



División de Neurociencias
Departamento de Fisiología, Anatomía y Biología Celular
Facultad de Ciencias Experimentales

Universidad Pablo de Olavide

Consecuencias funcionales a largo plazo de tratamientos postnatales con Metilfenidato y con Idazoxan en un modelo de ratón para el Estudio del Trastorno por Déficit de Atención con Hiperactividad

TESIS DOCTORAL

Manuel D. Ramos Castilla

Mayo 2013

Consecuencias funcionales a largo plazo de
tratamientos postnatales con Metilfenidato y
con Idazoxan en un modelo de ratón para el
Estudio del Trastorno por Déficit de Atención
con Hiperactividad

DIRECTOR

Dr. Eduardo Domínguez del Toro

Profesor Titular del Departamento de
Fisiología, Anatomía y Biología Celular
de la Facultad de Ciencias Experimentales de la
Universidad Pablo de Olavide

Trabajo presentado para la obtención del título de
Doctor

Manuel D. Ramos Castilla

Eduardo Domínguez del Toro, Profesor Titular del Departamento de Fisiología, Anatomía y Biología Celular de la facultad de Ciencias Experimentales de la Universidad Pablo de Olavide.

CERTIFICA:

Que el presente trabajo titulado “Consecuencias funcionales a largo plazo de tratamientos postnatales con Metilfenidato y con Idazoxan en un modelo de ratón para el Estudio del Trastorno por Déficit de Atención con Hiperactividad”, ha sido realizado bajo su dirección y supervisión por D. Manuel D. Ramos Castilla, licenciado en Psicología Clínica y Antropología y considera que reúne las condiciones de calidad y rigor científico para ser presentada y defendida como Tesis Doctoral. Dentro del programa de doctorado de Neurociencias.

Sevilla, 17 de mayo de 2013

Fdo: Dr. Eduardo Domínguez del Toro

Dedicado:

A Lola, Carmen y Blanca, mis hijas, la mejor ofrenda que he recibido en mi vida, son la suma de mi formidable familia. Que logren entender los momentos que les he privado de soñar juntos. Recuperaremos estos siete años. A su madre, que es mi esposa, por tolerarme y no olvidarme.

A mi padre que siempre está en mi recuerdo, que admiró y confió en la Ciencia. A su esposa, que es mi extraordinaria madre, por lo laborioso que le hago entenderme.

“La mejor vida no es la más larga, sino la más rica en buenas acciones.”

Marie Curie (1867-1934), científica francesa, Nóbel de Física

Agradecimientos

Al Departamento de Fisiología, Anatomía y Biología Celular de la UPO, que ha mantenido mi esperanza. Al Área de Fisiología que es interminable. A la Fundación Conocimiento y Cultura, por su apoyo económico, impulsor de este trabajo.

Como no sería de agradecer, por supuesto no quiero olvidar a nadie, pues no os lo merecéis. Gracias a tod@s. A tod@s los que habéis tolerado mi desconocimiento, mis cuestiones y comentarios, a tod@s los que habéis contribuido a la realización de este trabajo, que sois much@s. Gracias por dedicarme tiempo y apoyo, por la paciencia, por la enseñanza, por hacerme entretenido aprender, por amenizarme las jornadas. Gracias por crearme dudas, por ayudarme a intentarlas resolver, por vuestras insaciables ganas de trabajar, por los resultados. Gracias por vuestra amabilidad, por vuestra sonrisa y por hacerme reír. Gracias por concederme el privilegio de conoceros. Gracias también a los pequeños roedores, por consentir fusionarme a ellos tantas horas en nuestra afiliada y compartida soledad.

Agradezco lo afortunado que he sido al coincidir con mis brillantes compañer@s de esta aventura, Noelia, Teresa, Mirian, Azahara, Cristina, Elena, Rocío, María, siempre respondéis, estaréis perpetuamente en mi recuerdo. A Raudel por hacerme menos laberínticas las fórmulas y cubrirme el lado derecho estadísticamente. A Elena Porras por su sosegado auxilio, asesoramiento y disposición. A J. Antonio por hacerme ganar tiempo, tenerme siempre a punto los ordenadores y velar por la informática. A Juan Carlos por despejarme, por su hilaridad y consejos. A Iván y Javier por proporcionarme curiosar. A María y José por acercarme lo lejano, a Samuel por su pacífica presencia. A los bedeles y limpiadoras, las primeras sonrisas de las mañana, gracias por resistirnos todo el día.

Agradecido a José María, a su incansable mensaje, me sedujo el primer día que le oí hablar de ciencia. A Agnès por su perseverancia y su ilustración ante mis preguntas. A Ángel Carrión y su equipo, por revelarme algunas de las diminutas piezas encubiertas de la Biología y custodiar su laboratorio siempre con la puerta abierta.

A la oportuna Elena de “micontigo”, que es mi fracción científica, gracias por obsequiar su sangre en análogo instante.

Y como no, a Eduardo y Magda. A él por permitirme estar aquí, por enseñarme y sufrirme, por agudizarme nuestros debates, por su diligencia y armonía. A ella por suavizarlo todo, su bella educación y su agradable presencia. Por ell@s estoy aquí.

Mi mayúsculo agradecimiento a tod@s, siete años ha dado para todo, pero aún queda bastante.

Y siempre a mi familia por su bondad y a mis hijas, por las aventuras que les debo. Gracias, un abrazo interminable.

“Casi todo lo que realice será insignificante, pero es muy importante que lo haga.”

Mahatma Gandhi

TABLA DE CONTENIDOS

	Página
Índice de figuras	12
Abreviaturas	15
Resumen	17
Introducción	18
1.1. La Organización Mundial de la Salud y el Trastorno de Déficit de Atención e Hiperactividad	18
1.2. Datos sobre el Trastorno de Déficit de Atención e Hiperactividad	18
1.2.1. Sensibilización Unificada sobre el Trastorno de Déficit de Atención e Hiperactividad	19
1.3. Conclusiones Principales durante el III Congreso Internacional sobre el TDAH (Berlín 2011), Consenso Internacional sobre TDAH (Barkley) y Consenso Multidisciplinar Nacional en TDAH (Valdizan)	20
1.3.1. Evolución Histórica del Trastorno de Déficit de Atención e Hiperactividad	20
1.3.2. Desarrollo del Término Trastorno de Déficit de Atención e Hiperactividad	22
1.3.2.1. Referencias Históricas Cronológicas desde el Siglo XIX (APA 2009)	22
1.3.2.1.1. Críticas al DSM-V: APA	25
1.3.3. Características más Representativas del Trastorno de Déficit de Atención e Hiperactividad	25
1.4. Qué es el Trastorno de Déficit de Atención e Hiperactividad	26
1.4.1. Heredabilidad	28
1.4.2. Factores Ambientales	29
1.4.3. Sintomatología	29
1.4.3.1. Clasificación del Trastorno por Déficit de Atención con Hiperactividad según sus Síntomas (DSM-IV TR)	29
1.4.4. Diagnóstico	30
1.4.4.1. Criterios Diagnósticos para Trastorno de Déficit de Atención e Hiperactividad	31

1.4.4.1.1. Criterios de Déficit de Atención	31
1.4.4.1.2. Criterios de hiperactividad e impulsividad	32
1.4.5. Evaluación del Trastorno de Déficit de Atención e Hiperactividad	32
1.4.6. Trastornos Asociados	33
1.4.7. Evolución del Impacto del Trastorno de Déficit de Atención e Hiperactividad en el Desarrollo	34
1.4.8. Trastorno de Déficit de Atención e Hiperactividad en Adultos	36
1.4.9. Tratamiento del Trastorno de Déficit de Atención e Hiperactividad	37
1.4.9.1. Tratamiento Médico-Farmacológico	38
1.4.9.2. Tratamiento Psicológico	39
1.4.9.3. Tratamiento Multimodal	39
1.5. Contribución de Modelos de Animales a la Investigación sobre el TDAH	40
1.5.1. Modelos Genéticos	41
1.5.1.1. Rata Espontáneamente Hipertensa (SHR)	42
1.5.1.2. Ratones Knockout para el Transportador Dopaminérgico (DAT-KO)	43
1.5.1.3. Ratones Coloboma	43
1.5.1.4. Ratas Naples Altamente Excitables (NHE)	44
1.5.1.5. Ratones Acallosal	44
1.5.2. Animales Expuestos a Neurotoxinas	44
1.5.2.1. Ratas Jóvenes con Lesión Cerebral Neonatal con 6-Hidroxidopamina	45
1.5.2.2. Ratas con Hipoxia Neonatal	45
1.5.2.3. Ratas con Desarrollo Cerebelar Sorprendente	45
1.5.3. Animales Expuestos a Toxinas Ambientales	45
1.5.3.1. Ratones Expuestos Crónicamente	46
1.5.3.2. Ratas con Daño Hipocampal por Rayos X	46
1.5.4. Otros Modelos	46
1.5.4.1. Ratas Macho Hiposexuales	46

1.6. Organización del Sistema Nervioso Central	46
1.7. Desarrollo del Sistema Nervioso	47
1.7.1. Sistemas Catecolaminérgicos	51
1.7.1.1. Sistema Dopaminérgico	53
1.7.1.2. Sistema Noradrenérgico	56
1.7.1.3. Sistema Adrenérgico	59
1.8. Vitamina A	60
1.8.1. Historia	60
1.8.2. Absorción de Vitamina A y Síntesis de Ácido Retinoico	62
1.9. Qué es el Ácido Retinoico	63
1.9.1. Mecanismo de Acción del Ácido Retinoico	64
1.9.2. Problemática del Ácido Retinoico	65
1.10. Idazoxan (IDA)	68
1.11. Metilfenidato (MF)	70
1.11.1. Acción Neuromoduladora	72
1.11.2. Efectos Conductuales	72
1.11.3. Farmacoterapia	73
1.11.4. Adicciones	73
Objetivos	75
Materiales y Métodos	76
2.1. Normativas Europeas, Nacionales y Autonómicas	76
2.2. Métodos Relacionados con la Manipulación de los Animales	78
2.2.1. Sujetos Experimentales	78
2.2.2. Principios de Estabulación	79
2.3. Tratamiento para Obtener los Ratones Experimentales	79
2.4. Procedimiento Experimental	81
2.4.1. Caracterización del Fenotipo Motor Socio-Conductual en Ratones Adultos	82
2.4.1.1. Marcaje de los Ratones	83
2.5. Estudio Comportamental en Adultos	83
2.5.1. Marcador de Desarrollo	83
2.5.1.1. Evolución del Peso y Medida	83

2.5.2. Prueba de Analgesia	84
2.5.2.1. Prueba Nociceptiva – Test de la Placa Caliente	84
2.5.3. Pruebas Conductuales y de Capacidades Motoras	85
2.5.3.1. Prueba de Actividad Motora – Actímetro	85
2.5.3.2. Respuesta de Sobresalto e Inhibición por Pre-pulso	86
2.5.4. Pruebas de Aprendizaje Motor y Equilibrio	90
2.5.4.1. Cilindro Rotatorio	90
2.5.4.2. Cinta Giratoria – Sinfín	92
2.5.5. Pruebas Memorísticas y de Aprendizaje	94
2.5.5.1. Reconocimiento de Objetos	94
2.5.5.2. Evitación Pasiva	97
2.5.6. Condicionamiento Clásico del Reflejo Palpebral	101
2.5.6.1. Cirugía	101
2.5.6.2. Procedimiento Quirúrgico Común para Implantación de Electrodo Periférico	102
2.5.6.3. Respuesta Refleja Parpebrales	103
2.5.6.4. Técnica de Registro	104
2.5.7. Comportamiento Social	106
2.5.7.1. Intruso	106
2.5.7.2. Actividad Defecadora	108
2.5.8. Preparación de Histología	108
2.5.9. Prueba RT-PCR (<i>Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction</i>)	109
2.5.9.1. Extracción de ARN	109
2.5.9.2. Cuantificación de ARN	110
2.5.9.3. Retrotranscripción	110
2.5.9.4. PCR Semicuantitativa	110
2.5.9.5. Electroforesis de DNA	111
2.5.9.6. Cuantificación de ADN por Densitometría Óptica	112
2.6. Recogida y análisis de datos	112
2.7. Presentación de Bibliografía	115
Resultados	116
3.1. Ratones Idazoxan	117

3.1.1. Marcadores de Desarrollo – Peso	117
3.1.2. Placa Caliente	119
3.1.3. Actímetro	121
3.1.4. Respuesta de Sobresalto	124
3.1.5. Cilindro Rotatorio	127
3.1.6. Cinta Giratoria	133
3.1.7. Reconocimiento de Objetos	134
3.1.8. Evitación Pasiva	137
3.1.9. Condicionamiento Clásico	138
3.1.10. Intruso	140
3.1.11. RT-PCR	142
3.2. Ratones Metilfenidato	146
3.2.1. Marcadores de Desarrollo – Peso	146
3.2.2. Placa Caliente	147
3.2.3. Actímetro	149
3.2.4. Respuesta de Sobresalto	152
3.2.5. Cilindro Rotatorio	156
3.2.6. Cinta Giratoria	160
3.2.7. Reconocimiento de Objetos	161
3.2.8. Evitación Pasiva	164
3.2.9. Condicionamiento Clásico	165
3.2.10. Intruso	167
3.2.11. RT-PCR	170
Discusión	175
4.1. Ratones Idazoxan	176
4.2. Ratones Metilfenidato	180
4.3. Consideraciones generales	186
Conclusiones	188
Bibliografía	189
Anexos	197
5.1. Datos Informativos sobre TDAH	197
5.2. Tablas de Expresión del Efecto Estadístico	199

Índice de figuras

Figuras Introducción

Figura 1.1. Esquema de la segmentación del tronco del encéfalo	48
Figura 1.2. Esquema representativo de la distribución de los genes Hox	49
Figura 1.3. Síntesis de catecolaminas	53
Figura 1.4. Vías y sinapsis dopaminérgicas	54
Figura 1.5. Vías noradrenérgicas	57
Figura 1.6. Estructura química del retinol	60
Figura 1.7. Estructura química del ácido retinoico	63
Figura 1.8. Fórmula química del Idazoxan	68
Figura 1.9. Fórmula química del Metilfenidato	71

Figuras Materiales y Método

Figura 2.1. Esquema representativo de la selección de sujetos	78
Figura 2.2. Descripción del tratamiento farmacológico	80
Figura 2.3. Batería de las distintas pruebas realizadas	82
Figura 2.4. Placa caliente	84
Figura 2.5. Actímetro	86
Figura 2.6. Inhibición por prepulso	88
Figura 2.7. Análisis de la inhibición por prepulso	90
Figura 2.8. Cilindro rotatorio	92
Figura 2.9. Cinta giratoria	94
Figura 2.10. Reconocimiento de objetos	96
Figura 2.11. Evitación pasiva	100
Figura 2.12. Registro electromiográfico	104
Figura 2.13. Paradigma de traza	105
Figura 2.14. Intruso	107
Figura 2.15. Aplicación para análisis de datos estadísticos	114
Figura 2.16. Estadística para PCR	115

Figuras Idazoxan

Figura 3.1. Evolución del peso	118
Figura 3.2. Representación de la latencia (placa caliente)	120

Figura 3.3. Número de heces (placa caliente)	121
Figura 3.4. Evolución de la actividad acumulada total (actímetro)	122
Figura 3.5. Representación del porcentaje (actímetro)	123
Figura 3.6. Número de heces (actímetro)	124
Figura 3.7. Latencia de respuesta (sobresalto)	125
Figura 3.8. Intensidad de la respuesta pico (sobresalto)	125
Figura 3.9. Medida del área (sobresalto)	126
Figura 3.10. Porcentaje de inhibición (sobresalto)	127
Figura 3.11. Número de caídas (cilindro rotatorio)	129
Figura 3.12. Número de respuestas pasivas (cilindro rotatorio)	130
Figura 3.13. Número de giros (cilindro rotatorio)	131
Figura 3.14. Porcentaje de éxito (cilindro rotatorio)	132
Figura 3.15. Número de heces (cilindro rotatorio)	133
Figura 3.16. Representación del tiempo (cinta giratoria)	134
Figura 3.17. Gráfica normalizada (reconocimiento de objetos)	135
Figura 3.18. Número total de contactos (reconocimiento objetos)	136
Figura 3.19. Número de heces (reconocimiento objetos)	137
Figura 3.20. Latencia (evitación pasiva)	138
Figura 3.21. Curvas de aprendizaje asociativo (C. clasico)	139
Figura 3.22. Representación de la conducta de olfateo (intruso)	140
Figura 3.23. Latencia de respuesta (intruso)	141
Figura 3.24. Número de peleas (intruso)	142
Figura 3.25. Representación RT-PCR en cerebelo	143
Figura 3.26. Representación RT-PCR en tronco del encéfalo	144
Figura 3.27. Representación RT-PCR en hipocampo	145
Figura 3.28. Representación RT-PCR en la corteza cerebral	146

Figuras Metilfenidato

Figura 3.29. Evolución del peso	147
Figura 3.30. Representación de la latencia (placa caliente)	148
Figura 3.31. Número de heces (placa caliente)	149
Figura 3.32. Evolución de la actividad acumulada total (actímetro)	150
Figura 3.33. Representación del porcentaje (actímetro)	151

Figura 3.34. Número de heces (actímetro)	152
Figura 3.35. Latencia de respuesta (sobresalto)	153
Figura 3.36. Intensidad de la respuesta pico (sobresalto)	154
Figura 3.37. Medida del área (sobresalto)	155
Figura 3.38. Porcentaje de inhibición (sobresalto)	156
Figura 3.39. Número de caídas (cilindro rotatorio)	157
Figura 3.40. Número de respuestas pasivas (cilindro rotatorio)	158
Figura 3.41. Número de giros (cilindro rotatorio)	159
Figura 3.42. Porcentaje de éxito (cilindro rotatorio)	159
Figura 3.43. Número de heces (cilindro rotatorio)	160
Figura 3.44. Representación del tiempo (cinta giratoria)	161
Figura 3.45. Gráfica normalizada (reconocimiento de objetos)	162
Figura 3.46. Número total de contactos (reconocimiento objetos)	163
Figura 3.47. Número de heces (reconocimiento objetos)	164
Figura 3.48. Latencia (evitación pasiva)	165
Figura 3.49. Curvas de aprendizaje asociativo (C. clasico)	167
Figura 3.50. Representación de la conducta de olfateo (intruso)	168
Figura 3.51. Latencia de respuesta (intruso)	169
Figura 3.52. Número de peleas (intruso)	170
Figura 3.53. Representación RT-PCR en cerebelo	171
Figura 3.54. Representación RT-PCR en tronco del encéfalo	172
Figura 3.55. Representación RT-PCR en hipocampo	173
Figura 3.56. Representación RT-PCR en la corteza cerebral	174

Abreviaturas

A: Adrenalina.

ACAMPADAH: Asociación Cántabra de Padres de ayuda al Déficit de Atención y/o Hiperactividad.

ADH: Alcohol deshidrogenasas

ADHD: Siglas en inglés del TDAH

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ALDH: Aldehído deshidrogenasas

APA: Asociación Psiquiátrica Americana

AR: Ácido Retinoico

ALDH2: Aldehído deshidrogenasa 2 familias (mitocondrial)

ATAR: AR trans

CD1: Cepa de ratón BALB/c, ratón blanco suizo, (ratón albino)

CEI: Criterio de Edad de Inicio

CIAP: Clasificación Internacional de la Atención Primaria

CIE: Clasificación Internacional de Enfermedades.

CIF: Clasificación internacional del funcionamiento, de la discapacidad y de la Salud (CIE)

COMT: Catecol-oxi-metiltransferasa

CYP26C1: Familia de citocromo (hemoproteína)

DA: Dopamina

DRD4: Receptor de Dopamina D4

DSM: Manual diagnóstico y estadístico de los trastornos mentales

E7: Séptimo día de gestación

EFPA: Federación Europea de Asociaciones de Psicólogos

ER: Equivalentes de Retinol

FEAADAH: Federación Española de Asociaciones de Ayuda al Déficit de Atención e Hiperactividad

IDA: Idazoxan

LPA: Leucemia promielocítica aguda

OMS: Organización Mundial de la Salud

MAO: Monoaminoxidasa.

MF: Metilfenidato

NA: Noradrenalina

PNMT: Feniletanolamina N-Metiltransferasa

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

RAR: Receptores de Ácido retinoico

RO: Retinol

RT-PCR: Siglas en ingles de *Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction*

RXR: Receptores X de retinol

SDR: Dehidrogenasa-reductasas

SIL: Ratones silvestres

SNC: Sistema Nervioso Central

TDAH: Trastorno por Déficit de Atención e Hiperactividad

WFIRS: Siglas en ingles de la escala para medir el impacto de la hiperactividad en la funcionalidad de los niños

WONCA: Organización Mundial de los Médicos Generales y de Familia

6-OHDA: Neurotoxina 6-Hidroxidopamina

Resumen

Nuestro trabajo se inicia con una leve descripción del Trastorno de Déficit de Atención e Hiperactividad (TDAH en adelante), su evolución en la clínica, la evocación social, sintomatología, diagnósticos y tratamientos. También se realiza una discusión sobre los retinoides, concretamente sobre el Ácido Retinoico (AR), sus mecanismos y funciones, del sistema catecolaminérgico, una medida probatoria del tratamiento con AR en las primeras etapas embrionarias del ratón, para estudiar las consecuencias durante su vida y desarrollo aplicando posteriormente Metilfenidato e Idazoxan (fármacos) en la etapa postnatal del ratón. Para ello se propone el modelo de ratón con déficit de atención e hiperactividad expuesto a Ácido Retinoico creado por el grupo dirigido por el Dr. Domínguez del Toro (Guimarães y cols. 2007) de características comportamentales similares a las humanas, interpretando las distancias.

Los resultados obtenidos demuestran que, una vez suprimidos sendos tratamientos, en la etapa adulta, los animales mantienen los síntomas característicos del TDAH a dicha edad, manteniéndose el déficit atencional, observado en pruebas como el condicionamiento clásico o el reconocimiento de objetos, así como la hipoactividad, medida en la prueba del actímetro. Los resultados también demuestran que los tratamientos postnatales con ambos fármacos en ratones silvestres, y por tanto normales, afectan negativamente el desarrollo de las pruebas mencionadas, lo que indica que producen daños irreversibles en sus cerebros, afectando a las tareas que implican psicomotricidad, atención y memoria.

Introducción

1.1. La Organización Mundial de la Salud y el Trastorno de Déficit de Atención e Hiperactividad

Entre las características principales del TDAH se encuentran los problemas de atención y actividad excesiva. Las deficiencias de la atención se manifiestan como una tendencia a suspender las tareas antes de terminarlas y una dificultad para concluir cualquier actividad: el niño o adolescente cambia con frecuencia de una actividad a otra. Este déficit en persistencia y atención se debe diagnosticar como un trastorno solamente si es excesivo para la edad e inteligencia del niño o adolescente y si afecta a su funcionamiento y aprendizaje normal. La actividad excesiva implica inquietud exagerada, especialmente en situaciones que requieren relativa tranquilidad. Puede incluir conductas tales como correr o saltar de un lado a otro, levantarse de la silla en situaciones en que se espera que permanezca sentado, hablar excesivamente y hacer demasiado ruido, así como inquietud o intranquilidad excesiva.

Los problemas conductuales característicos deben haberse iniciado a temprana edad (antes de los 6 años) y ser de larga duración (mayor a 6 meses) y no estar limitados a un solo entorno.

1.2. Datos sobre el Trastorno de Déficit de Atención e Hiperactividad

El TDAH actualmente es uno de los trastornos más y mejor investigados de la psiquiatría. Los datos generales sobre su validez son mucho más contundentes que los de la **mayoría de los trastornos mentales e incluso que los de muchas afecciones médicas**, según el Consejo de asuntos científicos de la Asociación Americana de Medicina.

La Federación Española de Asociaciones de Ayuda al Déficit de Atención e Hiperactividad (FEAADAH) viene celebrando desde 2008 la Semana Europea de Sensibilización sobre el TDAH, patrocinada por *ADHD Europe*, de forma

coordinada con los restantes países miembros de esta organización. El último premio del 7º Congreso Virtual de Psiquiatría Interpsiquis correspondió al artículo: **Un trastorno de moda** (sobre TDAH) I. Morán Sánchez; A. de Concepción Salesa; M.M de la Cruz Recio; P. Moreno Gil; F. Robles Sánchez. CSM Infantil Molina de Segura (Murcia, España).

El sobrediagnostico producido por el movimiento económico alrededor de una patología no siempre repercute en los grandes impactos monetarios, si no en la alteración de la buena praxis por los profesionales, en ocasiones nos encontramos noticias como estas, “Tres psiquiatras de Harvard, investigados por cobros millonarios de la industria farmacéutica por sobrediagnosticar TDAH” (*The New York Time*, 8, 9 y 12 junio 2008, *By Scott Hensley, Gardiner and Benedict Carey*) Cover N.

1.2.1.Sensibilización Unificada sobre el Trastorno de Déficit de Atención e Hiperactividad

La Asamblea Parlamentaria sobre el control del diagnóstico y tratamiento de los niños hiperactivos en Europa resuelve el acta de recomendación 1562 (2002), aprobada por el Comité de Ministros (26/3/2003) en la reunión de diputados nº 833.

En la edición 109 del congreso de los EEUU se designa el día 14 de Septiembre de 2005 como el “I Día Nacional de Toma de Conciencia del Trastorno por Déficit de Atención (TDAH)”. Desde ese momento se impulsa una gestión más uniforme, aunando las diferentes disciplinas para un sólo efecto, que se extiende universalmente. El extracto de la resolución es el siguiente:

a) Se designa el 14 de septiembre del año 2005 como el “I Día Nacional de Toma de Conciencia del Trastorno por Déficit de Atención (TDAH)” (*National Attention Deficit Disorder Awareness Day*).

b) Se reconoce que el Trastorno por Déficit de Atención e Hiperactividad (TDAH) es una importante preocupación de salud pública.

c) Se alienta al pueblo de los Estados Unidos a investigar más a cerca del TDAH y de los servicios de salud mental que lo tratan, así como buscar apropiado tratamiento y apoyo, si fuera necesario.

d) Se expresa el sentir del Senado de que el Gobierno Federal tiene una responsabilidad en: (1) esforzarse en aumentar la conciencia pública en torno del TDAH y (2) continuar considerando las maneras de mejorar el acceso y calidad de los servicios de salud mental para los niños y adultos con TDAH.

e) Hacer un llamado al Gobierno Federal, a los Gobiernos Estatales, administraciones locales y al pueblo de los Estados Unidos a observar este día con un apropiado programa de actividades.

1.3. Conclusiones Principales durante el III Congreso Internacional sobre el TDAH (Berlin 2011), guía para el TDAH (Valdizan et al, 2009), Consenso Multidisciplinar Nacional en TDAH (Valdizan 2005) y Consenso Internacional sobre TDAH (Barkley 2002).

1.3.1. Evolución Histórica del Trastorno de Déficit de Atención e Hiperactividad

El Trastorno de Déficit de Atención e Hiperactividad puede parecer un síndrome aparentemente reciente, sin embargo, a lo largo de los tiempos se han tenido noticias de la existencia de personajes ilustres con comportamientos de los que en la actualidad se podrían enmarcar dentro de un TDAH, probablemente no con un diagnóstico clínico como en el presente pero si a través de rasgos que se manifiestan en la personalidad. Teniendo en cuenta que el trastorno no priva de poder destacar en la generación en que se viva ni tampoco de poder realizar una vida normal. Los TDAH además de tener un lugar en la sociedad han hecho grandes contribuciones a lo largo de la historia.

Según su comportamiento, **Sócrates** sería susceptible de ser hiperactivo o haber tenido alguna característica propia de las personas con TDAH, al igual que algunas personalidades que se citan a continuación. Al no aparecer nada

escrito sobre sí mismo basándonos en los diálogos de Platón (salvando los posibles errores históricos) y en la comedia de Aristófenes “Las nubes”, que nos relata la juventud de Sócrates, independientemente de su nivel intelectual, en ambos escritos al menos se le consideraba en distintas situaciones distraído, alejado de la realidad, dinámico y con una agitación e inquietud constante.

San Agustín en su autobiografía “Confesiones” (se definía en los libros de sus errores (1-9) “Yo soy dos y estoy en cada uno de los dos por completo”. Nos relata su capacidad de desdoblamiento activo y rasgos de baja autoestima.

En la traducción que fray Francisco de Pepuris de Bolonia hace al latín de los escritos de la vida de micer **Marco de Venecia** “libro de Marco Pòlo”, el mismo Marco Polo puntualizaba ser incansable y efusivo. Sus conciudadanos de Venecia lo hacían usando la denominación de impaciente y apasionado.

Julio César a lo largo de su *Cursus honorum* fue reconocido, tanto por sus seguidores como por sus adversarios, como impulsivo, impetuoso y exaltado.

Más cercano a nuestros tiempos, **Catalina II de Rusia** (La Grande) era definida por sus amantes, hijo y los turcos como desbordante de energía, vehemente y muy impulsiva.

Alejandro Magno, Agatha Christie, Harvey Williams Cushing (primer neurocirujano), **Michael Phelps, Leonardo Da Vinci, T. A. Edison, A. Ampere, A. Einstein, W. Disney, Beethoven, W. Churchill, John Lenon, Luis Rojas Marco, Michel jordan** son, entre otros, personalidades susceptibles de haber padecido TDAH.

Muchas personas con TDAH son muy inteligentes, creativas, personas fácilmente queridas y que son capaces de hacer muchas cosas admirables. Sin embargo, vivir con TDAH a veces es insufrible. Por otro lado podría haberse establecido una propuesta pseudocientífica, que envuelva una tradición cuyo fin pretenda paliar los inconvenientes de los afectados y familiares de TDAH y

de alguna manera neutralizar el problema que les desfavorece conforme a la estipulación psicosocial.

“Es mi creencia, que muchos grandes hombres y mujeres afrontaron su TDAH y que su grandeza provino porque poseyeron otras habilidades y capacidades que les brindaron la oportunidad de superar esta condición. Afortunadamente, los síntomas de TDAH pueden ser tratados y con eficacia conduciendo, a quienes pueden luchar con su capacidad disminuida para el autocontrol, a vidas más exitosas y felices” Sam Goldstein.

1.3.2. Desarrollo del Término Trastorno de Déficit de Atención e Hiperactividad

Las historias de los niños inquietos e indisciplinados son tan antiguas como la humanidad misma. Los informes de niños nerviosos e inquietos en un contexto más estrechamente médico se remonta hasta 1798.

1.3.2.1. Referencias Históricas Cronológicas desde el Siglo XVIII (APA 2009)

- Sir Alexander Crichton (1798)(Crichton 1798). Médico escocés describe un estado mental similar al subtipo inatento TDAH, en su libro: Una investigación sobre la naturaleza y el origen de los trastornos mentales, en el capítulo “Atención” describe una “inquietud mental”.
- Heinrich Hoffman (1847): describe sus síntomas, en varios libros de poemas, en el cuento que escribió para su hijo "Struwwelpeter". Narra en verso el vicio o mal comportamiento de algunos chicos (Hoffman 1945).
- Alfred Binet (1898): el padre de los tests de inteligencia. Cita: “estos niños son inestables, tienen el carácter irritable, el cuerpo siempre en movimiento”, “son refractarios a la disciplina ordinaria. Llegan a ser una causa incesante de trastorno y molestias para el maestro y los compañeros”. “La vigilancia de uno de ellos es mas enojosa que la atención a veinte alumnos normales”.
- Kraepelin (1899): sitúa a los psicópatas inestables, refiriéndose sobre todo a los adultos con existencias de psicopatías consistentes en una anomalía de personalidad, postulando que sufrían trastornos de inestabilidad emocional de

tipo impulsivo, sin que aparezca asociada a ninguna lesión cerebral. Las enfermedades mentales eran causadas principalmente por desordenes biológicos y genéticos.

- Still (1902): los cita como defectos del control moral (Revista Lancet) describió 43 pacientes (niños) que se caracterizaban por ser frecuentemente “agresivos, desafiantes y resistentes a la disciplina, excesivamente emocionales y con inhibición volitiva”. Asimismo, quedó impresionado por las dificultades que estos niños tenían para mantener la atención. Still creyó que estos niños presentaban un importante “déficit en el control moral de su conducta”, que era prácticamente crónico en la mayoría de los casos.
- Augusto Vidal i Parera (1908): en la 2ª edición del "Compendio de Psiquiatría Infantil", afirma: las distracciones, ensimismamientos, atrofias del juicio y del raciocinio, valga la frase, amnesias, exacerbaciones de la imaginación, debilidad volitiva, etc. Son cosas consideradas como de poca importancia y a las cuales se dedica poca atención, sin ver las consecuencias que tales descuidos pueden acarrear. Se les trata de una manera poco conveniente ya que no se tiene en cuenta que lo que motiva el correctivo proviene de una enfermedad que se desconoce. La escala de psicoanormalidades es considerable, pues desde la leve perturbación que ocasiona por ejemplo la distracción, a la idiocia hay una distancia enorme.
- Hohman, Kant, Cohen (1920-1934): Hallaron síntomas en niños que habían padecido lesiones o infecciones cerebrales. Así hablaron del “síndrome de lesión cerebral humana”.
- Bradley (1937): utilizó farmacoterapia con bencedrina, primer tratamiento psicoestimulante utilizado en niños que tenía efectos en su comportamiento con TDAH.
- Strauss (1947): creó el concepto de “lesión cerebral mínima”. Mencionaba que los niños con dificultades de aprendizaje (sin retraso mental, oyentes y sin alteración emocional) tenían un daño cerebral imperceptible disfuncional.
- Eisenberg (1957): introduce el término “hipercinecia” para referirse a niños con una actividad motriz excesiva en relación a la considerada como normal en niños de su misma edad y sexo.

- Clements y Peters (1962): describieron la “disfunción cerebral mínima” que se caracterizaba por hiperactividad, déficit de atención, bajo control de impulsos, agresividad, fracaso escolar y labilidad emocional.
- DSM II (1968) (Manual de diagnóstico y estadística de los trastornos mentales 2º edición): introduce el término “Reacción hiperkinética de la infancia” (hipercinesia) resaltando especialmente la hiperactividad como síntoma ajeno a lesiones cerebrales.
- CIE-9 (1978)(Clasificación internacional de enfermedades, 9ª versión) (OMS): incluye el término “síndrome hiperkinético”.
- En el DSM III (1980): aparece por primera vez el término “déficit de atención con hiperactividad”, reconociendo ya una subdivisión del trastorno en “déficit de atención con o sin hiperactividad” y que puede afectar a los adultos.
- Eric Taylor (1986): señala lo inadecuado del término de hiperactividad, puesto que puede referirse a una conducta o un temperamento, un rasgo característico de desviación, un síndrome o una enfermedad. Se ha aplicado en la conducta agresiva y/o antisocial, a la impulsividad incontrolada, a una falta de concentración.
- DSM-III-R (1987): sólo se reconocen criterios diagnósticos para el “déficit de atención con hiperactividad” sin ninguna subdivisión. Se diagnostica en adultos.
- Barkley en 1990: distingue desde la lesión cerebral desde principios de 1900 hasta su división en tres tipos a finales del siglo XX. Puede representar sencillamente, un rasgo humano y no una condición patológica.
- CIE-10 (1992): se refiere a estos trastornos como trastornos hiperkinéticos. En la clasificación europea del trastorno, expresada en la CIE-10 igualmente lo denomina Trastorno Hiperkinético. Comprende tres grupos de síntomas fundamentales (inatención, hiperactividad e impulsividad) y su diagnóstico exige la presencia significativa de síntomas tanto de inatención como de hiperactividad y de impulsividad. Así, su descripción corresponde a la variante más severa del trastorno, siendo similar al TDAH Tipo Combinado.
- DSM IV (1994): utiliza la denominación de trastorno por déficit de atención e hiperactividad con dos grupos de síntomas fundamentales: inatención y la hiperactividad/impulsividad y distingue tres subtipos según sus síntomas.
- DSM IV TR (2000): acentúa las diferencias entre los subgrupos. Más utilizado en investigación.

- DSM V (en desarrollo, 1º borrador, sin compendiar trabajo de campo): aparecen nuevas propuestas, definiciones y criterios respecto al TDAH. Se eleva la edad requerida de comienzo de 7 a 12 años. Sobrediagnóstico, amplía el tratamiento con fármacos psicoestimulantes. Incluye nuevos subgrupos, propone clasificar un “tipo restrictivo de TDAH”. Se reduce a la mitad el número de síntomas requeridos para adultos. Basa más sus objetivos en desarrollo de fármacos y marketing. Psicopatologiza la vida cotidiana. Sigue utilizando las nomenclaturas y perfiles de la CIE.
- CIE 11 (en desarrollo, primer boceto, mayo 2012). Recomendado por la OMS. Más neutral en relación al tratamiento de utilidad clínica, menos apoyo al tratamiento farmacológico. Más independiente de las diferencias culturales. Plantea para el TDAH más distribución de recursos de salud individual.

1.3.2.1.1. Críticas al DSM-V: APA

- Cambian las definiciones contribuyendo a elevar las tasas de TDAH, aumentando prescripción de medicamentos.
 - Eleva la edad de comienzo de 7 a 12 años.
 - El diagnóstico se basará en la presencia de los síntomas, no de la discapacidad. No requiere deterioro, sólo presencia de síntomas
 - Se reduce a la mitad los síntomas requeridos para el diagnóstico en el adulto.
 - Permitir el diagnóstico de TDAH en presencia de autismo.

1.3.3. Características más Representativas del Trastorno de Déficit de Atención e Hiperactividad:

- Su etiología todavía no está clara.
- La gran huella que produce sobre los niños-adolescentes y posteriormente en adultos en las áreas cognitivas emocional y social.
- El impacto que produce en las familias.
- La variabilidad de los síntomas.
- La falta de relación entre profesionales.
- La independencia Geográfica.
- La desatención de las administraciones.

- El deficiente procedimiento sanitario en cuanto a su proceso y seguimiento, que mejoraría de ser tratados correctamente.

1.4. Qué es el Trastorno de Déficit de Atención e Hiperactividad en la actualidad

De etiología desconocida en la actualidad, sigue siendo un trastorno neuroconductual (heterogéneo) de origen poco claro y sin causa única. Seguramente de bases neurobiológicas con intervención de factores genéticos y ambientales, producida por la suma de una serie de fallos (APA 2000, DSM IV-TR). Entre ellos parece que existe una alteración a nivel del sistema nervioso central, caracterizándose mediante un aumento de la actividad, impulsividad, falta repetida de atención, inestabilidad emocional y asociándose con frecuencia con otras alteraciones. Se muestra más frecuente que el mostrado en el resto de sujetos de un nivel de desarrollo similar. Estos síntomas generalmente se acusan con más intensidad en situaciones que exigen una atención o un esfuerzo mental sostenido o que carecen de atractivo para el individuo. Por consiguiente, pierde con frecuencia el interés por las actividades que está realizando en pocos minutos, por lo que cambia constantemente de una actividad a otra (Clinic M. 2002).

Si un niño presenta este tipo de problemas sólo en un entorno (por ejemplo, sólo en casa o sólo en el colegio) es improbable que el problema sea el TDAH. Aunque los síntomas del TDAH se agravan en situaciones de mayor desorganización (lugares ruidosos, con mucha gente, etc.) están presentes en mayor o menor medida en casi todas las situaciones y entornos de la vida del niño (en casa, en el colegio, con los abuelos, haciendo la tarea escolar, viendo la televisión, etc.) Aunque las situaciones que les divierten (ver dibujos animados o jugar con videojuegos, etc.) les permiten centrar su atención con mayor eficacia, aun manteniendo la inquietud (agitando manos, piernas, pies) esto hace a veces caracterizar a los niños TDAH como extravagantes, maleducados, maniáticos o perezosos.

Las ideas iniciales que lo definen como "daño cerebral mínimo" han evolucionado gracias a estudios de neurobiología, fisiopatología, neuroimagen y genética. Del mismo modo, aunque los factores psicosociales no se consideran actualmente como la causa principal del TDAH, el estudio de las disfunciones familiares existentes en niños con esta patología ha revelado su importante papel en el desarrollo de los síntomas, en la aparición de otros problemas frecuentemente asociados al TDAH y en el diseño de los nuevos tratamientos.

Afectando más a hombres que a mujeres en relación 2,5 a 1 (en recientes estudios esta cifra se está igualando) (Goldman y col. 1998). Las hembras presentan con mayor frecuencia problemas de inatención, dificultades cognitivas, síntomas ansiosos y afectivos que sintomatología de impulsividad o agresividad más característica en varones. El CEI (Criterio de Edad de Inicio) muestra que suelen aparecer sus síntomas entre los 3 y 7 años de edad (12 años según DSM V), y afecta al 4-9 % de niños menores de 18 años (según zonas u observaciones). Hay estudios que nos muestran que entre un 31 % y el 71,5 % de pacientes con TDAH diagnosticado en la niñez continua con él en la adolescencia (Hansen y col. 1999) y que de éstos, el 50% al menos se mantendrán de adultos (Cuffe y col. 2001). Según el informe de la Oficina de Desarrollo del Niño de EEUU en 1971, no suelen existir diferencias geográficas, culturales ni socioeconómicas y tampoco en la prevalencia entre países más o menos desarrollados. Sin embargo Tristes en 1979 en un estudio de campo afirmaba que sí influían estas variables.

Los estudios familiares realizados con muestras clínicas han encontrado entre los padres de niños con TDAH un riesgo entre 2 y 8 veces superior al de la población normal de padecer ellos mismos el trastorno. (Shaywitz y col.1991) (Biederman y col. 1987) Recíprocamente, el riesgo calculado para un niño de sufrir el trastorno si uno de los padres lo padece sobrepasa el 57 % (Shaywitz y col.1991; Berlin 2011).

La personalidad antisocial se muestra en un 25-40 % de los adolescentes y adultos remitidos de niños como TDAH, especialmente en niños con trastornos

tempranos. Sin embargo, en algunos casos, los problemas muy tempranos de algunos niños hiperactivos cesan en la adolescencia o en la vida adulta, e incluso algunos adolescentes aprenden a controlar la hiperactividad, aunque la impulsividad, las dificultades de mantener la atención y de organizarse persisten, limitando el aprendizaje y el éxito social y profesional, y suelen sentir más inquietud (Serketich y Dumas 1996).

1.4.1. Heredabilidad

Aunque los mecanismos por los que se producen este trastorno del desarrollo neurológico no están todavía aclarados, el componente genético está demostrado, puesto que el TDAH es 5-7 veces más frecuente en hermanos. Estudios con gemelos muestran el coeficiente de heredabilidad más elevado de todas las patologías psiquiátricas (Schachter y col. 2001) alrededor de 18 veces más frecuente en hermanos gemelos, superando el 80 % en gemelos idénticos y el 30 % en mellizos. Lo que no ocurre con relaciones adoptivas. Parece que gran parte del rasgo hiperactividad-impulsividad (70-90 %) se debe a factores genéticos, pudiendo incrementarse dicha contribución cuanto más extrema sea la manifestación clínica de dicho rasgo. Se ha descrito un factor poligenético relacionando el trastorno fundamentalmente, con los genotipos DRD4 y DAT sin excluir a otros, todos ellos relacionados con catecolaminas (Swanson 2007). Estudios multicéntricos sugieren marcadores genéticos en los cromosomas 4q13.2, 5q33.3, 8q11.23, 11q22 y 017p11, para TDAH (Biederman y col. 1991; Faraone y col. 1996; Castellanos y Tannock 2002). Recientemente tanto en modelos animales como humanos sugieren que el gen STS ligado al cromosoma X puede tener un papel importante en la atención (Davies y col. 2007; Davies y col. 2009). El TDAH es uno de los trastornos psiquiátricos hereditarios de la infancia más prevalentes afectando en la edad escolar, (Asherson y Consortium 2004; Polanczyk y col. 2007). Igualmente que la mayoría de los trastornos neuroconductuales se presenta con un sesgo masculino (Swanson y col. 1998). Lo que apoya un posible papel de los genes ligados al cromosoma X en su etiología.

1.4.2. Factores Ambientales

Los factores ambientales deberían incluir por lo menos algunos tóxicos ambientales (nicotina, alcohol, plomo, bisfenol A, aditivos alimenticios, etc.) y algunos factores gestacionales (nacimiento pretérmino, tamaño pequeño debido a restricción en el crecimiento, estrés grave maternal durante el embarazo) y ambientes familiares desorganizados o psicopatológicos (Swanson 2007). La depresión ambiental y la violencia doméstica aumenta el riesgo de TDAH en niños, (Bauer y cols 2013).

1.4.3. Sintomatología

Los síntomas característicos del TDAH son (DSM IV, pág. 84):

- Déficit de atención
- Impulsividad
- Hiperactividad

El TDAH puede acompañarse de trastornos del sueño: insomnio, somnolencia diurna, síndrome de piernas inquietas (SPI), movimientos periódicos de las extremidades (MPE), síndrome de apnea/hipopnea obstructiva del sueño (SAHOS), ronquido e incluso algunas parasomnias.

1.4.3.1. Clasificación del Trastorno por Déficit de Atención con Hiperactividad según sus Síntomas (DSM-IV TR)

TDAH: Subtipos clínicos

- Trastorno por Déficit de Atención con Hiperactividad, tipo combinado.
Es el trastorno más frecuente:
 - si presenta 6 o más de los criterios diagnósticos de desatención por lo menos durante 6 meses y
 - cumple los criterios de hiperactividad por lo menos durante 6 meses.
- Trastorno por Déficit de Atención con Hiperactividad, tipo con predominio del déficit de atención o predominantemente desatento:
 - si presenta 6 o más de los criterios diagnósticos de desatención por lo menos durante 6 meses.

- No presenta los criterios de hiperactividad – impulsividad por lo menos durante 6 meses.
- Trastorno por Déficit de Atención con Hiperactividad, tipo con predominio Hiperactivo-Impulsivo:
 - si presenta 6 o más de los criterios diagnósticos de hiperactividad impulsividad por lo menos durante 6 meses.
 - Pero no presenta 6 o más de los criterios de desatención.
- Trastorno por Déficit de Atención con Hiperactividad, no especificado. Esta categoría incluye trastornos con síntomas prominentes de desatención o hiperactividad-impulsividad que no satisfacen los criterios del trastorno por déficit de atención con hiperactividad (tipo combinado). Ejemplos:
 - Individuos cuyos síntomas cumplen los criterios diagnósticos de TDAH pero con un inicio posterior a los 7 años.
 - Individuos con desatención clínicamente significativa, pero con un patrón de comportamiento caracterizado por lentitud e hipo actividad.

1.4.4. Diagnóstico

Determinar si existe TDAH no debería basarse únicamente en los síntomas, sino que exige una evaluación por parte de un profesional especializado en niños, adolescentes, adultos con experiencia en TDAH. Este elabora un diagnóstico basado en la evaluación de la conducta del individuo en combinación con un examen físico exhaustivo y una valoración de la información obtenida de padres, colegio, otros familiares o amigos. Además, es necesario descartar otros problemas médicos como fallos de audición o visión, problemas nutricionales, etc. y descartar trastornos en la infancia que pueden presentar síntomas similares.

Muchos de los síntomas pueden estar causados por otros factores de estrés situacional o ambiental o son comunes en muchas otras enfermedades psiquiátricas y mentales lo que dificulta su diagnóstico.

Como ayuda complementaria pueden usarse escalas de evaluación de la conducta (por si solas no determinan un diagnóstico) rellenas por los padres, profesores y otros cuidadores de la persona. Dada la importante carga genética del TDAH, es conveniente realizar una historia médica detallada tanto personal como familiar.

Para el diagnóstico de TDAH no es necesario realizar pruebas de imagen salvo en casos concretos. No obstante, dichas pruebas realizadas en trabajos de investigación, están ayudando a conocer qué ocurre en el cerebro de los TDAH. En estudios con resonancia magnética y tomografía computerizada se ha visto una ligera disminución del tamaño cerebral, más marcado en la zona prefrontal y de los ganglios basales, sin observarse malformaciones graves. En otro tipo de estudios llamados "estudios de imagen funcional" se analiza el flujo sanguíneo en determinadas zonas y el consumo de oxígeno, datos que explican la actividad cerebral. Con estos estudios se ha visto una actuación menor de lo esperado en zonas concretas del cerebro, que estaría en relación con la falta de atención y el exceso de movimiento. En estas zonas podría existir un funcionamiento anómalo de unos neurotransmisores catecolaminérgicos: dopamina y noradrenalina (Solanto 1984) importantes en la transmisión correcta del impulso eléctrico cerebral (Castellano et al 1994).

1.4.4.1. Criterios Diagnósticos para Trastorno de Déficit de Atención e Hiperactividad

1.4.4.1.1. Criterios de Déficit de Atención

- A menudo no presta atención suficiente a los detalles o incurre en errores por descuido en las tareas escolares, en el trabajo o en otras actividades.
- A menudo tiene dificultades para mantener la atención en tareas o en actividades lúdicas.
- A menudo parece no escuchar cuando se le habla directamente.
- A menudo no sigue instrucciones y no finaliza tareas escolares, encargos u obligaciones en el lugar de trabajo.
- A menudo tiene dificultad para organizar tareas y actividades.

- A menudo evita, le disgustan las tareas que requieren un esfuerzo mental sostenido.
- A menudo extravía objetos necesarios para tareas o actividades.
- A menudo presenta sordera ficticia.
- A menudo se distrae fácilmente por estímulos irrelevantes.
- A menudo es descuidado en las actividades diarias.

1.4.4.1.2. Criterios de hiperactividad e impulsividad

- A menudo mueve en exceso manos y pies o se remueve en su asiento.
- A menudo abandona su asiento en la clase o en otras situaciones en que se espera que permanezca sentado.
- A menudo corre o salta excesivamente en situaciones en las que es inapropiado hacerlo.
- A menudo tiene dificultades para jugar o dedicarse tranquilamente a actividades de ocio.
- A menudo está en marcha o parece que tenga un motor.
- A menudo habla excesivamente.
- A menudo precipita respuestas antes de haber sido completadas las preguntas.
- A menudo tiene dificultades para guardar su turno.
- A menudo interrumpe o estorba a otros.

Estos ítems deben persistir más de 6 meses, en dos o más lugares (colegio, casa, trabajo, etc.) (fuente: DSM-IV TR-APA 2002-CIE 10).

1.4.5. Evaluación del Trastorno de Déficit de Atención e Hiperactividad

- Evaluación del entorno familiar.
- Entrevista a los padres.
- Evaluación escolar.
- Escalas de medición (para padres, profesores y mixtas).
- Evaluación médica (laboratorio).
- Evaluaciones complementarias (lenguaje).

- Test (no específicos).

El TDAH se confunde, a veces, con las siguientes entidades:

- Niños inquietos, pero con atención normal, situación que es frecuente en los menores de 5 años de edad.
- Retraso mental.
- Trastornos específicos del aprendizaje.
- Fragilidad del cromosoma X.
- Fetopatía alcohólica por ingestión de alcohol durante el embarazo.
- Fenilcetonuria.
- Intoxicación por plomo.
- Efectos adversos de fármacos como broncodilatadores, neurolépticos, antiepilépticos, etc.
- Trastornos psicológicos o psiquiátricos.

Síntomas asociados(Kaplan y Sadock 2009; Brown 2010):

- Demandantes.
- Arrebatos emocionales.
- Autoritarismos.
- Testarudez.
- Desmoralización.
- Baja autoestima.
- Baja tolerancia a la frustración.
- Disforia.

1.4.6. Trastornos Asociados

Cerca de dos terceras partes de los niños remitidos a consulta por TDAH presentan algún otro trastorno asociado. El *Ontario Child Health Study* encontró que en niños entre 4 y 11 años, un 53 % de los chicos y un 42 % de las chicas que tenían TDAH tenían al menos otro diagnóstico. Para las edades de 12 a 16 años, la proporción de sujetos con TDAH y al menos otro diagnóstico fue del 48 % para niños y del 76 % para niñas. Los trastornos asociados más frecuentes:

- Trastorno Oposicionista Desafiante
- Trastorno de Conducta
- Trastornos por abuso de drogas
- Trastornos de ansiedad
- Trastornos afectivos
- Trastornos del sueño
- Trastorno de Tics
- Trastornos de la coordinación motora
- Problemas de rendimiento académico
- Problemas intelectuales
- Lesiones y accidentes

1.4.7. Evolución del Impacto del Trastorno de Déficit de Atención e Hiperactividad en el Desarrollo

En evidencia que los niños crecen el TDAH va acompañándolos en sus distintas etapas evolutivas.

Preescolar:

- Alteración de conducta.

Escolar:

- Alteración de conducta (incapaz de controlar su propia conducta).
- Problemas escolares (Lectoescritura, Matemáticas).
- Dificultad de relacionarse.
- Caída de la autoestima.

Adolescente y estudios superiores:

- Problemas académicos.
- Tendencia a la inquietud.
- Conductas impulsivas peligrosas.
- Poca capacidad de juicio.
- Poca éxito social.
- Dificultad en relacionarse con iguales.
- Equivocación en tareas.
- Caída de la autoestima.

- Problemas legales, agresividad.
- Consumo y abusos de tóxicos (efecto subjetivos de disminución de síntomas).
- Dificultades para trabajar.
- Alteración de la conducta.
- Accidentes, cursos repetidos, etc.

Adultos:

- Problemas académicos.
- Conductas delictivas.
- Problemas laborales (discontinuidad).
- Poco éxito social y profesional.
- Problemas conducción de vehículos (trafico).
- Dificultad en relacionarse.
- Caída de la autoestima.
- Alteración de la conducta.
- Abuso de tóxicos.
- Dificultad en parejas (más divorcios).
- Accidentes, etc.

Estos estados de inadecuación social hacen del TDAH una de las causas más frecuentes de fracaso escolar y de problemas sociales en la edad infantil y adulta. Casi todos los niños con TDAH tienen problemas por sus conductas hiperactivas e impulsivas antes de los 6 años. Sus padres y profesores se sienten frustrados en su capacidad para criarlos y educarlos. Utilizando diferentes métodos para intentar controlar los problemas conductuales de sus hijos, habitualmente sin resultados. Suelen describirlos como inquietos o difíciles desde que eran bebés, tienden a empezar a andar (correr) precozmente e incluso hay madres que los describen como hiperactivos durante el embarazo. Al ser más habladores, desafiantes, poco cooperativos, difíciles de entretener, más demandantes de la atención de los demás los lleva a un circularidad negativa con los padres en la cual éstos responden menos a las demandas del niño. En cualquier caso suelen ser más colaborativos y problemáticos con los padres que con las madres. Esto crea un nivel de estrés constante en las familias, reduciendo sus contactos y ampliando sus conflictos,

creando una sensación de soledad y abandono, tasas altas de separación y más síntomas depresivos.

No se debe tener como origen del TDAH a los padres del niño o sus métodos educativos, señalando además que en demasiadas ocasiones han llevado a diagnósticos tardíos, lo que supone una peor respuesta al tratamiento. No es un problema social, de mala educación, ni de características particulares de ciertos niños que "se le van a pasar con la edad", sino de un trastorno concreto, con características clínicas y necesidad de tratamiento.

