

UNIVERSIDAD DE ALMERIA

Dpto. de Neurociencias y Ciencias de la Salud

**Modulación sensorial para la
recuperación
de la función visual en sujetos
ambliopes**

MÁSTER EN INVESTIGACION EN SALUD MENTAL

Curso Académico 2010/2011

Autor:

Sergio Castaño Castaño

Director:

Dr. Francisco A. Nieto Escaméz

AGRADECIMIENTOS:

Al Dr. Francisco A. Nieto Escaméz por introducirme en el apasionante mundo de la electrofisiología, Miguel Morales por su inestimable ayuda y colaboración y a mis compañeros y profesores de máster por “aguantarme” que no es poco.

UNIVERSIDAD DE ALMERÍA



MÁSTER EN INVESTIGACIÓN EN SALUD MENTAL

Curso Académico 2010/2011

Trabajo de Fin de Máster

**Modulación sensorial para la recuperación de la
función visual en sujetos ambliopes**

Autor: Sergio Castaño Castaño

Tutor: Dr. Francisco A. Nieto Escaméz

INDICE:

I.	RESUMEN.....	5
II.	ABSTRACT.....	6
III.	INTRODUCCION.....	7
	• Ambliopía: concepto generales.....	7
	• Privación monocular como modelo de ambliopía.....	12
	• Recuperación de la función visual en sujetos ambliopes.....	13
IV.	OBJETIVOS DEL PROYECTO.....	15
V.	ESTUDIO EXPERIMENTAL.....	17
	• Sujetos.....	17
	• Inducción a la ambliopía experimental.....	17
	• Estimulación eléctrica directa transcraneal.....	18
	• Registro crónico in vivo con hyperdrive.....	19
	• Procedimientos quirúrgicos.....	20
	• Electrodos.....	21
	• Presentación de estímulos y registro fisiológico.....	23
	• Análisis de datos.....	25
VI.	CONCLUSIONES.....	29
VII.	BIBLIOGRAFIA.....	31
VIII.	ANEXOS.....	38

I. RESUMEN

En este proyecto se plantea recuperar la función visual en sujetos ambliopes. Pretendemos desarrollar una vertiente experimental básica con intención de que nuestras investigaciones puedan ser extrapolables a otros estudios clínicos y ser útiles con finalidad terapéutica en humanos.

Utilizaremos animales de experimentación (ratas albinas Sprague-Dawley) en los cuales induciremos el fenómeno de la ambliopía (ojo vago) mediante sutura palpebral u oclusión en uno de los ojos. Esta oclusión se realizará en ratas jóvenes (día 12 postnatal) y se mantendrá hasta la edad de 2 meses. Se considera que este momento coincide con un periodo crítico en el desarrollo del sistema visual de la rata y, por tanto, la supresión visual monocular durante el mismo es utilizada como modelo experimental de ambliopía. A fin de valorar los efectos de la pérdida sensorial utilizaremos técnicas de registro neurofisiológico, y en el futuro también pretendemos evaluar la pérdida sensorial mediante procedimientos de medición conductual de la función visual. Está previsto que a la fase inicial de evaluación de la función visual mediante procedimientos neurofisiológicos y conductuales siga una segunda fase en la que pretendemos desarrollar estrategias terapéuticas que combinen procedimientos conductuales de estimulación visual y estimulación eléctrica transcraneal sobre las áreas visuales corticales. Así, a diferencia de los procedimientos de estimulación visual tradicionales en los que simplemente se ocluye el ojo sano para estimular la función de la vía visual ambliope, pretendemos diseñar tareas y procedimientos de estimulación que aceleren la recuperación de la corteza afectada por ambliopía. Simultáneamente, diseñaremos un protocolo de estimulación eléctrica transcraneal, con objeto de favorecer las capacidades plásticas de la corteza cerebral ambliope, y por tanto potencie el efecto de los procedimientos conductuales y de estimulación sensorial.

Al tratarse de un proyecto de investigación que inicia su puesta en marcha y requiere poner en funcionamiento diferentes protocolos y técnicas nuevas en nuestro laboratorio, en el presente Trabajo Fin de Máster describimos la fase inicial del proyecto de investigación, en la cual desarrollamos los procedimientos neurofisiológicos para la estimulación y el registro de la actividad neuronal, bien de neuronas individuales como de poblaciones neuronales.

II. ABSTRACT

The current project proposes to recover visual function in amblyopic subjects. We intend to develop a basic experimental strategy aiming that our research can be extrapolated to other clinical studies and to be useful for therapeutic purposes in humans.

We will use experimental animals (Sprague-Dawley albino rats) in which the phenomenon of amblyopia (lazy eye) will be induced by lid suture of one eye. This surgical procedure will be carried out in young rats (postnatal day 12) and eye closure will last until the age of 2 months. It is considered that this period coincides with a critical period in the development of the visual system of the rat and, therefore, monocular visual suppression during such time is used as an experimental model of amblyopia. To assess the effects of sensory loss we will use neurophysiological recording techniques, and in the future we will also intend to evaluate sensory loss through behavioral procedures for measuring visual function. It is expected that the initial phase of assessment of visual function by neurophysiological and behavioral procedures will be followed by a second phase in which we intend to develop therapeutic strategies that combine the behavioral visual stimulation and transcranial electrical stimulation on cortical visual areas. Thus, unlike the traditional visual stimulation procedures that simply occlude the good eye to stimulate the function of the amblyopic visual pathway, we intend to design tasks and procedures to speed recovery of the visual cortex affected by amblyopia. Simultaneously, we are designing a transcranial electrical stimulation protocol in order to increase the plastic

capacities of the amblyopic cortex, enhancing then the effect of behavioral and sensory stimulation.

Being a research project recently started, it requires initiating different protocols and new techniques in our laboratory. This Master's Thesis describes the initial phase of research, in which we have developed electrophysiological procedures for stimulation and recording of neuronal activity, both for single neurons as well as for neuronal populations.

III. INTRODUCCION

Ambliopía: conceptos generales

La ambliopía es un término médico que define una disminución de visión en uno o a veces en los dos ojos. Por regla general se debe a que el cerebro favorece el desarrollo de la visión de uno de los ojos con respecto al otro. En la mayoría de los casos no existen anomalías anatómicas en el ojo y puede desarrollarse por diversas etiologías. Debido tanto a anisometropía unilateral como a estrabismo que se presentan al principio de la vida postnatal, se produce una alteración permanente de la binocularidad a nivel de la corteza visual siempre que estas alteraciones de la función visual se instauren antes del periodo crítico, variable entre las distintas especies animales. En esta condición, tanto la retina como el núcleo geniculado lateral del tálamo (NGL) no presentan anomalías y es a nivel de la corteza visual, tanto la primaria como la asociativa, donde actúan los mecanismos que explican la alteración de la función visual asociada a la ambliopía (Hoyt, 2005; Barrett et al., 2004). En este caso la información procedente del ojo normal predomina sobre la que llega desde el ojo ambliope. Por ejemplo, las neuronas que reciben información del ojo ambliope responden a frecuencias espaciales más bajas que las neuronas que reciben información del ojo normal.

La ambliopía es la causa más común de problemas visuales en niños, y según las últimas investigaciones, aproximadamente un 2,5 por ciento de la población mundial sufre este problema. En España, existen aproximadamente más de un millón de casos.

Principales causas de la ambliopía

Numerosas han sido las investigaciones que se han realizado con animales para intentar esclarecer los mecanismos fisiopatológicos de la ambliopía, siendo el córtex estriado y el núcleo geniculado lateral las regiones cerebrales más estudiadas.

TABLA1: CAUSAS DE LA AMBLIOPIA:

<p>1- Portadores de estrabismo de aparición temprana:</p>	<p>La causa más frecuente de la ambliopía es la desalineación de los dos ojos. Cuando los ojos no están alineados de manera apropiada, el cerebro no presta atención a uno de ellos para evitar la visión doble.</p>
<p>2- Portadores de catarata:</p>	<p>La ambliopía provocada por cataratas (opacidad en el tejido del ojo) es menos frecuente pero más severa.</p>
<p>3- Portadores de problemas de graduación elevados, principalmente los que combinan astigmatismo e hipermetropía:</p>	<p>La ambliopía también puede producirse cuando un ojo ve mejor que el otro, por ejemplo, cuando uno de los ojos es muy miope. Se usa el ojo dominante con más frecuencia que el ojo débil y, eventualmente, el ojo fuerte se hace cargo completamente y el ojo débil deja de trabajar.</p>
<p>4- Portadores de nistagmos:</p>	<p>Un tipo de movimiento constante e involuntario de vaivén, de ambos ojos.</p>
<p>5-Portadores de alguna lesión microscópica:</p>	<p>Lesiones retinianas.</p>



Se ha propuesto que como consecuencia del estrabismo pueden producirse cambios en el equilibrio entre las conexiones excitatorias e inhibitorias que llegan a las neuronas de la corteza visual, con una reducción selectiva de conexiones excitatorias locales y distantes, quedando sin afectar las interconexiones inhibitorias (Löwel and Singer, 1992).

De la experimentación animal se ha deducido que las conexiones excitatorias son más susceptibles a las experiencias visuales anómalas (Sengpiel and Blakemore, 1994); son estas conexiones excitatorias las que interconectan neuronas que muestran una preferencia por estímulos de orientación similar. De hecho, la privación visual mantenida durante 2 días al principio de la vida postnatal, retrae las conexiones horizontales de las capas supragranulares (Trachtenberg and Stryker, 2001), con lo que queda alterada la percepción de estímulos orientados que ocupan un volumen apreciable en el campo visual. Tanto la privación visual como el estrabismo y la anisometropía, mantenidos hasta sobrepasar el periodo crítico, tendrían consecuencias tanto más irreversibles cuanto más prolongada sea su duración.



