



Grado en Psicología
Trabajo de Fin de Grado
Curso 2020/2021
Convocatoria Junio



Modalidad: Trabajo experimental

Título: Efectos de un ambiente enriquecido en la respuesta a la actividad física en ratas hembra durante la adolescencia

Autor: Valeria Gómez Soriano

Tutor/a: Hugo Cabedo Martí

Cotutor/a: Dr José Luis Ferrán Bertone y Dr Miroljub Popovic Popovic

Murcia a 4 de Junio de 2021

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quiero agradecer a mi familia el apoyo que me ha brindado estos años de carrera, así como la motivación y los consejos recibidos, no solamente durante el periodo de la carrera de psicología, sino desde pequeña, haciendo posible cada uno de mis objetivos académicos.

A Hugo Cabedo Martí, por adentrarme en este mundo tan fascinante que es la neurociencia y la motivación ofrecida haciendo posible esta vocación.

A José Luis Ferrán por brindarme la gran oportunidad de desarrollarme junto con su equipo, así como todo el apoyo y orientación ofrecida durante este periodo.

A Miroљub Popovic Popovic, por guiarme y ofrecerme la ayuda necesaria durante todo este periodo, así como todo el conocimiento que me ha brindado.

A Alberto Barreda y Daniel Garrigós, por ser unos increíbles compañeros de laboratorio. Gracias a ambos por todo lo que me habéis enseñado y por acompañarme y guiarme en todo este periodo.

A Laura Solana, por ser imprescindible en mi vida y por haber crecido juntas durante estos años de carrera

Por último, a mi estrella en el cielo, Coral Gómez, por haberme regalado una vida de recuerdos y por seguir guiándome desde el cielo.

ÍNDICE

1.	INTRODUCCIÓN	1
1.1.	Enriquecimiento ambiental (EA) y tipos de EA.....	1
1.2.	Tipos de cajas. Caja Marlau.....	2
1.3.	Evidencias del EA en estructuras cerebrales.....	3
1.4.	La habituación y sus efectos.....	4
1.5.	Justificación del estudio.....	4
2.	OBJETIVOS E HIPÓTESIS	6
3.	MATERIAL Y MÉTODO	7
3.1.	Animales de laboratorio y las condiciones de mantenimiento...	7
3.2.	Equipos y materiales de laboratorio.....	8
3.2.1.	<i>Instrumentos</i>	8
3.3.	Programa de entrenamiento.....	11
3.4.	Análisis estadístico.....	13
4.	RESULTADOS	14
4.1.	Test incremental.....	14
4.2.	Ganancia de peso.....	15
4.3.	Test de campo abierto.....	15
5.	DISCUSIÓN	20
6.	CONCLUSIONES	23
7.	REFERENCIAS	24
8.	ANEXOS	27
8.1.	Anexo 1.....	27
8.2.	Anexo 2.....	28

Resumen

El enriquecimiento ambiental pretende la mejora del bienestar animal proporcionando a los roedores interacción social y alojamiento, así como la posibilidad de llevar a cabo actividad física y estimulación cognitiva, sin causar ningún tipo de daño físico o estrés. En condiciones de alojamiento estándar, los roedores habituados al ejercicio tienen mayor tiempo de carrera durante el test incremental, que los no habituados. En base a ello, el objetivo del presente estudio, basado en un modelo animal de ratas hembra Sprague-Dawley (N=12), es determinar si un ambiente enriquecido puede mejorar la respuesta observada en el test incremental, en los roedores habituados. Además, se pretende determinar, mediante test de comportamiento, la respuesta conductual de los roedores habituados comparados con los no habituados. Para este fin, se diseñó un programa de habituación en entrenamiento en rueda forzada. Los animales fueron divididos en grupo experimental habituado (n=6) y grupo control no habituado (n=6). Los resultados corroboraron nuestra hipótesis, indicando un tiempo de carrera mayor en el grupo experimental tras la realización del test incremental, pero se rechazó nuestra tercera hipótesis específica, ya que el grupo experimental presentó un peor aprendizaje y mayor conducta ansiosa.

Palabras clave: enriquecimiento ambiental, habituación, entrenamiento, rueda forzada, test de campo abierto, rata

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Enriquecimiento ambiental (EA) y tipos de EA

El enriquecimiento ambiental se puede definir como la adaptación de los animales a un entorno que les permita experimentar situaciones novedosas, y aproximarse a los comportamientos propios en la vida libre (Khoshen, 2013). El principal objetivo de un ambiente enriquecido es mejorar el bienestar fisiológico y psicológico de los animales en cautiverio. Este ambiente proporciona estimulaciones sensoriales y motoras que pretenden satisfacer las necesidades conductuales y psicológicas del roedor. Consiguiendo que los animales aumenten las opciones de comportamiento, así como habilidades, reduciendo además la frecuencia de comportamientos anormales (Ben-Ari, 2001; Young, 2003). El EA, viene aplicándose en animales desde los años 60. Dicho modelo surgió de la aplicación en ratas, pero actualmente se extiende a diversos animales. Específicamente en ratas, el paradigma de enriquecimiento ambiental consiste en colocarlas junto con otras ratas en jaulas que presentan diferentes objetos, para la creación de hogares o nidos. De esta manera los roedores serán **estimulados social y sensorialmente** (Denymac, 2016). Por lo tanto, este modelo pretende la mejora del bienestar animal proporcionando a los roedores interacción social y alojamiento, así como la posibilidad de llevar a cabo actividad física y estimulación cognitiva, sin causar ningún tipo de daño físico o estrés (Denymac, 2016).

Existen diferentes tipos de enriquecimiento: social y físico. El enriquecimiento social puede ser con y sin contacto con otros roedores. Cuando el enriquecimiento es con contacto los animales se alojan en parejas o grupos. Sin embargo, cuando el enriquecimiento no incluye contacto, se añade enriquecimiento de tipo visual, auditivo, olfativo, pudiendo ver, escuchar y oler a otros, pero sin mantener contacto físico. El enriquecimiento social hace referencia al número de animales que comparten el alojamiento, el cual debe ser en grupos (National Research Council *et al.* 2011). Relacionarse con otros roedores aporta exploración social, apoyo y la obtención de un mayor control sobre el medio, ayudando a lidiar el estrés y favoreciendo el bienestar del animal (Newberry, 1995; Olsson y Westlund, 2007; Hennessy *et al.* 2009).

El enriquecimiento de tipo físico hace referencia a los estímulos derivados del alojamiento, lo sensorial y lo nutricional. (Denymac, 2016). El enriquecimiento físico en roedores se puede conseguir mediante nidos, refugios y escondites, que pueden determinar un sustrato y alojamiento complejo. El material de los nidos, así como las cajas nido, son imprescindibles para la cría y descanso (Baumans, 2005; Liss *et al.* 2015). Los refugios, permiten a los roedores sensación de seguridad y afrontamiento frente al miedo

o estrés, ya que suelen presentar miedo intenso ante situaciones que les son desconocidas (Buijs *et al.* 2011). Estos alojamientos pueden ser estructuras sencillas como tubos de cartón o PVC o, por el contrario, estructuras ya incorporadas en las jaulas (Verwer *et al.* 2009). El enriquecimiento físico incluye además el enriquecimiento ocupacional, en el cual se incluyen juguetes y objetos novedosos, ya que los roedores pasan gran parte del tiempo investigando el entorno, jugando, trepando, etc., (Liss *et al.* 2015).

El enriquecimiento nutricional consiste en la dispersión y en la variedad de alimentos. Además de dispensar el alimento, ocultarlo, colgarlo o dejar rastros podría motivar y fomentar la escalada o exploración olfativa (Baumans, 2005; Pritchett-Corning *et al.*, 2013).

Finalmente tenemos el enriquecimiento sensorial. El olfato juega un papel muy importante en la comunicación social del roedor (Baumans, 2005). En cuanto al ruido, un excesivo nivel de este puede dar lugar a graves alteraciones fisiológicas (interrupción de la reproducción o canibalismo) (Gómez, 2005). El ruido se puede mitigar añadiendo música tranquila (no más de 80 dbls), encubriendo así los sonidos estresantes (Alworth y Buerkle, 2013).

