



**Universitat de les
Illes Balears**

Facultad de Ciencias

Memoria del Trabajo de Fin de Grado

**Estudio de la funcionalidad de receptores
colinérgicos y serotoninérgicos en ratas
adultas sometidas a enriquecimiento
ambiental y empobrecimiento ambiental
sobre capacidades cognitivas de
aprendizaje, memoria y actividad motora.**

Daniel Carnero Rocca

Grado de Biología

Año académico 2012-13

DNI del alumno: 39458681 L

Trabajo tutelado por Susana Esteban Valdés

Departamento de Biología

L'autor autoritza l'accés públic a aquest Treball de Fi de Grau.

Palabras clave del trabajo:

Environmental enrichment, Environmental impoverishment, pilocarpina, 8-OH-DPAT, aprendizaje-memoria.

Índice de contenidos

	Páginas
I Resumen.	4
II Abstract.	4
III Introducción: conocimientos de la disciplina.	5
IV Objetivos: finalidad del trabajo.	6
V Materiales y métodos.	7
VI Resultados obtenidos.	12
VII Discusión.	23
VIII Conclusiones.	27
IX Agradecimientos	28
X Referencias	29

Resumen

La relación de los sistemas colinérgico y serotoninérgico en el proceso de aprendizaje y memoria son bien conocidos, sin embargo se ignoran los cambios que sufren a nivel de expresión debido a la presión que el ambiente pueda ejercer. En el presente estudio se presentan y analizan los cambios producidos por diversas condiciones ambientales (condiciones estándar, enriquecimiento ambiental y empobrecimiento ambiental) sobre las vías anteriormente citadas así como su evolución al prolongar el mantenimiento de dichas situaciones ambientales. Para valorar los cambios en la funcionalidad de receptores colinérgicos y serotoninérgicos se han usado tratamientos agudos de Pilocarpina y 8-OH-DPAT para cada vía respectivamente. Los resultados de latencia en las pruebas del laberinto de Barnes señalan una pérdida de facultades cognitivas en los animales sometidos a empobrecimiento ambiental respecto al enriquecimiento ambiental, sin embargo no hubo resultados farmacológicos consistentes en los tratamientos citados.

Abstract

The relationship between memory and learning process and cholinergic and serotonergic pathways are well known, nevertheless the modifications that the environment could have made upon them are unknown. This study will show and analyze the shifts caused by three different environmental conditions (standard conditions, environmental enrichment and environmental impoverishment) and the evolution of the pathways through the time. To evaluate the possible shifts in the cholinergic or serotonergic pathways it will be used the aid of acute treatments of Pilocarpine and 8-OH-DPAT for each pathway respectively. Results of latency in Barnes maze indicates a loss of cognitive skills in animals subjected to environmental impoverishment respect to environmental enrichment, however, there were no pharmacological consistent results in any of the treatments mentioned before.

INTRODUCCIÓN

La posibilidad de que el cerebro de un individuo entrenado, por diversos métodos con finalidad lúdica fuera capaz de experimentar cambios anatómicos respecto a otro individuo sin estímulo alguno, ha sido contemplada desde comienzos del siglo XX.

Ya en 1911 Santiago Ramón y Cajal sugirió que el ejercicio cerebral podría ser capaz de establecer nuevas y más numerosas conexiones neuronales en el cerebro, sin embargo no se llegó a aventurar cuál pueda ser la manera en que ello se consigue.

Recién en 1949 Hebb, hipotetizó que los animales criados en ambientes enriquecidos podían desarrollar cambios permanentes a nivel cerebral, aumentando su potencial para resolver problemas, basándose en el hecho de que las ratas que eran utilizadas como mascota eran más eficaces en resolución de laberintos que las ratas de laboratorio comunes criadas en jaulas.

Sin embargo, no fue hasta los años '60 que el laboratorio de Psicología de Berkeley demostró los cambios neuroanatómicos del Enriquecimiento Ambiental (abreviado EE del inglés "*Environmental Enrichment*"). Con los primeros estudios hasta el momento según investigaciones realizadas por *Bennet et al* (1969, 1996), ratas sometidas a ambientes enriquecidos demostraban poseer mayor tamaño del córtex occipital respecto a ratas sometidas a ambientes empobrecidos (de aislamiento social y carencia de interacciones).

Además de esta mejora del córtex visual se ha descubierto que el EE induce a cambios neuroanatómicos y bioquímicos del hipocampo y el cerebelo, siendo el hipocampo el que ha captado gran atención en cuanto a estudios se refiere. Hay aumento de densidad sináptica y mayores zonas de contacto, hecho que se asocia con un aprendizaje más rápido (*Diamond 2001*).

Por otro lado, la supresión de estímulos, denominada Empobrecimiento Ambiental y abreviado EI del inglés "*Environmental Impoverishment*", ha mostrado guardar relación con el declive de las facultades cognitivas (*Winocur; G.1998*), adelantando procesos de envejecimiento cerebral y aparición de enfermedades asociadas a dicho proceso tales como demencias.

Tal y como se recoge en los trabajos de *Diniz et al* (2010), ratas sometidas a dicho ambiente a partir del día 21 post-natal muestran a partir de los 6 meses una fuerte disfunción cognitiva, la cual se ve reflejada en la disminución del rendimiento en las pruebas comportamentales.

Dentro del concepto de EI se incluyen todos los factores que impidan un desarrollo cerebral completo, como por ejemplo el aislamiento social, ausencia de estímulos o situaciones de estrés continuado.

Uno de los grandes misterios continúa siendo el sistema de aprendizaje y los mecanismos de su desarrollo. Se conoce el papel que juegan las vías de señalización tanto serotoninérgica como colinérgica en la función de modulación de la memoria, sin embargo la importancia de cada tipo de receptor en las funciones cognitivas no se encuentra claro todavía (*Haiders et al 2012*).

OBJETIVOS

En este trabajo se intentará conocer la importancia funcional que tienen los receptores serotoninérgicos y colinérgicos en procesos de aprendizaje y memoria no sólo en condiciones estándar, sino también en condiciones de Enriquecimiento Ambiental (EE) y Empobrecimiento Ambiental (EI) en dos etapas de inicio marcadamente distintas: por una parte animales que serán sometidos a condiciones de EE o EI a partir de los 21 días de vida, mientras que otras se mantendrán en condiciones estándar hasta los 7 meses (considerado adultez para estos animales), periodo a partir del cual se las someterá a la acción de estos ambientes. De este modo se realizará un contraste entre estas tres condiciones y mostrará así la evolución en todos los ámbitos a lo largo del experimento por medio de la administración de fármacos selectivos de los receptores mencionados.

A través de la administración de fármacos seremos capaces de observar las variaciones diferenciales en los receptores seleccionados para este estudio. El análisis de los resultados permitirá saber qué receptores han experimentado cambios y por tanto guarden relación con la plasticidad neuronal en cada una de las situaciones mencionadas.

Los receptores diana de este estudio han sido los receptores tanto del sistema colinérgico como serotoninérgico, cuyos fármacos elegidos han sido pilocarpina (agonista colinérgico para receptores muscarínicos M3 y M5) para el sistema colinérgico y 8-OH-DPAT (agonista selectivo del receptor serotoninérgico 5-HT_{1A}). Estos fármacos servirán de vector para conocer la evolución de dichos sistemas a lo largo del tiempo transcurrido en los distintos ambientes.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Animales: descripción de los animales utilizados y sus condiciones de mantenimiento.

Se han utilizado ratas Sprague, todas ellas machos divididas y distribuidas en los subgrupos descritos anteriormente y detallados a continuación:

- **Grupo Control:** ratas mantenidas en condiciones estándar (temperatura de 22°C con variación de +2/-2°C con una humedad del 56 – 60 %). El ratio de horas de luz y horas de oscuridad se ha mantenido en 12:12 (12 horas de luz y 12 de oscuridad) y poseen libre acceso tanto a agua como a alimento. Este grupo está formado por 24 ratas.
- **Grupo "EE":** ratas en condiciones estándar con refuerzos positivos que estimulen su desarrollo cognitivo (juguetes, sonajeros, objetos brillantes o luminosos; Figura 1) los objetos se cambian semanalmente para evitar habituación al mismo (*Kline et al. 2007*). Se corrobora que ha sido utilizado por los animales contrastando su estado inicial con su estado final (generalmente mordidos o desgastados producto de la interacción con el mismo; Figura2).Este grupo está formado por 24 individuos: la mitad de ellos son animales sometidos a EE desde su nacimiento y la otra mitad se encuentra formada por animales a los cuales se ha mantenido en condiciones estándar y a la edad de 7 meses se han sometido a EE. De esta manera podremos ser capaces de medir si el EE es capaz de marcar diferencias según la edad a partir de la cual se aplique el tratamiento.



Figura 1. Estado inicial de los juguetes.



Figura 2. Estado de los juguetes una vez los animales han interactuado con ellos.

- **Grupo "EI":** ratas mantenidas en condiciones no-estándar y sometidas constantemente a situaciones estresantes (refuerzos negativos).

El primero de estos refuerzos al cual serán sometidas es el aislamiento social: todas las ratas se encuentran en jaulas individuales de modo que no tendrán interacción de ningún tipo con sus hermanos durante todo el proceso. Acorde con *Volkers et al (2011)* esta situación de aislamiento social se ha observado que puede acarrear degeneración neuronal y

aparición temprana de demencias y otras enfermedades degenerativas. La aplicación de estos estímulos negativos se realiza una vez a la semana y se permite un tiempo de recuperación entre cada uno de ellos de modo que no provoquen deterioro en el animal.

Además de la privación de la interacción social se han empleado los siguientes refuerzos negativos para el mantenimiento constante de empobrecimiento ambiental:

- Cambios en los ciclos luz/oscuridad y constantes ambientales: estas ratas no se encuentran en el estabulario por lo que su ratio horas de luz/horas de oscuridad será modificado diariamente, al igual que las variables ambientales como temperatura y humedad que dependerán de las constantes ambientales. Duración permanente. Según estudios recientes (*LeGates et al 2012*) los cambios constantes en el ciclo de luz influye sobre las capacidades de aprendizaje ya que disparan los niveles de corticosterona, una hormona relacionada con momentos o situaciones de gran ansiedad, lo cual sugiere que ello pueda repercutir negativamente sobre las facultades cognitivas. Duración 4 días (desde 12/10 hasta 15/10/2011).
- Sustitución de serrín de las jaulas por bolas de vidrio (cánicas): cambio a un sustrato móvil e inestable incapaz de absorber orina. Duración 1 semana.
- Agua pulverizada esparcida sobre el animal (por medio de un pulverizador): cada hora junto con cronómetros que disparan la alarma sonora cada 60 minutos. Duración 1 semana.
- Alarmas ("timers") que emiten un sonido intermitente que se repite cada hora. Duración 1 semana.