TABLA 2: Los fenómenos patológicos observados en la ambliopía pueden ser:

<p>a) Enmascaramiento dicóptico,</p>	<p>Es el proceso por el cual un estímulo de determinado contraste presentado en un ojo inhibe la detección de un estímulo idéntico, pero de menor contraste, presentado en el otro ojo.</p>
<p>b) Supresión fusional</p>	<p>Es la inhabilidad para percibir objetos en parte o la totalidad del campo visual de un ojo. Ocurre en visión binocular y representa un proceso inhibitorio interocular que evita que la información visual del ojo suprimido alcance el umbral de percepción consciente.</p>
<p>c) Supresión por rivalidad binocular,</p>	<p>Hace referencia a periodos alternantes de dominancia y supresión ocasionados por estimulación retiniana de zonas retínicas correspondientes con estímulos monoculares distintos.</p>

Relevancia del desarrollo en el establecimiento y tratamiento de la ambliopía

Como es conocido, las estructuras cerebrales presentan un importante grado de maduración a lo largo del desarrollo postnatal. En concreto, los circuitos corticales que posibilitan la percepción visual uni- y bilateral son objeto de un desarrollo que culmina hacia los 10 años en el humano (Mitchell and Sengpiel, 2009) y hasta el día 45 postnatal en la rata (Maffei et al., 1992). Estas fases del desarrollo se consideran periodos críticos, transcurridos los cuales resultaría difícil restaurar la función visual. Así, los primeros trabajos sobre ambliopía realizados hace varias décadas, mediante oclusión de un ojo y otros tipos de privación visual, establecían la importancia de determinadas fases de desarrollo para la recuperación de la función visual. Estos periodos donde la privación tenía efectos irreversibles se conocen como periodos críticos y dependen del tipo de privación llevada a cabo (Berman y Daw, 1977).

En el caso de niños con estrabismo severo mantenido durante muchos años, la pérdida de estereopsia (visión binocular) era considerada irreversible. Banks et al. (1975) estimaron el periodo crítico estudiando sujetos estrábicos que habían sido operados a diferentes edades. Los sujetos endotrópicos congénitos operados antes de los 3 años habían recuperado las funciones binoculares mucho antes y en mayor grado que los operados a partir de esa edad. Sin embargo, en todos los casos se observaba una pobre estereopsia (Atkinson et al, 1991). En aquellos que habían desarrollado el estrabismo después de los 4 años, la recuperación era la misma independientemente de cuándo se hubiera realizado la operación. De estos trabajos, Banks concluyó que el periodo crítico en el ser humano está comprendido entre los 1 y 3 años de edad. En este periodo, la información binocular sería utilizada para construir la compleja función binocular en la corteza cerebral. Otros trabajos posteriores han continuado dando soporte a esta teoría (Smith et al, 1991; Dellar, 1988).

Sin embargo, desde hace tiempo se conocía que la pérdida funcional de un ojo ocluido podía recuperarse si se producía una enucleación del ojo sano. Ello era un índice de la plasticidad del sistema binocular (Kratz et al, 1976). Este efecto además, era mucho más rápido (se puede dar en horas) que el equivalente de ocluir el ojo sano (que tardaría semanas). En la misma línea, otros estudios

clínicos recientes han mostrado cómo en los pacientes con ambliopía que han perdido la visión del ojo sano se puede producir una recuperación espontánea de la visión del ojo ambliope, lo que indicaría que las conexiones del ojo ambliope pueden estar silenciadas más que eliminadas (Levi and Li, 2009).

Otros estudios experimentales recientes han ido poniendo de manifiesto la posibilidad de reorganizar los circuitos corticales en las áreas visuales aún en fase adulta. Así, se ha intentado recuperar la agudeza visual y la percepción binocular mediante el enriquecimiento ambiental (Sale et al., 2007), el entrenamiento en tareas de aprendizaje perceptivo (He et al., 2007; Li et al., 2008; Levi and Li, 2009) e incluso a la estimulación magnética transcraneal repetitiva (Thompson et al., 2008). Además, se ha puesto de manifiesto la posibilidad de reorganizar los circuitos corticales en las áreas visuales aún en fase adulta. La activación de factores permisivos a través de la aplicación de trofinas y la modificación de la matriz extracelular (Hensch, 2005) apuntan posibilidades terapéuticas para los intentos de recuperar la función visual en fase adulta. En este sentido son reveladores los ejercicios de práctica visual perceptiva repetitiva mediante tareas de estimulación visual que, tanto en adultos como en niños, han posibilitado una mejora en el rendimiento visual perceptivo (Li et al., 2008; Levi and Li, 2009; Mitchell and Sengpiel, 2009). También se ha publicado (Maya-Vetencourt et al., 2008) que la administración de algunos fármacos antidepresivos consigue la restauración de la plasticidad neuronal en el sistema visual adulto de la rata. Este fármaco se ha aplicado a modelos experimentales de ambliopía en animales adultos, consiguiendo una recuperación significativa de las funciones visuales. Además, tras la administración de éste fármaco se ha detectado un incremento de la expresión del factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF) en la corteza visual de los animales tratados.

Privación monocular como modelo de ambliopía

El principal modelo de estudio de las anomalías binoculares es la privación monocular inducida. En general, se basa en la disminución o eliminación de la visión en uno de los ojos durante un periodo temprano de la vida del animal, de

forma que las células de la corteza visual desarrollan un funcionamiento anómalo. Los cuatro modelos de privación que se estudian son:

TABLA 3. Procedimientos utilizados para la supresión monocular
1. Oclusión de un ojo por ocluser o sutura de los párpados.
2. Creación de un estrabismo artificial por cirugía.
3. Desviación de uno de los ojos por prismas.
4. Inducción de aniseiconia por lente.
5. Inducción de parálisis muscular en un ojo.

Los síntomas de la privación monocular por un periodo largo de tiempo son conocidos desde hace décadas. El ojo privado manifiesta una combinación de síntomas que incluyen la pérdida de visión espacial, con reducción en tareas de agudeza e hiperagudeza en el ojo sano (Levi y Klein, 1982) y reducción en sensibilidad al contraste (Hess y Howell, 1977). Existen otros tipos de síntomas como la confusión entre estímulos cercanos (Pugh, 1958) y las distorsiones visuales (Hess et al, 1978) que requieren una explicación más compleja. También se ven afectados los movimientos oculares, encontrándose dificultades para mantener la fijación en el ojo afectado (Ciuffreda et al, 1980).

Recuperación de la función visual en sujetos ambliopes

Al ser un proceso dependiente de actividad, y por tanto de la experiencia, cabe la posibilidad de que la ambliopía pueda ser modelada y revertida, recuperándose la función visual del ojo hasta entonces “vago”. La oclusión del ojo sano mediante un parche ha sido el procedimiento terapéutico utilizado tradicionalmente en niños y más recientemente en adultos (Fischer et al., 2008). Este procedimiento fomenta la competencia entre las aferencias

visuales procedentes de ambos ojos. Nuestra intención consiste en favorecer la actividad visual de la vía ambliope mediante entrenamiento explícito de la misma mediante la aplicación de estímulos visuales y la ejecución de tareas conductuales que exijan al animal la utilización de dicha información. Como se ha mencionado anteriormente, algunos autores ya han seguido esta vía terapéutica, por lo tanto, la novedad del presente proyecto consiste en la utilización de la estimulación eléctrica transcraneal directa (tDCS) como estrategia para potenciar la plasticidad cerebral y por tanto acelerar los efectos del tratamiento conductual.

La tDCS es una técnica no invasiva, de bajo coste, fácil aplicación y segura dentro de los parámetros hasta ahora establecidos. Consiste en el paso de una corriente constante (0,250 mA) entre dos electrodos colocados sobre la superficie del cráneo durante un tiempo no superior a 30 min. Un electrodo sirve de ánodo (positivo) y otro de cátodo (negativo); en función de la dirección de la corriente, ánodo-cátodo o al revés, se induce la despolarización o la hiperpolarización del tejido subyacente que puede durar una hora o más, en función del protocolo de estimulación. Esta técnica se está proponiendo como una herramienta para fomentar la neurorehabilitación (Nitsche et al., 2003; Hummel and Cohen, 2006; Been et al., 2007; Wagner et al., 2007). Su utilidad en la neurorehabilitación se basa, al menos en parte, en la capacidad de fomentar la plasticidad mediante la despolarización de la corteza si ésta está a su vez activada mediante entrenamiento.

IV. OBJETIVO DEL PROYECTO

El objetivo general del presente proyecto consiste en un modelo de recuperación funcional del sistema visual en ratas ambliopes mediante el entrenamiento explícito de la vía afectada en combinación con la aplicación de estimulación eléctrica directa transcraneal (tDCS). Esta técnica de estimulación se ha utilizado previamente en el tratamiento de otras patologías causadas por daño cerebral (ver Thompson et al., 2010). Así, la estimulación eléctrica transcraneal aplicada inmediatamente antes de comenzar la fase de entrenamiento sensorial de los animales provocaría una potenciación de la capacidad plástica de la corteza visual justo en el momento en el que éste desarrolle los procedimientos conductuales y de entrenamiento sensorial.

La evaluación de la función visual se realizará mediante procedimientos de registro de la actividad electrofisiológica en la corteza visual y la ejecución en tareas conductuales diseñadas para medir la función visual de la rata. En el futuro también se podría combinar el registro electrofisiológico con procedimientos farmacológicos.

Puesto que el electrodo epicraneal se coloca sobre la superficie del cráneo y el hyperdrive va situado en la misma zona pero requiere una craneotomía, debemos comprobar que ésta no suponga ningún problema para el proceso de estimulación. Por ello, en el futuro valoraremos diversas opciones de estimular con el hyperdrive implantado, incluyendo la posibilidad de que los propios tetrodos de registro lleven incorporado algún canal para estimulación.

Por tanto, actualmente tenemos las siguientes vías de trabajo:

- 1- Implementar la técnica de registro electrofisiológico en un modelo animal de ambliopía utilizando la rata. Los registros neurofisiológicos permitirán evaluar los cambios en la actividad neuronal consecuencia de la privación monocular y su posible evolución mediante procedimientos de estimulación visual y realización de tareas conductuales.

- 2- Implementar el procedimiento de estimulación eléctrica directa transcraneal en la rata. Esta técnica, debería potenciar los efectos de la estimulación visual y del entrenamiento conductual.