1.2. Tipos de Cajas. Caja Marlau

En cuanto al tipo de alojamiento de los roedores, los más utilizados son las jaulas llamadas “caja de zapato”, pues tienen una estructura similar a esta. Se componen de diversos materiales (policarbonato, fibra de vidrio y tapa con rejilla de metal o acero inoxidable) (Gómez, 2005). Sin embargo, el enriquecimiento a proporcionar en estas cajas es limitado, siendo más adecuado el uso de cajas de mayor tamaño que permitan incorporar objetos y elementos para enriquecimiento físico del roedor. Para la realización de este estudio, se destaca la jaula Marlau. Se caracterizan por presentar cierta complejidad, ya que los roedores deben moverse por un laberinto (Löwel, Kalogeraki, Dehmel y Makowiecki, 2018). Esta acción se encuentra motivada por la necesidad de buscar alimento (se colocan el agua y los pellets de manera separada en distintos compartimentos). También, presenta una mayor actividad, fomentada por la ampliación en el área de exploración. Asimismo, presenta la variante novedad, puesto que el laberinto es cambiado 3 veces por semana, llegando a tener un total de 12 configuraciones. Por último, ofrece bienestar, pues el alojamiento en grupo de un amplio número de animales (12 ratas) promueven las interacciones sociales (Löwel, Kalogeraki, Dehmel y Makowiecki, 2018). Las jaulas están compuestas de dos pisos. En la parte baja, la jaula se divide en dos compartimentos: G1, donde se encuentran los pellets de comida y G2 donde se encuentra el agua. El piso superior es el que contiene el laberinto. Para

conseguir el alimento, los roedores deberán ir desde el compartimento G2 hasta el laberinto en el piso superior, para llegar hasta G1 por un túnel deslizante. Mientras que para conseguir el agua deberán cruzar unas puertas de plástico que dividen G1 y G2 (Rabadán, Ramos-Campos, Redolat, y Mesa-Gresa, 2019). Por lo tanto, la caja o jaula Marlau es un tipo de alojamiento enriquecido que sirven para la estandarización durante los procedimientos de EA de la función cognitiva, utilizándose laberintos para tal fin. (Rabadán, Ramos-Campos, Redolat, y Mesa-Gresa, 2019).

1.3. Evidencias del EA en estructuras cerebrales

Como producto del enriquecimiento, se han observado efectos en diversas estructuras neuroanatómicas, acompañadas por efectos neuroquímicos y conductuales a largo plazo. En ratas Sprague-Dawley, el EA produce un aumento en el tamaño de la corteza cerebral, aumentando el número de ramificaciones dendríticas de las neuronas y neurogénesis hipocampal, así como una mejoría de las capacidades cognitivas en una variedad de tareas (Peña Oliver y Escorihuela, 2007). Gracias a las investigaciones realizadas sobre el tratamiento de EA se ha demostrado el efecto que ofrece este tipo de alojamiento favoreciendo el aprendizaje y la memoria. Estas evidencias han tenido lugar, por ejemplo, en memoria espacial mediante la utilización del laberinto de agua de Morris o el laberinto radial de 8 brazos. Tales evidencias han sido registradas a nivel conductual y a través de cambios provenientes de la morfología cerebral y neuroquímica, así como de la funcionalidad de distintos sectores del cerebro, tales como el hipocampo (HPC). (Mora Gallegos, Salas Castillo, y Fornaguera, 2017). También, mediante investigaciones en ratas, los animales de mayor edad, en procesos de aprendizaje resultan menos eficientes. Por ejemplo, mediante el uso de distintos modelos del laberinto de agua de Morris, ciertas investigaciones han registrado que las ratas de mayor edad presentan un aprendizaje más lento y cierto déficit en memoria espacial de referencia. Puesto que dichas habilidades cognitivas resultan reducidas como consecuencia del envejecimiento, la puesta en práctica de un modelo de enriquecimiento ambiental (modelo de estimulación), que contribuya al aumento en memoria espacial, así como en la mejora del aprendizaje, puede suponer una mejora de dichas habilidades en distintas edades (Mora Gallegos, Salas Castillo, y Fornaguera, 2017).

Asimismo, en diversos estudios se ha intentado demostrar el efecto beneficioso del ejercicio físico moderado sobre la salud cerebral, en seres humanos, mediante datos conseguidos en modelos experimentales animales. Estos efectos de la actividad física están mediados, en parte, por la inferencia de factores de crecimiento (como por ejemplo el factor neurotrófico BDNF) o por efectos en la neurogénesis hipocampal. Hay evidencias de cómo la estimulación física y cognitiva de duración prolongada en el cerebro, en

contextos de enriquecimiento, proporcionan una disminución en ansiedad, así como una mejoría de la memoria espacial y mejores comportamientos de aprendizaje en ratones C57BL6 WT silvestres. (Hüttenrauch, Salinas y Wirths, 2016). También, se ha evidenciado en ciertos estudios con ratas Sprague-Dawley que, en pruebas de exploración y reconocimiento social, el enriquecimiento ambiental muestra un efecto distintivo en función del sexo, mostrando un aumento en la exploración y reconocimiento social en las ratas macho, pero una disminución en el grupo de ratas del sexo contrario. (Peña Oliver, 2007).

1.4. La habituación y sus efectos

Cabe destacar el papel de los efectos ejercidos por la habituación. Esta se define como aquel proceso de aprendizaje que se da ante un estímulo particular y mediante una exposición repetida al mismo, en el que la respuesta del animal se vuelve menos intensa hacia dicho estímulo (Mora Gallegos, Salas Castillo, y Fornaguera, 2017). En el momento en el que las ratas se exponen a un ambiente novedoso, se produce un incremento de la conducta exploratoria en los roedores, dando lugar a elevados niveles de locomoción y exploración vertical. Esta exposición induce a conflictos entre la exploración y el miedo hacia dicha novedad y lo que se espera es que ese miedo sea superado por el roedor, reduciéndose así tales comportamientos, en un tiempo corto, gracias a las características de la habituación. Por lo tanto, la reducción de los comportamientos de exploración permite al roedor evitar situaciones de peligro. De igual forma, la ausencia de tal patrón de comportamiento, es decir alta exploración al principio seguido de un descenso con el tiempo, sugiere en el roedor altos niveles de impulsividad o carencia de capacidad inhibitoria, ocasionando alta exposición de peligro (Mora Gallegos, Salas Castillo, y Fornaguera, 2017). Los procesos de habituación resultan ser más eficientes en ratas criadas con un ambiente enriquecido si se compara con otros tipos de alojamiento. Los resultados de la investigación de Mora Gallegos, Salas Castillo, y Fornaguera (2017) apoyan lo expuesto anteriormente acerca de la habituación eficiente observada en aquellos roedores que han sido criados en un ambiente enriquecido, mostrando menos comportamientos de locomoción y exploración vertical, pero elevados niveles de conductas de acicalamiento.

1.5. Justificación del estudio

La actividad física depende de la activación de circuitos motores en el sistema nervioso central (Toval et al., 2021). Sin embargo, las adaptaciones periféricas, tales como el incremento de la frecuencia cardíaca, aumento de la hemoglobina, de la disponibilidad de ATP o de la capacidad contráctil del músculo, pueden ser determinantes

en el nivel máximo de respuesta alcanzada (Toval et al., 2020). Actualmente, el grupo de Neurobiología de la Actividad Física de la Universidad de Murcia ha desarrollado un modelo de actividad física en el cual la respuesta parece ser predominantemente mediada por el sistema nervioso central (Toval et al., 2017; 2021). Toval et al. (2017, 2020, 2021) han desarrollado un período de familiarización o habituación al ejercicio que consiste en 8 días de exposición progresiva a una rueda forzada. Finalizada la habituación, se determina la capacidad de respuesta al ejercicio mediante un test de respuesta máxima de carrera (test incremental). En condiciones de alojamiento estándar, los roedores habituados al ejercicio tienen mayor tiempo de carrera durante el test incremental, que los no habituados. Por ello, el objetivo del presente estudio es determinar si un ambiente enriquecido puede mejorar la respuesta observada en el test incremental, en los roedores habituados. Además, se pretende determinar, mediante tests de comportamiento, la respuesta conductual de los roedores habituados comparados con los no habituados.



2. OBJETIVOS E HIPÓTESIS

Hipótesis General. El alojamiento en un ambiente enriquecido mejora la respuesta al test incremental en ratas hembra una vez finalizado el período de habituación mediante un programa de entrenamiento en rueda forzada.

Objetivo General. Determinar si ratas hembra alojadas en un ambiente enriquecido, presentan una mejora en la respuesta al test incremental, una vez finalizado el período de habituación.

Hipótesis específica 1. Ratas hembra habituadas y expuestas a un ambiente enriquecido, tienen un tiempo de carrera aumentado, determinado mediante un test incremental y comparado con un control no habituado.

Objetivo específico 1. Determinar si ratas hembra habituadas y expuestas a un ambiente enriquecido tienen un mayor tiempo de carrera en un test incremental, comparado con un control no habituado.

Hipótesis específica 2. Ratas hembra habituadas y no habituadas presentan diferencias en ganancia de peso, al estar expuestas a un ambiente enriquecido.

Objetivo específico 2. Determinar si ratas hembra expuestas a un ambiente enriquecido, habituadas y no habituadas, presentan diferencias de peso.

Hipótesis específica 3. Ratas hembra expuestas a un ambiente enriquecido y habituadas al entrenamiento en rueda forzada presentan una mejora en el aprendizaje y disminución de ansiedad, determinado mediante test de campo abierto.

Objetivo específico 3. Determinar si ratas hembra expuestas a un ambiente enriquecido y habituadas al entrenamiento en rueda forzada, presentan diferencias en la conducta en la habituación intrasesión e intersesión en campo abierto, comparadas con ratas hembra expuestas a un ambiente enriquecido y no habituadas al entrenamiento en rueda forzada.

