

Artículo de Investigación

Efecto del enriquecimiento ambiental sobre la actividad locomotora, habituación, aprendizaje y memoria en ratones C57BL/6

Effect of environmental enrichment on locomotor activity, habituation, learning and memory in C57BL/6 mice.

¹Suárez Rodríguez Marian A., ¹Pulido Barrera Silvana P., ¹Caicedo Pinto Peter J., ^{1*}Bonfante Cabarcas Rafael A.

¹Unidad de Bioquímica, Decanato de Ciencias de la Salud, Universidad Centroccidental "Lisandro Alvarado", Barquisimeto, Venezuela. Teléfono: +58-251-2591854, email: mariansuarez2014@gmail.com, silvanapulido123@gmail.com, pcaicedo88@gmail.com, *rcabarca@ucla.edu.ve

RESUMEN

El enriquecimiento ambiental (EA) es un paradigma útil para aumentar la capacidad cognitiva y el bienestar psíquico, así como coadyuvante en el tratamiento de enfermedades neurológicas y déficits relacionados con la edad. En el presente trabajo determinamos el efecto del EA sobre la locomoción, exploración y habituación medidas en el ensayo de campo abierto; y sobre la memoria y aprendizaje valoradas en el laberinto radial (LA). La muestra estuvo constituida por 20 ratones C57BL/6 hembras divididos en 2 grupos equivalentes: Control No Enriquecido (CNE) hospedados en compartimientos individuales; Control Enriquecido (CE) que fue hospedado grupalmente por 2 meses en una jaula que tenía elementos ambientales que estimulaban la exploración, locomoción, cognición y los órganos de los sentidos. Se demostró que los ratones pertenecientes al grupo experimental CE presentaron una actividad locomotora horizontal significativamente mayor en los primeros 3 días, con una mayor tasa de habituación ($p < 0,05$), sin embargo, los desplazamientos verticales y su habituación no mostraron diferencias significativas entre los grupos. En el LR, CE incurrió en un mayor número de errores en los primeros días ($p < 0,05$), sin embargo, la tasa de aprendizaje y memoria estuvo significativamente incrementada. En conclusión, el enriquecimiento ambiental incrementa la actividad locomotora, la habituación y la memoria de trabajo y debería considerarse como una alternativa para mejorar el bienestar de individuos sanos o con déficit cognitivos.

Palabras Clave: Enriquecimiento ambiental, habituación, aprendizaje, memoria, campo abierto, laberinto radial.

ABSTRACT

Environmental enrichment (EE) is a useful paradigm to increase cognition capacity and psychological well-being, as well as an adjuvant in the treatment of neurological disorders and age-related deficits. In this paper we determined the effect of EA on locomotor activity, exploration and habituation using open field test; and about memory and learning valued in the radial maze. Sample consisted of 20 C57BL/6 female mice, divided in 2 equivalent groups: Unenriched Control (CNE) housed in individual cages and Enriched Control (CE) that was housed in group for 2 months in cage that had environmental elements that stimulated exploration, locomotion, cognition and sensory organs. Results shown that mice belonging to EC group displayed a significantly higher horizontal locomotor activity during the first 3 days, with a significantly higher habituation rate, however, vertical displacements (rearing) and habituation of it did not show significantly differences between experimental groups. In the radial maze, EC group incurred in a greater number of errors in the first day ($p < 0.05$), however, learning and memory rates were significantly increased. In conclusion, EE increased locomotor activity, habituation and working memory and should be considered an alternative to improve welfare in healthy or in individuals with cognitive deficits.

Keywords: Environmental enrichment, habituation, learning, memory, radial maze, open field.

INTRODUCCIÓN

La carga de los trastornos mentales continúa creciendo con impactos significativos en la salud, con consecuencias sociales y en los derechos humanos y económicos en todos los países del mundo. Los determinantes de la salud mental y los trastornos mentales incluyen no sólo atributos individuales, como la capacidad de manejar los pensamientos, emociones, comportamientos e interacciones con los demás, sino también factores sociales, culturales, económicos, políticos y ambientales. El estrés, la genética, la nutrición, las infecciones perinatales y la exposición a riesgos ambientales son factores que contribuyen a la aparición de los trastornos mentales [1].

Actualmente, cerca de 450 millones de personas están afectadas por un trastorno mental o de conducta. De acuerdo con la Carga Global de Enfermedades 2001 de la OMS, el 33% del tiempo con discapacidad en la población mundial, son causados por los trastornos neuropsiquiátricos. Entre los costos relativos y absolutos de la atención en un amplio espectro de trastornos, la psicosis y neurosis representan un costo mayor que el de la diabetes, el cáncer de mama, la enfermedad cardíaca isquémica y la hipertensión. La enfermedad de Alzheimer y la esquizofrenia son dos de las enfermedades más costosas, representando un costo promedio por paciente más alto que el del cáncer y la apoplejía [2].

Los métodos de tratamiento de las enfermedades psiquiátricas pueden clasificarse en somáticos o psicoterapéuticos. Los tratamientos somáticos incluyen fármacos, terapia electroconvulsiva y tratamientos que estimulan el cerebro, como la estimulación magnética transcraneal y la estimulación del nervio vago. Los tratamientos psicoterapéuticos incluyen la psicoterapia, técnicas de terapia conductual y la hipnoterapia. La mayoría de los estudios sugieren un enfoque terapéutico que contemple la utilización conjunta de fármacos y psicoterapia, lo cual resultará más eficaz que cualquiera de los métodos de tratamiento empleados por separado [3].