Los objetivos específicos del presente trabajo han consistido en la puesta a punto de los procedimientos electrofisiológicos de estimulación y registro de la actividad cortical en nuestro laboratorio. Éste último ha sido el más laborioso.

A diferencia de otros trabajos previos que han trabajado con animales anestesiados, nosotros utilizaremos un procedimiento de registro crónico *in vivo*, el cual se llevará a cabo mientras los animales están despiertos y reciben estímulos luminosos. De esta manera intentaremos correlacionar la respuesta neuronal a la presentación de los estímulos. Además, así evitamos los efectos de la anestesia sobre la respuesta neurofisiológica.

Para los registros utilizaremos un sistema provisto de 8 tetrodos con el que registraremos la actividad de un gran número de neuronas de forma simultánea. Ello nos permitirá analizar tanto la respuesta unicelular como la actividad de poblaciones formadas por dichas neuronas individuales, lo cual nos proporcionará un salto cualitativo en el estudio de la plasticidad celular ya que no sólo contempla los cambios producidos en la actividad de neuronas particulares, sino que evalúa también los cambios producidos en la sincronía de grupos de neuronas (Singer, 1999; Bruno and Sakmann, 2006; Fries et al., 2008).

Las regiones objetivo de nuestros registros electrofisiológicos son las cortezas V1 monocular y binocular. Inicialmente registraremos únicamente la actividad en el hemisferio ipsilateral al ojo ambliope. De este modo podremos comparar la actividad de ambas regiones corticales, con la monocular recibiendo aferencias del ojo ambliope y la binocular de ambos. En un futuro, si disponemos de más canales de registro podríamos registrar simultáneamente las cortezas mono- y binocular de ambos hemisferios. Durante el proceso de registro presentaremos estímulos visuales bien de manera independiente a cada uno de los ojos (estando el otro tapado por un parche) o a los dos simultáneamente.

V. ESTUDIO EXPERIMENTAL

Los protocolos experimentales que se presentan han sido aprobados por el Comité de Bioética de la Universidad de Almería

Sujetos

Utilizaremos ratas hembra Sprague-Dawley gestantes procedentes de Harlan Laboratorios a fin de obtener las crías que finalmente servirán como sujetos experimentales. Todos los animales vivirán en el estabulario del Pabellón de Neurociencia que, al igual que las habitaciones experimentales donde se desarrollará el proyecto, dispone de control de temperatura (22°C) y del ciclo luz-oscuridad (con el periodo de luz de 8:00h a 20:00h), así como ventilación continua e independiente. Se procederá a identificar los animales y abrir una ficha a cada uno en la que figurarán todos los datos relativos a los tratamientos, revisiones de salud, incidencias, etc.

Las ratas gestantes serán alojadas en jaulas individuales en oscuridad; tras el nacimiento de las crías éstas serán sexadas e identificadas, abriéndose la ficha correspondiente en el registro del animalario.

Antes del inicio de cualquier experimento conductual los animales serán amansados diariamente durante una semana en la habitación experimental correspondiente. Todos los procedimientos se realizarán conforme a la normativa vigente (Real Decreto 1201/2005 y directiva 2010/63/UE) sobre Protección de los Animales para Experimentación y otros Fines Científicos, con el objeto de asegurar el máximo de confort y el mínimo malestar a los animales.

Inducción experimental de la ambliopía

El modelo de ambliopía experimental a utilizar será la supresión monocular por sutura palpebral durante el periodo en que termina de formarse la hendidura palpebral y en condiciones normales la retina queda expuesta a la luz ambiental. En la rata Sprague-Dawley este periodo oscila entre los 12–14 días

postnatales hasta la edad de 2 meses. Por ello, el día 12 postnatal se realizará la sutura palpebral de uno de los ojos en las crías. Se aplicará Diprogenta crema de uso tópico sobre la herida como profiláctico y se administrará antibiótico oral en caso necesario. El destete se producirá a los 21 días postnatales, tras lo cual serán enjauladas en grupos de dos animales del mismo sexo.

Estimulación eléctrica directa transcraneal

Para la estimulación eléctrica transcraneal hemos fabricado un electrodo epicraneal que se coloca sobre la superficie del cráneo, encima de la corteza visual V1 contralateral al ojo ambliope. El electrodo epicraneal consiste en un conector cilíndrico (3mm diámetro) de aleación cobre-níquel y bañado en oro que actuará como ánodo (polo positivo). La corriente eléctrica continua (0,25mA) deberá desplazarse entre el ánodo situado en sobre el cráneo del animal y el cátodo (polo negativo) que hemos confeccionado con un parche de electroestimulación cosido a un chaleco de nylon-elastán. Una vez colocado el chaleco a la rata, el parche queda sujeto al cuerpo del animal a nivel del lomo. Para lograr una buena conductividad es necesario eliminar el pelo de la rata en la zona donde lleva el parche. A fin de establecer los parámetros de estimulación adecuados hemos realizado diversos pilotos en los que hemos obtenido unos valores de resistencia eléctrica (impedancia) entre ánodo y cátodo de (20-50K Ω). Estos valores permiten obtener la intensidad de corriente deseada aplicando un voltaje de (5-12,5V).

Para el protocolo de estimulación nos basamos en el trabajo de Liebetanz et al. (2009) donde se establece el rango óptimo de estimulación. En nuestro caso aplicaremos una corriente de 0,25mA durante media hora. Para obtener esta intensidad de forma uniforme utilizaremos una fuente de corriente Stimulus Isolator A365 (WPI, UK).



FIG. 1- Fuente de corriente generadora de estímulos eléctricos

Registro crónico *in vivo* con Hyperdrive

La actividad neurofisiológica de la corteza visual contralateral al ojo ambliope (áreas monocular y binocular) se registrará mediante una técnica de registro extracelular *in vivo*, con los animales despiertos y sin restricción de movimiento. El registro se realizará en una caja de metacrilato transparente con unas medidas de 40x40x45cm. La caja se localizará en el interior de una jaula de Faraday que a la vez actuará como su conexión tierra.

La técnica de registro crónico *in vivo* presenta varias ventajas:

- (1) el animal no está bajo los efectos de la anestesia mientras se registra la actividad neuronal; por lo tanto la respuesta celular no se ve alterada.
- (2) se puede correlacionar la respuesta neuronal a la presentación de los estímulos y con la posible respuesta conductual del animal mientras realiza la tarea.

En esta fase inicial del proyecto no está previsto aplicar la estimulación eléctrica transcraneal en los animales a los que se realicen registros electrofisiológicos. Tenemos previsto desarrollar un protocolo que permita combinar ambos tipos de procedimiento experimental. Para ello vamos a poner a prueba un prototipo de hyperdrive con una base metálica que actúe como ánodo-electrodo epicraneal.

Procedimientos quirúrgicos

El implante del electrodo epicraneal se realizará mediante cirugía estereotáxica en animales previamente anestesiados (equitesina 3ml/Kg). El electrodo se acoplará a la superficie limpia del cráneo únicamente con cemento óseo Refobacin © (BIOMET, España).

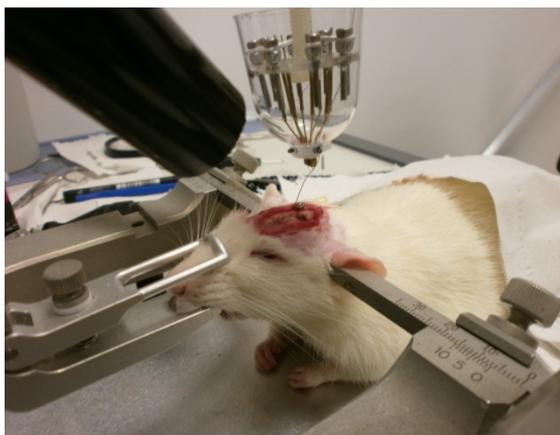


FIG.2- Colocación hyperdrive mediante cirugía

Para los registros electrofisiológicos crónicos utilizaremos un posicionador de electrodos (hyperdrive) con 10 tétodos (8 de registro y 2 de referencia). El hyperdrive se acopla a la cabeza del animal mediante tornillos y cemento óseo sintético para prótesis Refobacin © (BIOMET, España). Para su implante se utiliza un procedimiento estereotáxico en animales anestesiados (equitesina 3ml/Kg). En este caso es necesario realizar una craneotomía en el animal. A continuación, tras retirar cuidadosamente la duramadre, se coloca la base del hyperdrive sobre la superficie del córtex cerebral de modo que los tétodos desciendan suavemente y sin que ningún resto de tejido obstaculice su penetración. A fin de registrar simultáneamente las cortezas V1 mono- y binocular el hyperdrive ha sido diseñado específicamente para que la mitad de los tétodos queden posicionados sobre la corteza monocular y la otra mitad sobre la corteza binocular. Basándonos en el atlas de Paxinos y Watson (1998) y pilotos previos utilizaremos las siguientes coordenadas tomando el punto Bregma como referencia: V1 monocular (AP -9.0mm; ML \pm 2.5mm); V1

binocular (AP -9.0mm; ML \pm 4.3mm). Una vez que hemos posicionado el hyperdrive se recubre la craneotomía con Gelatamp (Roeko, Alemania) y se añade cemento óseo para anclar el hyperdrive a la superficie del cráneo.

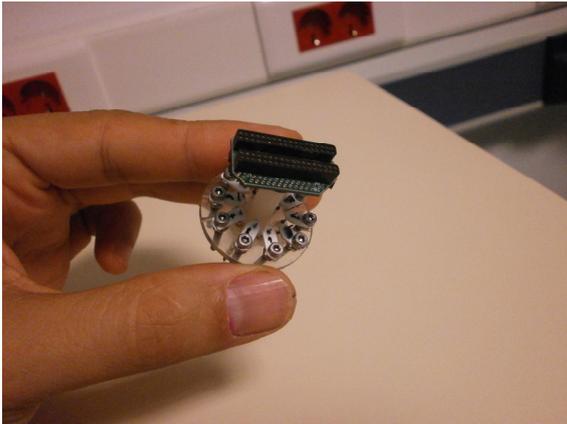


FIG 3- hyperdrive con 10 posicionadores



FIG 4- Prototipo de hyperdrive colocado mediante craneotomía

Electrodos

Como hemos mencionado anteriormente, el hyperdrive porta 8 tétrodos de registro y 2 de referencia. Todos los tétrodos se pueden manipular individualmente mediante un tornillo que permite el desplazamiento vertical de cada uno de ellos. Cada tétrodo está formado por 4 hilos de aleación de níquel y cromo con un grosor de $13\mu\text{m}$ (California Fine Wire, USA). Todos los canales de cada tétrodo deben ser procesados individualmente para ajustar su impedancia a un valor aproximado de $1\text{M}\Omega$ a 1kHz , para ello cada uno de sus cuatro hilos es bañado con oro mediante un proceso electrolítico.