Una situación psicosocial adversa incrementa el riesgo de problemas psiquiátricos emocionales y de conducta en niños. Dentro de estos factores de riesgo genérico, destaca una asociación positiva entre el TDAH y el índice de factores de adversidad de Rutter y Quinton (problemas de pareja importantes, clase social baja, familia amplia, criminalidad paterna, trastorno mental materno y acogimiento no familiar del niño). Estos factores tienden a aparecer como predictores universales de adaptabilidad y salud psíquica, y en ciertos aspectos (delincuencia paterna, conflictos familiares, clase social baja) podrían ser más bien una expresión de la presencia del trastorno en los padres que su causa.

1.4.8.Trastorno de Déficit de Atención e Hiperactividad en Adultos

En adultos es necesario que el trastorno esté presente desde la infancia, como mínimo desde los 7 años, y debe continuar presentando una alteración clínicamente significativa o un deterioro en más de dos áreas importantes de su actividad (social, laboral, académico o familiar). Suelen presentar síntomas de inatención y de impulsividad, ya que la hiperactividad disminuye con la edad o su expresión clínica es diferente que la encontrada en los niños. La dificultad de adaptación social puede aumentar en los adultos con TDAH. Los problemas en las relaciones interpersonales (parejas) son más frecuentes, doblan la cantidad de divorcios de la población general. Para determinar si un adulto padece TDAH, además de la evaluación profesional, se deberá incluir un estudio del historial académico y de comportamiento infantil. Generalmente los

adultos no han sido diagnosticados correctamente en su infancia, se descubre por primera vez, tras el diagnóstico de su hijo.

En la revisión realizada por Goldstein de los estudios sobre la evolución del TDAH en la vida adulta, el autor concluye que el 10-20 % de los adultos con historia de TDAH experimentan escasos problemas; el 60 % continúan presentando síntomas de TDAH. Al igual que sucede en la infancia, la presencia de otros trastornos psiquiátricos asociados al TDAH es frecuente en los adultos. Se considera que un 70 % de adultos con TDAH presentan comorbilidad psiquiátrica, con la diferencia de mayor prevalencia de drogodependencias, los trastornos de la personalidad inician el consumo de sustancias a una edad más temprana y la evolución hacia una dependencia es más rápida que en las personas que no padecen un TDAH.

1.4.9. Tratamiento del Trastorno de Déficit de Atención e Hiperactividad

El tratamiento del TDAH de niños y adolescentes tiene por objetivo mejorar los síntomas nucleares y consecuencias de la enfermedad (hiperactividad, impulsividad y déficit de atención) y reducir la aparición de otros síntomas frecuentemente asociados al TDAH. Debe ser individualizado e indicado y controlado por un profesional con experiencia en TDAH.

Existen diversos tipos de tratamientos indicados en el TDAH, sin embargo el que presenta mayores niveles de eficacia es el tratamiento combinado o multimodal, que incluye el tratamiento psicológico, el farmacológico y la intervención psicopedagógica. Incluso existen tratamientos a base de dietas (menos aceptados).

Los requisitos imprescindibles para el tratamiento son la información íntegra con padres y profesores y un seguimiento evolutivo, en colaboración con: (1) tratamiento médico-farmacológico y (2) tratamiento psicopedagógico.

1.4.9.1. Tratamiento Médico-Farmacológico

El objetivo del tratamiento farmacológico sería hacer desaparecer los síntomas a largo plazo para posibilitar el desarrollo social, intelectual y afectivo del niño y ayudarle a desarrollar técnicas que contrarresten sus limitaciones, Estudios recientes han observado cómo el tratamiento farmacológico precoz con psicoestimulantes parece ser un importante factor frente a un futuro abuso de tóxicos. El Tratamiento neurofarmacológico se basa en mejorar los impulsos nerviosos en determinados circuitos frontoestriados, mediados por la dopamina o por la noradrenalina, que no funcionan de forma óptima.

Este tipo de tratamiento es imprescindible en 7 de cada 10 niños con TDAH y tiene que individualizarse en cada niño, identificando la dosis mínima eficaz y bien tolerada por el mismo. Aunque hay otras alternativas farmacológicas, el tratamiento habitual es mediante psicoestimulantes, que mejoran la liberación de noradrenalina y dopamina.

Tienen un alto grado de seguridad, siendo destacable el seguimiento individual.

- Los estimulantes son efectivos en la actividad motora y en la falta de atención.
- Las dosis se adecuarán a cada caso.
- Habría que valorar los efectos secundarios.
- Deben usarse en la niñez, adolescencia y adultez

Los psicofármacos empleados en el tratamiento del TDAH en adultos son los mismos que los utilizados en el TDAH infantil. Los fármacos mejor estudiados en adultos son (a) el Metilfenidato (potente inhibidor de la recaptación de dopamina y noradrenalina) se desarrolla en gran medida paralelo al diagnóstico del TDAH como entidad clínica y (b) la atomoxetina (un inhibidor selectivo de la recaptación de noradrenalina).

Otros fármacos utilizados en el tratamiento del TDAH son:

- a) Psicoestimulantes:
 - Dexmetilfenofdato (Focalin XR)
 - Dextroanfetamina

- Dexanfetamina
- Lisdexanfetamina
- Sales mixtas de anfetaminas (adderall XR)
- b) Estimulantes no psicomotores:
 - Atomoxentina
- c) Antidepresivos:
 - Bupropion
- d) Tricíclico antidepresivos:
 - Imipramina
 - Desipramina
 - Nortriptilina
- e) Antihipertensivos:
 - Clonidina
 - Guanfacina

1.4.9.2. Tratamiento Psicológico

Las intervenciones psicológicas y psicopedagógicas que han mostrado evidencia científica sobre su eficacia para el tratamiento del TDAH se basan en los principios de la Terapia Cognitivo Conductual (TCC). Sobre todo en aptitudes y estrategias de la vida del paciente y de sus familias:

- Terapia individual de conducta (modificación de conducta).
- Técnica para incrementar las conductas.
- Técnicas para reducir/eliminar las conductas.
- Economía de fichas.
- Entrenamiento para padres.
- Terapia cognitiva.
- Entrenamiento en habilidades sociales.
- Tratamiento psicopedagógico.
- Reeducción psicopedagógica.
- Neuropsicológico.

1.4.9.3. Tratamiento Multimodal

- Tratamiento farmacológico

- Psicoterapia cognitivo-conductual:
 - Técnicas que incrementen el autocontrol emocional y conductual del niño.
 - Técnicas que faciliten a los padres y maestros el control conductual y emocional del sujeto. TDA/H.
 - Psicoterapia Individual y de grupo
 - Adaptación curricular

Actualmente es el tratamiento que se recomienda (Group 1999).

En cuanto al tratamiento con diferentes tipos de dietas para los TDAH no existe nada concluyente, sobre todo si su mayor etiología es congénita. Una buena alimentación, podría ayudar a mejorar en todo caso algunos de sus síntomas, e igualmente una buena, sana y adecuada nutrición es saludable para la buena salud en general, sea TDAH o no.

1.5. Contribución de Modelos de Animales a la Investigación sobre el TDAH

Para completar el estudio del TDAH en nuestro laboratorio, se asume configurar un modelo de ratón a base de Ácido Retinoico (AR) (Guimarães y col. 2007) con el fin de establecer un análisis del desarrollo de su comportamiento (similar al esperado por un TDAH humano) observando si aparecen alteraciones tanto en su conducta como en el Sistema Nervioso.

Los modelos experimentales de animales aportan a la investigación más control y rapidez, además interpretar los datos suele ser más fácil que en humanos. No obstante, la similitud puede ser únicamente investigadora (en cuanto a su comportamiento y genética) al no presentar la misma causa que en humanos, sobre todo tratándose de enfermedades mentales. Igualmente no solo debería imitar los déficits conductuales si no ajustarse a su realidad teórica (patofisiología y terapéutica del TDAH) para poder predecir aspectos desconocidos o terapias nuevas. Evidentemente como modelos que son, ninguno de ellos es superponible al desorden psiquiátrico humano.

Según Sagvolden (Sagvolden 2000) y Davids (Davids y col. 2003) un modelo adecuado de TDAH debería reunir los siguientes puntos:

- Imitar los déficits conductuales fundamentales encontrados en pacientes con TDAH (validez aparente).
- Ajustarse a una racionalidad teórica, tal como la patofisiología propuesta o terapéutica conocida del TDAH (validez de constructo).
- Predecir aspectos desconocidos (o parcialmente conocidos) del TDAH, como génesis, neurobiología o terapias nuevas (validez predictiva).

1.5.1. Modelos Genéticos

Los modelos de animales se hacen necesarios en la investigación básica, no obstante habría que señalar que ningún modelo animal de TDAH es, en su totalidad, comparable al TDAH humano, aunque si aportan partes individuales de ese todo interminable, salvando la complejidad del trastorno.

Además de la infinidad de ventajas que aportan a la investigación, los grupos de modelos animales suelen ser más homogéneos y su control ambiental es más simple (Sagvolden y Berger 1996; Berger y Sagvolden 1998). Evidentemente la investigación de la enfermedad humana se beneficia sin duda de los modelos animales. En función del objetivo de estudio se tendrá en cuenta la especie y la cepa del animal, edad, sexo y otros factores como la etiología (autoinmune o viral), y atender a una serie de criterios de calidad en los modelos para evitar los condicionantes derivados del propio proceso experimental tanto de los animales, del método, seguimiento y evaluación, así como del análisis de datos, para no alterar el diseño y optimizar la bondad y adecuación del modelo.

Dentro de los modelos experimentales habría que destacar los modelos genéticos, animales expuestos a neurotoxinas y otros modelos (Davids, Zhang y col. 2003). Es necesario seleccionar el modelo experimental más adecuado en función del objetivo a estudiar, y establecer unos criterios de calidad del

modelo en cuestión. Según la variabilidad de modelos animales de TDAH podemos citar:

1.5.1.1. Rata Espontáneamente Hipertensa (SHR)

A comienzos de la década de los 60, la SHR (*Spontaneously Hypertensive Rat*) es desarrollada en Japón. Son ratas pertenecientes a la cepa *Wistar-Kioto* y muestran altos niveles de presión sanguínea. Es uno de los modelos más extensamente utilizados en TDAH.

Las ratas SHR muestran varios rasgos característicos de TDAH (Sagvolden 2000), los cuales incluyen hiperactividad motora en un ambiente novel, cantidad excesiva de respuestas en un programa de extinción de intervalo fijo y dificultad en la realización de tareas operantes. Esas anormalidades conductuales corresponden a los rasgos clínicos de hiperactividad, impulsividad y dificultad de aprendizaje, respectivamente.

Similar a los pacientes con TDAH, la SHR es más sensible a un reforzador conductual inmediato y menos a uno retardado (con demora) que ratas controles que no son hipertensas (Sagvolden y col. 1993; Sagvolden y col. 1998), lo cual apoya la validez aparente, ya que los niños con TDAH generalmente eligen una recompensa pequeña pero inmediata en lugar de una mayor pero con demora.

Las anormalidades conductuales y cognitivas de la SHR responden a los estimulantes, como las d-anfetaminas y el d,1-Metilfenidato, sumando a la validez de constructo. Similar a los efectos clínicos en TDAH, los estimulantes debilitan la influencia de los reforzadores inmediatos sobre la conducta y fortalecen la de los reforzadores con demora, siendo siempre esos efectos, menos pronunciados en SHR que en ratas no hipertensas (Sagvolden 2000).

Las SHR muestran una alteración de la función dopaminérgica en áreas terminales del sistema dopaminérgico mesocortical, mesolímbico y nigroestriar. Esto altera los procesos de reforzamiento y extinción, a nivel conductual, aumenta el déficit de atención sostenida, la hiperactividad y la impulsividad.

Etiológicamente, la disfunción dopaminérgica, puede ser determinada genéticamente; pero también factores no genéticos, como el uso de drogas de abuso y toxinas ambientales pueden contribuir a la diferenciación regional encontrada en el TDAH (Russell y col. 1995; Johansen y col. 2002).

1.5.1.2. Ratones Knockout para el Transportador Dopaminérgico (DAT-KO)

Los ratones DAT-KO (Gainetdinov y Caron 2001) carecen del funcionamiento del transportador dopaminérgico y muestran una gran hiperactividad espontánea en relación a los ratones silvestres, tanto durante el ciclo de luz, como durante el período de oscuridad (Davids y col. 2003). Estos ratones muestran anormalidades que no están presentes en el TDAH, como retardo en el crecimiento y muerte prematura, lo cual resta validez de constructo.

1.5.1.3. Ratones Coloboma

Los ratones de la cepa Coloboma tienen severas dismorfologías oftalmológicas, volviéndolos ciegos. Estos ratones son extremadamente hiperactivos en pruebas de campo abierto y tardan en ejecutar ciertas tareas como sostener una barra. Muestran una prominente conducta estereotipada de movimientos de la cabeza. La mutación resulta de un cambio en el gen SNAP-25. A pesar de que se investigó el gen análogo en humanos, más específicamente en cinco familias en las cuales se sospechaba una dificultad genética para el TDAH, no hay una significativa articulación entre el locus del gen SNAP-25 en ratones y en humanos (Paule y col. 2000). Es un modelo poco representativo de TDAH debido a su hiperactividad predominante reducida con d-anfetamina pero no con Metilfenidato, carece de impulsividad, tiene déficit de atención sostenida y distintos déficits neurobiológicos que excluirían un diagnóstico de TDAH en niños.

1.5.1.4. Ratas Naples Altamente Excitables (NHE)

Estas ratas son otro modelo animal genético de TDAH (Sagvolden y col. 1992), donde está involucrado un excesivo funcionamiento dopaminérgico en las áreas límbicas y corticales del cerebro anterior. Son hiperexcitables y muestran déficits en tareas que requieren atención visoespacial (Davids y col. 2003). Muestran reactividad incrementada en situaciones novedosas y la memoria de trabajo dañada. Las NHE deberían ser un modelo útil para TDHA ya que son distraídas pero no presenta hiperactividad o comportamiento impulsivo típico del TDAH.

1.5.1.5. Ratones Acallosal

Estos ratones carecen totalmente de cuerpo calloso, presentando rasgos conductuales semejantes al TDAH. La hiperactividad en este modelo está relacionada a la dominancia funcional del hemisferio derecho, que puede ser exagerada por la pérdida de las conexiones que se dan a través del cuerpo calloso (Davids y col. 2003). En pacientes con TDAH, se sugiere que hay una disfunción específica del hemisferio derecho (Denckla 2003), aunque no hay evidencia de una malformación del cuerpo calloso.

El ratón Acallosal (Magara y col. 2000) llega a ser hiperactivo todo el tiempo y muestra una adquisición dañada en el aprendizaje acondicionado. La impulsividad, sin embargo, medida como la latencia para entrar en la sección del laberinto en Y, se incrementa en un medio novedoso pero decrece con el test repetido, lo cual no es una característica del TDAH.

1.5.2. Animales Expuestos a Neurotoxinas

Los roedores expuestos a neurotoxinas, (sustancias que alteran el sistema nervioso repercutiendo en su funcionamiento temporal o permanente), sufren daño en alguna de sus estructuras nerviosa y por tanto, en su competencia vital, logrando en algunas ocasiones alterar al animal en parte de sus funciones biosociales y causandoles problemas.

1.5.2.1. Ratas Jóvenes con Lesión Cerebral Neonatal con 6-Hidroxidopamina

Como secuela del tratamiento con 6-hidroxidopamina, las ratas manifiestan una hiperactividad locomotora, cuya duración está relacionada con la extensión o disminución de dopamina en el cerebro y con la edad en el momento del tratamiento. Estas ratas muestran algunos rasgos del TDAH. Las anfetaminas y el Metilfenidato disminuyen la hiperlocomoción tanto en estas ratas como en humanos con TDAH (Kostrzewa y col. 1994).

1.5.2.2. Ratas con Hipoxia Neonatal

En ratas, la hipoxia cerebral se produce por inmersión durante 25 minutos en un espacio con 100% de nitrógeno, en las 30 horas posteriores al nacimiento, lo cual produce anomalías conductuales con algunas similitudes con el TDAH, déficits de aprendizaje y memoria (Davids y col. 2003).

1.5.2.3. Ratas con Desarrollo Cerebelar Sorprendente

Lesiones del cerebelo o exposición a toxinas durante los días postnatales 1-4, producen severos cambios en la morfología del cerebelo, con ataxia, temblor, y generalmente, actividad reducida, con una pobre coordinación de movimientos, como también algunos déficits en el aprendizaje y la memoria (Davids y col. 2003). Cabe señalar que en pacientes con TDAH no hay un daño del cerebelo implicado.

1.5.3. Animales Expuestos a Toxinas Ambientales

Algunos agentes potencialmente tóxicos ya sean físicos, químicos o biológicos, provocan efectos fisiológicos, bioquímicos, patológicos y en ciertos casos genéticos en interacción con los sistemas biológicos. La exposición a los agentes tóxicos puede presentarse de distintas formas agudas o crónicas y la respuesta del organismo depende de varios factores. La relación dosis-respuesta controlada, puede inducir a producir organismos, que en este caso se establece como útiles para la investigación.

1.5.3.1. Ratones Expuestos Crónicamente

La exposición a toxinas ambientales como el plomo y el PCB (policlorobifenilos) puede contribuir a casos ocasionales de TDAH. Los ratones expuestos crónicamente a plomo desde el nacimiento muestran un incremento marcado en la actividad motora espontánea, que puede ser disminuida con el tratamiento de anfetaminas y Metilfenidato (Davids y cols. 2003).

1.5.3.2. Ratas con Daño Hipocampal por Rayos X

Los rayos X en el hipocampo en ratas infantiles dan lugar en la adultez, a conductas características del TDAH, sin embargo, dicho tratamiento produce graves déficits en el aprendizaje, lo cual limita la utilidad de este modelo (Paule y cols. 2000).

1.5.4. Otros Modelos

1.5.4.1. Ratas Macho Hiposexuales

Un alto porcentaje de ratas que fallan en la cópula con hembras, en un ambiente estándar son hiperactivas, además muestran impulsividad en pruebas de campo abierto, disminución de la hiperactividad en respuesta a anfetaminas, y una capacidad disminuida para ignorar información irrelevante en pruebas de evitación condicionada (Kohlert y Bloch 1993).

1.6. Organización del Sistema Nervioso Central

Constituido por el encéfalo y la médula espinal, está formado por millones de células nerviosas. Se denomina central en relación con el sistema nervioso autónomo (SNA), periférico o vegetativo. Están protegidos por tres membranas: duramadre (membrana externa), aracnoides (membrana intermedia), piamadre (membrana interna), denominadas genéricamente meninges. Además, el encéfalo y la médula espinal están protegidos por envolturas óseas, como son el cráneo y la columna vertebral, respectivamente.

En el embrión, el cerebro se origina a partir de las protuberancias localizadas en la extremidad anterior del tubo neural (estructura proveniente del pliegue de la placa neural, cuyas paredes forman el SNC), visibles alrededor de la primera (roedores) y la cuarta (en humanos) semana de gestación. Estas protuberancias dan lugar, en todos los vertebrados, a las estructuras que forman el cerebro anterior, el cerebro medio (mesencéfalo) y el cerebro posterior (bulbo, protuberancia, cerebelo). El cerebro anterior en sí está dividido en dos hemisferios (izquierdo y derecho). El canal interior del tubo neural del ser humano forma, de abajo hacia arriba (y de atrás hacia adelante en los animales) el canal medular, los ventrículos cerebrales, cuarto y tercero (situados en la línea media) y los ventrículos laterales, uno por cada hemisferio cerebral. En el interior de éstos se forma, circula y elimina el líquido cefalorraquídeo. Éste tiene funciones muy variadas: sirve como medio de intercambio de determinadas sustancias, como sistema de eliminación de productos residuales, para mantener el equilibrio iónico adecuado y como sistema amortiguador mecánico.

Entre las funciones del sistema nervioso central está la de atender las necesidades vitales, encargándose de recibir y procesar las sensaciones recogidas por los diferentes sentidos y de transmitir las órdenes de respuesta de forma precisa a los distintos efectores, permitiendo la relación entre nuestro cuerpo y el exterior. Es, por tanto, uno de los sistemas más importantes del organismo.

1.7. Desarrollo del Sistema Nervioso

Durante el desarrollo embrionario el tronco del encéfalo aparece subdividido en una serie de segmentos denominados rombomeros. La segmentación del tronco del encéfalo comienza, en roedores, alrededor del día 7 de gestación (E7) (Lumsdem y Krumlauf 1996) durante el cual, se establece un patrón de expresión de genes del desarrollo, los genes Hox, importantes para conferir a las células en formación la que será su identidad neuronal definitiva. La expresión de algunos de estos genes Hox depende de un gradiente endógeno

de Ácido retinoico (AR) (Gavalas 2002; Maden 2002). Diversos estudios sugieren que el gradiente de AR en el mesodermo es generado por la enzima RALDH2 (la que sintetiza AR; expresada caudalmente en los somitos de la médula espinal) y la enzima catabolizante CYP26C1 (expresada rostralmente al tronco del encéfalo, (ver figura 1.1.).

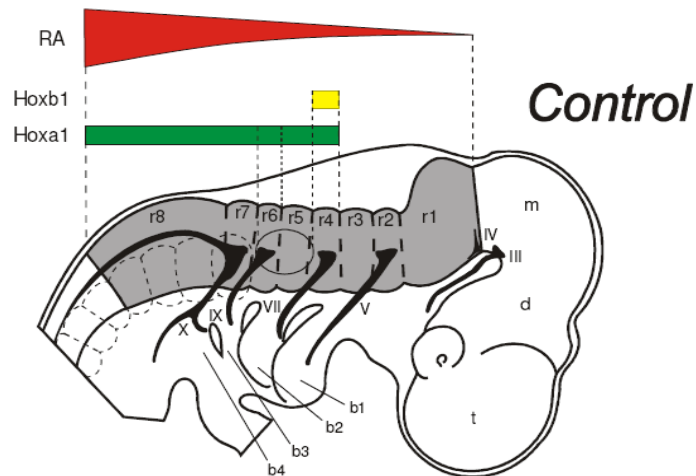


Figura 1.1. Esquema de la segmentación del tronco del encéfalo de ratones y del gradiente endógeno de Ácido retinoico (AR).

La expresión génica de algunos de los genes Hox surge en respuesta a las diferentes concentraciones de AR, transducido por los receptores de AR (RAR α , β y γ). Los retinoides juegan un papel crítico en el modelado, la segmentación y neurogénesis del romboencéfalo posterior. La ausencia de la señalización de retinoide desde una etapa dada del desarrollo en adelante indica que la señalización es dependiente tanto de la etapa como de la concentración. Por lo tanto, se necesita un gradiente de AR, más alto en la región posterior, para la organización correcta de los rombómeros (Véase figura 1.2.) Se sabe que el AR puede cambiar esta organización rombomérica a través de cambios en los dominios de expresión de los genes Hoxa1 y Hoxb1. La morfología de algunas de las anomalías inducidas por el AR aplicado de forma exógena se ha interpretado como una transformación de identidades celulares rostrales a identidades celulares más caudales (Wood y cols. 1994).

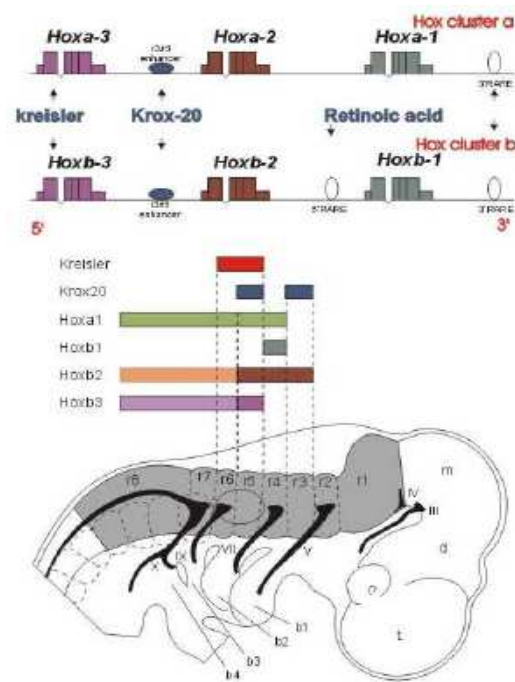


Figura 1.2. Esquema representativo de la distribución de los genes Hox en el tronco del encefalo de ratones.

Estudios realizados por el grupo dirigido por Domínguez del Toro (Guimarães y cols. 2007) establecieron que los ratones tratados con dosis subteratógenas de Ácido retinoico (AR) al inicio del proceso de segmentación (E7.5), originando camadas aparentemente normales con una supervivencia del 100 %, causaban alteraciones en el funcionamiento del sistema respiratorio neonatal, caracterizado por la aparición de episodios de respiración episódica (*Hiperneic Episodic Breathing*, HEB). Los estudios anatómicos demostraron modificaciones estructurales leves a nivel del puente rostral. Por todo ello, esta fase embrionaria es crucial para el desarrollo de redes neuronales del tronco del cerebro que regulan funciones vitales, como la respiración.

En ratones, las anomalías del ritmo respiratorio ya han sido descritas tras la inactivación de factores de transcripción cuyos patrones de expresión están restringidos a ciertos rombómeros (revisado por Lumsden y Krumlauf, 1996); por ejemplo Hoxa1, con la expresión rostral que une el borde entre r3 y T4, o Krox20, expresado en r3 y r5 (Jacquin y cols. 1996; Domínguez del Toro y cols. 2001; Chatonnet y cols. 2003). Las mutaciones $Krox20^{-/-}$ y $Hoxa1^{-/-}$, eliminan el

grupo respiratorio parafacial derivado de los rombómeros r3-r4 (pFRG), un sistema neuronal antiapneico, que puede ejercer una función que promueve el ritmo del complejo más caudal pre-Bötzing (pre-BötC) (Chatonnet y cols. 2003) en los primeros días después de nacimiento.

Durante el desarrollo postnatal se produce una maduración funcional que afecta a numerosas estructuras del tronco del encéfalo. Entre ellas destacamos la maduración del sistema noradrenérgico, a nivel del puente, el cual controla al sistema respiratorio (Viemari y cols. 2005). Como se ha mencionado, los ratones tratados con dosis subteratógenas de AR, afectados en el puente, muestran un fenotipo respiratorio característico (Guimarães y cols. 2007). No descartamos en este período postnatal que otras funciones puedan estar modificadas. De hecho se ha descrito en casos clínicos humanos, como en el síndrome de Joubert (revisado en Kumandas y cols., 2004), que tiene carácter hereditario, no solo la aparición de respiración episódica, sino problemas de ataxia y casos de retraso psicomotor.

De hecho, desde un punto de vista funcional-comportamental, la exposición al ácido retinoico todo-trans (AR) ha sido estudiada por Holson y cols. (1999) (Holson y cols. 1999) durante la etapa gestacional en ratas. En este caso se procedió a la inyección de AR en tres periodos de exposición, cada uno a tres dosis consecutivas diarias. Esta exposición abarcó los periodos de gestación (GD) 8 a 10, 11 a 13 o 14 a 16. Esos periodos fueron escogidos ya que se sabe que GD 8-10 en ratas, es el período de máxima sensibilidad para retinoides (y equivalente a E7.5 empleado en ratones por el grupo de Domínguez del Toro). Se realizaron estudios para valorar los efectos de la exposición a AR durante la etapa gestacional. En el primer estudio, los animales estuvieron expuestos a GD 8-10 o 14-16, y en el segundo, la exposición fue en GD 11-13 o 14-16.

Las conclusiones de estos estudios fueron que la exposición a AR en las dosis de los tres periodos de exposición produjo una evidente reducción en la actividad en campo abierto inducida por anfetaminas, pero ningún efecto en la actividad exploratoria (en campo novedoso) o en el reflejo de sobresalto. En cuanto a la prueba de aprendizaje en laberinto, los resultados no evidenciaron

problemas de aprendizaje en ratas expuestas al Ácido retinoico todo-trans para ninguno de los periodos gestacionales GDS 8-10, 11-13 o 14-16.

Por otro lado, el grupo de Domínguez del Toro ha observado que el tratamiento con dosis no teratogénicas de AR altera la adquisición de respuestas condicionadas, afectando por tanto, al aprendizaje asociativo (García-Sanz y cols. Manuscrito en preparación)

Dado que el sistema noradrenérgico se ha visto implicado en dicha alteración cognitiva y dado que se ha propuesto como importante en el desarrollo postnatal del control del sistema respiratorio, también modificado en nuestro sistema modelo, se prevé que durante el desarrollo postnatal de los ratones tratados con AR, dicho sistema pueda estar afectando a otras funciones motoras.

1.7.1. Sistemas Catecolaminérgicos

En el desarrollo de este trabajo tiene un papel clave las catecolaminas (dopamina, noradrenalina y adrenalina), (figura 1.3.), las cuales pueden funcionar como hormonas liberadas al torrente sanguíneo, o como neurotransmisores actuando a nivel del SNC. Las catecolaminas causan generalmente cambios fisiológicos que preparan al cuerpo para la actividad física. Para que todo funcione correctamente en el individuo adulto, consideramos especialmente importante el cometido que el correcto funcionamiento de dicho sistema desempeña durante las etapas tempranas del desarrollo.

La dopamina la noradrenalina y la adrenalina pertenecen al grupo de los neurotransmisores denominados catecolaminas. Se sintetizan en las terminaciones sinápticas a partir del aminoácido tirosina por acción de la *tirosina hidroxilasa* (es la que resulta limitante en el control de la síntesis de los productos siguientes), produciéndose la L-dopa la cual, mediante la *dopa descarboxilasa*, se convierte en dopamina (DA), la primera de las

catecolaminas. La dopamina, por hidroxilación con la *dopamina β -hidroxilasa* se transforma en noradrenalina (NA), que es la segunda de las catecolaminas. Finalmente, la NA, por una metilación con la *feniletanolamina N-metiltransferasa* (PNMT), se convierte en adrenalina (A). La mayoría de las reacciones de síntesis tienen lugar en el axón o en el terminal sináptico.

Una vez liberada una catecolamina, el principal mecanismo de desactivación es la recaptación. En la recaptación participa activamente la membrana presináptica con un mecanismo similar al de la bomba de Na⁺, que se denomina bomba de amina. Es en este fenómeno donde los fármacos tricíclicos presentan su actividad inhibiendo la recaptación, por lo que su efecto consiste claramente en una potenciación de las catecolaminas; de ahí se deriva el valor terapéutico de los antidepresivos tricíclicos.

Por otro lado, la acción enzimática aunque minoritaria con respecto a la recaptación, también constituye una parte importante en la inactivación de las catecolaminas. Los sistemas enzimáticos implicados son dos, la monoaminoxidasa (MAO) y catecol-oxi-metiltransferasa (COMT).

En la actualidad, los grupos dopaminérgicos y noradrenérgicos son en total 17, que se designan como AI-A17, mientras que los grupos adrenérgicos son tres y se designan como CI-C3.

Dentro de los grupos catecolaminérgicos localizados en el romboencéfalo caudal se incluyen los denominados grupos tegmental ventrolateral (AI y CI), el grupo dorsolateral (A2 y C2), y los grupos A3 y C3. En el rombencéfalo rostral, se localizan los grupos noradrenérgicos A4, A5, A6 y A7, situados en la formación reticular del puente. El grupo A6 corresponde al locus coeruleus, que se subdivide en tres partes: una dorsal (locus coeruleus) una ventral (locus subcoeruleus) y otra lateral (núcleo de Kölliker-Fuxe) parabraquial. El locus coeruleus es el grupo noradrenérgico más importante, ya que se calcula que contiene más del 40 % de las neuronas noradrenérgicas. A pesar de ser la mayor fuente de NA en el cerebro, el locus coeruleus contiene un pequeño número de neuronas. Sin embargo, sus axones forman una red difusa y se

calcula que aproximadamente cada célula da lugar a unos 100.000 terminales. Así, una única neurona proyectaría a varias regiones del encéfalo, incluso a zonas muy alejadas entre sí. El grupo A4 constituye una continuación dorsal del complejo A6. El grupo A7 se encuentra localizado en la región ventrolateral de la formación reticular del puente, cerca del *branchium conjunctivum*, mientras que el grupo A5 se continúa rostralmente con el grupo A7 y se localiza dorsal a la oliva superior y ventromedial al tracto del nervio facial.

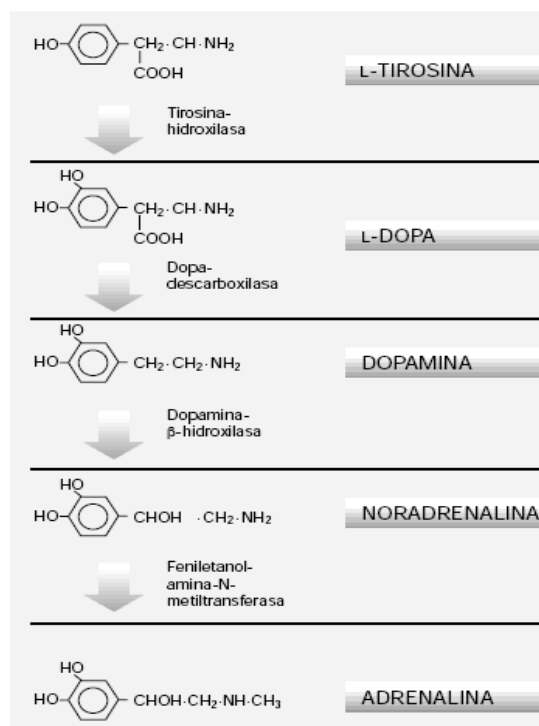


Figura 1.3. Síntesis de Catecolaminas.

1.7.1.1. Sistema Dopaminérgico

La dopamina es el producto intermedio de la síntesis de la noradrenalina siendo, en muchas neuronas, el producto final de la ruta (figura 1.4.). Actúa como neurotransmisor y/o hormona dentro y fuera del sistema central y posee una notable actividad biológica, particularmente en el riñón.

Existen dos vías dopaminérgicas principales, la nigroestriatal y la mesocórtico-límbica (o mesocortical), que se originan, respectivamente, en la *substantia nigra* y el área tegmental ventral del mesencéfalo. Una tercera vía

(tuberohipofisial) se origina a partir de cuerpos celulares en el hipotálamo e inerva el lóbulo intermedio de la hipófisis y la eminencia media.

La vía nigroestriada es cuantitativamente la más importante (contiene más del 80 % de la dopamina cerebral) y se origina a partir de neuronas presentes en la *substantia nigra (pars compacta)* que proyectan hacia el núcleo estriado (caudado-putamen).

La vía mesocortical se origina en el tegmento ventral y proyecta esencialmente hacia los tubérculos olfatorios, estriado ventral (núcleo *accumbens*) y áreas corticales (corteza prefrontal y cingulada).

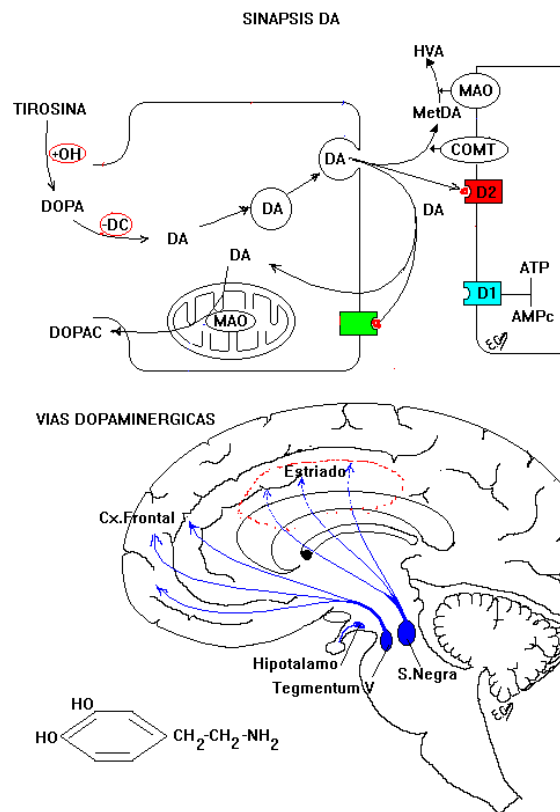


Figura 1.4. Vías y sinapsis dopaminérgicas

Los efectos de la dopamina están mediados a través de la interacción con los receptores del tipo D1 (D₁ y D₂) y D2 (D₂, D₃ y D₄), todos de tipo postsináptico.

Durante la actividad neuronal, la dopamina es liberada de sus vesículas de almacenamiento. La cantidad almacenada y liberada depende de la capacidad disponible almacenada, de la proporción en que las vesículas son descargadas y recargadas, y de la proporción en que nuevas vesículas son formadas. La biodegradación de la dopamina se efectúa por dos vías diferentes: a nivel neurocitoplasmático, experimenta desaminación oxidativa y es convertida en Ácido dihidroxifenilacético por la MAO localizada en la membrana -externa mitocondrial. Y a nivel extracelular, la dopamina que no se encuentra unida a los receptores, es metilada y convertida en O-metil-dopamina por la Catecol-oximetiltransferasa (COMT). Los 2 productos de la degradación sufren transformación enzimática antes de dar origen al metabolito inactivo más importante de la dopamina, el Ácido homovanílico.

La dopamina tiene muchas funciones en el cerebro, incluyendo papeles importantes en el comportamiento y la cognición, el humor, motora, la motivación y la recompensa, la regulación de la producción de leche, el sueño, el humor, la atención, y el aprendizaje.

En los lóbulos frontales, la dopamina controla el flujo de información desde otras áreas del cerebro. Los desórdenes de dopamina en esta región del cerebro pueden causar un declinamiento en las funciones neurocognitivas, especialmente la memoria, atención, y resolución de problemas.

Las concentraciones reducidas de dopamina en la corteza prefrontal se piensa que contribuyen al trastorno o Déficit de Atención con Hiperactividad (TDAH). Por el contrario, la medicación anti-psicótica actúa como antagonista de la dopamina y es usada en el tratamiento de los síntomas positivos en esquizofrenia.

Desde el punto de vista de la farmacología; la cocaína es un bloqueador (del transportador de la dopamina) que inhibe competitivamente la recaptación de la dopamina para aumentar el periodo de vida de la dopamina y producir una

sobreabundancia de dopamina (un aumento de hasta el 150 %) dentro de los parámetros de los neurotransmisores de la dopamina.

Al igual que la cocaína, las anfetaminas incrementan la concentración de dopamina en el espacio sináptico, pero por medio de un mecanismo distinto. Las anfetaminas tienen una estructura similar a la dopamina y pueden por tanto penetrar en el botón terminal de la neurona presináptica por medio de sus transportadores de dopamina, así como difundiendo a través de la membrana neural directamente. Al entrar en la neurona presináptica, las anfetaminas fuerzan a las moléculas de dopamina a salir de su vesícula de almacenamiento y las expulsan al espacio sináptico haciendo funcionar a la inversa a los transportadores de dopamina.

1.7.1.2. Sistema Noradrenérgico

La noradrenalina (NA) es una catecolamina que se utiliza como neurotransmisor en el sistema nervioso central (SNC), y podemos decir que la masa más compacta y densa de neuronas adrenérgicas la constituye el *locus coeruleus*, el cual está perfectamente identificado en el tronco del encéfalo, (figura 1.5.).

Las primeras neuronas noradrenérgicas son notables entre los días E12 y E14 en la rata, en el primordio del *Locus Coeruleus* (Golden 1982; Herlenius y Lagercrantz 2004). La sinaptogénesis de neuronas del Locus Coeruleus (A6) es notoria hacia el día E19 (Lauder y Bloom 1977).

La transmisión NA se considera que está involucrada en la generación, migración y maduración de las neuronas corticales, ya que regula el desarrollo de las células de Cajal-Retzius (Naqui y cols. 1999).

El sistema noradrenérgico ocupa las áreas A1 a A7 y contiene el *locus coeruleus* y el *nucleo subcerúleo* (A6 y A5, respectivamente). Realiza sus proyecciones ascendentes mediante dos tractos: el tracto noradrenérgico dorsal (A6), ventral a la *sustancia gris periacueductal*, finaliza en el hipotálamo, en la región septal y en la corteza cingular; y el tracto noradrenérgico ventral

(A1, A2, A5, A7), que discurre por el *fascículo prosencefálico medial* y alcanza la formación reticular, el tálamo, el hipotálamo, el bulbo olfatorio y la corteza cerebral, en la que se distribuye de manera uniforme a través del neocórtex. Ambos fascículos tienen una especial implicación en el nivel de actividad córtico-subcortical precisamente por su proyección al córtex, al sistema límbico (hipocampo, amígdala y septum) y al diencefalo, tálamo e hipotálamo. Las proyecciones descendentes del *locus coeruleus* acaban en el asta anterior de la medula espinal y las del *núcleo subcerúleo* emiten colaterales a la oliva inferior. El papel principal de estas proyecciones descendentes estriba en la regulación de los niveles de vigilancia y, particularmente, en la actividad mínima de la vigilia, definiendo claramente los niveles de atención, emoción e hiperexcitabilidad; por lo que su repercusión conductual es tremendamente significativa. Las proyecciones del área A1, A2, A5 y A7 finalizan en el asta ventral, el núcleo intermediolateral y la lámina I de la medula espinal. A1 y A2 se proyectan, además, en los núcleos del tracto solitario y dorsal del vago.

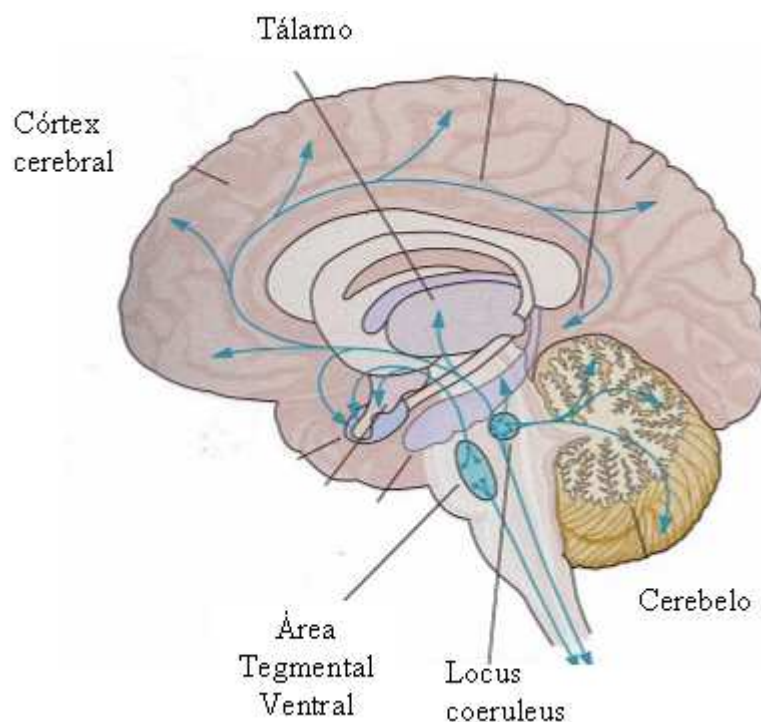


Figura 1.5. Vías Noradrenérgicas

Un alto nivel de secreción de noradrenalina aumenta el estado de vigilia, con lo que se incrementa el estado de alerta en el sujeto, y se facilita también la

disponibilidad para actuar frente a un estímulo. Y, contrariamente, unos bajos niveles de ésta secreción causan un aumento en la somnolencia, y estos bajos niveles pueden ser una causa de la depresión. Un fármaco agonista es, por ejemplo, la anfetamina.

Para que tenga lugar el correcto funcionamiento de las distintas acciones del sistema adrenérgico, que se han descrito anteriormente, es muy importante el papel que juegan los receptores adrenérgicos, que darán especificidad a la acción del neurotransmisor. Como se ha mencionado la adrenalina funciona principalmente como hormona circulante, mientras la noradrenalina a su vez, funciona como neurotransmisor (de las vías sinápticas del Sistema Nervioso Autónomo en las sinapsis postganglionares y en el Sistema Nervioso Central).

Los receptores adrenérgicos o adrenoreceptores son una clase de receptores metabotrópicos asociados a la proteína G, los cuales son activados por las catecolaminas adrenalina y noradrenalina.

Existen varios tipos de receptores adrenérgicos divididos en dos grupos principales, los receptores alfa (α , divididos a su vez en dos subtipos: el receptor α_1 y el receptor α_2 y los receptores beta (β , divididos en β_1 , β_2 y β_3). El mecanismo de la acción de los receptores adrenérgicos se fundamenta en la molécula acoplada al receptor en el lado intracelular de la membrana plasmática. Los receptores α_1 normalmente presentan una localización postsináptica, mientras se ha descrito que los receptores α_2 en el SNC son tanto presinápticos como postsinápticos. Lo mismo ocurre con los tres subtipos de receptores β .

Un receptor α_1 tiende a unirse a una proteína G_q , cuya activación activa a la fosfolipasa C, que a su vez produce un aumento en el inositol trifosfato (IP3) y del calcio intracelular, causando una activación de la célula receptora (como la contracción de la musculatura lisa). Existen tres subtipos de receptores α_1 : alfa-1A, alfa-1B y alfa-1D, todos ellos usan a la familia $G_{q/11}$ de proteínas G para la transducción de señales y cada subtipo tiene su patrón específico de activación, diferente a la de los demás subtipos. Causa vasoconstricción de muchos vasos sanguíneos incluyendo los de la piel, el riñón (arteria renal) y el

cerebro.

– Los receptores adrenérgicos α_2 , a su vez, se unen con una proteína G_i , que inactiva a la adenilato ciclasa, que a su vez produce una disminución del segundo mensajero intracelular AMPc, produciendo así una hiperpolarización de la célula.

– Los receptores β se unen a la proteína G_s , activan a la adenilato ciclasa y aumenta la actividad intracelular del AMPc.

1.7.1.3. Sistema Adrenérgico

Aunque la adrenalina puede funcionar como neurotransmisor, su papel en el funcionamiento del SNC queda en realidad completamente relegado por la acción de la noradrenalina; si bien se utiliza generalmente el termino adrenérgico. Esta paradoja se debe a que la potente producción de adrenalina desde la médula de las glándulas suprarrenales, como consecuencia de la activación simpática, tiene unas consecuencias generalizadas e iguales que las de la acción de la noradrenalina liberada por la neurona postsináptica de una vía autónoma.

Las neuronas adrenérgicas se sitúan en dos subgrupos (C1-C2) de las áreas A1-A2, y se proyectan al *locus coeruleus*, cerebelo, núcleos del rafe, núcleo dorsal del vago y medula espinal cervical. Los sistemas adrenérgico y noradrenérgico juegan un papel fundamental en el control de la presión arterial y están implicados en importantes procesos patológicos, como la enfermedad del Alzheimer, en la que la proyección y el número de neuronas noradrenérgicas disminuyen. La depresión se ha relacionado también con un descenso de los niveles de noradrenalina, mientras que los suicidas poseen un número mayor de receptores adrenérgicos beta. La estimulación del *locus coeruleus* provoca ansiedad y episodios de pánico.

1.8. Vitamina A

La **vitamina A** o **retinol** es una vitamina liposoluble; ayuda a la formación y mantenimiento de dientes sanos y tejidos blandos y óseos, de las membranas mucosas y de la piel. La vitamina A es un nutriente esencial para el ser humano. Se conoce también como **retinol**, ya que genera pigmentos necesarios para el funcionamiento de la retina o también como un ácido (ácido retinoico), (figura 1.6.). Desempeña un papel importante en el desarrollo de una buena visión, especialmente ante la luz tenue. También se puede requerir para la reproducción y la lactancia. El β -caroteno, que tiene propiedades antioxidantes, es un precursor de la vitamina A.

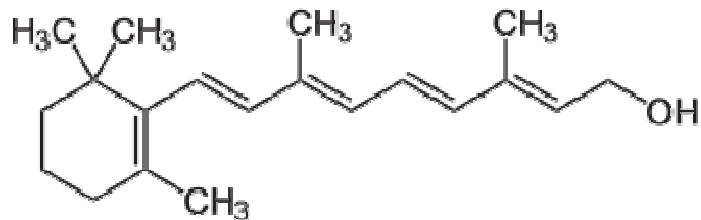


Figura 1.6. Estructura química del retinol

El déficit de vitamina A constituye uno de los mayores problemas de salud pública en el mundo. Según la OMS, unos 250 millones de niños en edad preescolar padecen una deficiencia subclínica de esta vitamina. Pero el problema no es exclusivo de los países en desarrollo, en general más de un tercio de la población mundial consume dietas con bajo contenido en vitamina A.

1.8.1. Historia

En Egipto, hacia el año 1500 a.C. se describió por vez primera el tratamiento de la ceguera nocturna (actualmente es sabido que esta ceguera obedece a un déficit de vitamina A), si bien no se relacionó a dicha enfermedad con alguna deficiencia en la dieta, se recomendaba la ingesta de hígado (alimento rico en vitamina A) (Grater 1997).

Hipócrates recomendaba hígado para el tratamiento de la ceguera nocturna e hígado untado en miel a aquellos niños que en un estado de desnutrición padeciesen de ceguera. El pueblo de Terranova descubrió en tiempos desconocidos que comer hígado era una cura rápida y segura para la ceguera nocturna, causada según creían por la sobre exposición de los ojos de los pescadores a la luz. Además de esto se han descrito prácticas similares en otras culturas del mundo (Collum 1957).

En 1857 David Livingstone (misionero médico en África) descubrió los efectos en sus transportadores nativos que estaban forzados a subsistir con trigo, café con menos azúcar y malanga (Bolet Astoviza 2005).

En 1906, investigaciones en la alimentación de animales determinaron que existían otros factores además de los carbohidratos, proteínas y grasas que eran necesarios para mantener la salud de los animales (Wolf 2001).

La primera vitamina se descubrió entre los años 1912-1914, uno de esos factores fue independientemente descubierto por Elmer McCollum y Margaret Davis en la Universidad de Wisconsin-Madison y en 1913 por Lafayette Mendel y Thomas Burr Osborne en la Universidad de Yale. Estos últimos descubrieron un factor liposoluble en la mantequilla y en la yema de huevo que era indispensable para el crecimiento y desarrollo normal de las ratas. Los investigadores consideraron el nombre del mismo en base al descubrimiento reciente del factor hidrosoluble B (vitamina B), por lo que acuñaron el nombre de factor liposoluble A (Vitamina A) para esta nueva sustancia descubierta (Rosenfeld 1997).

En 1919, Harry Steenbock de la Universidad de Wisconsin-Madison propuso una relación entre los pigmentos amarillos de los vegetales los β -carotenos y la vitamina A. Durante los años veinte, se llegó a establecer bien la importancia de su papel biológico. Se hallaron fuentes más ricas de vitamina A, como el aceite de hígado de halibut. Steenbock y Coward demostraron que el β -caroteno, componente normal de las plantas, puede reemplazar en la dieta a la vitamina A. En 1930, Moore demostró la conversión del β -caroteno en vitamina

A en las ratas. Se estableció entonces el papel de ciertos carotenoides como provitaminas A. En 1931, Karrer propuso las fórmulas estructurales de ambos compuestos. En 1933, Hale describió que la vitamina A (retinol) es esencial para el desarrollo embrionario normal. En 1937 se aisló por primera vez la vitamina A en su forma cristalina. En 1946, los holandeses David Adriaan Van Dorp y Jozef Ferdinand Arens publicaron la síntesis para la vitamina A en su forma ácida en la revista *Nature*. En 1947, ellos completaron la primera síntesis del complejo que compone la vitamina A habiendo transformado el radical ácido en uno alcohólico. Isler sintetizó en 1947 la vitamina en forma pura cristalina, mientras que el β -caroteno fue sintetizado por primera vez en 1950 (Sharman 1983; Wolf 1996).

1.8.2. Absorción de Vitamina A y Síntesis de Ácido Retinoico

La vitamina A o retinol se incorpora en el organismo por la ingesta tanto de productos de origen animal, en forma de retinol y de ésteres de retinol, como de origen vegetal en forma de carotinoides (beta carotenos). Los ésteres de retinol son hidrolizados en el lumen del intestino delgado a retinol, el cual junto con el retinol proveniente de la dieta y emulsionado con sales biliares y ácidos grasos libres es captado por los enterocitos. Por otro lado los carotinoides, entre los que destaca el β -caroteno como más activo, se absorben por difusión pasiva en el interior del enterocito donde son convertidos en retinol. Parte de este retinol o vitamina A es destinado a la retina en forma de 11- cis-retinal, donde juega un importante papel en el ciclo visual. Pero nuestro interés en la vitamina A se centra en su destino hacia la síntesis de ácido retinoico (AR). La formación de este compuesto, a partir de retinol, implica dos etapas de oxidación. La primera oxidación, de retinol a retinal, es reversible y está catalizada por dos familias de retinol deshidrogenasas. De la familia de alcohol deshidrogenasas (ADH) se han descrito 5 isoformas, siendo la ADH3 la más importante, y las dehidrogenasa-reductasas de cadena corta (SDR) constan de 8 isoformas, siendo la DHRS3, la más importante. El retinaldehído entonces es convertido a su forma activa, el AR, por las aldehído deshidrogenasas (ALDH), siendo la RALDH2, la más importante durante el desarrollo embrionario (Duester y cols. 2003).

Los animales no son capaces de sintetizar los retinoides, siendo las principales fuentes de retinol en la dieta los carotenoides de los vegetales y las reservas de vitamina A de tejidos animales, en forma de ésteres de retinol.

1.9. Qué es el Ácido Retinoico

El ácido retinoico (AR) es una de las principales formas activas de la vitamina A. Presenta distintos isómeros geométricos debido a las posibles configuraciones cis-trans alrededor de los dobles enlaces de la cadena lateral. Estas configuraciones son:

a) AR trans (ATAR). Se utiliza en el tratamiento de la leucemia promielocítica aguda y el cáncer renal debido a que induce apoptosis en células mesangiales humanas. Se une a los receptores de ácido retinoico ARR.

b) AR 9-cis. Se une a ambos tipos de receptores del ácido retinoico: ARR y RXR.

El AR se considera una hormona esteroide ya que se une a receptores intracelulares específicos que posteriormente se unen al DNA y afectan a la síntesis de proteínas implicadas en la regulación del crecimiento y la diferenciación celular.

Es un nutriente que el cuerpo necesita en pequeñas cantidades para funcionar y mantenerse sano. Es especialmente importante en el embrión ya que ayuda a las células a crecer y desarrollarse, y se ha demostrado que la falta de vitamina A materna produce malformaciones congénitas del feto que conlleva su muerte.

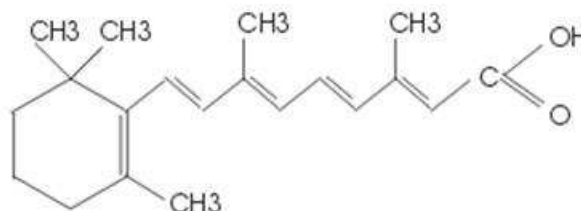


Figura 1.7. Estructura química del ácido retinoico

1.9.1. Mecanismo de Acción del Ácido Retinoico

El AR actúa como mensajero intracelular combinándose con receptores nucleares y modificando la expresión de genes. Se conocen dos tipos de receptores a los que pueden unirse el AR:

- los RAR o receptores de ácido retinoico
- los RXR o receptores X de retinoides

Ambos tipos de receptores tienen tres subtipos: α , β y γ que son codificados por genes distintos y que a su vez presentan isoformas (Mark y cols., 2006).