El Enriquecimiento Ambiental (EA) es un paradigma experimental compuesto por un mayor espacio de desplazamiento y exploración, con objetos de diversas características que promueve la estimulación cognitiva, motora, sensorial y social. Esta estrategia ofrece desafíos leves y breves que inducen una respuesta adaptativa beneficiosa, benigna y saludable, conocida como “eustrés” el cual es definido como un estrés positivo, en lugar de un entorno de aislamiento hostil o aversivo. Al promover eustrés y limitar la angustia dañina, los ratones muestran una variedad de conductas favorables [4].

El EA se ha propuesto durante mucho tiempo como un tratamiento o estrategia para aumentar la

capacidad cognitiva y el bienestar, principalmente en modelos animales y en niños en contextos educativos [5]. El concepto de EA fue propuesto por primera vez por Donald Hebb en 1947, cuando permitió que las ratas exploraran libremente en su hogar, y descubrió que se desempeñaban mejor en la resolución de problemas en comparación con los compañeros de camada alojados en el laboratorio; posteriormente, se han realizado diversos estudios para comprender mejor los efectos del mismo [6]. Se ha demostrado que el EA mejora el aprendizaje y la memoria, induce una reversión de los defectos de aprendizaje causados por alteraciones genéticas, así como un retraso en la aparición de síntomas de una variedad de trastornos neurológicos en modelos animales como Huntington, enfermedad de Alzheimer, epilepsia, Síndrome de X frágil y enfermedad de Parkinson [6].

Un trabajo reciente en roedores adultos indica que el EA iniciado en casi cualquier punto de la vida puede mejorar la memoria espacial y no espacial, y mejoró varios aspectos del funcionamiento del hipocampo, como la potenciación a largo plazo, la neurogénesis, el crecimiento dendrítico y en la expresión del ARNm de las neurotrofinas. Además, el EA en ratas y ratones seniles revierte los déficits en la memoria y de otras conductas [7].

El efecto del EA ha sido poco estudiado en los ratones C57BL/6. Zeleznikow y colaboradores en el año 2017 [8], estudiaron el efecto del EA en el desempeño de la flexibilidad cognitiva en ratones C57BL/6 en una tarea de aprendizaje con pantallas táctiles y encontraron mejoras en la función cognitiva, especialmente en la discriminación visual y en el aprendizaje inverso. Siendo esta cepa de ratones ampliamente utilizada en estudios biológicos de aplicación médica, es necesario ampliar el conocimiento de su desenvolvimiento en ensayos conductuales.

En la presente investigación se estudió el efecto del EA sobre la conducta motora, la habituación, la memoria de trabajo y de referencia en ratones C57BL/6, utilizando el campo abierto y el laberinto radial de 8 brazos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Población y muestra

Estuvo constituida por 20 ratones hembras de la cepa C57BL/6 con un peso promedio $17,90 \pm 0,33$ gr, que fueron obtenidos del Bioterio Central de la Universidad Centro Occidental “Lisandro Alvarado”, Barquisimeto (Venezuela). Los ratones fueron divididos en 2 grupos experimentales de 10 ratones cada uno, denominados grupo Control Enriquecido (CE) y grupo Control No Enriquecido (CNE). La totalidad de los ratones del grupo CE fueron

colocados en una jaula de acero inoxidable de 50 x 36 x 13 cm; mientras los ratones del grupo CNE fueron acomodados en una jaula dividida en 10 celdas de 14 x 9 x 14 cm, a razón de 1 ratón por celda. Los ratones tuvieron libre acceso a agua destilada y comida, que consistió en alimento comercial peletizado. Se mantuvieron a una temperatura ambiente entre 25 y 30°C y ciclos luz/oscuridad de 12 horas c/u.

Ambos grupos se alojaron en condiciones de bienestar cumpliendo las “cinco libertades” de Brambell: libre de hambre, sed y desnutrición; libre de miedos y angustia; libre de incomodidades físicas o térmicas; libres de dolor, lesiones o enfermedades; libre para poder expresar las conductas y pautas de comportamiento estándar de su especie a la que estaban habituados desde su nacimiento. Asimismo, todos los procedimientos experimentales se basaron en los principios establecidos en el Manual de Bioética y Bioseguridad del Fondo Nacional para Ciencia y Tecnología (Fonacit), Ministerio del Poder Popular para Ciencia y Tecnología, Caracas, Venezuela.

Enriquecimiento ambiental

Consistió en colocar armónicamente los siguientes objetos dentro de las jaulas: puentes de cartón que unían rampas de plástico, túneles de cartón o de plástico con paredes horadadas que terminaban en túneles conectores en forma de T de acero inoxidable, madrigueras de plásticos con dos orificios para el acceso y cáscaras de arroz en el piso, balancines atados al techo de la jaula, canicas, entre otros. Se les proporcionó estímulos sensoriales alternados diariamente, tales como: olores (cereza, lavanda, maresía y menta) colocados en motas de algodón introducidas en frascos de plástico de 5 cc con orificio de 1,3 cm de diámetro; sabores (ácido, amargo, dulce, salado, umami), que fueron administrados en bocadillos de merengues, cotufas o maíz inflado colocados en los balancines; visuales consistentes en balancines de diversos colores (rojo, amarillo, verde y azul) y en luces coloridas (púrpura) tenues intermitentes colocadas durante la noche, y estímulos táctiles consistente en colocar piedras pequeñas rugosas, cáscaras de arroz y virutas de madera en el piso. El CNE fue colocado en un espacio restringido (para más detalles ver población y muestra), con piso cubierto de cáscaras de arroz y libre acceso al agua y comida. Ambos recibieron diariamente bolitas de maíz inflado sabor umami para adaptarlos a la recompensa del laberinto de 8 brazos. Los animales fueron hospedados durante un periodo de 2 meses previo a las pruebas conductuales y durante el desarrollo de las mismas.