El proceso de medida de impedancia y electrolisis se realiza mediante medidor de impedancia IMP-1 (BAK Electronics, USA) acoplado a una fuente de corriente Stimulus Isolator A365 (WPI, UK) (van Duuren, E. 2007; Wilson, M.A. 1993). Cada uno de los canales de un tétrodo está conectado a una placa de circuito impreso, la cual va montada sobre el hyperdrive y va provista de conectores para el sistema de registro. Para el registro utilizaremos como conexión tierra un tornillo anclado al cráneo.

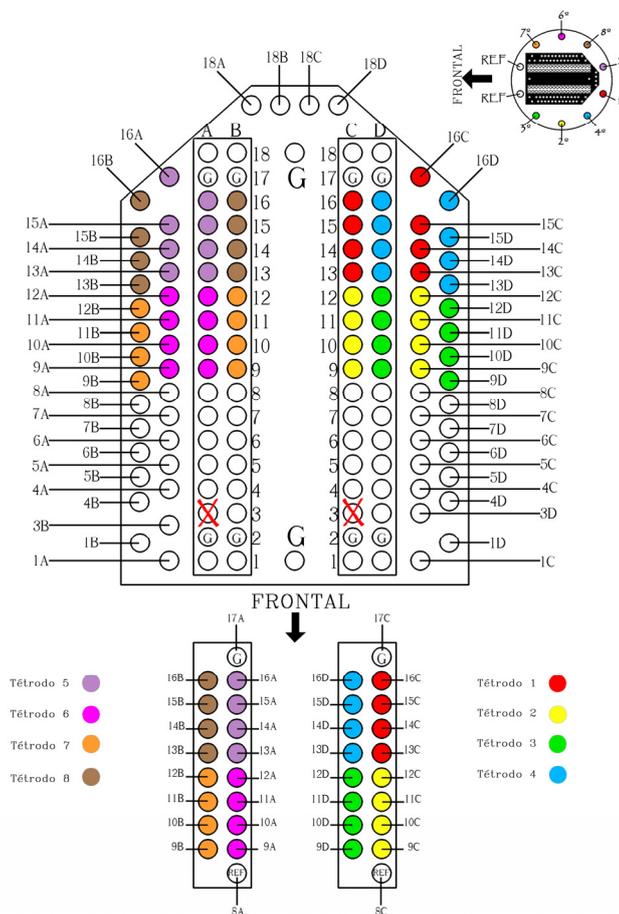
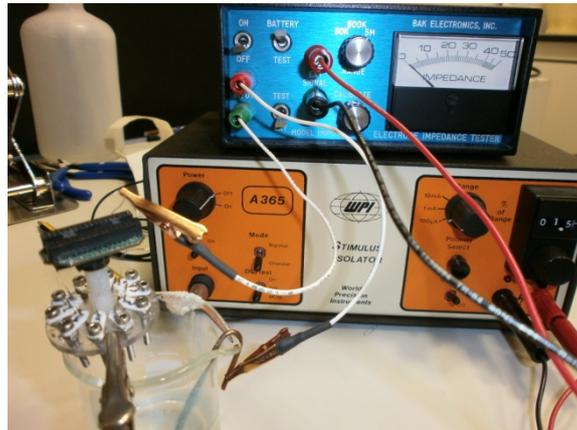


FIG 5 y 6, Baño electrolítico para electrodos y esquema de conexionado de los mismo a la placa de conectores del hyperdrive

El registro de la actividad celular se realiza en una caja de metacrilato transparente (40x40x45cm) que permite el movimiento del animal y va colocada dentro de una jaula de Faraday diseñada para aislar al sujeto de

estímulos visuales externos así como de posibles armónicos electromagnéticos ambientales que podrían falsear la medida de los registros.



FIG 7- Jaula de Faraday



FIG 8- Caja de metacrilato para electrofisiología

Puesto que el hyperdrive permite controlar la posición de cada tétrodo de forma individual, cada uno se irá insertando de manera independiente en el córtex subyacente hasta que detectemos actividad neuronal. Una vez que obtengamos potenciales de acción en los 8 tétrodos de registro el sujeto estará listo para una sesión de registro (que se realizará el día siguiente).

Presentación de estímulos y registro electrofisiológico

El registro electrofisiológico será procesado mediante un sistema de registro de 32 canales PENTUSA (Tucker Davis Technologies, USA). Puesto que los 32

canales equivalen a 8 tétrodos de registro, dispondremos de 4 tétrodos para la corteza monocular y otros cuatro para la corteza binocular. Siguiendo el procedimiento estándar, la señal de cada uno de los cuatro canales del tétrodo es amplificada, digitalizada y filtrada (ganancia 5000, filtro 0.6-6.0 kHz, digitalizada a 24kHz) y monitorizada a través de un osciloscopio y/o el programa de control del sistema de registro PENTUSA.

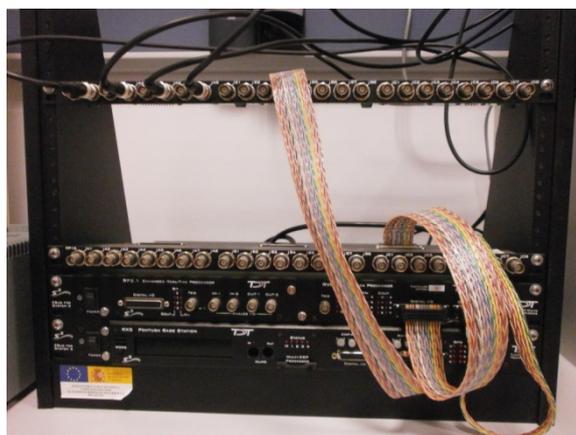


FIG 9- Sistema de registro PENTUSA de TDT

Los estímulos visuales utilizados para la estimulación visual serán destellos de luz (duración 10mseg., 72,64candelas/m²) que ocupan todo el campo ocular y que serán aplicados siguiendo el siguiente protocolo experimental:

1. Registro de actividad espontánea (30 seg).
2. Estimulación con destellos de baja frecuencia (1Hz; 30 seg).
3. Descanso y registro de actividad espontánea (15 seg).
4. Estimulación con destellos de alta frecuencia (10Hz; 30 seg).
5. Descanso y registro de actividad espontánea (15 seg).

Seguiremos este protocolo estimulando ambos ojos, el ojo ambliope o el ojo sano. Para ello utilizaremos un parche que irá sujeto con velcro al hyperdrive. Ello nos permitirá colocar el parche sobre el ojo que deseemos y quitarlo para cambiarlo de ojo o estimular ambos ojos simultáneamente. Los estímulos visuales se aplicarán mediante un LED de luz blanca conectado a la unidad de control de estímulos Barracuda RV8 (Tucker Davis Technologies, USA). El LED irá acoplado con velcro al hyperdrive quedando colocado sobre la frente del animal. A diferencia de otros sistemas en los que el estímulo es producido por

algún dispositivo independiente, este procedimiento permite que el estímulo luminoso sea igual independientemente del movimiento o posición del animal. Por lo tanto, permite mantener inalteradas las condiciones estímulares en un animal despierto y con libertad de movimiento.

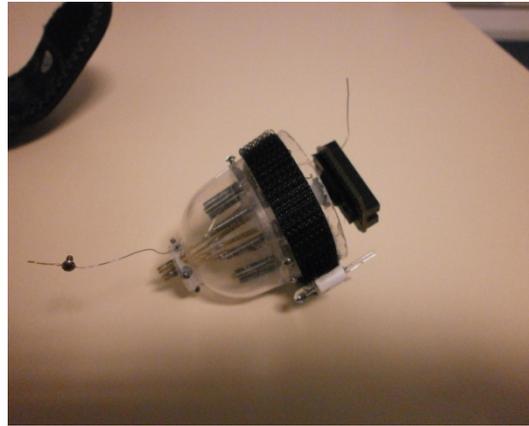


FIG 10 – Hyperdrive dotado de LED para estimulación visual

Con la finalidad de registrar el mayor número posible de neuronas y estudiar la actividad en diferentes capas corticales, al final de cada sesión de registro descenderemos los electrodos hasta $50\mu\text{m}$ en el córtex buscando nuevas neuronas. A continuación el animal es devuelto a su jaula, a fin de que se establezca la actividad neuronal, y al día siguiente se realiza una nueva sesión de registro.

Análisis de datos

Los potenciales de acción individuales se aíslan mediante el programa Offline Sorter (Plexon, USA). Para que un conjunto de espigas sean aceptadas como pertenecientes a una neurona diversos parámetros y gráficos son analizados visualmente (la forma de la onda en los cuatro canales del tétrodo, la distribución de parámetros de la onda tales como la amplitud, la altura del pico, profundidad del valle, tiempo,..., el autocorrelograma, y el intervalo entre espigas). Puesto que la ausencia de potenciales de acción durante el periodo refractario (2-3ms) es indicador de una buena selección de potenciales acción,

las neuronas cuyo autocorrelograma indique actividad durante este periodo no serán empleadas para el análisis.