El AR es necesario para impedir la síntesis de queratina de alta masa molecular. Se ha demostrado que los animales con deficiencia de vitamina A son más susceptibles a padecer cáncer debido al potencial antioxidante del β -caroteno y a los efectos que ejercen el retinol y el ácido retinoico en la regulación celular.

Interviene en la producción de mucus en las células epiteliales. El AR también participa en los mecanismos que controlan la reacción inflamatoria, ya que ha sido relacionado con la generación y la expresión de óxido nítrico, prostaglandinas, interleucina y citosinas. Estas sustancias actúan en la generación o el mantenimiento del dolor debido a la inflamación. También son sustancias diana para muchos analgésicos. Actúa como agente protector del daño oxidativo en las mitocondrias.

Pero también hay que tener en cuenta que un abuso de AR puede afectar negativamente al organismo provocando: pérdida de peso y apetito, irritabilidad, disfunciones renales, dolores de huesos y dolores en las articulaciones. En pacientes embarazadas el uso indebido del mismo puede inducir malformaciones congénitas en el desarrollo del embrión. Por ello, para nuestro estudio resulta relevante resaltar el papel que juega el AR durante el desarrollo embrionario.

1.9.2. Problemática del Ácido Retinoico

La vitamina A es un micronutriente esencial para el crecimiento del organismo humano, el trofismo de los tejidos epiteliales, la organogénesis, la diferenciación epitelial y el desarrollo embrionario. La recomendación nutricional diaria del *Food Nutrition Board* de la Academia de Ciencias y el Consejo Nacional de Investigaciones de EE.UU es de 800 µg de Equivalentes de Retinol (ER) durante todo el embarazo.

Tanto el exceso como la deficiencia de esta vitamina durante el desarrollo embrionario pueden generar malformaciones congénitas, muerte fetal o signos de deficiencia de vitamina A en la descendencia. Los receptores nucleares para el ácido retinoico funcionan como factores de transcripción que regulan la expresión genética y por esta vía ejercen su función, tanto en la organogénesis como en la teratogénesis.

En adultos, la ingestión, aguda o crónica de elevadas cantidades de vitamina A puede generar diversas manifestaciones clínicas como dolor de cabeza, vómitos, diplopía, alopecia, sequedad de las membranas mucosas, descamación cutánea, anomalidades óseas y daño hepático.

La vitamina A y los retinoides son teratógenos clásicos en una variedad de especies. Las malformaciones que se generan dependen de las dosis que se emplean y el momento de la organogénesis en el cual se suministran. El tratamiento durante la organogénesis precoz resulta en anomalías del sistema nervioso central y cardiovascular, mientras que un suministro más tardío da lugar a defectos genéticos en los miembros superiores e inferiores, el tracto genitourinario y el paladar.

Los retinoides que se derivan del catabolismo de la vitamina A de la dieta materna son transferibles al compartimiento embrio-fetal. Por causa de su efecto teratogénico demostrado en bioensayos con diferentes razas de animales y estudios epidemiológicos en humanos, los retinoides *per se*, se

encuentran contraindicados en el embarazo. El riesgo es máximo en el primer trimestre de la gestación y persiste hasta 1 mes después de haber finalizado el tratamiento.

La pérdida de peso materno, la elevación de la letalidad fetal, el crecimiento fetal retardado, las malformaciones de las estructuras craneofaciales -como los defectos del oído externo y timo-, la hipoplasia mandibular, las anomalías del hueso temporal, y las malformaciones de los miembros superiores e inferiores pertenecen a las malformaciones congénitas más informadas en la literatura. Su aparición alcanza 70 a 80 % de los fetos nacidos de ratas, ratones y monos tratados con altas dosis de estos compuestos, y la frecuencia de aparición de malformaciones es de 32 % con respecto a los controles históricos de las cepas de animales utilizados.

La relevancia biológica del retinol (RO) y sus derivados, principalmente el AR, toma interés durante la embriogénesis en donde el exceso o la deficiencia, como se ha citado anteriormente, producen severas anomalías (Lammer et al 1985) tanto en modelos experimentales como en el humano. Se tienen evidencias de que embriones de cerdo desarrollados bajo condiciones de deficiencia en vitamina A presentaron anoftalmía, en otras especies se observaron defectos en el sistema nervioso central (SNC hidrocefalia y espina bifida), ojo (anoftalmía y microftalmía), cara (paladar hendido), dentición, oído (otosclerosis), extremidades, sistema urogenital (ovarios ectópicos, pseudohermafroditismo y defecto renal), pulmón (hipoplasia) y corazón (septación ventricular incompleta), defectos de septación aorticopulmonar y *valvulus communisy* (Hale 1993).

El tipo de experimentos opuestos, en los cuales se administra un exceso de RO al embrión, identificó al AR como el principal compuesto con actividad biológica en la célula. El AR fue altamente teratogénico para mamíferos gestantes afectando múltiples sistemas, incluyendo el SNC (microcefalia, exencefalía, hidrocefalia y espina bífida), ojo (anoftalmía, exoftalmia y microftalmía), cara (labio y aladar hendido, anomalías craneales, hipoplasia maxilar y mandibular), oído (ausencia o deformación), extremidades (acortamiento,

ectrodactilia sindactilia), atresia esofágica y anal, hipoplasia-tímica, corazón (trasposición cardiovascular, hipoplasia aórtica), además de defectos en útero, riñón, tiroides y pituitaria(Hale 1993).

Es importante señalar que las alteraciones observadas en modelos experimentales son muy similares a las reportadas en humanos, también de que la presencia de poco o mucho AR es dañina para el embrión, cuyas células se encargan de regular de manera estricta los niveles endógenos de este compuesto para obtener un balance correcto. A pesar de los efectos adversos ocasionados por la administración de AR, ha mostrado ser eficiente en el tratamiento de desórdenes de la piel como el acné quístico, psoriasis y otras dermatosis queratinizantes. Debido a la capacidad que tiene el AR para regular el crecimiento de células con mutaciones, se ha evaluado como preventivo y terapéutico en una gran variedad de lesiones malignas y premalignas en el humano incluyendo cáncer de piel, cabeza y cuello, pulmón, hígado, glándula mamaria, leucoplaquia, leucemia promielocítica aguda (LPA) y síndromes mielodisplásicos. Hoy día, el AR se utiliza para inducir remisión en la LPA, teniendo una respuesta satisfactoria hasta en un 90 % si se utiliza como monoterapia. Por otro lado, este metabolito puede activar genes involucrados en el desarrollo pulmonar y promover la septación y crecimiento alveolar en los periodos pre y posnatal. Asimismo, se conoce que hay una relación entre el nivel de RO y el grado de obstrucción de las vías aéreas, estudios realizados en modelos animales sugieren que el AR promueve la reparación y/o realveolización de lesiones del parénquima pulmonar asociadas a enfisema (Parra-Hernandez, cols. 2005).

La deficiencia de AR puede dar lugar a una anemia provocada por una mala movilización del hierro, ya que se trata de una molécula necesaria para la síntesis de la transferrina, la proteína transportadora de hierro.

Actualmente se están haciendo estudios para la posible utilización del ácido retinoico en la prevención y el tratamiento de algunos tipos de cáncer. Por ejemplo en el caso del neuroblastoma, un cáncer infantil que se origina en el tejido nervioso, es importante debido a la implicación del AR en el desarrollo

embrionario y la generación de órganos y sistemas (entre ellos el sistema nervioso). También se ha pensado en utilizar el AR en la terapia de algunos cánceres ya que está relacionado con los procesos de crecimiento, diferenciación y supervivencia celular. Volviendo a relacionar este aspecto con el neuroblastoma, se ha descubierto que el AR produce una parada de la proliferación celular en la fase G1 del ciclo celular. Esta parada está relacionada con el incremento de la cantidad de una proteína llamada p27 y la inhibición de las proteínas kinasas y ciclinas.

1.10. Idazoxan (IDA)

El fármaco Idazoxan provoca un aumento de la concentración plasmática de noradrenalina al que puede atribuirse una estimulación baroreceptora. Siendo un antagonista del adrenoreceptor alfa2 (Dawson y cols 1999; Miguelez y cols 2009) el bloqueo de adrenoreceptores alfa2 por Idazoxan puede, por tanto, aumentar la liberación de noradrenalina de los nervios periféricos simpático de las ratas anestesiadas y conscientes. Este efecto es de corta duración y no influye en la presión arterial de ratas normotensas (Harland y Brown 1988).

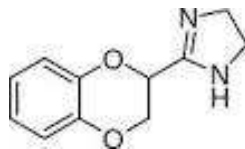


Figura 1.8. Fórmula química del Idazoxan.

La administración sistémica de Idazoxan aumenta notablemente la producción de dopamina en la corteza prefrontal medial, mientras que no afectan a flujo de dopamina en el cuerpo estriado o en el núcleo accumbens. Estos datos muestran que los receptores adrenérgicos alfa2 aumenta la producción de dopamina en la corteza prefrontal medial a través de un mecanismo local, un efecto que parece en gran medida independiente de la actividad neuronal dopaminérgica (Hertel, y cols., 1999).

Lo mismo ocurre con la liberación de noradrenalina en dicha región, pues en las neuronas del *locus coeruleus* funciona como autoreceptor (receptor pre-sináptico). De este modo el Idazoxan, como antagonista del receptor, bloquea la inhibición de la neurona, la cual descarga más noradrenalina en su lugar de proyección (Corteza prefrontal, amígdala, hipocampo, cerebelo, etc.).

Los efectos del antagonista Idazoxan de los receptores adrenérgicos alfa2 sobre las concentraciones extracelulares de dopamina en las principales regiones de terminales dopaminérgicos en el cerebro fueron investigados por medio de microdiálisis en ratas, las cuales se mueven libremente. La administración sistémica de Idazoxan aumentó notablemente la producción de dopamina en la corteza prefrontal medial, mientras que no afectaron al flujo de salida de la dopamina en el estriado o en el núcleo accumbens. La perfusión local de Idazoxan invertido a través de la diálisis mejora notablemente el flujo de salida de la dopamina en las áreas corticales, pero no subcortical, en la que la producción de dopamina se vio poco afectada. La infusión de Idazoxan en el área tegmental ventral no altera el flujo de salida de la dopamina en la corteza prefrontal medial.

Además, el aumento en la descarga de dopamina cortical inducida por la administración sistémica de Idazoxan no se vio afectado por la perfusión de tetrodotoxina del área tegmental ventral. Estos datos muestran que el antagonista alfa-2 Idazoxan preferentemente los receptores adrenérgicos aumenta la producción de dopamina basal en la corteza medial prefrontal a través de un mecanismo local, un efecto que aparece en gran medida independiente de la actividad neuronal dopaminérgica. Una producción mayor de la dopamina cortical puede contribuir al aumento pretendido por los alfa2 adrenérgicos de los efectos terapéuticos de los antidepresivos y antipsicóticos.

Durante el desarrollo postnatal, crítico para el desarrollo conductual y neuroendocrino, los receptores adrenérgicos α_2 alcanzan los valores máximos de expresión en el tronco del encéfalo (Winzer-Serhan y cols. 1997) y se han propuesto como posibles reguladores de procesos durante el desarrollo (Happe y cols. 2004). La manipulación neonatal de dichos receptores en la zona del

puede haber demostrado tener consecuencias en el adulto, que afectaban a funciones reflejas como la respuesta de sobresalto y la inhibición por prepulso (Shishkina y cols. 2004). Igualmente, la interferencia postnatal realizada en ratas en la neurotransmisión noradrenérgica con un tratamiento con yohimbina alteran las propiedades funcionales de las conexiones en la corteza visual (Soto-Moyano y cols. 1991).

1.11. Metilfenidato (MF)

Las anfetaminas constituyen un grupo de sustancias semejantes estructuralmente a la adrenalina y a la efedrina. La molécula representativa del grupo es la anfetamina. Es una amina simpaticomimética indirecta, que además de ejercer efectos sobre los receptores noradrenérgicos alfa y beta periféricos tiene claros efectos sobre el sistema nervioso central: estimula el centro respiratorio bulbar, actúa sobre la corteza cerebral y parece también estimular el sistema activador de la formación reticular. También disminuye el efecto depresivo de otras drogas sobre el sistema nervioso central.

Al ser una amina simpaticomimética actúa como agonista en los receptores de adrenalina y noradrenalina inhibiendo su recaptura y provocando un efecto prolongado de estimulación en el SNC. Afecta el hipotálamo, sitio donde se localizan los centros reguladores del hambre y la saciedad ocasionando falta de apetito, y se cree que interactúa también con los transportadores responsables de la captación de dopamina y 5-HT.

El Metilfenidato (MF) es un psicoestimulante, más conocido por la marca comercial Ritalin o Rubifen en España.

A comienzos de los sesenta, se popularizó el uso del MF para tratar a niños con TDAH, síndrome conocido en ese momento como "hiperactividad" o "disfunción cerebral mínima" (DCM).

El MF se administra generalmente por vía oral en forma de comprimidos. Los efectos clínicos de la fórmula de liberación inmediata se manifiestan unos 30 a 45 minutos después de ingeridos, y se extienden por un máximo de 4 horas.

Está indicado para el tratamiento en niños (mayores de 6 años) y también en adultos de:

- Déficit de atención con o sin hiperactividad (TDAH)
- Narcolepsia
- Hipersonmia primaria

El MF es una amina simpaticomimética. Pertenece al grupo de las fenetilaminas y, en particular, es un análogo ciclizado de la anfetamina. Estructuralmente, el MF añade al modelo un anillo piperidínico, que incluye al nitrógeno y al carbono beta.

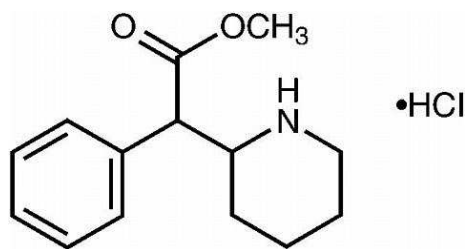


Figura 1.9. Fórmula química del Metilfenidato

El MF es un potente inhibidor de la recaptación de dopamina (DA) y noradrenalina (NA). Bloquea la captura de estas catecolaminas por las terminales de las células nerviosas; impide que sean retiradas del espacio sináptico. De este modo, la DA y la NA extracelulares permanecen activas por más tiempo, aumentando significativamente la densidad de estos neurotransmisores en las sinapsis neuronales.

El MF posee potentes efectos agonistas sobre receptores alfa y beta adrenérgicos: (1) a nivel presináptico produce liberación de NA y DA (agonista indirecto), (2) a nivel postsináptico actúa como agonista directo (Moizeszowicz 1998).

El MF eleva el nivel de alerta (*arousal*) del sistema nervioso central. Incrementa los mecanismos excitatorios del cerebro, a la vez que aumenta aquellos mecanismos responsables por la inhibición. Esto resulta en una mejor concentración, coordinación motora y control de los impulsos.

1.11.1. Acción Neuromoduladora

Los efectos del MF en el TDAH se atribuyen a una mejora en la capacidad inhibitoria de circuitos frontosubcorticales mediados por el neurotransmisor dopamina. En particular, el MF incrementa la acción reguladora de la corteza frontal y estructuras inferiores a nivel del cerebro anterior basal, como el núcleo estriado. Hacia la porción ventral de este último, localizado en los ganglios basales de las áreas prefrontales del cerebro, se encuentra el *núcleo accumbens*. La dopamina actúa en el *núcleo accumbens* limitando la información que debe ser procesada, permitiendo focalizar la atención. En el TDAH, la corteza prefrontal no modularía adecuadamente al *locus coeruleus* por un déficit de dopamina y noradrenalina. Esta falta de inhibición se manifiesta en un ingreso excesivo de información. Así, surgen dificultades para seleccionar estímulos pertinentes, y aumenta la distracción. Estudios recientes del flujo cerebral muestran que, durante el tratamiento con MF, se incrementan tanto la actividad en el estriado como las conexiones entre la región órbito-frontal y límbica (Ruiz-García y cols. 2005).

1.11.2. Efectos Conductuales

El MF es la droga más utilizada para tratar el TDAH y la más estudiada en los últimos cuarenta años. Se ha comprobado que produce un efecto estabilizador en personas con este trastorno. La noradrenalina incidiría sobre los sistemas atencionales posteriores, que permiten cambiar la focalización de un estímulo a otro; la noradrenalina y la dopamina, sobre los sistemas atencionales anteriores, relacionados con funciones ejecutivas, análisis de datos y preparación o planificación de la respuesta.

En los niños con trastornos por déficit de la atención, disminuye las conductas impulsivas y la inquietud motora, y aumenta la actividad cognitiva (atención, memoria), mejorando su capacidad de concentrarse en tareas repetitivas, que demandan esfuerzo mental sostenido y no se asocian a una satisfacción inmediata. En los adultos con TDAH, el MF favorece las funciones ejecutivas, relacionadas con el control cognitivo (Wilens y Spencer 2000).

1.11.3. Farmacoterapia

El MF es más activo sobre las funciones intelectuales que sobre las motoras, mientras que las anfetaminas producen una estimulación más generalizada, lo que se traduce en una mayor intensidad de efectos secundarios como insomnio, supresión del apetito y activación cardiorespiratoria. Sin embargo, estos efectos distintivos en algunos casos resultan funcionales a la terapéutica.

1.11.4. Adicciones

La prevalencia de abuso de sustancias en el TDAH es significativamente más alta que en la población general. Sin embargo, hasta la fecha no se ha comprobado drogodependencia en niños ni adolescentes que recibieron anfetaminas o Metilfenidato, como forma de tratamiento.

Actualmente se ha establecido que el tratamiento del TDAH con estimulantes ejerce un efecto protector contra las adicciones (Ramos-Quiroga 2002). En un estudio donde se comparan los índices de abuso de droga en tres grupos: adolescentes con TDAH no medicados, pacientes con TDAH medicados y un grupo control, puede observarse que los que nunca recibieron medicación tienen un 30 % de incidencia de abuso de sustancias, mientras que la incidencia en los TDAH medicados es prácticamente igual que la del grupo control (Ramos-Quiroga 2002).

Se presupone que el 20 % de los adultos que sufren adicciones tienen TDAH, una gran parte de los problemas de adicciones en adultos se podrían evitar diagnosticando el TDAH en los niños a tiempo (Sherman 2008).

La adicción a los estimulantes parece ocurrir cuando se producen aumentos considerables bruscos de los niveles de dopamina extracelular en el cerebro, y éstos se vinculan con las vías de administración intravenosa e intranasal. En estos casos, cuando hay abuso, el MF sería también más potente que la anfetamina (Segal y Janowsky 1978). El efecto terapéutico, por el contrario, se logra con incrementos graduales y progresivos de dopamina, similares a la producción natural del cerebro, como los que produce el MF si se lo administra por vía oral. De esta manera, el riesgo de adicción es relativamente bajo (Volkow y Swanson 2003).

Objetivos

Partiendo de la hipótesis de que los ratones modelo de TDAH tienen reducida la liberación de Dopamina y Noradrenalina a nivel cortical en la etapa postnatal, y considerando que esta etapa es fundamental en el establecimiento de proyecciones y conexiones permanentes entre el tronco del encéfalo y las estructuras corticales en el adulto, el **objetivo general** del presente estudio consiste en investigar de qué modo el tratamiento diario (crónico) durante las tres primeras semanas de vida postnatal con metilfenidato y con idazoxán, los cuales incrementan ambos neurotransmisores en el espacio sináptico, afecta en el adulto a funciones motoras reflejas o exploratorias, así como a la adquisición de respuestas motoras condicionadas o a los procesos de aprendizaje y memoria.

De este modo, los **objetivos específicos** del trabajo son:

- Estudiar las posibles modificaciones en la adquisición de respuestas condicionadas, en los ratones silvestres y AR tratados postnatalmente con uno u otro fármaco o con salino. Para ello usaremos las técnicas de la Evitación Pasiva, del Condicionamiento Clásico Palpebral y de la Inhibición por Prepulso de la Respuesta de Sobresalto.
- Caracterizar en los distintos modelos, y de modo no invasivo, el fenotipo comportamental con técnicas de actividad y capacidad locomotora, conductuales, sociales, de desarrollo, analgesia, aprendizaje motor y memorísticas, orientadas directamente al estudio de marcadores específicos del TDAH.
- Determinar, mediante la prueba de reconocimiento de objetos, el efecto de los tratamientos postnatales sobre los procesos atencionales durante las tareas de aprendizaje y memoria.

Materiales y Métodos

2.1. Normativas Europeas, Nacionales y Autonómicas

La realización del presente trabajo se ha llevado a cabo de acuerdo a las recomendaciones para la investigación y del Consejo de la Unión Europea (86/609/CEE) D.O.C.E. 18-12-86 (Nº L358/1 a Nº L358/28). En especial el Anexo II art.5 de la Directiva y las Normas Españolas (BOE 67/8509-12, 1998) en materia de obtención y cuidados de animales de laboratorio con fines científicos y el uso de animales de laboratorio en experimentos agudos y crónicos.

También se han considerado las siguientes legislaciones:

- El Decreto 142/2002 de 7 de Mayo, por el que se crea y se regula el registro de establecimientos de cría, suministradores y usuarios de animales de experimentación y otros fines científicos (BOJA 55; 11-5-2002).
- La Ley 11/2003, de 24 de Noviembre de protección de los Animales (BOJA nº 237,10-12-2003).
- El Real Decreto 1201/2005, del 10 de Octubre, sobre protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos (BOE 252; 21-10-2005).
- La Ley 32/2007 de 7 de Noviembre, para el cuidado de los animales, en su explotación, transporte experimentación y sacrificio (BOE nº268; 8-11-2007).
- La Propuesta (3 de Junio 2010 de modificación de la Directiva del consejo del 24-11-1986, a partir del documento acordado por la Comisión Europea(5-11-2008) consensuado con el Consejo Europeo y el Parlamento Europeo.
- El Diario oficial de la Unión Europea, Directiva 2010/63/UE del Parlamento Europeo y el Consejo del 22-9-2010 relativo a la protección de animales utilizados para fines científicos.
- La Normativa *REACH* de la agencia Europea de sustancias y preparados químicos.

- El artículo 168 del Tratado de Funcionamiento de la Unión Europea (TFUE) para protección de la salud para personal con riesgos.
- La Directiva marco 91/156/CEE y Directiva 177/2002 en su norma sobre eliminación de animales muertos.

Los experimentos también fueron aprobados por los dos Comités Institucionales locales para el manejo y cuidado de animales.

Así mismo, todos los instrumentos utilizados en el presente trabajo cumplen las Normas Europeas de uso manejo y seguridad ISO 9001:2008 y la Directiva 98/37/CE del Parlamento Europeo y del Consejo de 22 Junio de 1998 relativa a la aproximación de legislaciones de los Estados miembros sobre máquinas y dispositivos. La Norma EN 285 modificada en el 2008 y la Directiva 2007/47/EC para asegurar la esterilización de instrumentos más complejos como los de la cirugía mínimamente invasiva.

Igualmente, los participantes en este trabajo poseen los títulos requeridos para su objetivo:

- Formación Especializada en Procedimientos con Animales de Experimentación
- Cirugía Menor y otros Procedimientos Biosanitarios
- Protección y Experimentación Animal para Experimentadores en Ciencias Biomédicas
- Manipulación de Animales.

Durante el periodo de experimentación se hicieron pruebas periódicas aleatorias de monitorización de salud para animales de laboratorio siendo sometidos a inspección veterinaria, resultando los informes sin hallazgos desfavorables.

Al final del periodo experimental todos los animales se encontraban en óptimas condiciones físicas y biopsicosociales.

2.2. Métodos Relacionados con la Manipulación de los Animales

2.2.1. Sujetos Experimentales

Como actividad inicial de este trabajo de investigación se realiza una selección al azar de crías hembras (línea descendiente de 3^o generación) del animalario de la Universidad Pablo de Olavide y CABD (Centro Andaluz de Biología y Desarrollo), adquiridos previamente de un proveedor oficial (laboratorio Harlan Iberica S.L.).

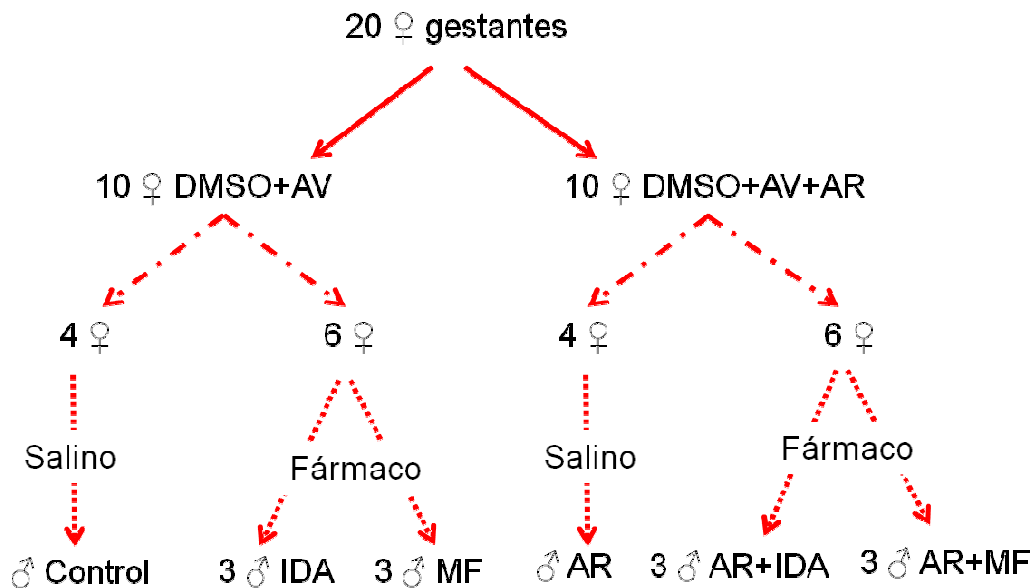


Figura 2.1. Esquema representativo de la selección para obtener los sujetos experimentales

Como se observa en la figura 2.1. se parte de 20 hembras gestantes CD1 para obtener los sujetos experimentales. Se eligen de esas 20 hembras, 10 ratonas para tratarlas durante su gestación con el fármaco ácido retinoico (AR) (Sigma, R2625) mezclado con aceite vegetal (AV) y dimetilsulfoxido (DMSO) como transportador miscible con el fin de conseguir una alteración en su naturaleza. De estas 10 hembras se eligen 4 aleatoriamente para que los machos descendientes sean tratados con salino, de donde resultan los ratones AR y de las otras 6 madres, los machos descendientes, son tratados postnatalmente durante 20 días (P₁ a P₂₀) con el fármaco para obtener los ratones AR+fármaco (los descendientes de 3 hembras con Idazoxan y los de las otras 3 hembras

restantes con Metilfenidato). De igual manera, las otras 10 hembras CD1 son tratadas con una administración oral sólo de DMSO y AV sin ácido retinoico como ascendentes de los machos controles. De estas 10 hembras, se eligen aleatoriamente a 4 para tratar a sus descendientes machos con salino y así obtenemos los ratones control y a las otras 6 hembras se tratan crónicamente de P1 a P20 a sus descendientes machos con el fármaco, para obtener los ratones fármaco (los descendientes de 3 hembras con Idazoxan y los de las otras 3 hembras restantes con Metilfenidato).

Los animales se destetaron a P21, después de la última administración de los fármacos. Los ratones machos se separan y los hermanos de cada camada se estabularon compartiendo la misma jaula (como aporte de enriquecimiento) hasta el comienzo de las pruebas de adultos. En toda la experimentación los animales utilizados para las pruebas fueron machos adultos desde 3 hasta aproximadamente 6 meses.

2.2.2. Principios de Estabulación

Los ratones se mantuvieron en jaulas colectivas como enriquecimiento social ($n \leq 6$ por jaula). El tamaño de las jaulas es de 45 x 30 x 20 cm, estándar mediano, de policarbonato. La temperatura es constante de 21 ± 1 °C, con una humedad ambiental diaria de 50 ± 7 %. Estas condiciones son las recomendadas por *FELASA (Federation of European Laboratory Animal Science Associations)* y fueron sometidos a un ciclo constante de 12 horas de luz-oscuridad (de 8:00 a 20:00 horas, respectivamente), con acceso libre a agua y alimento.

2.3. Tratamiento para Obtener los Ratones Experimentales

Para la obtención de animales tratados con AR, éste se administra a la madre gestante por vía oral, mediante una sonda gástrica achatada de punta redonda (Nº15). La sonda va directa al estómago con una medida aproximada de penetración de 3,4 cm desde la parte exterior de la boca y va unida a una jeringa que contiene el líquido con una dosis de 0,5 mg de AR por kg de hembra gestante, disuelto en dimetilsulfoxido (DMSO) y 0,2 ml de aceite

vegetal en el día embrionario 7,5 (E7,5). Las doce horas del día de observación del tapón vaginal fueron consideradas como E0,5. Los fármacos se administran, a los dos grupos, por vía subcutánea en la parte superior-baja de la nuca con una dosis de 1 mg/kg para Idazoxan (un antidepresivo, antagonista de receptores alfa2) y de 10 mg/kg para Metilfenidato (un psicoestimulante) suministrado con aguja G29 y jeringa de 0,5 ml, (esterilizadas con óxido de etileno según EN 550, ISO 11135 y validado mediante indicador biológico “Esporas de Bacillus Subtilis ATCC 9372”).

El tamaño de las camadas obtenidas, tomada como un índice de supervivencia postnatal, fue similar para ambos grupos AR y controles. Los animales fueron de apariencia normal, sin mortalidad observada ya fuera al nacer o durante el momento de la experimentación.

Cada grupo de ratones se somete sólo a una línea de investigación e igualmente a una única categoría experimental: Idaxozan o Metilfenidato.





Grupo	Embrión día 7, 5	Postnatal día P1-P20
control		
AR		
fármaco		
AR+fármaco		

Figura 2.2. Descripción del tratamiento farmacológico en los grupos experimentales.

El resultado final es cuatro grupos por serie experimental (Idazoxan o Metilfenidato): Control, AR, fármaco (ida o mf) y AR+fármaco.

2.4. Procedimiento Experimental

Para poder estudiar el efecto de los fármacos en los ratones experimentales, se diseña una serie de experimentos que consiste en someter a los animales a una batería de pruebas a partir de P90 (edad de tres meses) durante alrededor de 90 días, para verificar el efecto de los fármacos utilizados y los posibles cambios en conducta, comportamiento, anatomía y estructura.

Para la experimentación, 15 días antes de comenzar la batería de pruebas se separan en jaulas individuales (20 x 12 x 10 cm) hasta concluir el experimento. En las secciones experimentales se someten a las pruebas pertinentes según el protocolo a seguir, pesándolos y manteniéndolos en las condiciones adecuadas. Tras finalizar el procedimiento de pruebas se devuelven a su ambiente. Previamente durante 5 días, los animales adultos se exponen a una fase inicial de aclimatación en los que se manipulan durante 10 minutos diarios para evitar situaciones de estrés, una vez comenzadas las pruebas. La mayoría de los experimentos se realizan durante el ciclo de luz, entre las 8:00 y las 15:00 horas.

Se ha hecho un esfuerzo por mantener estables, en la medida de lo exigible por el experimento, las condiciones ambientales y habituándolos al manejo por parte del experimentador. Para ello, toda manipulación en las jaulas (comida, limpieza, cambios, etc.) fue realizada por éste. De igual forma entre cada una de las distintas pruebas experimentales se mantienen los ratones al menos con dos días de descanso. Ya que está bien establecido que el manejo anterior de los animales experimentales tiene efectos ansiolíticos en las pruebas de varias situaciones (Brittony B. 1981; Ferrer y cols 1995; Hogg 1996).

A continuación se detalla cada una de las pruebas a las que son sometidos los ratones experimentales. Todas ellas se llevan a cabo en laboratorio cerrado reduciendo así el nivel de estrés, evitando la interferencia de cualquier estímulo

externo a la base misma del experimento y separado de la zona de estabulación (figura 2.3.).

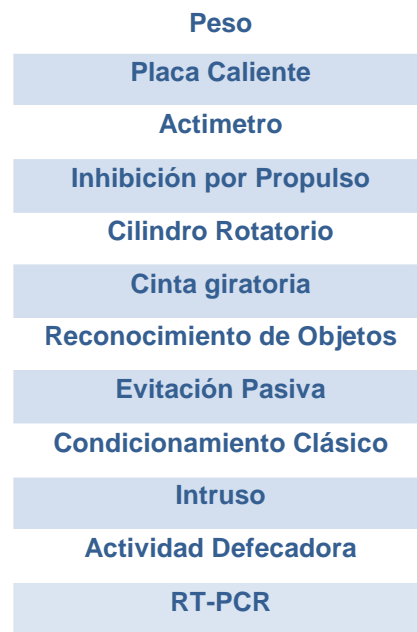


Figura 2.3. Batería de las distintas pruebas o medidas realizadas

2.4.1. Caracterización del Fenotipo-Genotipo Motor Socio-Conductual en Ratones Adultos

Todos los grupos de ratones se someten a una batería de pruebas destinadas a medir sus habilidades motoras y comportamentales, alguna de las cuales ya se habían usado por nuestro grupo de investigación con anterioridad (Porras y cols., 2005). El marcador de desarrollo se contempla con la medida de **peso y tamaño**. La analgesia se estudia mediante la técnica de la **Placa Caliente**, las capacidades motoras se evalúan mediante las pruebas de **Actímetro**, **Inhibición por Pre-pulso**, **Cilindro Rotatorio** (Rota-Rod) y **Cinta Giratoria**. Las capacidades memorísticas, competencia comportamentales y el aprendizaje se evalúan por la técnica de **Reconocimiento de Objetos**, **Evitación Pasiva** y **Condicionamiento Clásico del Reflejo Palpebral**, la actitud y aptitudes de comportamiento social, nivel de estrés y agresividad por la prueba de **Intruso** y la **actividad defecadora**. Como estudio de expresión génica se realiza la prueba de **RT-PCR**.

2.4.1.1. Marcaje de los Ratones

Los ratones son distinguidos con muescas en los lóbulos de las orejas, según nomenclatura estándar. En ocasiones, para facilitar el reconocimiento de los animales durante su manipulación, se hicieron marcas de rotulador en las colas.

2.5. Estudio Comportamental en Adultos

Los animales, mayores de tres meses de edad, son expuestos a doce pruebas experimentales. Durante las pruebas, antes de comenzar cada una, se hizo un seguimiento del peso de cada animal (considerado como prueba base) así como un control diario del estado de los animales para evaluar la aparición de algún tipo de estado anormal o inadecuado para realizarlas. Las pruebas se detallan a continuación:

2.5.1. Marcador de Desarrollo

2.5.1.1. Evolución del Peso y Tamaño

Se realiza un seguimiento diario de cada animal inmediatamente, antes de cada prueba, en una balanza de precisión digital con dos decimales de gramos (modelo *PCE-BSH 10000*) anotando los valores obtenidos. Mediante este seguimiento se evalúa si los ratones tienen algún tipo de deficiencias discriminatorias en cuanto a su estado y evolución que se valora cada 15 días a partir del día 90 hasta el final del experimento.

La medida de los ratones se realiza utilizando una regla común plana de 25 cm, milimetrada, con tope y varilla regulable.

2.5.2. Prueba de Analgesia

2.5.2.1. Prueba Nociceptiva – Test de la Placa Caliente

El método de la placa caliente se realiza básicamente como lo habían descrito Eddy y Leimbach (Eddy y Leimbach 1953). Se usa para el estudio de la analgesia espontánea, con objeto de evaluar la percepción del dolor por el ratón en una prueba única. Los animales se colocan sobre una plancha provista de una placa caliente (Accublock, Digital dry bath; labnet), que se mantiene a una temperatura constante de 52.2 °C, según describe Nieto y cols (2005). Sobre el aparato se coloca una jaula de plexiglás transparente para evitar que los ratones salgan de los límites de la placa caliente (figura 2.4.). Se miden dos latencias de respuestas en cada sujeto experimental. Como medida del umbral doloroso se mide la sensibilidad del animal controlando el tiempo que tarda el ratón en lamersse las patas por primera vez con un tiempo máximo de 15 segundos (T1), anotando este valor a aquellos animales que tardaron un tiempo mayor o no mostraron la respuesta. Como respuesta comportamental al dolor se contabiliza la latencia de respuesta correspondiente al tercer intento de fuga o salto (T2), con una latencia máxima (corte) de 240 segundos, anotando este valor, como en el caso anterior, a aquellos animales que tardaron más en escapar o no lo intentaron.

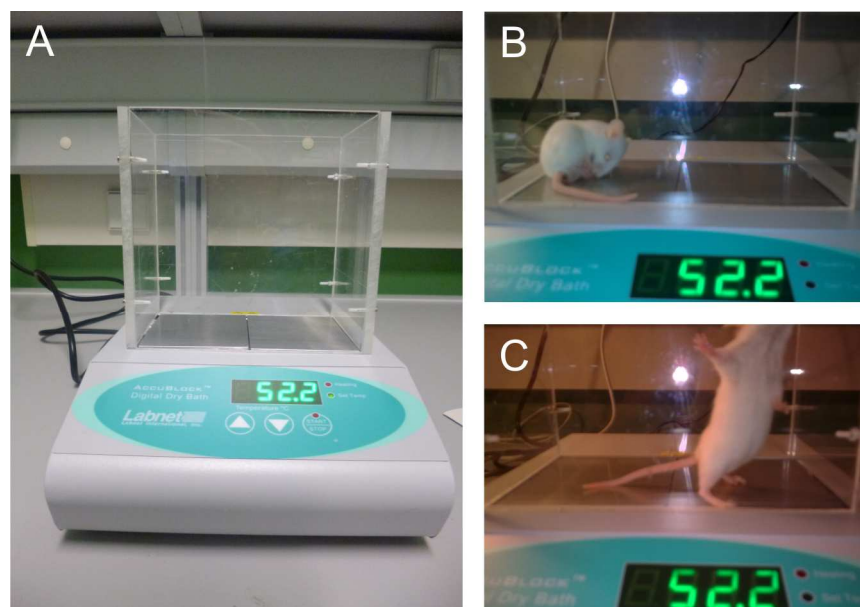


Figura 2.4. Placa caliente utilizada en el experimento. **(A)** Se puede observar las paredes de metacrilato que impedian que el animal saliese de la zona caliente. Los bloques de la plancha se calentaron hasta alcanzar una temperatura de 52,2 °C. **(B)** Representación de un animal lamándose las patas por primera vez (umbral doloroso, T1). **(C)** Imagen de un ratón alzándose y apoyando sus patas delanteras sobre la pared de metacrilato. Al repetir este comportamiento tres veces, se consideró una conducta de escape (T2), retirándolo de la placa y completando así la prueba. Nótese como la placa caliente permaneció a una temperatura constante de 52,2 °C.

2.5.3. Pruebas Conductuales y de Capacidades Motoras

Con el fin de evaluar las habilidades motoras de los distintos grupos de ratones se realizaron una serie de pruebas.

2.5.3.1. Prueba de Actividad Motora – Actímetro

La prueba del actímetro (figura 2.5.) supone una medida de la capacidad exploratoria o de la actividad motora general e inespecífica. El actímetro (*Cibertec, S.A.*) es un aparato que consta de una jaula de metacrilato (35 x 35 x 25 cm) rodeado de un bastidor con 16 haces (en cada eje X e Y) de rayos infrarrojos que al cortarse por el movimiento-presencia del ratón nos da información sobre su actividad y localización bidimensional. Esta información es cuantificada por un programa informático específico (*MUX_XYZ16L*, de *Cibertec S.A.*), que muestra la actividad por minuto (número de haces cortados por minuto), para cada uno de los sujetos experimentales.

La duración de la prueba es de 10 minutos. De esta manera se estudia si existen anomalías en el sistema motor y se puede concluir si los animales son hiper- o hipoactivos.

En ésta prueba se cuantifica la actividad acumulada cada dos minutos, así como a los 5 minutos, y se calcula el porcentaje del tiempo que pasan los ratones en la periferia de la jaula. Este tiempo se obtiene al restar del tiempo que permanecen en la totalidad del área, el tiempo que se sitúan en la parte céntrica. Es una medida de la ansiedad de sujeto experimental. Al final de la prueba se contabiliza la actividad defecadora (número de heces).

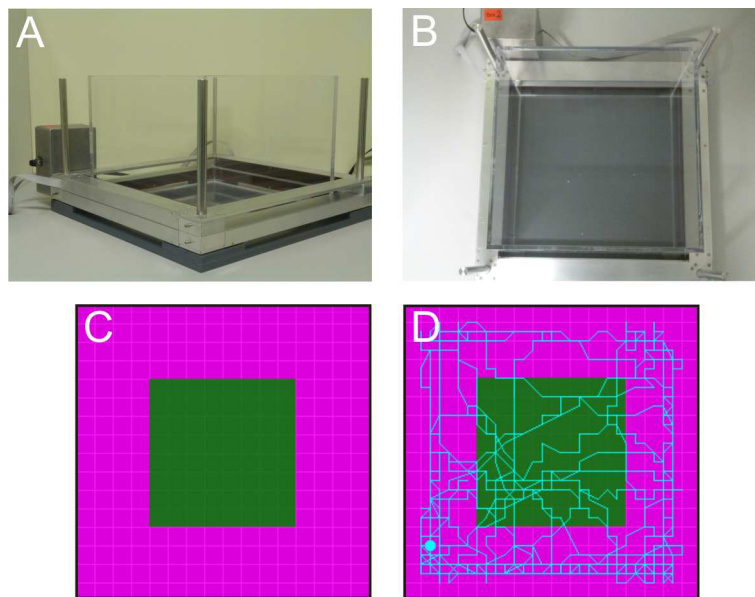


Figura 2.5. Actímetro. (A) y (B) Imágenes con distintas perspectivas del aparato del actímetro. (C) Imagen obtenida del programa MUX_XYZ16L (Cibertec, S.A.). El color rosa muestra la periferia del actímetro frente al centro de éste representado en color verde. (D) Imagen similar a la anterior, en la que además del centro y la periferia, se muestra en azul el recorrido efectuado por el animal durante 5 minutos de realización de la prueba.

2.5.3.2. Respuesta de Sobresalto e Inhibición por Pre-pulso

Hasta hace poco tiempo se consideraba el reflejo de escape como el hecho que nos vinculaba a supervivencia, correr cuando nos persiguen, gritar cuando nos asustan, etc. Actualmente el estudio va encaminado hacia las latencias entre estímulos como base de la modulación del reflejo de sobresalto.

El reflejo de sobresalto (startle reflex) consiste en una respuesta sensorio-motora que se caracteriza por la contracción de los músculos de los ojos (parpadear), el cuello y las extremidades ante un estímulo acústico fuerte e imprevisto. Se considera una respuesta de protección rápida, con una latencia baja.

La respuesta de sobresalto se mide usando un acelerómetro piezoeléctrico unido, a través de una tarjeta, a un ordenador compatible que recibe la información. Una sesión normal de grabación es organizada en una habitación aislada de la siguiente manera: antes de empezar la sesión se coloca el ratón en la habitación indicada por un período de aclimatación de 5 minutos en un

armario en la oscuridad. Seguidamente el ratón se introduce en una caja de Faraday insonorizada (Cibertec, S.A.), (en el interior de un pequeño armario aislante), que al cerrar la puerta hace que el animal permanezca totalmente aislado del exterior. Dentro de la caja existe un sensor de presión, en un habitáculo de plexiglás transparente (Figura 2.6.) en forma de túnel con dos pequeñas puertas en sus extremos para impedir la salida del ratón durante la prueba. En su interior se encuentra una plataforma, con un sensor de presión que detecta cualquier vibración, encima de la cual se coloca el animal. Cuando el ratón salta sobre la plataforma ésta detecta la fuerza ejercida sobre la misma. La caja atenuadora posee una luz que se mantiene encendida y dos altavoces situados en la parte superior, uno a cada lado de la caja, que proporcionan los estímulos acústicos. La prueba se realiza de forma individual y dura aproximadamente 45 minutos.

Las respuestas de la línea basal se calcularon a partir de la presentación de 30 estímulos sonoros (125 dB durante 100 ms) aplicados cada 30 segundos. Para la medida de *Inhibición por prepulso*, los mismos estímulos de 125 dB y 100 ms de duración, fueron precedidos en 250 ms por un pulso de 85 dB y 50 ms de duración. Estos pares de estímulos se presentaron aleatoriamente mezclados con estímulos de sobresalto normales, en una razón final de 25:25.



Figura 2.6. Inhibición por Prepulso. Medida del reflejo de sobresalto acústico en la cámara cerrada. **(A)** Representación general del aparato de la inhibición por prepulso. Nótese como la cámara esta colocada dentro de un armario, aislándolo así del ruido exterior. **(B)** y **(C)** Imágenes de la cámara con detalles de la cabina donde se aloja el ratón y el sensor. **(D)** Descripción de los pasos seguidos para la realización de la prueba. Cada sesión duró un total de 45 min., de los cuales los 3 primeros fueron de adaptación a la cámara. A continuación, se administraron 30 pulsos (125 dB, 100 ms), para calcular la línea base. 30 s después, el animal recibió 50 ensayos aleatorios, de los cuales 25 fueron pulsos aislados (125 dB, 100 ms) y otros 25 fueron pares de pulsos, esto es, con el pulso ya indicado (125 dB, 100 ms) precedido de otro de menor intensidad y duración (85 dB, 50 ms) para calcular la inhibición por prepulso. Todos los estímulos se separaron con un intervalo de aproximadamente 30 s. La sesión finalizó con 2 min. de reposo.

De este modo, los 30 primeros pulsos administrados al comienzo de la prueba establecen la *Línea Base* de cada animal y los parámetros que arroja el software nos dan una idea de si la respuesta de sobresalto es distinta entre los grupos experimentales. Estos parámetros son: la latencia de respuesta (VMLR), la latencia al pico máximo (VMLP), el valor del pico máximo (VMP) y el área total de respuesta (VMA). Para evaluar la magnitud de la respuesta de sobresalto de cada uno de los grupos experimentales en el momento inicial, se

midió el valor al pico máximo (VMP) y el área total de respuesta (VMA) en la línea base. A partir de los 50 pulsos siguientes, en esta prueba se grabaron y se cuantificaron cuatro índices distintos de inhibición por prepulso, relacionados con los mismos parámetros: latencia de respuesta (VMLR), la latencia al pico máximo (VMLP), el valor del pico máximo (VMP) y el área total de respuesta (VMA). Estos índices, destinados a cuantificar cuánto se modifica la respuesta de sobresalto cuando viene precedida del prepulso, se obtuvieron según la siguiente fórmula matemática (López-Ramos y cols., 2010):

$$IPP = \frac{\text{Startle/Prepulso}}{\text{Línea base}} \times 100, \text{ donde } \textit{Startle} \text{ es la media de los valores obtenidos}$$

durante los 25 pulsos de 125 dB y 100 ms de duración, administrados aleatoriamente durante 25 minutos, para cada uno de los animales de los distintos grupos experimentales. *Prepulso* es el valor correspondiente a la media de los datos obtenidos durante los 25 pulsos del ensayo de inhibición por prepulso (25 estímulos con pulsos de 125 dB y 100 ms de duración, precedidas en 250 ms por un pulso de 85 dB y 50 ms de duración). Y *Línea base*, corresponde a los valores obtenidos durante los 30 primeros pulsos administrados al comienzo de la prueba, (figura 2.7.).

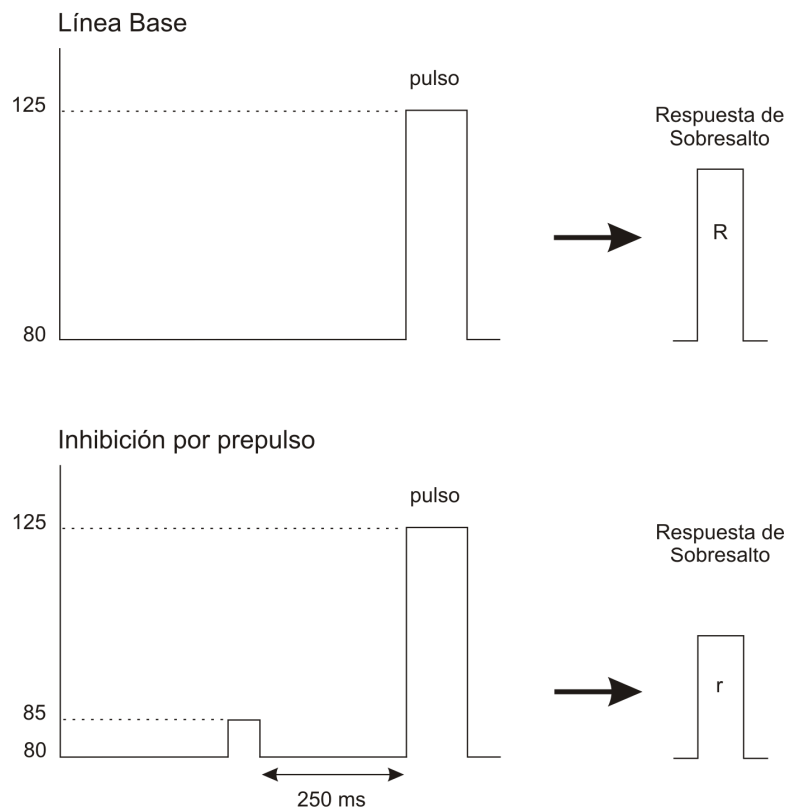


Figura 2.7. Análisis de la inhibición por prepulso. Ilustración de la respuesta de sobresalto (R) producida por un pulso de 125 dB, 100 ms, y de la inhibición que se genera en esta respuesta tras administrar previamente otro pulso de menor tamaño (85 dB, 50 ms), originando una respuesta de menor tamaño (r).

2.5.4. Pruebas de Aprendizaje Motor y Equilibrio

2.5.4.1. Cilindro Rotatorio

Este aparato es adecuado para probar la función motora en roedores. Alteraciones en el sistema nervioso central pueden ser demostradas midiendo el tiempo durante el cual el animal permanece en el cilindro de rotación. El rotarod (*Ugo Basile, Modelo 7650*) es un dispositivo que consta de un sistema de ejes (2 poleas) que mueven una correa transmitiendo la velocidad elegida a un rodillo con cinco calles sobre las que se depositan los ratones. Consiste en un cilindro de rotación con estancias individuales, con separadores superiores desmontables que evitan la interferencia entre los animales que corren en vías adyacentes. El cilindro mide 20 cm de longitud y 17 cm de diámetro. Está totalmente controlado por un microprocesador que permite un control más

preciso del tiempo y de la velocidad de rotación-giro. Los contadores de tiempo son individuales (uno para cada ratón) y funcionan desde el principio de la prueba hasta que el animal se cae del tambor al carril. El tiempo se mide en segundos.

La prueba consiste en el giro del tambor. El animal (uno por calle) se coloca sobre él en sentido contrario a la dirección del movimiento del cilindro (los ratones tendrán que aprender a caminar a la velocidad adecuada en sentido opuesto al avance del rodillo). Si la placa inferior bajo cada calle está levantada, el tiempo corre. En el momento que el animal se cae, la placa queda en posición horizontal y el tiempo se para. Se anota el tiempo y si no supera los 300 segundos, en nuestro experimento, se vuelve a colocar al ratón en el mismo lugar y posición y sigue contando el tiempo para sucesivas caídas.

Ya que la velocidad y aceleración están controladas eléctricamente, puede optarse por una rotación a velocidad constante entre 4 y 40 rpm o bien por una proporción de aceleración desde 4 a 40 rpm. La velocidad es de tipo constante (5 rpm) para el primer minuto. Durante los cuatro minutos siguientes la aceleración va desde 5 rpm hasta 30 rpm en todos los ensayos.

Las medidas realizadas en nuestro experimento se toman diferenciando el primer minuto y los cuatro minutos restantes. Estas medidas son: a) la latencia de la primera caída, b) el número de caídas, c) la latencia de cada caída hasta un total de cinco, d) el número de vueltas sobre el eje (respuestas pasivas), e) el número de cambios de posición del ratón sobre el sentido de giro en 180° (giros), f) el porcentaje de éxito (no caerse), y finalmente g) el número de heces.

En nuestro experimento se acuerda realizar tres ensayos al día, con una duración de 5 minutos cada uno durante tres días. Entre cada ensayo los ratones descansaban 15 minutos en sus jaulas (por tanto hacen tres ensayos al día de 5 minutos, por tres días, un total de 9 ensayos de 5 minutos). Los datos fueron recogidos y guardados para su posterior análisis estadístico.

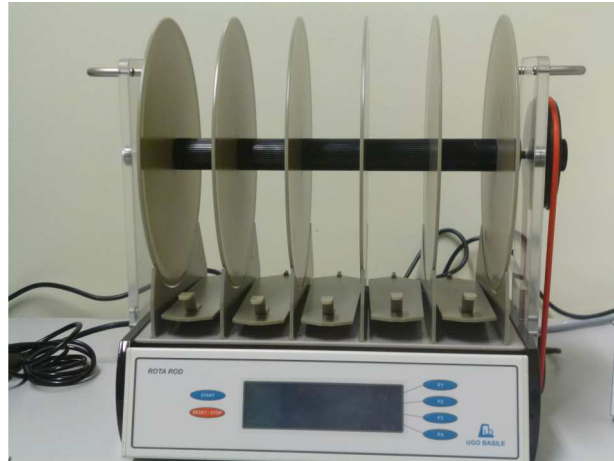


Figura 2.8. Cilindro Rotatorio. Fotografía del Rotarod utilizado. Este modelo consta de 5 compartimentos donde 5 animales pueden hacer la prueba a la vez.

2.5.4.2. Cinta Giratoria – Sinfín

Este tipo de cinta permite estudiar las capacidades motoras: marcha, coordinación, resistencia, esfuerzo, velocidad, respuesta al agotamiento y demora de recuperación.

El aparato marca *Columbus Instruments Treadmill Simplex II* consta de una cinta móvil giratoria sobre dos ejes extremos, con 6 calles individuales, de 60 cm de largo por 10 cm de ancho cada una. Posee un cerramiento superior de material transparente encima de las calles y una rejilla de descarga eléctrica en el extremo del comienzo de carrera que puede ser activado para administrar shocks eléctricos en las patas y cola e impedir que los animales se detengan en esta zona a descansar. La velocidad de la plataforma-cinta puede ser controlada desde 1 metro/minuto hasta 40 metros/minuto. El grado de inclinación es variable, de 0 a 30° (*Panlab S.A.*) y la intensidad de la descarga de choque hasta un máximo de 10 mA.

En el inicio del experimento (que dura 12 días), modificado de Marques y cols. (2010), el animal se coloca en el extremo de la cinta orientado en dirección contraria al sentido del movimiento. En este trabajo se registra: a) el número total de descargas recibidas (número de shocks) y b) el tiempo de permanencia en segundos en la cinta.