3. MATERIAL Y MÉTODO

3.1. Animales de laboratorio y las condiciones de mantenimiento

Los animales utilizados para realizar esta investigación han sido tratados acorde a la normativa española (Real Decreto 1201/2005, de 10 de octubre, B.O.E. nº 252, 21 de octubre de 2005, paginas 34367-34391) y la Directiva de la Unión Europea (2003/65/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 22 de julio de 2003, por la que se modifica la Directiva 86/609/CEE) respecto a la protección de los animales utilizados para la experimentación y otros procedimientos científicos (Guía para el cuidado y Uso de animales de laboratorio). Aprobación por parte del Comité Ético de Experimentación Animal de la Universidad de Murcia. (Véase Anexo 1)

Los experimentos se realizaron en 12 ratas hembra Sprague-Dawley (SD), en etapa adolescente. Los animales fueron facilitados por el Servicio de Animales de Laboratorio de la Universidad de Murcia, siendo proporcionados al Centro de Experimentación Integrada Biosanitaria (CEIB) del Instituto Murciano de Investigación Biosanitaria Virgen de la Arrixaca (IMIB), en el día post-natal 20, día en el que comenzaban el periodo de adolescencia. Las ratas fueron alojadas en el interior de dicho centro (CEIB), concretamente en las zonas de trabajo SPF (*Specific Pathogen Free*), garantizando de esta manera una barrera y un ambiente libre de patógenos específicos asociados al medio exterior, minimizando lo máximo posible distintos sesgos experimentales que puedan ser derivados de problemas de salud, así como del estado anímico de los animales. La temperatura ambiente se mantuvo a $22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2.8\text{ }^{\circ}\text{C}$, humedad relativa a 68-91% y reposición del aire a 10 ciclos por hora.

Las ratas Sprague-Dawley son animales nocturnos, las horas que conforman la noche es cuando ellas presentan su mayor actividad fisiológica. Es por ello, que su condición nocturna complica la actividad investigadora (Oster et al., 2017), decidiéndose invertir el fotoperiodo de las ratas desde el primer día que fueron llevadas a la zona SPF. Los ciclos de luz-oscuridad fueron controlados desde un panel que se encuentra en la zona SPF, el cual está regulado en horas, permitiendo la elección de los intervalos de luz que se requieran para la investigación. Se estableció un fotoperiodo que comprendía 12 horas de oscuridad y 12 horas de luz. El periodo de oscuridad daba comienzo a las 06.30h y finalizaba a las 18.30h. Durante este periodo, con el fin de habituar las ratas a la voz humana, lo que permitirá que los investigadores puedan dialogar sin que se provoque estrés en los animales, fueron expuestos a escuchar la emisora de radio "Cadena Dial".

3.2. Equipos y Materiales de laboratorio.

3.2.1 Instrumentos

Caja enriquecimiento Marlau. Las ratas fueron alojadas en una caja Marlau (Figura 1a y 1b). Esta les proporciona bienestar, ya que como se mencionó anteriormente, el alojamiento en grupo de un amplio número de animales (12 ratas) promueven las interacciones sociales (Löwel, Kalogeraki, Dehmel & Makowiecki, 2018). La caja Marlau se compone de dos pisos equipados con túnel, nido, escalera y laberinto. Las medidas de la caja son: Largo: 80 cm x Ancho: 60 cm x Alto: 51 cm. Estas dimensiones de la jaula, así como el número de animales asignado por jaula, garantizan a estos la amplitud suficiente para que prosperen óptimamente.

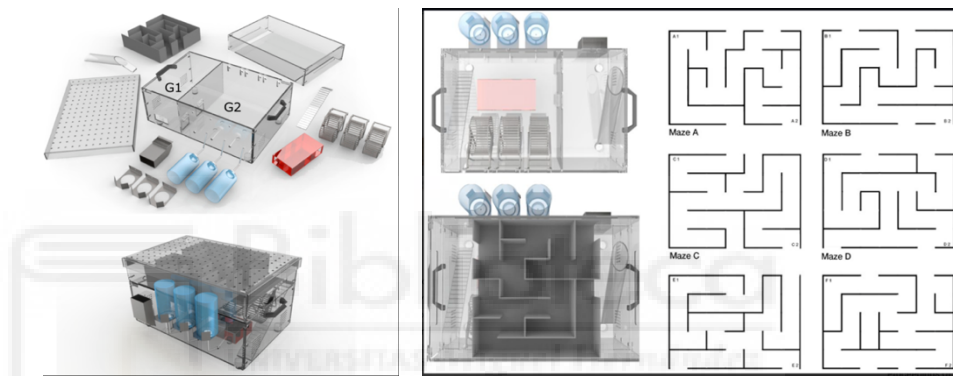


Figura. 1a. Fares, R. P., Kouchi, H., & Bezin, L. (2012). Estructura caja Marlau y disposición de las diferentes formas de laberinto en caja Marlau [Figura]. Recuperado de

<https://protocolexchange.researchsquare.com/article/nprot-2436/v1>



Figura 1b. Caja Marlau y laberinto utilizado en el estudio.

Elaboración propia

Báscula Nahita, modelo PCE-BS 3000; precisión 0,01 g (Véase Figura 2)



Figura 2. Báscula Nahita 3000 g; Elaboración propia

Ratódromo equipado con 12 ruedas (Véase Figura 3), ruedas y telas para cubrir el interior de las ruedas (Véase Figura 4)

El ejercicio físico se realizó en rueda forzada adaptada para ratas. Este dispositivo pertenece a la empresa Lafayette, modelo 80805-A/80806 con las siguientes medidas: 129.54 x 45.47 x 42.93 cm. Dicho aparato posee un rango de velocidad desde 1 metro/minuto a 28 metros/minuto. La resolución de velocidad es de 0.5 m/min.



Figura 3. Forced Exercise / Walking Wheel System for Rats de la empresa Lafayette Neuroscience. Modelo 80805. Elaboración propia

Ruedas. Las ruedas presentan el mismo modelo y pertenecen a la misma empresa que el dispositivo para ejercicio en rueda forzada (modelo 80806). Éstas presentan dos superficies de policarbonato en su estructura,

las cuales van unidas centralmente por unas barras de aluminio, ofreciendo soporte para los animales en los entrenamientos. Como se puede visualizar en la figura 4, el exterior se encuentra reforzado por una malla verde elástica, aportando al roedor mayor consistencia y soporte.

Desventaja: los roedores cuando se sienten cansados o simplemente ya no quieren seguir corriendo deciden engancharse a las barras de aluminio y a la malla. Lo que daría lugar a la obtención de datos sesgados y a un entrenamiento no homogéneo entre los sujetos del estudio. Para mitigar este problema, se recurrió a la utilización de unas telas con velcro, las cuales se adhieren en el interior del soporte de la rueda (barras de aluminio) descartando la probabilidad de aparición de dicha conducta y dando lugar a un entrenamiento libre de incidentes (Véase Figura 4)

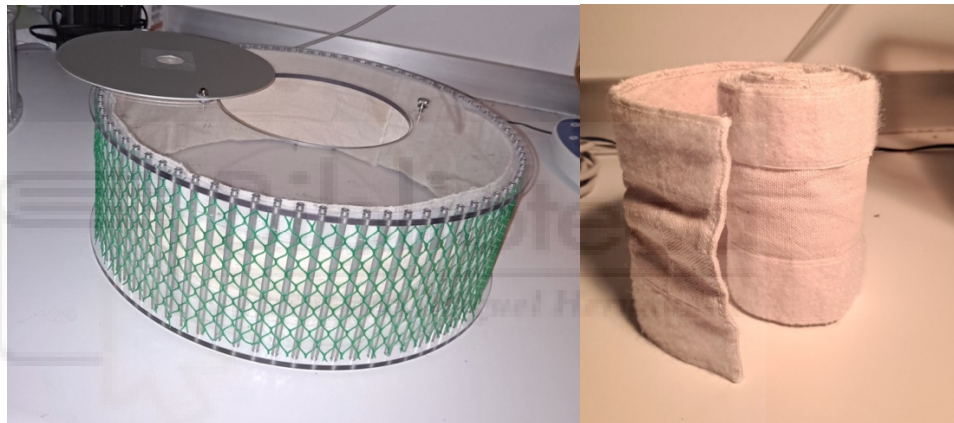


Figura 4. Rat exercise/ Walking Wheel de la empresa Lafayette Neuroscience. Modelo 80806. Tela con velcro que recubre el interior de la rueda. Elaboración propia.

Cajón para test en campo abierto (Véase Figura 5)

El test en campo abierto se llevó a cabo en un cajón cuadrado de madera contrachapada blanca (100cm ancho x 100cm largo x 40cm alto). La superficie se dividió en 16 cuadrados exteriores y 9 cuadrados interiores de las siguientes medidas: 20 x 20 cm.

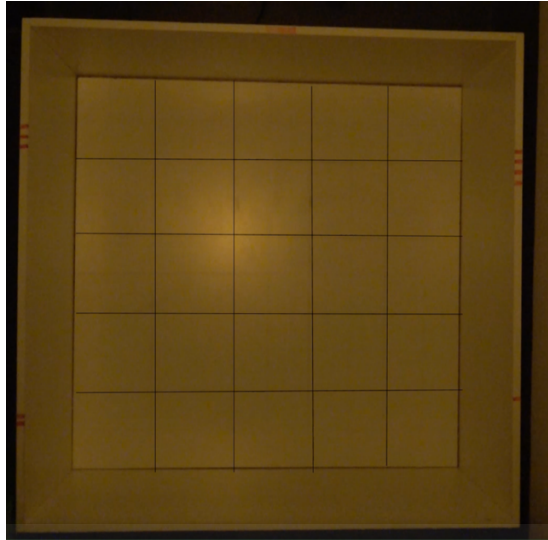


Figura 5. Cajón Test de Campo Abierto. Elaboración propia.

3.3. Programa de entrenamiento

El programa abarcó un total de 4 semanas. En cada una de estas semanas se llevó a cabo un tipo de entrenamiento, los cuales se caracterizan por perseguir distintos objetivos. Es importante destacar que el peso de los animales se llevó a cabo antes de proceder al entrenamiento correspondiente en cada sesión. A continuación, se exponen los objetivos que se corresponden con cada una de las semanas, así como la metodología empleada. Para una mayor contextualización del programa de entrenamiento, consultar el Anexo 2.

Semana de Pre-adaptación

El objetivo principal derivado de esta semana consiste en disminuir máximamente una serie de variables extrañas que pudieran influir en la conducta de los roedores y por consiguiente en la investigación. Estas variables provienen especialmente del estrés situacional y el proporcionado por el investigador. Además, en esta semana tuvo lugar la aplicación de la técnica de randomización, mediante la cual se produce la distribución de 12 animales, en forma aleatoria, al grupo

experimental o al grupo control, constituidos por el mismo número de individuos. La randomización tuvo lugar el primer día de llegada de los roedores.

En esta semana también se aplicó la técnica *Handling*. durante 5 días. Dicha técnica se realizó de manera individual en cada rata, con una duración de 2-3 minutos. La técnica consiste en coger a cada rata para que se queden con el olor y el trato del investigador, descartando a este último como una amenaza o causante de estrés. Es importante destacar que el investigador no emplee perfume, pero si lo hiciera, este debe ser siempre el mismo para que los roedores puedan identificarlo. Además, cabe destacar que la técnica *Handling* provoca la disminución en las concentraciones de corticosterona tras la manipulación continuada en ratas Sprague-Dawley (Deutsch-Feldman, Picetti, Seip-Cammack, Zhou y Kreek, 2015).

Semana de habituación

El entrenamiento al que fueron sometidas las ratas consistió en 10 sesiones de habituación distribuidas durante 8 días. Estas sesiones se caracterizaron por presentar un entrenamiento gradual, es decir que tanto la intensidad (velocidad) como el tiempo que se corre va aumentando en cada sesión, siguiendo un patrón progresivo ascendente. En dicho entrenamiento, solo en las ruedas de las ratas experimentales se produjo movimiento a diferentes velocidades, mientras que las ruedas del grupo control siempre permanecieron estáticas. (Para más detalle del entrenamiento de habituación, véase el anexo 2)

Concluida la sesión de habituación, se procedió a la limpieza de la sala de experimentación usada, ruedas y telas.

Test incremental

Tras finalizar el periodo de habituación se procedió a la realización del test incremental, el cual tuvo lugar 24 horas después de la última sesión de habituación (sesión 10). Este test consiste en el aumento progresivo de la velocidad de las ruedas forzadas, alcanzando como máximo una velocidad de 25 metros por minuto y siendo detenido cuando el investigador lo cree oportuno. El investigador iniciará una cuenta atrás de 20 segundos cuando se observe que la rata comienza a dejar de correr, mostrando fatiga, retirándose la rueda del ratódromo. Seguidamente, se anotó el tiempo que corrió cada rata para, posteriormente, realizar comparaciones entre los grupos experimental y control.

Test de Campo Abierto

El test de campo abierto se llevó a cabo el segundo día tras la realización del último test incremental. La prueba de campo abierto tuvo una duración de 15 minutos, dejando a los roedores explorar este entorno nuevo, el cual no supone una aversión o, por el contrario, un estímulo apetitivo. Consta de dos sesiones repartidas en dos días consecutivos. El primer día: prueba de adquisición (AT) el segundo día: prueba de retención (RT). (Popović et al., 2017, 2020). Ambas sesiones se llevaron a cabo bajo las mismas condiciones ambientales, además de medir en ambas las mismas variables. Los parámetros que se registraron fueron los siguientes: número de cuadrados exteriores e interiores cruzados, latencia en ingreso a los primeros cuadrados internos, así como latencia a la primera actividad exploración vertical, latencia hasta la actividad de acicalamiento, y, por último, número de deposiciones fecales (Popović et al., 2017, 2020). Los datos fueron agrupados en 3 bloques de tiempo: primer bloque (1-5 min), segundo bloque (6-10 min) y un tercer bloque (11-15 min). Dado que surgen diferencias individuales en el estudio de los parámetros, se utilizó una puntuación que comparó la conducta durante la sesión de “entrenamiento” y de “prueba”. Dicha puntuación se calculó según los criterios establecidos por Bolívar (2009): valor del parámetro del segundo día dividido por la suma del valor del primer día más el valor del segundo día. Por lo que, si la puntuación se acerca a 0,5, indica que no se ha producido cambio en la conducta (habitación). Pero si el valor se acerca a 0, existe certeza de habituación (Popović et al., 2017, 2020)

3.4. Análisis estadístico

El análisis estadístico de esta investigación se realizó a través de los programas informáticos SPSS IBM 25 y Graphpad Prism 9.0.0. y Excel. Los datos se presentan como media \pm desviación estándar. Mediante la prueba **Shapiro-Wilk** se evaluó si los datos seguían una distribución normal. Todos los datos obtenidos seguían la distribución normal ($p > 0,05$), por lo que se realizó la comparación entre grupos mediante los tests paramétricos. La ganancia de peso y la habituación intrasesión en los días 1 y 2 en el campo abierto se analizaron mediante la prueba **ANOVA de medidas repetidas** (Modelo Lineal General). La comparación de medias en test incremental y datos en los días 1 y 2 del campo abierto entre grupo experimental y grupo control, se realizó a través la prueba **T-Student para muestras independientes**. Además, se llevó a cabo un **análisis mediante T-Student para muestras pareadas**, para comparar los datos del mismo grupo entre el día 1 y el día 2 del test de campo abierto (habitación intersesión). La existencia de relación entre

las variables observadas en el test campo abierto y los datos obtenidos en el test incremental se analizó mediante la **prueba de correlación de Pearson**. Las diferencias se consideraron significativas para $p \leq 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1. Test incremental

Los resultados que se obtuvieron del test incremental mostraron un tiempo medio de carrera (minutos) para el **grupo experimental** de $39,96 \pm 9,06$ minutos, habiendo realizado previamente un programa de entrenamiento en habituación. (Véase figura 6.). Mientras que el **grupo control** mostró un tiempo medio de carrera de $21,61 \pm 12,43$ minutos, no habiendo realizado previamente un programa de entrenamiento en habituación. (Véase figura 6). La prueba **T-Student para muestras independientes**, demostró diferencias estadísticamente significativas ($t = -2,922$, $gl=10$, $p= 0,015$) en el tiempo corrido entre los grupos experimental y control.

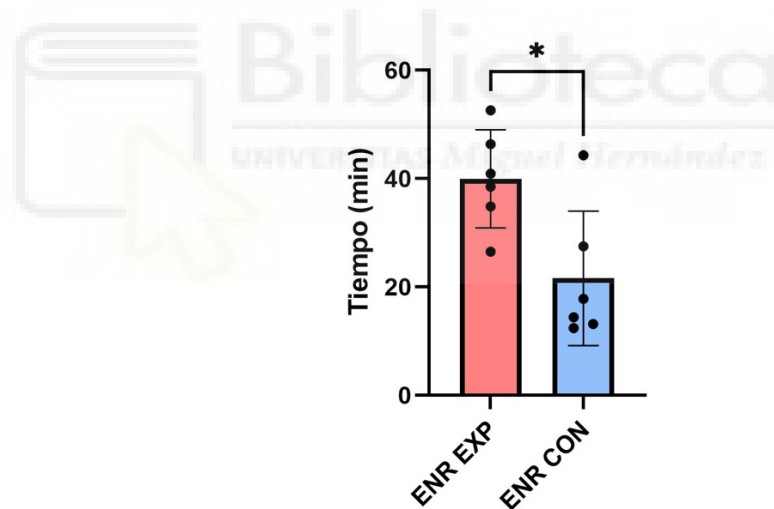


Figura 6. Tiempo en minutos corrido por cada rata hembra en test incremental. Resultado de la media y desviación estándar. Elaboración propia.

4.2. Ganancia de peso

La variable peso fue medida durante todo el proceso de investigación. El peso fue medido cada día antes de comenzar la sesión de entrenamiento en ambos grupos. El test **Anova para medidas repetidas** demuestra que, con el **paso del tiempo**, aumenta significativamente el peso de los animales ($F= 864,075$, $gl=1$, $p=0,001$). No se encontró efecto significativo **entre grupos e interacción entre grupo y tiempo** ($F= 0,025$, $gl=1$, $p=0,876$; $F=0,172$, $gl=1$, $p=0,687$ respectivamente) (Véase figura 7).

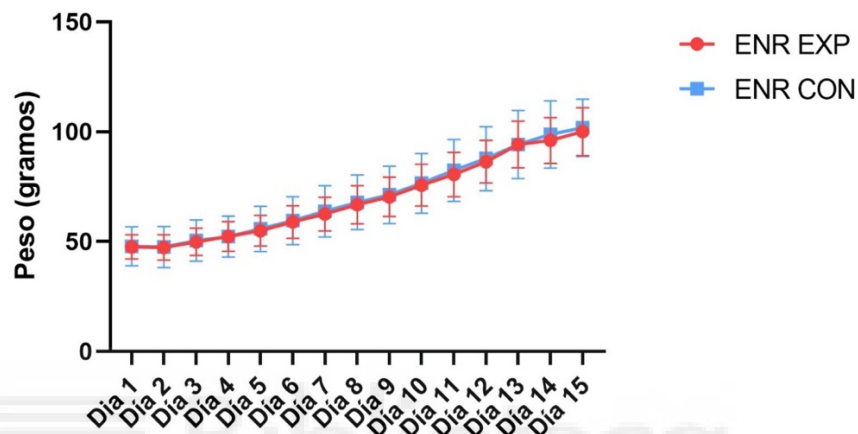


Figura 7. Gráfico de la evolución del peso en grupo experimental y grupo control. Elaboración propia.

4.3. Test de Campo Abierto

El test **Anova para medidas repetidas** demuestra que en ambas sesiones (día 1 y día 2), con el **paso del tiempo**, disminuye significativamente la actividad motora en la zona periférica (cuadrados exteriores cruzados) ($F= 307,735$, $gl=1$, $p=0,001$; $F=154,131$, $gl=1$, $p=0,001$, respectivamente) y zona central (cuadrados interiores cruzados) ($F= 59,889$, $gl=1$, $p=0,001$; $F=102,211$, $gl=1$, $p=0,001$, respectivamente) del campo abierto, así como la actividad de exploración vertical (Véase figura 10, 11 y 12) ($F= 56,597$, $gl=1$, $p=0,001$; $F=13,200$, $gl=1$, $p=0,005$, respectivamente). Por el contrario, con el paso del tiempo, aumenta la actividad de acicalamiento ($F= 13,208$, $gl=1$, $p=0,005$; $F=9,434$, $gl=1$, $p=0,012$, respectivamente) (Véase figura 13). También demostró efecto significativo **entre grupos e interacción entre grupo y tiempo** trascurrido en actividad motora en la zona central, en el día 1 de adquisición ($F= 13,509$, $gl=1$, $p=0,004$; $F=21,703$, $gl=1$, $p=0,001$, respectivamente). (Véase figura 9a).

La prueba **T-Student para muestras independientes**, solamente indicó diferencias significativas entre grupos en el primer día del test. La latencia para entrar en la parte central del campo abierto fue más corta en el grupo control ($t = -3,858$, $gl=10$: $p=0,003$) que en el grupo experimental. (Véase figura 8). La actividad total en la zona central, así como la actividad en dicha zona durante los primeros cinco minutos, fue más alta en el grupo control ($t = -3,676$, $gl=10$: $p=0,004$; $t = 4,669$, $gl=10$: $p=0,001$, respectivamente). (Véase figuras 9a y 11). Además, el número de bolos fecales fue más alto en los animales del grupo control ($t = 2,449$, $gl=10$: $p=0,034$). (Véase figura 9b).

Además, demostró que la puntuación para defecación (Véase figura 14) así como la puntuación de actividad en el centro (primeros cinco minutos) (Véase figura 15) el fue más bajo en los animales del grupo control ($t = -2,345$, $gl=10$: $p=0,041$; $t = -2,762$, $gl=10$: $p=0,020$, respectivamente) comparado con el grupo experimental

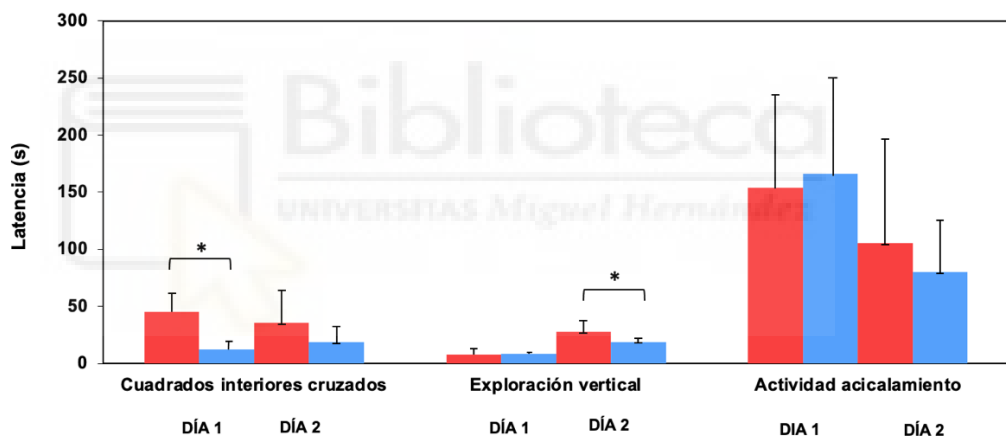


Figura 8. Latencia de los parámetros de cuadrados exteriores cruzados, exploración vertical y actividad de acicalamiento. Días 1 y 2. Elaboración propia

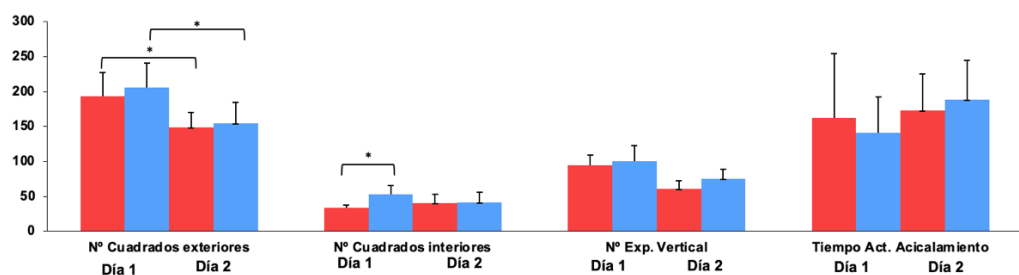


Figura 9a. Valores totales en cada parámetro en ambos grupos. Elaboración propia.

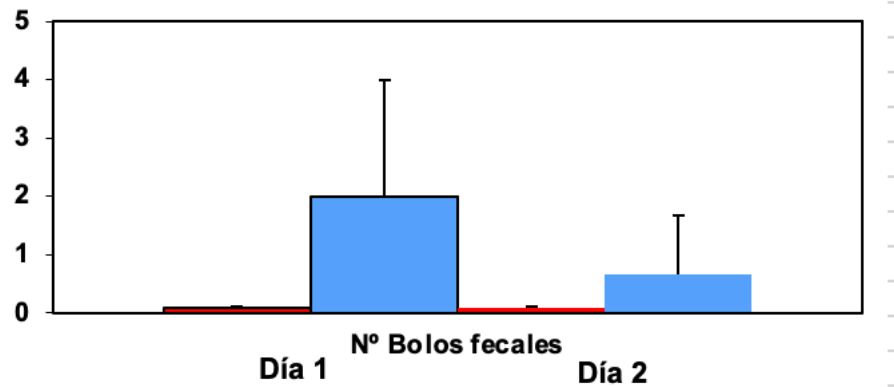


Figura 9b. Número de Bolos fecales. Elaboración propia

La prueba de T-Student para muestras relacionadas indicó que, en ambos grupos, en el día 2, comparando con el día 1, disminuyó significativamente la actividad total en la zona periférica (cuadrados exteriores) del campo abierto ($t=2,6059$, $gl=5$: $p=0,048$; $t=7,711$, $gl=5$, $p=0,001$, respetivamente) (Véase figura 9a) y en particular en los primeros cinco minutos del test ($t=3,031$, $gl=5$: $p=0,029$; $t=3,909$, $gl=5$, $p=0,011$, respetivamente). (Véase figura 10).