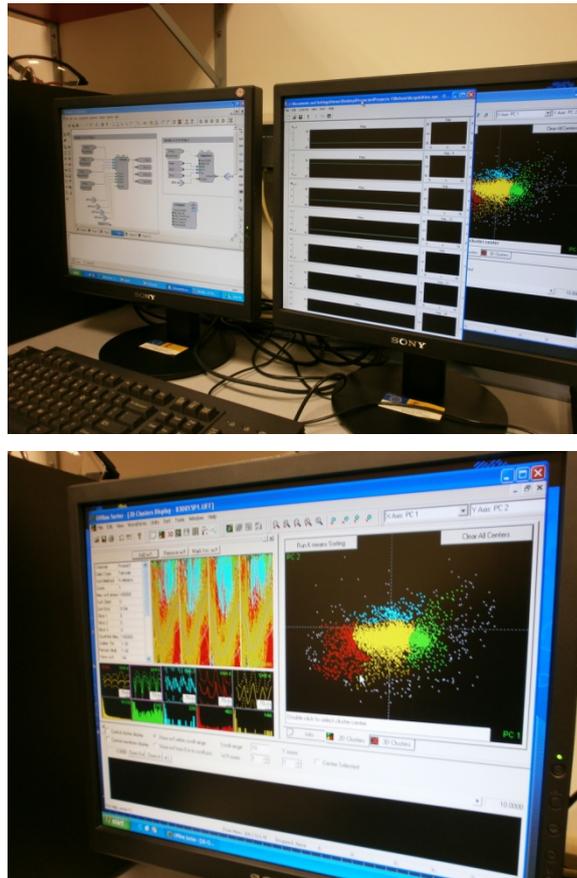


FIG 11 y 12 Software Sorter Offline de PLEXON

Mediante el registro agudo realizaremos un mapeo electrofisiológico inicial de la actividad neuronal en corteza visual de animales ambliopes. El primer lugar analizaremos la distribución de frecuencias en neuronas individuales tras la estimulación del ojo sano y/o el ambliope. Además estableceremos posibles diferencias en número de neuronas activas y su frecuencia de disparo en las regiones corticales mono- y binocular. Para ello emplearemos el análisis de la frecuencia media de disparo y la densidad de disparo mediante el histograma de tiempo periestímulo (PSTH) utilizando el software Neuroexplorer (Plexon, USA).

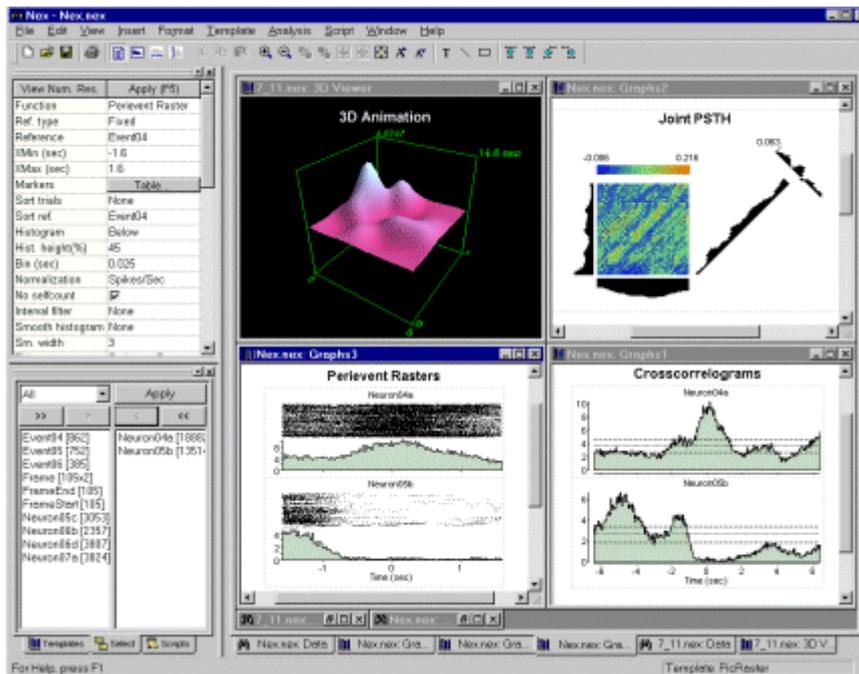


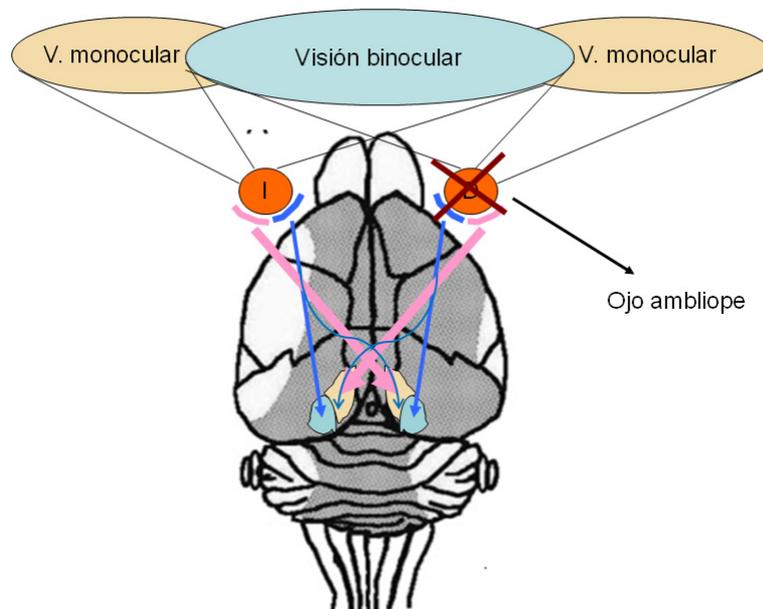
FIG-13 Software Neuroexplorer de PLEXON

El siguiente paso consistirá en determinar el grado de dominancia ocular de cada neurona utilizando la escala clásica de siete puntos (Hubel, 1962) donde se hacen corresponder los siguientes valores:

- (1) la neurona sólo responde a estímulos presentados en el ojo contralateral;
- (2) existe un fuerte predominio en la respuesta a estímulos presentados en el ojo contralateral;
- (3) la respuesta es ligeramente mayor a estímulos contralaterales;
- (4) la neurona responde de igual forma ante la estimulación de ambos ojos;
- (5) la respuesta es ligeramente mayor a estímulos ipsilaterales;
- (6) existe un fuerte predominio en la respuesta a estímulos presentados en el ojo ipsilateral;

(7) la neurona sólo responde a estímulos presentados en el ojo ipsilateral. Las puntuaciones serán asignadas por un evaluador ajeno a la condición experimental los animales y servirán para calcular el índice de sesgo de contralateralidad (CBI) en cada animal. Utilizaremos la siguiente fórmula $CBI = [(n_1 - n_7) + 2/3(n_2 - n_6) + 1/3(n_3 - n_5)] / 2N$; donde N corresponde al número total de neuronas y n_i es el número de neuronas clasificadas en la categoría i de dominancia ocular (Fischer, 2007).

La fase final de análisis de la actividad electrofisiológica consistirá en un análisis poblacional que nos permita evaluar la sincronía entre grupos de neuronas registradas simultáneamente en ambas cortezas visuales objetivo (córtez V1 mono- y binocular). Para ello utilizaremos las siguientes herramientas de análisis: crosscorrelograma y el histograma periéstímulo conjunto (JPSTH). Finalmente realizaremos un análisis de dominancia ocular para poblaciones neuronales siguiendo la misma escala indicada para la actividad de neuronas individuales. Los análisis se realizarán con el software Neuroexplorer (Plexon, USA).



ESQUEMA VISUAL RATA

VI. CONCLUSIONES

El presente Trabajo Fin de Máster presenta la preparación de la fase inicial de un proyecto de investigación sobre la recuperación funcional de la ambliopía. Este trabajo se centra en un modelo animal basado en la rata albina (Sprague Dawley) y en el que se utiliza un procedimiento de privación monocular a edad temprana para inducir experimentalmente la ambliopía.

Una de las líneas de trabajo del proyecto consiste en la utilización de las técnicas de registro neurofisiológico para la valoración de los cambios funcionales en las áreas cerebrales responsables de la visión. En el laboratorio de Psicobiología de la Universidad de Almería disponíamos de la mayor parte del equipamiento necesario (hardware y software), sin embargo éste no estaba en funcionamiento. Con el traslado del equipo al nuevo laboratorio hemos vuelto a reinstalar el equipo principal para registro neurofisiológico y diseñar/fabricar todos aquellos componentes necesarios para la realización de los experimentos. En primer lugar, hemos diseñado un nuevo modelo de hyperdrive que permite el registro de dos regiones cerebrales distintas de manera simultánea. Además, hemos adaptado nuestro diseño de hyperdrive para poder llevar acoplado un LED con el que aplicar estímulos luminosos.

Para poder realizar los registros en un entorno libre de interferencias electromagnéticas diseñamos y realizamos una caja que permite el movimiento del animal y una jaula de Faraday que atenúa los armónicos del campo electromagnético. Igualmente, ha sido necesario realizar diversas adaptaciones para poder acoplar de forma nuestro hyperdrive y el headstage del equipo de registro de manera fácil y segura. Por último, hemos realizado el programa en entorno de programación RPvds para controlar el sistema de registro.

A fin de comprobar el mejor protocolo de implante, hemos realizado dos pilotos de implante del hyperdrive en la rata.

En el caso del procedimiento de estimulación eléctrica directa transcraneal hemos diseñado un electrodo epicraneal así como un chaleco con electrodo

dérmico, evaluando diferentes prototipos, así como medios de implante y diferentes tipos de cemento dental y óseo. A fin de obtener los valores de estimulación apropiados hemos realizado varios pilotos de medición de impedancia para la estimulación eléctrica directa transcraneal.

VII. BIBLIOGRAFIA

Atkinson J, Smith J, Anker S, Wattam-Bell J, Braddick OJ, y Moore AT .1991. Binocularity and amblyopia after and before early strabismus surgery. Invest.Ophthal. And Vis Sci, 32,820

Balkema GW. 1988. Elevated dark-adapted thresholds in albino rodents. Invest Ophthalmol Vis Sci. 29(4):544-9.

Banks MS, Aslin RN y Letson RD .1975. Sensitive period for the development of human binocular vision, Science, 190,675-7

Barrett BT, Bradley A, McGraw PV. 2004. Understanding the neural basis of amblyopia. Neuroscientist. 10:106-117.

