFERICA	a	a	a	a	a	a																									a	a	a	a	a	a
VASO DILATAACION PERIFERICA	a	a	a	a	a	a																									a	a	a	a	a	a
PILO ERECCION	p	p	a	a	a	a																									a	a	a	a	a	a
SIALORREA	a	a	a	a	a	a																									a	a	a	a	a	a
TREMORES Y CONVULSIONES	a	a	a	a	a	a																									a	a	a	a	a	a
DESHIDRATAACION	p	p	p	a	a	a																									a	a	a	a	a	a
DIARREA	a	a	a	a	a	a																									a	a	a	a	a	a
ACTIVIDAD MOTORA □	0	0	0	0	0	0																									0	0	0	0	0	0
REACCION A ESTIMULOS □	0	0	0	0	0	0																									0	0	0	0	0	0
OJOS Y MEMBRANAS MUCOSAS*	0	0	0	0	0	0																									0	0	0	0	0	0
APARIENCIA PIEL*	0	0	0	0	0	0																									0	0	0	0	0	0

Responsable de a prueba: Láinez Daniel, López Karla

Observaciones: _____

DESCRIPCION GENERAL

PROTOCOLO: Toxicidad aguda oral 14 días SUSTANCIA DE ENSAYO: Veneno de sapo *Rhinella marina*

CONCENTRACION O DOSIS: 400 mg/kg FECHA INICIO: 23/06/2015 VIA ADMINISTRACION: Oral

GRUPO: CONTROL _____ TRATAMIENTO X CENTINELA _____

Clave: D= Día. a=ausencia. p=presencia □: 0 NORMAL 1 AUSENTE 2 EXAGERADO *: 0 NORMAL 1 ENROJECIMIENTO 2 SEQUEDAD 3 EXCESIVA HUMEDAD

PARAMETRO DE TOXICIDAD	ANIMAL 1				ANIMAL 2				ANIMAL 3				ANIMAL 4				ANIMAL 5			
	D13	D14			D13	D14			D13	D14			D13	D14			D13	D14		
ATAXIA	a	a															a	a		
PARALISIS	a	a															a	a		
VASO CONSTRICCION PERIFERICA	a	a															a	a		
VASO DILATACION PERIFERICA	a	a															a	a		
PILO ERECCION	a	a															a	a		
SIALORREA	a	a															a	a		
TREMORES Y CONVULSIONES	a	a															a	a		
DESHIDRATACION	a	a															a	a		
DIARREA	a	a															a	a		
ACTIVIDAD MOTORA □	0	0															0	0		
REACCION A ESTIMULOS □	0	0															0	0		
OJOS Y MEMBRANAS MUCOSAS*	0	0															0	0		
APARIENCIA PIEL*	0	0															0	0		

Responsable de a prueba: Láinez Daniel, López Karla

Observaciones: _____

Anexo 3: Hoja de colecta de datos del Test de Consumo de Sacarosa.

PROTOCOLO: _____ DURACION DEL PROTOCOLO: _____ FECHA DE INICIO:
 _____ FECHA FINAL: _____

SUSTANCIA DE ENSAYO: _____ CONCENTRACION O DOSIS: _____ No. GRUPO:

TEST DEL CONSUMO DE SACAROSA __/__/2015							
Grupo/Animal	Botella	Antes	Después	Consumo de Agua	Antes	Después	Consumo de Sacarosa
		Peso Agua			Peso Sacarosa		
G1-1	1			-			-
G1-2	2			-			-
G1-3	3			-			-
G1-4	4			-			-
G1-5	5			-			-
G2-1	6			-			-
G2-2	7			-			-
G2-3	8			-			-
G2-4	9			-			-
G2-5	10			-			-
G3-1	11			-			-
G3-2	12			-			-
G3-3	13			-			-
G3-4	14			-			-
G3-5	15			-			-
G4-1	16			-			-
G4-2	17			-			-
G4-3	18			-			-
G4-4	19			-			-
G4-5	20			-			-
G5-1	21			-			-
G5-2	22			-			-
G5-3	23			-			-
G5-4	24			-			-
G5-5	25			-			-

_____ No. DE ANIMALES: _____ TIEMPO DE DURACION DEL PCS: _____ DE SEXO: _____ ESPECIE:
 _____ CEPA: _____

Anexo 3: Hoja de colecta de datos del Test de Nado Forzado.

TEST DE NADO FORZADO

PROTOCOLO: _____ DURACION DEL PROTOCOLO: _____ FECHA DE INICIO: _____ FECHA FINAL: _____

SUSTANCIA DE ENSAYO: _____ CONCENTRACION O DOSIS: _____ No. GRUPO: _____ No. DE ANIMALES: _____

TIEMPO DE DURACION DEL TNF: _____ DE SEXO: _____ ESPECIE: _____ CEPA: _____

G1		G2		G3		G4		G5		G6	
No	inmovilidad total (minutos)										
1		1		1		1		1		1	
2		2		2		2		2		2	
3		3		3		3		3		3	
4		4		4		4		4		4	
5		5		5		5		5		5	

OBSERVACIONES:
