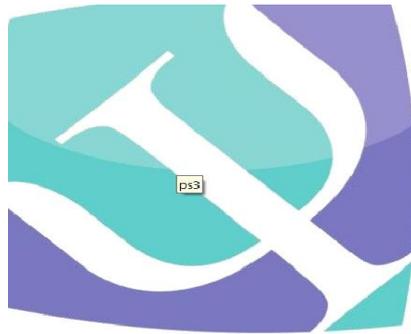


UNIVERSIDAD DE ALMERIA



FACULTAD DE PSICOLOGÍA



Trabajo Fin de Grado en Psicología

Convocatoria Julio

**Efectos funcionales de la EE en ratas con ambliopía inducida mediante la
evaluación de la función visual en una tarea de comportamiento innato**

**Functional effects of EE in rats with amblyopia induced through the evaluation of
visual function in a task of innate behavior**

Autor: Erika Andujar Román

Tutor: Fernando Sánchez -Santed

INDICE

I. RESUMEN	3
II. ABSTRACT	3
III. INTRODUCCION	4
AMBLIOPÍA: ¿QUÉ ES?	4
CAUSAS DE LA AMBLIOPÍA	5
LA SUPRESIÓN Y LA PRIVACIÓN MONOCULAR COMO MODELO DE AMBLIOPÍA	5
TRATAMIENTOS TRADICIONALES UTILIZADOS EN AMBLIOPÍA	7
ENRIQUECIMIENTO O ESTIMULACIÓN AMBIENTAL (EE).....	8
IV. MATERIALES Y MÉTODOS	10
ANIMALES	10
AMBLIOPÍA EXPERIMENTAL	11
ESTIMULACIÓN AMBIENTAL	11
PROCEDIMIENTOS.....	12
DISPOSITIVO	12
TAREA SLAG	12
V. ESTADÍSTICOS	14
VI. RESULTADOS	14
VII. DISCUSION	16
VIII. CONCLUSION	18
IX. BIBLIOGRAFÍA	18
X. ANEXO	23

I. RESUMEN

En la presente investigación se propone analizar los efectos de la estimulación ambiental, técnica no invasiva, en un modelo de ambliopía experimental. Para ello, se utilizaron animales de experimentación (ratas Long-Evans), a los que se les instauró la condición ambliope (ojo vago), por medio la privación monocular. La inducción de la ambliopía consistió en la sutura palpebral de uno de los ojos. Dicha oclusión se llevó a cabo en ratas jóvenes (día 12 postnatal) y se mantuvo durante un periodo de dos meses. Esto es así, porque se estima que dicha etapa coincide con el periodo crítico en el desarrollo del sistema visual de la rata. De esta manera, la privación monocular es empleada como un modelo experimental para la ambliopía.

La estimulación ambiental consistió en la exposición a los animales a dos luces Led parpadeantes. La exposición a la EE ha mostrado entre otras cosas, ser capaz de reabrir periodo crítico para la plasticidad en V1 en ratas adultas ambliopes. Para evaluar los efectos de la EE sobre las ratas se sometió a éstas a la realización de una tarea de comportamiento innato como es la tarea SLAG.

Los resultados obtenidos indican que la EE produce una mejora significativa en la realización de la tarea SLAG, al comparar ratas ambliopes con ratas no ambliopes en condición monocular.

Palabras clave: ambliopía, supresión, estimulación ambiental, tarea SLAG

II. ABSTRACT

In the present investigation proposes to analyze the effects of the environmental stimulation, non-invasive technique, in a model of experimental amblyopia. To do this, it was used experimental animals (Long-Evans rats), which were introduced the condition ambliope (eye lazy), through the monocular deprivation. The induction of the amblyopia consisted in the palpebral suture of one of the eyes. The occlusion was carried out in young rats (day 12 post-natal) and was maintained for a period of two months. This is so because it is estimated that this stage coincides with the critical

period in the development of the visual system of the rat. In this way, the monocular deprivation is used as an experimental model for amblyopia.

The environmental stimulation consisted in the exposure to animals to two led lights flashing. The exposure to the EE has shown among other things, be able to reopen critical period for plasticity in V1 in adult rats ambliopes. To assess the effects of the EE on rats were subjected them to the fulfilment of a task of innate behavior as is the task slag.

The results obtained indicate that the EE produces a significant improvement in the implementation of the task slag, when comparing rats ambliopes with rats not ambliopes in monocular condition

Key words: amblyopia, suppression, environmental stimulation, SLAG Task

III. INTRODUCCION

Ambliopía: ¿qué es?

La ambliopía también conocida como ojo vago, es un trastorno del neurodesarrollo del sistema visual resultante de la insuficiente experiencia visual durante los primeros años de vida (primeros 7-10 años). Tiene lugar cuando la experiencia visual es interrumpida durante el periodo crítico de la infancia. Ocurre que el cerebro beneficia el desarrollo de la visión de un ojo en pos del otro, produciendo déficits en el procesamiento cortical. Se trata de una patología con una prevalencia de 2-4% en la población general [1 2,3]. El modo más frecuente del trastorno es monocular o unilateral, obteniendo como resultado un deterioro en la agudeza visual del ojo afectado, así como un decrecimiento de la estereopsis de bajo contraste y de la sensibilidad al movimiento.

Existe un gran acuerdo al considerar que la ambliopía es causada principalmente por disfunciones neuronales que ocurren en la corteza visual primaria (V1) [4,5]. Se ha observado que en el núcleo geniculado lateral puede aparecer cierto déficit o atrofia [6]. Además diferentes estudios de neuroimagen [7] y neurofisiológicos [8,9] han demostrado que la visión del ojo ambliope genera menos activación cortical en la corteza visual que el ojo contralateral. Esto ha sido relacionado con la inhibición

neuronal producida por los circuitos neuronales GABAérgicos [10,11]. Por tanto, diversos estudios mostraron como el equilibrio excitatorio e inhibitorio en V1 tenía un papel importante en el periodo crítico de la plasticidad neuronal.

Causas de la ambliopía

Muchas han sido las investigaciones que han tratado de dar una explicación a la aparición de la ambliopía, las principales causas son:

CAUSA	DEFINICION
Estrabismo	Consiste en una desalineación de ambos ojos, se trata de una alteración en la que se pierde el paralelismo de los ojos. Como consecuencia ocurre que le cerebro recibe imágenes distintas de cada ojo, no produciéndose la fusión de las imágenes. Esto da lugar a la visión doble. Para evitar esto, el cerebro suprime la imagen del ojo desviado.
Anisometropía	Ocurre cuando existen diferencias importantes de graduación de uno y otro ojo, por lo tanto, una refracción desigual en los ojos da lugar a esta patología.
Privación	Tiene lugar cuando se produce una oclusión física durante un tiempo. Puede ser las cataratas o algún otro modo que dificulte o impida la llegada del input visual.
Nistagmos	Tiene lugar, cuando el individuo muestra movimientos involuntarios y constantes de vaivén en ambos ojos.
Ametropía	Se trata de problemas de graduación elevados, sobre todo combinaciones de astigmatismo e hipermetropía.
Micro-orgánica	Producida por lesiones microscópicas en la mácula de la retina.

La supresión y la privación monocular como modelo de ambliopía

La supresión es entendida como la influencia inhibitoria del ojo sano sobre el ojo ambliope cuando los dos ojos están viendo. Está asociada con una pobre estereopsis y agudeza visual en humanos con ambliopía, lo que compromete a la visión monocular. Por lo tanto, se considera que la ambliopía surge por una discordancia entre las

imágenes que van a cada ojo; la información de un ojo se ve favorecida, mientras que la información desde el otro ojo es suprimida [12] Muchas investigaciones han estudiado las interacciones binoculares dentro de V1 detectando un incremento de la supresión binocular [13] Este incremento de la supresión puede ser responsable de la reducción detectada en el impulso de las neuronas binoculares en V1 [14] además la supresión binocular puede ocurrir si la fuerza de la señal al ojo contralateral es reducida para compensar la supresión del ojo ambliope [15]

Una forma de inducir la supresión es a través de la oclusión monocular durante un periodo de tiempo corto. Este breve periodo puede alterar el equilibrio de las interacciones binoculares, ocasionando cambios anatómicos en la corteza visual. Hubel y Wiesel establecieron el concepto de competición cortical. Todas las células corticales están conectadas con los dos ojos. Si ambos ojos están funcionando igual entonces el número de células conectadas con cada ojo es el mismo. Demostraron que al ocluir un ojo (privación visual) [16,17] en la capa IV, las franjas de dominancia correspondiente al ojo ocluido se contraen y las correspondientes al ojo no ocluido se expanden. Las conexiones de la capa IV y de la capa II Y III se alteran y las células binoculares de las capa II y III se vuelven más sensibles a estímulos provenientes del ojo que permaneció abierto. Estos cambios de dominancia ocular se pueden revertir reabriendo el ojo ocluido, si es en periodo crítico. Si el periodo de exposición a la oclusión ocular es breve, las consecuencias serán reversibles, en cambio, si la exposición se prolonga durante la etapa adulta tendrá efectos más perdurables y problemáticos sobre la función cortical visual.

Wiesel y Hubel(1963) observaron además, que la privación monocular no solamente origina desviación de la dominancia ocular, sino que causa cambios anatómicos en el cuerpo geniculado lateral. Al cabo de tres semanas las capas del cuerpo geniculado del ojo privado están más delgadas y los cuerpos celulares estaban encogidos. Sugirieron que la privación monocular retardaba el crecimiento celular del cuerpo geniculado lateral que recibían proyecciones del ojo privado, lo que causaba algún tipo de atrofia. Además, en un estudio con ratones sometidos a privación visual monocular mostró, que también da lugar a una reducción en las dendritas de neuronas ganglionares en el ojo privado, así como una aumento de las dendritas en el ojo no privado [18].

Tratamientos tradicionales utilizados en ambliopía

Los tratamientos tradicionales más utilizados para el tratamiento de la ambliopía, son aquellos basados en ocluir el ojo sano, para forzar así el uso del ojo ambliope. Así pues, al privar el ojo contralateral, la supresión del ojo ambliope es reducida, y la experiencia visual, favorecerá la recuperación de la agudeza visual. La privación del ojo sano mediante un parche, se ha utilizado para tratar la ambliopía, a pesar de que presenta ciertas limitaciones. El cumplimiento del tratamiento es pobre, [19] debido a las dificultades sociales y psicológicas que supone para el niño el uso del parche, combinado con el deterioro de la experiencia visual del niño cuando haga uso de dicho parche [20,21] . Otra limitación en el uso del parche como tratamiento, es que la visión binocular sigue siendo pobre independientemente de la mejora de la agudeza visual en el ojo ambliope [22]. Esto puede ser debido a las condiciones de visualización durante la aplicación del parche. Cuando se tiene el parche la visión es monocular, mientras que una vez que se le quita el parche ésta pasa a ser binocular. Además existen datos de que el ocluir el ojo durante mucho tiempo puede inducir a pérdida de agudeza del ojo bueno así como, volver a los dos ojos ambliopes [23]. Como tratamiento farmacológico se utiliza la atropina, una droga en forma de gotas que empaña la visión del ojo no ambliope, para así estimular el ojo ambliope y ayudar así, a que la parte encargada del desarrollo de la visión se desarrolle de forma completa. . El uso de lentes que corrijan los defectos de refracción también se ha utilizado como tratamiento. Otros tratamientos han sido el uso de juegos de ordenador, aprendizaje perceptual, etc.

Durante el desarrollo, la plasticidad del cerebro es alta y las neuronas pueden adaptarse rápidamente en respuesta a nuevos estímulos ambientales, pero al llegar a la edad adulta los circuitos neuronales se vuelven menos plásticos. La caída en los niveles de plasticidad impide, en el cerebro maduro, la posibilidad de recuperación de trastornos del desarrollo. Por ello, se consideró que la ambliopía únicamente podía ser tratada en la infancia, durante el periodo crítico, más allá de ese periodo no se consideraba que pudiese haber una recuperación de la función visual en la ambliopía. Nuevas investigaciones aparecieron poniendo en cuestión esta incapacidad de recuperación de la función visual, a través de la mejora de la plasticidad en el sistema visual adulto. A partir de estas investigaciones comenzaron a aparecer nuevos procedimientos no invasivos con el propósito de alcanzar una recuperación en la función visual en adultos.

Uno de ellos es la estimulación transcraneal de corriente eléctrica (tDCS) se trata una técnica de estimulación cerebral no invasiva que ha incrementado su uso en investigación básica y clínica. Existen estudios que muestran que la tDCS afecta al procesamiento visual, además actúa en la modulación de la excitabilidad cortical [24,25,26,27,28] La tDCS modifica el potencial de membrana en reposo, e induce a efectos secundarios similar a la potenciación/ depresión a largo plazo [29] considerados ser los mecanismos celulares encargados de la memoria y el aprendizaje. La tDCS consiste en la aplicación de una corriente directa (DC) en el cuero cabelludo utilizando electrodos que se encuentran encerradas en bolsas perforadas de esponjas impregnadas con una solución salina o un electrodo de goma con gel conductor [30,31]Dependiendo del flujo de corriente que se aplique, puede tener lugar un aumento o excitabilidad neuronal. Los mecanismos son dependientes del electrodo y puede ocurrir: 1) una despolarización de la membrana, utilizando el ánodo (aumento espontaneo y disparo de la excitabilidad de las neuronas corticales, 2) una hiperpolaridad de la membrana, utilizando el cátodo (disminución de la descarga neuronal y excitabilidad de la estimulación.) [24, 32,33].

En esta investigación nos centraremos en otra de las técnicas no invasivas como es la estimulación o enriquecimiento ambiental

Enriquecimiento o estimulación ambiental (EE)

El enriquecimiento ambiental (EE) es un concepto utilizado para referirse al paradigma consistente en la exposición a los animales de laboratorio a una estimulación física o social mayor de la que recibirían bajo condiciones de estancia estándar [34].Se distingue dos tipos de exposición al EE: enriquecimiento físico y enriquecimiento social. El enriquecimiento físico supone modificaciones estructurales, como un mayor espacio y la inclusión de características que permitan el ejercicio, jugar, explorar, es decir que de alguna manera los animales puedan tener cierto control sobre su ambiente [35] se utilizan túneles plásticos, columpios, objetos para roer, rampas, escaleras, pelotas y otros juguetes... por otro lado el enriquecimiento social se refiere el exponer a los animales a vivir en grupos, siempre que sea posible.

Estudios de roedores expuestos a estimulación ambiental, han mostrado una mejora de la plasticidad de la corteza visual [36,37,38,39] , para acelerar el desarrollo del sistema visual [40,41,38] y dar lugar a cambios en el cerebro, que van desde niveles moleculares

hasta funcionales: incrementa los niveles del factor neurotrófico derivado del cerebro [40,42,43] , serotonina [36] y la insulina como factor de crecimiento I [38] reduciendo GABA extracelular [36,38] y la inhibición en V1 [44]. Se ha mostrado cómo el ejercicio físico era suficiente para la recuperación de la ambliopía después de la oclusión ocular por un tiempo largo [37] además prolonga y restaura la plasticidad en la dominancia ocular [45].

La transmisión GABAérgica y glutamaérgica han sido relacionadas con la plasticidad del cerebro, y la exposición a enriquecimiento ambiental. Estudios han demostrado que había una mayor densidad de receptores AMPA en las ratas expuestas a condiciones de EE que aquellas que aquellas ratas controles que se encontraban en condiciones de aislamiento [46]. Además también se observó un aumento del receptor NMDA en el hipocampo de ratas expuestas a condiciones ambientales enriquecidas, comparadas con aquellas que estaban expuestas a condiciones de control estándar y condiciones de aislamiento [47]. Estudios han mostrado como la aplicación de un antagonista de NMDA y de AMPA eliminaba los efectos de EE [48]. Por tanto, se podría decir que la capacidad de la exposición a estimulación ambiental para alterar los niveles de neurotransmisores en el cerebro, podría explicar cómo EE influye en la plasticidad cerebral y mejorar así el aprendizaje. Además se han obtenido datos de cómo las monoaminas(que tienen un papel en la neurogénesis), los parámetros colinérgicos y el sistema opioide asociados con la plasticidad sináptica y el aprendizaje, se ven influenciados por la exposición a EE. Se ha observado que las ramificaciones detriticas y la densidad de las espinas son significativamente mayores en la corteza somatosensorial de ratas adultas expuestas a EE frente a las controles [49]. La exposición a EE da lugar a cambios anatómicos en la circunvolución dentada enriquecimiento y el ejercicio da lugar a cambios morfológicos. Cambios funcionales asociados con el enriquecimiento podría deberse a la mejora de la neurogénesis, aumentos en gliogenesis, sinaptogénesis y angiogénesis, según lo sugerido por W.Greenough y colegas [50, 51,52]. Los factores neurotróficos son proteínas conocidas por promover la supervivencia y funciones, especialmente relacionadas con la plasticidad sináptica. NGF, BDNF, y la neurotrofina-3 (NT-3) están muy presentes en el hipocampo y participan en la neuroplasticidad para el aprendizaje y la memoria [53].

Diversos estudios han mostrado que la exposición a EE es eficaz en la mejora de la plasticidad en la corteza visual primaria de las ratas adultas con ambliopía, promoviendo la recuperación de la agudeza visual y la dominancia ocular. Actúa reduciendo la inhibición Gabaérgica, esto se ha observado a través de la actuación sobre moduladores de la serotonina, noradrenalina y acetilcolina en los que se ha producido un cambio, ya que estos están implicados en la plasticidad neuronal. La recuperación de la plasticidad en ambliopes en ambientes enriquecidos se asocia con una reducción de la liberación de GABA en la corteza visual, y aumento de BDNF[40] Las ratas adultas ambliopes criadas bajo condiciones de enriquecimiento ambiental muestran una total recuperación de las funciones visuales [39] además EE reabre el periodo crítico para la plasticidad en V1 en respuesta a MD, incluso en ratas de edad avanzada[37,40] .La exposición a EE también resulta en una marcada reinstauración de las habilidades en la percepción de la profundidad de animales ambliopes adultos, como se observó en la tarea visual cliff [54].

En resumen, a través de los diversos estudios mencionados con anterioridad se han mostrado cómo la exposición a EE puede dar lugar a una recuperación visual en pacientes con ambliopía fuera del periodo crítico, a través de la mejora de la plasticidad neuronal.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

Animales

En este trabajo se utilizaron 12 ratas adultas de género masculino long Evans, las cuales habían nacido y se habían criado en el animalario de la universidad de Almería. Todas las ratas provenían de un linaje de los laboratorios Janvier en Francia. Tanto el animalario experimental como los habitáculos en los que se hallaban las ratas se encontraban a una temperatura de 22°C. Estaban expuestas a un ciclo de luz y oscuridad, en el que el periodo de luz se desarrollaba de 8 am a 20 pm. Todas las habitaciones disponían de ventilación continua e independiente, eran alimentadas sin ningún tipo de limitación de agua y comida ad libitum, y eran estabulados en grupos de 4 del mismo sexo. Además cada animal poseía una identificación en la cual aparecen los datos de su mantenimiento, como los tratamientos, las revisiones médicas, etc.

Durante una semana los animales se amansaron durante 15 min al día, quince días antes de la etapa experimental. Todos los procedimientos llevados a cabo han sido realizados de acuerdo al reglamento oficial (Real Decreto española 53/2013, de 1 de febrero, para lo cual se han establecido las normas básicas relativas a la protección de los animales de experimentación y fines científicos, la Directiva 2010/63/UE del Parlamento Europeo y el Consejo en relación con la protección de los animales utilizados para fines científicos) con la finalidad de asegurar el máximo confort posible.

Ambliopía experimental

La inducción de la ambliopía ha tenido lugar mediante oclusión monocular del párpado, en la edad en la que los animales han desarrollado sus párpados y las retinas han sido expuestas a la luz ambiente. De esta manera, 12 días tras el nacimiento, antes de la apertura de los ojos, se procedió a ocluir uno de sus párpados mediante sutura. Los animales fueron anestesiados con 0,03 ml de una solución compuesta por un 2% de Xilacina (Xilagesic) y 100mg/ml de ketamina (Imalgene). Una vez tuvo lugar la oclusión de los párpados con hilo de seda, se aplicó clara de huevo a modo de pegamento tisular. El grupo control no fue sometido a privación monocular pero sí fueron anestesiados. Una vez acabada la cirugía los animales fueron reunidos con sus madres hasta el destete, 21 día tras el nacimiento. A partir de este momento, las ratas se reunieron en grupo de 3 del mismo sexo. Pasados 2 meses y medio de edad se llevó a cabo la reapertura de los párpados. Se dejó un periodo de recuperación de un mes tras la cirugía antes de comenzar la exposición a la estimulación ambiental, y tras esto, se pasó a realizar la tarea SLAG de comportamiento

Estimulación Ambiental

La exposición a la estimulación ambiental consistía en situar a los animales dentro de sus cajas, a un metro de distancia de un dispositivo de luz parpadeante. Tenían lugar ocho sesiones cada 24 horas de 20 minutos cada sesión. La estimulación ambiental tenía lugar a oscuras mediante un dispositivo con dos luces led de 5 W cada una. Se trataba de una luz fría de 6000k con una intensidad de 350 lúmenes. Una vez finalizada la exposición al enriquecimiento ambiental, los animales eran devueltos al animalario.

Procedimientos

Para la realización de la tarea SLAG se usaron 12 ratas machos Long Evans (N=12), que se dividieron en dos grupos, un grupo control(N=6) y un grupo ambliope(N=6). Ambos grupos pasan por dos momentos, el momento pre-tratamiento, antes de la estimulación ambiental y el momento post-tratamiento después de la estimulación ambiental

Dispositivo

Para la evaluación mediante la tarea SLAG se creó un dispositivo de metacrilato con forma de trapecio con una varilla de acero de 2mm de diámetro. La estructura del dispositivo es de 30cm de altura y 36 cm de ancho, con la varilla de acero situado a 27 cm sobre la base del dispositivo. [55].

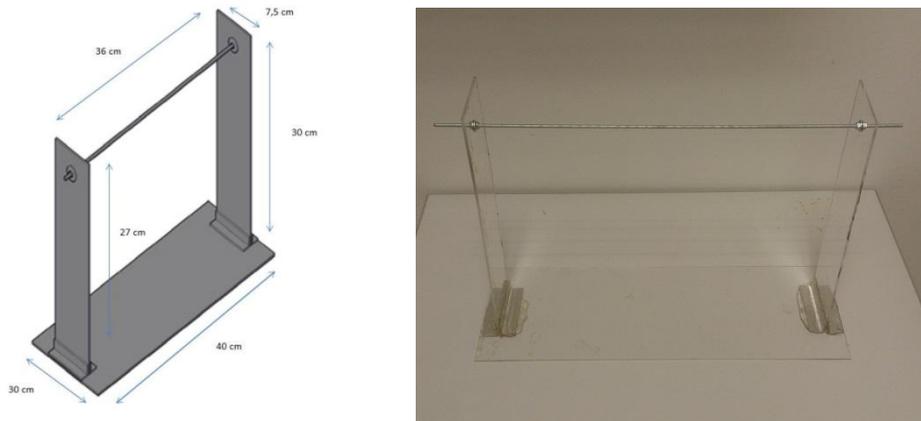


Fig. 1. Dispositivo utilizados en la tarea de SLAG. [55].

Tarea SLAG

Para llevar a cabo la tarea, el dispositivo fue colocado en el borde de una tabla completamente en color negro y con una altura de 70 cm sobre el suelo. Para conseguir una total oscuridad y evitar las señales visuales externas se colocaron cortinas oscuras, que iban desde el suelo al techo. Se iluminaba el dispositivo con una lámpara halógena de 20 W (12 v), colocada a 80 cm en el borde contrario de la mesa. Para evitar diferencias entre ensayos, el evaluador fue entrenado en desplazamiento y velocidad de movimiento. Además los ensayos se hicieron bajo criterio de doble ciego. Los animales fueron enumerados de modo que el experimentador desconocía el grupo experimental y la fase de entrenamiento. El procedimiento consistía en mantener al animal alrededor de 30cm por encima de la varilla del trapecio, que se iluminó por una lámpara en el lado

opuesto de la tabla. El animal, se suspendía por la cola con la región ventral de su cuerpo orientada al experimentador, que era descendiente según el ángulo mostrado por las flechas (Fig. 2 y 3), de tal manera que la varilla de escalera de acero permanecía siempre dentro de su campo visual durante el descenso.

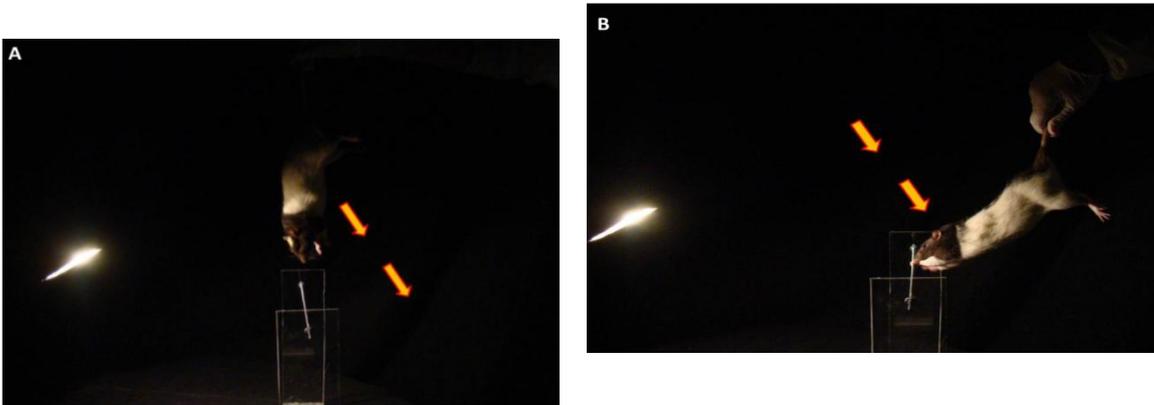


Fig. 2: Secuencia de imágenes en las que se puede apreciar el movimiento que sigue el animal. Esta respuesta se considera como la SLAG +.[55].

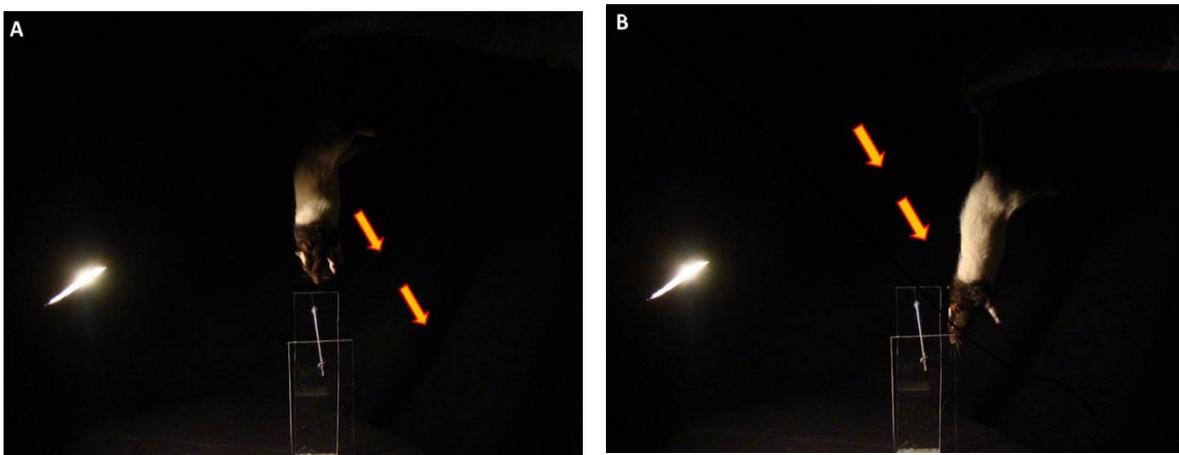


Fig. 3: Secuencia de imágenes en las que se puede apreciar el movimiento que sigue el animal. Esta respuesta se considera como SLAG – [55]

Si observamos la figura se entiende que si el animal al pasar muy cerca de la varilla de la escalera extiende su pata delantera para agarrarse a esta, se considera SLAG+, por el contrario si no realiza este movimiento como consecuencia de que su vista no le permite ver la barra de la escalera ,se denomina SLAG-. Tras la prueba, de forma independiente al rendimiento que obtuvieron la rata se colocó por un momento en

la varilla de la escalera. Finalmente la varilla fue limpiada con 70% de etanol y agua cuando cada ensayo fue terminado.

Cada sesión constaba de 10 ensayos. Tras esto, con los datos que se obtuvieron se calculo un índice de discriminación

$$ID = (E \text{ positivo} - \text{negativo } e) / E \text{ TOTAL}$$

(donde E son positivas y negativas, respectivamente, el número de pruebas positivas y el número de las pruebas negativas, y Total E es el número total de ensayo).

Cada animal realiza un total de 4 sesiones (10 ensayos por sesión) en cada fase. Es decir, 2 veces en el momento del pretratamiento (monocular y binocular) y 2 veces en el momento de postratamiento (monocular y binocular).

V. ESTADÍSTICOS

Para la elaboración de los estadísticos se utilizó el programa SPSS 20.0. La variable dependiente estudiada fue el índice de discriminación, ID. Como variables independientes se realizó en análisis de los efectos de un factor entre grupos: la variable GRUPO dividida en dos niveles (CONTROL, y el AMBLIOPE tratado), y un factor intrasujeto, como fue la variable TRATAMIENTO con dos niveles (PRE y POST). Se realizaron análisis no paramétricos con el estadístico U de Mann-Whitney y para ver los cambios producidos en cada grupo la prueba de los rangos con signo de Wilcoxon. El análisis estadístico se llevo a cabo tanto para la evaluación Monocular como para la evaluación Binocular.

VI. RESULTADOS

Los resultados obtenidos a partir del análisis estadístico son los siguientes:

- En el grupo de pre- tratamiento en condiciones binoculares: $U= 15$, $p= 0,617$

- En el grupo de pre- tratamiento en condiciones monoculares: $U= 3,5$, $p< 0,017$

Para observar el efecto del tratamiento, los cambios en cada grupo se realizar la prueba de rangos con signo de Wilcoxon:

- Entre el post- tratamiento y el pre-tratamiento en binoculares: $Z= -1,890$, $p=0,059$ (control)
- Entre el post-tratamiento y el pre-tratamiento en monoculares: $Z: -0,378$, $p=0,705$ (control)
- Entre el post-tratamiento y el pre-tratamiento en binoculares: $Z: -0,412$, $p= 0,680$ (ambliope)
- Entre post-tratamiento y el pre-tratamiento en monoculares: $Z: -2,121$, $P= 0,034$ (ambliope)

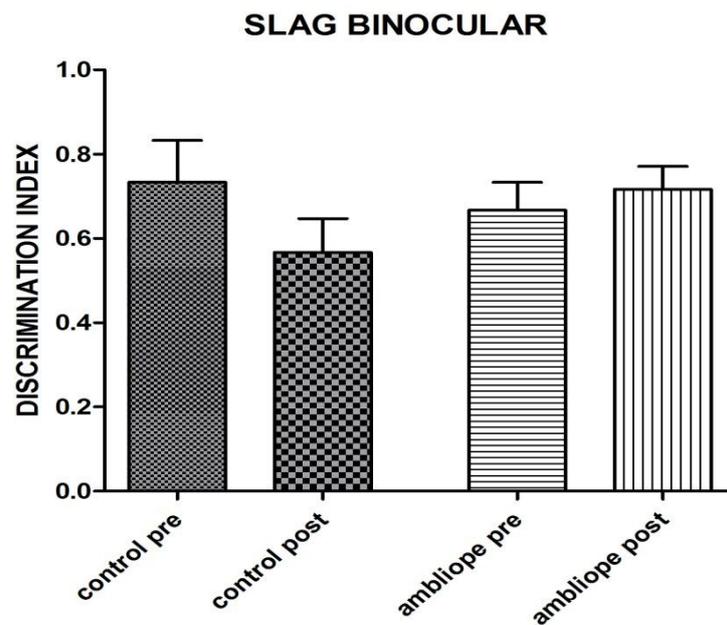


Fig. 4: En esta gráfica se puede observar como no hay diferencias significativas cuando realizamos la evaluación binocular entre los distintos grupos tanto en el momento pre-tratamiento como en el momento post-tratamiento.

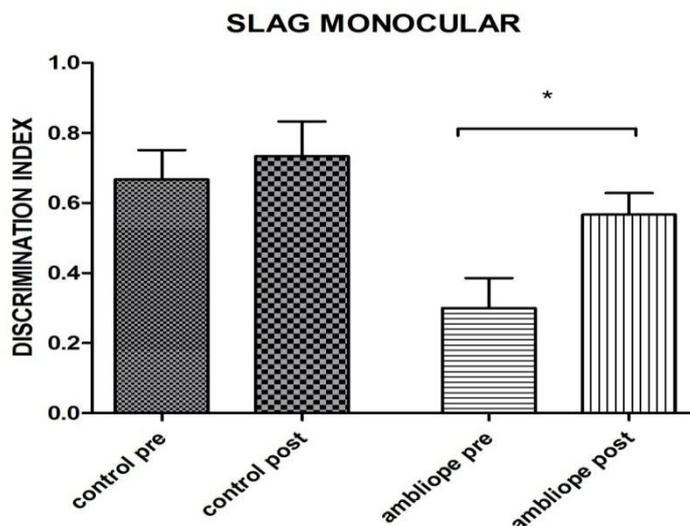


Fig. 5: En esta grafica se puede observar cómo en la evaluación monocular entre los distintos grupos, si hay un importante déficit visual a la hora de ejecutar la tarea por parte de los grupos ambliopes con respecto al grupo control. También se observa cómo se produce un efecto significativo de recuperación visual a la hora de ejecutar la tarea SLAG por parte de grupo ambliope tratado con EE.

VII. DISCUSION

En este trabajo se plantea como objetivo la evaluación de los posibles efectos terapéuticos que puede tener la EE en la recuperación de la función visual en modelos animales de ambliopía experimental.

Para ello se ha decidido el uso de la tarea SLAG como alternativa a una serie de pruebas experimentales llevadas a cabo para identificar la función visual de los roedores [56]. Se trata de una prueba de comportamiento innato (el que al suspender la rata por su cola y colocarse frente a un objeto tienda a agarrarse a dicho objeto) que evalúa el procesamiento visual del animal.

Nuestros datos muestran que en un primer momento, en la evaluación binocular no se encuentran diferencias significativas ni en el momento del pre-tratamiento, ni en el momento del post-tratamiento entre los diferentes grupos.

En cambio, en la evaluación monocular si se observan diferencias significativas entre los resultados obtenidos tanto en el momento de pre- tratamiento, lo que demostraría

que los animales son ambliopes, ya que desde un principio realizan peor la tarea SLAG respecto al grupo control. Como en el momento post-tratamiento del grupo "AMBLIOPE Trat". Lo que nos indica que tras el tratamiento con EE, si se produce una mejoría de la agudeza visual monocular.

Los resultados obtenidos concuerdan con la literatura en dos aspectos. En primer lugar, se muestra la eficacia de utilizar un modelo experimental de ambliopía, consistente en la oclusión ocular mediante la suturación del párpado. En el pre-tratamiento se observa dificultad para realizar la tarea entre el grupo control y el grupo ambliope, este último la realiza peor. En el momento de ejecutar la tarea tanto el grupo control como el ambliope se encuentran en condición monocular. Desde el pre tratamiento se muestran las diferencias significativas que hay entre controles y ambliopes, mostrando el efecto de la condición ambliope.

En segundo lugar, los resultados obtenidos en la investigación ponen de manifiesto la efectividad de un tratamiento no invasivo como es la EE, para la mejora de la función visual en ratas ambliopes. La exposición a EE durante 8 sesiones de 20 min, ya producen efectos en el procesamiento visual. Estos datos podrían tenerse en cuenta para una futura investigación en la que se estudiase los efectos prolongados de esta. Se sabe por investigaciones que la EE produce el cerebro. Se ha estudiado la capacidad de la EE para reducir la inhibición producida por los sistemas GABAérgico, asociados al fenómeno de la supresión [36,38]. Este tratamiento no podría utilizarse no solo para el estudio de la función visual, sino para otras investigaciones. La EE ha mostrado ser capaz de dar lugar a un aumento de los factores de crecimiento [40, 42,43], estos están implicados en la mejora de la memoria y el aprendizaje. Por ejemplo, estudios con ratas jóvenes y adultas han mostrado como el enriquecimiento ambiental mejora el aprendizaje y la memoria. Se demostró cómo ratones expuestos a EE hacían mejor la tarea de watermaze que los controles no sometidos a dichas condiciones [57, 58,59].

De esta manera la EE ambiental muestra ser una técnica que puede servir de apoyo a futuras investigaciones.

Otro dato que deberíamos de tener en cuenta es el que no se hayan observado diferencias significativas entre el grupo control y el grupo ambliope en la condición binocular. Esto puede ser debido a una característica propia de la visión binocular

conocida como el fenómeno de la sumacion. Esto hace referencia a que la agudeza visual de los dos ojos de forma conjunta es superior a éstos de forma individual [60]

VIII. CONCLUSION

El tratamiento basando en la exposición a la EE puede ser útil para la mejora de la agudeza visual, como se ha mostrado al realizar una tarea de comportamiento innato SLAG. La EE ha mostrado ser capaz de producir cambios en el procesamiento visual tras una exposición breve. Por tanto, sería bueno para futuras investigaciones el uso de esta técnica durante más tiempo, y poder utilizarla en diferentes dominios, no solo para evaluar la función visual.

IX. BIBLIOGRAFÍA

1. Donnelly,U., Stewart,N.M., and Hollinger,M.(2005).Prevalence and outcomes of child hood visual disorders. *Ophthalmic Epidemiol.* 12, 243–250
2. Robaei,D., Rose,K.A., Ojaimi,E., Kifley,A., Martin,F.J., and Mitchell, P.(2006).Causes and associations of amblyopia in a population based sample of 6-year-old Australian children. *Arch.Ophthalmol.* 124, 878–884.
3. Williams,C., Northstone,K., Howard,M., Harvey,I., Harrad,R.A., and Sparrow,J. M. (2008).Prevalence and risk factors for common vision problems in children :data from the ALSPAC study. *Br.J.Ophthalmol.* 92, 959–964.
4. Hess,R.F.(2001).Amblyopia:siteunseen. *Clin. Exp.Optom.* 84, 321–336.
5. Barrett, B.T., Bradley,A., and McGraw,P.V.(2004).Understanding the neural basis of amblyopia. *Neuroscientist* 10, 106–117.
6. Wiesel,T.N., and Hubel,D.H.(1963).Single cell responses in striate cortex of kittens deprived of vision in one eye. *J. Neurophysiol.* 26, 1003–1017.
7. Moschos, M.M., Margetis,I., Tsapakis, S., Panagakis, G., Chatzistephanou,I.K., and Iliakis, E.(2010) Multifocal visual evoked potentials in amblyopia due to anisometropia. *Clin Ophthalmol.* 4,849-853

8. Hess, R.F., Li, X., Lu, G., Thompson, B., and Hansen BC.(2010) The contrast dependence of the cortical fMRI deficit in amblyopia: a selective loss at higher contrasts. *Hum Brain Mapp.* 31,1233-1248.
9. Barnes, G.R., Hess, R.F., Dumoulin, S.O., Achtman, R.L., and Pike, G.B.(2001). The cortical deficit in humans with strabismic amblyopia. *J Physiol.* 533(pt 1),281-297.
10. Sengpiel, F., Jirrmann, K.U., Vorobyov, V., and Eysel UT.(2006). Strabismic suppression is mediated by inhibitory interactions in the primary visual cortex. *Cereb Cortex.*16,1750-1758.
11. Mower, G.D., Christen, W.G., Burchfiel, J.L., and Duffy, F.H.(1984) Microiontophoretic bicuculline restores binocular responses to visual cortical neurons in strabismic cats. *Brain Res.*309,168-172
12. Harrad,R.(1996).Psychophysics of suppression. *Eye(Lond.)* 10 (Pt2),270–273.
Joly,O and Frankí,E. (2014). Neuroimaging of amblyopia and binocular vision :a review. *Frontiers in Integrative Neuroscience.*8, 1-10.
13. Zhang,B.,Bi,H.,Sakai,E.,Maruko,I.,Zheng,J.,Smith,E.L.,etal.(2005).Rapid plasticity of binocular connections in developing monkey visua l cortex(V1). *Proc. Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 102, 9026–9031
14. Duffy,F.H.,Burchfiel,J.L.,andConway,J.L.(1976).Bicuculline reversal of deprivation amblyopia in the cat. *Nature.* 260, 256–257.
15. Baker,D.H.,Meese,T.S.,Mansouri,B.,and Hess,R.F.(2007).Binocular summation of contrastre mains intact in strabismic amblyopia. *Invest.Ophthalmol.Vis.Sci.* 48, 5332–5338.
16. Wiesel,T.N., and Hubel,D.H.(1963).Single cell responses in striate cortex of kittens deprived of vision in one eye. *J. Neurophysiol.* 26, 1003–1017.
17. Hubel, D.H and Wiesel, T.N.(1970) The period of susceptibility to the physiological effects of unilateral eye closure in kittens. *J Physiol.*206, 419-36.
18. Mwachaja,P., Saidi,H.,Odula,P and Mandela, P. (2014). Effects of Monocular Deprivation on the Dendritic Features of Retinal Ganglion Cells. *Int. J. Morphol.*4, 1144-1151
19. Searle, A., Norman, P., Harrad, R., and Vedhara, K. (2002). Psychosocial and clinical determinants of compliance with occlusion therapy for amblyopic children. *Eye.* 16, 150–155.

20. Holmes, J. M., Beck, R. W., Kraker, R. T., Cole, S. R., Repka, M. X., Birch, E. E., et al. (2003). Impact of patching and atropine treatment on the child and family in the amblyopia treatment study. *Archives of Ophthalmology*, 121(11), 1625–1632.
21. Webber, A. L., Wood, J. M., Gole, G. A., and Brown, B. (2008). Effect of amblyopia on self-esteem in children. *Optometry and Vision Science*, 85(11), 1074–1081.
22. Birch, E. E. (2012). Amblyopia and binocular vision. *Progress in Retinal Eye Research*. 33, 67–84
23. GarciaAguado,J.,Sánchez-Ventura,J.G.,MartinezRubio,A.,Mengual Gil,J.M.,Merino Morina,M., Pallás Alonso,C.R.,Sánchez Ruiz-Cabello,F.J., Colmer Revuelta, J.,Cortés Rico,O., Esperanza Olcina,M.J y Soriano Faura,F.J (2015). Grupo PrevInfad/PAPPS infancia y adolescencia. Cribado de alteraciones visuales (parte2). *Rev Pediatr Aten Primaria* 17,57-67
24. Nitsche,M.A., and Paulus,W.(2000). Excitability changes induced in the human motor cortex by weak transcranial direct current stimulation. *J. Physiol.(Lond.)* 527, 633–639
25. Fregni,F.,Boggio,P.S.,Nitsche,M.,Bermppohl,F.,Antal,A.,Feredoes,E.,etal.(2005).Anodal transcranial direct current stimulation of prefrontal cortex enhances working memory. *Exp.BrainRes.* 166, 23–30.
26. Dieckhöfer,A.,Waberski,T.D.,Nitsche,M.,Paulus,W.,Buchner,H.,and Gobbelé,R.(2006).Transcranial directcurrent stimulation applied over the somatosensory cortex :differential effect on low and high frequency SEPs. *Clin. Neurophysiol.* 117, 2221–2227.
27. Nitsche,M.A.,Doemkes,S.,Karaköse,T.,Antal,A.,Liebetanz,D.,Lang,N.,etal.(2007).Shaping the effects of transcranial direct current stimulation of the human motor cortex. *J. Neurophysiol.* 97, 3109–3117
28. Wagner,T.,Valero-Cabre,A.,and Pascual-Leone,A.(2007b).Non- invasive human brain stimulation. *Annu.Rev.Biomed.Eng.* 9, 527.
29. Paulus,W.(2004).Outlasting excitability shifts induced by direct current stimulation of the human brain. *Suppl.Clin.Neurophysiol.* 57, 708–714.
30. Vanneste,S.,Plazier,M.,Ost,J.,vanderLoo,E.,Heyning,P.V.,and Ridder,D.(2010).Bilateral dorsolateral prefrontal cortex modulation for tinnitus by transcranial direct current stimulation :a preliminary clinical study. *Exp.BrainRes.* 202, 779–785.