En ambos grupos, la latencia para realizar la primera exploración vertical (Véase figura 8), aumentó significativamente en el día 2 del test de campo abierto ($t=-8,1749$, $gl=5$: $p=0,001$; $t=-5,085$, $gl=5$, $p=0,004$, respetivamente) disminuyendo el número total de exploraciones verticales ($t=4,642$, $gl=5$: $p=0,005$; $t=5,409$, $gl=5$, $p=0,003$, respetivamente) (Véase figura 9a), particularmente en los primeros cinco minutos ($t=4,897$, $gl=5$: $p=0,004$; $t=4,531$, $gl=5$, $p=0,006$, respetivamente) (Véase figura 12). Esta prueba demostró que solamente en el grupo control la actividad en la zona central, así como la exploración vertical disminuyeron significativamente el día 2, en el periodo de 6 a 10 min de actividad ($t=3,230$, $gl=5$: $p=0,023$; $t=2,771$, $gl=5$, $p=0,039$, respetivamente). (Véase figuras 11 y 12)

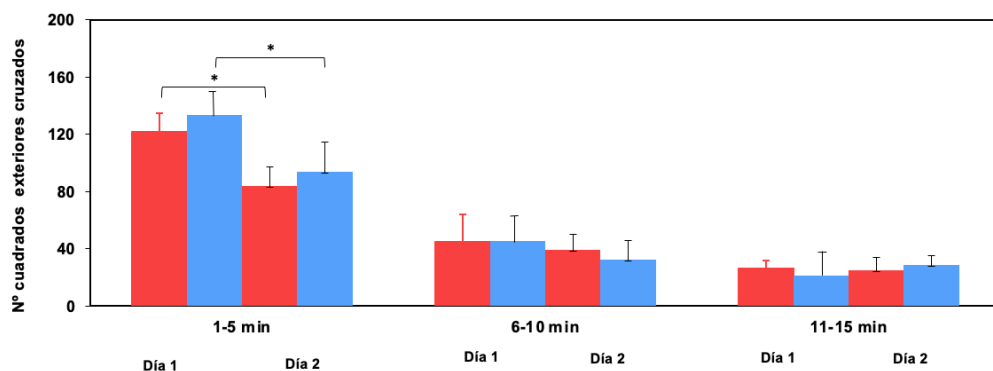


Figura 10. Número de cuadrados exteriores cruzados en ambos grupos.
Separación por bloque de tiempo. Elaboración propia

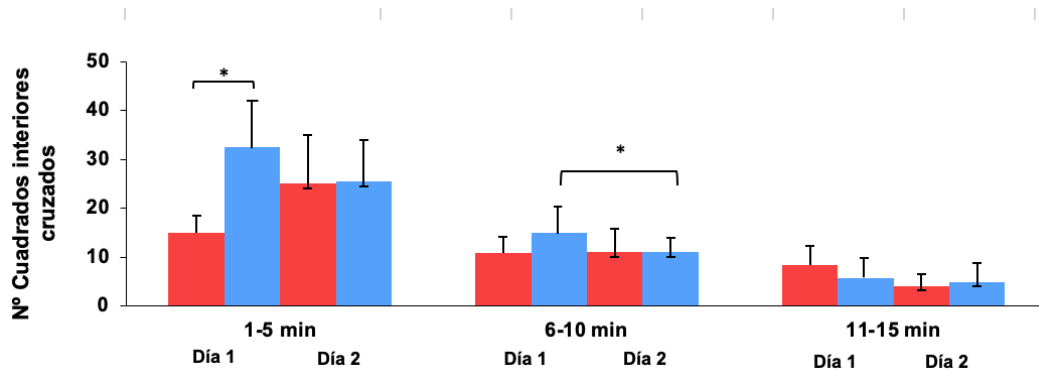


Figura 11. Número de cuadrados interiores cruzados en ambos grupos.
Separación por bloque de tiempo. Elaboración propia

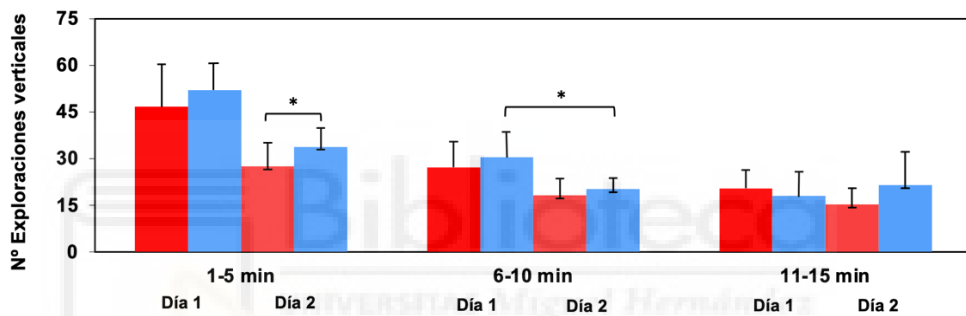


Figura 12. Número de exploraciones verticales en ambos grupos. Separación por bloque de tiempo. Elaboración propia

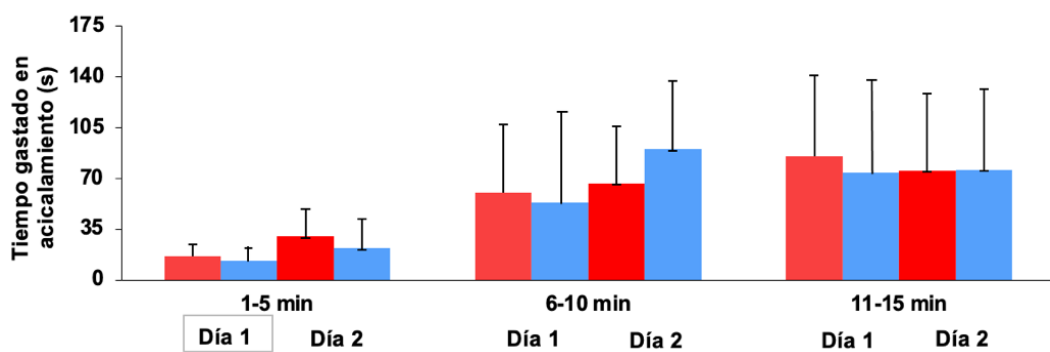


Figura 13. Tiempo gastado en acicalamiento (s) en ambos grupos.
Separación por bloque de tiempo. Elaboración propia

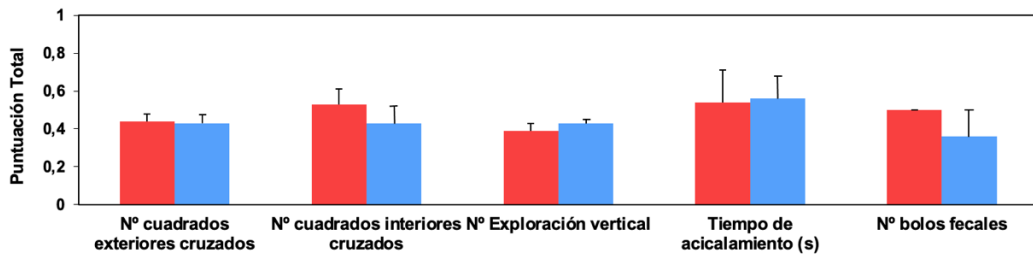


Figura 14. Puntuación en habituación. Elaboración propia.

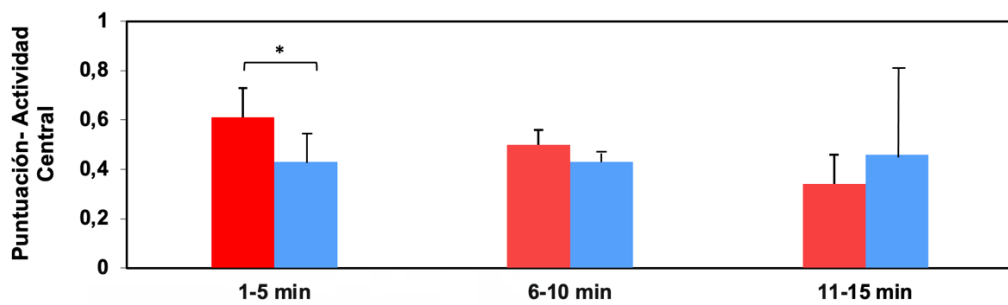


Figura 15. Puntuación Actividad central. Elaboración propia.

Por último, mediante la **prueba de Correlación de Pearson** en el puntaje de habituación, el grupo control no mostró ningún dato estadísticamente significativo. Sin embargo, el grupo experimental mostró para la actividad total de la zona periférica (cuadrados exteriores), tiempo de latencia y actividad total de en exploración vertical, correlación inversa con los valores del test incremental ($r = -0,831, p = 0,040$; $r = -0,918, p = 0,01$; $r = -0,860, p = 0,028$, respectivamente)

5. DISCUSIÓN

Mediante la realización de este estudio se pretende observar si en una misma población de ratas hembra adolescentes (N=12), que se encuentran en las mismas condiciones ambientales (ambiente enriquecido), se dan diferencias entre grupo control y experimental en los tiempos de carrera tras el test incremental y si se dan diferencias en el aprendizaje mediante la realización de test de campo abierto.

En primer lugar, se analizó si existían diferencias en el tiempo de carrera que realizaron las ratas medido a través de test incremental, finalizado el periodo de entrenamiento en habituación. Los resultados indicaron que había diferencias estadísticamente significativas entre los grupos en el tiempo de carrera. Por lo que, estos resultados se asemejan con otros programas de habituación llevados a cabo por otros autores en los que se obtienen una mejoría de los tiempos de carrera. Toval et al. (2017, 2020, 2021).