El procedimiento elegido es el siguiente: en los siete días previos al comienzo de la prueba se hace una aclimatación sin inclinación, los tres primeros con una velocidad de 5 m/min. Se comienza el primer día con 5 minutos, el segundo día con 7 minutos, el tercero con 10 minutos, el cuarto día con 7 minutos hasta alcanzar un máximo de 10 m/min., el quinto día con 10 minutos hasta un máximo de 15 m/min., el sexto día 10 minutos hasta un máximo 20 m/min., siempre con un pre-calentamiento de 5 minutos a 5m/min. y subida progresiva (5m/min cada 2 minutos), de igual manera al final de cada día se estabilizan progresivamente. Tras estos siete días se realiza un test de resistencia máxima (un solo día) para conocer la resistencia aeróbica que tiene cada animal (octavo día), y se asigna a cada grupo un trabajo del 80%, de la velocidad máxima obtenida. Este test consiste en la entrada en calor durante 5 minutos a 5 m/min. Se incrementa la velocidad en 5m/min cada 5 minutos hasta que los ratones ya no puedan correr más (con un tiempo máximo de 30 minutos) y se queden sobre la rejilla de descarga eléctrica (shock) durante 3 segundos. Se elige una descarga de 1 mA incrementándola según resistencia del ratón. Todo esto se lleva a cabo sin grados de inclinación.

Proponemos una velocidad media para trabajo de todos los grupos de 25 m/min. A las 24 horas (noveno día) se vuelven a poner los grupos en la cinta durante 15 minutos subiendo la velocidad cada 5 minutos en 5m/min. Hasta un máximo de 15 m/min., con una inclinación de 5 grados. Al día siguiente (décimo día) se hace el test. La prueba empieza a 5m/min. aumentando 5m/min. cada 2 minutos hasta llegar a 25m/min. con una inclinación de 5 grados. El tiempo de corte (tiempo máximo de permanencia en la cinta) es de 30 minutos. A continuación se analizan los resultados.

Al término de esta prueba, durante 2 días, se tienen a los ratones 15 minutos diarios (5 minutos a 5m/min., 5 minutos a 10 m/min. y 5 minutos a 5m/min.) sin inclinación, con el fin de estabilizar su actividad-metabolismo.

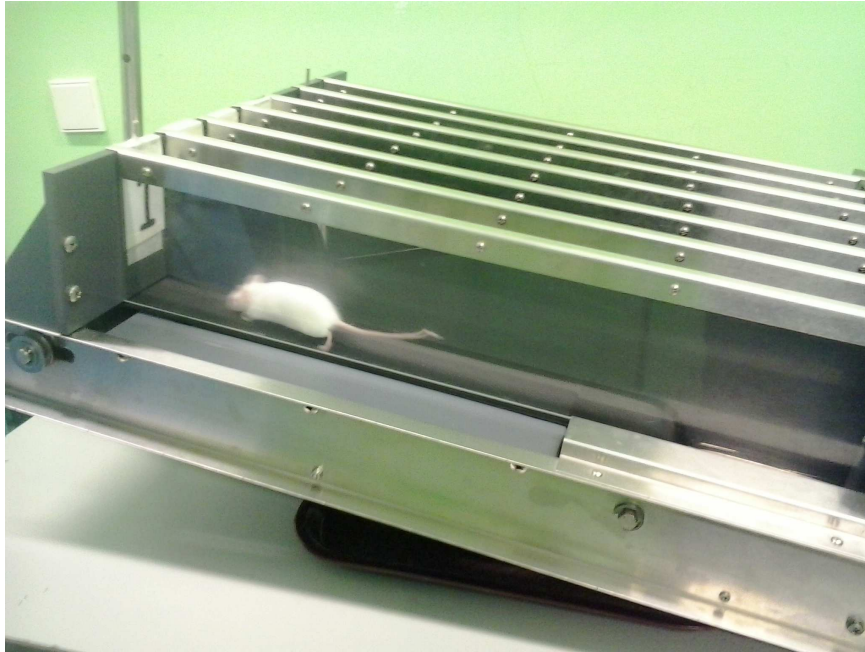


Figura 2.9. Cinta giratoria - sinfin. Fotografía del aparato utilizado. Este modelo consta de 6 calles donde 6 animales pueden hacer la prueba a la vez.

2.5.5. Pruebas memorísticas y de aprendizaje

2.5.5.1. Reconocimiento de Objetos

Para esta prueba se utiliza una jaula de metacrilato con objeto de que entre serie y serie se puedan limpiar con etanol al 70%, al igual que los objetos. Con esto se evitan olores y restos de la sesión anterior. Cada ratón utiliza, en los distintos tiempos y fases, siempre la misma caja. También se utilizan cuatro objetos del mismo material y distintas formas geométricas y tamaño. El primer objeto (objeto número 1) con forma de cilindro (de 5 x 6 cm), el objeto número 2 de igual forma, tamaño y materia que el primero, el objeto número 3 en forma de cubo (de 6 x 3 x 3 cm) y finalmente el objeto número 4, un cilindro más pequeño (4 x 2 cm).

La prueba consiste en cuatro fases de 5 minutos cada una, las dos primeras seguidas, sumando un total de 10 minutos:

- 1º. Habitación-Adaptación
- 2º. Entrenamiento
- 3º. Memoria a corto plazo (a la hora), y
- 4º. Memoria a largo plazo (a las veinticuatro horas)

Se introducen los ratones de manera individual en una jaula de policarbonato-metacrilato transparente que hace de campo abierto (45 x 25 x 20 cm). Los ratones, se aclimatan en la cámara de experimentación (jaula), fase de **Habitación** durante un tiempo de 5 minutos, tiempo en que se evalúa su capacidad exploradora y actividad general y adaptación a la misma. Transcurrido ese tiempo de aclimatación se colocan los objetos (nº 1 y nº 2), es la fase de **entrenamiento**. El objeto novedoso siempre se presenta en el lado derecho de la cámara. En pruebas previas se había observado que no existe predisposición alguna por ninguno de ellos y se normalizan los objetos. Una hora más tarde, para medir la **memoria a corto plazo**, se coloca de nuevo al animal en la misma cámara, con el objeto conocido (nº 1) y uno novedoso (nº 3) durante otros 5 minutos. Pasadas 24 horas, para evaluar la **memoria a largo plazo** se repite la prueba, sustituyendo esta vez el objeto nº 3 por el nº 4, de nuevo durante 5 minutos.

Para el análisis de los datos, tal como se describe en Ennaceur y Delacour (1988), se contabilizan en cada prueba el número de contactos o aproximaciones (hocico a menos de 1 cm del objeto) que cada sujeto realiza a cada objeto (objeto número 1, número 2, número 3 y número 4). En todas las sesiones se contabiliza el número de heces.

A partir de estos datos se calcula el índice de discriminación del objeto novedoso números 2, 3 ó 4 con respecto al número 1 (objeto conocido), mediante la siguiente fórmula: $T2/(T2+T1)$ (Dornelles y cols., 2007) donde T1 es el número de acercamientos al objeto conocido (nº1) y T2 el número de acercamientos al objeto novedoso (nº 2, nº 3 y nº 4, según la sesión). Un índice de 0.5 indica no predilección por ningún objeto, mientras que un incremento en

el índice en las pruebas realizadas pasadas 1 y 24 horas, favorable a los objetos novedosos, indica novedad y mayor exploración hacia los mismos.

La prueba completa fue grabada por una videocámara comercial Sony (DCR-HC62), para su posterior medición y observación.

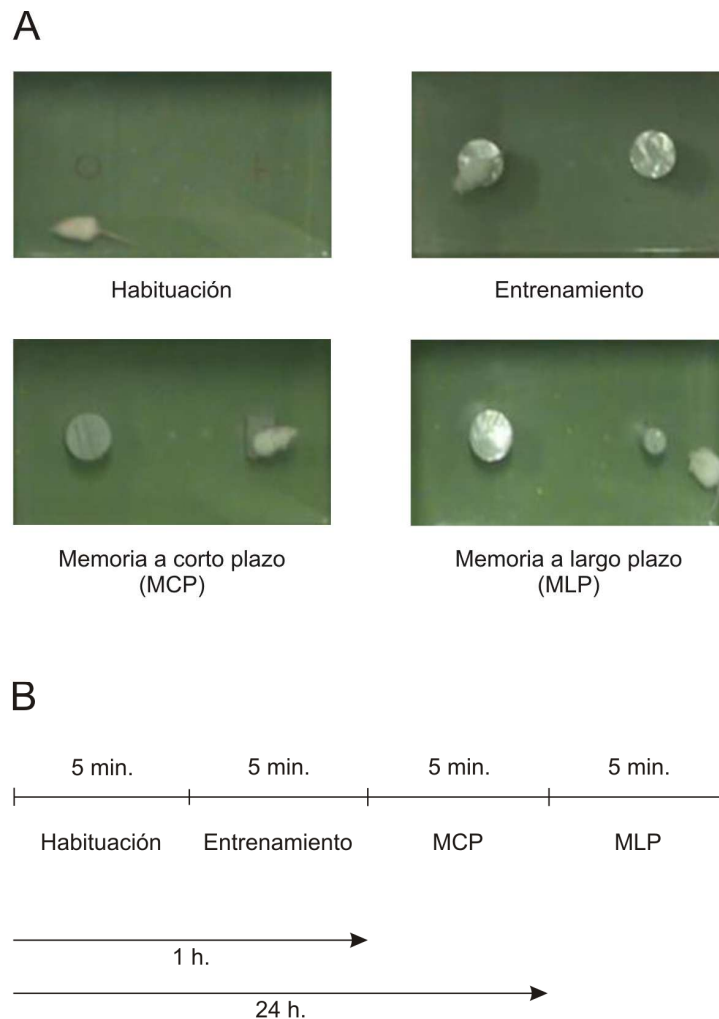


Figura 2.10. Reconocimiento de objetos. (A) Vista aérea de la prueba. (B) Representación de las 4 sesiones de la prueba de *Reconocimiento de objetos*. Nótese como uno de los objetos presentado en la fase de entrenamiento, se identificó como conocido, siendo éste siempre el que permaneció en las distintas sesiones que se dieron a continuación. (C) Esquema temporal de la sucesión de las distintas fases experimentales. La primera sesión fue la de habituación, en la que se puso el animal en la jaula en ausencia de objetos. A continuación se colocó dos objetos iguales, fue la fase de entrenamiento. Pasada una hora se analizó la memoria a corto plazo. En esta sesión, se dejó el objeto conocido y se cambió uno de ellos por un objeto nuevo. Al día siguiente, a las 24 horas, se evaluó la memoria a largo plazo. Para ello, se volvió a cambiar el objeto novedoso por otro nuevo completamente, dejando en la caja también el objeto conocido. Todas las sesiones experimentales tuvieron una duración de 5 minutos.

2.5.5.2. Evitación Pasiva

Los modelos de evitación requieren que los sujetos se comporten de una manera contraria a su inclinación normal o predilección. En la mayoría de los casos, los sujetos dejan de actuar según su comportamiento si así evitan las consecuencias de un refuerzo negativo, al que son sometidos si llevan a cabo ese tipo de conductas.

La desventaja de este aparato es que registra una gran variabilidad en el comportamiento de unos ratones a otros, por lo que el tamaño de la muestra debe ser alto. Además, cada sujeto sólo puede ser usado una vez y no tiene valor como su propio control. De todas formas es un método ampliamente utilizado.

El equipo está compuesto por una caja de evitación inhibitoria marca (*Passive avoidance apparatus, Ugo Basile, Comerio-Varese, Italia*). Posee dos cámaras de 15 x 9,5 x 16,5 cm, una blanca y otra negra (oscura), comunicadas entre sí por una puerta retráctil, de 4 x 4 cm, que se cierra mediante un sistema automático. En la base de las dos cámaras, hay una rejilla que en el lado de la cámara negra está preparada para dar una descarga eléctrica cuando detecta el peso del animal. El compartimento de color blanco está iluminado de forma constante con 290 luxes proporcionados por una bombilla de 24v-10w situada en el techo de la caja. Es el lado seguro pero desagradable para los ratones, por presentar ftofobia. En este compartimento se sitúa al animal al inicio de la prueba. El otro compartimento, en el que el animal recibe el choque eléctrico, es negro y permanece a oscuras.

El techo de la caja es común para los dos compartimentos. La parte de este techo que está sobre el compartimento blanco es transparente, lo que permite observar al animal, mientras que la que está sobre el compartimento negro es negra y opaca. El suelo de la caja es de barras de acero inoxidable de 0,7 mm de diámetro separadas entre sí por 0,8 cm. Funciona como un balancín, teniendo el punto de apoyo en la zona de separación entre ambos compartimentos. Cuando el animal cruza del compartimento blanco al negro, se

cierra la puerta y recibe una descarga eléctrica en sus patas y cola. Bajo las rejillas del suelo hay una bandeja extraíble que permite la limpieza y control de residuos tras el paso de cada ratón.

Esta caja se encuentra unida a una unidad de control que permite regular los parámetros de la prueba (duración máxima del ensayo, intensidad del choque eléctrico, duración del mismo), que incluye un contador donde se refleja el tiempo de latencia de cruce de compartimento para cada ratón y un pedal como interruptor para el comienzo de las medidas. Además los ratones como periodo y zona de adaptabilidad, permanecían a oscuras en una cámara y sin estímulos exteriores durante 15 minutos antes del experimento.

La principal variable a medir en este tipo de experimentos es la latencia; es decir, el tiempo que transcurre desde que se coloca el animal en la cámara blanca hasta que éste entra en la cámara negra; momento en que la puerta se cierra y el animal recibe la descarga, o bien transcurren 180 segundos desde su inicio y la puerta igualmente se cierra aún sin entrar el ratón en el compartimento negro.

La tendencia del ratón es irse a la cámara negra porque prefiere la oscuridad, donde se siente más seguro. Sin embargo, deben memorizar, después de la primera vez, que el compartimento negro es peligroso (recibe un castigo). De manera que a medida que se avanza en las pruebas, los ratones deben aumentar la latencia a entrar en el mismo.

Antes de comenzar el ensayo se indica en la unidad de control conectada a las cámaras cuál va a ser la intensidad y duración de la descarga, latencia de retraso de la puerta y cuánto tiempo dura la prueba en caso de que el ratón no penetre en la cámara negra (tiempo de corte). En nuestro experimento los parámetros elegidos son: a) duración del choque (2 segundos), intensidad del choque (2.5 mA), c) tiempo de corte (3 minutos) y d) retraso de apertura de la puerta (1 segundo).

La prueba de evitación pasiva empleada consta de tres sesiones consecutivas repartidas en dos días. Después de aislar los ratones a una zona oscura durante 15 minutos, se realiza la sesión de entrenamiento y la aplicación de los test.

Día 1

Sesión de Entrenamiento. El ratón se introduce en la cámara blanca, se enciende la luz de la caja y se activa el sistema (apertura de la puerta y encendido del crono). Se observa el comportamiento del animal en la cámara blanca hasta que pasa a la cámara negra. Una luz roja indica el momento en el que el ratón recibe el choque eléctrico (de 2.5 mA durante 2 segundos). Se deja al animal unos 5 segundos en la cámara negra, se anota la latencia y se retira al animal a su jaula de anterioridad.

Test Memoria a Corto Plazo (1 hora). Tras un nuevo aislamiento del animal en oscuridad durante 15 minutos, se repiten todos los pasos anteriores con excepción del choque eléctrico (el animal ya no recibe ningún choque eléctrico al pasar a la cámara). El tiempo de corte es de 3 minutos. En este caso la finalidad principal es observar si el animal aún recuerda el castigo aprendido y evita entrar.

Día 2

Test Memoria a Largo Plazo (24 horas). El procedimiento es el mismo que el día anterior de memoria a corto plazo (1h), de nuevo no recibe ningún choque eléctrico al pasar a la cámara negra. El tiempo de corte es de 3 minutos. Igualmente en este test se observa si el animal recuerda el choque eléctrico.

Como se ha comentado anteriormente, mientras el ratón está en la cámara blanca se observa su comportamiento, y para esto, se requiere hacer un seguimiento de determinados comportamientos que pudo presentar el animal durante los diferentes ensayos.

Entre los comportamientos observados en el compartimento blanco se encuentra la conducta de paralizarse. Ésta consiste en que el ratón se queda

paralizado y no realiza ningún movimiento durante varios segundos. Es un comportamiento poco común ya que se da en situaciones de mucho estrés para el animal. El comportamiento de levantarse, consiste en ponerse a dos patas; el ratón eleva sus patas delanteras y sólo se apoya en las traseras, las patas delanteras puede apoyarlas o no en la pared.

Otro comportamiento es el acicalamiento. El animal inicia un proceso de lavado y rascado, sobre todo limpiando su cara con sus patas delanteras. También se registra el número de veces que asoma la cabeza hacia el interior de la cámara negra sin entrar en el compartimento o los que no entran a la cámara negra, y el ratón llega a introducir las patas delanteras como máximo, pero finalmente se queda en la cámara blanca. Igualmente se mide el comportamiento de husmear, que es un comportamiento bastante común en los ratones para reconocer el ambiente donde se encuentran. En el caso de la evitación pasiva, se considera la conducta de husmear cuando el animal introduce el hocico en el hueco entre la pared de la cámara y la rejilla de la base.

Por último, se anota la latencia de entrada en la cámara negra, si la hubiera y se toma nota del número de defecaciones, índice del estado de estrés del animal.



Figura 2.11. Evitación pasiva. Imágenes del aparato de la evitación pasiva en dos perspectivas distintas. Se observa los dos compartimentos diferenciados, el iluminado en color blanco y el que permanece en la oscuridad, de color negro fotografía derecha. En la fotografía de la izquierda se muestra, a la derecha en negro, el pedal que marcaba el inicio de la prueba.

2.5.6. Condicionamiento Clásico del Reflejo Palpebral

Una de las tareas de aprendizaje asociativo o Pavloviano más utilizadas es el condicionamiento clásico palpebral. En esta prueba de tipo óculo-motora, se pretende que el animal de experimentación aprenda a asociar dos estímulos: estímulo condicionado (EC) y el estímulo incondicionado (EI). El EI es siempre más intenso que el EC y provoca una respuesta refleja de cierre del párpado que se denomina respuesta incondicionada (RI). El EC funciona como "aviso" ante la llegada del estímulo fuerte. Después de varias sesiones, el animal debe aprender a anticipar la respuesta del cierre del párpado a la llegada del EI. Esa será la respuesta condicionada.

Para llevar a cabo este experimento se precisa de una cirugía previa así como la elaboración de electrodos de registro y de estimulación.

2.5.6.1. Cirugía

Elaboración de electrodos de registro y de estimulación. Se cuantificará la actividad electromiográfica del músculo ipsilateral del párpado *orbicularis oculi*, mediante dos electrodos de registro. También son insertados dos electrodos de estimulación en la rama suparorbitaria del nervio trigémino izquierdo. Para ello son anestesiados, vía intraperitoneal (i.p.), con una mezcla de Ketamina, (10 mg/kg) y xylacina, (1 mg/kg), con una aplicación de 10 ml por 10 g de animal. Los electrodos periféricos utilizados, tanto los de registro como de estimulación, eran de alambre de acero inoxidable y recubiertos de teflón, de 50 μm de diámetro y 2,5 cm de longitud (*A-M Systems, Carlsborg, WA-98324, USA*). En los extremos de los electrodos se quita la cubierta de teflón en 0,5 mm, un lado para facilitar la soldadura y el paso de corriente y el extremo contrario se dobla en forma de punta de flecha (anzuelo) para permitir que la inserción tanto en el músculo del párpado superior como en el nervio sean estables. Los electrodos se sueldan por su extremo libre a un conector hembra de 4 vías (*RS-Amidata, Madrid, España*). Los puntos de soldadura son recubiertos por una capa de esmalte con el fin de aislarlos. Tras la inserción en músculo y nervio, el conector se fija al cráneo mediante dos pequeños tornillos

de acero inoxidable de 0,8 x3 mm (*Nuorishi optical S-11*) y cemento dental (Duralay®) (Domínguez del Toro y cols., 2004; Gruart y cols., 2006)).

2.5.6.2. Procedimiento Quirúrgico Común para Implantación de Electrodo Periférico

La preparación quirúrgica de los animales para el registro de la actividad eléctrica del músculo *orbicularis oculi* del párpado izquierdo se lleva a cabo en un solo tiempo operatorio, de aproximadamente una hora de duración. Cinco minutos antes de la operación, los animales son anestesiados, vía intraperitoneal, con una mezcla de Ketamina, (Ketolar®) y xylacina, (Rompún®). Durante toda la intervención quirúrgica, se procura mantener estable la temperatura del animal, con una manta de reacción térmica de 10 x 12,5 (*Heat wave 4 W pts1028*) así como mantener la asepsia de la zona de trabajo y el material quirúrgico. Debido a que la instrumentación es reutilizable, se higienizan antes de su uso con esterilizador de calor seco (ref-2432 *QuiruMED*), autoclave de vapor, (140° *Vacuklav 30-B, MELAG*), desinfectante veterinario F10SC, alcohol 70°, dependiendo del nivel crítico (UNE-EN 46003:2000): con el fin de proteger la córnea de la luz directa durante la operación, se le administra al animal unas gotas humectantes en los ojos (Methocel® 2 %).

Los pasos seguidos son los siguientes:

- Una vez logrado el nivel adecuado de anestesia, se afeita la parte superior de la cabeza del animal y se coloca en un aparato estereotáxico de ratón (Kopf®), con el fin de inmovilizarle la cabeza.
- Se realiza una incisión en la cabeza antero-posterior a lo largo de la línea media que comprende piel y tejido celular subcutáneo.
- Posteriormente, se limpia la zona craneal expuesta con gasas estériles y se les retira el periostio con bisturí y/o espátula. Se hizo hemostasia con cera quirúrgica (*Ethicon®*, *Jonson - Johnson. Intl*, Bélgica) en los puntos sangrantes.
- Para sujetar el conector al cráneo, se marcaron (pintado) los lugares de anclaje de dos tornillos (*Nuorishi optical S-11*).

- Con un taladro y sin llegar a la duramadre, se hace un agujero en el hemisferio derecho del hueso frontal y otro en el hemisferio izquierdo del hueso parietal.

- Se colocan los tornillos de anclaje y se aseguran al cráneo mediante cianocrilato (*FORCH*) y cemento dental (*Duralay*®).

- Partiendo del extremo rostral de la incisión, se abre un trayecto subcutáneo hasta el borde libre del párpado superior izquierdo para insertar los cuatro electrodos, soldados previamente a una torreta hembra de cuatro vías.

- Los dos electrodos de registro se implantaron en el músculo *orbicularis oculi* del párpado izquierdo y los dos electrodos de estimulación en la rama supraorbitaria del nervio trigémino del mismo párpado.

- El conector se colocó en la superficie del cráneo delimitada por los dos tornillos de anclaje y se fijó mediante cemento dental y cianocrilato.

- Los extremos rostral y caudal de la incisión se suturaron con hilo de seda 4/0 tratando de aproximar lo máximo posible los bordes libres de la herida al conector mediante puntos simples.

Una vez finalizada la cirugía, se lava la zona con un antiséptico (tintura de yodo) y se aplica una pomada cicatrizante con extracto de centella asiática (*Blastoestimulina*®) en los bordes de la herida alrededor del conector.

Los animales despiertan de la anestesia en un máximo de 2 horas de la operación y a las 24 horas muestran un comportamiento normal. Antes de comenzar el proceso experimental, se permite una recuperación postoperatoria de 3 días.

2.5.6.3. Respuesta Reflejas Parpebrales

Se pueden provocar las respuestas reflejas palpebrales aplicando un estímulo (sonoro, eléctrico, etc). Si se utiliza un estímulo eléctrico, como en nuestro caso, se han descrito dos componentes para esta respuesta (Kugelberg, 1952): R1 y R2.

El componente temprano, R1, recorre el trigémino y mediante una motoneurona facial vuelve al músculo *orbicularis oculis*. Suele aparecer a los 6-8 ms. R2 es el componente tardío. Se le denomina así porque al atravesar la Formación Reticular, no aparece hasta los 14-16 ms. (figura 2.12.).

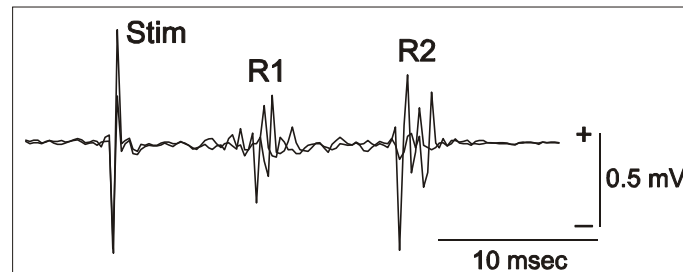


Figura 2.12. Representación de un registro electromiografico (EMG), donde aparecen los dos componentes de las respuestas reflejas palpebrales a un choque eléctrico.

2.5.6.4. Técnica de Registro

Para registrar la actividad electromiográfica del músculo *orbicularis oculi* se utilizan amplificadores diferenciales *GRASS P511*, con un ancho de banda de 1 Hz a 10 KHz (*Grass-Telefactor, West Warwick, RI 02893 USA.*). El animal se coloca en una pequeña caja de plástico (5 x 5 x 10 cm). Esta caja se coloca dentro de una caja de Faraday de mayor tamaño (30 x 30 x 20 cm).

Se somete a todos los grupos a dos sesiones de habituación, diez de condicionamiento y cuatro de extinción, durante 16 días consecutivos a la misma hora. En la habituación, sólo se le administra al ratón el primer estímulo (EC) hasta un total de 60, separados cada 30 ± 5 segundos, y con la intención de que el ratón se adapte a la nueva situación (lugar del experimento, EC, etc.) En las sesiones de condicionamiento se le administran 60 pares de estímulos (EC y EI) al animal de experimentación, con un intervalo de tiempo entre ellos de 30 ± 5 segundos. En las cuatro sesiones de extinción de nuevo sólo se presenta EC, y también se aplican 60 estímulos (EC) separados cada 30 ± 5 segundos. Con estas últimas sesiones se intenta que olvide la tarea anterior al prescindir del EI o, desde otro punto de vista, que aprenda otra tarea nueva, distinta a la anterior: la eliminación de la respuesta condicionada.

La estimulación eléctrica se administra con la ayuda de un estimulador CS-20, a través de dos unidades de aislamiento (Cibertec, S.A., Madrid, España). El paradigma utilizado es el de traza (choque eléctrico – choque eléctrico). En él, los dos estímulos, EC y EI, son de la misma modalidad sensorial. La pareja de estímulos se inicia con un choque eléctrico, aplicado en el párpado superior izquierdo, de muy corta duración ($50 \mu\text{s}$) y muy débil ($1 \times$ intensidad umbral). Como EI, se usa un choque eléctrico, aplicado también en el párpado izquierdo, de ($500 \mu\text{s}$) de duración y con la intensidad suficiente para provocar un parpadeo reflejo ($3 \times$ intensidad umbral). El EI comienza 250 ms después de que finalizara el EC, (figura 2.13.).

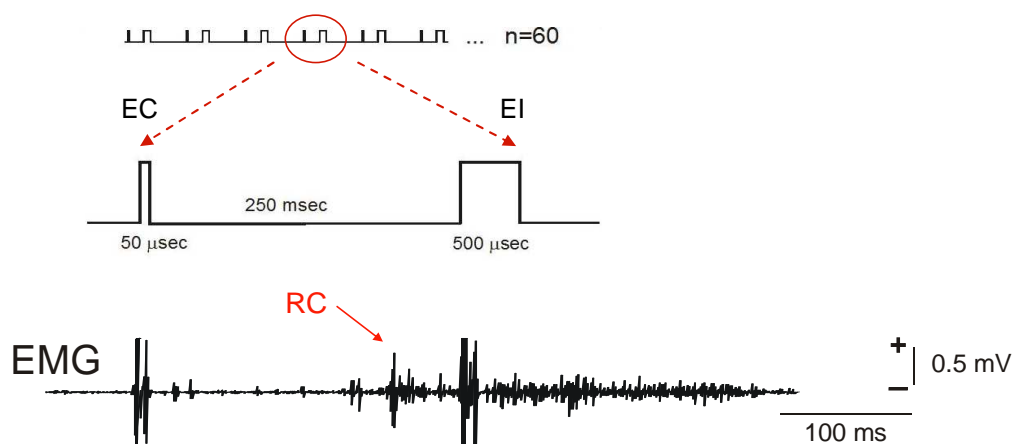


Figura 2.13. Paradigma de traza. Utilizado en el Condicionamiento Clásico del reflejo corneal.

Las respuestas reflejas se miden al principio del experimento en todos los ratones. Para ello, se aplican pulsos catódicos cuadrados aislados de $50 \mu\text{s}$ de duración y $2 \times$ Umbral mA de intensidad. Se administra un pulso cada 30 segundos antes de empezar con las sesiones de habituación. De esta manera se comprueba la funcionalidad de los circuitos neuronales involucrados en la formación de las respuestas motoras palpebrales.

Se considera "respuesta condicionada", la respuesta electromiográfica que aparece en el período inter-estímulo, pero siempre 50 ms después del EC, para evitar confusiones con las respuestas reflejas a dicho estímulo. Para

considerar esta respuesta como aprendida, además debe tener una duración mayor de 10 ms y el área de esta respuesta debe ser, al menos, 2,5 veces mayor que la actividad media grabada antes de la presentación del EC.

Los datos obtenidos se almacenan directamente en un ordenador con un convertidor analógico-digital (*CED 1401 Plus, Cambridge, Inglaterra*) con una frecuencia de muestreo de 4 KHz y una amplitud de resolución de 12 bits. Se modifica un programa comercial de ordenador (*SIGAVG, Signal Averager* de CED) para representar, rectificar y promediar los registros EMG obtenidos. Después se analizan los registros obtenidos para cuantificar el número de respuestas reflejas y condicionadas con la ayuda de programas de representación comerciales.

2.5.7. Comportamiento Social

Unas de las características de los ratones es su comportamiento social y una manera de estudiar su actuación en estas situaciones es comparar sus interacciones en distintos periodos dentro de su especie.

2.5.7.1. Intruso

El modelo residente-intruso fue estudiado extensivamente por Blanchard, Takahashi y Blanchard (1977). Ellos colocaron un intruso en colonias donde hay uno o dos machos residentes. El macho residente dominante suele desplegar respuestas de agresión hacia el intruso, tales como olfateo, ataques laterales, persecución, arrinconamiento, mordidas, etc. (nosotros hemos visto conducta de copula). El intruso suele exhibir respuestas de sumisión, como permanecer congelado, colocarse de espaldas con las patas hacia arriba, arrinconarse, hacer boxeo defensivo o caminar agachado.

En estos experimentos se exponen individualmente a todos los ratones de todos los grupos durante dos días consecutivos a la misma hora, durante 5 minutos, en su jaula habitual a la presencia de un intruso (visitante). Como

intruso se utilizaron 15 ratones silvestres C57BL/6 para cada día, con el objeto que no coincidan dos veces los mismos animales.

El primer día la prueba consiste en poner en una habitación aislada con luz tenue la jaula del animal de experimentación durante 5 minutos sin ninguna intervención. Seguidamente se introduce el intruso durante otros 5 minutos y se observa el comportamiento del residente (ratón experimental) con respecto al visitante (intruso). El segundo día se repite el procedimiento omitiendo los cinco minutos previos sin intervención.

El procedimiento es seguido por el investigador en todo momento y grabado por un equipo de videocámara ocular de lectura en pantalla (*Auxilab 3 MP*) con software de análisis de imagen y registrado en un ordenador, para su posterior visualización y evaluación.

Dentro de los patrones para los que están motivados los ratones ante una situación de invasión espontánea de territorio, se mide: a) la latencia del primer acercamiento (conducta de oler), b) el número de veces que se huelen, c) la latencia de la primera agresión, d) el número de veces que se pelean, e) el número de intentos fuga, escaparse y f) el número de intentos de cópulas (observación), teniendo en cuenta qué ratón lleva la iniciativa, para su posterior control, (figura 2.14.).



Figura 2.14. Imagen aérea de una instantánea de la prueba de intruso (segundo día). Se observa el ratón experimental (blanco, cepa CD-1) frente al intruso (ratón negro) dentro de la jaula del residente.

2.5.7.2. Actividad Defecadora

La cantidad, el aspecto, el tamaño y el estado de los excrementos son ampliamente utilizados como método de obtención de información indirecta (comunicación olfativa, sistema de señales, etc.) sobre los mamíferos. Se elige la información cuantitativa de las heces y la observación del número de excrementos producidos por los ratones de cada grupo durante los diferentes ensayos, que presentaban la posibilidad de contabilizarlas y se presentan las graficas de heces al final de la representación de cada prueba en la que haya sido contabilizada.

Dado que la actividad defecadora del animal depende del nivel de estrés que presenta, generalmente a medida que aumenta el estrés del animal el número de excrementos es mayor. Se trata de una relación compleja, que se ha tratado de analizar para considerar el estado de los ratones tomando como medidas, el número de heces y la latencia del primer excremento en cada prueba, se observa, también, si existe un cambio en tamaño y aspecto.

2.5.8. Perfusión y preparación de Histología

Al final de los experimentos, los ratones fueron sacrificados siendo profundamente anestesiados con una solución de hidrato de cloral al 4% (10 ml/kg). Una vez anestesiado el animal y alcanzado el plano quirúrgico (ausencia de reflejo podal) los cerebros se fijan por perfusión transcardiaca con salino al 0,9% y paraformaldehído al 4% con una aguja. Se extrajo el cerebro del interior de la cavidad craneal en un periodo de tiempo menor a tres minutos y se introdujo individualmente en un tubo con paraformaldehído para un período de postfijación a 4°C, de cuatro horas, pasadas las cuales se incubó durante 24 horas en PBS más sacarosa al 30%, igualmente mantenida a 4°C, para crió-protger el tejido. Se obtuvieron cortes en rodajas en Crío-tomo (Leica, Wetzlar, Alemania) de 50 µm. coronales de la parte rotral del encéfalo (incluyendo corteza e

hipocampo) y cortes sagitales de la parte caudal (tronco del encéfalo) para su posterior análisis histológico.

2.5.9. Prueba RT - PCR (*Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction*)

Con objeto de conocer la expresión génica de receptores alfa-2 noradrenérgicos en los distintos ratones modelo del presente estudio, se solicita colaboración con el Dr Ángel Carrión del laboratorio Severo Ochoa de la División de Neurociencias de la Universidad Pablo de Olavide, para la realización de una prueba de RT-PCR de cuatro estructuras del encéfalo: cerebelo, tronco encéfalo, hipocampo y corteza.

2.5.9.1. Extracción de ARN

A partir de tejido fresco se obtuvo extractos de ARN total utilizando *Tripure isolation reagent* de *Roche Diagnostics S.L.* Se homogeniza el tejido (*Tissueruptor*® *Qiagen*) durante 15 segundos al 25% de la intensidad máxima. Previamente, se limpia el vástago del homogeneizador de RNAsas sumergiéndolo en NaOH (*Panreac Química S.A.U.*) 0,1M durante al menos 10 minutos. Seguidamente se incuba 5 minutos a temperatura ambiente. Se añade 0,8 ml de cloroformo (*Panreac Química S.A.U.*) y se agita vigorosamente durante 15 segundos. Incubándolo durante 2-15 minutos a temperatura ambiente y centrifugando a 4°C durante 15 minutos a 12000 g.

La fase superior acuosa se transfiere a un nuevo tubo (aproximadamente 0,5 mL). Se precipita el ARN añadiéndole 2 mL de isopropanol (*Panreac Química S.A.U.*), invirtiéndolo 5 veces y dejándolo a temperatura ambiente durante 5-10 minutos. Se centrifuga a 4°C durante 10 minutos a 12.000 g. Luego se desecha el sobrenadante y se añade al precipitado 4 mL de etanol (*Panreac Química S.A.U.*) al 75% y se mezcla con el vortex.

Se centrifuga en frío a 7500 g durante 5 minutos y se descarta el sobrenadante con la pipeta, dejándolo secar bajo la lámpara. Se resuspende el pellet en 20-

40 μL de agua destilada estéril mediante pipeteo, y se incuba 10-15 minutos en el baño a 65 °C. Finalmente se obtiene el ARN y se conserva a -20°C

2.5.9.2. Cuantificación de ARN

Para cuantificar el ARN se utiliza la medida de absorbancia de la muestra a 260 nm utilizando un factor de corrección, de modo que 1 unidad de absorbancia corresponde a 35 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de ARN. Se preparan diluciones de las muestras 1:500 en agua estéril autoclavada. Las medidas se realizan en cubetas de cuarzo.

2.5.9.3. Retrotranscripción

A partir del ARN total se lleva a cabo la retrotranscripción para obtener cDNA mediante el siguiente protocolo:

Se preparan reacciones independientes para cada muestra de ARN conteniendo: 50 mM Tris-HCl (pH 8.3); 79 mM KCl; 3 mM MgCl_2 ; 10 mM DTT (USB-Affimetrix comercializa un tampón 5x con los componentes anteriores); 0,4 mM dNTPs (*Fermentas Internacional Inc.*); 4 μM hexanucleótidos al azar (random primers) (*Sigma Aldrich*); 0,5 U/ μL de complejo inhibidor de RNasa porcino (*Amersham Bioscience*); 4 U/ μL de retro-transcriptasa murina (*M-MLV RT*) (*USB-Affimetrix, Inc.*); y 80 ng/ μL de RNA total.

Se incuba durante 5 minutos a 65 °C para desnaturalizar las estructuras secundarias del ARN después 45 minutos a 37 °C para que la enzima retrotranscriba los mRNAs a cDNA y nuevamente 5 minutos a 95°C para inactivar la retrotranscriptasa. El cDNA obtenido se conserva a -20°C

2.5.9.4. PCR Semicuantitativa

Se preparan reacciones para cada muestra de cDNA en un volumen final de conteniendo: 10 mM Tris-HCl; 50 mM KCl; 1,5 mM MgCl_2 ; 0,1% Triton X100 (tampón Taq polimerasa); 0,2 mM dNTPs (*Fermentas Internacional Inc.*); 250 nM de cada pareja de cebadores; 0,05 U/C Taq polimerasa (*Favorgen Biotech Corp.*); y 0,2-1 ng/ μL cDNA.

Los cebadores utilizados son:

- Gliceraldehido 3 - Fosfato deshidrogenasa (gapdh) (Se amplifica un fragmento de 171 pares de bases):

- 5' ATGTTCCAGTATGACTCCACTCACC 3' y

- 5' GAAGACACCAGTAGACTCCACGACA 3'.

- Receptor adrenérgico (α 2A-AR). Se obtiene una banda en torno a 100 pares de bases

- 5' CAAGATCAACGACCAGAAGT 3' y

- 5' GTGCGACGCTTGGCGATCT 3'

Se obtiene una banda en torno a 100 pares de bases.

Se colocan las muestras en un termociclador, programando el siguiente protocolo:

- a) 5 min a 95°C
- b) 20 segundos a 95°C
- c) 30 segundos a T^a de alineamiento (60°C)
- d) 45 segundos 72°C
- e) Repetir 25 ciclos de los pasos b), c) y d)
- f) 5 minutos a 72°C

Se sacan alícuotas de cada muestra, cada 5 ciclos de amplificación desde el ciclo 25 al 40.

2.5.9.5. Electroforesis de DNA

Las alícuotas obtenidas para cada número de ciclos de la PCR contienen el fragmento amplificado en un gran número de copias. La electroforesis se realiza en gel de agarosa, en % adecuado (2%) para el tamaño de fragmento amplificado, en TBE 1X. 89 mM Tris-Base (*Roche Diagnostics*); 89 mM ácido bórico (*Panreac Química S.A.U.*), 1 mM EDTA pH 8 (*Sigma Aldrich*). Se calienta en microondas hasta la completa disolución. Cuando baja la temperatura a 55-60 °C, se añade bromuro de etidio (*Serva GmbH*) a una concentración final de 0,5 mM.

Se vierte en un portagel con tamaño y peines adecuado según el número de muestras. Se deja enfriar hasta que se solidifique. Una vez hecho el gel, se coloca en una cubeta de electroforesis, de modo que los pocillos queden hacia el polo negativo, ya que el ADN tiene carga negativa y así pueda migrar a través del gel hacia el polo positivo. Se cubre por completo el gel con tampón TBE 1X.

A cada una de las muestras se le añade tampón de carga (60% glicerol (*Panreac Química S.A.U.*); una pizca de azul de bromofenol (*Serva GmbH*), y TBE 1X) para proporcionar densidad a la muestra. Se colocan las muestras en cada uno de los pocillos formados por el peine. Se coloca también un marcador de peso molecular en uno de los pocillos y se conecta la cubeta a una fuente eléctrica manteniéndolo a voltaje continuo hasta que las muestras hayan migrado lo suficiente.

Una vez finalizada la migración del ADN en el gel, se observan las bandas obtenidas colocando el gel bajo exposición a luz ultravioleta. El bromuro de etidio al intercalarse en el ADN emite fluorescencia, en una relación directamente proporcional al ADN cargado en el pocillo, al excitarse con ultravioleta. Posteriormente se captura una imagen del gel mediante una cámara digital, para posteriormente ser analizada por densitometría óptica.

2.5.9.6. Cuantificación de ADN por Densitometría Óptica

Se utiliza el programa de análisis de imagen (*Image J*) disponible en la siguiente dirección web: <http://rsbweb.nih.gov/ij/>. Este programa da una medida de intensidad de fluorescencia de cada banda, que se relaciona con la cantidad de ARNm de ese gen que había en la muestra de ARN. Estos valores son relativizados frente a la expresión del gen de expresión constitutiva *gapdh*.

2.6. Recogida y análisis de datos

Los datos de las pruebas de evitación pasiva, cilindro rotatorio, peso, placa caliente y actividad defecadora se recogen con lápiz y papel. Las pruebas de

reconocimiento de objetos, intruso y la cinta andadora se recogen además con una cámara de grabación. Posteriormente todos los datos se pasan al ordenador. Para facilitar el proceso se utilizan tablas diseñadas con anterioridad en las que únicamente hay que anotar el dato en cuestión.

En el caso de las pruebas del actímetro, condicionamiento clásico e inhibición por pre-pulso, los datos son recogidos directamente por el ordenador a través de una tarjeta de adquisición y se recuperan en forma de archivos para su posterior análisis estadístico. Para la prueba de RT-PCR los datos estadísticos son suministrados por el laboratorio del Doctor Ángel Carrión de nuestro departamento.

Para el análisis estadístico los datos se ordenan en hojas Excel y en éste mismo programa se realizan las representaciones gráficas y el análisis de cálculos de valores de promedios \pm el error estándar del promedio. El análisis de varianza y el estudio posterior de contraste se realiza a través del programa *Datos de Excel* en funciones para análisis. Para la prueba de PCR, los datos estadísticos presentados por el laboratorio de genética, se realizan en el programa *ineSTAR-a V1.3*

Cuando se buscan diferencias entre los ratones (entre/intra cada grupo) a lo largo de las sesiones se utiliza el análisis de varianza de un factor, (ANOVA). Las diferencias se consideran estadísticamente significativas cuando $p < 0,05$, que se marca en las gráficas de barras con una estrella (*) encima del dato significativo. Cuando la $p < 0,01$ se representa con dos estrellas (**). Si la $p < 0,001$ se indica con tres estrellas (***). En las graficas lineales las estrellas van representadas del color de cada grupo frente a control (roja para AR, verde para fármaco, morada para AR+fármaco), para mostrar las diferencias significativas del grupo AR frente al grupo AR+fármaco se utiliza el color negro en la estrella.

Se indican las diferencias significativas y el rango en que se encuentran, mostrando la F de Fisher y la probabilidad, recopilado de (Raudel y cols., 2007)

en tablas anexas. La significancia de los resultados se indica en la figura correspondiente.

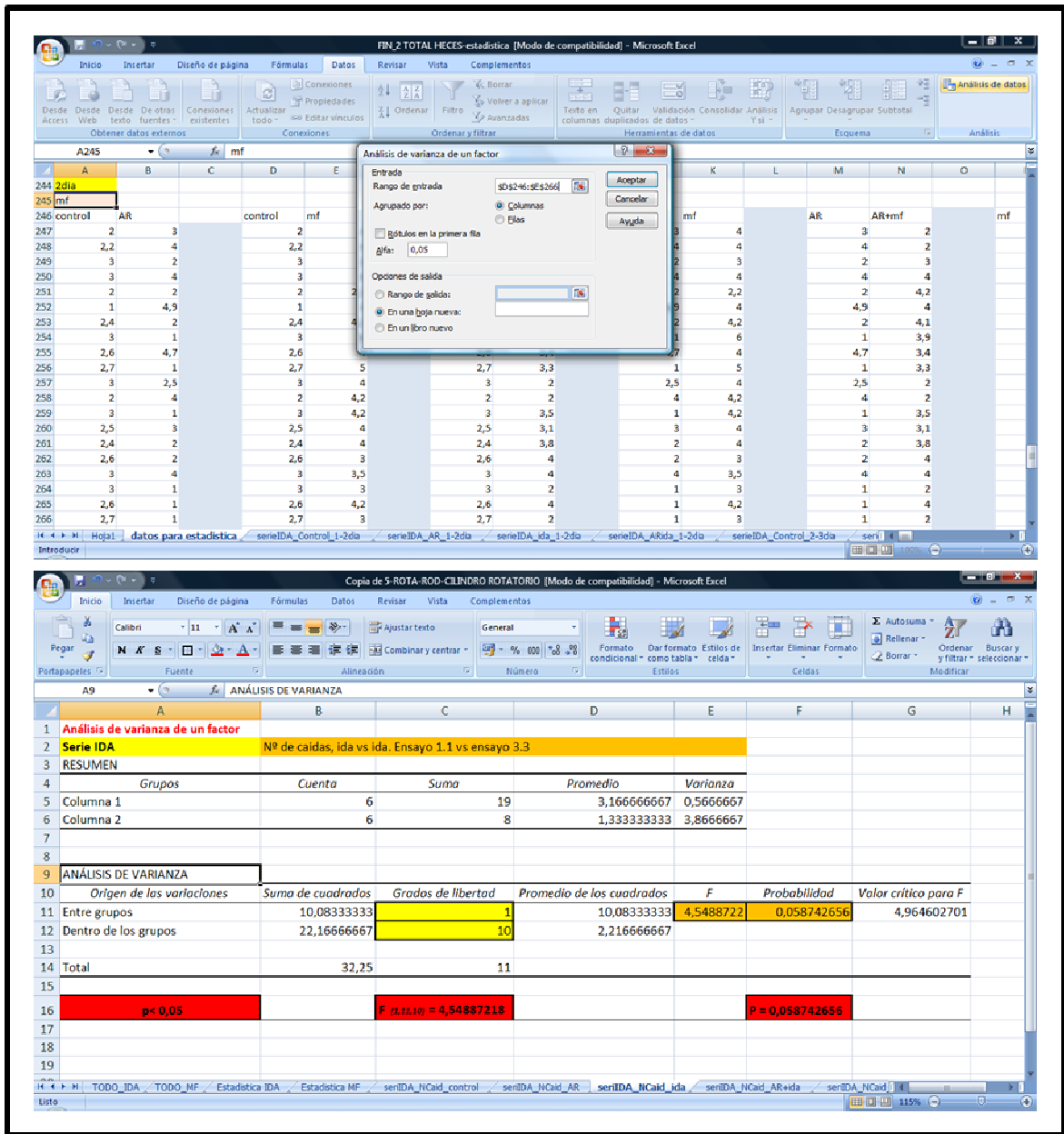


Figura 2.15. Aplicación para análisis de datos estadísticos

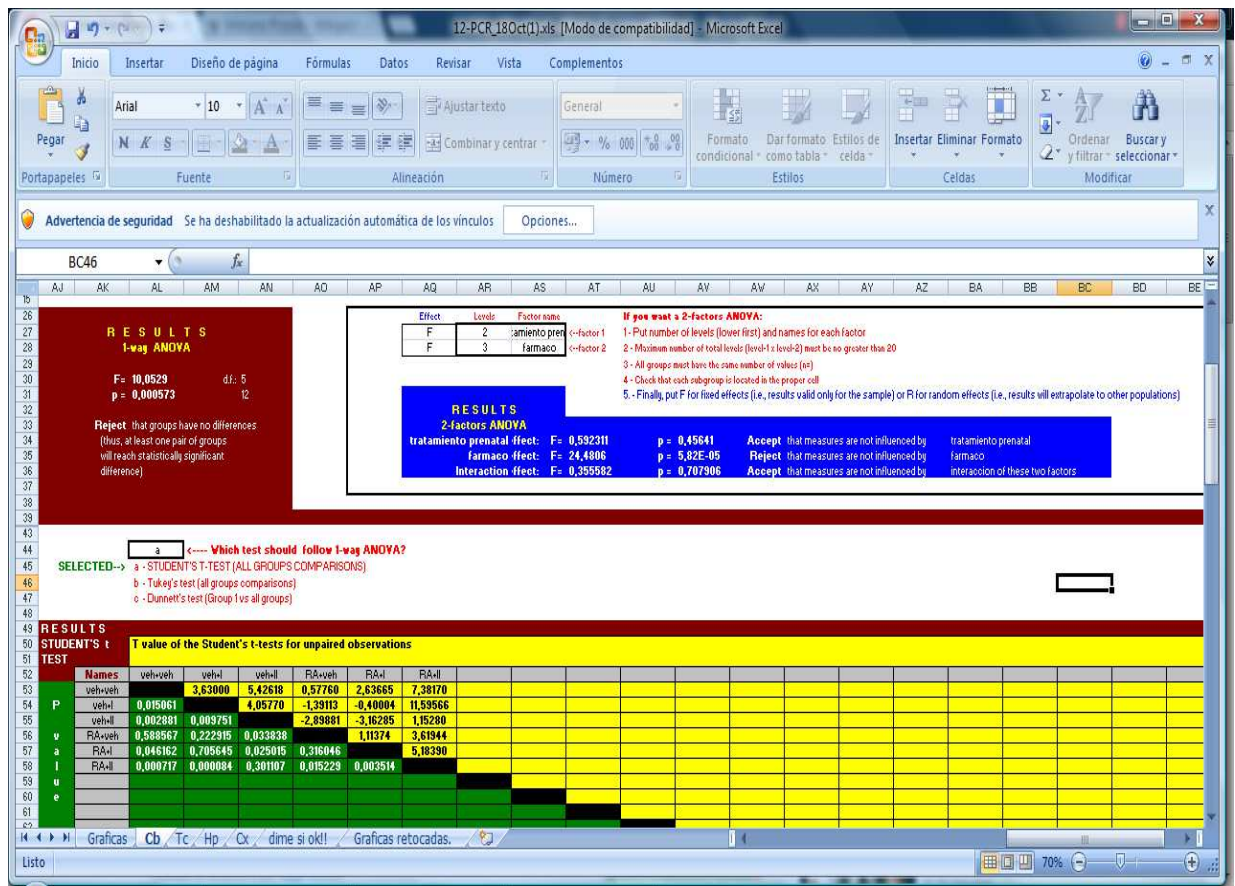


Figura 2.16. Estadística para PCR

2.7. Presentación de Bibliografía

Como gestor de referencias, para mostrar la Bibliografía y su manejo, se utiliza el programa EndNote versión X.

Resultados

Dado que la asignación de los animales a los diferentes grupos de estudio fue aleatoria, manteniendo grupos de control para cada grupo objeto de estudio, aún en ampliación de la población implicada en el experimento, la tasa de supervivencia en todos los grupos no mostraba diferencias entre ellos. El tratamiento con Metilfenidato e Idazoxan no compromete la supervivencia de los ratones.

El sistema de tratamiento de los fármacos se puso a punto controlando todos los factores del producto, con el fin de no encontrar diferencias en el origen de síntesis y lote de los productos. Han sido controlados, igualmente, los vehículos en que se administraban los agentes terapéuticos para que no interfirieran en la sintomatología, enmascarando el posible efecto curativo del compuesto. Tanto la seguridad como la eficacia de los fármacos se determinan frecuentemente mediante el seguimiento de los cambios que se producen con respecto a valores de base (humanos) comparando valores con la información basal usada de referencia en el momento de inicio del experimento.

También los test de las diferentes pruebas, no solo han sido objeto de evaluaciones mediante observaciones visuales, que requiere una alta formación específica del evaluador, sino que tanto los estudios como los resultados se graban y monitorizan, y los datos obtenidos de cada grupo se combinan en cada tiempo de estudio y se analizan para obtener información del buen desarrollo de la investigación.

La medida de los ratones se mantuvo igualada durante todo el experimento, siendo de 17 cm \pm 1cm para todos los grupos. Durante la realización del experimento los animales presentaron un estado aparentemente adecuado de salud, con buen pelaje y peso apropiado.

En el momento de explicar estos resultados, se comparan entre sí todos los grupos experimentales, de manera que todos quedan combinados. Se

representa con estrellas en las gráficas la diferencia estadísticamente significativa, cuando ésta aparezca entre los tres grupos (AR, fármaco, AR+fármaco) frente al grupo control, y AR+fármaco frente al grupo AR se representa además con una llave puente en las gráficas de barras. En las gráficas lineales se representa con una estrella negra para el grupo AR frente AR+fármaco, para los demás grupos frente al grupo control la estrella se representa en el color que muestre cada grupo en la gráfica).

Se presenta una tabla con el grado de relación estadística de los grupos en Anexos. La representación de los distintos grupos en las gráficas aparece con colores. Azul para el grupo control, rojo para el grupo AR, verde para el grupo fármaco, y morado para el grupo AR+fármaco, presentados en la leyenda de cada gráfica. Posteriormente, en la discusión, se realiza una valoración de estos resultados.

A continuación se muestran los resultados obtenidos de las pruebas mencionadas, aplicadas a los sujetos experimentales:

3.1. Ratones Idazoxan

Con el fin de estudiar el efecto de Idazoxan en el desarrollo de los ratones se efectuaron las pruebas sin muestras distintivas entre los grupos tratados con el fármaco Idazoxan y los controles referente a peso, tamaño, edad, conducta, agresividad, etc.

El conjunto de resultados generales obtenidos tras la realización de las pruebas experimentales refleja el rendimiento que cada grupo experimental presenta en cada una de las pruebas. Como se puede observar, la ejecución de la mayoría de las pruebas presenta pocas diferencias entre los grupos, quizás en este caso, por la edad de los animales.

3.1.1. Marcadores de Desarrollo – Peso

La pérdida de peso, medida tanto en gramos como en porcentaje, es un buen indicador de la evolución del estado de salud de los animales. Usando el

porcentaje de pérdida de peso se minimizan las diferencias de peso iniciales entre animales.

En la figura 3.1 se muestra la evolución del peso de todos los grupos durante el desarrollo de las pruebas. En ella se observa que todos los grupos siguen un patrón de crecimiento progresivo parecido, sin diferencias estadísticamente significativas entre los grupos en cuanto a su desarrollo, al ir aumentando entre márgenes considerados normales y de aparente salud de masa. Sí existen variaciones a lo largo del tiempo del experimento que se igualan hacia el final de éste. No obstante los ratones AR muestran un peso más ligero que el resto. A los 135 días presentan diferencias significativas ($p < 0,05$) con respecto al grupo AR+ida ($32,5 \pm 0,4$ gramos para los AR frente a $39 \pm 0,3$ para el grupo AR+ida) en este último, parece ser que el fármaco aumenta el peso en los ratones AR. Igualmente el grupo ida mantiene un peso menor que el grupo control sin mostrar diferencias significativas. En cuanto al porcentaje, la mayor diferencia entre los grupos (AR frente a AR+ida) no supera el 20 %, emparejándolos hacia el final del experimento.