Motilidad y Habitación

Estos ensayos fueron realizados en una caja de motilidad, con dimensiones de 50x50x 31 cm, con paredes construidas de fibropanel de densidad media pintada de color crema, el piso fue dividido en cuatro cuadrantes equivalentes con una cinta adhesiva negra. El ensayo de motilidad consistió en dos periodos, uno de adaptación y otro de medición. En el periodo de adaptación se colocó el animal dentro de la caja de motilidad y se dejó que deambulara libremente sin registrar sus movimientos por 5 min, cumplido este lapso se midieron los desplazamientos horizontales y verticales durante 10 min. Los desplazamientos horizontales se referían a los movimientos de los ratones de un cuadrante a otro con posicionamiento de las 4 patas y los desplazamientos verticales se cuantificaban cuando el ratón se levantaba y se sostenía en sus dos patas traseras. El ensayo fue cuantificado por un observador colocado a 30 cm de uno de los ángulos de la caja, en una sala acondicionada, libre de sonidos. Los ensayos fueron realizados diariamente durante un periodo de 4 días para determinar el fenómeno de habituación.

Memoria Espacial

Este ensayo fue realizado en un laberinto radial con 8 brazos de dimensiones de 48 x 9,5x 9,5 cm, con una plataforma central de forma octagonal con un diámetro de 40 cm y paredes con una altura de 9,5 cm. Cada brazo estaba comunicado con la plataforma central por aberturas en forma de arco de 6,5 cm de alto y 5,5 cm de ancho. El laberinto estaba construido de madera, las paredes de la plataforma central de plástico de acetato y el techo de los brazos de paneles removibles de vidrio.

Los animales fueron sometidos a un primer periodo de adaptación grupal, que consistió en colocar 10 ratones en la plataforma central dentro de un recipiente removible y horadado de 25 cm de altura y 20 cm de diámetro; a lo largo de cada brazo se colocaron 3 trozos de 12 mg de maíz inflado sabor umami. A los 10 seg se retiró el recipiente y se permitió a los ratones explorar y comer libremente por el laberinto durante 20 min, culminado el tiempo, los ratones fueron retornados a sus jaulas de origen por 2 horas, para ser colocados nuevamente en el laberinto descrito, pero esta vez con 2 trozos de maíz inflado. Al día siguiente se procedió a realizar un segundo periodo de adaptación de forma individual, este se basó en colocar un trozo de maíz inflado al final de cada brazo dentro de recipientes de diferentes colores de 1,3 cm de diámetro por 1,5 cm de altura, siguiendo el protocolo anteriormente descrito por un periodo máximo de 20 min. Si el ratón comía todas las

porciones de maíz previo al tiempo máximo, se retiraba del laberinto.

Los ensayos de memoria de trabajo fueron realizados interdiario en 4 oportunidades, siguiendo el protocolo descrito anteriormente, por un periodo máximo de 15 min. Durante los ensayos se midió el tiempo requerido para comer todas las porciones y las entradas acertadas a los brazos. Se consideraba incursión acertada a la entrada en un brazo con comida y su consumo total.

Los ensayos de memoria de referencia consistieron en colocar comida en los 8 brazos del laberinto, estando la entrada de 4 brazos bloqueados (brazos impares). Los ratones fueron colocados en el laberinto según el protocolo descrito en memoria de trabajo y se les permitió consumir la comida contenida en los 4 brazos abiertos, luego fueron desbloqueados aquellos brazos que aún no habían sido abiertos, iniciándose el registro. Se consideró error cuando el ratón ingresaba a un brazo donde había comido.

En el ensayo de memoria de trabajo con distractor, se colocó en la plataforma central una caja de cartón sin techo, de 22x17x10,5 cm, con orificios de 4,5 cm en el centro de cada pared de la caja; además en cada esquina de la caja surgían cuatro paredes, que se adosaban a las paredes de la plataforma central, de tal manera que la salida de dos brazos convergían en un espacio poligonal comunicado a un orificio de la caja. Con este diseño pretendíamos distraer al animal. El protocolo de evaluación fue similar al de memoria de trabajo.

Análisis de los Datos

Los datos son presentados como el promedio \pm el error estándar o la desviación estándar de valores absolutos o porcentuales. Para determinar la significancia estadística de la diferencia observada entre las variables analizadas se utilizó el Test de Student no pareado. Para analizar los datos de habituación en los días sucesivos de ensayo, se utilizó el Test Anova pareado seguido del post-test de Tukey, asimismo la tasa de habituación y aprendizaje para cada ratón fue determinada por regresión lineal. Se aceptó como significativo $p < 0,05$. En todos los casos el análisis estadístico fue realizado utilizando el programa Graph Pad Prism 6.

RESULTADOS

Los ratones adaptados al EA, mostraron una actividad locomotora horizontal significativamente mayor en los días 0, 1 y 2 del ensayo, al ser comparados con el grupo control, (Figura 1, panel A), sin embargo, no se observó diferencias estadísticamente significativas para la actividad locomotora vertical (Figura 1, panel C). Ambos grupos desarrollaron el fenómeno de habituación, al disminuir

significativamente el número de movimientos horizontales y verticales los días 1, 2 y 3 respecto al día 0 (ver Figura 1, Tabla I). Al analizar más detalladamente el fenómeno de habituación, obtuvimos que los ratones con EA presentaron una habituación absoluta global y una tasa de habituación significativamente mayor que el grupo control (ver Tabla I), indicando una mayor y más rápida adaptación a la caja de motilidad.

El desempeño de los ratones en el laberinto de 8 brazos, para la memoria de trabajo, se caracterizó por una disminución progresiva de carácter significativo, en el tiempo empleado y en el número de errores cometidos durante su resolución, lo cual indicó que ambos grupos resolvieron satisfactoriamente el paradigma del laberinto en un periodo de 4 días. No obstante, los ratones acostumbrados al EA cometieron significativamente más errores y emplearon más tiempo en la resolución del laberinto (Figura 2 y Tabla II). En el test de memoria de trabajo con distractor, los ratones con EA cometieron un número significativamente mayor de errores con respecto al grupo control, sin embargo, tardaron un tiempo significativamente menor en su resolución (Figura 3, Paneles C y D). Mientras que en el ensayo de memoria de referencia no se observaron diferencias significativas entre ambos grupos.

DISCUSIÓN

En el presente estudio reportamos que el enriquecimiento ambiental incrementa la actividad locomotora horizontal, no afecta la actividad exploratoria y facilita el proceso de habituación. Sin embargo, perturba el proceso inicial de aprendizaje, pero no la adquisición y la consolidación de la memoria en el laberinto radial.

Diversos autores han encontrado que animales sometidos a ambientes enriquecidos tuvieron un mayor nivel de actividad locomotora, comparados con los animales hospedados en ambientes estándar [9], efecto que estuvo relacionado con la fase del día [9, 10]. Por el contrario, otros autores reportaron que ratones o ratas alojadas en condiciones de enriquecimiento ambiental no mostraron diferencias o fueron menos activas en el campo abierto en relación a los animales controles [11]. Las diferencias observadas han sido relacionadas con: las características físicas (tamaño, forma y color) del equipo utilizado, al protocolo ensayado (simples o repetitivos), el ambiente donde fue ejecutado el ensayo (intensidad de la luz y niveles de ruido), la duración del ensayo, la cepa y sexo de los animales utilizados [9, 10, 12]. El EA tiende a mejorar más drásticamente la actividad locomotora en ratones viejos [13] o en modelos animales de enfermedades con déficit neurológico [14].

En el presente estudio la locomoción horizontal fue incrementada significativamente por el EA, sin embargo, la motilidad vertical (alzadas) no mostró diferencias significativas. Ambos comportamientos son típicamente conductas exploratorias instintivas relacionadas con ambientes novedosos, su frecuencia está relacionada indirectamente con el grado de ansiedad del animal (especialmente las alzadas). Los ratones con niveles elevados de ansiedad tienden a moverse preferentemente en la periferia de la caja de motilidad, se desplazan menos distancia, tienen mayor tiempo de inmovilidad y exhiben menos alzadas. En consecuencia, nuestros resultados sugieren que el EA disminuye la ansiedad en los ratones, reflejado en un mayor número de desplazamientos horizontales por cada alzada. El índice desplazamientos horizontales/alzadas pudiera ser indicativo de una mayor eficiencia de las alzadas en la valoración del medio ambiente novedoso, para inducir una respuesta motora capaz de explorar físicamente el área novedosa sin aprehensión e incertidumbre, con el objetivo de incrementar el conocimiento del medio ambiente explorado e incrementar los chances de encontrar comida, abrigo y de las posibilidades de cruzamiento. En ratones, las conductas exploratorias se correlacionan estrechamente con el nivel de actividad eléctrica de las fibras de Mossy en el hipocampo. De esta manera, ratones de diferentes cepas o genéticamente seleccionados de acuerdo al número de alzadas, mostraron diferencias en la morfología del hipocampo, teniendo los ratones con alta actividad, fibras infrapiramidales de proyección más robustas [15].

En el mismo orden de ideas, la habituación es un fenómeno cognitivo no asociativo que permite al animal valorar y responder sucesivamente con disminución de la actividad locomotora, a ambientes que el cerebro ha procesado como no hostiles. Al estar en un ambiente novedoso, las conductas exploratorias para determinar el nivel de riesgo están incrementadas, sin embargo, tan pronto como la incertidumbre acerca del origen de donde provendrán las amenazas, las conductas exploratorias disminuyen. El proceso cuantitativo cinético de disminución progresiva de la conducta exploratoria es denominado habituación. En este contexto, la locomoción y las alzadas son las respuestas más sensitivas a las experiencias prolongadas y repetitivas en el campo abierto [16].

Diversos autores han estudiado el efecto del EA sobre la habituación, encontrando que el EA incrementa la habituación de las alzadas o de la locomoción en el campo abierto [17, 18], primariamente debido al efecto del ambiente novedoso [19], conllevando a conductas y a efectos neuroquímicos similares a los ejercidos por los antidepresivos [11]. El efecto del EA ha sido

relacionado con diferentes variables, por ejemplo; duración del enriquecimiento, siendo mayor en animales expuestos a mayores periodos de enriquecimiento [18]; también los aspectos físicos y sociales del EA contribuyen a un mayor desempeño en el campo abierto, siendo mayor en animales machos, sin embargo, el enriquecimiento social tiene mayor efecto en las hembras [20]. Asimismo, el efecto del EA es mayor en animales con déficits cognitivos o de conducta [21] y en animales con mayor edad con bajos niveles de actividad [22].