El estudio llevado a cabo por Toval et al (2017) sobre entrenamiento en sistema de rueda en carrera forzada en roedores alojados en un ambiente no enriquecido, obtuvo datos estadísticamente significativos en los tiempos de carrera de los sujetos. El estudio se conformó por dos grupos de roedores, por un lado, un grupo control (no entrenado), obteniendo una media en el tiempo de carrera de $5,42 \pm 0,5$ minutos. Entretanto, el grupo experimental (entrenado) obtuvo una media de $31,70 \pm 1,8$ minutos, dando lugar a diferencias estadísticamente significativas en el tiempo de carrera entre ambos grupos. Resumiendo, estos autores señalaban que la respuesta al test incremental era mejorada cuando los roedores presentaban un periodo de entrenamiento en habituación. Sin embargo, las diferencias existentes entre los tiempos de carrera del grupo control de este estudio (5,42 minutos) y el obtenido en nuestro estudio (21,61 minutos) puede ser explicada porque el grupo control de este estudio fue alojado en una caja control, es decir, no mantuvo contacto con la rueda forzada, únicamente mantuvieron trato con esta el día del test incremental (Toval et al., 2017), mientras que nuestro grupo control si mantuvo contacto durante el periodo de entrenamiento en habituación, aunque la rueda se mantuvo inmovilizada.

Sin embargo, estos mismos autores, Toval et al (2021) recientemente llevaron a cabo un estudio similar en el que se observó para el grupo control (no entrenados en habituación) que el tiempo medio de carrera tras el test incremental fue de $16,65 \pm 1,11$ minutos y $36,75 \pm 2,52$ minutos para el grupo experimental (habituado). De manera que, si se compara el tiempo medio de carrera obtenido por este experimento con los

datos obtenidos en nuestro estudio, por un lado, grupo experimental $39,96 \pm 3,69$ minutos, y, por otro lado, grupo control, $21,61 \pm 5,07$ minutos, se puede ver que escasamente existen diferencias. La investigación llevada a cabo por estos autores (Toval et al., 2021) y nuestro trabajo coinciden en presentar test incremental. **Por consiguiente, se podría inferir que tanto roedores habituados y no habituados, alojados en un ambiente enriquecido, como aquellos roedores habituados y no habituados y que no se encuentra en un ambiente enriquecido, obtienen tiempos de carrera al test incremental similares.**

En segundo lugar, se analizó si existían diferencias entre grupo control y experimental en el aprendizaje tras la realización de un test comportamental, test de campo abierto. Los resultados parecían indicar que los roedores que conformaron el grupo experimental se mostraban mas ansiosos que aquellos que pertenecían al grupo control.

En un experimento llevado a cabo por diferentes autores, Brenes, Padilla, y Fornaguera (2009) sobre la habituación en test de campo abierto compararon tres grupos experimentales de ratas SD. Dos de los grupos experimentales se alojaron en jaulas de policarbonato, un grupo bajo aislamiento (SI) y otro en alojamiento grupal de tres ratas (SC) y un tercer grupo, alojado en un ambiente enriquecido. Se encontró una habituación de todos los animales al test de campo abierto, reflejado en el descenso gradual y significativo de la función locomotora ($p < 0,001$; $p < 0,002$). Además, se encontraron diferencias entre los grupos en la función locomotora comportándose de manera similar los roedores SI y SC en los minutos 1,4 y 6. Sin embargo, las ratas SI junto con el grupo SC, mostraron frecuencia de cruce mas alta que el grupo enriquecido. También, el grupo enriquecido mostró las puntuaciones más bajas en cuanto a la distancia recorrida en la zona central y el grupo SI las más altas. Si comparamos estos datos con los resultados de nuestro estudio, en ambos grupos se produjo aprendizaje, desarrollando **habituación al test de campo abierto**, reflejado en una disminución gradual de la actividad locomotora. También en nuestro estudio, si comparamos los datos del grupo control con el grupo experimental se observan diferencias en la **actividad motora, siendo mayor la del grupo control no habituado durante la prueba de adquisición (primer día), expresando menor ansiedad respecto al grupo experimental. También se encontró que aquellos roedores que habían obtenido una mejor respuesta en el test incremental obtuvieron una peor correlación en el aprendizaje del test de campo abierto.**

En otro estudio llevado a cabo por Elliott y Grunberg, (2005), se comparó la actividad en test de campo abierto en ratones. Se dividió en cuatro condiciones de alojamiento (alojamiento no enriquecido física o socialmente, alojamiento enriquecido físicamente, alojamiento enriquecido socialmente y alojamiento con enriquecimiento físico y social) mostrando mayores niveles de actividad los animales aislados que aquellos enriquecidos socialmente. Si comparamos estos resultados con nuestro estudio se puede ver como aquellos animales que no fueron habituados presentaron una mayor actividad frente a aquellos que previamente habían sido entrenados en rueda forzada, obteniendo datos contrarios a lo que se enmarcó en nuestra hipótesis específica 3.

Por lo tanto, estos datos obtenidos podrían sugerir que un entrenamiento previo en habituación al ejercicio en rueda forzada no se traduce en una mejora al aprendizaje del test de campo abierto. Como mencionan Sáenz, Villagra, y Trías, (2006) el EA utilizado para la mejora del bienestar del animal ha indicado una disminución de la actividad en un entorno novedoso, como sería el test en campo abierto, respecto a aquellos animales que fueron alojados en condiciones mas pobres.

Como futura línea de investigación se deberían estudiar los cambios de plasticidad a nivel cerebral que demuestren el efecto de un ambiente enriquecido y uno no enriquecido en la respuesta al test incremental. El laboratorio actualmente esta llevando a cabo estudios de RT-qPCR para evaluar dichos cambios. Además, se debería analizar cuáles son los grupos neuronales principalmente activados durante el test incremental en ambas condiciones ambientales. Para ello, se debería llevar a cabo estudios de inmunohistoquímica para determinar mediante la expresión de C-fos los grupos neuronales activados.

6. CONCLUSIONES

En relación con la hipótesis específica 1 y el objetivo específico 1 se puede concluir que ratas hembra habituadas **presentan un tiempo de carrera mayor** tras la realización del test incremental y en comparación a ratas hembra no habituadas

En relación con la hipótesis específica 2 y el objetivo específico 2 se puede concluir que **no existen diferencias estadísticamente significativas en la ganancia de peso** entre grupo de ratas hembra habituadas y no habituadas

En relación con la hipótesis específica 3 y el objetivo específico 3 podemos concluir que ratas hembra expuestas a un ambiente enriquecido y habituadas **presentan respecto al grupo control no habituado un peor aprendizaje y mayor conducta ansiosa.**



7. REFERENCIAS

- Alworth, L. C., Buerkle, S. C. (2013). The effects of music on animal physiology, behavior and welfare. *Lab Animal Europe*. 13(2): 54–61.
- Baumans, V. (2005). Environmental Enrichment for Laboratory Rodents and Rabbits: Requirements of Rodents, Rabbits, and Research. *Science & Mathematics*. 46 (2): 162-170.
- Baumans, V. y Van Loo, P. L. P. (2013). How to improve housing conditions of laboratory animals: The possibilities of environmental refinement. *The Veterinary Journal*. 195 (1): 24–32
- Ben-Ari. E.T. (2001). What's New at the Zoo? *Biological Sciences*. 51(3): 172-177.
- Boivin, G. P. (2013). Availability of feces-free areas in rodent shoebox cages. *Lab Animal Europe*. 13(5): 13–21
- Brenes, J. C., Padilla, M., & Fornaguera, J. (2009). A detailed analysis of open-field habituation and behavioral and neurochemical antidepressant-like effects in postweaning enriched rats. *Behavioural brain research*, 197(1), 125-137.
- Buijs, S; Keeling L. J; Rettenbacher S; Maertens, L; Tuytens FA. (2011). Glucocorticoid metabolites in rabbit faeces influence of environmental enrichment and cage size. *Physiology and Behavior*. 104: 469–473.
- Denymac. (2016). Enriquecimiento ambiental para animales de laboratorio. Mexico. <http://www.enriquecimiento.net/>
- Deutsch-Feldman, M., Picetti, R., Seip-Cammack, K., Zhou, Y., & Kreek, M. J. (2015). Effects of handling and vehicle injections on adrenocorticotropin and corticosterone concentrations in Sprague–Dawley compared with Lewis rats. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*, 54(1), 35-39.
- Elliott, B. M., & Grunberg, N. E. (2005). Effects of social and physical enrichment on open field activity differ in male and female Sprague–Dawley rats. *Behavioural brain research*, 165(2), 187-196.
- FARES, R. P., KOUCHI, H., & BEZIN, L. (2012). Standardized environmental enrichment for rodents in Marla cage.
- Gallegos, A. M., & Castillo, S. S. (2014). Modelos animales de miedo y ansiedad: descripciones neuro-conductuales. *Actualidades en psicología*, 28(117), 1-12.
- Gómez, C. L. (2005). Normas básicas para la mantención de ratones y ratas de laboratorio. *TecnoVet*, 11(2), ág-20.
- Halit, K (2013). Enriquecimiento y bienestar de mamíferos en cautiverio. Manual para Centro y Sur América. (Primera Edición). Panamá, Republica de Panamá.