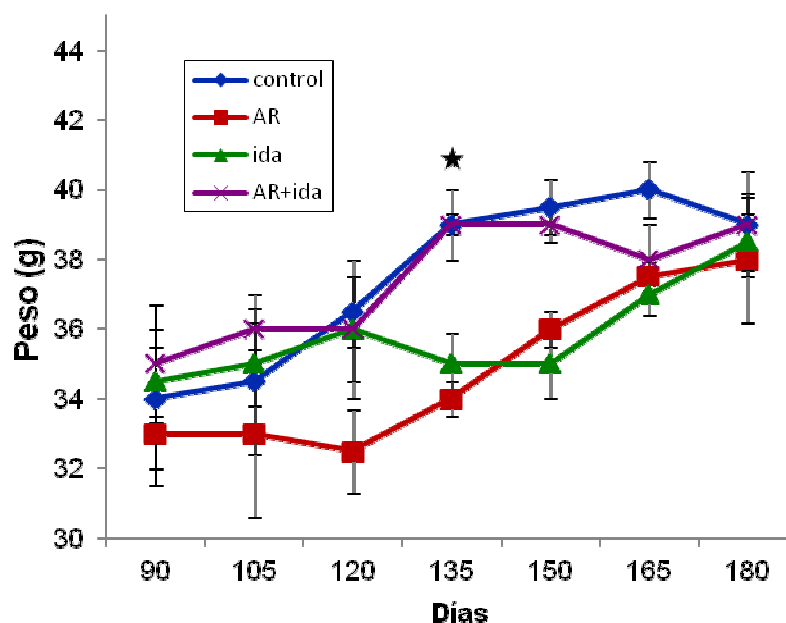


Figura 3.1. Evolución del peso entre 90 y 180 días. Tiempo aproximado en el que los diferentes grupos realizaron las pruebas experimentales.

3.1.2. Placa Caliente

Con objeto de evaluar la percepción del dolor por el ratón, se utiliza la placa caliente, midiendo el tiempo en segundos que tardan los ratones en mostrar sensibilidad, primera latencia (T1) (tiempo de aparición de respuesta para lamerse las patas por primera vez a causa del dolor) con un máximo de 15 segundos, y segunda latencia (T2) (se evalúa la respuesta comportamental al dolor, midiendo el tiempo de la aparición del tercer intento de fuga) con un máximo de 240 segundos. Cuando se les expone a esta prueba, se observa, tal como se muestra en la figura 3.2, que en cuanto a sensibilidad (T1) no existen diferencias estadísticamente significativas entre ningún grupo. La mayor diferencia aparece en el grupo control ($9,65 \pm 1,65$ s) frente al grupo ida ($16 \pm 3,15$ s), este último muestra una mayor latencia dolorosa que el resto de los grupos. Con respecto al grupo AR+ida ($9,83 \pm 1,54$ s) frente a su control el grupo AR ($11,73 \pm 0,72$ s) no hay diferencias, comportándose el grupo AR+ida de manera similar al grupo control.

Referente a la variable T2, el grupo AR ($18,29 \pm 2,49$ s) muestra similar comportamiento que el grupo AR+ida ($19,17 \pm 2,82$ s) presentando estos dos grupos, valores más bajos que el grupo control ($21,75 \pm 2,17$ s) y que el grupo ida ($24,83 \pm 2,89$ s). No obstante ningún grupo presenta diferencias estadísticamente significativas.

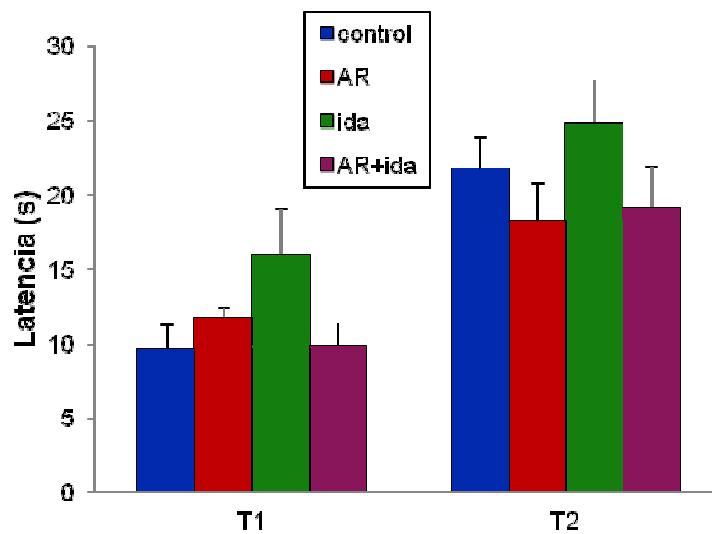


Figura 3.2. Representación de la latencia, en segundos, de la conducta de lamerse las patas (T1) y del tercer intento de fuga (T2), en la prueba de la placa caliente.

En cuanto al comportamiento de defecar, figura 3.3., en esta prueba, los ratones control ($0,50 \pm 0,22$ heces) y AR+ida ($0,33 \pm 0,21$ heces) tienen una conducta menor que el grupo AR ($1,83 \pm 0,31$ heces) y el grupo ida ($1,83 \pm 0,48$ heces). Presentando diferencias estadísticamente significativas entre el grupo control y AR ($p < 0,01$), el grupo control frente a ida ($p < 0,05$), y el grupo AR frente al grupo AR+ida ($p < 0,05$).

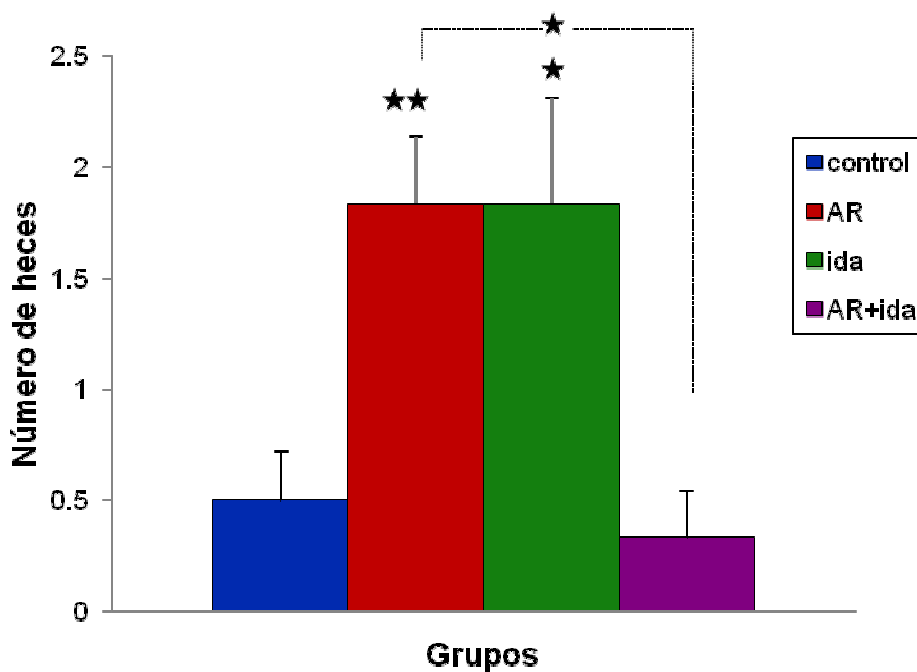


Figura 3.3. Número de heces que presentan los distintos grupos en la prueba de la placa caliente, notece las diferencias entre los grupos control frente al grupo ida y el grupo AR y este ultimo frente al grupo AR+ida.

3.1.3. Actímetro

Para medir la actividad motora y la capacidad exploratoria de los ratones mediante la locomoción espontánea, se determinan los cortes de haces de infrarrojos en el actímetro. Según muestra la figura 3.4, la actividad total de los ratones va aumentando conforme al tiempo, si bien este incremento no se da de igual forma en todos los grupos. La evolución ascendente del grupo AR ($3413,58 \pm 265,02$ cortes) no difiere de la del grupo control ($3469,38 \pm 261,81$ cortes). Ambos grupos mantienen una actividad superior que el resto de los grupos, ida ($2962,67 \pm 331,73$ cortes) y AR+ida ($2858 \pm 220,20$ cortes). Este último presenta la menor actividad de todos los grupos, posiblemente por el efecto del fármaco, no obstante las diferencias entre grupos no llegan a ser estadísticamente significativas.

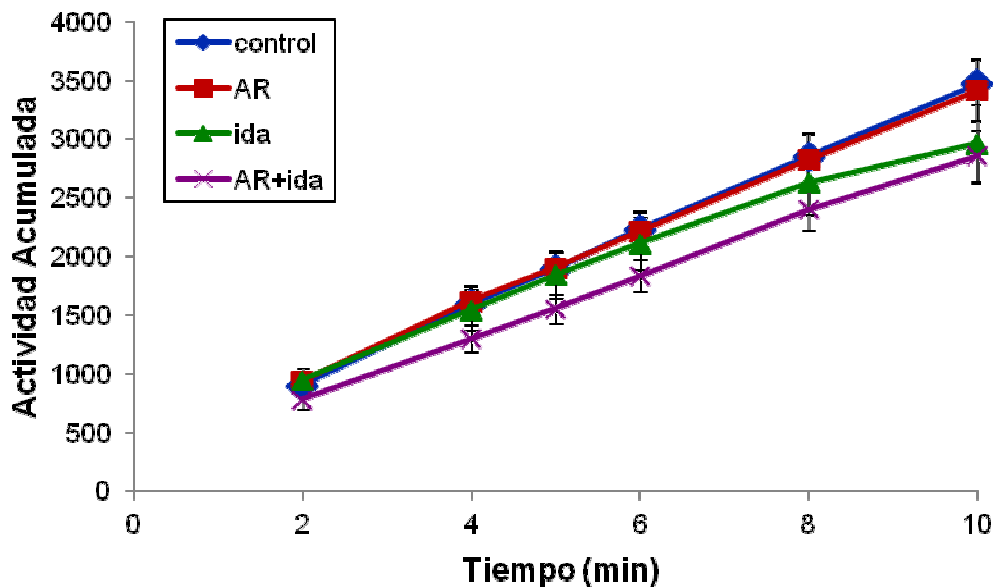


Figura 3.4. Evolución de la actividad acumulada total, respecto al tiempo durante diez minutos, de los distintos grupos experimentales.

El grupo control y AR muestran una actividad parecida, mientras que la tendencia del grupo AR+ida es moverse menos durante los diez minutos que dura la prueba. Los ratones del grupo ida mantienen una actividad similar a los grupos de más actividad hasta la mitad de la prueba, a partir del sexto minuto su dinamismo se reduce hasta bajar su actividad hasta el nivel del grupo AR+ida posiblemente debido a un declive en su resistencia.

Como medida de ansiedad, en la figura 3.5, se muestra la frecuencia de la visita al centro en campo abierto, medida como porcentaje de tiempo en el centro con respecto al tiempo total, a los 5 y 10 minutos. Se puede decir que la visita al centro del grupo AR+ida ($9,22 \pm 2,27$ %, a los 5 minutos y $13,09 \pm 2,57$ %, a los 10 minutos) es menor que en el resto de los grupos, y que el grupo ida presenta una mayor estancia en el centro ($21,12 \pm 5,00$ %, a los 5 minutos y $22,64 \pm 2,76$ %, a los 10 minutos) que los demás grupos. Además el grupo AR+ida frente a ida, tanto a los 5 como a los 10 minutos, presentan diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$). Tanto el grupo control como el grupo AR presentan una medida de ansiedad similar en ambos tiempos (5 y 10 minutos). En esta prueba se podría decir que el fármaco aumenta ligeramente

la ansiedad en los ratones retinoicos y que de distinta manera reduce la ansiedad en el ratón normal (control).

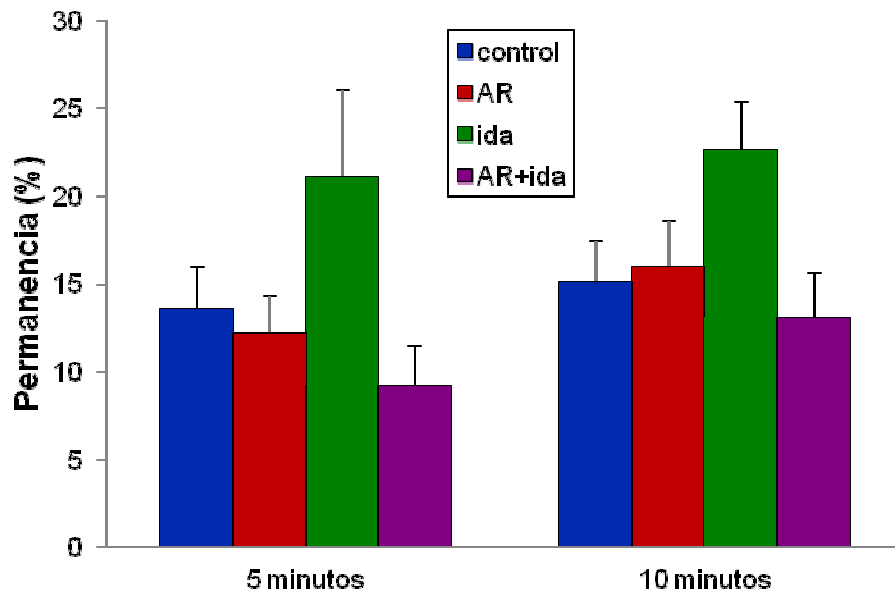


Figura 3.5. Representación del porcentaje de permanencia en el centro a los 5 y 10 minutos como medida de ansiedad. Durante toda la prueba los ratones que presentan menos ansiedad son los del grupo ida manteniendo el mismo patrón de preferencia.

En la actividad defecadora (figura 3.6), el grupo control ($4,77 \pm 0,44$ heces) presenta una ligera menor actividad que los otros grupos, solo presentando diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,001$) con el grupo ida ($11,17 \pm 0,87$ heces) en el cual el fármaco podría descontrolar esta actividad, ya que su nivel de ansiedad, medido en visitas al centro en campo abierto, es menor que el de los otros grupos. Los demás grupos se mantienen en una línea semejante al grupo control, AR ($5,08 \pm 0,56$ heces) y AR+ida ($5,00 \pm 0,44$ heces).

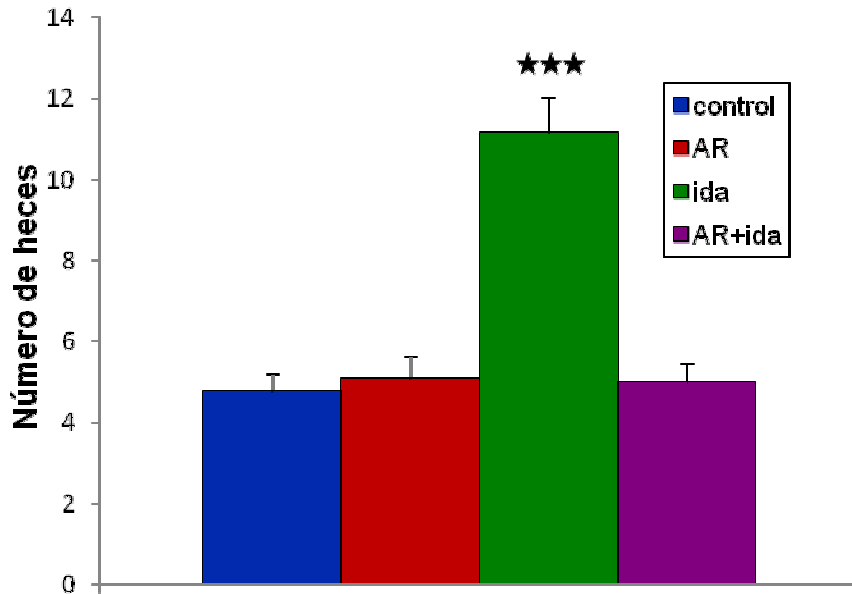


Figura 3.6. Número de heces en la prueba de la actividad acumulada. El grupo ida presenta una cantidad superior que el resto de los grupos experimentales, que presentan una actividad defecadora semejante.

3.1.4. Respuesta de Sobresalto

La respuesta de sobresalto es una conducta incondicionada o no voluntaria que se produce cuando, ante un estímulo brusco, aparece una respuesta de contracción de la musculatura esquelética que favorece una conducta de escape.

En este trabajo, consiste en una respuesta sensorio-motora caracterizada por la contracción de los músculos de los ojos (parpadear), el cuello y las extremidades ante un estímulo acústico fuerte e imprevisto.

En la figura 3.7, se observa que respecto a la latencia de respuesta motora al estímulo auditivo frente a la línea base, todos los grupos lo hacen en torno a 13 milisegundos, sin diferencias estadísticas significativas entre ellos. No obstante el grupo control ($12,30 \pm 0,90$ ms) es el que presenta la respuesta más rápida y el grupo AR+ida ($14,04 \pm 1,72$ ms) el que tarda más en responder.

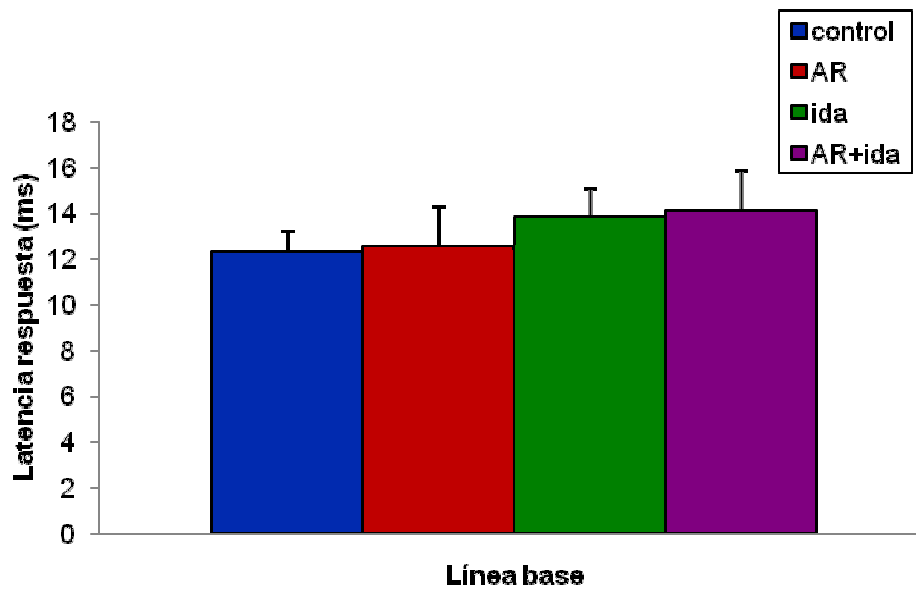


Figura 3.7. Latencia de respuesta, medida en milisegundos, frente a la línea basal en el reflejo de sobresalto.

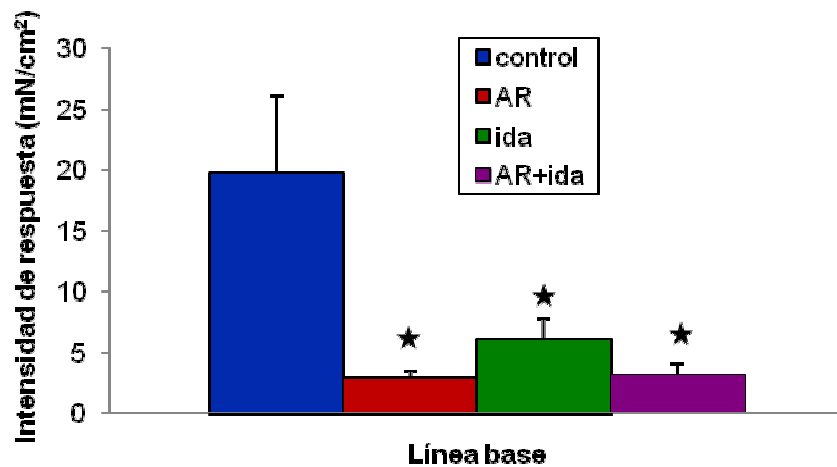


Figura 3.8. Intensidad de la respuesta pico de sobresalto frente a la línea basal de cada grupo, representada en la fuerza que ejerce el ratón sobre la plataforma. La reacción ante esta prueba para el grupo control es superior que el resto de los grupos.

Con referencia a la intensidad pico, dada sobre la máxima fuerza que ejerce el ratón sobre la plataforma medida en miliNewton por centímetro cuadrado, ver Figura 3.8, el grupo control ($19,76 \pm 6,31$ mN/cm²) presenta diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) frente a los grupos AR ($2,89 \pm 0,58$ mN/cm²), ida ($6,05 \pm 1,75$ mN/cm²) y AR+ida ($3,22 \pm 0,90$ mN/cm²). Mostrando que el grupo control presenta mayor sobresalto que el resto de los ratones.

En cuanto al área de respuesta, ver figura 3.8, el grupo control presenta un valor de área superior a los demás grupos, mostrando diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) con los grupos AR e ida y ($p < 0,01$) con el grupo AR+ida.

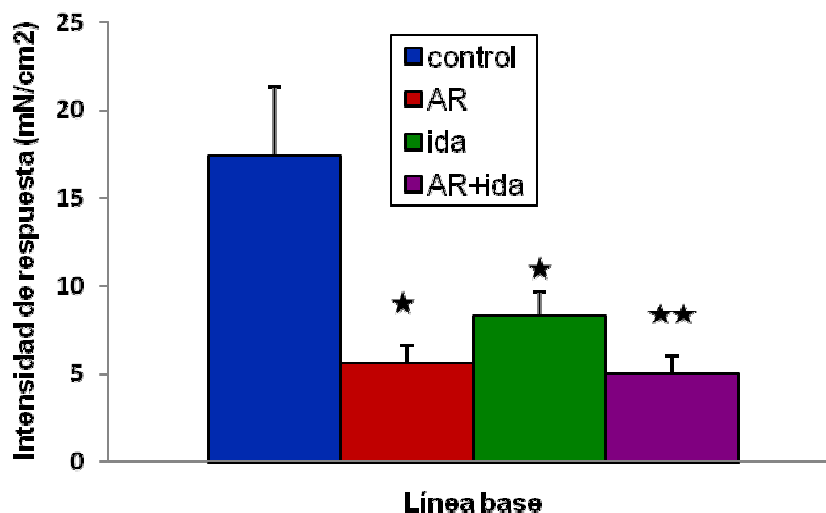


Figura 3.9. Medida del área frente a la línea basal de cada grupo. En la que el grupo control muestra más intensidad constante de respuesta al estímulo auditivo.

En la figura 3.10, se muestra la inhibición por prepulso frente a la línea base, medido en el valor máximo (pico). En el eje de ordenadas se representa el estado normal de cada grupo en ausencia de estímulo sonoro. Y en el de coordenadas el porcentaje de parada de la respuesta de sobresalto anticipándose a inhibirla. En esta prueba no presentan diferencias significativas ningún grupo respecto a sus controles. El grupo AR presenta la mayor inhibición ($50,05 \pm 11,39 \%$) frente al grupo AR+ida que presenta el menor porcentaje de inhibición ($2,88 \pm 27,73 \%$), posiblemente por la acción del fármaco.

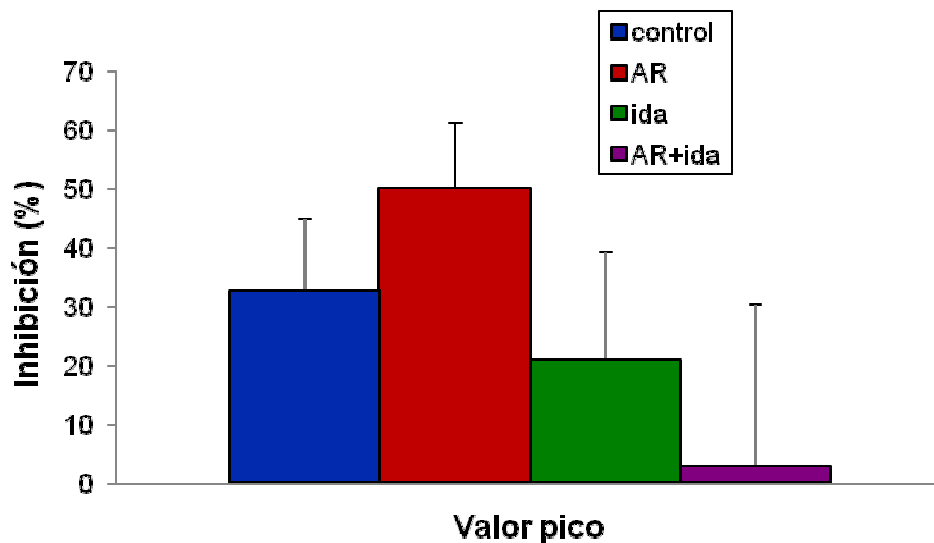


Figura 3.10. Porcentaje de inhibición, en valor pico, que presentan los distintos grupos ante un estímulo auditivo que se presenta precedido por un sonido más leve, que debe llamar la atención de los ratones para anteponerse al sobresalto y disminuir la respuesta. La respuesta más inhibida la presentan los ratones del grupo AR.

3.1.5. Cilindro Rotatorio

En la prueba del cilindro rotatorio (rotarod) los ratones son colocados en la rueda giratoria a distintas velocidades para registrar la capacidad de los animales a permanecer en el cilindro rotatorio. El propósito de esta prueba es evaluar la coordinación sensitiva motora de los ratones. La prueba es sensible a los daños en el sistema nervioso (ganglio basal y cerebelo) y de las drogas a efecto de la función motora.

En esta prueba los ratones disminuyen el número de caídas a lo largo de las sesiones y aumenta el tiempo transcurrido entre una caída y otra (Desarrollo-aprendizaje)

El primer día de la prueba, los ratones que más dificultades tienen en adaptarse al cilindro rotatorio son el grupo control, con una media de $(7,50 \pm 1,21$ caídas) mostrando diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,001$) con el grupo ida ($4,33 \pm 0,44$ caídas) y de ($p < 0,01$) con el grupo AR+ida ($4,14 \pm 0,43$ caídas) siendo éste el grupo con menos dificultades para adaptarse a la prueba, presentando también diferencias estadísticamente significativas

($p < 0,05$) con el grupo AR ($5,87 \pm 0,39$ caídas). El segundo día de prueba, el grupo control ($2,61 \pm 0,40$ caídas) tiene una bajada apreciable en el número de caídas mostrando diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,001$) con el grupo AR ($5,27 \pm 0,58$) que mantiene la línea de caídas del día anterior. Tanto el grupo ida ($2,67 \pm 0,63$ caídas) como el grupo AR+ida ($1,89 \pm 0,36$ caídas) reducen notablemente el número de caídas, sobre todo el grupo AR+ida que manifiesta diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,001$) con el grupo AR. El tercer día de prueba, el grupo control ($2,28 \pm 0,60$ caídas) se comporta similarmente al día anterior mostrando diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,01$) con el grupo AR ($5,87 \pm 0,57$ caídas) que mantiene su propensión de no reducir el número de caídas. El grupo ida ($1,72 \pm 0,54$ caídas) y el grupo AR+ida ($0,56 \pm 0,17$ caídas) siguen superándose en la adaptabilidad a esta prueba, mostrando además este último, diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,001$) con el grupo AR.

En los tres días de prueba, todos los grupos mejoran su permanencia en el cilindro reduciendo apreciablemente el número de caídas con el paso del tiempo. Sobre todo el grupo AR+ida, que llega a presentar un dominio considerable en esta prueba. Sin embargo el grupo AR parece ser que no mejora en absoluto, manteniendo una estabilidad en su realización, posiblemente porque se arriesga más. Ver figura 3.11.

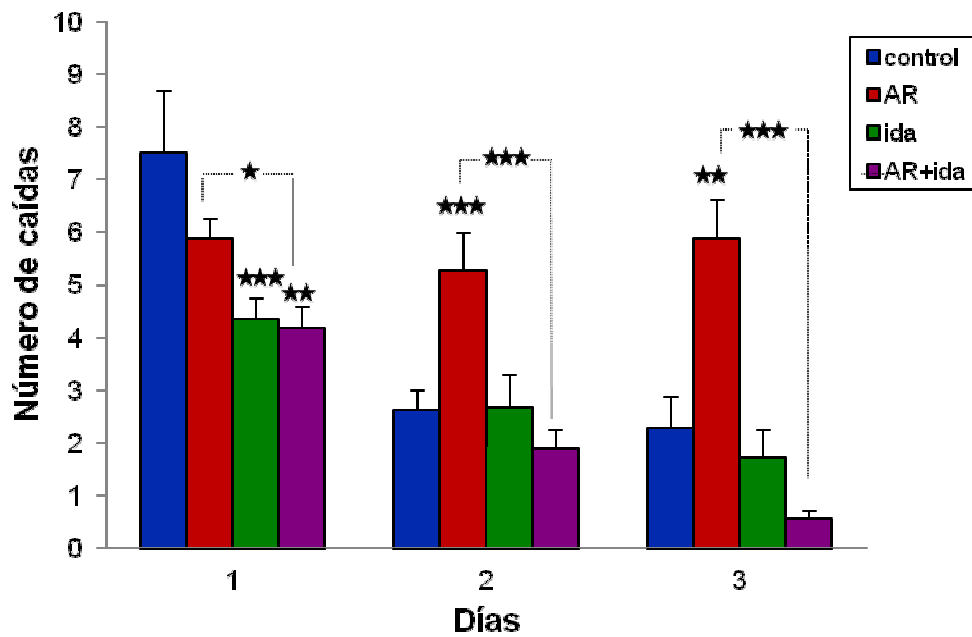


Figura 3.11. Número de caídas en los diferentes ensayos de los tres días que dura esta prueba. En la que el grupo AR al contrario que el resto de los grupos no muestra mejoría en su capacidad motora, de manera opuesta, actúa el grupo AR+ida que presenta una habilidad de adaptación muy significativa.

En cuando al número de respuestas pasivas, la veces que el ratón da vueltas alrededor del cilindro, el primer día, el grupo ida ($0,67 \pm 0,16$ respuestas pasivas) realiza esta conducta mayor cantidad de veces que el resto de los grupos, que están por debajo de 0,1 respuestas pasivas, y presenta diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) con el grupo control. El segundo día, el grupo control ($0,56 \pm 0,15$ respuestas pasivas) presenta diferencias

estadísticamente significativas ($p < 0,05$) con el grupo AR ($0,07 \pm 0,07$ respuestas pasivas) que presenta semejante conducta que el primer día. Contrariamente, el grupo AR+ida ($0,61 \pm 0,18$ respuestas pasivas) muestra una actividad superior a la del día anterior, presentando diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) con el grupo AR. En el tercer día el grupo control vuelve a bajar la ejecución de esta conducta ($0,06 \pm 0,06$ respuestas pasivas) y presenta diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,001$) con el grupo ida ($0,94 \pm 0,24$ respuestas pasivas) que sigue manteniendo una alta ejecución de esta conducta. El grupo AR ($0,20 \pm 0,11$ respuestas pasivas) aumenta tenuemente el número de respuestas pasivas con respecto a los dos días anteriores y el grupo AR+ida se mantiene igual al día anterior. En el cómputo de esta prueba el grupo AR mantiene durante toda la prueba una baja conducta de respuestas pasivas. El grupo AR+ida es el que presenta una propensión a realizarla. Ver figura 3.12.

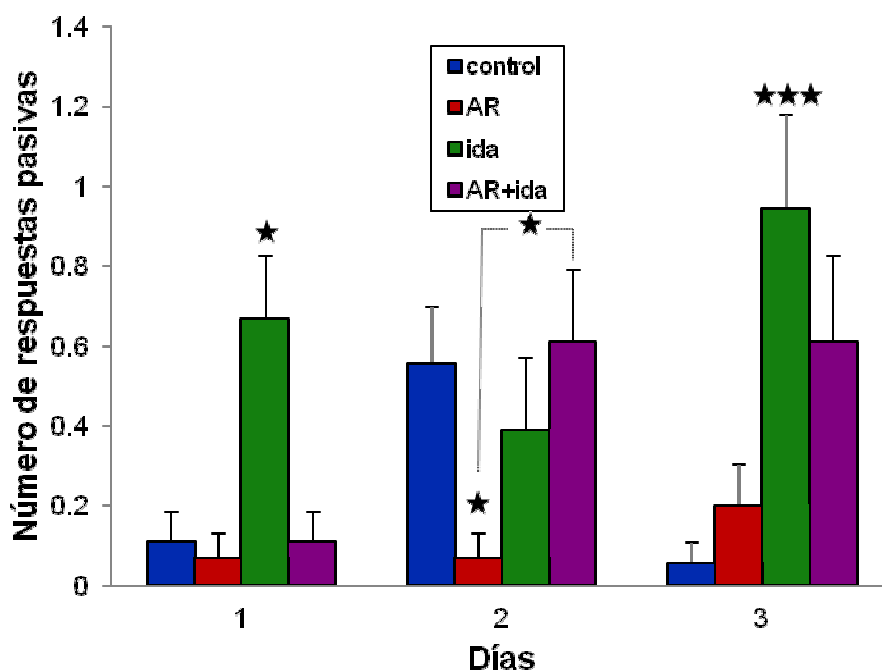


Figura 3.12. Número de respuestas pasivas sobre el cilindro rotatorio en los tres días que transcurre la prueba. En ella se muestra como el grupo AR se mantiene en una baja realización de esta conducta, al contrario que el grupo AR+ida que a partir del segundo día se acomoda en esta conducta. Las diferencias encontradas aparecen entre el grupo control e ida y entre el grupo AR+ida y AR.

En la figura 3.13 se muestra el comportamiento en el número de giros sobre el cilindro. En el primer día el grupo control no ejecuta esta conducta, por tanto presenta diferencias estadísticamente significativa con los restantes grupos que se muestran de manera semejante entre ellos, siendo los resultados para los grupos los siguientes: AR ($0,47 \pm 0,13$ giros), ida ($0,56 \pm 0,17$ giros) y AR+ida ($0,56 \pm 0,14$ giros). Para el segundo día el grupo control ($0,28 \pm 0,14$ giros) mantiene una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,5$) con el grupo AR+ida ($0,72 \pm 0,13$ giros) y éste a su vez con el grupo AR ($0,13 \pm 0,09$ giros) presenta diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,01$). El grupo ida ($0,67 \pm 0,16$ giros) muestra similar resultado al día anterior. En el tercer día se puede observar como el grupo ida ($0,78 \pm 0,21$ giros) y el grupo AR+ida ($0,94 \pm 0,21$ giros) siguen incrementando el número de giros, mostrando diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,5$) para ambos, con respecto al control ($0,33 \pm 0,14$ giros). El grupo AR ($0,20 \pm 0,11$ giros) presenta diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) con el grupo AR+ida. En cuanto al total de la prueba el grupo ida y el grupo AR+ida presentan más actividad en esta observación que el resto de los grupos que se mantienen poco propensos a realizar los giros.

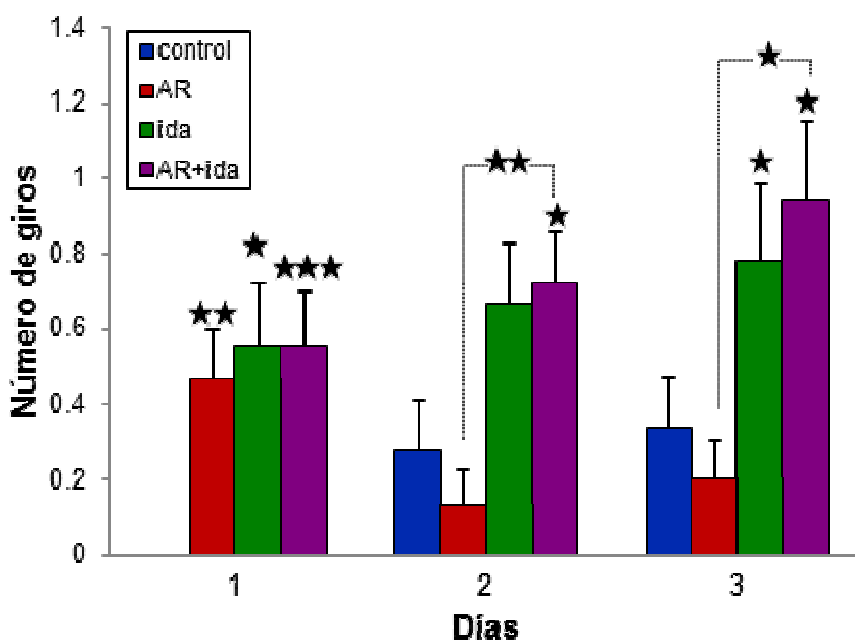


Figura 3.13. Número de giros sobre el cilindro rotatorio, durante los tres días que transcurre la prueba. En ella vemos que el grupo AR+ida es el que más giros realiza.

El comportamiento en el porcentaje de éxito muestra una mejora progresiva en todos los grupos, menos en el grupo AR. La prueba fue dividida en dos variables, caídas en el primer minuto y caídas desde el segundo al quinto minuto. Los animales que más éxito presentan en toda la prueba son los del grupo AR+ida, que llegaba al 95% en el tercer día. Los que menos el grupo AR que se mantienen alrededor del 20% de éxito. Para el primer minuto, en el primer día los ratones presentaban poco éxito, al tener que acostumbrarse al cilindro rotatorio y aprender esta tarea, a partir de aquí hay un progreso, que en el caso del grupo AR (0% a 13% de éxito), es muy bajo respecto a los otros grupos.

En la segunda variante de esta prueba, desde el minuto dos al quinto, los grupos siguen progresando llegando el grupo control a un 60% y el ida al 67%. Ver figura 3.14.

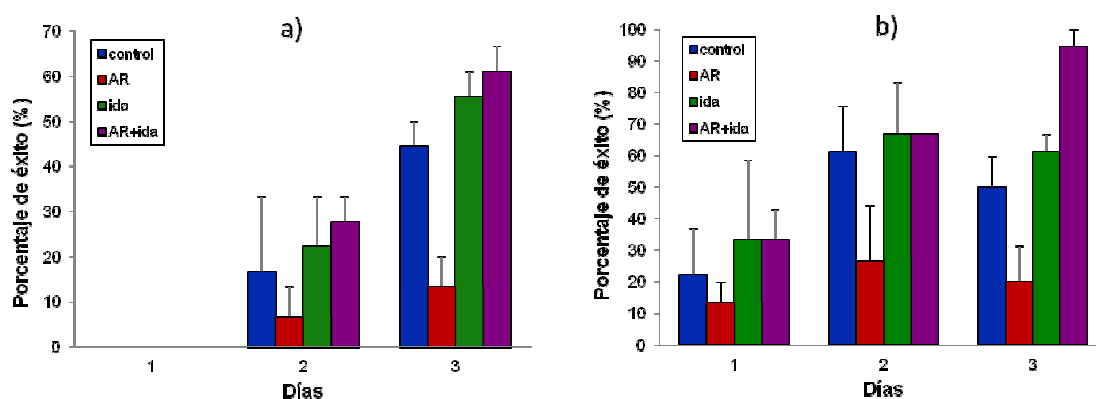


Figura 3.14. En estas figuras se muestran las dos variables analizadas en la prueba del porcentaje de éxito, ratones que no se caen respecto al número total de ratones [(ratones no caen/nº total de ratones) x100]. a) Representación del primer minuto de los tres días de prueba. b) Representación del segundo al quinto minuto de los tres días de prueba. El éxito en el grupo AR+ida en esta prueba es superior al resto de los grupos, por el contrario el grupo AR no presenta una buena evolución, al llegar alrededor del 20% y el grupo control al 60%.

El número de heces en esta prueba, muestra que el grupo AR ($3,27 \pm 0,38$ heces) presenta diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,01$) tanto con el grupo control ($1,44 \pm 0,20$ heces) como con el grupo AR+ida ($1,50 \pm 0,28$ heces), para el primer día. El segundo día el grupo AR ($2,60 \pm 0,34$ heces) reduce la cantidad de heces respecto al día anterior, manteniendo diferencias

estadísticamente significativas ($p < 0,05$) con el grupo control y con el grupo AR+ida ($p < 0,01$). El tercer día el grupo AR ($0,93 \pm 0,25$ heces) se iguala a los demás grupos que durante toda la prueba se han mantenido en la misma línea. Ver figura 3.15.

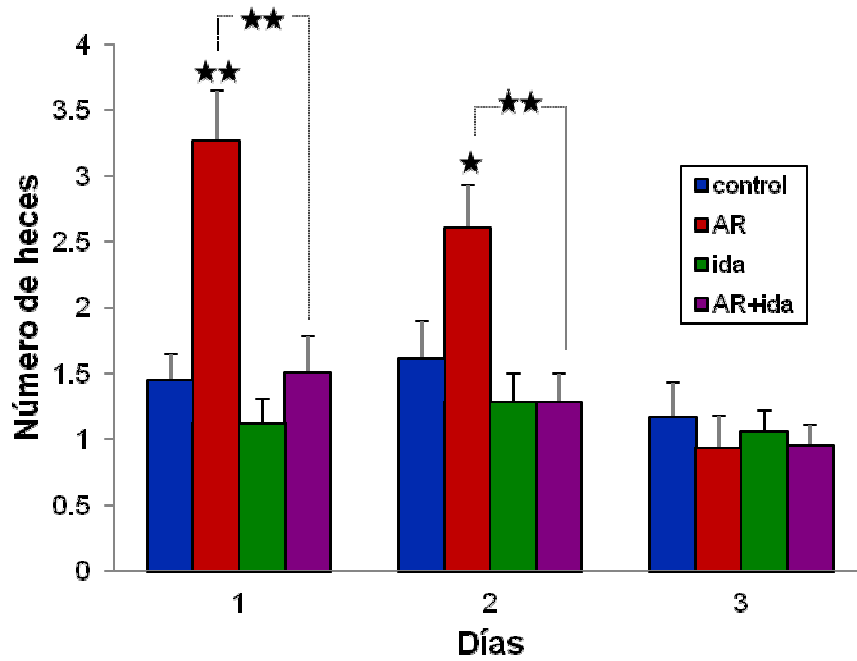


Figura 3.15. Muestra del número de heces de cada grupo en los tres días que transcurre la prueba. El grupo AR presenta más deposiciones que los demás en los dos primeros días, igualándose en el tercer día al resto de los grupos.

3.1.6. Cinta Giratoria

En esta prueba se comprueba el esfuerzo, la resistencia, velocidad máxima, abatimiento, capacidad de adaptación a cambios de ritmos y dificultades. Ver figura 3.16. El grupo sobresaliente en todos los aspectos es el AR, ya que muestra amplias diferencias con todos los grupos, y cuanto mayor dureza o complicación, las diferencias aumentan. Como segundo grupo aventajado discretamente sobre los restantes se encuentra el grupo ida. En la prueba a 25 metros/minuto y 5° de inclinación el grupo AR (1782 ± 18 segundos) presenta diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,01$) con el grupo control ($1281,67 \pm 108,08$ segundos) y con el grupo AR+ida ($1073,33 \pm 51,31$ segundos), ($p < 0,001$). El grupo ida ($1589,17 \pm 38,95$ segundos) presenta diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) con el grupo control.

Tanto el número total de descargas eléctricas, como el tiempo de permanencia en la zona de descarga, no objetiva nada concluyente al mostrarse igualado para todos los animales y la permanencia total se muestra como el final de la prueba.

En cuanto a la velocidad máxima, destaca el grupo AR: 40m/minuto. El resto de los animales están comprendidos alrededor de 30 m/minuto. El mayor tiempo, a velocidades altas, también la obtienen los animales del grupo AR (6 minutos a 40 m/minuto sin inclinación). Todos a cero grados de inclinación.

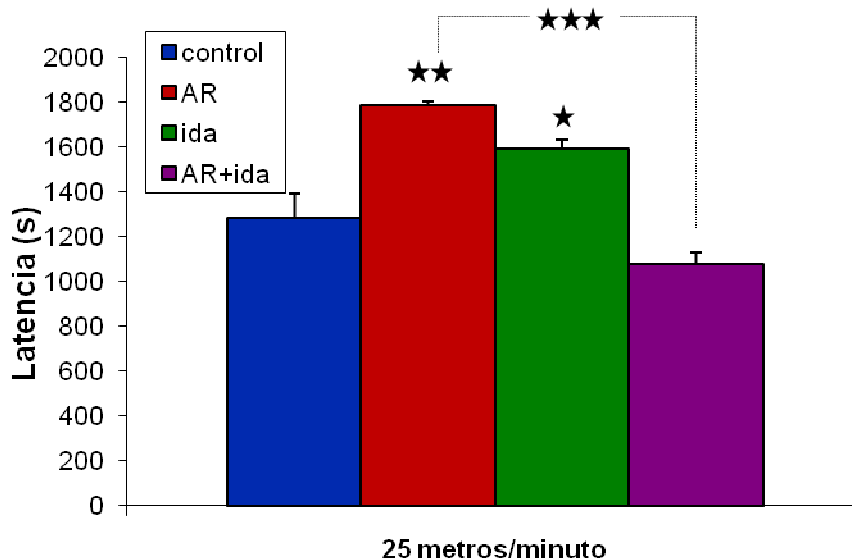


Figura 3.16. Representación del tiempo, en segundos, que se mantienen los ratones en la cinta a una velocidad de 25 metros/minuto con 5° de inclinación. Para esta prueba los ratones del grupo AR son los más efectivos, debido quizás a que no necesitan prestar una atención sostenida para la carrera o a su dinamismo.

3.1.7. Reconocimiento de Objetos

Con esta prueba se pretende analizar la capacidad atencional y memorística de los ratones. Con ella se mide la capacidad del animal para explorar un objeto novedoso en un contexto conocido.

En el índice de reconocimiento, el entrenamiento, presenta un registro de exploración similar para todos los grupos con una ligera predisposición al objeto izquierdo (objeto conocido). En la prueba de memoria a corto plazo, todos los grupos se inclinan a reconocer más el objeto novedoso, menos el grupo ida ($40 \pm 4\%$) de preferencia al objeto derecho (conocido), que frente al grupo control ($59 \pm 2\%$) presenta diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$). El grupo AR ($56 \pm 2\%$). El grupo AR+ida ($52 \pm 4\%$) mantiene un

índice de reconocimiento similar para ambos objetos, aunque con una tenue tendencia hacia el objeto nuevo.

Respecto a la memoria a largo plazo, el grupo control (60 ± 2 %) continua teniendo un índice de reconocimiento superior hacia el objeto novedoso, presentando diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) frente al grupo ida (41 ± 4 %) que reconoce más el objeto conocido. El grupo AR (51 ± 1 %) reconoce a ambos objetos por igual y el grupo AR+ida (54 ± 3 %) sigue mostrando, a las 24 horas, una ligera preferencia hacia el objeto nuevo. Ver figura 3.17.

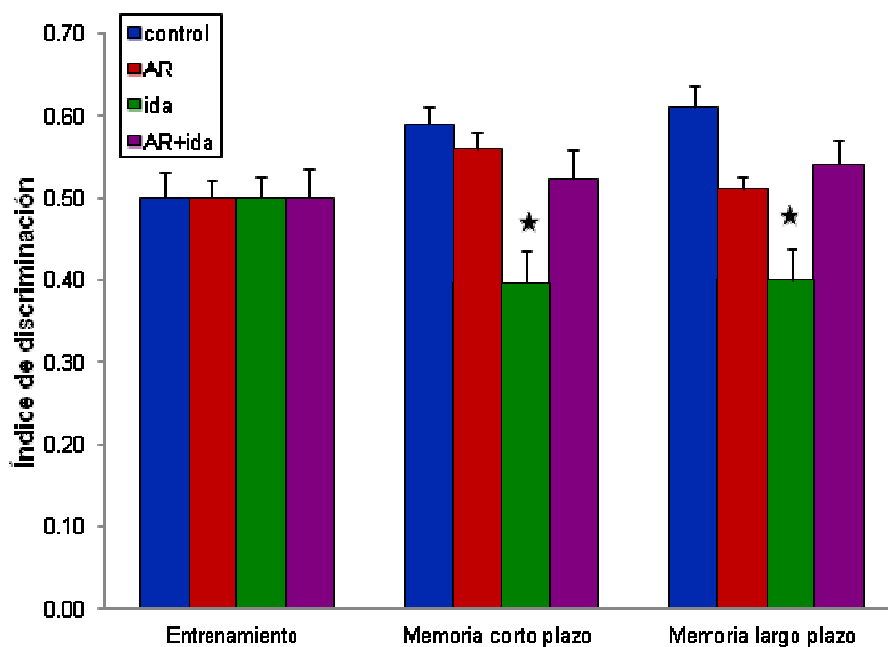


Figura 3.17. Gráfica normalizada de reconocimiento de objetos, en la que se tiene en cuenta los valores que presentan los distintos grupos en el entrenamiento para representar las tres etapas de la prueba. El grupo AR en la prueba a corto plazo tuvo un mayor índice de exploración del objeto novedoso comparado con la sesión de entrenamiento, al contrario que el grupo ida, que presenta menor índice de exploración hacia el objeto novedoso, en la memoria a corto y largo plazo respecto al entrenamiento.

Otra de las variables que se analiza en esta prueba es el número total de contactos realizados por cada grupo en las distintas sesiones, ver figura 3.18. En el entrenamiento, el grupo AR ($89,42 \pm 6,38$ contactos) presenta mayor número de contactos que los otros grupos, con diferencias estadísticamente

significativas ($p < 0,01$) con el grupo AR+ida ($57,80 \pm 9,24$ contactos). El grupo control ($76,21 \pm 8,20$ contactos) realiza más número de contactos que el grupo ida ($54,08 \pm 8,23$ contactos) que es el que menos toques presenta, pero sin llegar a tener diferencias significativas. Tanto en la memoria a corto plazo como a largo plazo los grupos se comportan de manera semejante al entrenamiento, presentando en toda la prueba más números de contactos el grupo AR que el resto. Los grupos ida y AR+ida son los que menos contactos presentan durante el desarrollo de la prueba.

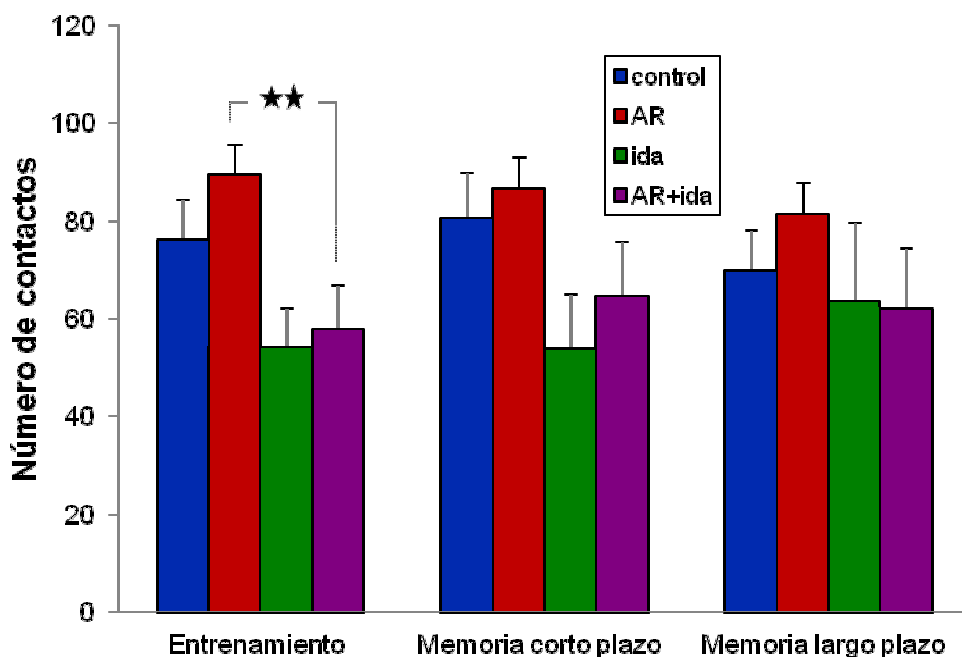


Figura 3.18. Número total de contactos realizados por cada uno de los grupos experimentales en las distintas sesiones de reconocimiento de objetos. Se puede observar como el grupo AR, es el que más contactos tiene en las tres sesiones de esta prueba y el grupo ida el que menor número de contactos tiene en toda la prueba.

La última variable que se estudia en la prueba de reconocimiento de objetos es el número de heces que cada grupo experimental realiza durante las distintas sesiones (figura 3.19). En el entrenamiento, el grupo control ($2,50 \pm 0,76$ heces) es el grupo que menos deposiciones realiza frente al grupo ida ($4,50 \pm 1,10$ heces) y al grupo AR+ida ($4,50 \pm 1,48$ heces), que son los que más presentan. En la memoria a corto plazo, los grupos control, ida y AR+ida reducen el número de heces, mientras que el grupo AR ($3,50 \pm 0,72$ heces) se mantiene como en el entrenamiento, presentando diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) con el grupo control ($1,19 \pm 0,56$ heces). En la memoria

a largo plazo, todos los grupos aumentan el número de heces, siendo el que más presenta el grupo ida ($7,50 \pm 1,65$ heces) mostrando diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) con el grupo control ($2,65 \pm 0,86$ heces) que es el grupo que menos presenta.

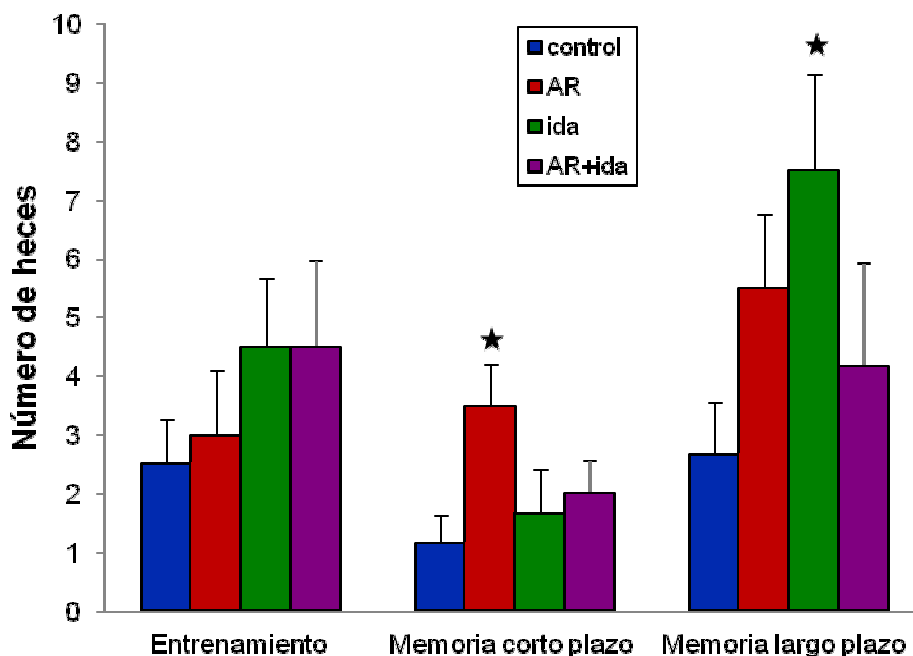


Figura 3.19. Número de heces presentadas por cada grupo en las diferentes sesiones de la prueba de reconocimiento de objetos. Se muestran las diferencias estadísticamente significativas del grupo AR frente al grupo control en la sesión de memoria a corto plazo y del grupo ida frente al grupo control en la memoria a largo plazo.