Been G, Ngo TT, Miller SM, Fitzgerald PB. 2007. The use of tDCS and CVS as methods of non-invasive brain stimulation. Brain Res Rev. 56: 346-361.

Behn D, Doke A, Racine J, Casanova C, Chemtob S, Lachapelle P. 2003. Dark adaptation is faster in pigmented than albino rats. Doc Ophthalmol. 106(2):153-9.

Berman N y Daw NW, 1977. Comparison of the critical periods for monocular and directional deprivation in cats. Journal of Psychology, 265,249-59

Bruno RM, Sakmann B. 2006. Cortex is driven by weak but synchronously active thalamocortical synapses. Science. 312:1622-1627.

Cicerone, C. M. 1976. Cones survive rods in the light-damaged eye of the albino rat. Science 194, 1183-1185.

Ciuffreda KJ, Kenyon RV y Stark L .1980. Increased drift in amblyopic eyes. British Journal of ophthalmology, 64,7-14

Crawford, M.L.J. et al 1990: Interspecies comparisons in the understanding of human visual perception. In L. Spillman and J.S. Werner (eds.), *Visual Perception: The Neurophysiological Foundations*. San Diego: Academic Press, pp. 23-52.

Creel DJ, Summers CG, King RA. 1990. Visual anomalies associated with albinism. *Ophthalmic Paediatr Genet*. 11(3):193-200.

Dellar M .1988.. Why should surgery for early onset strabismus be postponed. *British Journal of Ophthalmology*, 72, 110-15

Drager UC. 1985. Calcium binding in pigmented and albino eyes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 82(19):6716-20.

Fain GL, Matthews HR, Cornwall MC, Koutalos Y. 2001. Adaptation in vertebrate photoreceptors. *Physiol Rev*. 81(1):117-151.

Fischer QS, Aleem S, Zhou H, Pham TA. 2007a. Adult visual experience promotes recovery of primary visual cortex from long-term monocular deprivation. *Learn Mem*. 14:573-580.

Fischer QS, Graves A, Evans S, Lickey ME, Pham TA. 2007b. Monocular deprivation in adult mice alters visual acuity and single-unit activity. *Learn Mem*. 14:277-286.

Fries P, Womelsdorf T, Oostenveld R, Desimone R. 2008. The effects of visual stimulation and selective visual attention on rhythmic neuronal synchronization in macaque area V4. *J Neurosci*. 28:4823-4835

Grant S, Patel NN, Philp AR, Grey CN, Lucas RD, Foster RG, Bowmaker JK, Jeffery G. 2001. Rod photopigment deficits in albinos are specific to mammals and arise during retinal development. *Vis Neurosci*. 18(2):245-51.

Green DG, Herreros de Tejada P, Glover MJ. 1991. Are albino rats night blind? *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 32(8):2366-71.

He HY, Ray B, Dennis K, Quinlan EM. 2007. Experience-dependent recovery of vision following chronic deprivation amblyopia. *Nat Neurosci.* 10:1134-1136.

Hensch TK. 2005 Critical period plasticity in local cortical circuits. *Nat Rev Neurosci.* 6:877-888.

Hecht, E. 1987. *Optics.* 2nd Ed, Addison Wesley.

Herreros de Tejada P, Green DG, Munoz Tedo C. 1992. Visual thresholds in albino and pigmented rats. *Vis Neurosci.* 9(3-4):409-14.

Hess RF, Campbell FW y Greenhalg T .1978. On the nature of the neural abnormality in human amblyopia: neural aberrations and neural sensitivity loss. *Pflugers Archiv fur die gesamte physiologie,* 377,201-7

Hoyt CS. 2005. Amblyopia: a neuro-ophthalmic view. *J Neuroophthalmol.* 25:227-231.

Hubel DH, Wiesel TN. 1962. Receptive fields, binocular interaction and functional architecture in the cat's visual cortex. *J Physiol.* 160:106-154.

Hummel FC, Cohen LG. 2006. Non-invasive brain stimulation: a new strategy to improve neurorehabilitation after stroke? *Lancet Neurol.* 5: 708-712

Hupfeld D, Hoffmann KP. 2006 Motion perception in rats (*Rattus norvegicus* sp.): deficits in albino Wistar rats compared to pigmented Long-Evans rats. 2006. *Behav Brain Res.* 170(1):29-33.

Ilija M, Jeffery G. 2000. Retinal cell addition and rod production depend on early stages of ocular melanin synthesis. *J Comp Neurol.* 2000 May 15;420(4):437-44.

Jacobs, G.H., Neitz, J. and Deegan, J.F. II. 1991. Retinal receptors in rodents maximally sensitive to ultraviolet light. *Nature*, 353:655-656.

Jacobs, Gerald H.; Fenwick, John A.; Williams, Gary A. 2001. Cone-based vision of rats for ultraviolet and visible lights. *Journal of Experimental Biology*. 204(14):2439-2446.

Kratz KE, Spera PD y smith DC .1976. Postcritical period reversal of effects of monocular deprivation on striate cortex cells of the cat. *Journal of Neurophysiology*, 39, 501-11

Lanum, Jackie. 1978. The damaging effects of light on the retina. Empirical findings, theoretical and practical implications. *Survey of Ophthalmology*. 22 (4):221-249

LaVail, M. M. 1976. Survival of some photoreceptors in albino rats following long-term exposure to continuous light. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 15, 64-70.

Levi DM y Klein S, .1982. Hiperacuity and amblyopia, *Nature*, 298, 268-9

Levi DM, Li RW. 2009. Improving the performance of the amblyopic visual system. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 364:399-407.

Li RW, Klein SA, Levi DM. 2008. Prolonged perceptual learning of positional acuity in adult amblyopia: perceptual template retuning dynamics. *J Neurosci.* 28:14223-14229.

Liebetanz D, Koch R, Mayenfels S, König F, Paulus W, Nitsche MA. 2009. Safety limits of cathodal transcranial direct current stimulation in rats. *Clin Neurophysiol.* 120:1161-1167.

Löwel S, Singer W. 1992. Selection of intrinsic horizontal connections in the visual cortex by correlated neuronal activity. *Science*. 255:209-212.

Maffei L, Berardi N, Carmignoto G, Cellerino A, Domenici L, Fiorentini A, Pizzorusso T. 1992. Role of neurotrophic factors in the plasticity of the mammalian visual system in Regeneration and plasticity in the mammalian visual system. Editors Mankit-Lam and Bray. MIT Press, Cambridge, USA, pp:45-56.

Maya Vetencourt JF, Sale A, Viegi A, Baroncelli L, De Pasquale R, O'Leary OF, Castrén E, Maffei L. 2008. The antidepressant fluoxetine restores plasticity in the adult visual cortex. *Science*. 320:385-388.

Mitchell DE, Sengpiel F. 2009. Neural mechanisms of recovery following early visual deprivation. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 364:383-398.

Munoz Tedo C, Herreros de Tejada P, Green DG. 1994. Behavioral estimates of absolute threshold in rat. *Vis Neurosci*. 11(6):1077-82.

Noell, W. K., V. S. Walker, B. S. Kang, S. Berman. 1966. Retinal damage by light in rats. *Investigative Ophthalmology*. 5(5): 450-473

Paxinos G, Watson C. 1998. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. San Diego, CA: Academic Press.

Pugh M .1958. Visual distortion in amblyopia. *British Journal of Ophthalmology*. 42, 449-60

Radlwimmer FB, Yokoyama S. 1998. Genetic analyses of the green visual pigments of rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) and rat (*Rattus norvegicus*). *Gene*. 218(1-2):103-9.

Sale A, Maya Vetencourt JF, Medini P, Cenni MC, Baroncelli L, De Pasquale R, Maffei L. 2007. Environmental enrichment in adulthood promotes amblyopia

recovery through a reduction of intracortical inhibition. *Nat Neurosci.* 10:679-681.

Sengpiel F, Blakemore C. 1994. Interocular control of neuronal responsiveness in cat visual cortex. *Nature.* 368:847-850.

Singer W. 1999. Neuronal synchrony: A versatile code for the definition of relations? *Neuron.* 24:49-65, 111-25.

Smith JC, Atkinson J, Anler S y Moore AT .1991. A prospective study of the binocularity and amblyopia in strabismic infants before and after corrective surgery: implication of the human critical period. *Invest. Ophthal. And Vis Sci,* 26,80-7

Szel, A. and Rohlich, P. 1992. Two cone types of rat retina detected by anti-visual pigment antibodies. *Exp. Eye Res.* 55, 47&endash;52.

Thompson B, Mansouri B, Koski L, Hess RF. 2008. Brain plasticity in the adult: modulation of function in amblyopia with RTMS. *Curr Biol.* 18:1067-1071.

Trachtenberg JT, Stryker MP. 2001. Rapid anatomical plasticity of horizontal connections in the developing visual cortex. *J Neurosci.* 21:3476-3482.

van Duuren E, Escamez FA, Joosten RN, Visser R, Mulder AB, Pennartz CM. 2007. Neural coding of reward magnitude in the orbitofrontal cortex of the rat during a five-odor olfactory discrimination task. *Learn Mem.* 14:446-456

Wagner T, Valero-Cabré A, Pascual-Leone A. 2007. Noninvasive human brain stimulation. *Annual Rev Biomed Eng.* 9: 527-565

Wasowicz M, Morice C, Ferrari P, Callebert J, Versaux-Botteri C. 2002. Long-term effects of light damage on the retina of albino and pigmented rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 43(3):813-20.

Wilson MA, McNaughton BL. 1993. Dynamics of the hippocampal ensemble code for space. *Science*. 261:1055-1058

VIII. ANEXOS

ANEXO I

LA VISIÓN DE LAS RATAS ALBINAS

A la hora de diseñar las tareas que la rata debe llevar a cabo para analizar el comportamiento de su corteza visual deberíamos tener en cuenta que su visión no es como la de los seres humanos.

Los seres humanos poseemos tres tipos de conos de color en la retina, por lo que tenemos visión "tricromática" basada en conos de longitud de onda corta "azul", conos de longitud de onda media "verde" y de longitud de onda larga "rojos".