El efecto del EA sobre la habituación podría estar relacionado con la disminución de la conducta defensiva; en este sentido se ha reportado que el EA reduce esta conducta en diferentes ensayos de ansiedad no condicionados, puesto que, la complejidad del EA y sus desafiantes características elevan el umbral de las conductas defensivas, por lo tanto, las propiedades ansiogénicas del campo abierto son percibidas como menos peligrosas. Asimismo, el EA incrementa el aprendizaje y la memoria, por lo tanto, los ratones sometidos a EA extraen y procesan la información más rápido y eficientemente, reconociendo rápidamente que no hay salida o elementos potencialmente dañinos.

No solamente, el EA intensifica la exploración de los ambientes noveles, él también incrementa el aprendizaje espacial como resultado de niveles disminuidos de ansiedad y disminución de la reactividad ante situaciones estresantes [23, 24]. Similarmente, el EA retrasa la aparición de déficits de aprendizaje y memoria relacionados con la edad avanzada [25]. Más aun, el EA mejora significativamente el desempeño para la memoria espacial en ratones con genotipos de la enfermedad de Alzheimer [14] y es capaz de contrarrestar las fallas en la inducción de la potenciación a largo plazo ocasionada por hipoxia cerebral debido a ligadura bilateral de las arterias carótidas en ratas [26].

En la presente investigación, observamos que la habituación para el día 0 fue menor en el grupo adaptado a EA, mientras que la tasa de habituación fue mayor entre los días 1 y 3, indicando que hubo un efecto bifásico del EA sobre la habituación. En forma interesante, estos resultados fueron significativamente coincidentes con los resultados obtenidos en el laberinto radial, donde observamos un retraso en el aprendizaje absoluto (número de errores), en los ratones sometidos a EA, pero con una mayor tasa de aprendizaje. En ambos paradigmas experimentales el grupo adaptado a EA mostró una hiperactividad inicial que fue extinguiéndose más aceleradamente.

Recientemente, Christakis et al. en el año 2018 [27], recrearon un modelo animal de excesiva y sincronizada estimulación sensorial auditiva y visual, que fue mayor a cualquier estimulación que los ratones en condiciones normales de hospedaje o en

su medio silvestre pudieran encontrar. Ellos memoria estuvieron disminuidos, sin embargo, la toma de riesgos y la actividad locomotora estuvieron incrementadas, planteando que el modelo desarrollado era similar al trastorno por déficit de atención con hiperactividad (TDAH) observado especialmente en niños. Específicamente, estos ratones recorrían mayores distancias en el campo abierto, permanecían más tiempo en el brazo abierto del laberinto de ansiedad y persistía más tiempo en la cámara iluminada en el ensayo caja luz-oscuridad. Los hallazgos fueron interpretados planteando que la excesiva estimulación sensorial conllevaba a ratones hiperkinéticos, impulsivos y temerarios que son capaces de tomar mayores riesgos aversivos. Similares resultados fueron obtenidos por Hadasel et al. (2016) [28], quienes expusieron ratas juveniles a estímulos odoríferos que fueron cambiados constantemente, encontrando que las ratas sometidas a estos estímulos mostraron un desempeño pobre en el tiempo de reacción en serie de 5 opciones, cuando un distractor auditivo estuvo presente. En este trabajo, además de enriquecer el ambiente para promover actividad motora, incluimos estimulación táctil, olfativa, gustativa y visual, variable o intermitente, en consecuencia, planteamos que nuestro esquema experimental es un modelo de EA con rasgos concretos de sobre-estimulación sensorial. Este punto de vista, permitiría explicar la hiperactividad y el déficit de atención observados en las etapas iniciales de los experimentos en el campo abierto y en el laberinto radial.

Es interesante acotar que la hiperactividad y los déficits de atención han sido observados en el TDAH y en ratones inoculados con escopolamina. Se ha razonado que el ADHD socioculturalmente está asociado con una sobre estimulación sensorial [27] y neuroquímicamente a trastornos en la señalización dopaminérgica y colinérgica. Experimentalmente se ha demostrado que algunos pacientes con TDAH expresan una rara variante del transportador para dopamina (SLC6A3 variante Ala559Val), que exhibe la propiedad de eflujo presináptico de dopamina y es bloqueado por anfetaminas y metilfenidato, explicando la efectividad de estos fármacos en el tratamiento de TDAH [29]. Asimismo, ha sido reportado un déficit en la transmisión colinérgica en los pacientes con ADHD, asociados con polimorfismos de los genes del transportador de colina (CHT, SLC5A7: variante Ile89Val y CHT 3'UTR +4067 G/T) y de los genes que codifican para las subunidades $\alpha 4$ y $\alpha 7$ del receptor colinérgico nicotínico; los déficits en la transmisión colinérgica son causa de los déficits de atención asociados a los trastornos de aprendizaje y memoria [30]. Las alteraciones descritas podrían ser aplicables al efecto de escopolamina, cuyo efecto ha sido asociado al bloqueo presinápticos de receptores

reportaron que la ansiedad, el aprendizaje y la colinérgico muscarínicos M2 en las terminales dopaminérgicas, incrementando la liberación de dopamina asociada a la hiperactividad y al bloqueo de los receptores colinérgico muscarínicos M1 asociados con los déficits de atención, memoria y aprendizaje [31]. Recientemente Caicedo y colaboradores en el año 2019 [32], mostraron que la escopolamina en un protocolo de inducción de deshabitación por alternancia de protocolos conductuales, potenció el fenómeno de habituación en el laberinto de ansiedad y disminuyó la conducta obsesivo-compulsiva para el enterramiento de canicas en ratones NMRI.