2. Tratamientos farmacológicos: descripción de los fármacos y dosis empleadas.

Administración de tratamientos agudos: fármacos y dosis establecidas.

Los tres grupos serán sometidos a tratamientos farmacológicos, con la finalidad de conocer y a la vez contrastar el papel de las dos vías seleccionadas en el proceso de aprendizaje y cómo evolucionan. La administración de los fármacos se realizará por vía intraperitoneal, 30 minutos previos a la ejecución de pruebas comportamentales. La finalidad de dichos tratamientos agudos es la de evaluar el efecto del fármaco para ver si esa función o vía está relacionada con el aprendizaje, si observamos una mejora/empeoramiento cognitiva o motora, si se potencia/inhibe la capacidad de aprendizaje de los sujetos:

Utilizaremos los siguientes tratamientos farmacológicos para estimular cada una de las vías de señalización elegidas.

Pilocarpina:

Es un agonista colinérgico. Las vías colinérgicas están íntimamente implicadas en el proceso de aprendizaje, la memoria y la alteración de este sistema produce deterioros en el aprendizaje y en muchos modelos de memoria. Mayoritariamente activa receptores cerebrales muscarínicos de tipo M_3 . Estudios recientes (De-Mello *et al.* 2005) demuestran que la administración de pilocarpina puede revertir el deterioro cognitivo inducido en ratas jóvenes.

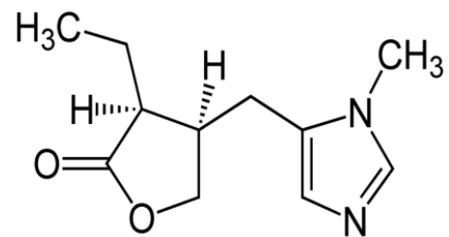


Figura 3. Estructura química de la pilocarpina.

Dosis utilizada en el estudio: la dosis empleada será la descrita por Tejada *et al* (2010) demostrada que produce efectos positivos en aprendizaje y memoria es 3mg/ kg animal en un 1ml salino/ kg.

8-OH-DPAT:

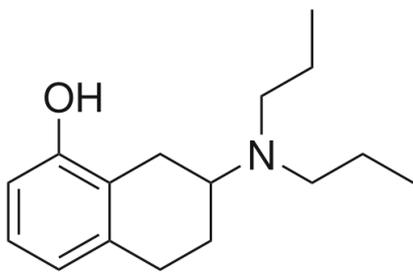


Figura 4. Fórmula 8-OH-DPAT.

Es uno de los agonistas más selectivos del receptor 5-HT_{1A} serotoninérgico; receptor que juega un papel importante en la modulación de las funciones de memoria (Haiders *et al* 2012).

El receptor cerebral 5-HT_{1A} se encuentra en las áreas del cerebro relacionadas con las funciones de memoria y aprendizaje como el hipocampo, hipotálamo y el córtex.

Estudios han demostrado que el 8-OH-DPAT produce mejoras significativas en la adquisición de aprendizaje, memoria a corto y largo plazo en ratas tratadas con el mismo, sin embargo la mejora que se observa a largo plazo es ligeramente menor respecto al corto plazo (Haiders *et al* 2012).

Dosis utilizada en el estudio: en la bibliografía consultada se describen dos dosis con efectos marcadamente diferentes; por una parte una dosis de 1mg/ kg disuelta en 1ml salino/ kg animal, que ha demostrado tener unos efectos negativos sobre el aprendizaje de los individuos, mientras que una dosis más baja 0,3mg/ kg (Haiders *et al*) muestra un cambio positivo, con la cual permitirá conocer el papel que sus receptores diana tienen en el proceso de aprendizaje. Dichas dosis actúan sobre receptores postsinápticos o presinápticos respectivamente.

Para la comparación de dichos tratamientos y para corregir el error en las pruebas producido por la administración de fármacos vía intraperitoneal, a las ratas del grupo control se les administrará suero salino en dosis de 1 ml / kg.

3. Tests cognitivos.

A todas las ratas utilizadas en el ensayo se las ha sometido previamente a una evaluación de su comportamiento por medio de la ejecución de todos los tests comportamentales simulando incluso las aplicaciones de fármacos (en este caso sustituido por suero salino 1mg/ kg). Una vez realizadas todas las pruebas se ha procedido a la separación de las ratas en los diversos grupos citados anteriormente.

Para llevar a cabo este estudio es necesario medir la efectividad del estímulo causado a cada individuo a nivel motor y cognitivo, por lo que las siguientes pruebas realizadas sobre ellas han servido para esta función:

Laberinto de Barnes



Figura5, esquema dispositivo utilizado.

La prueba conocida como laberinto de Barnes (Figura5) es un instrumento muy utilizado en experimentación con animales de laboratorio. Éste nos permite estudiar cómo es la memoria espacial de una rata sometida a una situación de estrés inducido por un foco de luz intenso ó un sonido blanco de 90 decibeles. En nuestro estudio se ha utilizado un foco potente como estímulo.

El laberinto consiste en una tabla circular con 18 agujeros alrededor de la periferia de la misma. Bajo uno de estos agujeros se halla la denominada caja meta o *target*. El objetivo a conseguir por el animal es encontrar la caja meta del laberinto en el menor tiempo posible, siendo el único lugar disponible en el laberinto donde éste puede refugiarse del estímulo lumínico previamente descrito.

La prueba consta de dos fases:

Una primera fase de habituación o familiarización en la que se permite a la rata explorar el terreno durante un máximo de 2 minutos, si la rata no ha conseguido esconderse en la meta se le facilita la entrada y se la deja reposar dentro de la caja tapada, de este modo facilitamos el aprendizaje. Este paso se ha repetido 4 veces dejando pasar unos 10 minutos de descanso entre cada intento.

Pasado el entrenamiento se pone a prueba lo aprendido por el animal en la fase test en la cual el tiempo límite se reduce a solamente 90 segundos en vez de 2 minutos.

La rata es depositada a oscuras dentro de un dispositivo en la zona central de la mesa, a continuación se encienden las luces, que actuarán de estímulo para potenciar la búsqueda de la caja meta la cual está a oscuras y supone un refugio para ella.

Mediciones realizadas:

Los datos recogidos de esta prueba son múltiples: se puede analizar por una parte el tiempo que ha empleado el animal para ingresar en el *target*, denominado latencia. Distinguimos entre latencia primaria (primera vez que se acerca y procede a la inspección del *target*) y latencia total (tiempo que emplea en ingresar físicamente al *target*).

Otros parámetros que se estudian son la preferencia por el *target* (número de veces que visita cada uno de los diferentes agujeros), lo cual nos revela si los animales tienen problemas cognitivos o de aprendizaje, y la estrategia empleada. Se describen tres tipos básicos de estrategia:

- Estrategia directa: el animal se acerca únicamente al *target*. Mejoras en la estrategia nos ayudarán a evaluar en su proceso de aprendizaje.
- Estrategia seriada: el animal visita agujeros próximos al *target* hasta dar con éste.
- Estrategia mixta o aleatoria: comportamiento más o menos errático del animal, el cual visita diferentes agujeros sin una pauta explicable.

4. Tratamiento de datos y análisis estadístico:

Se realizó un análisis de los datos con el programa Graph pad Prism, se aplicaron contrastes t-Student y ANOVA. Los resultados presentados corresponden a la media \pm error estándar de la media (ES). El nivel de significación estadística se consideró $p \leq 0,05$.

RESULTADOS

A todas las ratas utilizadas para el experimento se las ha sometido previamente a un test base para comprobar sus aptitudes por medio de la ejecución de las pruebas comportamentales simulando incluso las administraciones de fármacos (en este caso sustituido por suero salino 1ml/kg).

El EE mejora las capacidades cognitivas y motoras respecto al grupo control, mientras que el EI induce cambios positivos en un primer momento sobre las capacidades cognitivas, seguido de un empeoramiento progresivo a largo plazo.

Grupo EE

Resultados de los animales sometidos a EE desde la separación de la madre (21 días):

Las siguientes gráficas muestran los datos de latencia (en segundos) obtenidos.

Efectos a los 3 meses

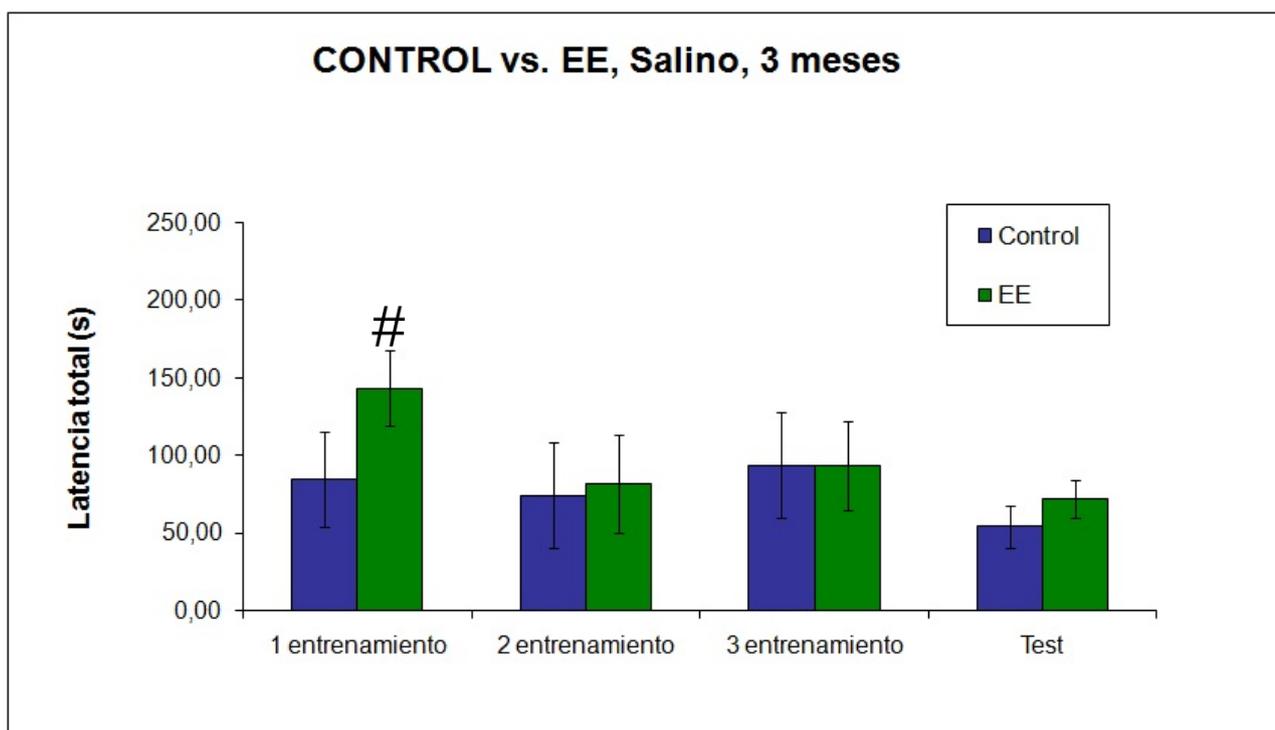


Figura 6. Comportamiento diferencial de ambos ambientes (EE en verde y Control en azul) a la edad de 3 meses.# $p < 0,05$ (t-Student) comparando EE con el grupo control.

Esta gráfica muestra únicamente cambios significativos en el primer entrenamiento entre el grupo control y el grupo sometido a EE, aunque en el resto de entrenamientos y la fase test no nos evidencia cambios significativos que se hayan podido registrar con 3 meses de enriquecimiento ambiental en relación a potenciación del aprendizaje. Esto refuerza las ideas de que es un proceso largo y continuo en el cual se observarán cambios, pero no serán inmediatos (Haiders et al 2012).

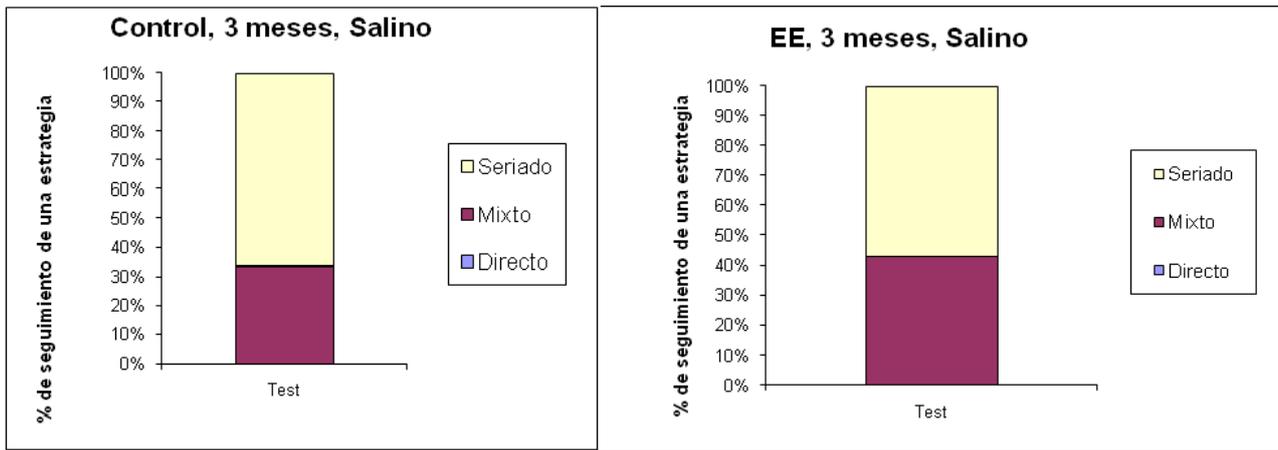


Figura 6A. Estrategias comportamentales registradas en la fase de test.

En cuanto a la estrategia seguida (Figura 6A), muestran estrategias y pautas de conducta similares seriada-mixta, lo que nos avala la primera idea propuesta de que se trata de grupos que responden de manera similar al ambiente pues se requiere más tiempo de enriquecimiento ambiental para mostrar mejorías significativas.

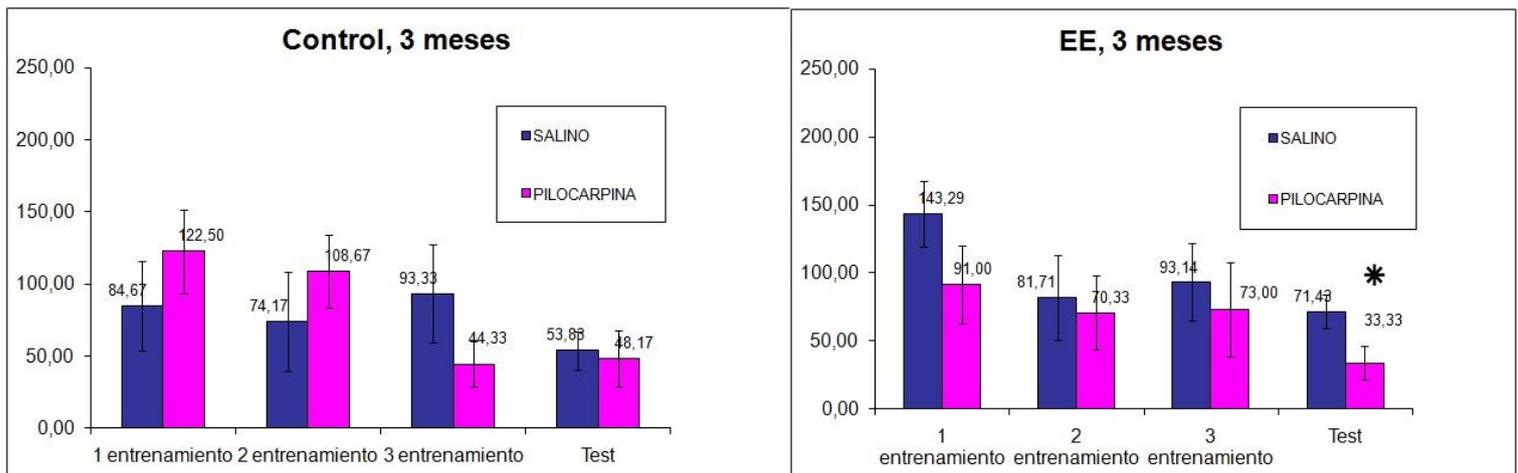


Figura 7. Comparación del comportamiento de la Pilocarpina en animales Control y EE. Se observaron diferencias significativas en la fase de test de los animales sometidos a EE. * $p < 0,05$ (t-Student) comparado con su control.

La Figura 7 muestra como la administración de Pilocarpina resulta en tiempos de latencia superiores en los animales sometidos a condiciones estándar, mientras que se aprecian ligeras mejoras en los tiempos de los animales mantenidos en condiciones de EE, reduciendo un 53% el tiempo de latencia en la fase de test ($p < 0,05$). Ello se debe seguramente a un aumento de plasticidad neuronal que comienza a inducir este tipo de ambiente que parece afectar al sistema colinérgico.

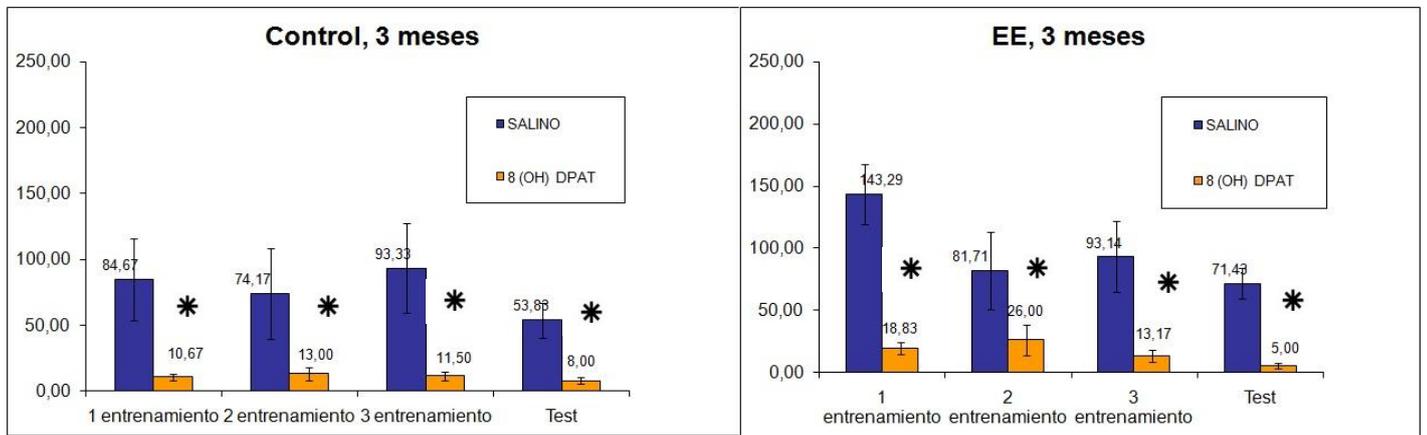


Figura 8. Efectos diferenciales de la administración de 8-OH-DPAT en animales del grupo Control y EE; * $p < 0,05$ (t-Student) comparado con su control.

Los efectos del 8-OH-DPAT son fácilmente apreciables en ambos grupos, el gran descenso de los tiempos de latencia acompañado de una elección de la estrategia directa en la fase de test mayoritaria en ambos casos refuerza la hipótesis propuesta de su efecto beneficioso en el aprendizaje. Las regiones que gobiernan en la inclinación hacia estrategias de tipo directo es el hipocampo, el cual es muy sensible a este tipo de fármacos dada la gran expresión de receptores serotoninérgicos (Rasmuson, 1997). El efecto del 8-OH-DPAT es ligeramente más marcado en el grupo sometido a EE respecto al control en la fase de test (reducción del tiempo de latencia 93% en EE respecto a una reducción del 85% en el grupo control, $p > 0,05$).

Efectos a los 10 meses: Los animales del grupo Control empiezan con una latencia superior respecto a EE.

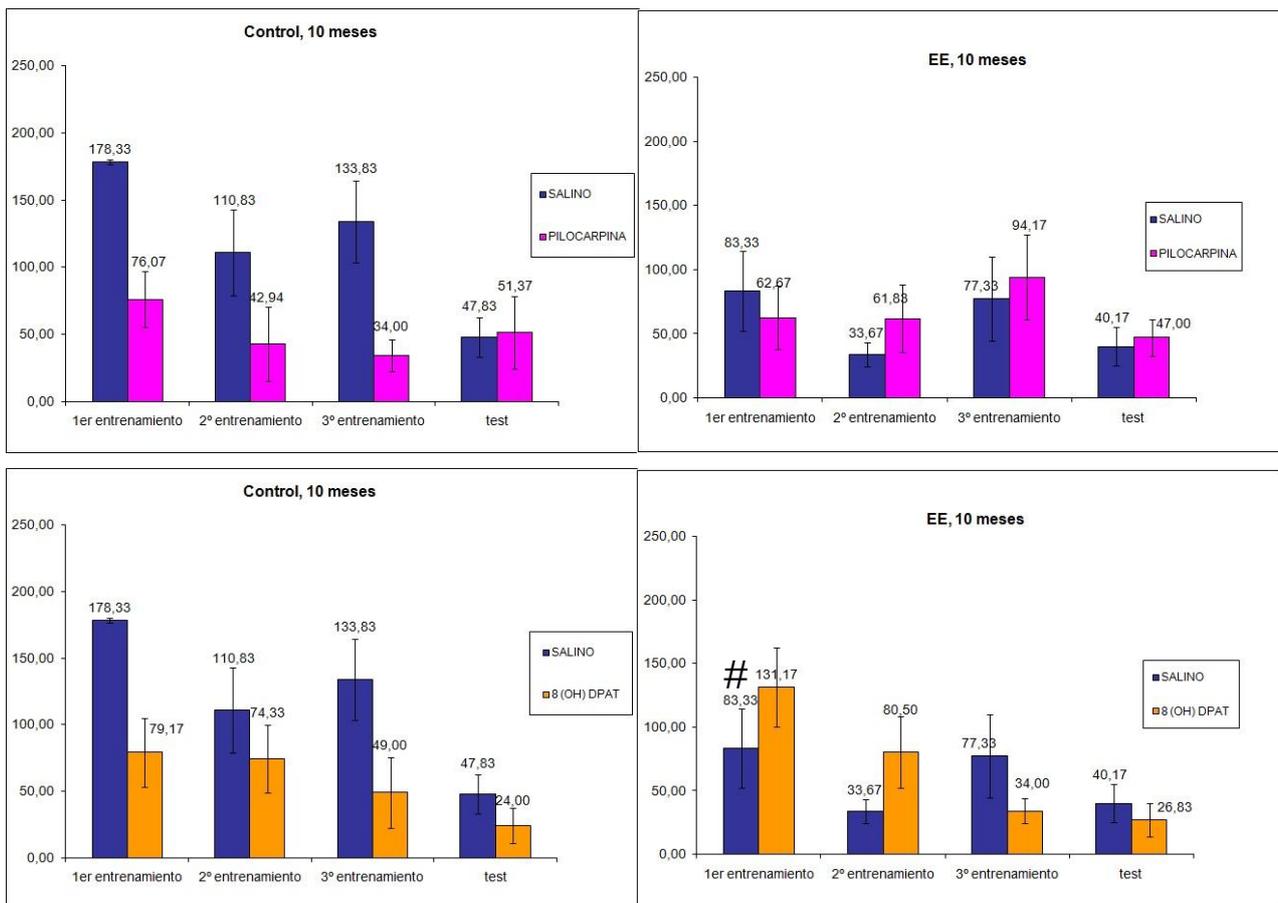


Figura 9. Efecto de la pilocarpina y 8-OH-DPAT sobre los tiempos de latencia en ratas sometidas EE y animales Control. # $p < 0,05$ (*t*-Student) comparando el grupo EE con el grupo Control.

A partir del mes 10 apreciamos, tanto en las administraciones de Pilocarpina como de 8-OH-DPAT lo descrito por Kline (2007), la incompatibilidad de beneficio de fármaco y tratamiento ambiental, ya que observamos que los tiempos inyectando pilocarpina no experimentan una mejora significativa en EE. De la misma manera ocurre con el 8-OH-DPAT, el cual comienza mostrando unos tiempos iniciales muy elevados pero igualando a los tiempos de los animales tratados con suero salino en la fase de test.

Respecto a las estrategias podemos decir que la administración de 8-OH-DPAT permite observar una pauta más errática en animales del grupo EE en comparación a los animales Control, cuya estrategia es mayoritariamente directa (Rasmuson, 1997).

Efectos a los 13 meses

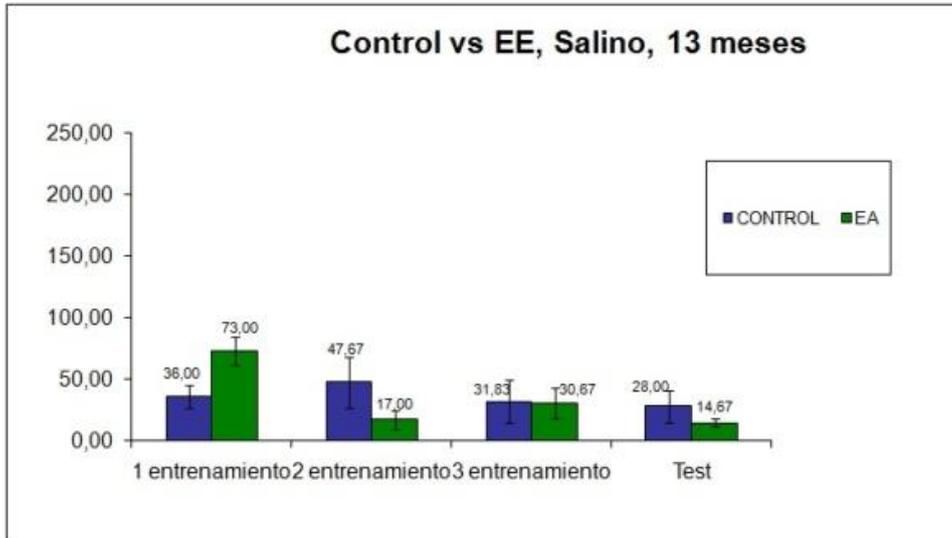


Figura 10. Evolución de los tratamientos en el muestreo realizado a los 13 meses.

La repetición del proceso, pasados 3 meses nos indica una mejoría en los tiempos de latencia de los animales mantenidos en EE (Figura 10) en la fase test. Sin embargo las figuras siguientes muestran como las administraciones de Pilocarpina denotan unos resultados contrarios respecto a lo observado a

3 y 10 meses aunque de nuevo más marcado en el grupo de animales sometidos a EE (aumento del tiempo de latencia en 264%, $p < 0,05$) que en grupo Control (subida del 68% en el tiempo de latencia).

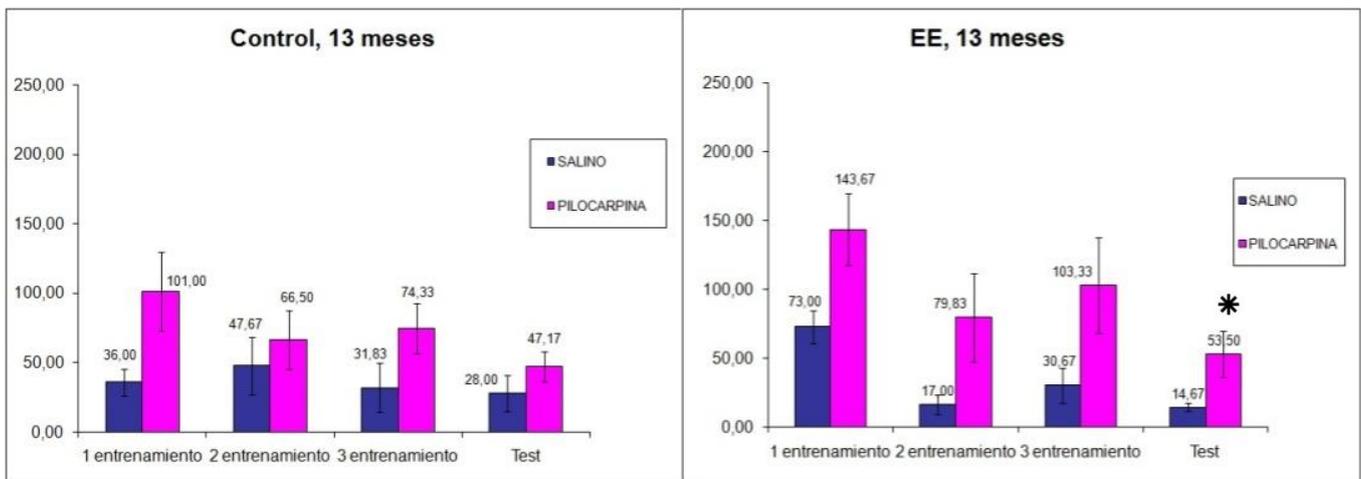


Figura 11. Tiempos de latencia (segundos) en tratamientos de Pilocarpina. * $p < 0,05$ (t-Student) comparado con su control.

La administración de 8-OHDPAT denotan un efecto significativamente más marcado ($p < 0,01$) en el grupo de animales controles (87%) que en los sometidos a EE (36%).

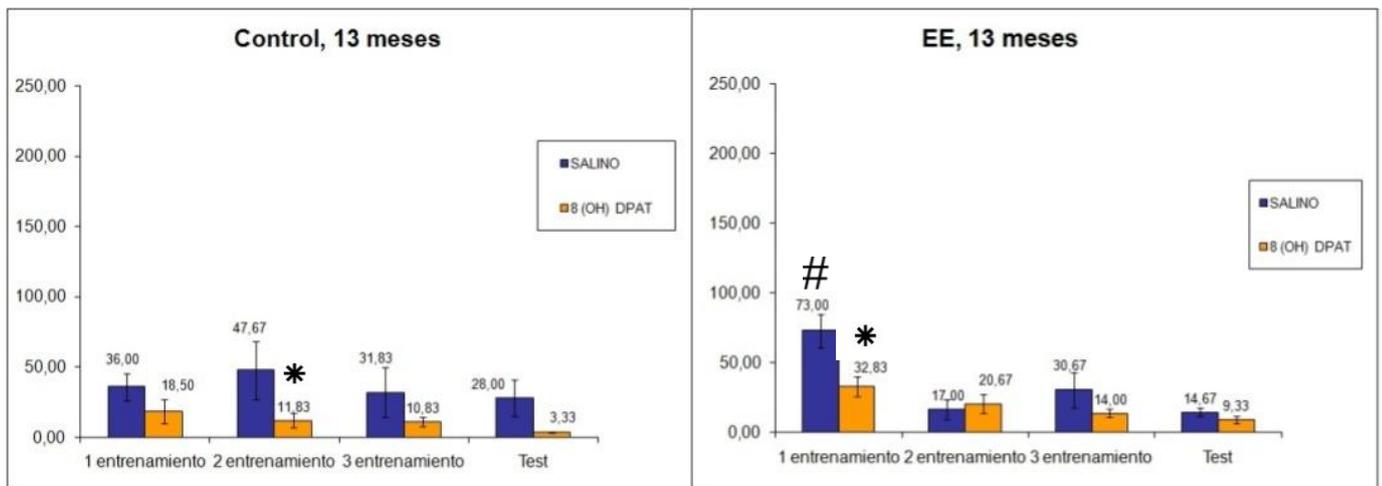


Figura 12. Tiempos de latencia (segundos) en tratamientos de 8-OH-DPAT. * $p < 0,05$ (t-student) comparado con su control; # $p < 0,05$ (t-Student) comparando el grupo EE con el grupo Control

Las estrategias seguidas continúan siendo inclinadas hacia el mixto-seriado en animales mantenidos en EE, mientras que se aprecia un comportamiento positivo del fármaco en los animales mantenidos en situaciones estándar ya que éstos recurren a la estrategia principalmente directa para la resolución de la prueba. Esta elección está gobernada por el hipocampo (región rica en receptores serotoninérgicos) (Rasmuson, 1997).

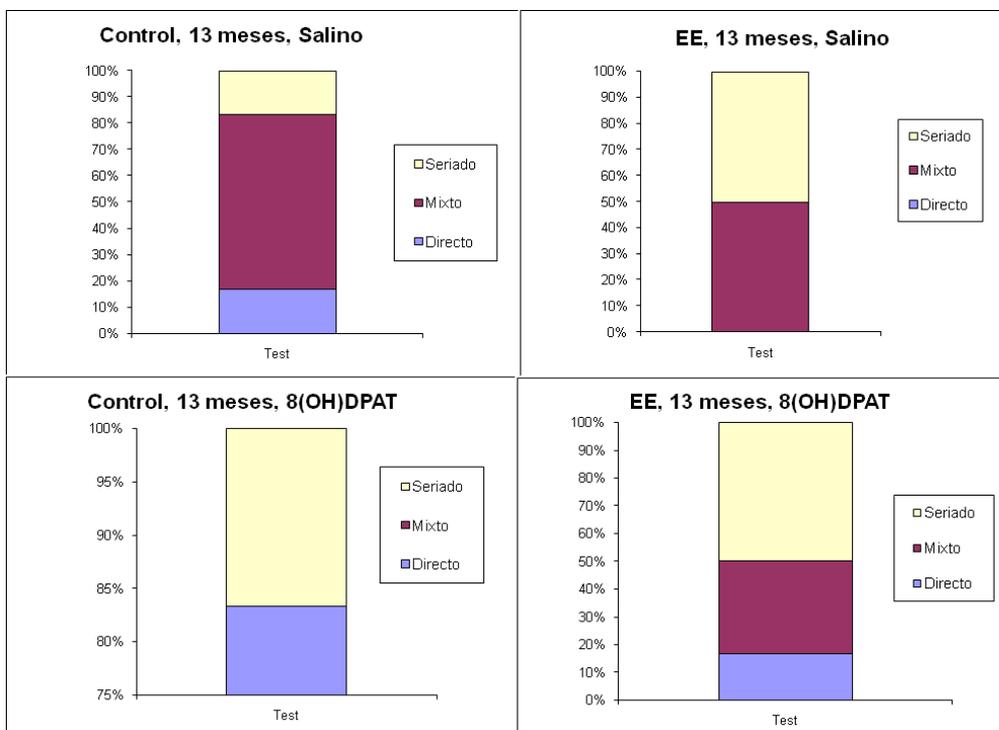


Figura 12A. Comparativa de las estrategias adoptadas por animales en fase test del grupo Control y EE.

Resultados de los animales sometidos a EE a partir de la edad adulta (7 meses):

A diferencia de los animales que fueron sometidos a EE desde momentos tempranos de su vida (21 días), las condiciones ambientales de este grupo experimental han sido estándar hasta llegar a la edad adulta de 7 meses, a partir de la cual se les sometió a enriquecimiento ambiental. Los resultados muestran que no hay diferencia significativa entre aquellos mantenidos en situación estándar y los sometidos a EE, teniendo unas latencias similares desde el primer entrenamiento (Figura 13).

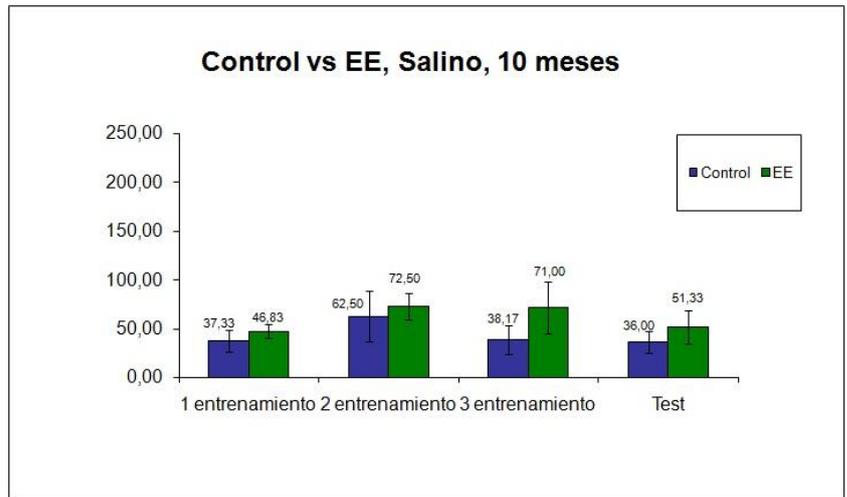


Figura 13. Evolución grupo control y EE con solución salina.

Esto nos permite afirmar que los animales adultos requieren un mayor tiempo de estimulación para apreciar las mejorías a nivel de neuroplasticidad que ofrece el enriquecimiento ambiental.

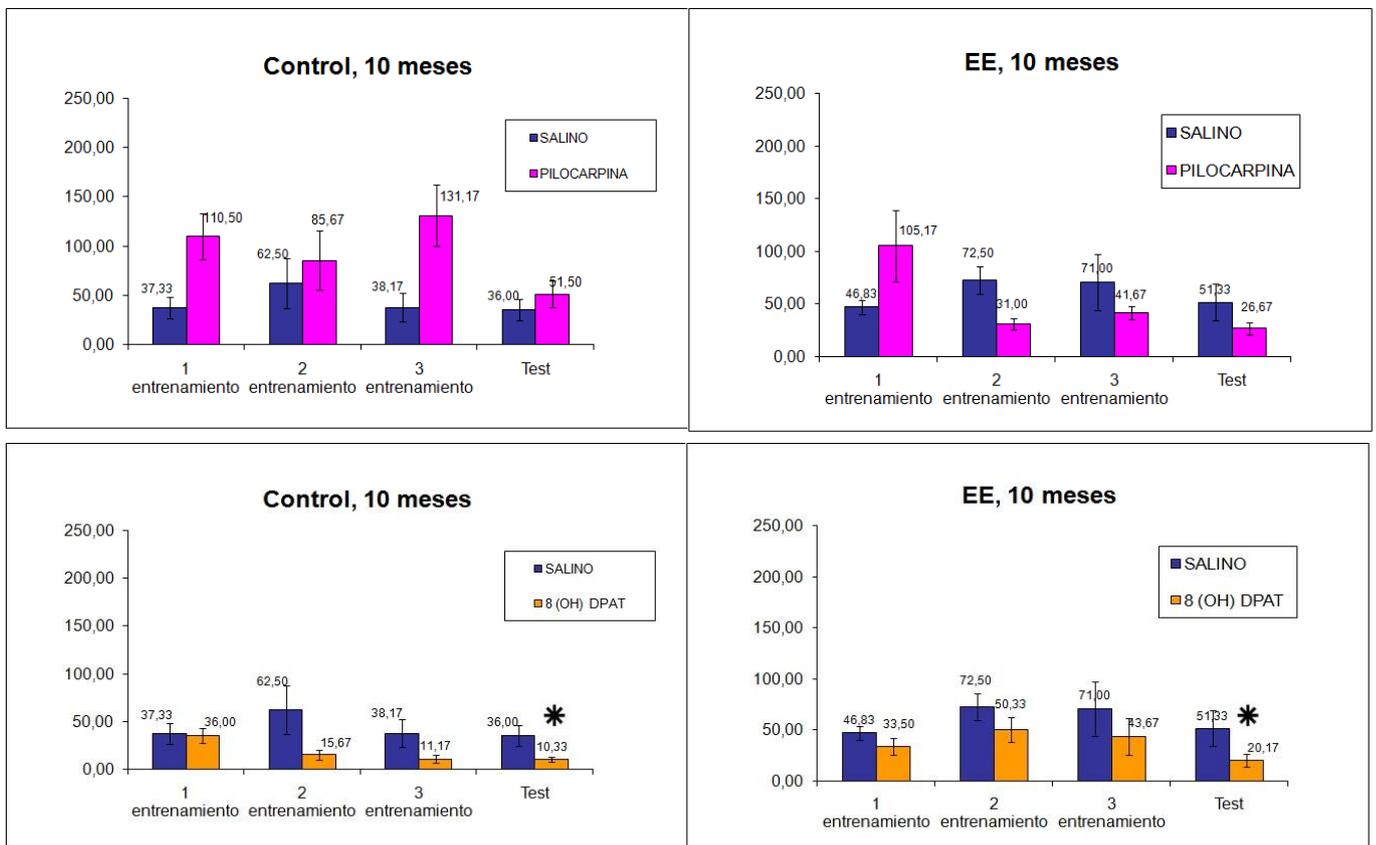


Figura 14. Efectos de la pilocarpina y el 8-OH-DPAT en ratas de 10 meses sometidas a EE desde los 7 meses.

Respecto a los fármacos administrados, los tratamientos con Pilocarpina se muestran negativos para el aprendizaje en situación control mientras que de forma general se observa un efecto positivo para el aprendizaje en el grupo sometido a EE. En cuanto al 8-OH-DPAT no se observan diferencias significativas entre ambos grupos aunque parecen ser ligeramente inferiores en el grupo EE (disminución del 60% de latencia) que en el grupo control (disminución del 71% de latencia)(Figura 14). Estos resultados contrastan con los observados previamente en animales que fueron sometidos a EE desde edades tempranas, en los que se observaban a los 3 meses de estar sometidos a estímulos de enriquecimiento ambiental, un mayor efecto de ambos fármacos respecto al grupo control (Figuras 7 y 8).

Grupo EI

Resultados animales sometidos a EI desde su nacimiento:

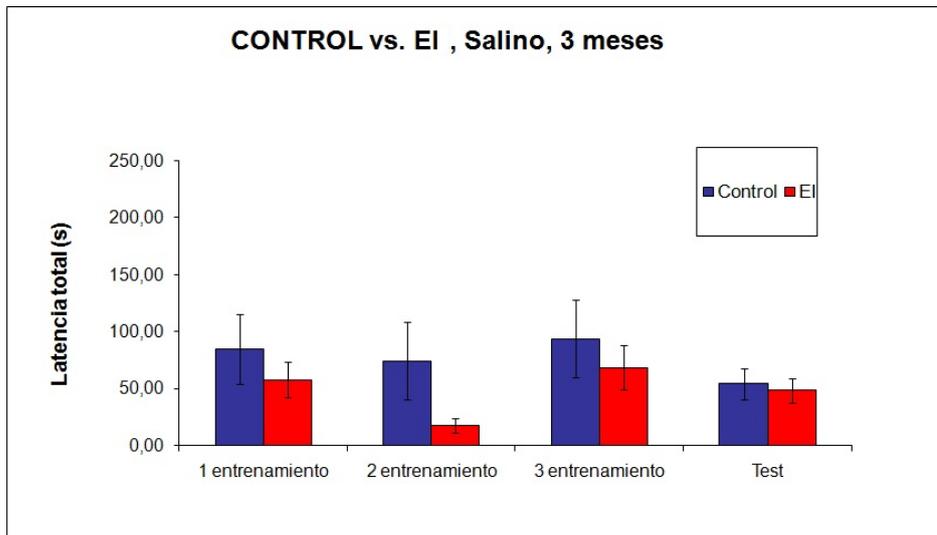


Figura 15. Comparativa de tiempos de latencia grupo Control y EI a la edad de 3 meses.

Acorde con lo observado, y al contrario de lo estipulado, no se observan fenómenos desfavorables para el aprendizaje en condiciones ambientales desfavorables (Figura 15). No obstante, apreciamos algunos hechos puntuales, el primero hace referencia al tipo de estrategia llevada a cabo por ambos grupos tratados con salino, más del 80% de los tests de animales sometidos a EI han sido resueltos por medio de una estrategia de tipo mixto; al contrario que en las de grupo Control, cuya estrategia mayoritaria es la directa, siendo inexistente la estrategia seriada en ambos grupos (Figura15A). Se observó que los animales sometidos a EI presentaban un comportamiento motor incrementado respecto a los controles, probablemente por el aumento de actividad simpática (de activación sistémica, muy visibles en situaciones de estrés). Como resultado de ello, presentaron un tiempo de latencia similar al control aunque siguiendo una estrategia aleatoria. La estrategia aleatoria está menos relacionada con un proceso favorable de aprendizaje respecto a la estrategia directa y la estrategia seriada que requieren la funcionalidad del hipocampo y el estriado, regiones estrechamente relacionadas con los procesos de aprendizaje y memoria.

Estas observaciones sugieren que los ambientes con abundantes estímulos estresantes proporcionan una mayor velocidad de respuesta a la búsqueda de refugio respecto a aquellas mantenidas en ambientes ausentes de estímulos estresantes aunque esta búsqueda sea irreflexiva.

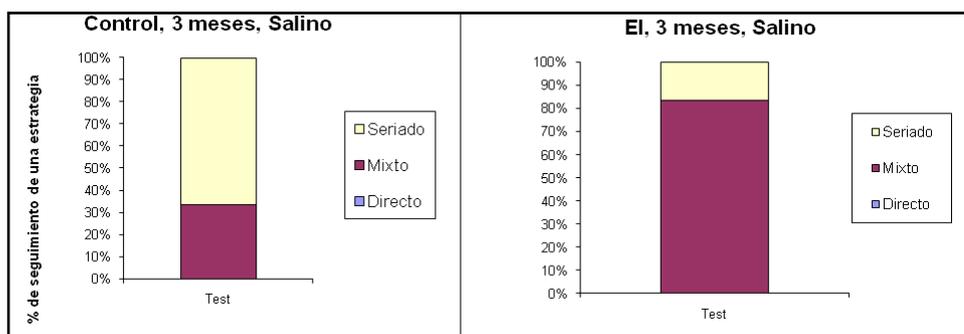


Figura 15A. Estrategias adoptadas por los grupos Control y EI con suero salino.

Evolución de la respuesta farmacológica al Empobrecimiento Ambiental:

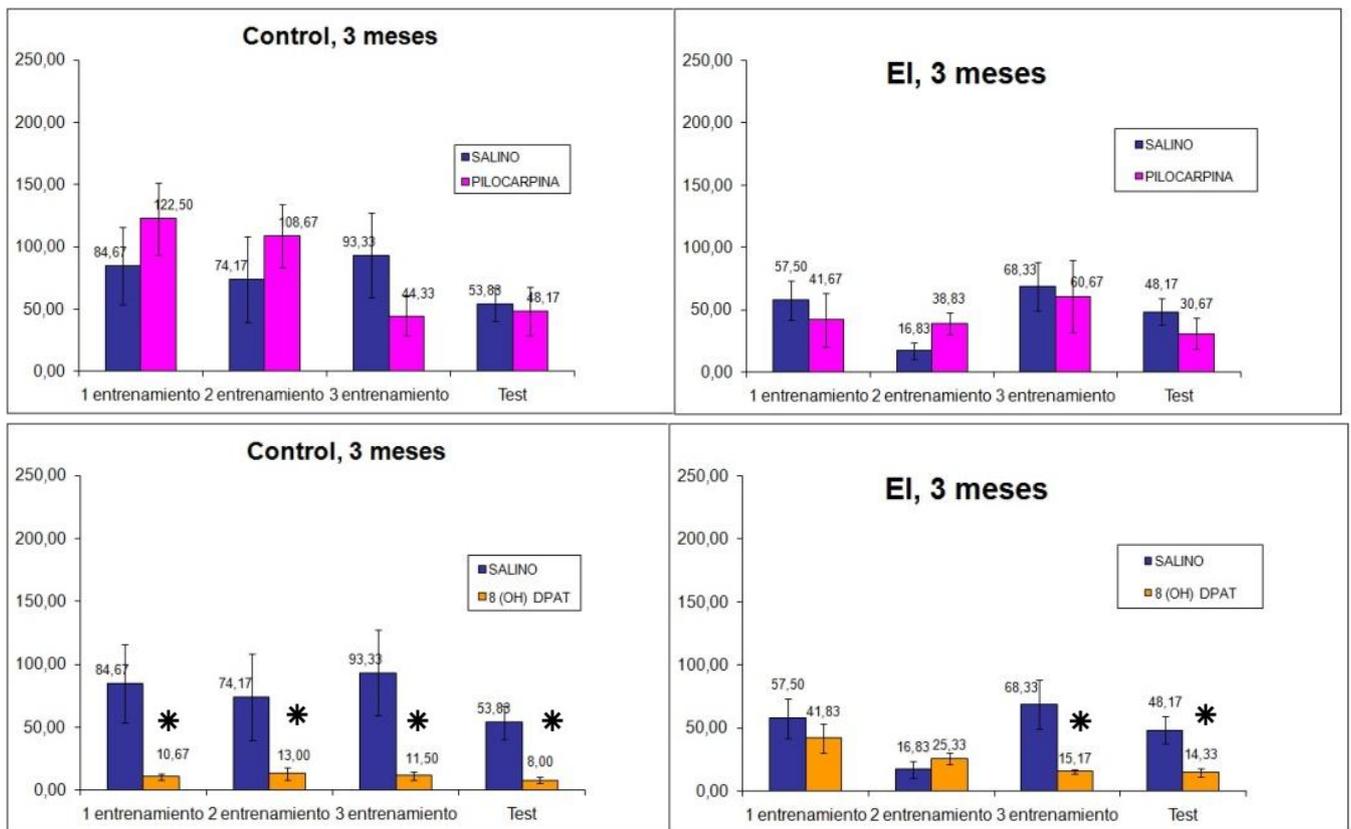


Figura 16. Comparativa de los efectos de la pilocarpina y 8-OH-DPAT en tiempos de latencia en ratas sometidas EI y animales Control. * $p < 0,05$ (t-Student) comparado con su control.

Se destaca el bajo efecto de la Pilocarpina en los animales control y los sometidos a EI. En cuanto a la administración de 8-OH-DPAT parece tener unos efectos favorables sobre el aprendizaje mayor en animales del grupo Control (85% mejoría) que en los animales sometidos a EI (70 % mejora), ello podría sugerir un deterioro del sistema serotoninérgico en el grupo sometido a condiciones de estrés. Este hecho está relacionado con la adquisición de estrategias de búsqueda de tipo mixto o aleatorio en detrimento de pautas directas respecto al grupo de animales mantenidos en condiciones estándar (Figura 16A).

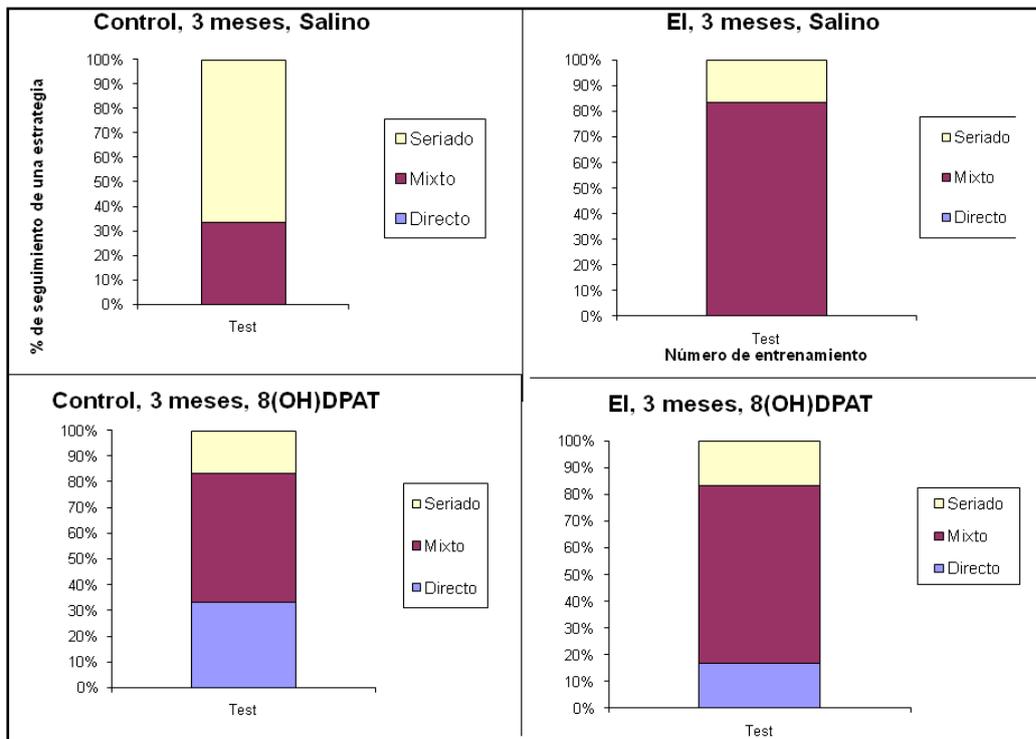


Figura 16A. Estrategias comportamentales observadas en animales de los grupos Control y EI.

Tal y como se observa, hay diferencias a la hora de la adopción de pautas comportamentales en animales Control respecto a animales sometidos a EI.

Resultados obtenidos de los animales sometidos a EI a partir de la edad adulta (7 meses):

Los siguientes datos corresponden a animales sometidos a condiciones estresantes a partir de los 7 meses siendo mantenidos hasta dicha edad en condiciones estándar.

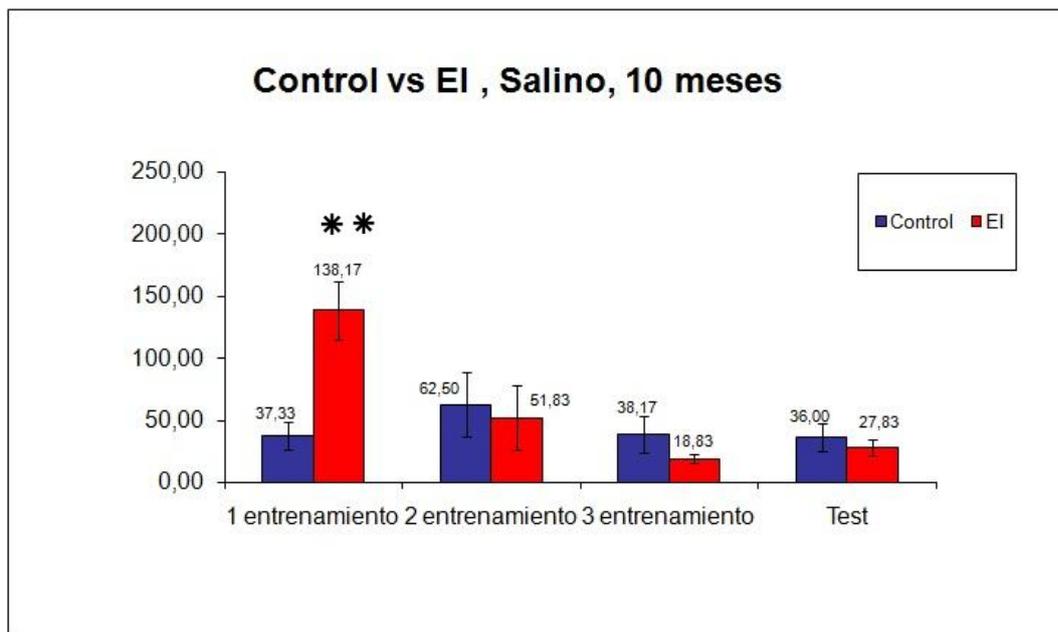


Figura 17. Comparativa de tiempos de latencia grupo Control y EI a la edad de 10 meses; $**p < 0,01$ (t-Student) comparado con su control.

Nuevamente, podemos observar que una exposición a situaciones ambientalmente desfavorables, practicadas a partir de los 7 meses y prolongadas durante 3 meses, no muestra afecciones al aprendizaje (Figura 17). Sin embargo cabe destacar la gran diferencia en el primer entrenamiento entre los grupos Control y EI. La gran diferencia lo cual nos proporciona un indicio acerca de una posible pérdida de memoria a largo plazo (olvido casi por completo del dispositivo al que fueron el día antes de sersometidasal test para su habituación). Esta posible pérdida de memoria puede ser atribuida a inicios de neurodegeneración (Volkers et al 2011).

Evolución de la respuesta farmacológica al Empobrecimiento Ambiental:

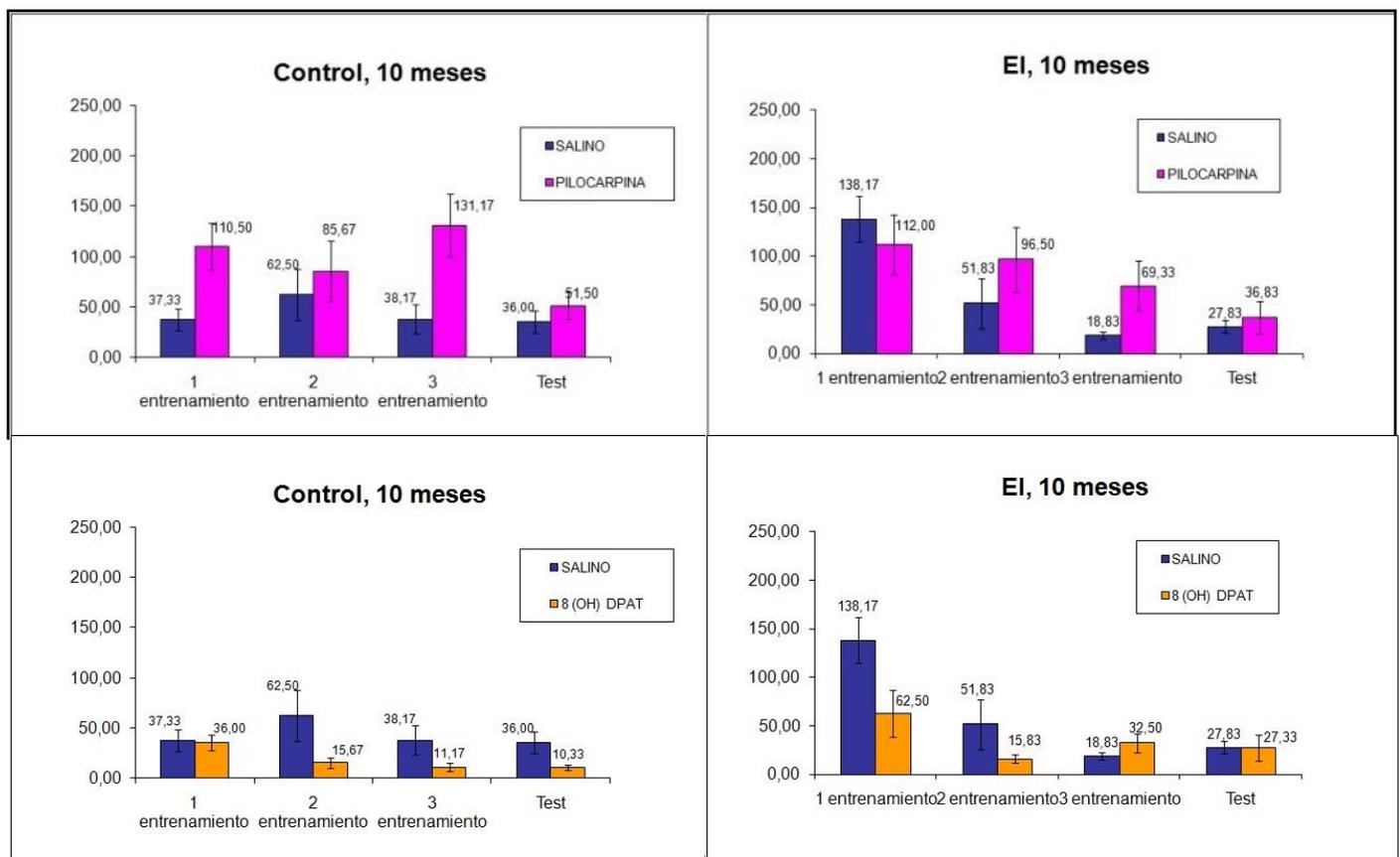


Figura 18. Comparativa de los efectos de la pilocarpina y 8-OH-DPAT en tiempos de latencia en ratas sometidas EI y animales Control. .

El patrón de comportamiento de la Pilocarpina parece tener algunos efectos negativos sobre los individuos a los cuales se aplica. Sin embargo la ausencia de dichos efectos desfavorables en el grupo EI, nos hace sospechar de un fuerte bloqueo de estas vías producto de la sobreexpresión de las vías simpáticas en situaciones de estrés. A pesar de ello no se observan significancias en el desarrollo de pautas de estrategia entre grupo Control y EI.

En cuanto a la administración de 8-OH-DPAT parece tener unos efectos favorables sobre el aprendizaje mayor en animales del grupo Control (71% mejoría) que en los animales sometidos a EI donde no se observa ningún efecto, ello podría sugerir un deterioro del sistema serotoninérgico en el grupo sometido a condiciones de estrés, como se observó en animales sometidos a EI en edades tempranas

DISCUSIÓN

Ideas generales:

A la vista de los resultados, podemos corroborar la primera hipótesis de partida del trabajo, y es que tanto la vía colinérgica como serotonérgica están directamente implicadas en el desarrollo de patrones de aprendizaje y memoria.

El análisis de los resultados ha denotado una actuación de los fármacos diferenciada en cada uno de los tratamientos o situaciones ambientales que se corresponde con lo descrito por *Harati et al* (2012) y *Kline et al*(2007) respectivamente para situaciones de EE y EI.

Efectos Farmacológicos observados e interés de las vías implicadas:

La medición de las vías colinérgica y serotonérgica gracias a los fármacos seleccionados ha revelado que dichas vías no poseen ni el mismo peso ni se muestran equitativamente dañadas/potenciadas en las diferentes situaciones analizadas. Las mejoras cognitivas se ven más claras al estimular el receptor serotonérgico 5-HT_{1A} con 8-OH-DPAT dando mejores resultados comparativamente a los ofrecido por la Pilocarpina sobre el sistema colinérgico. Cabe señalar que la Pilocarpina induce efectos somáticos que en ocasiones han podido afectar negativamente al desarrollo de la prueba aunque han podido igualmente revelar la sensibilidad al fármaco en los diferentes grupos experimentales. Por otro lado el 8-OH-DPAT ha sido usado como agente potenciador de la recuperación frente a lesiones neuronales mostrando un resultado muy satisfactorio (*Kline* 2007) de modo que las vías serotonérgicas muestran una mayor recuperación al daño neuronal.

En general, hemos observado grandes diferencias entre ambos fármacos: denotando una mejora en los tiempos de latencia administrando 8-OH-DPAT incluso en los animales sometidos a empobrecimiento ambiental respecto a los tratamientos con Pilocarpina.

Comportamiento diferencial de las vías en situaciones de Enriquecimiento ambiental y Empobrecimiento ambiental:

EE:

Estudios del año 1997 (*Rasmuson et al*), revelaron que se observaba una mayor expresión de RNA mensajero de receptores de tipo 5-HT_{1A} en la región hipocampal de animales sometidos a enriquecimiento ambiental, lo que se podría traducir en una mayor expresión de receptores 5-HT_{1A} y quizás también de su función. Una posible explicación a los resultados obtenidos al administrar 8-OH-DPAT, que ha producido una respuesta contraria a la esperada (menor efecto en general en los animales sometidos a enriquecimiento ambiental respecto a los controles tras la administración de

8-OH-DPAT). Podría ser que el aumento de mRNA no se haya traducido en un mayor número/función del receptor 5-HT_{1A}; o bien que el mayor número de receptores se encuentren a nivel postsináptico, con lo cual la función sobre los procesos de memoria/aprendizaje sean negativos. En este sentido *Haiders et al (2012)*, describe un efecto contrario de 2 dosis de 8-OH-DPAT sobre la memoria, dosis bajas como la utilizada en este trabajo inducen efectos positivos al actuar mayoritariamente sobre receptores presinápticos, mientras dosis superiores inducen efectos negativos al actuar mayoritariamente sobre receptores postsinápticos. Si el menor efecto positivo sobre la memoria observado en los animales sometidos a EE respecto al grupo Control, se deben a una interacción entre los efectos positivos y negativos sobre la memoria, si bien requiere mayores estudios podría estar indicando un aumento en la sensibilidad al agonista, convirtiendo la dosis aplicada en una dosis equivalente a la que produce los efectos desfavorables descritos por Haiders y cols.

Es sabido que el EE promueve la creación de nuevas sinapsis: evitando de esta manera que haya un retraso en la aparición de disfunciones cognitivas con el paso de la edad, previniendo déficits de atención producidos por la edad por medio de la potenciación de la memoria (*Hatari et al*). Por otra parte, el mismo equipo de investigación, llegó a la conclusión que animales sometidos a EE poseían un número de neuronas colinérgicas en la zona del prosencéfalo mucho mayor que sus homólogos mantenidos en condiciones estándar, lo cual sugiere que el EE produce cambios neuroanatómicos que preservan capacidades de memoria y aprendizaje espacial gracias a una mayor supervivencia de neuronas colinérgicas. De acuerdo con estos autores, en el estudio realizado hemos observado que la estimulación durante 3 meses con enriquecimiento ambiental mejoró el efecto de la pilocarpina en la fase de test tanto si se trataba de animales que tuvieron el EE desde los 21 días de vida, como si se realizaba a partir del estado adulto (7 meses de edad). Sin embargo, estos efectos no se mantuvieron a lo largo de todo el proceso de enriquecimiento ambiental.

Siguiendo la línea de otros autores (*Segovia et al 2009; Mohamed et al 2002*), no se discute el beneficio que reporta tanto el uso de potenciadores sinápticos, como del enriquecimiento ambiental, tanto a edades tempranas como tardías para recuperación de lesiones (*Kline 2007*) o para la mejora de las conexiones sinápticas retrasando la aparición de enfermedades neurodegenerativas (*Volkers et al 2011*). Sin embargo no existían estudios que aportaran evidencia de si estas vías de estimulación aplicadas conjuntamente reportarían efectos beneficiosos sumatorios. Los estudios realizados permiten defender la hipótesis planteada por *Kline et al* evidenciando que no se produce dicho efecto sumatorio, este hecho se observa claramente en los tratamientos con 8-OH-DPAT (ver figura 8) incluso la administración de fármaco reduce notoriamente su rendimiento, afectando negativamente. Si bien se desconoce la razón exacta de ello, se sostiene que se debe a que el EE produce una serie de cambios a nivel de sinapsis y de densidad de receptores que permite alcanzar el máximo de potenciación que el cerebro del animal es capaz de conseguir.

EI:

Tres meses después de someter a los animales a estas condiciones, no se observaron diferencias significativas en las latencias de los animales sometidos a empobrecimiento desde las primeras etapas de vida respecto al control. No obstante presentaron peores estrategias, siendo fundamentalmente de tipo aleatorio frente a la seriada del grupo control. En los animales sometidos a empobrecimiento en el estado adulto, a los 3 meses de estar sometidos a EI se observó una latencia muy superior en el primer entrenamiento, que podría estar relacionada con un empeoramiento de la memoria a largo plazo.

El resultado de efectos farmacológicos sobre este grupo se atiene a lo inicialmente esperado, *Winocur (1998)* describe cómo *situaciones extenuantes constantes que inducen a una progresiva destrucción de ciertas regiones cerebrales*.

Por medio del análisis de resultados de latencia total en la fase de test, se observan diferencias en la capacidad de respuesta al estímulo de ambas vías. En general, no se observaron diferencias respecto al grupo Control cuando se administró pilocarpina, mientras que se observaron efectos inferiores tras la administración de 8-OH-DPAT en los animales sometidos a EI respecto a los del grupo Control. Esta disminución de respuesta al 8-OH-DPAT se observó al cabo de 3 meses con empobrecimiento ambiental, tanto si se trataba de animales que tuvieron el EI desde los 21 días de vida, como si se realizaba a partir del estado adulto (7 meses de edad). De acuerdo con ello, los trabajos de *Gordon Winocur (1998)* podrían indicar que dicha falta de respuesta en la vía serotoninérgica se pueda atribuir a principios de neurodegeneración propios de ambientes empobrecidos en estímulos.

Si bien carecen del respaldo histológico, se hacen fácilmente visibles principalmente en los resultados de latencia de los animales tratados con 8-OH-DPAT. Ello nos permite afirmar por una parte que la degeneración de las vías estudiadas no es equitativa, sino que la vía serotoninérgica se ve afectada de forma superior a la vía colinérgica. Por otra parte permite sugerir que la administración de 8-OH-DPAT es susceptible de inducir a mejoras en situaciones de EI significativamente mejores que con la administración de Pilocarpina.

CONCLUSIONES

1. Se han observado diferencias en la modulación de los procesos de aprendizaje/memoria atribuibles al ambiente, siendo mejorados por efecto del enriquecimiento ambiental (latencias disminuidas), y disminuidos por el empobrecimiento ambiental (peor estrategia o aumento de las latencias iniciales).

2. Tanto la administración de pilocarpina como de 8-OH-DPAT a animales control ha resultado en una mejora de sus capacidades cognitivas, siendo más pronunciados los efectos observados tras la administración de este último.

3. El enriquecimiento ambiental y la administración de 8-OH-DPAT no ha resultado en un mayor efecto sobre los procesos cognitivos, ambos estímulos no son aditivos, si no que se ha observado una disminución del efecto del 8-OH-DPAT en los animales sometidos a enriquecimiento ambiental. Por el contrario, se ha observado un efecto mayor a la pilocarpina en los animales sometidos a enriquecimiento ambiental respecto a los controles tres meses después de su aplicación en ratas jóvenes y en adultas.

4. En condiciones de empobrecimiento ambiental, se ha observado una disminución del efecto del 8-OH-DPAT respecto a los controles tres meses después de su aplicación en ratas jóvenes y en adultas. Por el contrario, no se han observado cambios en el efecto de la pilocarpina en los animales sometidos a empobrecimiento ambiental respecto al control.

Conclusion final

Se ha sugerido que el EE promueve la creación de nuevas conexiones, evitando de esta manera que haya un retraso en la aparición de disfunciones cognitivas debidas a la edad, previniendo déficits de atención producidos por la edad por medio de la potenciación de la memoria. Sin embargo poco se ha estudiado o sabe acerca de los efectos causados por el empobrecimiento ambiental a largo plazo. Conocer la manera en que todo ello puede llegar a afectar a los complicados sistemas de conexiones neuronales, podría ayudar a establecer una hipótesis de cómo el estilo de vida puede llegar a afectar tanto a la calidad como número de conexiones funcionales.

AGRADECIMIENTOS

Quisiera agradecer la ayuda prestada para la realización de este trabajo a la Doctora Susana Esteban, mi tutora y guía en este trabajo. También quisiera agradecer el esfuerzo y compañía de Marga Ramis y Fiorella Sarubbo, por toda la ayuda prestada tanto durante las pruebas como en el tratado de los datos. Gracias a las tres por todo su apoyo y paciencia.

REFERENCIAS

Benaroya-Milshtein N. et al. 2004. *Environmental enrichment in mice decreases anxiety, attenuates stress responses and enhances natural killer cell activity*. European Journal of Neuroscience; (20); p. 1341–1347.

De-Mello N. et al. 2005. *Pilocarpine prevents age-related spatial learning impairments in rats*. Behavioural brain research; (158); p.263-268.

Diniz G, Foro C, Rego C. 2010. *Environmental impoverishment and aging alter object recognition, spatial learning, and dentate gyrus astrocytes*. Behavioural Neuroscience; (32); p. 509-519.

Francis D, Diorio J, Plotsky P, Meaney M.2002. *Environmental Enrichment Reverses the Effects of Maternal Separation on Stress Reactivity*.The Journal of Neuroscience; (18); p. 7840–7843.

Haiders S. et al.2012.*Role of Somatodendritic and Postsynaptic 5-HT1A Receptors on Learning and Memory Functions in Rats*.Neurochemical Research; (37); p. 2161-2166.

Harati H, Barbelivien A et al. 2012. *Lifelong environmental enrichment in rats: impact on emotional behavior, spatial memory vividness, and cholinergic neurons over the lifespan*. American Aging Association.

Hutchinson K, McLaughlin K, Wright R. et al. 2012. *Environmental enrichment protects against the effects of chronic stress on cognitive and morphological measures of hippocampal integrity*. Neurobiology of Learning and Memory; (97); p. 250-260.

Kline A. Yu J et al. 2002.*Protective effects of the 5-HT1A receptor agonist 8-hydroxy-2-(di-n-propylamino) tetralin against traumatic brain injury-induced cognitive deficits and neuropathology in adult male rats*.Neuroscience Letters; (333); p. 179-182.

Kline A, Wagner A. Westergom B et al. 2007.*Acute treatment with the 5-HT1A receptor agonist 8-OH-DPAT and chronic environmental enrichment confer neurobehavioral benefit after experimental brain trauma*. Behavioural brain Research; (177); p. 186-194.

Krech D, Rosenzweig M, Bennet E. 1996. *Environmental impoverishment, social isolation and changes in brain chemistry and anatomy*.Physiology & Behavior; (1); p. 99-104.

LeGates T., Altimus C, Wang Hiu et al. 2012.*Aberrant light directly impairs mood and learning through melanopsin-expressing neurons*.Nature; 491; p. 594-598.

Neddens J, Bagorda F et al. *Epigenetic factors differentially influence postnatal maturation of serotonin (5-HT) innervation in cerebral cortex of gerbils: interaction of rearing conditions and early methamphetamine challenge*. Developmental Brain Research; (146); p. 119–130.

Peña Y. 2007. *El enriquecimiento ambiental en ratas: efectos diferenciales en función del sexo*.

Tesis doctoral de la UAB. Disponible para su consulta en:
"www.tdx.cat/bitstream/10803/3794/1/yp01de1.pdf"

Rasmuson S, Olsson T, Henriksson B et al. 1997. *Environmental enrichment selectively increases 5-HT1A receptor mRNA expression and binding in the rat hippocampus*. *Molecular Brain Research*; (53); p. 285-290.

Renoir T. et al. 2011. *Treatment of depressive-like behaviour in Huntington's disease mice by chronic sertraline and exercise*. *British journal of Pharmacology*; (165); p. 1375-1389.

Segovia G, del Arco A, Mora F. 2009. *Environmental enrichment, prefrontal cortex, stress, and aging of the brain*. *J Neural Transm.*; (116); p. 1007–1016.

Tejada S, Rial RV, Coenen AM, Gamundi A, Esteban S. 2007. *Effects of pilocarpine on the cortical and hippocampal theta rhythm in different vigilance states in rats*. *European Journal of Neuroscience*; 26 (1); p. 199-206.

Tejada S, González JJ, Rial RV, Coenen AM, Gamundí A, Esteban S. *Electroencephalogram functional connectivity between rat hippocampus and cortex after pilocarpine treatment*. *Neuroscience* 165, 621–631 (2010)

Vicens P, Redolat R, Carrasco C. 2003. *Aprendizaje espacial y laberinto de agua: metodología y aplicaciones*. *Psicothema*; (15); p. 539-544.

Volkers KM, Scherder EJ. 2011. *Impoverished environment, cognition, aging and dementia*. *Rev Neurosci.*; 22(3); p.259-66.

Winocur G. 1998. *Environmental Influences on Cognitive Decline in Aged Rats*. *Neurobiology of Aging*. (19); p. 589 –597.