3.1.8. Evitación Pasiva

La aparente curiosidad y evitación ante situaciones estresantes de los ratones hace que en esta prueba, la medición temporal sea bastante efectiva para compararlos. Los resultados se representan en la figura 3.20. En la fase de entrenamiento (de descarga) el grupo que más latencia presenta al entrar en la cámara oscura es el grupo control ($48,50 \pm 17,62$ segundos), frente al que entra más rápido el grupo AR+ida ($11,33 \pm 3,41$ segundos). En la sesión de memoria a corto plazo, como era de esperar, todos los grupos alargan más el periodo de latencia al entrar en la cámara oscura. El grupo que entra en la cámara en menos tiempo es el grupo AR ($105,60 \pm 36,52$ segundos) y el grupo que más tarda en entrar es el grupo control ($149,83 \pm 29,21$ segundos). En la sesión de memoria a largo plazo todos los grupos reducen el tiempo de entrada

en la cámara oscura, siendo el grupo AR ($26,80 \pm 15,94$ segundos) el que lo hace con más rapidez. Los grupos ida ($78,17 \pm 33,51$ segundos) y el grupo AR+ida ($84,83 \pm 23,43$ segundos) parece que recuerdan algo más el efecto negativo de la cámara oscura. El comportamiento general de esta prueba es que los ratones AR son menos efectivos en la memoria que el resto de los ratones experimentales, pero sin diferencias significativas entre ningún grupo.

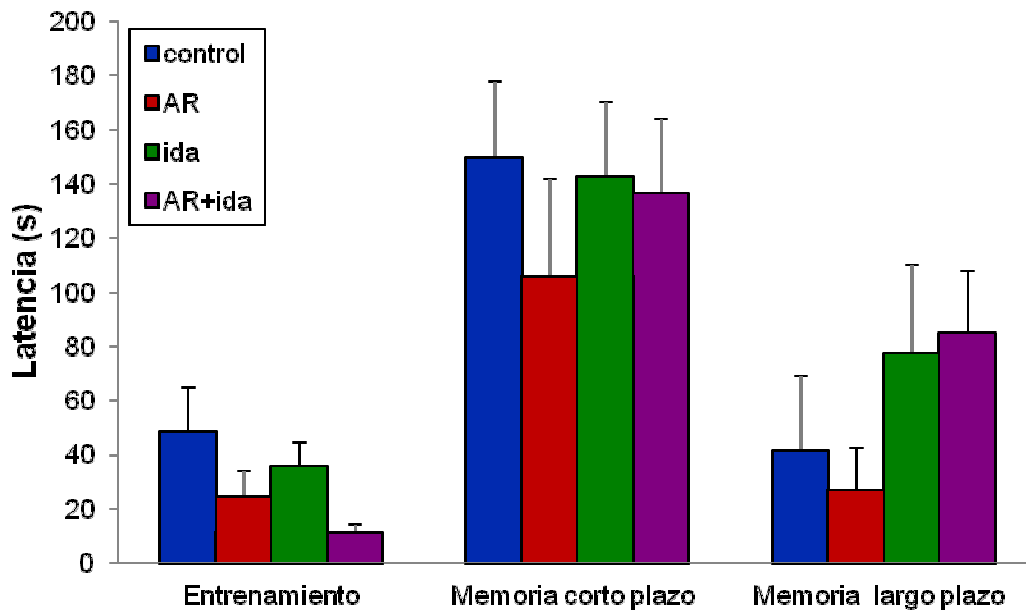


Figura 3.20. Latencia, en segundos, que tardan los diferentes grupos experimentales en entrar en la cámara oscura. En el primer ensayo (entrenamiento) los ratones reciben un choque eléctrico al entrar y deben recordarlo en los siguientes ensayos de memoria a corto plazo y memoria a largo plazo, donde no reciben ninguna descarga eléctrica.

3.1.9. Condicionamiento Clásico

Se estudia la capacidad de aprendizaje de los grupos experimentales mediante el condicionamiento clásico del reflejo palpebral, usando un paradigma de huella o traza.

En la figura 3.21 se muestra la curva de aprendizaje, medida como porcentaje de aparición de respuestas condicionadas por sesión de condicionamiento, de los animales investigados. Los ratones del grupo control muestran un aumento en el porcentaje de respuestas condicionadas, desde el primer día en que reciben el par de estímulos, hasta llegar a un máximo en torno al 56%, en las sesiones C6-C7, que sobre el porcentaje de respuestas de la habituación,

ronda el 64%, presentando una media de 47% de respuestas en las sesiones de condicionamiento. A partir de ahí, con la extinción, comienza el decremento en el porcentaje de dichas respuestas. Al abordar el estudio de las respuestas obtenidas en los otros tres grupos encontramos que éstos alcanzan su máxima respuesta en C2 y C5, que presentan una media alrededor de 33% de respuestas condicionadas y que están en torno al 42% con respecto a la habituación. En cuanto a las diferencias estadísticamente significativas solo aparecen en el grupo AR frente al grupo control en las sesiones C6 a C9, siendo la máxima diferencia ($p < 0,01$) en C7.

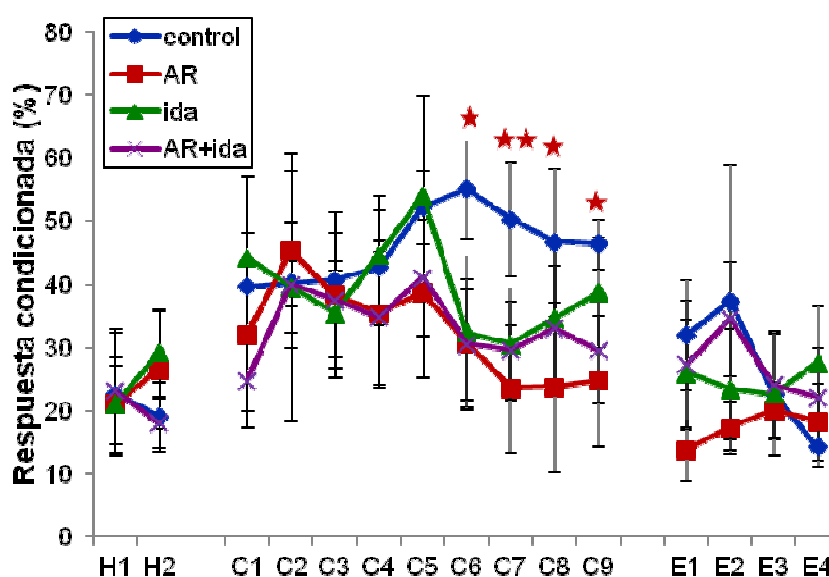


Figura 3.21. Curvas de aprendizaje asociativo de los cuatro grupos de ratones. Se muestra la evolución temporal del porcentaje de respuestas condicionadas, durante un condicionamiento con el paradigma de traza (choque eléctrico-choque eléctrico). Cada punto representa el valor medio de porcentaje, obtenido durante las sucesivas sesiones diarias, de aprendizaje por grupo. Se observa como el grupo control presenta un número mayor de respuestas que los demás grupos.

3.1.10. Intruso

Sobre esta prueba se presentan los datos más representativos del comportamiento que tiene el ratón ante la presencia repentina de un intruso en su compartimento, como la primera vez que se huelen. En la figura 3.22, se muestra para el primer día, que el grupo AR ($17,00 \pm 2,61$ segundos) es el grupo que más latencia presenta en acercarse, mostrando diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,01$) con el grupo AR+ida ($5,00 \pm 1,73$ segundos). El grupo control ($11,83 \pm 4,70$ segundos) presenta mayor latencia que el grupo ida ($3,90 \pm 1,71$ segundo).

En cuanto al segundo día, la mayor latencia en la conducta de acercamiento la sigue presentando el grupo AR ($36,25 \pm 10,70$ segundos) que presenta diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) con el grupo AR+ida ($7,00 \pm 2,91$ segundos) y con el grupo control ($7,30 \pm 1,52$ segundos). El grupo ida ($17,00 \pm 6,03$ segundos) aumenta el tiempo de acercamiento con respecto al primer día al igual que el grupo AR.

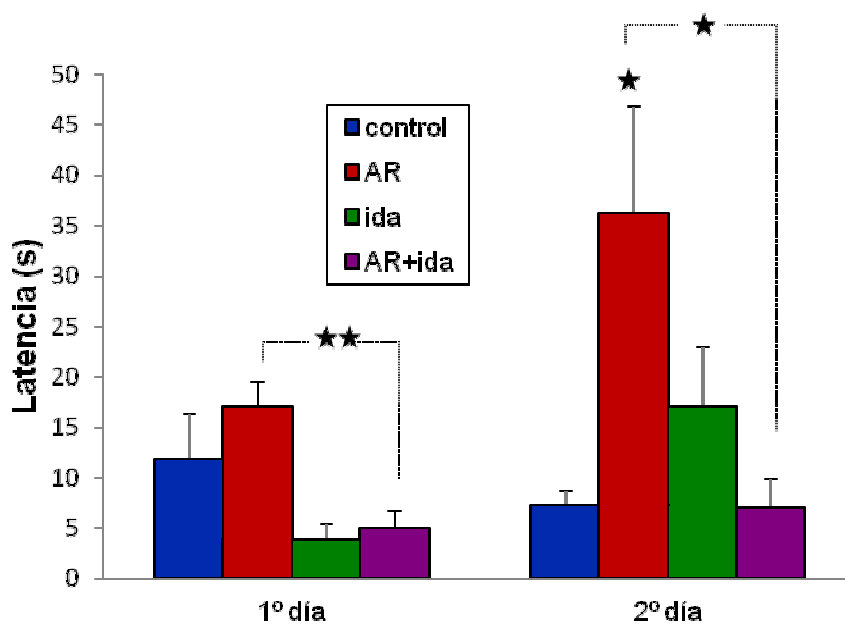


Figura 3.22. Representación de la conducta de olfateo que presentan los ratones en los dos días que transcurre la prueba. Como puede observarse el grupo de ratones AR es el que más demora la conducta de acercarse al ratón intruso en ambos días, el grupo AR+ida por el contrario, es el que más rápido realiza esta conducta en el segundo día y en el primer día también presenta una latencia baja, al igual que el grupo ida que en el primer día es el que menos latencia muestra.

Otras de las evidencias estudiadas en esta prueba es la primera vez que se pelean, ver figura 3.23. Se pone de manifiesto que en el primer día los ratones que actúan más rápidamente en esta conducta son el grupo AR+ida ($109,17 \pm 37,97$ segundos) y el grupo AR ($141,01 \pm 12,91$ segundos) y los que más tardan en ejecutar este comportamiento son los ratones del grupo control ($259,50 \pm 40,50$ segundos) seguidos del grupo ida ($198,50 \pm 47,70$ segundos), sin diferencias significativas en ninguno de ellos.

En el segundo día de esta prueba las pautas seguidas por el grupo AR+ida ($236,05 \pm 41,70$ segundos) cambian respecto al día anterior, siendo los ratones que más demoran este comportamiento, presentando diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) con el grupo AR ($90,71 \pm 32,56$ segundos) que son los ratones que menos tardan en pelearse. El grupo control ($131,17 \pm 53,52$ segundos) también reduce el tiempo en comenzar a pelearse respecto al primer día. Los ratones del grupo ida ($197,83 \pm 41,16$ segundos) se mantienen igual al día anterior.

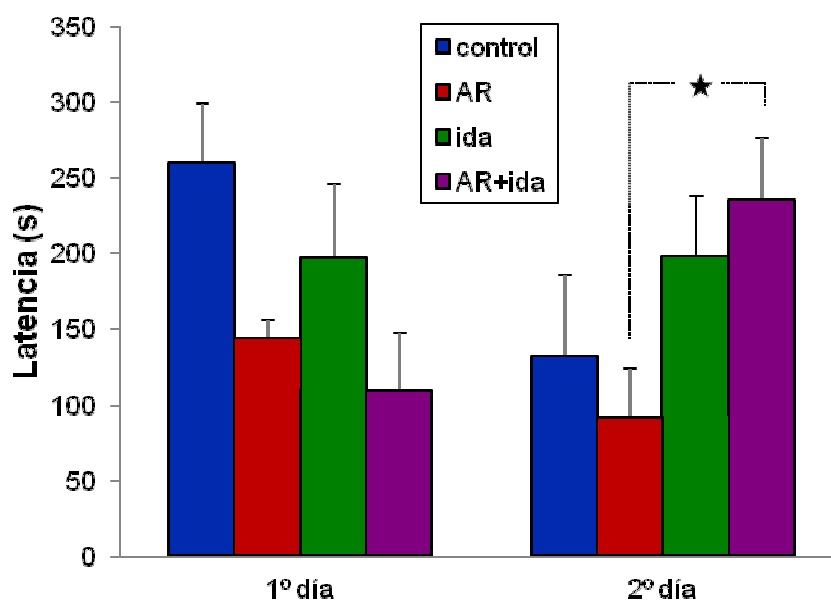


Figura 3.23. Latencia de respuesta, en segundos, que tardan los distintos grupos de ratones experimentales en pelearse con el ratón intruso, presentada en los dos días en que transcurre esta prueba.

La cantidad de veces que se pelean, figura 3.24, se toma como otra cualidad para medir su agresividad. Los ratones que más se pelean en ambos días son

los del grupo AR ($8,25 \pm 1,93$ peleas) para el primer día y ($11,00 \pm 4,14$ peleas) para el segundo día. El grupo AR+ida presenta $5,67 \pm 1,65$ peleas en el primer día, mientras que en el segundo reduce bastante este comportamiento ($2,33 \pm 1,50$ peleas). El grupo control presenta $2,00 \pm 2,00$ peleas en el primer día y para el segundo $4,67 \pm 1,67$ peleas. El grupo ida ($0,83 \pm 0,83$ peleas) para el primer día, es el que menos se pelea en ambos días ($2,10 \pm 1,45$ peleas) para el segundo día. Los sujetos experimentales del grupo AR+ida muestran la mayor actividad en los enfrentamientos para ambos días. Los ratones AR, siendo los más rápidos y más insistentes en los enfrentamientos, no suelen ser los que inician esta conducta. No aparecen diferencias significativas en los dos días.

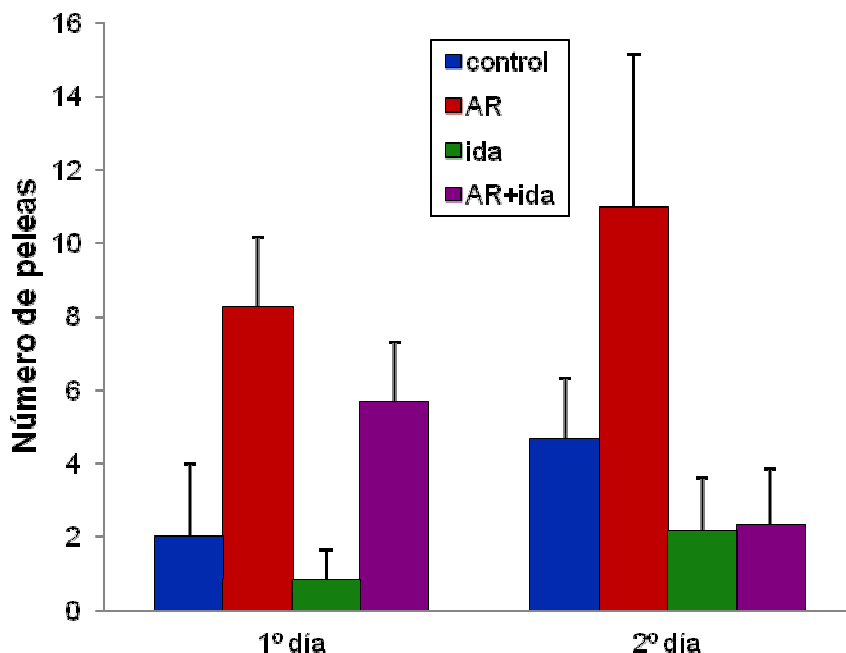


Figura 3.24. Número de peleas que tienen los grupos experimentales ante la presencia de un intruso. La mayor actividad en los enfrentamientos para los dos días las presenta el grupo AR y la menor el grupo ida.

3.1.11. RT-PCR

Con idea de comprobar si se observa un aumento en el número de receptores presinápticos alfa2A, en las áreas del encéfalo de los distintos grupos, después de terminar todos los ensayos, se realiza la RT-PCR. (Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa)

En el cerebelo, el grupo control ($1,00 \pm 0,12$ expresión relativa) presenta más detección de receptores que el resto de los grupos, concretamente un 20% más que los AR ($0,85 \pm 0,21$ expresión relativa), por encima del 600% sobre el grupo ida ($0,16 \pm 0,09$ expresión relativa) presentando diferencias estadísticamente significativas de ($p < 0,01$), y de ($p < 0,001$) con el grupo AR+ida ($0,04 \pm 0,03$ expresión relativa) con el que se diferencia superando el 2350%. El grupo AR+ida muestra también diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) con el grupo AR. Dado que el cerebelo está implicado en la afinidad y modulación de la actividad motora, parece ser que se ve afectado por el fármaco IDA. Ver figura 3.25.

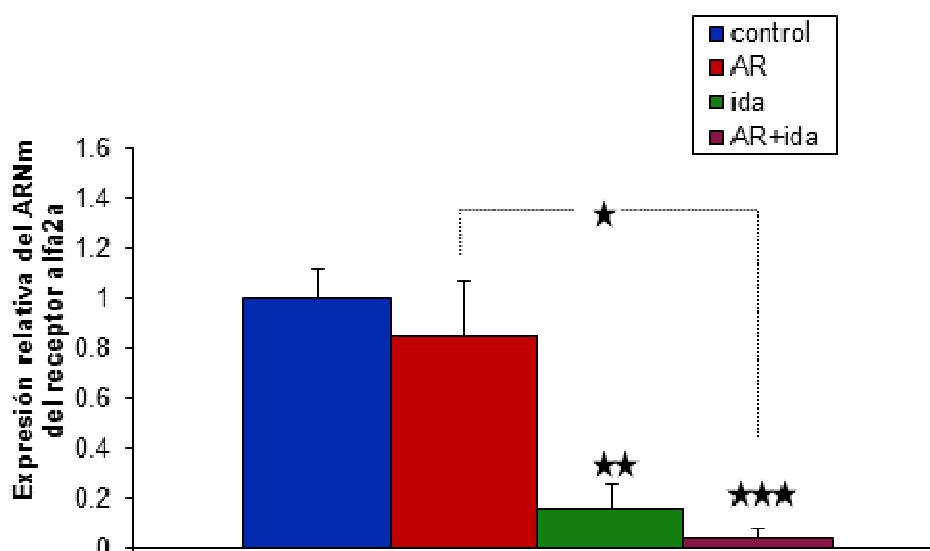


Figura 3.25. Representación, en el cerebelo de los ratones experimentales, de la expresión del receptor Alfa2a. En esta zona del encéfalo parece que afecta el fármaco Idazoxan. Como se puede observar los grupos ida y AR+ida muestran muy baja expresión del receptor.

En el troco del encéfalo (figura 3.26.) se muestra una expresión del receptor del gen menor en el grupo AR ($0,59 \pm 0,13$ expresión relativa) frente a su control ($1,00 \pm 0,13$ expresión relativa). El grupo ida ($1,09 \pm 0,05$ expresión relativa) es el que más expresión muestra y el grupo AR+ida ($0,08 \pm 0,05$ expresión relativa) el que menos, presentando diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,01$) con el grupo control y de ($p < 0,05$) con el grupo AR. Según estos

resultados los animales AR presentan afectado el tronco del encéfalo, con lo que tendrían más problemas en el oído, en el momento de articular los movimientos de escape, y en infinidad de acciones de adaptabilidad, dada la cantidad de nervios craneales localizados en esta zona. Ambiguamente el fármaco Idazoxan disminuye la actividad de esta zona en los AR opuestamente a la actuación del fármaco en los silvestres, aumentando los receptores.

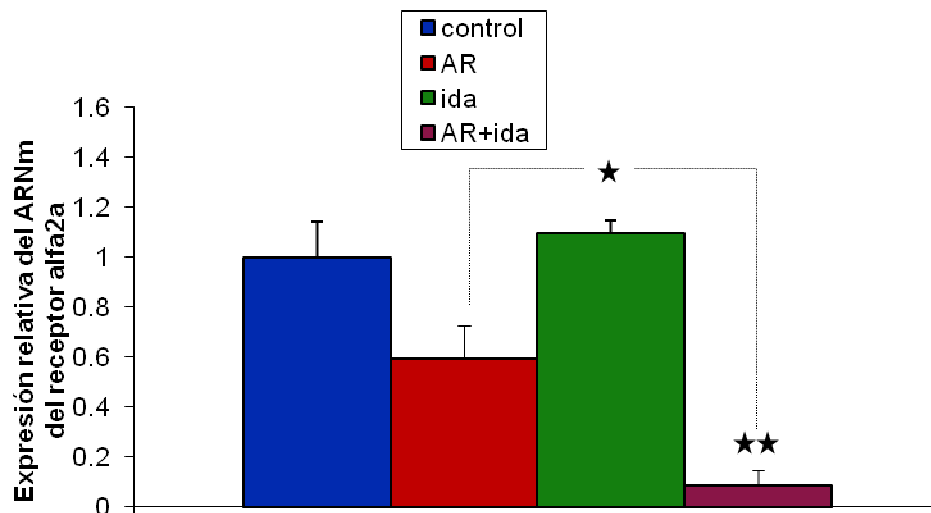


Figura 3.26. Representación, en el tronco del encéfalo, de la expresión del receptor en los distintos grupos experimentales. Parece ser que los ratones retinoicos tienen reducida la actividad en esta zona.

En el hipocampo, ver figura 3.27., el grupo AR ($0,52 \pm 0,14$ expresión relativa) frente al grupo control ($1,00 \pm 0,20$ expresión relativa) muestra menos expresión del receptor. El grupo ida ($1,31 \pm 0,16$ expresión relativa) es el que más expresa este gen. El grupo AR+ida ($0,10 \pm 0,06$ expresión relativa) sigue mostrando poco receptores en esta zona, presentando diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,01$) con el grupo control y con el grupo AR de ($p < 0,05$). Por tanto el hipocampo como zona de memoria y olfativa está disminuida en los AR y aún más en los AR+ida, indicándonos que el fármaco

Idazoxan a los ratones AR le empeora esta actividad. Sin embargo este mismo fármaco parece aumentar la capacidad memorística en los controles con Idazoxan.

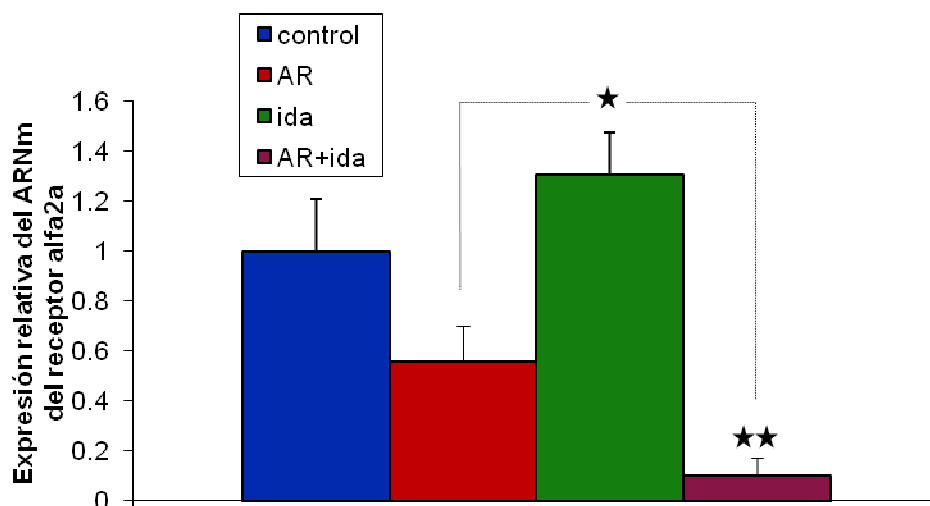


Figura 3.27. Representación, en el hipocampo de los ratones experimentales, de la expresión del receptor. A esta zona del encéfalo puede ser que le afecte el ácido retinoico. Como se puede observar los grupos AR y AR+ida muestran muy baja expresión del receptor. Contrariamente, al grupo ida, podríamos decir que el fármaco Idazoxan le mejora el rendimiento en el hipocampo.

En la corteza cerebral el grupo AR ($0,92 \pm 0,26$ expresión relativa) expresa ligeramente menos el receptor que el grupo control ($1,00 \pm 0,21$ expresión relativa). El grupo ida ($0,21 \pm 0,05$ expresión relativa) baja la expresión del gen respecto al control, presentando con este grupo diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$). El grupo AR+ida ($0,64 \pm 0,29$ expresión relativa) también baja respecto a su control en la expresión del receptor. Atendiendo a estos resultados, el fármaco Idazoxan reduce la expresión del gen en la corteza frontal y el ácido retinoico altera ligeramente esta participación, en una zona donde las funciones ejecutivas, como la atención y resolución de las acciones están implicadas, al igual que la motivación social, la irritabilidad, impulsividad e intolerancia, que pueden producir en el ratón perturbación en sus ejecuciones. Ver figura 3.28.

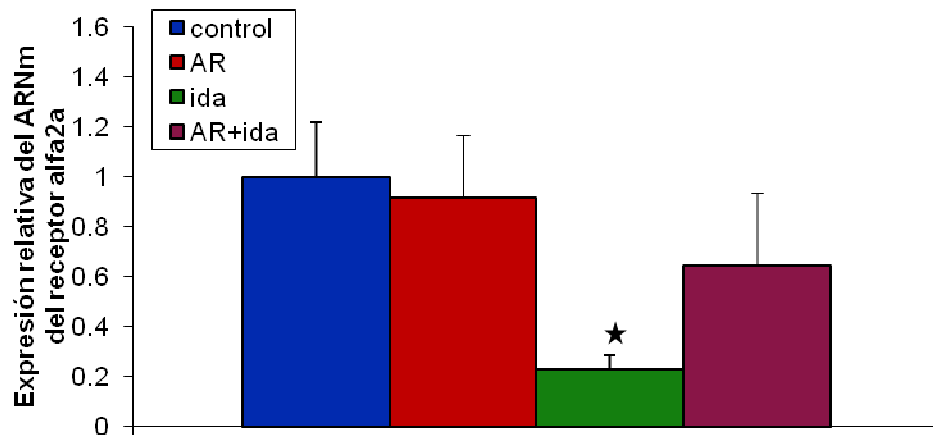


Figura 3.28. Representación en la corteza cerebral de la expresión del receptor en los distintos grupos experimentales. Se observa como el fármaco Idazoxan reduce la actividad en esta zona.

3.2. Ratones Metilfenidato

De igual manera que para los grupos del experimento Idazoxan se pretende determinar en los animales el efecto producido con el tratamiento del estimulante Metilfenidato a bajas dosis, que nos indica el comportamiento en la ejecución de las pruebas.

3.2.1. Marcador de Desarrollo - Peso

La evolución del peso como marcador de desarrollo en el experimento Metilfenidato nos muestra que en todos los grupos los ratones mantienen un buen progreso a lo largo del tiempo que dura el experimento, sin desigualdades importantes. Los ratones del grupo AR se mantienen ligeramente con menor peso que el resto de los grupos, igualándose todos los grupos llegando el final del experimento. No obstante presentan diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) en el quinto mes de vida frente al grupo AR+mf ($41,00 \pm 0,90$ gramos), contra ($35,50 \pm 0,50$ gramos) del grupo AR. Ver figura 3.29.

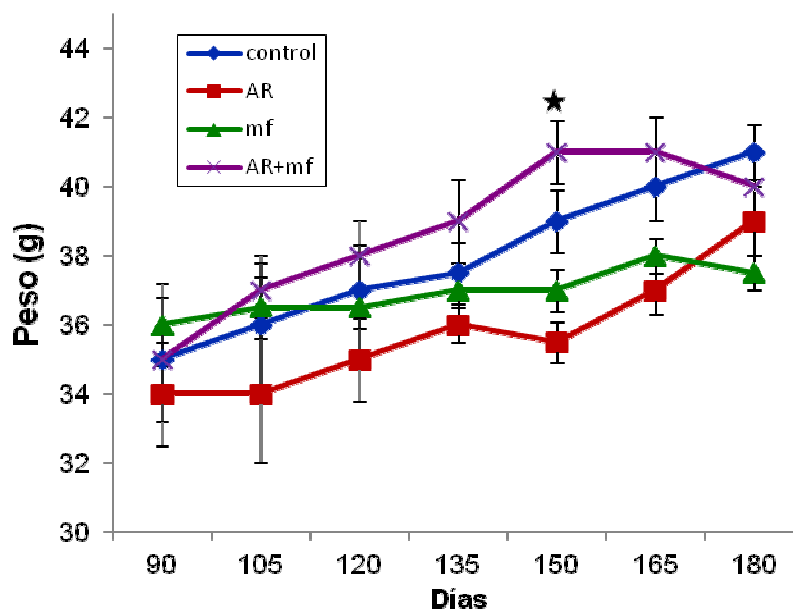


Figura 3.29. Evolución del peso, en gramos, a lo largo del procedimiento experimental. No aparecen diferencias importantes entre los grupos, aunque el grupo AR se mantiene ligeramente por debajo del peso de los demás grupos.

3.2.2. Paca Caliente

La prueba de la placa caliente pone a prueba el sistema sensorial/nociceptivo del ratón, ya que al colocarlo sobre una placa caliente (52,2° C) siente dolor y su comportamiento se orienta a intentar evitar dicho estímulo negativo, respuesta que nosotros medimos.

En la sensibilidad (T1) y muestra de dolor (T2) no existe diferencias significativas en ningún grupo. En la respuesta a la variable T1 los ratones que más aguante presentan son el grupo control y el grupo AR, pero sin diferencias importantes ya que todos los grupos rondan alrededor de los 13 segundos.

Para la respuesta a la variable T2, se observa que la latencia para el grupo control es ($35,07 \pm 9,94$ segundos) indicando que es la mayor latencia de todos los grupos. El siguiente grupo en mostrar resistencia en esta variable es el grupo AR+mf ($30,90 \pm 5,03$ segundos). Por el contrario el grupo AR ($27,67 \pm 4,21$ segundos) y el grupo mf ($25,77 \pm 2,72$ segundos) muestran un tercer intento de fuga algo más rápido. Los resultados se muestran en la figura 3.30.

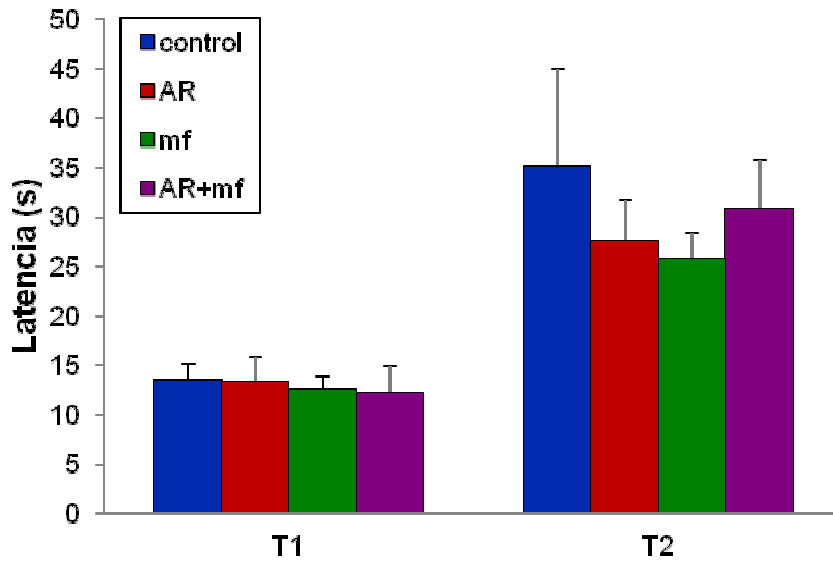


Figura 3.30. Representación de la latencia, en segundos, de los distintos grupos experimentales para las variables T1 y T2 en la prueba de la placa caliente. No aparecen diferencias significativas entre los grupos.

El número de heces en esta prueba (consultar figura 3.31) de respuesta comportamental ante la persistencia del estímulo doloroso, no muestra variabilidad entre los grupos experimentales presentando unos resultados para el grupo control ($0,76 \pm 0,25$ heces) para el grupo AR ($0,83 \pm 0,30$ heces) para el grupo mf ($0,85 \pm 0,25$ heces) y el grupo AR+mf ($0,50 \pm 0,27$ heces).

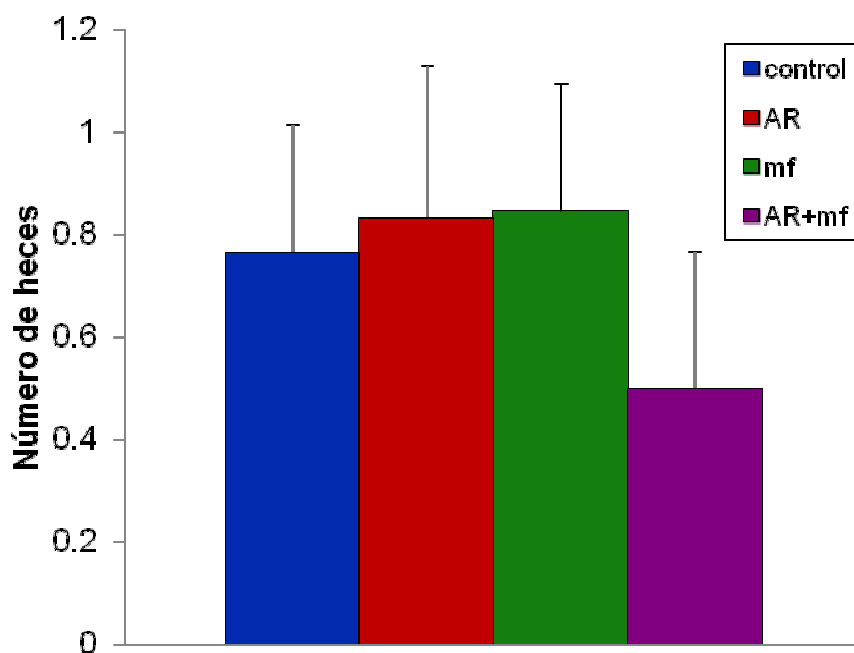


Figura 3.31. Medida del número de heces que presentan los distintos grupos en la prueba de la placa caliente. Los resultados nos muestran una igualdad entre los grupos control, AR y mf, con mayores valores que el grupo AR+mf.

3.2.3. Actímetro

Con esta prueba se mide la capacidad exploratoria o la actividad motora general de los ratones. La medida de la actividad, dada por los cortes de los haces de luz infrarroja, se representa de modo acumulado a lo largo del tiempo, en 10 minutos, medidos en diferentes tiempos parciales.

La actividad motora de todos los grupos sigue una trayectoria ascendente tal como se muestra en la figura 3.32. Según aumenta la permanencia en el perímetro de medida, el grupo con más actividad es el control ($4744,44 \pm 284,21$ cortes), presentando diferencias estadísticamente significativas de ($p < 0,05$) a los dos minutos y de ($p < 0,001$) a los cinco y diez minutos con el grupo AR ($3166,00 \pm 257,58$ cortes) que es el que menos actividad muestra.

El grupo AR+mf ($3563,20 \pm 288,02$ cortes) también presenta diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,01$) a los dos, cinco y diez minutos con el grupo control. El grupo mf ($4052,92 \pm 442,40$ cortes) mantiene su actividad ligeramente por debajo del grupo control.

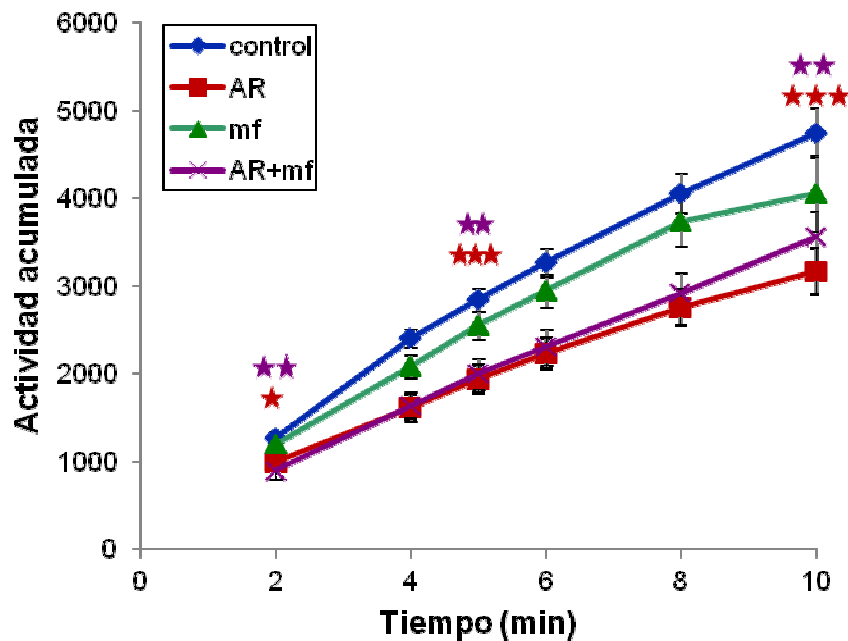


Figura 3.32. Representación de la actividad exploratoria acumulada de los grupos experimentales a los 2, 4, 5, 6, 8 y 10 minutos. En conjunto, la actividad exploratoria es mayor en los animales del grupo control que en los demás grupos, observando cierta tendencia a la hipoactividad en los grupos AR y AR+mf, a pesar de estar bajo efecto del ácido retinoico.

Además de la actividad acumulada, otra de las variables estudiadas en la prueba de campo abierto es la actividad mostrada en el centro del actímetro, utilizándose ésta como medida de la ansiedad en los ratones. En la figura 3.33 se muestra el porcentaje del tiempo total que los animales permanecen en el centro del actímetro, a los 5 y 10 minutos de la prueba. Se puede observar como a los 5 minutos no hay diferencias significativas entre los grupos en la actividad en el centro, manteniéndose entre el 6 y el 9,5%. Al final de los 10 minutos son los animales del grupo control ($8,44 \pm 1,15$ %) los que permanecen menor tiempo en el centro del aparato. Mientras, el grupo AR ($10,61 \pm 2,68$ %) y el grupo AR+mf ($10,79 \pm 3,23$ %) son los que visitan mayor tiempo el centro del actímetro.

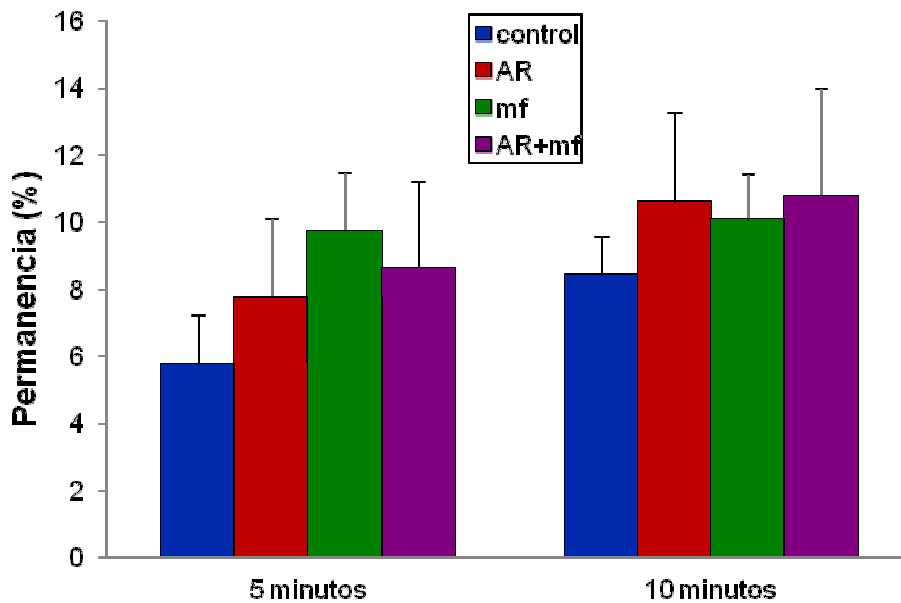


Figura 3.33. Representación de la actividad en el centro, medida en porcentaje de latencia de tiempo, a los 5 y 10 minutos. Los grupos experimentales mostraron resultados aproximados en la prueba de campo abierto.

Los datos de las heces en la prueba del actímetro mostraban un comportamiento similar en los grupos control ($5,88 \pm 1,19$ heces), AR ($7,12 \pm 1,58$ heces) y AR+mf ($6,95 \pm 2,12$ heces). Sin embargo, el grupo mf ($11,22 \pm 3,38$ heces) es el que más defecaciones muestra, presentando diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,001$) con el grupo control. Ver figura 3.34.

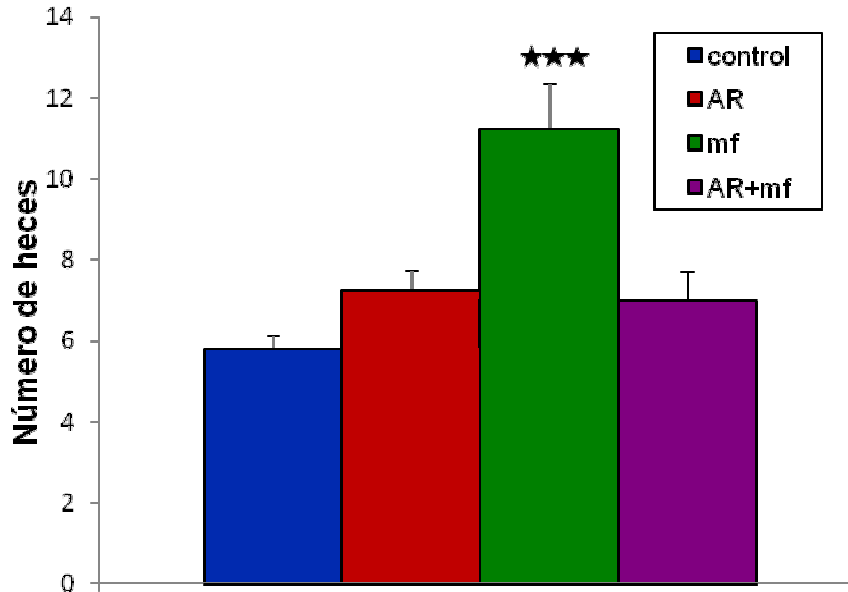


Figura 3.34. Representación de la medida del número de heces en la prueba del actímetro. El grupo mf presenta una cantidad superior que el resto de los grupos experimentales, que presentan una actividad defecadora semejante.

3.2.4. Respuestas de Sobresalto

Se aplicó esta técnica, de cara a analizar posibles modificaciones en la respuesta de sobresalto sola, así como modificaciones en el porcentaje de inhibición al presentar un pre-pulso. En la prueba de sobresalto, la latencia de respuesta es el tiempo que tarda el ratón en reaccionar tras emitirse el sonido.

La respuesta al estímulo auditivo medida en tiempo de respuesta, se presenta en todos los grupos en torno a 12 ms, superando ligeramente esta latencia el grupo AR+mf ($13,66 \pm 0,88$ ms). Ver figura 3.35.

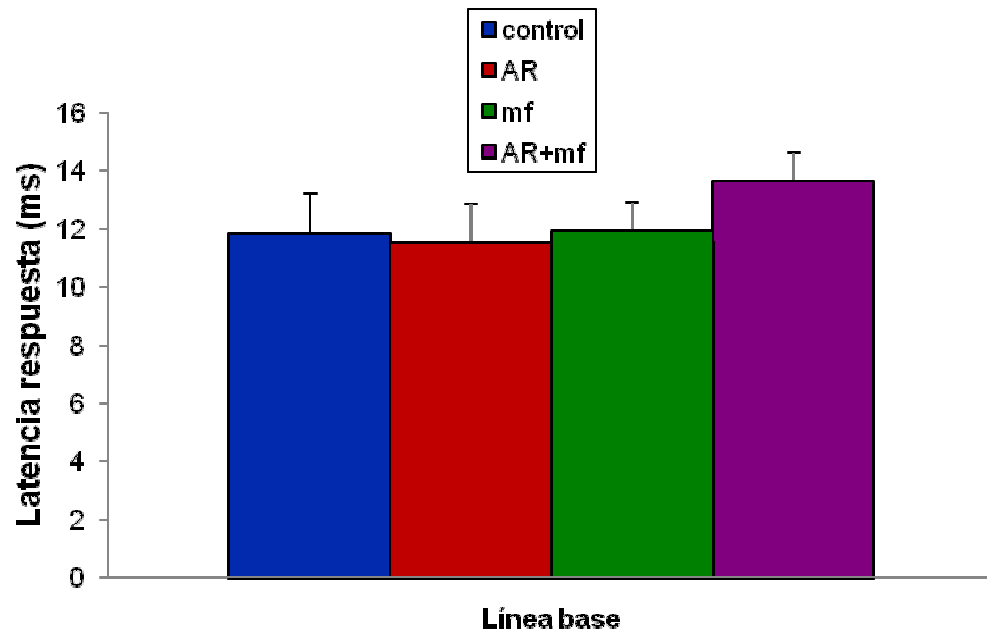


Figura 3.35. Representación de la latencia de respuesta de los grupos experimentales, medida en milisegundos, que tarda en reaccionar el ratón tras emitirse un sonido. Los ratones del grupo AR+mf presentan un ligero (no significativo) incremento en la latencia de respuesta.

La intensidad de la respuesta es la medida de la fuerza que ejerce el ratón sobre la superficie al provocarle el reflejo de sobresalto con un estímulo acústico (sonido). Se mide en milinewton por centímetro cuadrado. El resultado de la intensidad de la respuesta en el valor pico muestra que el grupo control ($9,87 \pm 3,71$ mN/cm²) y el grupo AR+mf ($10,18 \pm 2,95$ mN/cm²) son los que más intensidad presentan frente al grupo AR ($4,66 \pm 0,92$ mN/cm²) y al grupo mf ($5,59 \pm 2,04$ mN/cm²), pero sin llegar a ser diferencias significativas. Resultados mostrados en la figura 3.36.

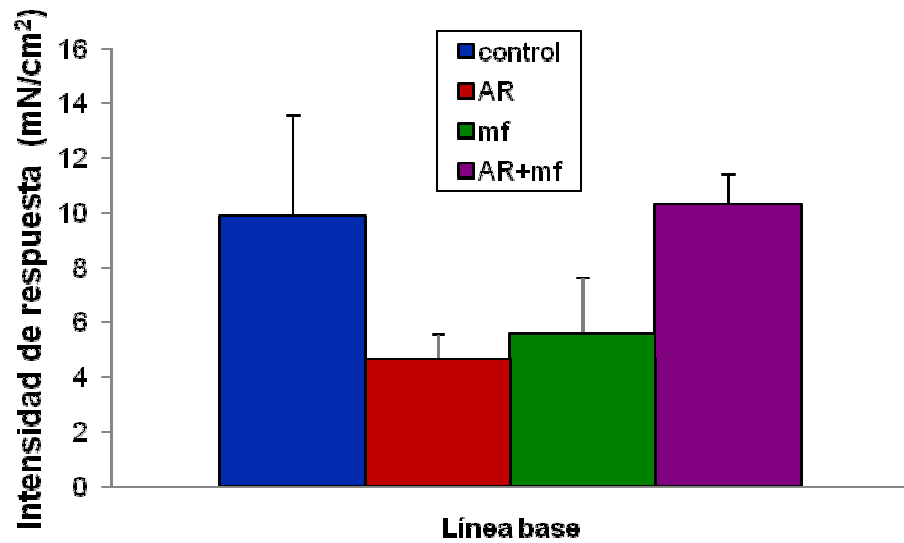


Figura 3.36. Intensidad de la respuesta pico de sobresalto frente a la línea basal de cada grupo, representada en la fuerza que ejerce el ratón sobre la plataforma. La reacción ante esta prueba para el grupo control y el grupo AR+mf es superior que el resto de los grupos que se muestran similares.

La otra variable estudiada es el área de respuesta (figura 3.37.), donde se observa como el grupo control ($13,57 \pm 4,00$ mN/cm²) y el grupo AR+mf ($12,27 \pm 1,84$ mN/cm²) se muestran superiores en intensidad de respuesta al grupo AR ($7,14 \pm 1,15$ mN/cm²) y al grupo mf ($6,91 \pm 1,49$ mN/cm²) sin llegar a ser significativas.

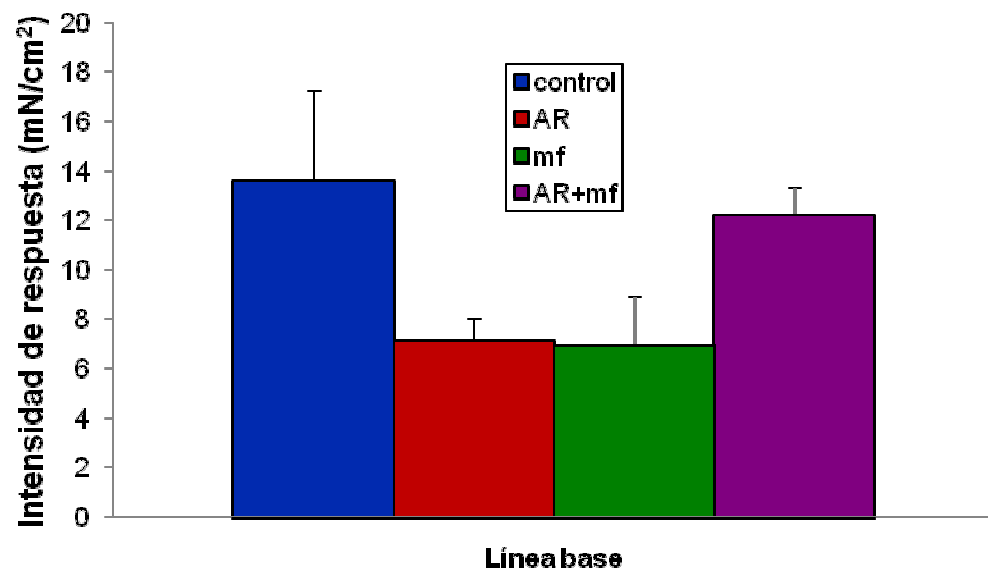


Figura 3.37. Representación del área de respuesta frente a la línea basal de cada grupo en la prueba de sobresalto. Los grupos control y AR+mf vuelven a mostrar más respuesta que los otros grupos.

La inhibición por prepulso con respecto a la línea base muestra la respuesta de los distintos grupos ante un estímulo auditivo que se presenta precedido por un sonido más leve. Ver figura 3.38. Se observa un resultado igualado en el porcentaje del valor pico en todos los grupos. El grupo control ($34,96 \pm 13,73$ %) y el grupo mf ($41,15 \pm 9,46$ %) son los que menos inhibición presentan, no así los grupos AR ($47,76 \pm 7,16$ %) y AR+mf ($47,57 \pm 12,85$ %) que aumenta la inhibición, pero sin diferencias significativas.

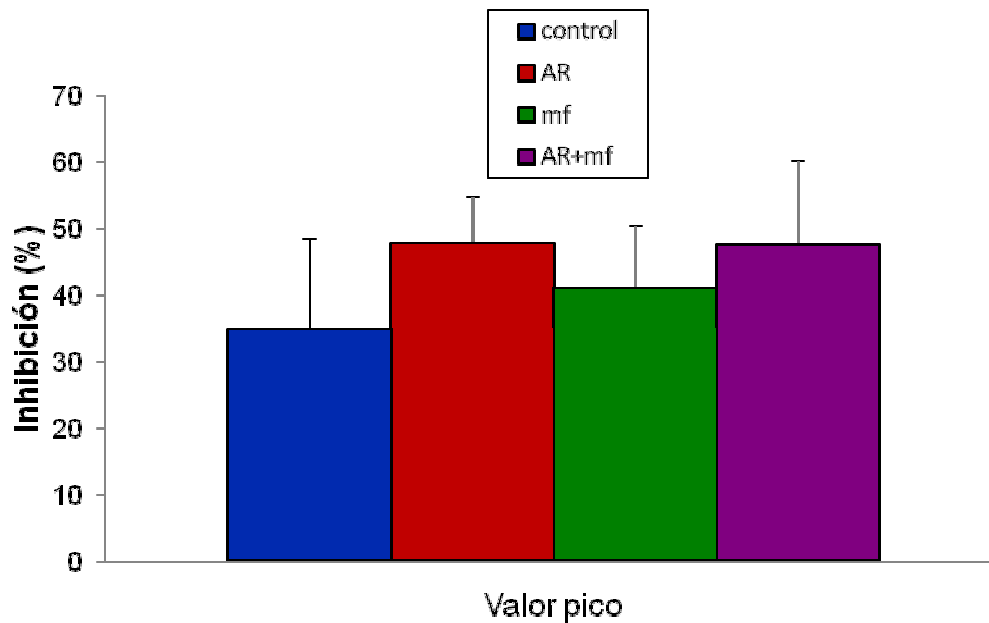


Figura 3.38. Porcentaje de inhibición, en valor pico, que presentan los distintos grupos ante un estímulo auditivo que se presenta precedido por un sonido más leve, que debe llamar la atención de los ratones para anteponerse al sobresalto y disminuir la respuesta. La respuesta más inhibida la presentan los grupos control y mf.

3.2.5. Cilindro Rotatorio

El propósito de esta prueba es evaluar la coordinación sensitivomotora del roedor. La prueba es sensible a los daños en el sistema nervioso y al efecto de algunas drogas. A lo largo de la prueba y sus distintos ensayos todos los grupos van disminuyendo la cantidad de caídas. En el primer día el número de caídas de los grupos control, AR y mf estaba entre cuatro y cinco, sin embargo el grupo AR+mf ($2,60 \pm 0,67$ caídas) es por tanto el grupo que menos se cae del cilindro.

El segundo día todos los grupos presentan una reducción de caídas respecto al primer día, mostrando similar número de caídas los grupos control ($2,48 \pm 0,43$ caídas), AR ($2,47 \pm 0,53$ caídas) y mf ($2,44 \pm 0,39$ caídas). El grupo AR+mf ($0,83 \pm 0,21$ caídas) presenta diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) con el grupo control y el grupo AR, siendo el que menos número de caídas muestra.

El tercer día los grupos siguen reduciendo el número de caídas. El grupo control ($0,96 \pm 0,22$ caídas) el grupo AR ($1,72 \pm 0,35$ caídas) y el grupo mf

($1,26 \pm 0,26$ caídas). El grupo AR+mf ($0,27 \pm 0,10$ caídas) sigue presentando diferencias significativas ($p < 0,05$) frente al grupo control y el grupo AR y sigue siendo el que menos número de caídas tiene, no solo en los diferentes días, sino en toda la prueba. Figura 3.37.