CONCLUSIÓN

Podemos entonces plantear que nuestro protocolo de EA fue un protocolo de sobre-estimulación sensorial, el cual indujo un síndrome de hiperactividad motora con posibles déficits de atención, que a su vez conllevó a un retardo cuantitativo en la habituación en el campo abierto y del aprendizaje en el laberinto radial, sin embargo, por el contrario, aumentó la capacidad cognitiva al contrarrestar la hiperactividad inicial con una mayor tasa de habituación y de aprendizaje.

AGRADECIMIENTOS

Suárez Rodríguez MA y Pulido Barrera SP pertenecen al programa de Talento Científico Juvenil de la Unidad de Bioquímica, Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico y Tecnológico (C.D.C.H.T), Universidad Centro Occidental Lisando Alvarado (U.C.L.A)

BIBLIOGRAFÍA

[1] Organización Mundial de la Salud. Desórdenes mentales 2018. Disponible en: URL: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/mental-disorders>

[2] Organización Mundial de la Salud. Invertir en salud mental 2004. Disponible en: URL: https://www.who.int/mental_health/advocacy/en/spanish_final.pdf

[3] First M. Evaluación médica del paciente con síntomas mentales. Kenilworth, Nueva Jersey, EE.UU. Manual de MSD. 2017. Disponible en: URL: <https://www.msdmanuals.com/professional/psychiatric-disorders/approach-to-the-patient-with-mental-symptoms/medical-assessment-of-the-patient-with-mental-symptoms>

[4] Slater AM, Cao LA protocol for housing mice in an enriched environment. J Vis Exp (100) 2015; e52874.

- [5] Ball NJ, Mercado E III, Orduña I. Enriched environments as a potential treatment for developmental disorders: a critical assessment. *Psychol* 2019; 10:466.
- [6] Arai JA, Feig LA. Long-lasting and transgenerational effects of an environmental enrichment on memory formation. *Brain Res Bull* 2011; 85(1-2):30-35.
- [7] Frick KM, Stearns NA, Pan JY, Berger-Sweeney J. Effects of environmental enrichment on spatial memory and neurochemistry in middle-aged mice. *Learn Mem.* 2003; 10(3):187-198.
- [8] Zeleznikow-Johnston A, Burrows EL, Renoir T, Hannan AJ. Environmental enrichment enhances cognitive flexibility in C57BL/6 mice on a touchscreen reversal learning task. *Neuropharmacology* 2017; 117:219-226.
- [9] Sudo M, Nagamatsu T, Ando S. Does environmental enrichment increase locomotor activity in rats? Evidence from an implanted sensor device. *Bull Physical Fitness Res Inst* 2018; 116:29-32.
- [10] Loss CM, Binder LB, Muccini E, Martins WC, de Oliveira PA, Vandresen-Filho S et al. Influence of environmental enrichment vs. time-of-day on behavioral repertoire of male albino Swiss mice. *Neurobiol Learn Mem.* 2015; 125:63-72.
- [11] Brenes JC, Padilla M, Fornaguera J. A detailed analysis of open-field habituation and behavioral and neurochemical antidepressant-like effects in postweaning enriched rats. *Behav Brain Res* 2009; 197: 125-137.
- [12] Toth LA, Kregel K, Leon L, Musch TI. Environmental enrichment of laboratory rodents: The answer depends on the question. *Comp Med* 2011; 61: 314-321.
- [13] McMurphy T, Huang W, Queen NJ, Ali S, Widstrom KJ, Liu X et al. Implementation of environmental enrichment after middle age promotes healthy aging. *Aging (Albany NY)* 2018; 10:1698-1721.
- [14] Jankowsky JL, Melnikova T, Fadale DJ, Xu GM, Slunt HH, Gonzales V et al. Environmental enrichment mitigates cognitive deficits in a mouse model of Alzheimer's disease *J Neurosci* 2005; 25:5217-5224.
- [15] Alves R, Barbosa de Carvalho JG, Campana Venditti MA. High- and low-rearing rats differ in the brain excitability controlled by the allosteric benzodiazepine site in the Gaba A receptor. *J Behav Brain Sci* 2012; 2:315-325.
- [16] Rojas-Carvajal M, Fornaguera J, Mora-Gallegos A, Brenes JC. Testing experience and environmental enrichment potentiated open-field habituation and grooming behaviour in rats. *Anim Behav* 2018; 137: 225-235.
- [17] Varty GB, Paulus MP, Braff DL, Geyer MA. Environmental enrichment and isolation rearing in the rat: effects on locomotor behavior and startle response plasticity. *Biol Psychiatry* 2000; 47:864-873.
- [18] Amaral OB, Vargas RS, Hansel G, Izquierdo I, Souza DO. Duration of environmental enrichment influences the magnitude and persistence of its behavioral effects on mice. *Physiol Behav* 2008; 93:388-394.
- [19] Zimmermann A, Stauffacher M, Langhans W, Würbel H. Enrichment-dependent differences in novelty exploration in rats can be explained by habituation. *Behav Brain Res* 2001; 121:11-20.
- [20] Elliott BM, Grunberg NE. Effects of social and physical enrichment on open field activity differ in male and female Sprague-Dawley rats. *Behav Brain Res* 2005; 165:187-196.
- [21] Suemaru K, Yoshikawa M, Aso H, Watanabe M. Environmental enrichment alleviates cognitive and behavioral impairments in EL mice. *Epilepsy Behav* 2018; 85:227-233.
- [22] Ballelli M, Pugliese A, Fabbietti P, Di Rosa M, Conti F. Aged rats with different performances at environmental enrichment onset display different modulation of habituation and aversive memory. *Neurobiol Learn Mem* 2019; 161:83-91.
- [23] Sampedro-Piquero P, Zancada-Menendez C, Begega A, Rubio S, Arias JL. Effects of environmental enrichment on anxiety responses, spatial memory and cytochrome c oxidase activity in adult rats. *Brain Res Bull* 2013; 98:1-9.
- [24] Nowakowska E, Czubak A, Kus K, Metelska J, Burda K, Nowakowska A. Effect of lamotrigine and environmental enrichment on spatial memory and other behavioral functions in rats. *Arzneimittelforschung* 2010; 60(6):307-314.
- [25] Cortese GP, Olin A, O'Riordan K, Hullinger R, Burger C. Environmental enrichment improves hippocampal function in aged rats by enhancing