Durante mucho tiempo, se pensó que las ratas eran totalmente daltónicas, (Crawford *et al.* 1990). Pero recientes experimentos de comportamiento, han demostrado que las ratas puede percibir la luz ultravioleta, y con entrenamiento puede distinguir entre el ultravioleta y la luz visible, así como entre los diferentes colores dentro del rango azul-verde (Jacobs *et al.* 2001). Esto se debe a que las ratas tienen sólo dos tipos de conos (tiene visión "dicromática"): conos para onda corta "azul-UV" y conos para longitud de onda media "verde" (Szel, 1992). En los conos de onda media "verde" el pico de sensibilidad es de alrededor de 510 nm (Radlwimmer 1998), pero los "azules" se desplazan hacia longitudes de onda más cortas que los conos "azules" de los seres humanos, alcanzando un máximo de 359 nm. Esto significa que las ratas pueden ver en el ultravioleta, por lo que pueden ver colores que los seres humanos no podemos percibir (Jacobs *et al.* 1991; 2001). Así, la retina de la rata es sensible a los verdes y azules-ultravioleta.

Es importante señalar que el 99% de la retina de la rata se compone de bastones que detectan los cambios de luz claro y oscuro, y sólo el 1% está formado por conos (Lavail 1976), en comparación con el 5% de un ser humano (Hecht 1987). Por tanto, la percepción del color por parte de la rata es más débil que la nuestra. De hecho en la manera de percibir el mundo por parte de

estas el brillo parece ser mucho más importante que el color. Es fácil de entrenar ratas para distinguir su comportamiento ante el brillo, pero difícil de entrenar su comportamiento para diferenciar colores (Jacobs *et al.* 2001).

A nivel de la corteza visual primaria en la rata Sprague-Dawley la porción binocular ocupa una franja estrecha que no supera el tercio de la extensión del sector monocular y se sitúa lateralmente a este último. Estos datos anatómicos sugieren la escasa significación relativa que en esta especie animal poseen las aferencias ipsilaterales para el procesamiento visual

Las ratas albinas tienen una visión más pobre aun que las ratas que no lo son. Aquí están los detalles:

Agudeza visual baja: la rata albina es incapacidad de controlar los niveles de luz entrante, la dispersión de la luz dentro del ojo, además durante su ciclo de vida tienden a desarrollar una degeneración retiniana progresiva lo que hace que a mayor edad su agudeza visual va siendo cada vez más pobre.

Se deslumbran con facilidad: las ratas albinas no puede controlar los niveles de luz entrante ya que en contraposición a las ratas pigmentadas carecen de pigmento en su iris lo cual le provoca deslumbramientos a intensidades elevadas de luz, llegando en casos de excesivo brillo a no poder ver nada en absoluto, porque sus retinas se ven saturadas por la luz entrante.

Sufren alteraciones de la visión con poca luz: Los bastones de la retina requieren un precursor de la melanina para el desarrollo (dopa). Las ratas albinas no pueden sintetizarlo por lo tanto el 30% de los bastones de la rata no se desarrollan (Ilia *et al.* 2000). No sólo la rata albina tienen menos bastones si no que en general estas tienen menos fotorreceptores (*rodopsina*) que en el caso de las ratas pigmentadas (Grant *et al.* 2001). Los bastones y sus fotorreceptores son útiles para detectar los niveles bajos de luz, las ratas albinas, por tanto, podrían tener problemas para ver en condiciones de poca luz.

Adaptación tardía a la oscuridad: Las ratas albinas tardan más en adaptarse a la oscuridad que las ratas pigmentadas. En concreto, las ratas pigmentadas

pueden adaptarse a la oscuridad en unos 30 minutos aproximadamente, pero las ratas albinas pueden tardar alrededor de tres horas (Behn *et al.* 2003). Este retraso viene provocado por que las ratas albinas carecen de la melanina en los ojos. Lo cual les ha reducido la bio-disponibilidad de calcio (Drager 1985) y se sabe que el calcio juega un papel clave en la capacidad de adaptarse a las condiciones de poca luz (Fain *et al.* 2001).

Existen trabajos contradictorios en cuanto a la visión de las ratas albinas una vez que se han adaptado a la oscuridad en comparación con las ratas pigmentadas, los informes Balkema (1988) dicen que las ratas pigmentadas pueden ver en condiciones de poca luz mucho más que las ratas albinas. Sin embargo, Green *et al.* (1991), Herreros *et al.* (1992), y Muñoz *et al.* (1994) no encontraron diferencias en la adaptación a la oscuridad entre albinas y ratas pigmentadas.

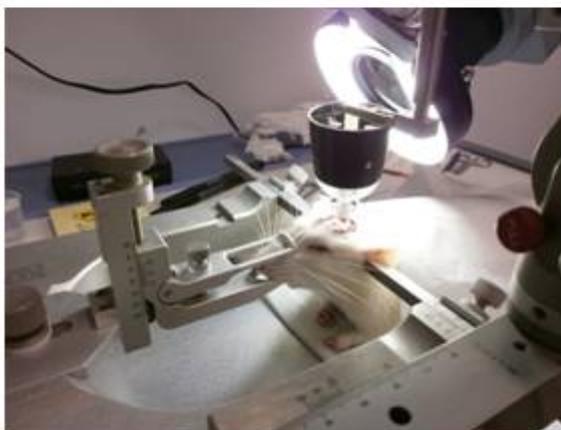
Problemas para coordinar lo que ven los dos ojos: Hay aún más diferencias visuales entre los animales albinos y normalmente pigmentados, que afectan a la conexión ojo-cerebro. En los mamíferos normales, el lado izquierdo de cada ojo está conectado con el hemisferio derecho del cerebro, y el lado derecho de cada ojo está conectado con el hemisferio izquierdo. Los albinos tienen una conexión mucho más simple: la mayor parte del ojo izquierdo está conectado con el hemisferio derecho, mientras que la mayor parte del ojo derecho está conectado con el hemisferio izquierdo, además, las proyecciones de los nervios más profundos están desorganizadas (Creel *et al.* 1990). La consecuencia es que las ratas albinas pueden tener problemas de coordinación y procesamiento de la visión binocular.

Mala percepción del movimiento: Las ratas Albinas tienen la percepción del movimiento muy pobre en comparación con las ratas pigmentadas. Las ratas albinas requieren alrededor de dos a tres veces más nivel de coherencia a la hora de distinguir el movimiento que las pigmentadas. En el experimento realizado por Hupfeld y Hoffman (2006) se les presentaba a las ratas unos patrones de movimiento los cuales consistían en una serie de puntos en movimiento al azar en una pantalla. Se creó un patrón de coherencia de movimiento el cual estaba definido por el porcentaje de puntos que se movían

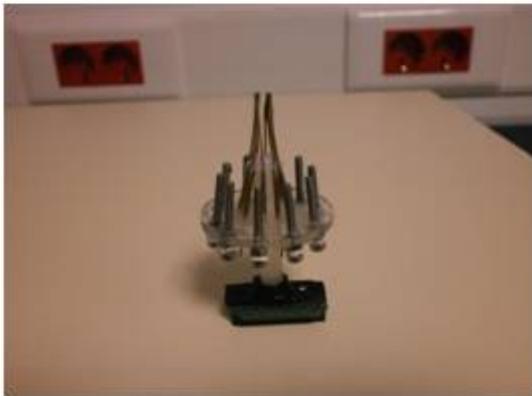
hacia la derecha. Dicho porcentaje se llamaba el "porcentaje de coherencia dinámica." Por lo tanto, una coherencia del 100% significa todos los puntos se trasladan a la derecha, el 70% la coherencia significaba el 70% de los puntos se trasladan a la derecha mientras que el 30% se traslada al azar, y así sucesivamente". Tanto las ratas pigmentadas como las albinas pueden distinguir entre un patrón aleatorio y un patrón de coherencia del 100%. Cuando la coherencia se redujo, el rendimiento disminuyó a la hora de discriminar dicho patrón tanto en ratas pigmentadas como en albinas. Sin embargo las ratas pigmentadas tendían a hacerlo mejor que las albinas. Ambas discriminaban hasta un 30% la coherencia, pero por debajo de ese nivel de coherencia las ratas pigmentadas eran significativamente mejores que las albinas.

Degeneración de la retina: Además de los destellos deslumbrantes, la luz ambiente (incluso a baja intensidad) puede causar la degeneración de retina de las ratas de forma irreversible (Noell, 1966). Ya que éstas son muy sensibles a la luz, en ellas los bastones se degeneran con mayor facilidad que los conos (Cicerone, 1976; Lanum, 1978), lo que reduce la capacidad de la rata para ver con poca luz. Veinticuatro horas de luz ambiente son suficientes para causar algún grado de degeneración, y un par de semanas son suficientes para degenerar por completo la retina externa (Lanum, 1978), al causar la pérdida de fotorreceptores y de los cuerpos celulares (Wasowicz *et al.* 2002).