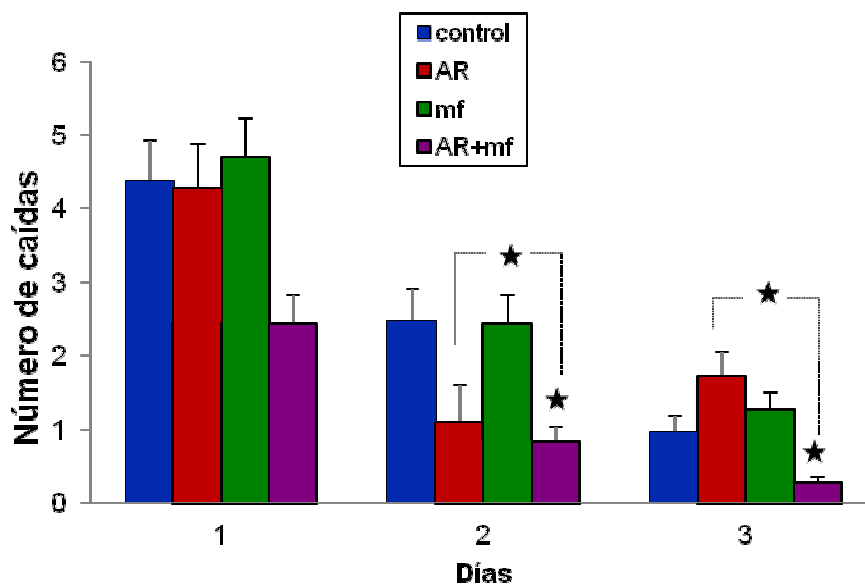


Figura 3.39. Número de caídas del cilindro rotatorio en los tres días que dura esta prueba. Todos los grupos muestran mejoría a lo largo de la prueba, concretamente el grupo AR+mf es el que más lo hace.

En las respuestas pasivas en el cilindro rotatorio, el primer día, el grupo que más respuestas presenta es el grupo control ($0,70 \pm 0,24$ respuestas pasivas) y el grupo AR+mf ($0,70 \pm 0,20$ respuestas pasivas). Este último presenta diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) con el grupo AR ($0,14 \pm 0,07$ respuestas pasivas) que es el que menos respuestas pasivas presenta. El grupo mf ($0,28 \pm 0,08$ respuestas pasivas) también muestra una baja tasa de respuestas pasivas. El segundo día de prueba, todos los grupos están en torno a 0,6 de respuestas pasivas. El tercer día, el grupo control ($1,04 \pm 0,19$ respuestas pasivas) es el grupo que más respuestas presenta, encontrando diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) con el grupo AR ($0,40 \pm 0,12$ respuestas pasivas) que es el grupo que presenta menos. El grupo mf ($0,58 \pm 0,12$ respuestas pasivas) y el grupo AR+mf ($0,67 \pm 0,23$ respuestas pasivas) se comportan de manera semejante al día anterior. Ver figura 3.40.

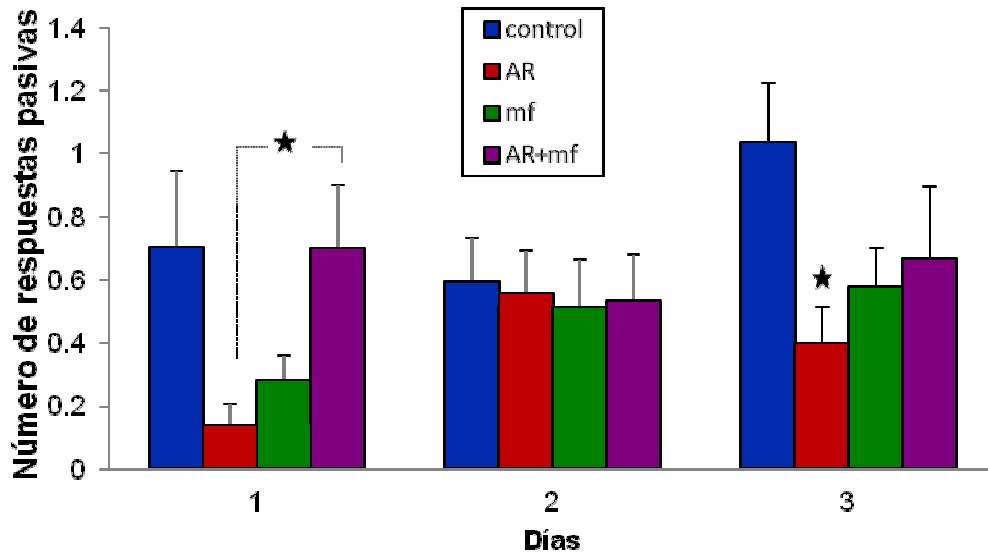


Figura 3.40. Número de respuestas pasivas, sobre el cilindro rotatorio, en los tres días que transcurre la prueba. En ella se muestra como el grupo AR presenta diferencias el primer día con el grupo AR+mf y el tercer día con el grupo control.

El número de giros sobre el cilindro rotatorio, ver figura 3.41, muestra, para el primer día, que el grupo control ($0,63 \pm 0,15$ giros) es el que menos giros presenta y el grupo AR ($1,50 \pm 0,37$ giros) el que más. Los valores para el grupo mf ($0,95 \pm 0,20$ giros) y AR+mf ($1,33 \pm 0,27$ giros) son intermedios.

Para el segundo día, el grupo control ($1,41 \pm 0,29$ giros) aumenta esta conducta respecto al día anterior. Los demás grupos mantienen valores equivalentes al primer día, siendo estos valores para el grupo AR ($1,60 \pm 0,31$ giros), para el grupo mf ($1,12 \pm 0,28$ giros) y para el grupo AR+mf ($1,61 \pm 0,42$ giros).

En el tercer día aumenta el número de giros en todos los grupos, para el grupo control ($1,89 \pm 0,37$ giros), el grupo AR ($2,89 \pm 0,65$ giros) es el que más incrementa la diferencia con los días anteriores. El grupo mf ($1,72 \pm 0,27$ giros) es el grupo que menos giros presenta este día y el grupo AR+mf ($2,33 \pm 0,55$ giros) sigue incrementando el número de giros. No aparecen diferencias significativas, en ningún grupo en el número de giros en toda la prueba.

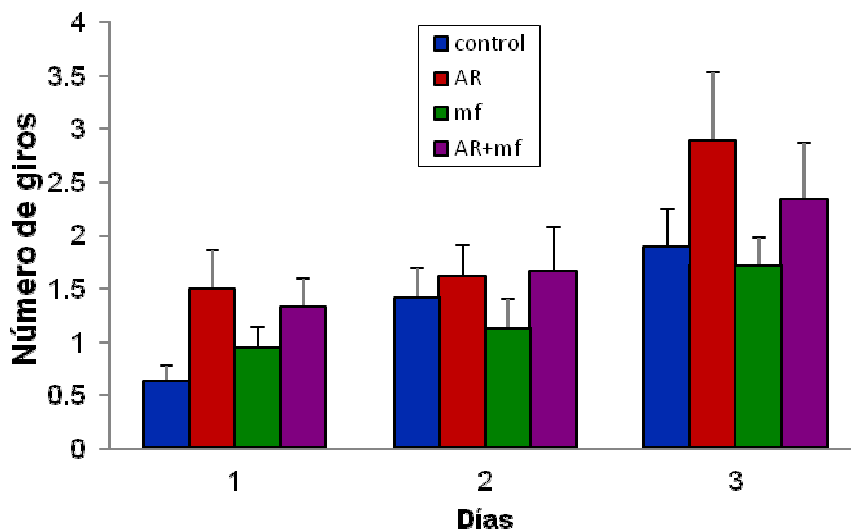


Figura 3.41. Representación del número de giros sobre el cilindro rotatorio, durante los tres días que transcurre la prueba. El grupo AR es el que más giros realiza en toda la prueba.

El comportamiento en el porcentaje de éxito, dado como la efectividad en el cilindro rotatorio sin caídas, muestra una mejora progresiva en todos los grupos, según pasan los días (ver figura 3.42).

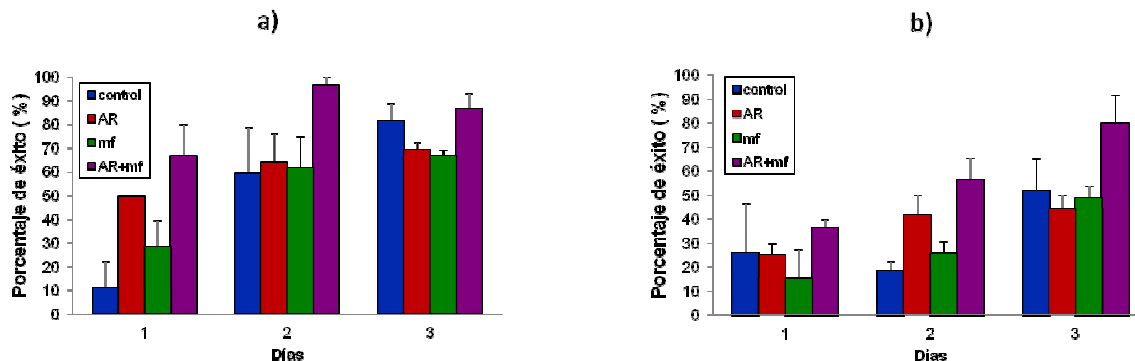


Figura 3.42. En esta figura se muestra las dos variables analizadas en la prueba del porcentaje de éxito, ratones que no se caen respecto al número total de ratones. (a) Representación del primer minuto de los tres días de prueba. (b) Representación del segundo al quinto minuto. El grupo AR+mf muestra mayor éxito en el total de la prueba.

La prueba es dividida en dos variables, caídas en el primer minuto y caídas desde el segundo al quinto minuto. Los animales que más éxito presentan, en el primer minuto, los tres días, es el grupo AR+mf que llega a estar cerca del $(96 \pm 3,33 \%)$ en el segundo día. El grupo control $(11,11 \pm 11,11 \%)$ en el primer minuto del primer día, alcanza el $(81,48 \pm 7,40 \%)$ el tercer día. El grupo

AR ($50,00 \pm 3,33$ %) el primer día, logra el ($70,00 \pm 2,77$ %) en el tercer día. El grupo mf ($28,21 \pm 11,17$ %) para el primer día, presenta ($66,67 \pm 2,56$ %) para el tercer día.

En la variable que mide el tiempo desde el segundo minuto al quinto, todos los grupos mejoran en el desarrollo de la prueba, aunque el grupo control el segundo día muestra una ligera disminución, que en el tercer día se ve superada. El grupo AR+mf ($87,00 \pm 6,66$ %) es el que más éxito muestra en esta prueba. Los demás grupos llegan alrededor del 50%.

El número de heces que los ratones producen en la prueba del cilindro rotatorio, indica que para el segundo día existen diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre el grupo AR y el grupo AR+mf y entre éste y el grupo control de ($p < 0,01$). Para el tercer día, las diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) las presenta el grupo mf frente al grupo control. Figura 3.43.

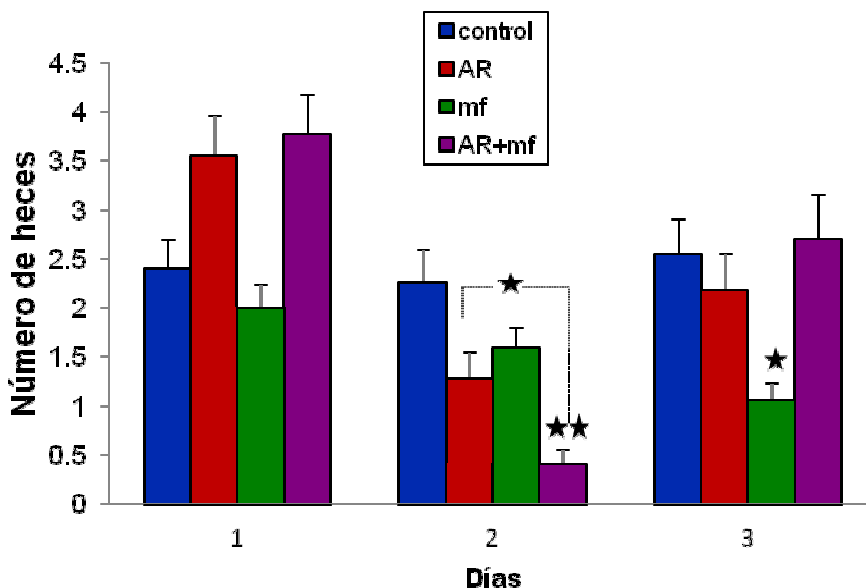


Figura 3.43. Número de heces de cada grupo en los tres días que transcurre la prueba del cilindro rotatorio.

3.2.6. Cinta Giratoria

El comportamiento en esta prueba de resistencia muestra que existen diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) del grupo AR ($1575,83 \pm$

91,02 segundos) frente al grupo control ($1320,83 \pm 46,25$ segundos) y de éste con el grupo mf ($1598,43 \pm 61,45$ segundos) de ($p < 0,01$). El grupo AR+mf ($1129,33 \pm 210$ segundos) es el que menos tiempo aguanta en la cinta giratoria, (figura 3.44.).

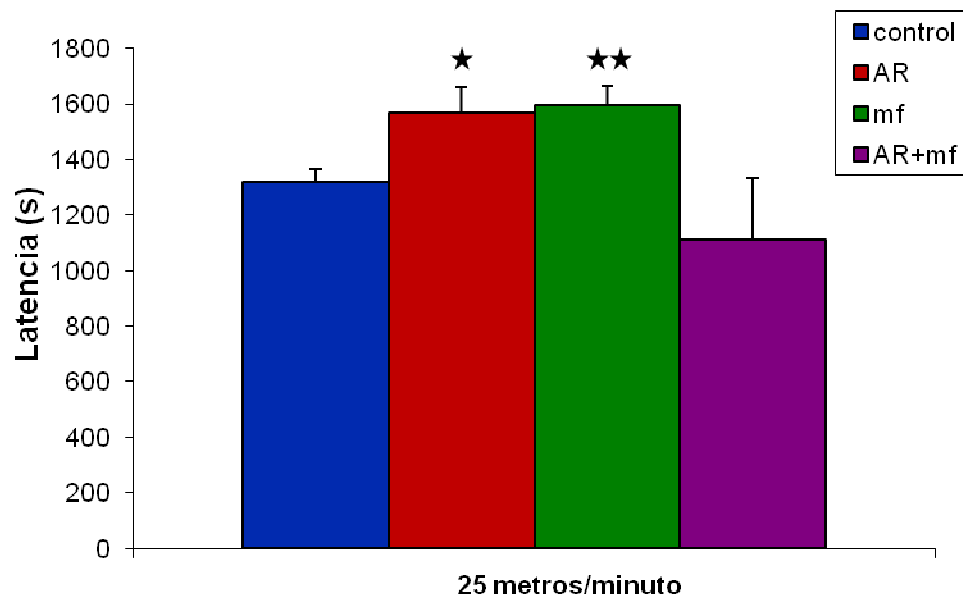


Figura 3.44. Representación del tiempo, en segundos, que se mantienen los ratones en la cinta a una velocidad de 25 metros/minuto siendo la inclinación 5°. Para esta prueba los ratones del grupo AR y del grupo mf son los más efectivos.

3.2.7. Reconocimiento de Objetos

Con esta prueba se muestra la exploración hacia los distintos objetos, con la inclinación que cada grupo de ratones tenga hacia alguno de ellos y se mide la capacidad del animal para explorar un objeto novedoso en un contexto conocido. En el índice de reconocimiento, el entrenamiento, presenta una ligera predisposición al objeto izquierdo (objeto conocido) para el grupo control, los demás grupos prefieren ligeramente el objeto nuevo (derecha). En la prueba de memoria a corto plazo, todos los grupos se inclinan a reconocer más el objeto conocido, especialmente el grupo AR (32 ± 3 %) encontrando diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) con el grupo control (65 ± 3 %) que se inclina por el objeto novedoso, presentando igualmente diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) con el grupo mf (38 ± 2 %). El grupo AR+mf (44 ± 4 %) muestra diferencias estadísticamente significativas con el

grupo AR. En la sesión de memoria a largo plazo, todos los grupos menos el control siguen prefiriendo el objeto conocido, mostrándose con valores equivalentes entre ellos, mostrando todas diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) frente al grupo control, con los siguientes índices: AR ($37 \pm 3 \%$), mf ($34 \pm 4 \%$), AR+mf ($37 \pm 4 \%$), figura 3.45.

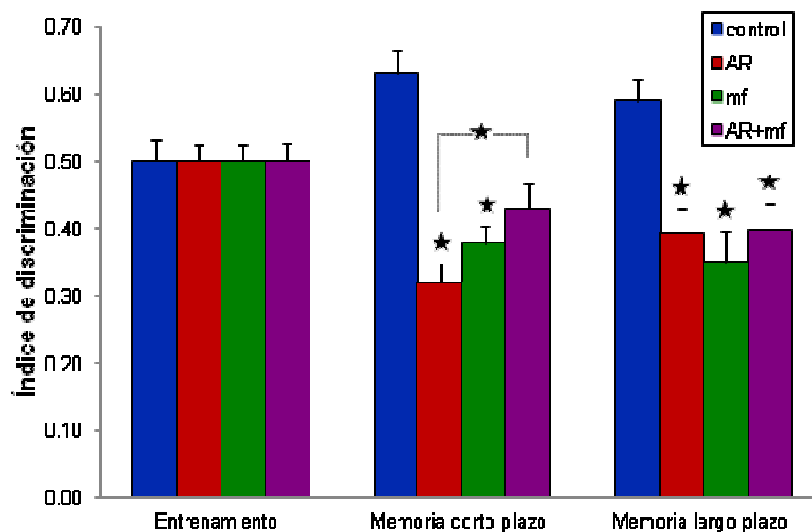


Figura 3.45. Gráfica normalizada de reconocimiento de objetos, en la que se tiene en cuenta los valores que presentan los distintos grupos en el entrenamiento para representar las siguientes etapas de la prueba. Valorado en porcentajes. Se pretende analizar la capacidad atencional y memorística de los ratones. El resultado tanto en la memoria a corto plazo como a largo plazo es la preferencia por el objeto conocido en todos los grupos.

Otra de las variables que se analizan en esta prueba es el número total de contactos realizados por cada grupo en las distintas sesiones. En el entrenamiento, el grupo control ($26,56 \pm 2,16$ contactos) presenta mayor número de contactos que los otros grupos, con diferencias estadísticamente

significativas ($p < 0,05$) con el grupo mf ($19,42 \pm 1,98$ contactos). El grupo AR y el grupo AR+mf están los dos en torno a 24 contactos.

En la memoria a corto plazo, el grupo mf ($22,42 \pm 4,18$ contactos) amplía el número de contactos respecto al entrenamiento, los grupos restantes disminuyen el número de contactos en relación a la sesión de entrenamiento, especialmente el grupo AR+mf ($15,00 \pm 2,86$ contactos).

En la memoria a largo plazo, el grupo que más contactos realiza es el control ($23,69 \pm 2,51$ contactos) encontrando diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) frente a todos los grupos, que se mantienen en torno a 16 contactos. Figura 3.46.

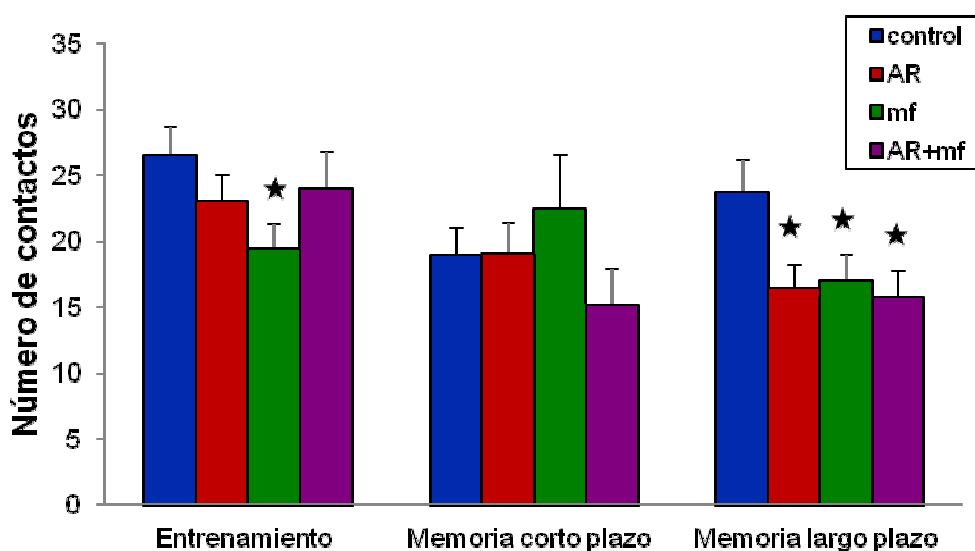


Figura 3.46. Número total de contactos realizados por cada uno de los grupos experimentales en las distintas sesiones de reconocimiento de objeto. En general los grupos reducen el número de contactos con los objetos a lo largo de la duración de la prueba.

La última variable estudiada en la prueba de reconocimiento de objetos es el número de heces que cada grupo experimental realiza durante las distintas sesiones. Tanto en el entrenamiento como en la sesión de memoria a corto plazo no aparecen diferencias significativas entre los grupos. En la sesión de memoria a largo plazo, el grupo AR ($2,83 \pm 0,47$ heces) y el grupo AR+mf ($3,10 \pm 0,43$ heces) presentan diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

Los valores para el grupo mf son ($1,83 \pm 0,59$ heces). Los grupos en general reducen la cantidad de deposiciones a lo largo de la prueba. Ver figura 3.47.

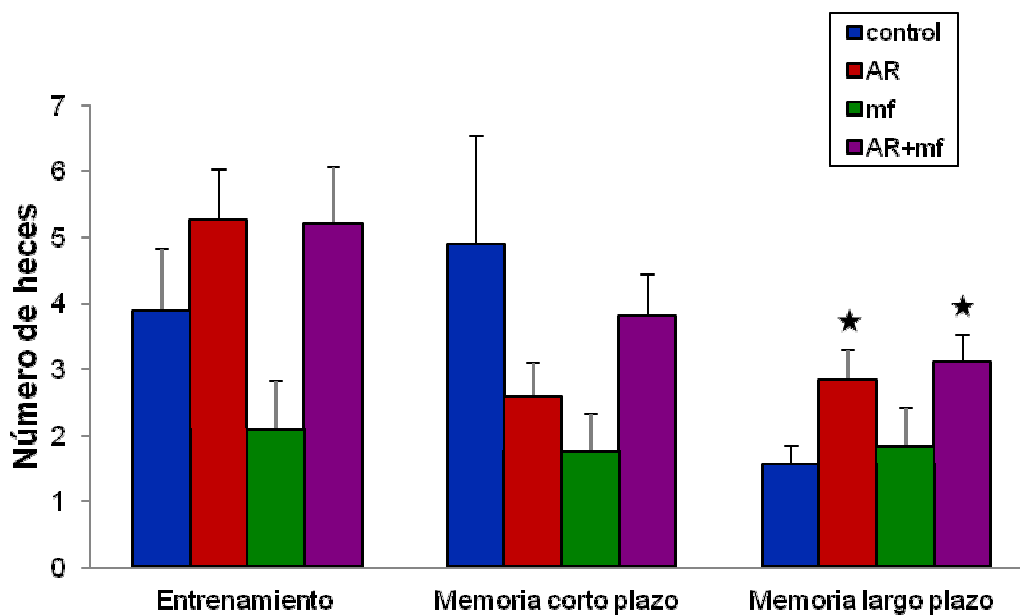


Figura 3.47. Número de heces presentadas, por cada grupo, en las diferentes sesiones de la prueba de reconocimiento de objetos. Se muestran las diferencias estadísticamente significativas del grupo AR y AR+mf frente al grupo control en la sesión de memoria a largo plazo. En general todos los grupos reducen el número de heces a lo largo de la prueba.

3.2.8. Evitación Pasiva

La respuesta de los ratones al estímulo aversivo se mide con la prueba de la evitación pasiva. En la fase de entrenamiento (de descarga), el grupo que más latencia presenta al entrar en la cámara oscura es el grupo control ($43,56 \pm 26,86$ segundos). La latencia para el grupo AR es ($12,10 \pm 2,03$ segundos) y para el grupo mf ($39,58 \pm 17,09$ segundos). El grupo que más rápido entra en la cámara oscura es el AR+mf ($10,54 \pm 2,48$ segundos).

En la sesión de memoria a corto plazo, todos los grupos retrasan el periodo de latencia al entrar en la cámara oscura en relación al entrenamiento. El grupo que entra en la cámara oscura más rápido es el grupo AR+mf ($42,20 \pm 16,48$ segundos) presentando diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) con el grupo control ($123,69 \pm 25,92$ segundos), que es el grupo que más retrasa la entrada en la cámara. El grupo AR ($82,62 \pm 24,27$ segundos) es el grupo que más diferencia presenta al entrar en la cámara oscura respecto al

entrenamiento. La latencia de entrada en la cámara oscura para el grupo mf es ($74,55 \pm 20,70$ segundos).

En la sesión de memoria a largo plazo, aunque demoran más la entrada que en el entrenamiento, todos los grupos reducen el tiempo de entrada en la cámara oscura en relación a la memoria a corto plazo, excepto el grupo AR+mf ($59,34 \pm 21,59$ segundos). El grupo mf ($33,73 \pm 9,51$ segundos) presenta diferencias estadísticamente significativas con el grupo control ($100,09 \pm 25,56$ segundos), que de nuevo es el que más tarda en entrar en la cámara oscura. La latencia para el grupo AR es ($46,36 \pm 20,09$ segundos). Figura 3.48.

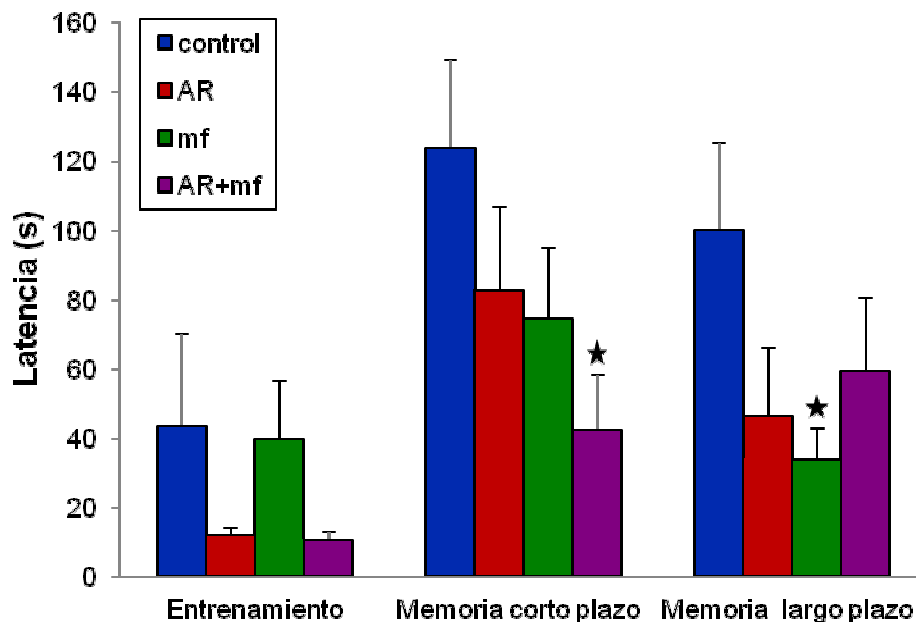


Figura 3.48. Latencia, en segundos, que tardan los diferentes grupos experimentales en entrar en la cámara oscura. En el primer ensayo (entrenamiento) reciben un choque eléctrico al entrar y deben recordarlo en los siguientes ensayos de memoria a corto plazo y memoria a largo plazo, donde no reciben ninguna descarga eléctrica.

3.2.9. Condicionamiento Clásico

Se estudia la capacidad de aprendizaje de los grupos experimentales mediante el condicionamiento clásico del reflejo palpebral, usando un paradigma de huella o traza.

La curva de aprendizaje, medido éste como porcentaje de aparición de respuestas condicionadas por sesión de condicionamiento de los animales

experimentales, muestra un aumento en el porcentaje de respuestas condicionadas en el grupo control, desde el primer día en que reciben el par de estímulos hasta llegar a un máximo en torno al 50% de respuestas en la sesión C7, que sobre el porcentaje de respuestas de la habituación supera el 50%, presentando una media de 41%. A partir de ahí, con la extinción comienza el decremento en el porcentaje de dichas respuestas.

Al abordar el estudio de las respuestas obtenidas en los otros tres grupos nos encontramos que éstos presentan una media entorno al 23% de respuestas condicionadas. En cuanto a las diferencias estadísticamente significativas aparecen en el grupo AR frente al grupo control en las sesiones C1 ($p < 0,05$), C2 ($p < 0,01$), C4 ($p < 0,001$) y en C7 ($p < 0,001$). El grupo mf frente al grupo control presenta diferencias estadísticamente significativas en C4 ($p < 0,01$) y en C5 ($p < 0,001$), y el grupo AR+mf también presenta diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,01$) frente al grupo control en C6 y C7. Ver figura 3.49.

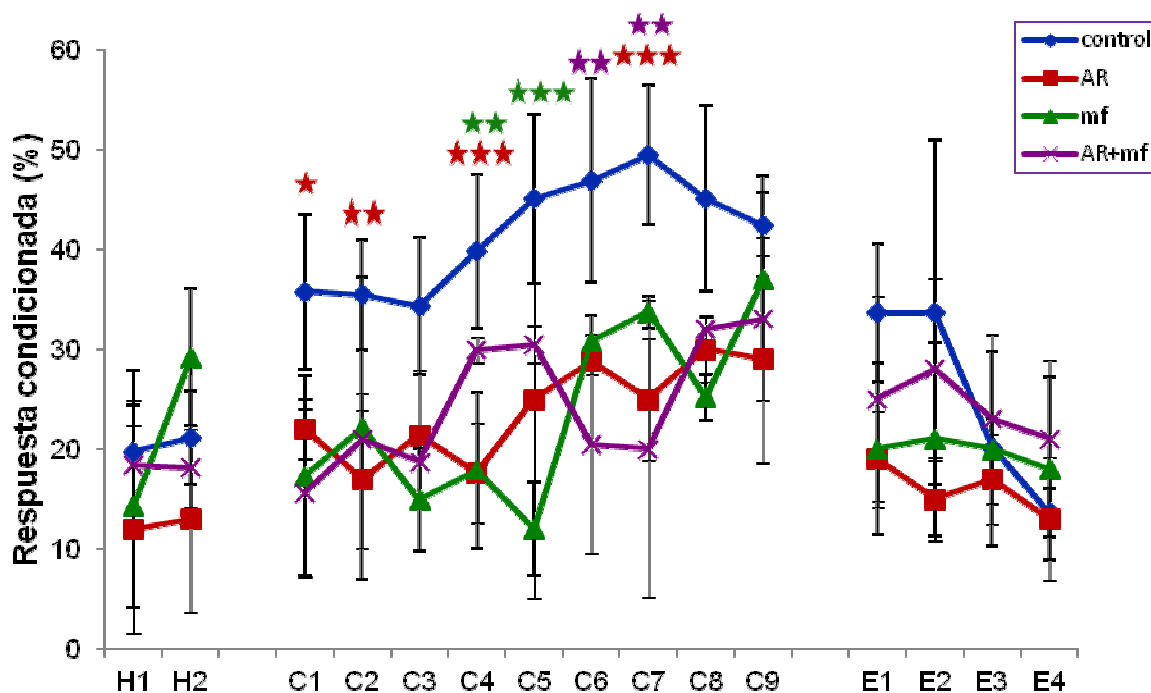


Figura 3.49. Curvas de aprendizaje asociativo de los cuatro grupos de ratones. Se muestra la evolución temporal del porcentaje de respuestas condicionadas, durante un condicionamiento con el paradigma de traza (choque eléctrico-choque eléctrico). Cada punto representa el valor medio de porcentaje, obtenido durante las sucesivas sesiones diarias, de aprendizaje por grupo. Vemos como el grupo control presenta un número mayor de respuestas que los demás grupos.

3.2.10. Intruso

En la figura 3.50 se muestra la respuesta a la presencia repentina de un intruso. La primera vez que se huelen, presentan diferencias significativas ($p < 0,01$) el grupo control ($10,44 \pm 1,96$ segundos) frente al grupo AR+mf ($2,90 \pm 0,82$ segundos), que es el grupo que menos tiempo tarda en ejecutar la conducta de olfatearse. El grupo AR ($16,00 \pm 5,91$ segundos) es el grupo que más retrasa esta conducta. La latencia para el grupo mf es ($8,46 \pm 3,79$ segundos).

El segundo día, sin diferencias significativas entre ningún grupo, la latencia para los grupos control, AR y AR+mf muestra un resultado equivalente en torno a 13 segundos. El grupo mf ($30,38 \pm 10,19$ segundos) es el grupo que más

retrasa esta conducta, aumentando destacadamente la latencia en relación al primer día.

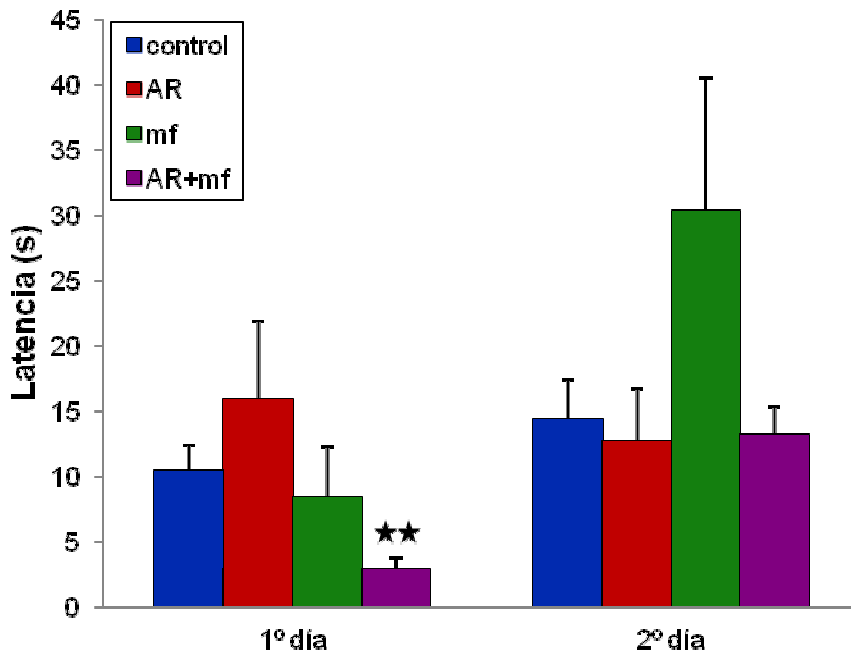


Figura 3.50. Representación de la conducta de olfateo que presentan los ratones en los dos días que transcurre la prueba. Como puede observarse el grupo de ratones AR es el que más demora la conducta de acercarse al ratón intruso en el primer día y el grupo AR+mf por el contrario, es el que más rápido realiza esta conducta. Para el segundo día los ratones que más retrasan la conducta de olfateo son los del grupo mf.

Otra de las variables analizadas en esta prueba es la primera vez que se pelean. En el primer día, los ratones que actúan más rápidamente en esta conducta son el grupo AR+mf ($150,20 \pm 35,88$ segundos) y el grupo control ($227,00 \pm 34,32$ segundos) el que más tarda en ejecutar este comportamiento.

Para el segundo día los grupos control ($157,20 \pm 57,90$ segundos), AR ($166,11 \pm 40,10$ segundos) y AR+mf ($131,63 \pm 44,00$ segundos) reducen la latencia en la primera vez que se pelean con respecto al primer día. No así el grupo mf ($198,50 \pm 38,70$ segundos) que la aumenta respecto al primer día. Ver figura 3.51.

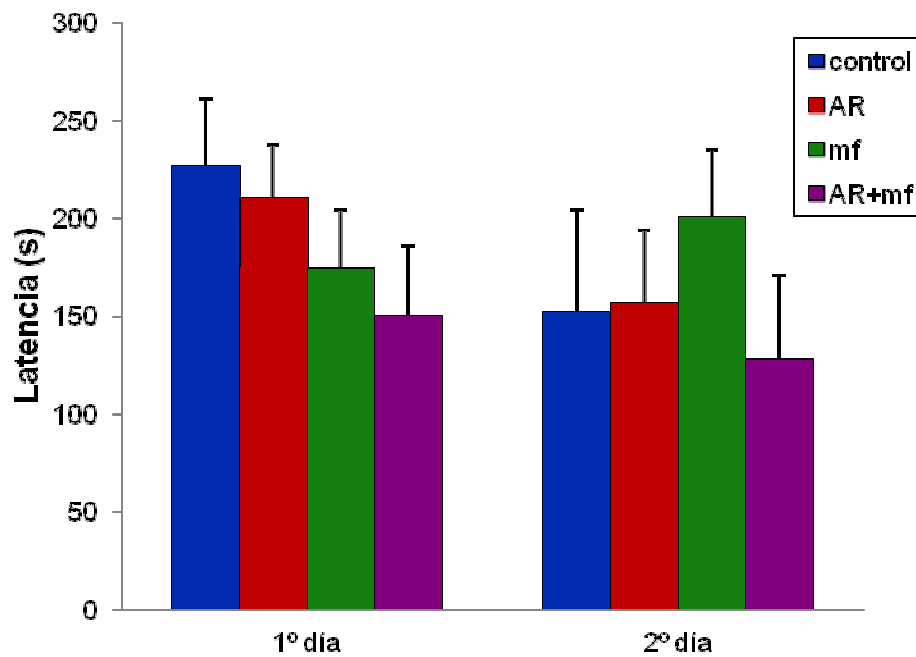


Figura 3.51. Latencia de respuesta, en segundos, que tardan los distintos grupos de ratones experimentales en pelearse con el ratón intruso, presentada en los dos días en que transcurre esta prueba. No se encuentran diferencias significativas entre ningún grupo en ambos días.

La última variable estudiada en la prueba de intruso es el número de veces que se pelean, tomada como otra cualidad para medir su agresividad. El primer día los ratones que más se pelean son los del grupo AR+mf ($6,30 \pm 1,84$ peleas) y en el segundo día se reduce este comportamiento a ($5,50 \pm 1,86$ peleas). El grupo control ($4,11 \pm 1,81$ peleas), en el primer día, es el que menos veces se

pelea, para el segundo día muestra ($7,56 \pm 2,31$ peleas). El grupo AR ($5,09 \pm 1,68$ peleas) para el primer día y en el segundo día es el que más se pelea ($8,64 \pm 2,32$ peleas). El grupo mf presenta valores similares para ambos días ($4,31 \pm 1,32$ peleas) para el primer día y ($3,77 \pm 1,41$ peleas) para el segundo día. Ver figura 3.52.

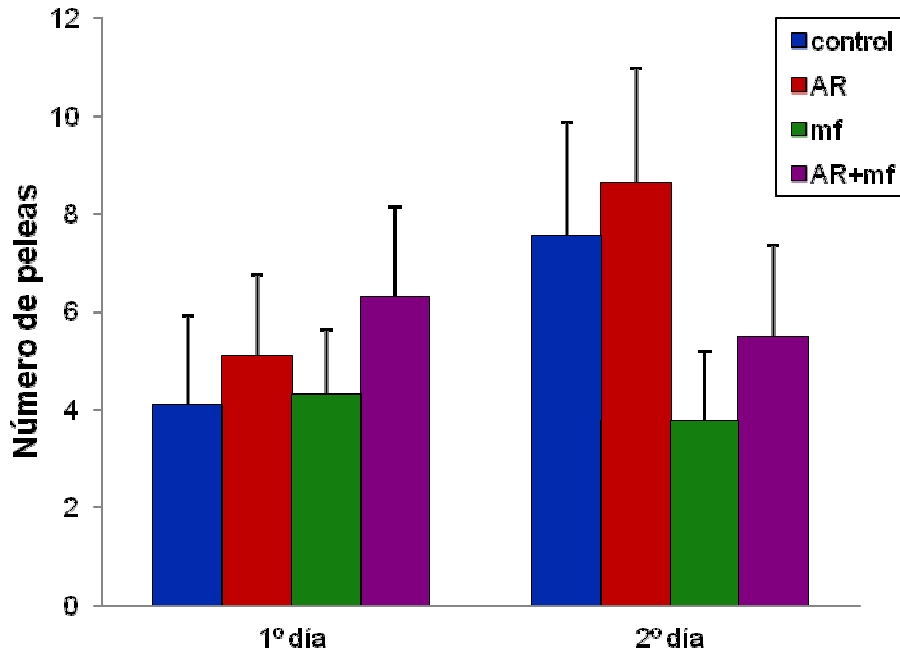


Figura 3.52. Número de peleas que tienen los grupos experimentales ante la presencia de un intruso. No aparecen diferencias significativas en ningún grupo en los dos días que dura esta prueba.

3.2.11. RT-PCR

En el cerebelo el grupo control ($1,00 \pm 0,12$ expresión relativa) presenta más expresión del receptor del gen que el resto de los grupos, concretamente un 20% más que los AR ($0,85 \pm 0,21$ expresión relativa), por encima del 80% sobre el grupo mf ($0,54 \pm 0,01$ expresión relativa) y cerca del 75% con grupo AR+mf ($0,58 \pm 0,09$ expresión relativa). Dado que el cerebelo está implicado en la afinidad y modulación de la actividad motora, parece ser que se ve afectado por el fármaco MF, (figura 3.53.).

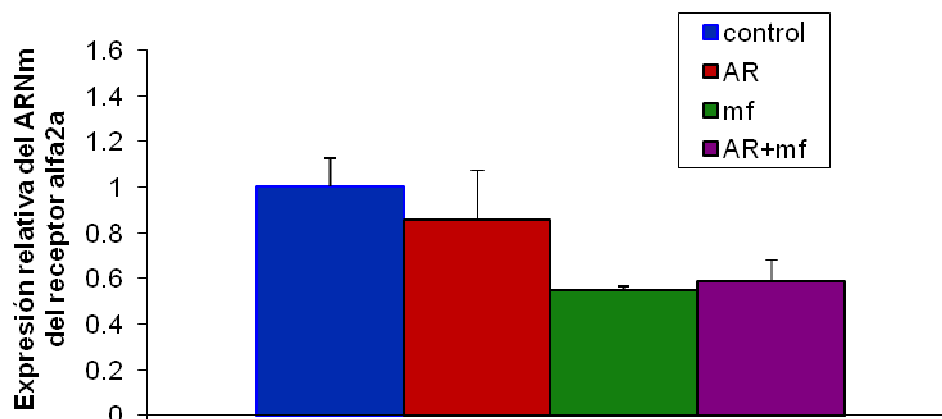


Figura 3.53. Representación, en el cerebelo, de la expresión del receptor en los grupos experimentales. En esta zona del encéfalo parece que afecta el fármaco MF. Como se puede observar los grupos mf y AR+mf muestran más baja expresión del receptor que el grupo control. Sin embargo no aparecen diferencias significativas entre ningún grupo.

El tronco del encéfalo es el responsable de importantes funciones de adaptabilidad, dado la cantidad de nervios craneales que engloba. La expresión del receptor en esta zona, se muestra menor para el grupo AR ($0,59 \pm 0,13$ expresión relativa) frente al grupo control ($1,00 \pm 0,13$ expresión relativa). El grupo mf ($1,05 \pm 0,08$ expresión relativa) es el que más expresión muestra y en el grupo AR+mf ($0,81 \pm 0,29$ expresión relativa) existe más expresión del gen que en el grupo AR. Según estos resultados los animales AR podrían tener afectado el tronco del encéfalo, que se muestra mejorado con la administración del fármaco Metilfenidato. Aún presentando estos resultados no presentan diferencias significativas ningún grupo. Resultados presentados en la figura 3.54.

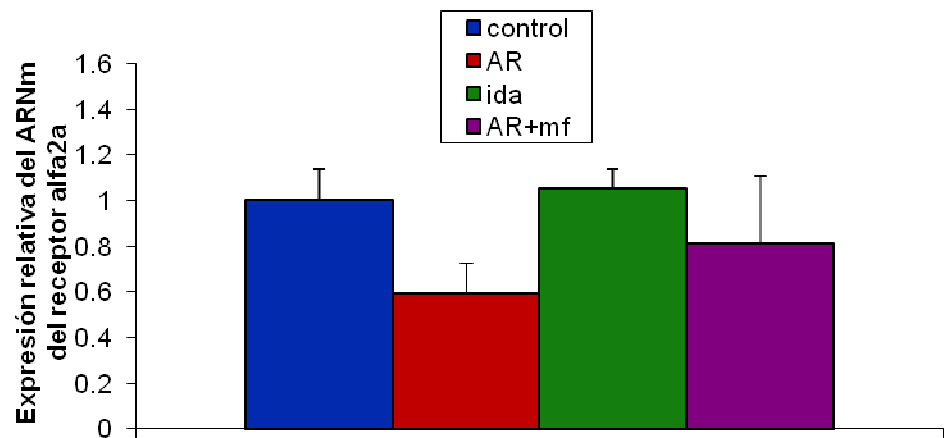


Figura 3.54. Representación, en el tronco del encéfalo, de la expresión del receptor en los distintos grupos experimentales. Parece ser que los ratones tratados con Metilfenidato mejoran la actividad de esta zona.

En el hipocampo, zona de memoria y olfativa, el grupo AR ($0,55 \pm 0,14$ expresión relativa) frente al grupo control ($1,00 \pm 0,20$ expresión relativa) muestra menos expresión del receptor. El grupo mf ($0,02 \pm 0,07$ expresión relativa) expresa menos receptores que el grupo control, existiendo entre ellos diferencias estadísticamente significativas de ($p < 0,01$). El grupo AR+mf ($0,39 \pm 0,36$ expresión relativa) presenta menos expresión del gen que el grupo AR. Notoriamente el Metilfenidato afecta a la memoria reduciendo la actividad en los retinoicos y groseramente en los silvestres en la zona del hipocampo.

Los ratones AR muestran poco receptores para este gen en esta zona, que se manifiesta perjudicada con el fármaco Metilfenidato. El hipocampo como zona de memoria y olfativa esta disminuida con el tratamiento del fármaco Metilfenidato, tanto en los ratones retinoicos como en los controles con metilfenidato. Ver figura 3.55.

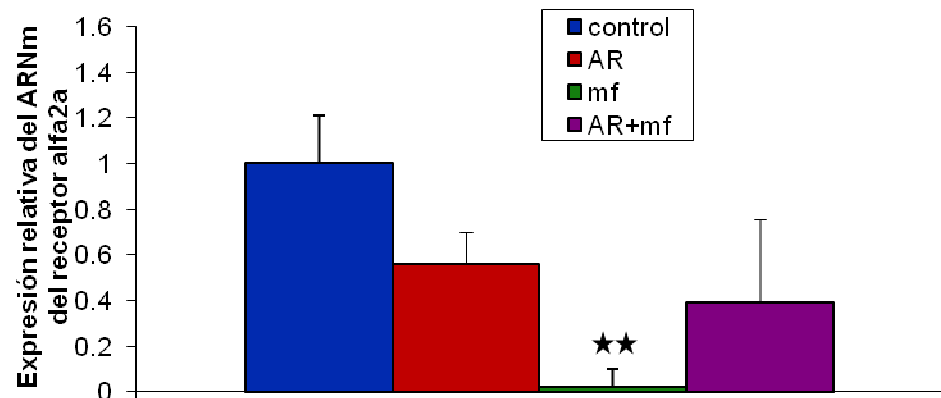


Figura 3.55. Representación, en el hipocampo, de la expresión del receptor en los ratones experimentales. Los ratones AR muestran pocos receptores en esta zona que se manifiesta perjudicada con el fármaco Metilfenidato, que aún perjudica más a los ratones controles tratados con el fármaco.

En la corteza cerebral, el grupo AR ($0,92 \pm 0,26$ expresión relativa) expresa, ligeramente menos, el receptor que el grupo control ($1,00 \pm 0,21$ expresión relativa). El grupo mf ($0,64 \pm 0,05$ expresión relativa) reduce su expresión respecto al control. El grupo AR+mf ($0,18 \pm 0,00$ expresión relativa) también reduce la expresión respecto al grupo AR, con el que muestra diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$), al igual que con el grupo control. Atendiendo a estos resultados (ver figura 3.56) el fármaco Metilfenidato reduce la expresión del gen en la corteza frontal y a los ratones retinoicos en mayor medida. En una zona donde las funciones ejecutivas, como la atención y resolución de las acciones, están implicadas, al igual que la motivación social, la irritabilidad, impulsividad e intolerancia, pueden producir en el ratón perturbación en sus ejecuciones.

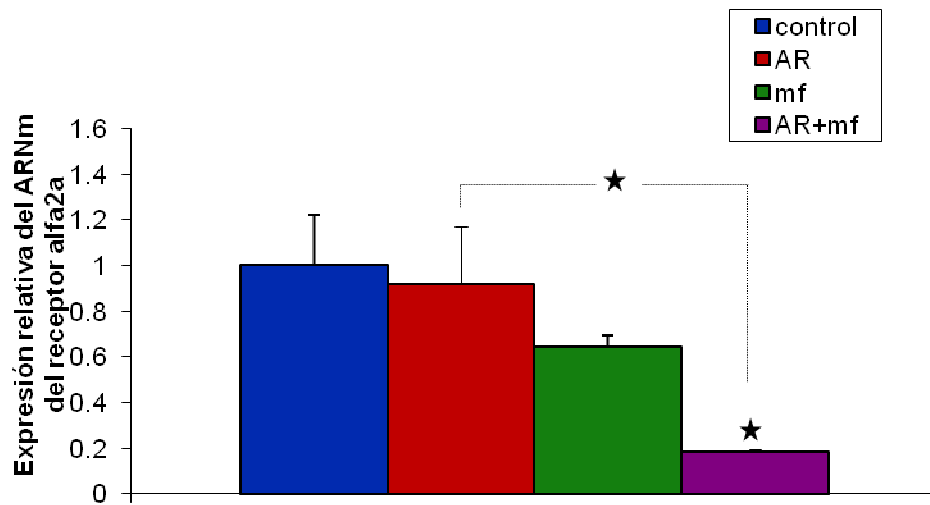


Figura 3.56. Representación, en la corteza cerebral, de la expresión del receptor en los distintos grupos experimentales. Observamos como el fármaco Metilfenidato reduce la actividad en esta zona alterándola aún más en los ratones retinoicos.

Discusión

Antes de empezar a analizar los resultados obtenidos en nuestro estudio, es importante considerar que el tratamiento con los fármacos Idazoxan y Metilfenidato, durante las dos primeras semanas de vida de los ratones, no ha tenido efecto alguno en la supervivencia de los ratones tratados. Por otro lado, las diferencias obtenidas comparando ambos grupos experimentales han sido en algunos casos significativas y en otras, o bien no se obtuvo el resultado esperado, o las diferencias encontradas no fueron significativas. Esto plantea sopesar si la “*n*” experimental ha de ser ampliada. O tal vez, habría que analizar los resultados de forma menos general, al tratarse de la observación para un comportamiento como el TDAH que se caracteriza por alteraciones de la conducta, según unos parámetros establecidos como patrones, que en ocasiones presenta situaciones atípicas individualmente. Ya que en algunas pruebas no se ha visto una tendencia clara del comportamiento grupal.

No obstante hay que ser cautos a la hora de analizar los resultados. Si bien en algunos casos, ya podemos obtener una tendencia en el comportamiento de los ratones ante distintas pruebas realizadas y bajo los efectos de los distintos tratamientos efectuados, que se acercan al continuo biológico-temperamental-social del TDAH. Sin embargo no se puede hablar de un diagnóstico diferencial claro o que sea causa de otra consecuencia, dado la dificultad de planteamiento que tiene el estudio de este trastorno en base a la interpretación en animales y las limitaciones en su diseño.

Igualmente, varios estudios en animales, presentan que éstos al ser expuestos a AR en distintos días de gestación, muestran diferentes déficits según las tareas específicas para el TDAH (Holson y col. 1999).

Se analizan los resultados presentando dos grupos, diferenciados por el fármaco. Los ratones Idazoxan, para los tratados con el fármaco Idazoxan y sus controles, y los ratones Metilfenidato para los tratados con el fármaco

Metilfenidato y sus controles. Finalmente, se hará una visión integral de los resultados en conjunto.

4.1. Ratonos Idazoxan

Haciendo una visión global de los resultados obtenidos en todas las pruebas realizadas y los análisis llevados a cabo, se comprueba que realizando una primera valoración, comparando los ratones tratados con AR frente a los no tratados, y a los tratados con el fármaco Idazoxan con los no tratados, se observa que no existen diferencias que afecten al desarrollo de los ratones retinoicos y con Idazoxan, al menos respecto al peso y tamaño en las pruebas relacionadas con el desarrollo fisiológico y sus marcadores. Sí aparecen en algunas pruebas, un ligero retraso de los ratones tratados con Idazoxan en cuanto a latencia, demostrando que muchas de las pruebas realizadas, o los sistemas que participan en la ejecución de las mismas, están controlados por el sistema noradrenérgico.

Las pequeñas diferencias en el peso que presentan los ratones AR en un margen de quince días y el estado más ligero de su peso en general, puede ser debido a la mayor actividad de los ratones AR en algunas pruebas del experimento.

En la prueba de analgesia estudiada mediante la placa caliente, el fármaco Idazoxan hace más lenta la respuesta al dolor, produciendo una cierta analgesia en oposición a los estudios realizados (Su y cols, 2000), que los ratones controles y no altera la respuesta en los retinoicos. El número de heces medido en esta prueba, indica que en los ratones retinoicos y los controles tratados con Idazoxan existen más indicios de ansiedad. Sin embargo, el fármaco Idazoxan en los ratones retinoicos, reduce tal respuesta en situaciones de inquietud.

Las respuestas motoras de los ratones encontradas en el actímetro no muestran unas diferencias claras entre los grupos. Los ratones retinoicos

tienen el mismo proceder que los controles. El fármaco Idazoxan tiende a ralentizar levemente la actividad.

En cuanto a la ansiedad registrada, el fármaco Idazoxan revierte el comportamiento de los ratones controles, que permanecen más tiempo en el centro del actímetro, mostrando menos nivel de ansiedad o menos atención del lugar donde se encuentra. En el número de heces como señal de ansiedad son el grupo que más muestra, encontrando una amplia diferencia con el control.

En la respuesta de sobresalto e inhibición por prepulso, valorada como una capacidad motora inmediata, en latencia, no se han observado diferencias significativas a la intensidad de estímulo trabajada. Sí ha sido significativa la respuesta, en cuanto a la intensidad del movimiento, sobre la plataforma en la intensidad de la respuesta, medida como valor pico de actividad, y como área de respuesta, mayores en los ratones control.

En los grupos retinoicos y tratados con Idazoxan la respuesta es menos intensa posiblemente por la aparición de procesos inhibitorios sobre la respuesta motora. Existen antecedentes en los que la manipulación neonatal de los receptores α_2 en la zona del puente, han demostrado tener consecuencias en el adulto que afectan a funciones reflejas como la respuesta de sobresalto y la inhibición por prepulso (Shishkina y cols, 2001; Shishkina y cols, 2002; Shishkina y cols, 2004). Sin embargo el comportamiento de los ratones retinoicos en la inhibición por prepulso, muestra la mayor respuesta ante la señal, poniendo en duda su posible falta de atención.

La coordinación motora medida con la cinta rotatoria, muestra que los ratones retinoicos no mejoran a lo largo de la prueba debido a su capacidad impulsiva, desatención o por la dificultad para adaptarse a situaciones rutinarias. Muestran una continua ansiedad por el continuo y cantidad de sus heces, todo esto, hace que el porcentaje de éxito en esta prueba para estos ratones sea muy bajo. Sin embargo al ser tratados con el fármaco Idazoxan modifican su respuesta hasta un total control de la situación. En estudios llevados a cabo por (Holson y cols, 1997) se establece que los efectos por daños en el cerebelo

no se limitan a problemas con la coordinación motora, sino que está claro que el cerebelo desempeña un papel importante en el condicionamiento y tal vez en estados emocionales como el temor.