learning and memory, LTP, and mGluR5-Homer1c activity. *Neurobiol Aging* 2018; 63:1-11.

[26] Bayat M, Sharifi MD, Haghani M, Shabani M. Enriched environment improves synaptic plasticity and cognitive deficiency in chronic cerebral hypoperfused rats. *Brain Res Bull* 2015; 119(Pt A):34-40.

[27] Christakis DA, Benedikt JS, Ferguson SM, Ravindera S, Ramirez JM. How early media exposure may affect cognitive function: A review of results from observations in humans and experiments in mice. *PNAS* 2018; 115: 9851-9858.

[28] Hadas I, Gal R, Bokovza L, Meiran N, Feifel D, Zangen A. Exposure to salient, dynamic sensory stimuli during development increases distractibility in adulthood. *Sci Repr* 2016; 6:21-29.

[29] Mergy MA, Gowrishankar R, Davis GL, Jessen T, Wright J, Stanwood GD, et al. Genetic targeting of the amphetamine and methylphenidate-sensitive dopamine transporter: on the path to an animal model of attention-deficit hyperactivity disorder. *Neurochem Int* 2014; 73:56-70

[30] English BA, Hahn MK, Gizer IR, Mazei-Robison M, Steele A, Kurnik DM, et al. Choline transporter gene variation is associated with attention-deficit hyperactivity disorder. *J Neurodev Disord*. 2009; 1:252-263

[31] Shin JH, Adrover MF, Wess J, Álvarez V. Muscarinic regulation of dopamine and glutamate transmission in nucleus accumbens. *PNAS* 2015; 112:8124-8129.

[32] Caicedo P, Lucena D, Correa M, Yang K, Terán O, Bonfante R. Efecto de la *Petiveria alliacea* y drogas colinérgicas sobre la habituación. *Bol Latinoam Caribe Plant Med Aroma* 2019; 18(6):595-606.

Grupos		CNE				CE			
Motilidad Campo Abierto	Días	DH	DH%	DV	DV%	DH	DH%	DV	DV%
	0	62,3 ± 6,77	100 ± 10,84	48,8 ± 6,02	100 ± 12,33	93,7 ± 9,86*	100 ± 10,52	42,9 ± 4,34	100 ± 10,12
	1	41,78 ± 3,54°	60,32 ± 5,68°	30,1 ± 2,66°	61,68 ± 5,45°	71,3 ± 7,59*°	76,09 ± 8,11°	30,2 ± 3,77°	70,4 ± 8,79°
	2	39,67 ± 3,67°	57,27 ± 5,88°	32,4 ± 3,21°	66,39 ± 6,58°	72 ± 5,92*	76,84 ± 6,32	39,7 ± 3,60	92,54 ± 8,38*
	3	40,56 ± 5,51°	58,55 ± 10,24°	30,1 ± 4,35°	61,68 ± 8,91°	46,7 ± 6,02°	49,84 ± 6,43°	21,6 ± 3,47°	50,35 ± 8,09°
Habitación Temprana		22,80 ± 4,68		18,70 ± 5,33		22,40 ± 5,65		12,70±3,06	
Habitación Total		30,70 ± 9,58		18,70 ± 5,12		47,00 ± 7,43*		21,30±3,32	
Tasa de Habitación		6,74 ±4,91		6,38 ± 4,47		14,03 ± 5,79*		5,44± 4,35	

CNE: Control No Enriquecido; CE: Control Enriquecido; DH: Desplazamientos Horizontales; DV: Desplazamientos Verticales. (*) y (°) Significan p<0,05 con respecto al grupo CNE y al día 0, respectivamente.