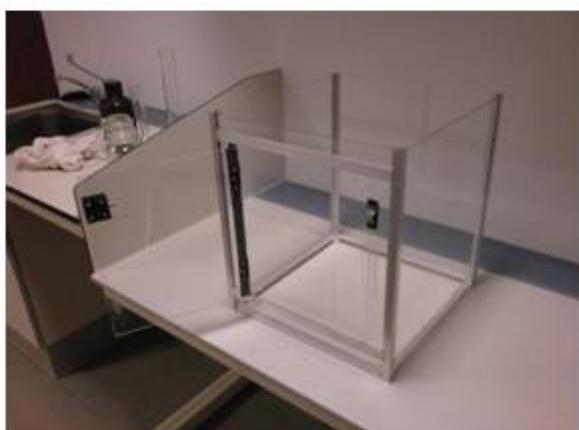
ANEXO 2: Pruebas piloto de cirugía para implantación del Hyperdrive



ANEXO 3 : Diseño y desarrollo de distintos tipos de Hyperdrive



ANEXO 4 : Fabricación de jaula de metacrilato para electrofisiología

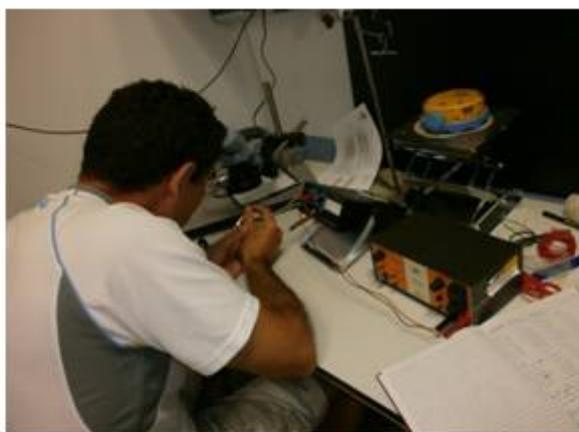


ANEXO 5: Desarrollo y fabricación de jaula de Faraday

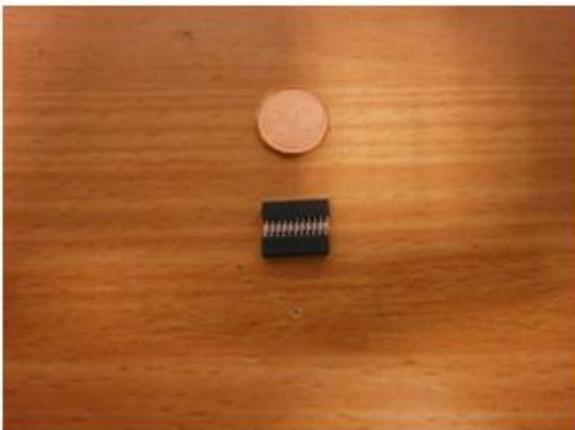
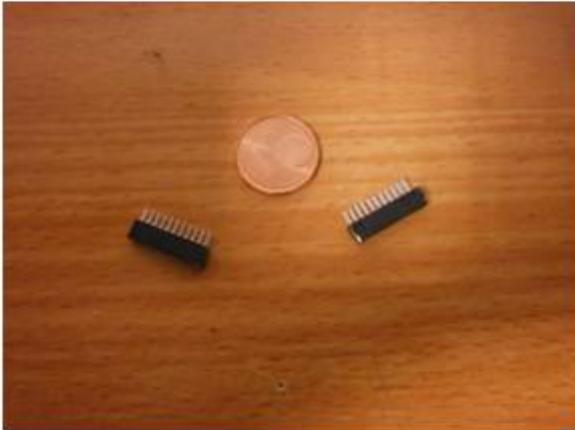




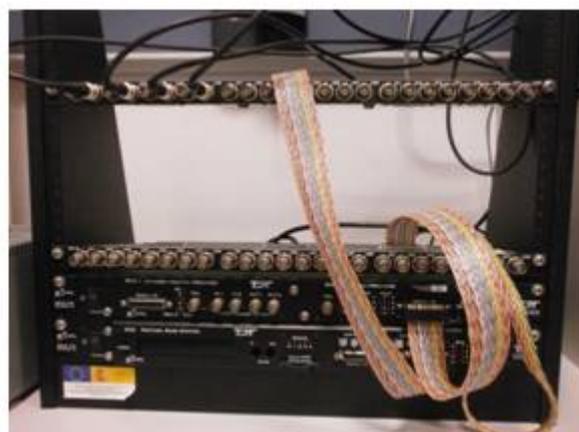
ANEXO 6: Montaje de tétrodos en el Hyperdrive y pruebas de conectividad



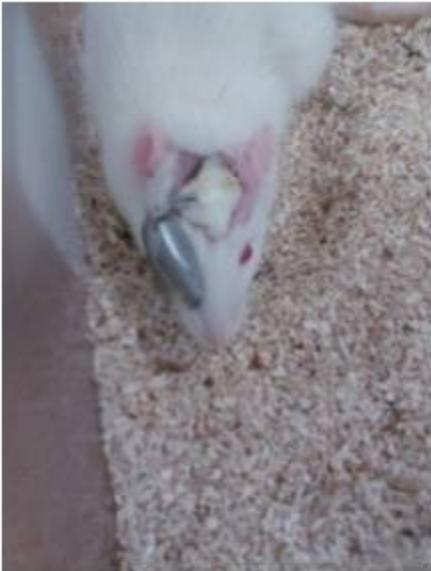
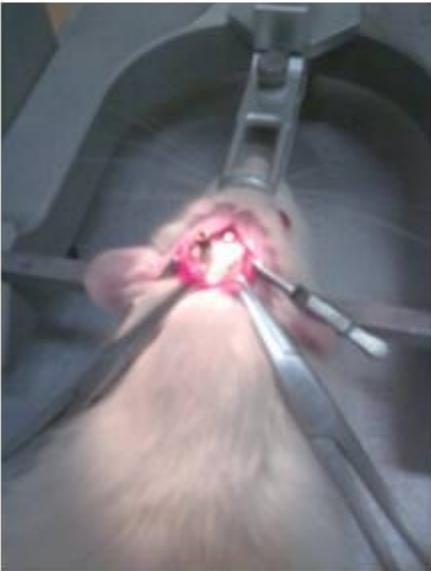
ANEXO 7 : Desarrollo de componentes electrónicos



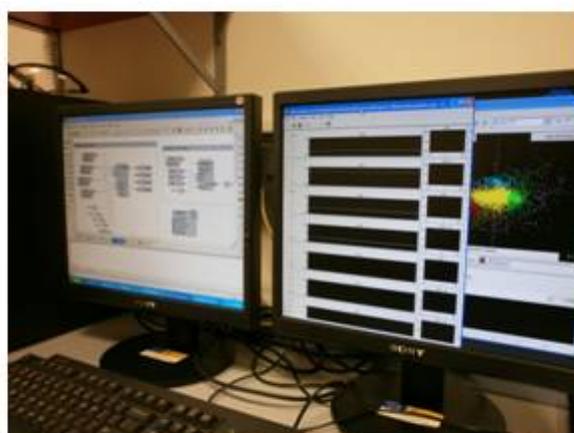
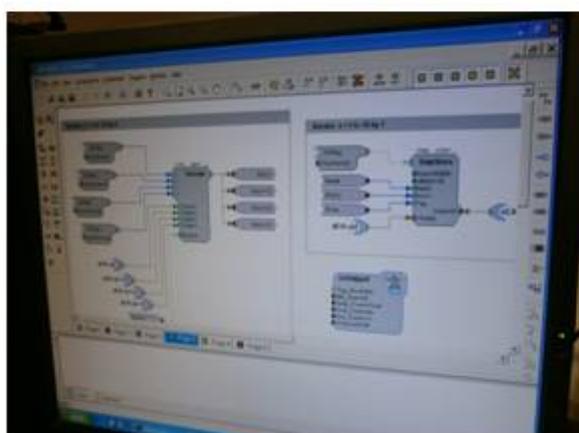
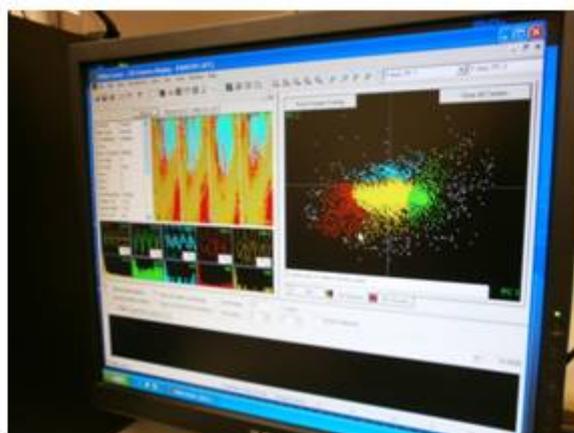
ANEXO 8 : Montaje del laboratorio de electrofisiología



ANEXO 9: Implantacion de electrodos para tDCS y pilotos con parche



ANEXO 10: Pilotos con hardware y software



RESUMEN

En este proyecto se plantea recuperar la función visual en sujetos ambliopes. Pretendemos desarrollar una vertiente experimental básica con intención de que nuestras investigaciones puedan ser extrapolables a otros estudios clínicos y ser útiles con finalidad terapéutica en humanos.

Utilizaremos animales de experimentación (ratas albinas Sprague-Dawley) en los cuales induciremos el fenómeno de la ambliopía (ojo vago) mediante sutura palpebral u oclusión en uno de los ojos. Esta oclusión se realizará en ratas jóvenes (día 12 postnatal) y se mantendrá hasta la edad de 2 meses. Se considera que este momento coincide con un periodo crítico en el desarrollo del sistema visual de la rata y, por tanto, la supresión visual monocular durante el mismo es utilizada como modelo experimental de ambliopía. A fin de valorar los efectos de la pérdida sensorial utilizaremos técnicas de registro neurofisiológico, y en el futuro también pretendemos evaluar la pérdida sensorial mediante procedimientos de medición conductual de la función visual. Está previsto que a la fase inicial de evaluación de la función visual mediante procedimientos neurofisiológicos y conductuales siga una segunda fase en la que pretendemos desarrollar estrategias terapéuticas que combinen procedimientos conductuales de estimulación visual y estimulación eléctrica transcraneal sobre las áreas visuales corticales. Así, a diferencia de los procedimientos de estimulación visual tradicionales en los que simplemente se ocluye el ojo sano para estimular la función de la vía visual ambliope, pretendemos diseñar tareas y procedimientos de estimulación que aceleren la recuperación de la corteza afectada por ambliopía. Simultáneamente, diseñaremos un protocolo de estimulación eléctrica transcraneal, con objeto de favorecer las capacidades plásticas de la corteza cerebral ambliope, y por tanto potencie el efecto de los procedimientos conductuales y de estimulación sensorial.

Al tratarse de un proyecto de investigación que inicia su puesta en marcha y requiere poner en funcionamiento diferentes protocolos y técnicas nuevas en nuestro laboratorio, en el presente Trabajo Fin de Máster describimos la fase inicial del proyecto de investigación, en la cual desarrollamos los procedimientos neurofisiológicos para la estimulación y el registro de la actividad neuronal, bien de neuronas individuales como de poblaciones neuronales.