31. DaSilva,A.F.,Volz,M.S.,Bikson,M., and Fregni,F.(2011).Electrode positioning and montage intracranial direct current stimulation. *JOVE* 51. 1–11.
32. Nitsche,M.A.,and Paulus,W. (2001). Sustained excitability elevations induced by transcranial DC motor cortex stimulation in humans. *Neurology*. 57, 1899–1901.
33. Nitsche,M.A.,Nitsche,M.S.,Klein,C.C.,Tergau,F.,Rothwell,J.C.,and Paulus,W.(2003a).Level of action of cathodal DC polarisation induced inhibition of the human motor cortex. *Clin. Neurophysiol.* 114, 600–604.
34. Rosenzweig ,M.R and Bennett ,EL.(1996). Psychobiology of plasticity: effects of training and experience on brain and behavior. *Behav Brain Res.*78,57–65.
35. Stewart, K and Bayne, K.(2004). Environmental enrichment for laboratory animals. In: Reuter JD, editor. *Laboratory animal medicine and management*. New York: International veterinary information service.
36. Baroncelli, L.,Sale,A.,Viegi,A.,MayaVetencourt,J.F.,DePasquale,R.,Baldini, S., et al.(2010).Experience dependent reactivation of ocular dominance plasticity in the adult visual cortex. *Exp. Neurol.* 226, 100–109
37. Baroncelli, L., Bonaccorsi, J., Milanese, M., Bonifacino, T., Giribaldi, F., Manno, I., Cenni, M.C., Berardi, N., Bonanno, G., Maffei, L and Sale, A.(2012). Enriched experience and recovery from amblyopia in adult rats: impact of motor, social and sensory components. *Neuropharmacology*. 62, 2388-2397.
38. Sale, A.,MayaVetencourt,J.F.,Medini,P.,Cenni,M.C.,Baroncelli,L.,De Pasquale, R.,et al.(2007).Environmental enrichment in adulthood promotes amblyopia recovery througha reduction of intracortical inhibition. *Nat. Neurosci.* 10, 679–681
39. Scali,M.,Baroncelli,L.,Cenni,M.M.,Sale,A.,andMaffei,L.(2012).A rich environmental experience reactivates visual cortex plasticity in aged rats. *Exp. Gerontol.* 47, 337–341
40. Cancedda, L., Putignano, E., Sale, A., Viegi, A., Berardi, N and Maffei, L.(2004). Acceleration of visual system development by environmental enrichment. *J. Neurosci.* 24, 4840-4848.
41. Landi, S., Sale, A., Berardi, N., Viegi, A., Maffei, L. and Cenni, M.C.(2007b). Retinal functional development is sensitive to environmental enrichment: a role for BDNF. *FASEB J.* 21, 130-139.
42. Falkenberg, T., Mohammed, A.K., Henriksson, B., Persson, H., Winblad, B and Lindfors, N.(1992). Increased expression of brain-derived neurotrophic factor mRNA in rat hippocampus is associated with improved spatial memory and enriched environment. *Neurosci. Lett.* 138, 153-156.
43. Ickes, B.R., Pham, T.M., Sanders, L.A., Albeck, D.S., Mohammed, A.H and Granholm AC.(2000) Long-term environmental enrichment leads to regional

- increases in neurotrophin levels in rat brain. *Exp Neurol.* 164,45–52 Greifzu, F., Pielecka-Fortuna, J., Kalogeraki, E., Krempler, K., Favaro, P.D.
44. Greifzu, F., Pielecka-Fortuna, J., Kalogeraki, E., Krempler, K., Favaro, P.D., Schlüter, O. Ma and Löwel, S.(2014). Environmental enrichment extends ocular dominance plasticity into adulthood and protects from stroke-induced impairments of plasticity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 111, 1150-1155.
 45. Kalogeraki, E., Greifzu, F., Haack, F and Löwel, S.(2014). Voluntary physical exercise promotes ocular dominance plasticity in adult mouse primary visual cortex. *J. Neurosci.* 34, 15476-15481.
 46. Gagne ,J., Gelinas, S., Martinoli, M.G., Foster ,T.C., Ohayon, M., Thompson, R.F., et al.(1998).AMPA receptor properties in adult rat hippocampus following environmental enrichment. *Brain Res.*799 ,16–25.
 47. Andin ,J, Hallbeck M,MohammedAH, Marcusson J. (2007)Influence of environmental enrichment on steady-state mRNA levels for EAAC1, AMPA1 and NMDA2A receptor subunits in rat hippocampus. *Brain Res.* 1174,18–27
 48. Lee, E.H., Hsu, W.L.,Ma, Y.L., Lee, P.J and Chao, C.C.(2003). Enrichment enhances the expression of sgk, a glucocorticoid-induced gene, and facilitates spatial learning through glutamate AMPA receptor mediation. *Eur J Neurosci.*18,2842–52.
 49. Johansson BB and Belichenko PV.(2002). Neuronal plasticity and dendritic spines: effect of environmental enrichment on intact and postischemic rat brain. *J Cereb Blood Flow Meta*,22,89–96.
 50. Greenough, W. T.(1976). *Neural Mechanisms of Learning and Memory* (eds Rosenzweig, M. R. & Bennett, E. L.) 255–278(MIT Press, Cambridge, Massachusetts,
 51. Isaacs, K. R., Anderson, B. J., Alcantara, A. A., Black, J. E. and Greenough, W. T. (1992). Exercise and the brain: angiogenesis in the adult rat cerebellum after vigorous physical activity and motor skill learning. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 12, 110–119
 52. Volkmar, F. R. and Greenough, W. T. (1972). Rearing complexity affects branching of dendrites in the visual cortex of the rat. *Science.* 176, 1445–1447
 53. Ernfors, P., Wetmore ,C., Olson, L and Persson, H.(1990) Identification of cells in rat brain and peripheral tissues expressing mRNA for members of the nerve growth factor family. *Neuron.* 5, 511-26

54. Baroncelli, L., Braschi, C., and Maffei, L. (2013). Visual depth perception in normal and deprived rats: effects of environmental enrichment. *Neuroscience* 236, 313–319.
55. Castaño S , Martinez G , Morales M , Nieto FA , Fernandez E and Sanchez-Santed F. (2016) Functional effects of transcranial direct-current stimulation (tDCS) of rats with induced amblyopia through visual function evaluation in an innate-behavioral task. *Brain research* : In review.
56. Fox, W.M (1965). Reflex-ontogeny and behavioral development of the mouse. *Anim. Behav.* 13, 234-241
57. Kempermann, G., Kuhn, H. G. and Gage, F. H. (1997) More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment. *Nature*. 386, 493–495.
58. Kempermann, G., Kuhn, H. G. and Gage, F. H. (1998) Experience induced neurogenesis in the senescent dentate gyrus. *J. Neurosci.* 18, 3206–3212.
59. Pacteau, C., Eion, D. and Sinden, J. (1989) Early rearing environment and dorsal hippocampal ibotenic acid lesions: long-term influences on spatial learning and alternation in the rat. *Behav. Brain Res.* 34, 79–96
60. Ding, J and Sperling, G (2006). A gain-control theory of binocular combination. *PNAS*. 103, 1141-1146

X. ANEXO

Prueba de Mann-Whitney

Estadísticos de contraste^a

	IDPREBI	IDPREMONO
U de Mann-Whitney	15,000	3,500
W de Wilcoxon	36,000	24,500
Z	-,500	-2,385
Sig. asintót. (bilateral)	,617	,017
Sig. exacta [2*(Sig. unilateral)]	,699 ^b	,015 ^b

Prueba de los rangos con signo de Wilcoxon

	IDPOSTBI - IDPREBI	IDPOSTMONO - IDPREMONO
Z	-1,890 ^b	-,378 ^c
Sig. asintót. (bilateral)	,059	,705

Prueba de los rangos con signo de Wilcoxon

	IDPOSTBI - IDPREBI	IDPOSTMONO - IDPREMONO
Z	-,412 ^b	-2,121 ^b
Sig. asintót. (bilateral)	,680	,034