Tabla I.-Motilidad y habituación en campo abierto de ratones c57bl/6 sometidos a enriquecimiento ambiental

Grupos		CNE		CE	
	Días	Errores	Tiempo	Errores	Tiempo
Memoria de Trabajo	0	9± 3,04	477 ± 71	21 ± 2,25*	787,1± 50,52*
	1	2,1± 1,00 °	244 ± 12,50 °	19± 2,36*	704,3± 71,15*
	2	1,4± 0,50	232,4± 30,67	5,2± 0,61* °	411,5± 41,25*
	3	1,1± 0,89 °	249± 47,19 °	1,1±0,38 °	169,5± 20,65 °
Memoria de Referencia		0,67± 0,37	180 ± 24	2,30 ± 0,93	169 ± 20,52
Memoria de Trabajo con Distractor		9± 1,49	465,3± 80,69	3,44± 0,90*	195,9± 23,38*
Aprendizaje Temprano		6,90 ± 2,16	233,4 ± 63,42	1,36 ± 2,87	82,80 ± 106,7
Aprendizaje Tardío		7,90 ± 2,24	228 ± 70,50	19,36 ± 2,26 *	617,6 ± 53,26 *
Tasa de Aprendizaje		2,44 ± 0,74	69,48 ± 21,49	7,40 ± 0,76*	214,6 ± 11,78 *

El aprendizaje temprano se midió restando los valores del día 0 con el día 1; el aprendizaje tardío se midió restando valores del día 0 con los del día 3; la tasa de aprendizaje se midió calculando el slope mediante GraphPad Prisma. (*) y (°) Significan $p < 0,5$ con respecto al grupo CNE y al día 0, respectivamente.

Tabla II.-Aprendizaje y memoria espacial en el laberinto radial en ratones c57bl/6 sometidos a enriquecimiento ambiental

Figura 1.- Motilidad y habituación de ratones c57bl/6 sometidos o no a enriquecimiento ambiental. Los ratones fueron colocados de forma individual en la caja de motilidad diariamente durante 10 min, por un periodo de 4 días. Los desplazamientos horizontales (paneles A y B) consistían en los desplazamientos de un cuadrante a otro de la caja de motilidad. Los desplazamientos verticales (paneles C y D) se referían cuando los animales se levantaban sobre sus patas traseras. Observe que los ratones del grupo CE (círculos vacíos) presentaron una motilidad horizontal significativamente mayor los días 0,1 y 2 al ser comparado con el grupo CNE (ver panel A), sin embargo, no se observó diferencias resaltantes o estadísticamente significativas para la actividad locomotora vertical (paneles C y D). Ambos grupos desarrollaron el fenómeno de habituación al disminuir significativamente el número de desplazamientos horizontales y verticales los días 1, 2 y 3 respecto al día 0. (*) y (°) significan $p < 0,05$ cuando se comparan el grupo CE con el CNE, o cuando se comparan las sesiones 1, 2 y 3 respecto a la sesión 0, respectivamente.

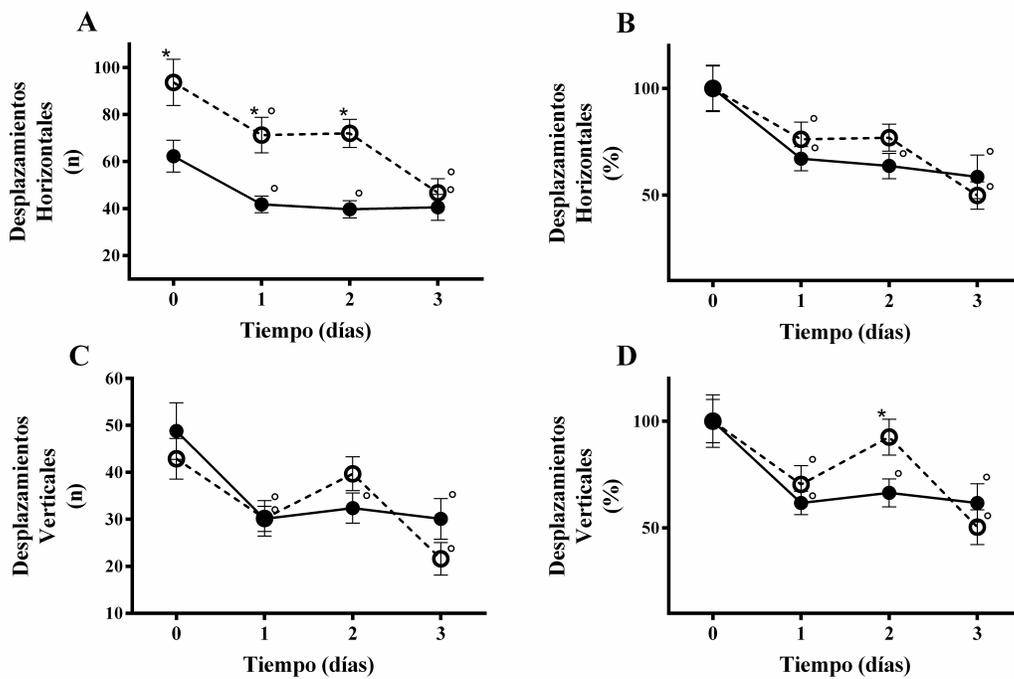


Figura 2. Tiempo y errores totales cometidos durante la ejecución de la memoria de trabajo en el laberinto radial. Los ratones C57BL/6 fueron entrenados previamente en 3 sesiones tanto grupales como individuales, para luego durante 4 sesiones interdiarias ser sometidos a resolver el paradigma del laberinto de 8 brazos. Observamos una disminución progresiva de carácter significativo en el tiempo empleado (panel A) y en el número de errores cometidos para resolver el laberinto (panel B). No obstante, los ratones del grupo CE emplearon un tiempo significativamente mayor durante las primeras tres sesiones del ensayo (panel A) y cometieron significativamente más errores (panel B) con respecto al grupo CNE (círculos llenos), ambos lograron resolver satisfactoriamente el laberinto en la sesión 3. (*) y (°) significan $P < 0,05$ cuando se comparan el grupo CE con el CNE, o cuando se comparan las sesiones 1, 2 y 3 respecto a la sesión 0, respectivamente.