- Hüttenrauch, M., Salinas, G., & Wirths, O. (2016). Effects of long-term environmental enrichment on anxiety, memory, hippocampal plasticity and overall brain gene expression in C57BL6 mice. *Frontiers in molecular neuroscience*, 9, 62.
- Hylander, B. L y Repasky, E. A. (2016). Thermoneutrality, Mice and Cancer: A Heated Opinion. *Trends in Cancer*. 2(4):166-17
- Liss, C; Litwak, K; Tilford, D; Reinhardt, V. (2015). Comfortable Quarters for laboratory animals. Pennsylvania, Washington DC, U. S. A. Animal Welfare Institute. pp: 1-252.
- Löwel, S., Kalogeraki, E., Dehmel, S., & Makowiecki, K. (2018). Environmental conditions strongly affect brain plasticity. *Neuroforum*, 24(1), A19-A29.
- Mesa Gresa, P. (2014). Desarrollo de un paradigma de enriquecimiento ambiental y su potenciación mediante agonistas nicotínicos: efectos conductuales en ratones
- Mora Gallegos, A., Salas Castillo, S., & Fornaguera Trías, J. (2017). Efectos del enriquecimiento ambiental dependiente de la edad en el comportamiento, funciones cognitivas y neuroquímica.
- Oster, H., Challet, E., Ott, V., Arvat, E., de Kloet, E. R., Dijk, D. J., ... & Van Cauter, E. (2017). The functional and clinical significance of the 24-hour rhythm of circulating glucocorticoids. *Endocrine reviews*, 38(1), 3-45.
- Peña Oliver, Yolanda; Escorihuela, Rosa María, dijo. El Enriquecimiento ambiental en ratas:: Efectos diferenciales en funciones del sexo. Bellaterra: Universidad Autónoma de Barcelona, 2007. ISBN 9788469073612. Tesis doctoral - Universidad Autónoma de Barcelona, Facultad de Medicina, Departamento de Biología Celular, Fisiología e Inmunología, 2007 <<https://ddd.uab.cat/record/37898> >
- Plexx B. V. (2015). Plexx. Making life-science easier. <http://plexx.eu/product-category/enrichment/> [citado 2016-08-01]
- Popović, N., Giménez de Béjar, V., Caballero Bleda, M., Popović, M., 2017. Verapamil parameter-and dose-dependently impairs memory consolidation in open field habituation task in rats. *Front. Pharmacol.* 7, 539. <https://doi:10.3389/fphar.2016.00539>.
- Poveda CM, Popović N., Morales-Delgado, N., De la Cruz-Sánchez, E, Caballero Bleda M., Miroljub Popović. (2020). The diurnal variation of open-field habituation in rats *Behav Processes* 178:104186. doi: 10.1016/j.beproc.2020.104186.
- Pritchett-Corning, K. R; Keefe, R; Garner, J. P y Gaskill, B. N. (2013). Can seeds help mice with the daily grind? *Laboratory Animals*. 47: 312–315.

- Quillfeldt, J. A. (2016). Behavioral methods to study learning and memory in rats. In *Rodent Model as Tools in Ethical Biomedical Research* (pp. 271-311). Springer, Cham.
- Rabadán, R., Ramos-Campos, M., Redolat, R., & Mesa-Gresa, P. (2019). Physical activity and environmental enrichment: behavioural effects of exposure to different housing conditions in mice. *Acta neurobiologiae experimentalis*, 79(4), 374-385.
- Sáenz, J. C. B., Villagra, O. R., & Trías, J. F. (2006). Factor analysis of forced swimming test, sucrose preference test and open field test on enriched, social and isolated reared rats. *Behavioural brain research*, 169(1), 57-65.
- Shomer, N. H; Peikert, S; Terwilliger, G. (2001). Enrichment-toy trauma in a New Zealand White Rabbit. *Contemporary Topics in Laboratory Animal Science*. 4(1): 31–32.
- Toval, A., Baños, R., De la Cruz, E., Morales-Delgado, N., Pallarés, J. G., Ayad, A., ... & Ferran, J. L. (2017). Habituation training improves locomotor performance in a forced running wheel system in rats. *Frontiers in behavioral neuroscience*, 11, 42.
- Toval, A., Garrigos, D., Kutsenko, Y., Popović, M., Do-Couto, B. R., Morales-Delgado, N., ... & Ferran, J. L. (2021). Dopaminergic modulation of forced running performance in adolescent rats: role of striatal D1 and extra-striatal D2 dopamine receptors. *Molecular Neurobiology*, 58(4), 1782-1791.
- Toval, A., Vicente-Conesa, F., Martínez-Ortega, P., Kutsenko, Y., Morales-Delgado, N., Garrigos, D., ... & Ferran, J. L. (2020). Hypothalamic Crh/Avp, plasmatic glucose and lactate remain unchanged during habituation to forced exercise. *Frontiers in Physiology*, 11.
- Verwer, C. M; Aan der Ark, A; Van Amerongen, G; Van den Bos, R; Hendriksen, C. F. (2009). Reducing variation in a rabbit vaccine safety study with particular emphasis on housing conditions and handling. *Laboratory Animals*. 43:155–164
- Young, R.J. (2003). *Environmental Enrichment for Captive Animals*. Blackwell Science Ltd. Oxford, UK. pp: 1- 228.

8. ANEXOS

8.1. Anexo 1

UNIVERSIDAD DE
MURCIA

Vicerrectorado de Investigación
e Internacionalización

CEEA Comité Ético de
Experimentación
Animal

CAMPUS MARE NOSTRUM

Código CEEA: 719/2021

INFORME DE COMITÉ ÉTICO

INFORME DEL COMITÉ ÉTICO DE EXPERIMENTACIÓN ANIMAL

DATOS DEL CENTRO

Nombre: **CEEA Universidad de Murcia**

Número de Registro del Centro: **REGA ES300305440012**

Título del Trabajo Fin de Grado: *"Efectos de un ambiente enriquecido en la respuesta a la actividad física en ratas hembra durante la adolescencia "*

Estudiante: D.ª Valeria Gómez Soriano

Director del Trabajo Fin de Grado: D. José Luis Ferrán Bertone

Título del Proyecto en el que se enmarca el Trabajo Fin de Grado: *"Neural bases of resistance to fatigue and reduction of adipose tissue in an exercise forced program"*

Investigador responsable: D. José Luis Ferrán Bertone

Aspectos que han sido considerados para su evaluación:

- Capacitación del personal investigador
- Idoneidad del procedimiento en relación a los objetivos del estudio.
- Metodología empleada
- Posibilidad de conseguir conclusiones válidas con el menor nº posible de animales
- Consideraciones de métodos alternativos
- Idoneidad de las especies seleccionadas
- Supervisión, Criterios de Punto Final y Finalización del Procedimiento

Una vez evaluado el procedimiento antes mencionado, atendiendo a los puntos indicados y de conformidad con lo acordado el día veintiuno de mayo de dos mil veintiuno¹, el Comité Ético de Experimentación Animal de la Universidad de Murcia, **INFORMA FAVORABLEMENTE** sobre la realización de dicho procedimiento.

D.ª Carmen Lagares Martínez

D.ª María Senena Corbalán García

Secretaria CEEA

Presidenta CEEA



¹ A los efectos de lo establecido en el art. 19.5 de la Ley 40/2015 de 1 de octubre de Régimen Jurídico del Sector Público (B.O.E. 02-10), se advierte que el acta de la sesión citada está pendiente de aprobación

Código seguro de verificación: RUXFmpkH-2kz/DUqU-Kbklwtwv-czfuONzC

COPIA ELECTRÓNICA - Página 1 de 1

Esta es una copia auténtica imprimible de un documento administrativo electrónico archivado por la Universidad de Murcia, según el artículo 27.3 c) de la Ley 39/2015, de 1 de octubre. Su autenticidad puede ser contrastada a través de la siguiente dirección: <https://sede.um.es/validador/>

8.2. Anexo 2

	EN2						6		Morning session: 8:30	
	PRE - TRAINING									
SESSION Nº	-5	-4	-3	-2	-2					
Postnatal Day	P21	P22	P23	P24	P25	P25				
DATE	12-Apr	13-Apr	14-Apr	15-Apr	16-Apr	17-Apr				
	Random.	Adaptation to light cycle, handling and weight								
	HABITUATION									
SESSION Nº	1	2	3	4	5	6	7	9		
Postnatal Day	P26	P27	P28	P29	P30	P31	P32	P33	P34	
DATE	18-Apr	19-Apr	20-Apr	21-Apr	22-Apr	23-Apr	24-Apr	25-Apr	26-Apr	
	MORNING (08:30 AM)									
SPEED (m/min)	0	0 + 5	7	7	8	8	9	9		
DURATION (min)	5	5 + 2	5	10	2x10 (5'rest)	3x10 (5'rest)	2x10 (5'rest)	3x10 (5'rest)		
							AFTERNOON (14:30 PM)			
SESSION Nº							8	10	11	
SPEED (m/min)							9	9		
DURATION (min)							2x10 (5'rest)	3x10 (5'rest)	TEST	