En cuanto a las respuestas pasivas o giros sobre el cilindro, los ratones tratados con el fármaco Idazoxan, sean retinoicos o no, desarrollan más esta actitud que los controles, determinando que el Idazoxan no repercute en el equilibrio o bien, utilizan este recurso en una situación para ellos estresante.

En la cinta giratoria la actividad motora es superior en los ratones retinoicos, que tratados con Idazoxan, éstos se comportan de forma similar al control. De distinta manera el fármaco actúa en los animales control, acercándolos más al comportamiento de los ratones retinoicos. Posiblemente este comportamiento en la cinta giratoria, tan ventajoso para el grupo AR, se deba a que no necesitan un nivel de atención sostenido para esta tarea y a la actividad de su estado.

Para comprobar el efecto que el ácido retinoico y el tratamiento con Idazoxan neonatal produce en la capacidad de atención, memoria y aprendizaje asociativo en los ratones adultos, se efectúan unas series de pruebas como el reconocimiento de objetos, en las que los ratones retinoicos tienen mayor preferencia por los objetos nuevos y mayor número de contactos con los objetos que los controles. Éstos al ser tratados con Idazoxan se quedan más tiempo cercanos al objeto conocido y su número total de contactos es inferior al grupo control. Dada la curiosidad innata de los ratones, los retinoicos amplían este comportamiento que se ve disminuido por el fármaco Idazoxan, comportándose similar a los controles, descrito anteriormente (Dornelles y cols, 2007). En este sentido, se podría esperar que se hubiese producido alguna modificación funcional en estructuras corticales (corteza prefrontal, hipocampo) que afecte a la capacidad de retención, similares a algunas ya descritas cuando se interfiere, durante el desarrollo postnatal, en la neurotransmisión noradrenérgica (Goter y cols, 1989; Soto-Moyano y cols, 1991).

El número de heces que se encuentra en esta prueba, nos indica mayor nivel de ansiedad de los ratones ida en la prueba a largo plazo, y en menor medida el de los retinoicos en la prueba a corto plazo.

En la prueba de evitación pasiva, los ratones del grupo control, en la primera sesión, son los que más tardan en entrar en la cámara de castigo, al contrario que los retinoicos, que su curiosidad los hace recibir antes la descarga. La memoria a corto plazo parece no estar afectada en ningún grupo, aunque los ratones retinoicos presenten más curiosidad y entren antes en la cámara. En cuanto a la memoria a largo plazo los retinoicos parecen que olvidan antes la descarga de la cámara o que su nivel de curiosidad es mayor al sufrimiento recibido, no así al ser tratados con Idazoxan, que parece hacerles recordar el castigo o analizar la situación. De similar manera el fármaco también actúa en los ratones control.

En la prueba de condicionamiento clásico, el aprendizaje mostrado en los ratones control es ligeramente inferior al esperado. Los ratones retinoicos y tratados con Idazoxan, presentan una curva de aprendizaje en torno al 33%, índice bajo respecto a los controles. En el caso de los retinoicos puede ser debido a que alcanzan su máxima respuesta en las primeras sesiones de condicionamiento y a partir de ahí les cuesta más mantener la atención.

La prueba del intruso revela el comportamiento de los ratones en situaciones sociales de invasión del territorio. Los ratones retinoicos presentan un comportamiento de olor y pelea al mismo tiempo, es decir, la conducta de olerse es corta por parte de los retinoicos, no suelen empezar el enfrentamiento, pero parece que siempre tienen esta opción preparada. Tardan más que otros grupos en acercarse al intruso, pero pasan directamente a una acción más agresiva. Cuando empiezan a pelearse no paran, se podría decir que son combativos.

La expresión de genes en el cerebelo se ve afectada por el fármaco Idazoxan. Por ello los ratones tratados con el fármaco suelen presentar menos facilidad de adaptación motora. El tronco del encéfalo y el hipocampo, en los ratones

retinoicos, tiene menor participación, y el fármaco Idazoxan es más perjudicial para estas zonas en los retinoicos. En los controles el fármaco Idazoxan parece mejorar la implicación de esta zona. Esto empeoraría la memoria y la capacidad de reacción de los retinoicos, sin embargo en nuestro caso, según las pruebas realizadas no se muestra una desventaja de los ratones retinoicos en la participación de estas zonas.

En la corteza cerebral, el fármaco Idazoxan, afecta negativamente a las competencias que debe ejecutar, tanto en los retinoicos como en los controles, debido a esto, las funciones motoras entre otras, en los grupos ida y AR+ida deberían estar mermadas y en algunos casos, los datos obtenidos en nuestras pruebas, no confirman esos resultados.

4.2. Ratones Metilfenidato

Al realizar una primera valoración de los resultados, no se encuentran diferencias que desfavorezcan el rendimiento de los grupos en la batería de pruebas planteadas. Ni los tratamientos administrados han dificultado el desarrollo del experimento. No obstante atendiendo a Heyser y cols. 2004, puede ser que los resultados de este estudio sobre la respuesta al metilfenidato esten influidos por la edad del animal. Por otro lado un estudio (Bolaños y cols. 2003) indica que el tratamiento con Metilfenidato durante el desarrollo, puede alterar la capacidad de respuestas en la edad adulta en animales normales, y como este tipo de fármacos puede influir en el desarrollo del sistema nervioso central y que éstos efectos sean perdurables durante la vida adulta.

Las pruebas relacionadas con el desarrollo fisiológico y sus marcadores. No muestran diferencias en cuanto a peso y tamaño de los grupos. Los ratones retinoicos muestran un ligero menor peso a lo largo del experimento que los controles. Los ratones tratados con Metilfenidato revierten sus resultados tanto en los controles como en los retinoicos. Estos resultados coinciden con los realizados en ratas tratadas con Metifenidato (Bolaños y cols. 2003) aunque los efectos eran mostrados en animales controles tratados solo con Metilfenidato,

no Retinoicos. Estos resultados no coinciden con Morton y Stockton, 2000, donde el tratamiento con Metilfenidato produce una disminución del peso corporal en los animales AR, por la pérdida de apetito que el consumo de dicha sustancia provoca.

En la prueba de analgesia, estudiada mediante la placa caliente, tanto el fármaco Metilfenidato como el ácido retinoico aumenta en los ratones la sensibilidad al dolor. Coincidiendo en parte con los estudios de Bolaños y cols. 2003 respecto a la sensibilidad a estímulos aversivos.

El número de heces medidas en esta prueba, indica que los ratones retinoicos tratados con Metilfenidato reducen sus deposiciones, no dando síntomas de niveles de ansiedad como los anunciados en alguna pruebas por Bolaños y cols. 2003. No obstante, todos los grupos presentan un bajo número de heces.

Las respuestas motoras de los ratones encontradas en el actímetro, muestran que los ratones retinoicos tienen menos actividad, aún tratados con Metilfenidato, quizás debido a que visitan más el centro del actímetro, y en esta zona se muevan más lentos, producido por el estrés. Estos resultados no coinciden con los resultados de ratones retinoicos recién nacidos (Guimarães y cols. 2007) ni con los estudiados en ratas retinoicas (Heyser y cols. 2004), coincidiendo más con los presentados por Bolaños C.A. y cols. 2003 y (Holson y cols. 1999). No obstante, en estos últimos, las dosis y los días de tratamiento gestacional son diferentes. Sin embargo en el estudio de Carlezon y cols. 2003 en ratas tratadas con Metilfenidato, éstas presentaban mayor índice de actividad que las administradas con salino. Por tanto estos resultados sugieren ampliar el estudio de este comportamiento desde otros paradigmas adicionales para poder interpretar mejor los datos.

En cuanto a la ansiedad en esta prueba, los ratones retinoicos y tratados con el fármaco no presentan dificultades en el momento de moverse dentro del actímetro. Tal vez, por este motivo, presenten mayor número de heces los grupos retinoicos y con el fármaco Metilfenidato.

La respuesta de sobresalto e inhibición por prepulso, en latencia, no se han observado diferencias significativas a la intensidad de estímulo trabajada, en línea con los estudios de Holson y cols., 1999, donde no presentan deficiencias en ninguna de las exposiciones gestacionales a la respuesta de sobresalto.

Sí ha sido significativa la respuesta, en cuanto a la intensidad del movimiento sobre la plataforma en la intensidad de la respuesta, medida como valor pico de actividad, mayores en los ratones control. En los grupos retinoicos y tratados con Metilfenidato la respuesta es menos intensa posiblemente por la aparición de procesos inhibitorios sobre la respuesta motora.

En la respuesta al área, los ratones retinoicos cuando son tratados con Metilfenidato responden como los controles. El fármaco actúa como menguador de las deficiencias que muestran los retinoicos. De igual manera disminuye las pautas normales de los controles al ser tratados con el fármaco, equiparándose a los retinoicos.

La inhibición frente a la línea base, no muestra diferencias que indiquen deterioro en esta respuesta para los retinoicos tratados con fármaco o sin el, hecho que podría indicar una útil atención coincidiendo con los estudios en ratas de Holson y cols., 1999.

La cinta rotatoria muestra que, los ratones en general, tienden a controlar con el paso del tiempo la adaptabilidad a esta prueba, reduciendo el número de caídas. Los retinoicos tratados con Metilfenidato muestran mayor habilidad que el resto de los grupos reduciendo el número de caídas, consiguiendo el mayor éxito, incluso en un alto número de giros. Estos resultados no coinciden con los estudios de Holson y cols., 1999 realizados en rata con el tratamiento en distintas etapas gestacionales.

Las heces en esta prueba, indican que todos los ratones reducen su ansiedad a lo largo del tiempo que dura la prueba.

En la cinta giratoria, la actividad motora es superior en los ratones retinoicos y los controles tratados con Metilfenidato. Los retinoicos tratados con Metilfenidato bajan su actividad en el continuo de esta prueba no coincidiendo con Bolaños y cols. 2003, posiblemente inducida por la exposición a un ambiente nuevo (Hooks y Kavilas 1995; Kabbaj y cols 2000).

Para comprobar el efecto que el ácido retinoico y el tratamiento neonatal con Metilfenidato produce en la capacidad de atención, memoria, y aprendizaje asociativo en los ratones adultos, se efectúan pruebas como el reconocimiento de objetos, en la que los ratones retinoicos tienen mayor preferencia por los objetos nuevos, junto con los ratones del grupo mf durante el entrenamiento. En la memoria a corto plazo se inclinan todos los grupos por el objeto conocido, especialmente el grupo AR y en la memoria a largo plazo, siguen prefiriendo todos los grupos el objeto conocido. Estos resultados estarían en oposición a otros estudios publicados, en los que muestran que el ácido retinoico produce daños en el aprendizaje respecto al control (Holson y cols. 1997).

En nuestro caso, el tratamiento con Metilfenidato no parece mejorar el índice de exploración, ni a corto ni a largo plazo, tanto en animales AR como controles, pues las diferencias encontradas con el resto de los grupos no son significativas, contradiciendo lo expuesto anteriormente por Wilens y Spencer, 2000. Lo que se observó es que en el desarrollo de esta prueba, el tratamiento con Metilfenidato disminuye la exploración total de los objetos, sin que tenga efecto en la exploración del objeto novedoso. Conviene incidir en el hecho de ser cautos con los resultados y las conclusiones que se pueda obtener de este estudio, dado que los índices de exploración son más bajos que los descritos en animales adultos.

En el número total de contactos, las diferencias de todos los grupos frente al grupo control, aparece en la memoria a largo plazo aunque desde el entrenamiento el grupo control tiene más contactos con los objetos. No obstante se van reduciendo los contactos a lo largo de la prueba.

El número de heces que se encuentra en esta prueba nos indica el nivel de ansiedad de los ratones del grupo AR y AR+mf, que en general se mantiene en todo el experimento.

Analizados los resultados del reconocimiento de objetos, en esta prueba todos los grupos tienen una actuación mediocre, con un total bajo de número de contactos y poca curiosidad por el objeto nuevo.

El tratamiento con AR parece no afectar la memoria a corto o largo plazo, pues las diferencias encontradas en general con los otros grupos no resultan significativas, lo cual estaría en oposición a otros estudios publicados en los que se dice que la exposición a AR en los días de gestación (E8-E10) en ratas (edad equivalente a la administración de AR en nuestros ratones), produce daños en el aprendizaje, mientras que la exposición posterior (E11-E13) causa cambios en la actividad, más que en el aprendizaje (Holson y cols., 1997).

En la prueba de evitación pasiva los ratones control, en la primera sesión, son los que tardan más en entrar en la cámara de castigo, al contrario que los retinoicos que su curiosidad los hace recibir antes la descarga. La memoria a corto plazo parece no estar afectada en ningún grupo, todos los grupos aumentan el tiempo de entrada en la cámara respecto al entrenamiento, aunque los ratones del grupo AR+mf presenten más curiosidad y entren antes en la cámara. En cuanto a la memoria a largo plazo, el grupo mf parece que olvidan antes la descarga de la cámara, al igual que los retinoicos, el grupo control también reduce el tiempo de entrada en la cámara respecto a la memoria a corto plazo. No así el grupo AR+mf que aumenta el tiempo de entrada en la cámara oscura.

En la prueba de condicionamiento clásico, el aprendizaje mostrado en los ratones controles es ligeramente inferior al esperado. Los ratones retinoicos y tratados con mf, presentan una curva de aprendizaje entorno al 23%, bastante menor que los controles. Los ratones control tratados con mf tienen una respuesta en esta prueba baja y con poca armonización. Los retinoicos presentan bajo nivel de aprendizaje y el tratarlos con Metilfenidato no lo mejora,

al igual que a los controles, que le perjudica bastante el tratamiento con Metilfenidato.

La prueba del intruso revela el comportamiento de los ratones en situaciones sociales de invasión del territorio. Los ratones retinoicos presentan un comportamiento de olor más retrasado que los otros grupos el primer día, que lo revierten al ser tratados con Metilfenidato, comportándose ante la conducta de oler más precipitados. El segundo día todos los grupos se comportan en tiempos igualados, menos el grupo mf que retrasa esta conducta.

En cuanto a la conducta de pelearse, los que más retrasan esa alternativa son los del grupo control, al contrario que el grupo AR+mf que se anticipa en este comportamiento. El segundo día reducen el tiempo en pelearse todos los grupos, menos el grupo mf, que aumenta levemente la latencia respecto al día anterior. En cuanto al número de peleas el segundo día el grupo control, y el grupo AR se pelea más que los grupos mf y AR+mf, tal vez en estos debido al efecto del fármaco Metilfenidato.

La expresión de genes en el cerebelo se ve afectada por el fármaco Metilfenidato. Los retinoicos tienen levemente menos implicada esta zona. El tronco del encéfalo, en los ratones retinoicos, tiene menor participación, y el fármaco Metilfenidato la mejora levemente, sin embargo el Metilfenidato no afecta a los controles en esta zona. En el hipocampo, zona donde los retinoicos están disminuidos con respecto al control, el fármaco Metilfenidato perjudica en gran medida a los controles y levemente a los retinoicos. Esto, junto a las pruebas realizadas de memoria, refleja la capacidad mermada en los retinoicos y los tratados con Metilfenidato. En la corteza cerebral, el fármaco Metilfenidato, afecta negativamente a las competencias de esta zona, tanto en el grupo AR+mf, que reduce su actividad en gran medida, como en el grupo mf, debido a ésto, las funciones motoras en los grupos mf y AR+mf deberían estar mermadas y en algunos casos los datos obtenidos en nuestras pruebas no confirman esos resultados.

4.3. Consideraciones generales

Durante el curso del desarrollo cerebral, comparando los seres humanos y los ratones, la sensibilidad en el periodo gestacional E7-E8 en estos últimos, puede corresponder a algún momento del final del primer mes de embarazo en los seres humanos. Pese a las diferencias potenciales en los diferentes retinoides investigados hasta la fecha (retinol, ácido todo-transretinoico, isotretionina), todos han demostrado su efecto en el desarrollo con respecto a todos los puntos de control (Adams 1993).

Los niños que se expusieron a isotretinoína en el embarazo, a menudo reducían la inteligencia y este daño no siempre es acompañado por otras malformaciones perceptibles (Adams y Lammer, 1991). Resulta interesante observar que los niños que muestran un patrón respiratorio HEB, se vean acompañados de un déficit en el desarrollo psicomotor, y que el tratamiento en ratones con dosis bajas de AR, que produce HEB (Guimaráes y cols., 2007), también esté produciendo un déficit cognitivo.

Aunque el AR podría tener un potencial interés clínico para descartar anomalías de desarrollo en el inicio de la segmentación del cerebro (Pascaletti y cols., 2001), los resultados refuerzan la idea de que el uso de AR debe limitarse estrictamente durante el embarazo, según se describe en Guimaráes y cols., 2007.

En una visión general, se puede concluir que el tratamiento con ácido retinoico, a las dosis empleadas, no afecta en gran medida la ejecución de las pruebas realizadas durante el experimento. Solo se ha descrito retraso en algunas pruebas aisladas de memoria y aprendizaje. Sin embargo cuando consideramos las pruebas realizadas de forma puntual, si se han apreciado diferencias en los animales tratados con AR frente a su control.

La medida del peso, nos muestra que son más ligeros los AR posiblemente por su mayor actividad y metabolismo, aunque la cantidad de consumo de comida estaba igualada en todos los grupos. Igualmente las pruebas para analgesia y

capacidades motoras, muestran una actividad algo superior en los retinoicos. Las capacidades memorísticas y de aprendizaje, revela una disminución en los retinoicos. En cuanto a la agresividad y el comportamiento social, los retinoicos se muestran similares a los ratones control.

Finalmente, con todo lo expuesto hasta el momento, nos atrevemos a proponer el modelo de ratón tratado con AR como modelo de estudio de enfermedades congénitas que originan neonatos con problemas en la psicomotricidad y que pueden degenerar en problemas atencionales que afecten a actividades intelectuales o memorísticas. El ratón AR aparece como modelo de hiperactividad infantil-adolescente, incluso adulto, revertido con los fármacos que se utilizan a este respecto en niños y adolescentes con TDAH, si bien aun no hemos podido constatar que exista realmente un déficit atencional en los mismos, lo que nos obliga a buscar nuevas pruebas en las que estas habilidades se vean realmente puestas en juego.

Conclusiones

El modelo retinoico (AR) puede ser un buen patrón para estudiar el TDAH, en cuanto a falta de atención, impulsividad y actividad se refiere.

Los tratamientos con los fármacos Metilfenidato e Idazoxán hasta la pubertad en los ratones RA no mejoran en el adulto los síntomas característicos del TDAH descrito en nuestro modelo de ratón.

Los tratamientos postnatales con ambos fármacos en ratones silvestres, y por tanto normales, afectan negativamente el desarrollo de las pruebas realizadas, lo que indica que producen daños irreversibles en sus cerebros, afectando a las tareas que implican psicomotricidad, atención y memoria.

Bibliografía

Adams, J. (1993). "Structure-activity and dose-response relationships in the neural and behavioural teratogenesis of retinoids". *Neurotoxicol-teratol* **15**:193-220.

Adams, J. Lamer, E. J. (1991). "Relationship between dysmorphology and neuropsychological function in children exposed to isotretinoin in utero". In Fujii, T., Boer, G. J., eds. *Functional neuroteratology of a short-term exposure to drugs*. Tokyo: Teiko University Press: 159-170.

APA (2009) . American Psychological Association "Development of ADHD. History of the disorders". Introduction part.

American Psychiatric Association,(2008). *Psychiatric Supplement 3. Parents Medication Guide ADHD*

American Psychiatric Association, (2000). *Diagnostic and statistical manual of mental disorders: DSM IV Washington DC*.p 80-89.

Asherson, P. Image C. (2004). "Attention-deficit hyperactivity disorder in the post-genomic era." *European Child & Adolescent Psychiatry* **13**: 50-70.

Barkley Russell A. (2002). *Consenso Internacional sobre TDAH. Clinical Child and Psychology Review*, Vol. 5. No. 2 June.

Bauer, N.S. Gilbert, A.L. Carroll, A.E. Downs, S.M. (2013). "Exposure to partner violence, depression associated with ADHD in children". *Journal JAMA Pediatrics*, doi 10,1001. 780, february.

Berger, D. F. Sagvolden, T. (1998). "Sex differences in operant discrimination behaviour in an animal model of attention-deficit hyperactivity disorder." *Behavioural Brain Research* **94**(1): 73-82.

Berlin , III congreso internacional sobre TDAH. World Federation of Attention Deficity Hyperactivity Disorder. 26-29 Mayo 2011. www-adhd-congress.org.

Biederman Joseph, Munir K, Knee D. (1987). "Conduct and oppositional disorder in clinically referred children with, attention deficit disorder. A controlled family study". *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* **26**:724.

Biederman, Joseph., Newcorn, J. Sprich, S. (1991). "Comorbidity of attention deficit hyperactivity disorder with conduct, depressive, anxiety, and other disorders." *Am J Psychiatry* **148**: 567-577.

Bolaños C. A., Michel Barrot, Olivier Berton, Deanna Wallace-Black, and Eric J. Nestler (2003) "Methylphenidate Treatment during Pre- and Periadolescence Alters Behavioral Responses to Emotional Stimuli at Adulthood" *Biological Psychiatry*; **54**:1317–1329

Bolet Astoviza, M. (2005). *Breve Historia de las Vitaminas*.

Britton DR, Britton KT (1981): A sensitive open field measure of anxiolytic drug activity. *Pharmacol Biochem Behav* **15**:577–582.

Brown, T. (2010). *Comorbilidades del TDAH*. Barcelona, Elsevier.

Castellanos, F. X., Elia, J., Kruesi, M., Gulotta, C., Mefford, I., Potter, W., Ritchie, G. Rapoport, J. (1994). "Cerebrospinal fluid monoamine metabolites in boys with attention-deficit hyperactivity disorder". *Psychiatry Res* 1994 52:305, 1994.

Castellanos, F. X. Tannock, R. (2002). "Neuroscience of attention-deficit/hyperactivity disorder: the search for endophenotypes." *Nat Rev Neurosci* 3: 617-628.

Chatonnet, F., Domínguez del Toro, E., Thoby-Brisson, M., Champagnat, J., Fortin, G., Rijli, F. M. Thaëron-Antônio, C. (2003). "From hindbrain segmentation to breathing after birth: developmental patterning in rhombomeres 3 and 4." *Mol Neurobiol.* 25(3): 277-294.

Clinic, Mayo. (2002). "How Common is Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder?" *Archives of Pediatrics and Adolescent Medicine* 156(3): 209-210.

Collum, Mc. (1957). *A History of nutrition*. Boston: The Johns Hopkins University.p13-15

Crichton, Sir Alexander (1798). *Una investigación sobre la naturaleza y el origen de la enajenación mental: la comprensión de un sistema conciso de la fisiología y patología de la mente humana y una historia de las pasiones y sus Efectos*: 271-279.

Cuffe, S. P., McKeown, R. E. Jackson, K. L., Addy, Ch. L., Abramson R. Garrison, C.Z. (2001). "Prevalence of Attention-Deficit Hyperactivity Disorder in a Community Sample of Older Adolescents." *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry.* 40(9): 1037-1044.

Dauids, E., Zhang, K. H., Tarazi, F. I. Baldessarini, R. J. (2003). "Animal models of attention-deficit hyperactivity disorder." *Brain Research Reviews* 42(1): 1-21.

Davies, William, Trevor Humby, Anthony R. Isles, Paul S. Burgoyne Lawrence S. Wilkinson (2007). "X-monosomy effects on visuospatial attention in mice: A candidate gene and implications for turner syndrome and attention deficit hyperactivity disorder." *Biological Psychiatry* 61(12): 1351-1360.

Davies William, Trevor Humby, Wendy Kong, Tamara Otter, Paul S. Burgoyne Lawrence S. Wilkinson (2009). "Converging Pharmacological and Genetic Evidence Indicates a Role for Steroid Sulfatase in Attention." *Biological Psychiatry* 66(4): 360-367.

Dawson, L. A., Nguyen, H. Q., Geger, A. (1999). "Effects of venlafaxine on extracellular concentrations of 5-HT and noradrenaline in the rat frontal cortex: augmentation via 5-HT1A receptor antagonism." *Neuropharmacology*, 38: 1153-1163.

Denckla, M. B. (2003). "ADHD: topic update." *Brain & Development* 25(6): 383-389.

Domínguez del Toro, E., Borday, V., Davenne, M., Neun, R., Rijli, F. Champagnat, J. (2001). "Generation of a novel functional neuronal circuit in Hoxa1 mutant mice." *J Neurosci* 21: 5637-5642.

Dornelles, A. de Lima, M.N. Grazziotin, M. Presti-Torres, J. Garcia, V.A. Scalco, F.S. Roesler, R Schröder, N. (2007). "Adrenergic enhancement of consolidation of object recognition memory" *Neurobiol Learn Mem.* 88:137-42

Duester, G., Mic, F. A. Molotkov, A. (2003). "Cytosolic retinoid dehydrogenases govern ubiquitous metabolism of retinol to retinaldehyde followed by tissue-specific metabolism to retinoic acid." *Chemico-Biological Interactions* **143**: 201-210.

Eddy, N. B. Leimbach, D. (1953). "Synthetic analgesics .2. dithienylbutenylamines and dithienylbutylamines." *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **107**(3): 385-393.

Ennaceur A, Delacour J. (1988). "A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. I: Behavioral data". *Behav Brain Res*; **31**: 47-59.

Faraone, S. V., Joseph Biederman, D., Mennin, J., Gershon, J. Tsuang, M.T. (1996). "A prospective four-year follow-up study of children at risk for ADHD: psychiatric, neurophysiological, and psychosocial outcome." *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* **35**: 1449-1459.

Ferre P, Nunez JF, Garcia E, Tobena A, Escorihuela RM, Fernandez-Teruel A (1995): Postnatal handling reduces anxiety as measured by emotionality rating and hyponeophagia tests in female rats. *Pharmacol Biochem Behav* **51**:199–203.

Gainetdinov, R. R. Caron, M.C. (2001). "Genetics of childhood disorders: XXIV. ADHD, part 8: Hyperdopaminergic mice as an animal model of ADHD." *Journal of the American Academy of Child and Adolescent Psychiatry* **40**(3): 380-382.

García Sanz, M.P., García Sánchez, F.A., Maquilón, J.J. Morillas, R., (2010). Diseño de WEBs didácticas para la mejora de la calidad de los procesos educativos en el EEES. En J. R. Hilera, F. Cervantes y L. Bengochea (Eds.) *CAFVIR 2010. I Congreso Iberoamericano de la Formación Virtual* (pp. 191-199). Alcalá de Henares: Universidad de Alcalá

Gavalas, A. (2002). "ArRAnging the hindbrain." *Trends in Neurosciences* **25**(2): 61-64.

Golden, G. S. (1982). "A review of the neuroembryology of monoamine systems." *Brain Research Bulletin* **9**(1-6): 553-558.

Goldman, L. S., Genel, M., Bezman, R.J. Slanetz, P.J. (1998). "Diagnosis and treatment of attention-deficit/hyperactivity disorder in children and adolescents." *Journal of the American Medical Association*.

Gorter, J.A. Mirmirian, M. Bos, N.P.A. van der Werf, D. (1989). "Hippocampal neuronal responsiveness to different neurotransmitters in the adult rat after neonatal interference with noradrenaline transmission". *Brain Research Bulletin*, Vol. 23,pp.293-297.

Grater, H. (1997). "Vitamine A functions, dietary requirements and safety in humans." *Int j Vitam Nutr* **67**(6): 71-90.

Group, MTA (Multimodal treatmentn of Attention) Cooperative. (1999). "Moderators and Mediators of Treatment Response for Children With Attention-Deficit/ Hyperactivity Disorder " *Archives of General Psychiatry*. **56**: 1088-1096.

Guimarães, L., Dominguez-Del-Toro, E., Chatonnet, F., Wrobel, L., Pujades, C., Monteiro, L. S. Champagnat, J. (2007). "Exposure to retinoic acid at the onset of hindbrain segmentation induces episodic breathing in mice." *European Journal of Neuroscience* **25**(12): 3526-3536.

- Hale, F. (1993). "Pigs born without eye balls." *J Hered* **24**: 105-106.
- Hansen, C. H. Weiss, D. Last, C. G. (1999). "ADHD Boys in Young Adulthood: Psychosocial Adjustment." *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* **38**(2): 165-171.
- Happe, H. K., Coulter, C. L., Gerety, M. E., Sanders, J. D., O'Rourke, M., Bylund, D. B. Murrin, L. C. (2004). "Alpha-2 adrenergic receptor development in rat CNS: An autoradiographic study." *Neuroscience* **123**(1): 167-178.
- Harland, D. Brown, M. J. (1988). "Effects of acute and chronic administration of Idazoxan on blood-pressure and plasma-catecholamine concentrations of rats." *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **245**(1): 265-273.
- Heyser C. J., Pelletier M., Ferris J.S. (2004) "the effects of methylphenidate on novel object exploration in weaning and periadolescent rats" *Pharmacol Biochem behav.* **77**, (3):491-500.
- Herlenius, E. Lagercrantz, H. (2004). "Development of neurotransmitter systems during critical periods." *Experimental Neurology* **190**: S8-S21.
- Hoffman H.(1945). *Der Struwwelpeter oder lustige Geschichten und drollige Bilder*. Editorial T. Square Books. ISBN184365153, ver Actualizada.
- Holson, R. R.; Gazzara, R. A.; Ferguson, S. A.; Adams, J. (1997): A behavioral and neuroanatomical investigation of the lethality caused by gestational day 11–13 retinoic acid exposure. *Neurotoxicol. Teratol.* **19**:347–353.
- Holson, R. R. Adams, J. Ferguson, S. A. (1999). "Gestational stage-specific effects of retinoic acid exposure in the rat." *Neurotoxicology and Teratology* **21**(4): 393-402.
- Hooks MS, Kalivas PW (1995): The role of mesoaccumbenspallidal circuitry in novelty-induced behavioural activation. *Neurosciencie* **64**: 587-597
- Jacquin, T. D., Borday, V., SchneiderMaunoury, S., Topilko, P., Ghilini, G., Kato, F., Charnay, P. Champagnat, J. (1996). "Reorganization of pontine rhythmogenic neuronal networks in Krox-20 knockout mice." *Neuron* **17**(4): 747-758.
- Johansen, E. B., Aase, H., Meyer, A. Sagvolden, T. (2002). "Attention-deficit/hyperactivity disorder (ADHD) behaviour explained by dysfunctioning reinforcement and extinction processes." *Behavioural Brain Research* **130**(1-2): 37-45.
- Kabbaj M, Devine DP, Savage VR, Akil H (2000): Neurobiological correlates of individual differences in novelty-seeking behavior in the rat: Differential expression of stress-related molecules. *J Neurosci* **20**:6983–6988.
- Kaplan, H. Sadock, B. Grebb J. (1996). *Trastornos relacionados con sustancias. Sinopsis de Psiquiatría*. 7ª ed. Madrid: Médica Panamericana; p. 196
- Kohlert, J. G. Bloch, G. J. (1993). "A rat model for attention deficit-hyperactivity disorder " *Physiology & Behavior* **53**(6): 1215-1218.
- Kostrzewa, R. M., Brus, R., Kalbfleisch, J. H., Perry, K. W. Fuller, R. W. (1994). "Proposed animal-model of attention-deficit hyperactivity disorder." *Brain Research Bulletin* **34**(2): 161-167.

Kumandas, S., Akcakus, M., Coskun, A. Gumus, H. (2004). "Joubert syndrome: review and report of seven new cases." *European Journal of Neurology* **11**(8): 505-510.

Lammer, E. J., Chen D. T., Hoar R. M., Agnish N. D., Benke P.J. Braun J.T. (1985) Retinoic acid embryopathy. *N Engl J Med*; 313:837-41.

Lauder, J. M. Bloom, F. E. (1977). "Ontogeny of monoamine neurons in the locus coeruleus, raphe nuclei and sustantia nigra of the rat. I. Cell differentiation". *J. Comp. Neurol.* **155**: 469-482.

Lumsdem, A. Krumlauf, R. (1996). "Patterning the vertebrate neuraxis." *Science* **274**: 1109-1115.

Maden, M. (2002). "Retinoic acid and limb regeneration - a personal view." *International Journal of Developmental Biology* **46**(7): 883-886.

Magara, F., Ricceri, L., Wolfer, D. P. Lipp, H. P. (2000). "The acallosal mouse strain I/LnJ: a putative model of ADHD?" *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* **24**(1): 45-50.

Mark, M. Ghyselinck N. B. Chambon P. (2006) "Function of retinoid nuclear receptors: lessons from genetic and pharmacological dissections of the retinoic acid signaling pathway during mouse embryogenesis". *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **46**:451-480.

Marques, C. M. Motta, V. F. Torres, T. S. Aguila, M. B. & Mandarim-de-Lacerda, C. A. (2010). "Beneficial effects of exercise training (treadmill) on insulin resistance and nonalcoholic fatty liver disease in high-fat fed C57BL/6 mice". *Braz. J. Med. Biol. Res.*, **43**:467-75.

McCollum, E. V. (1967) "The paths to the discovery of vitamins A and D". *Rev. J Nutr*; 91(2 Suppl 1):11-6

Migueluez, C. Fernandez-Aedo, I. Torrecilla, M. Grandoso, L. Ugedo, L. (2009) "α2 Adrenoceptors mediate the acute inhibitory effect of fluoxetine on locus coeruleus noradrenergic neurons". *Neuropharmacology* **56**: No. 6-7. 1068-1073.

Moizeszowicz, J. (1998). *Psicofarmacología psicodinámica IV: estrategias terapéuticas y psiconeurobiológicas*. Buenos Aires, Paidós.

Morton W.A. y Stockton G.G. (2000). Methylphenidate Abuse and Psychiatric Side Effects. *J. of Clinical psychiatry*; **2**(5):159-164

Naqui, S. Z. Harris, B. S. Thomaidou, D. Parnavelas, J. G. (1999). "The noradrenergic system influences the fate of Cajal-Retzius cells in the developing cerebral cortex." *Brain research. Developmental brain research* **113**(1-2): 75-82.

Nieto, M. M. Guen, S. L. E. Kieffer, B. L. Roques, B. P. Noble, F. (2005). "Physiological control of emotion-related behaviors by endogenous enkephalins involves essentially the delta opioid receptors." *Neuroscience* **135**(2): 305-313.

Parra-Hernandez, E. Navas- Reyes, H. Zamudio-Cortes, P.(2005). "Ácido retinoico y función pulmonar." *Rev. Inst. Nac. Enf. Resp* **18**(1): 59-69.

Pascualetti, M. Rijli, F. M. (2001). "Vitamin A prevents inner ear defects in mice with congenital homeobox gene deficiency". *Scientific World Journal*. **1**:916-8.

Paule, M. G. Rowland, A. S. Ferguson, S. A. Chelonis, J. J. Tannock, R. Swanson, J. M. Castellanos, F. X. (2000). "Attention deficit/hyperactivity disorder: characteristics, interventions, and models." *Neurotoxicology and Teratology* **22**(5): 631-651.

Polanczyk, G. de Lima, M. S. Bernardo Lessa Horta, Joseph Biederman Luis Augusto Rohde (2007). "The worldwide prevalence of ADHD: A systematic review and metaregression analysis." *American Journal of Psychiatry* **164**(6): 942-948.

Porrás-García, E. Cedelin, J. Domínguez-del-toro, E. Vozeh, F. Delgado-García, J.M. (2005). "Purkinje cell loss affects differentially the execution, acquisition, and prepulse inhibition of skeletal and facial motor responses in Lucher mice." *Eur.J.Neurosci*. **21**:979-988.

Ramos-Quiroga, J. A. (2002). "TDAH y drogodependencias." Programa Oficial del Déficit d'Atenció a l'Adult. Hospital Universitari Vall d'Hebron.

Sánchez-Campuzano, R. Gruart A. Delgado-García J.M. (2007). "The Cerebellar Interpositus Nucleus and the Dynamic Control of Learned Motor Responses." *The Journal of Neuroscience*, 20 June 2007, **27**(25): 6620-6632.

Soto-Moyano, R. Hernandez, A. Perez, H. Ruiz, S. Galleguillos, X. Belmar, J. (1991). "Yohimbine early in life alters functional properties of interhemispheric connections of rat visual cortex". *Brain Res Bull*. **26**(2):259-63.

Su, R. B. Li, J. Gao, K. Pei, G. Qin, B. Y. (2000). "Influence of idazoxan on analgesia, tolerance, and physical dependence of morphine in mice and rats in vivo". *Acta pharmacol Sin*. **21**(11):1011-5.

Rosenfeld, L. (1997). "Vitamine-vitamin. The early years of discovery." *Clin Chem* **43**(4): 680-685.

Ruiz-García, M. Gutierrez-Moctezuma, J. Garza-Morales, S. de la Peña-Olvera, F.(2005). "Trastorno por déficit de atención con hiperactividad. Actualidades diagnósticas y terapéuticas." *Academia Mexicana de Pediatría* **62**: 145-151.

Russell, V. Devilliers, A. Sagvolden, T. Lamm M. Taljaard, J. (1995). "Altered dopaminergic function in the prefrontal cortex, nucleus-accumbens and caudate-putamen of animal-model of attention-deficit hyperactivity disorder - The spontaneously hypertensive rat." *Brain Research* **676**(2): 343-351.

Sagvolden, T. (2000). "Behavioral validation of the spontaneously hypertensive rat (SHR) as an animal model of attention-deficit/hyperactivity disorder (AD/HD)." *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* **24**(1): 31-39.

Sagvolden, T. Aase, H. Zeiner, P. Berger, D. (1998). "Altered reinforcement mechanisms in attention-deficit/hyperactivity disorder." *Behavioural Brain Research* **94**(1): 61-71.

Sagvolden, T. Berger, D. F.(1996). "An animal model of attention deficit disorder: The female shows more behavioral problems and is more impulsive than the male." *European Psychologist* **1**: 113-122.

Sagvolden, T. M. Metzger, M. A. Schiorbeck, H. K. Rugland, A. L. Spinnangr, I. Sagvolden, G. (1992). "The spontaneously hypertensive rat (SHR) as an animal-model of childhood hyperactivity (ADHD) - Change reactivity to reinforcers and to psychomotor stimulants." *Behavioral and Neural Biology* **58**(2): 103-112.

Sagvolden, T. Pettersen, M. B. Larsen, M. C. (1993). "Spontaneously hypertensive rats (SHR) as a putative animal-model of childhood hyperkinesia - SHR behavior compared to 4 other rat strains " *Physiology & Behavior* **54**(6): 1047-1055.

Schachter, H. Pham, B., King, J. Langford, S. Moher, D.(2001). "How efficacious and safe is short-acting methylphenidate for the treatment of attention-deficit disorder in children and adolescents?" *Can Med Assoc* **165**: 1475-1488.

Segal, D. S. Janowsky, D. S.(1978). "Physostimulant-induced behavioral effects: possible models of schizophrenia. *Psychopharmacology: a generation of progress.*" Nueva York, Raven Press: 1113-1124.

Serketich, W. Dumas, J. E. (1996). "The effectiveness of behavioural parent-training to modify antisocial behaviour in children: a meta-analysis." *Behav Ther* **27**: 171-186.

Sharman, I. M. (1983). "Historical introduction. Vitamin A in nutrition and disease. . Historical introduction". *Proc Nutr Soc* ;42(1):1-5

Sherman, N. (2008). 50 preguntas para reconocer y tratar el TDAH. Draft Editores, S.L. 32. 162

Shaywitz, B. Shaywitz, S. (1991) "Comorbidity, a critical issue in attention deficit disorder". *Journal of Child Neurology*, 6, S13-S22.

Shishkina, G. T. Kalinina, T. S. Dygalo, N. N. (2004). "Attenuation of alpha(2a)-adrenergic receptor expression in neonatal rat brain by RNA interference or antisense oligonucleotide reduced anxiety in adulthood." *Neuroscience* **129**(3): 521-528.

Shishkina, G. T. Kalinina, T. S. Popova, N. K. Dygalo, N. N. (2004). "Influence of neonatal short-term reduction in brainstem Alpha2A-adrenergic receptors on receptor ontogenesis, acoustic startle reflex, and prepulse inhibition in rats." *Behavioral Neuroscience* **118**(6): 1285-1292.

Solanto M. V.(1984) "Neuropharmacological basis of stimulant drug action in attention deficit disorder with hyperactivity: a review and synthesis". *Psychol Bull*; 95:387-409.

Soto-Moyano, R. Hernández, A. Pérez, H. Ruiz, S. Galleguillos, X. Belmar, J. (1991). "Yohimbine early in life alters functional properties of interhemispheric connections of rat visual cortex." *Brain Res Bull* **26**(2): 259-263.

Swanson, J. M. Castellanos, F. X. Murias, M. LaHoste, G. Kennedy, J., (1998). "Cognitive neuroscience of attention deficit hyperactivity disorder and hyperkinetic disorder." *Current Opinion in Neurobiology* **8**(2): 263-271.

Swanson, J. M. (2007) Etiologías genéticas y ambientales del TDAH. APDA, p45-46

Valdizan, J. R. (2005) Concenso multidisciplinar EN TDAH infancia, adolescencia y adultos, Julio 2005.

Valdizan, J.R. Izaguerri-Garcia A. C. (2009) Trastorno por Deficit de Atencion /hiperactividad en Adultos. *Rev. Neurologia*; 48 (supl 2): S95-S99.

Viemari, J. C. Maussion, G. Bevorgut, M. Burnet, H. Pequignot, J. M. Nepote, V. Pachnis, V. Simonneau, M. Hilaire, G. (2005). "Ret deficiency in mice impairs the development of A5 and A6 neurons and the functional maturation of the respiratory rhythm." *European Journal of Neuroscience* **22**(10): 2403-2412.

Volkow, N. D. J. Swanson, J. M. (2003). "Variables that affect the clinical use and abuse of methylphenidate in the treatment of ADHD." *American Journal of Psychiatry* **160**(11): 1909-1918.

Wilens, T. E. Spencer, T. J.(2000). "The stimulants revisited." *Child and Adolescent Psychiatric Clinics of North America* **9**(3): 573-+.

Winzer-Serhan, U. H. Raymon, H.K. Broide, R. S. Chen, Y. Leslie, F. M. (1997). "Expression of alpha(2) adrenoceptors during rat brain development .1. alpha(2A) messenger RNA expression." *Neuroscience* **76**(1): 241-260.

Wolf, G. (1996). *A history of vitamin A and retinoids*. University of California; Berkeley; 10(9):1102-7.

Wolf, G. (2001). "Discovery of Vitamin A." *Encyclopedia of life Sciencies*. doi: 10.1038/npg.els 0003419. Retrieved on 2007

Wood, H. Pall, G. Morriskay, G. (1994). "Exposure to retionic acid before of after the onset of somitogenesis reveals separate effects on rhombomeric segmentation and 3' *hoxb* gene-expression domains." *Development* **120**(8): 2279-2285.

Anexos

Datos informativos sobre TDAH:

- Academia Americana de Pediatría.
- Área Psiquiatría Infanto-Juvenil. Hospital Fray Bernardino Álvarez, Madrid.
- Asociación Andaluza de Neuropsiquiatría.
- Asociación de familiares de niños hiperactivos Española.
- Asociación de familiares de TDAH.
- Centro para el control y prevención de enfermedades.
- CIAP-2
- CIE.
- Clínica contemporánea.
- Colegio de psicólogos de Andalucía occidental
- Consenso Internacional sobre TDAH (Russell A. Barkley, enero 2002)
- Consenso Multidisciplinar en TDAH (J.R. Valdizan, julio 2005)
- DSM.
- EFPA.
- Diccionario Terminologico de Ciencias Médicas. Barcelona:Salvat; 1972. P.1124
- Estudio realizado por Pedro Benjumea y Dolores Mojarro en Sevilla y Gómez Beneyto en Valencia.
- Federación Española de asociaciones de ayuda al déficit de atención e hiperactividad
- Federación española de enfermedades raras
- Hospital de día Infanto-Juvenil "Natividad Zubieta".
- Hospital Virgen del Rocío de Sevilla. Área de Salud Mental.
- INFOCOP.
- III Congreso Internacional sobre TDAH (Berlín, mayo 2011)
- Las ventajas de ser Hiperactivo, ediciones Aljibe
- No estáis solos, editorial Cúpula.
- Organización mundial de la salud (OMS)
- Proyecto TDAH
- Red de servicios de atención a la salud mental en Andalucía
- Revista: Psychiatric Times 2010. Frances, Allen.

- Sir Alexander Crichton (1798) “Una investigación sobre la naturaleza y el origen de la enajenación mental: la comprensión de un sistema conciso de la fisiología y patología de la mente humana y una historia de las pasiones y sus Efectos. Pag 271-279
- TDAH Guía de tratamientos para padres, Academia de Psiquiatría Americana de niños y adolescente y Asociación Americana de Psiquiatría
- TDAH Manual para Padres.
- Unidad de Psiquiatría de la Universidad Complutense de Madrid

Tablas de expresión del efecto estadístico

Peso

Tabla 1. Evolución del peso IDA

GRUPO	VALOR F	VALOR P	SIGNIFICANCIA
control vs AR	$F_{(1,13,12)} = 4,2915361$	$P = 0,0605162$	
control vs ida	$F_{(1,13,12)} = 2,2966715$	$P = 0,1555412$	
control vs AR+ida	$F_{(1,13,12)} = 0,0039164$	$P = 0,9511300$	
AR vs ida	$F_{(1,13,12)} = 0,9607843$	$P = 0,3463383$	
AR vs AR+ida	$F_{(1,13,12)} = 5,6593886$	$P = 0,0348295$	*
ida vs AR+ida	$F_{(1,13,12)} = 3,4489311$	$P = 0,0879957$	

Tabla 2. Evolución del peso MF

GRUPO	VALOR F	VALOR P	SIGNIFICANCIA
control vs AR	$F_{(1,13,12)} = 4,0909090$	$P = 0,0659824$	
control vs mf	$F_{(1,13,12)} = 1,3579676$	$P = 0,2665315$	
control vs AR+mf	$F_{(1,13,12)} = 0,4498141$	$P = 0,5151245$	
AR vs mf	$F_{(1,13,12)} = 2,5346534$	$P = 0,1373561$	
AR vs AR+mf	$F_{(1,13,12)} = 7,4490398$	$P = 0,0182904$	*
mf vs AR+mf	$F_{(1,13,12)} = 2,5346534$	$P = 0,1373561$	

Placa caliente

Tabla 3. Placa caliente IDA T1

GRUPO	VALOR F	VALOR P	SIGNIFICANCIA
control vs AR	$F_{(1,23,22)} = 1,1737541$	$P = 0,2903626$	
control vs ida	$F_{(1,18,17)} = 3,8798627$	$P = 0,0653846$	
control vs AR+ida	$F_{(1,20,19)} = 0,0242826$	$P = 0,8778115$	
AR vs ida	$F_{(1,16,15)} = 2,9891401$	$P = 0,1043449$	
AR vs AR+ida	$F_{(1,18,17)} = 2,2965719$	$P = 0,1480325$	
ida vs AR+ida	$F_{(1,13,12)} = 4,1470675$	$P = 0,0643942$	

Tabla 4. Placa caliente IDA T2

GRUPO	VALOR F	VALOR P	SIGNIFICANCIA
control vs AR	$F_{(1,23,22)} = 1,1037664$	$P = 0,3048452$	
control vs ida	$F_{(1,18,17)} = 0,6758472$	$P = 0,4224016$	
control vs AR+ida	$F_{(1,20,19)} = 1,0766414$	$P = 0,3124758$	
AR vs ida	$F_{(1,16,15)} = 2,6663380$	$P = 0,1233014$	
AR vs AR+ida	$F_{(1,18,17)} = 0,0744135$	$P = 0,7783017$	
ida vs AR+ida	$F_{(1,13,12)} = 1,6600409$	$P = 0,2218857$	

Tabla 5. Placa caliente IDA, número de heces

GRUPO	VALOR F	VALOR P	SIGNIFICANCIA
control vs AR	$F_{(1,23,22)} = 12,307692$	$P = 0,0056433$	**
control vs ida	$F_{(1,18,17)} = 6,4000000$	$P = 0,0298800$	*
control vs AR+ida	$F_{(1,20,19)} = 0,2941176$	$P = 0,5994703$	
AR vs ida	$F_{(1,16,15)} = 0,0000001$	$P = 0,9999999$	
AR vs AR+ida	$F_{(1,18,17)} = 16,200000$	$P = 0,0024192$	**
ida vs AR+ida	$F_{(1,13,12)} = 8,2653061$	$P = 0,0165280$	*

Tabla 6. Placa caliente MF T1

GRUPO	VALOR F	VALOR P	SIGNIFICANCIA
control vs AR	$F_{(1,28,27)} = 0,0014477$	$P = 0,9699287$	
control vs mf	$F_{(1,29,28)} = 0,1213717$	$P = 0,7301573$	
control vs AR+mf	$F_{(1,26,25)} = 0,1548636$	$P = 0,6972663$	
AR vs mf	$F_{(1,24,23)} = 0,0651356$	$P = 0,8008239$	
AR vs AR+mf	$F_{(1,21,20)} = 0,0909720$	$P = 0,7660587$	
mf vs AR+mf	$F_{(1,22,21)} = 0,0214525$	$P = 0,8849497$	

Tabla 7. Placa caliente MF T2

GRUPO	VALOR F	VALOR P	SIGNIFICANCIA
control vs AR	$F_{(1,28,27)} = 0,8629304$	$P = 0,3611509$	
control vs mf	$F_{(1,29,28)} = 0,6359127$	$P = 0,4319056$	
control vs AR+mf	$F_{(1,26,25)} = 0,0983107$	$P = 0,7564675$	
AR vs mf	$F_{(1,24,23)} = 0,1480130$	$P = 0,7039759$	
AR vs AR+mf	$F_{(1,21,20)} = 0,2320122$	$P = 0,6352643$	
mf vs AR+mf	$F_{(1,22,21)} = 0,8748125$	$P = 0,3602581$	

Tabla 8. Placa caliente MF, número de heces

GRUPO	VALOR F	VALOR P	SIGNIFICANCIA
control vs AR	$F_{(1,28,27)} = 0,0311404$	$P = 0,8612445$	
control vs mf	$F_{(1,29,28)} = 0,0511502$	$P = 0,8227166$	
control vs AR+mf	$F_{(1,26,25)} = 0,4681647$	$P = 0,5001267$	
AR vs mf	$F_{(1,24,23)} = 0,0011044$	$P = 0,9737753$	
AR vs AR+mf	$F_{(1,21,20)} = 0,6672226$	$P = 0,4236452$	
mf vs AR+mf	$F_{(1,22,21)} = 0,8783434$	$P = 0,3593100$	

Actimetro

Tabla 9. Total actividad acumulada IDA, 2 minutos

GRUPO	VALOR F	VALOR P	SIGNIFICANCIA
control vs AR	$F_{(1,24,23)} = 0,1174252$	$P = 0,7349559$	
control vs ida	$F_{(1,18,17)} = 0,0763280$	$P = 0,7846001$	
control vs AR+ida	$F_{(1,24,23)} = 0,9945600$	$P = 0,3286019$	
AR vs ida	$F_{(1,17,16)} = 0,0006546$	$P = 0,9799042$	
AR vs AR+ida	$F_{(1,23,22)} = 2,3051497$	$P = 0,1431864$	
ida vs AR+ida	$F_{(1,17,16)} = 1,3936300$	$P = 0,2551125$	

Tabla 10. Total actividad acumulada IDA, 5 minutos

GRUPO	VALOR F	VALOR P	SIGNIFICANCIA
control vs AR	$F_{(1,24,23)} = 0,0028560$	$P = 0,9578411$	
control vs ida	$F_{(1,18,17)} = 0,0302215$	$P = 0,8642135$	
control vs AR+ida	$F_{(1,24,23)} = 2,5457209$	$P = 0,1242436$	
AR vs ida	$F_{(1,17,16)} = 0,0624247$	$P = 0,8058833$	
AR vs AR+ida	$F_{(1,23,22)} = 3,4201866$	$P = 0,0778854$	
ida vs AR+ida	$F_{(1,17,16)} = 1,6337650$	$P = 0,2194153$	

Tabla 11. Total actividad acumulada IDA, 10 minutos

GRUPO	VALOR F	VALOR P	SIGNIFICANCIA
control vs AR	$F_{(1,24,23)} = 0,0223846$	$P = 0,8823726$	
control vs ida	$F_{(1,18,17)} = 1,2804421$	$P = 0,2735272$	
control vs AR+ida	$F_{(1,24,23)} = 3,1383293$	$P = 0,0897231$	
AR vs ida	$F_{(1,17,16)} = 1,0350417$	$P = 0,3241156$	
AR vs AR+ida	$F_{(1,23,22)} = 2,5999140$	$P = 0,1211238$	
ida vs AR+ida	$F_{(1,17,16)} = 0,0722653$	$P = 0,7915020$	

Tabla 12. Total actividad acumulada IDA, 2 minutos vs 5 minutos

GRUPO	VALOR F	VALOR P	SIGNIFICANCIA
control vs control	$F_{(1,25,24)} = 27,478490$	$P = 0,0000225$	***
AR vs AR	$F_{(1,23,22)} = 38,583980$	$P = 2,983E-06$	***
ida vs ida	$F_{(1,11,10)} = 16,350852$	$P = 0,0023460$	**
AR+ida vs AR+ida	$F_{(1,23,22)} = 26,053262$	$P = 0,0000409$	***

Tabla 13. Total actividad acumulada IDA, 5 minutos vs 10 minutos

GRUPO	VALOR F	VALOR P	SIGNIFICANCIA
control vs control	$F_{(1,25,24)} = 25,878025$	$P = 0,0000333$	***
AR vs AR	$F_{(1,23,22)} = 25,381439$	$P = 0,0000480$	***
ida vs ida	$F_{(1,11,10)} = 8,4502201$	$P = 0,0156405$	*
AR+ida vs AR+ida	$F_{(1,23,22)} = 26,272001$	$P = 0,0000388$	***

Tabla 14. Medida de ansiedad IDA, 5 minutos

GRUPO	VALOR F	VALOR P	SIGNIFICANCIA
control vs AR	$F_{(1,24,23)} = 0,1862355$	$P = 0,6690011$	
control vs ida	$F_{(1,18,17)} = 2,3715867$	$P = 0,1419679$	
control vs AR+ida	$F_{(1,24,23)} = 1,7345301$	$P = 0,2008050$	
AR vs ida	$F_{(1,17,16)} = 3,7971120$	$P = 0,0690995$	
AR vs AR+ida	$F_{(1,23,22)} = 0,9291782$	$P = 0,3455533$	
ida vs AR+ida	$F_{(1,17,16)} = 6,3390921$	$P = 0,0228427$	*

Tabla 15. Medida de ansiedad IDA, 10 minutos

GRUPO	VALOR F	VALOR P	SIGNIFICANCIA
control vs AR	$F_{(1,24,23)} = 0,0577783$	$P = 0,8121719$	
control vs ida	$F_{(1,18,17)} = 3,5483525$	$P = 0,0768265$	
control vs AR+ida	$F_{(1,24,23)} = 0,3233193$	$P = 0,5751302$	
AR vs ida	$F_{(1,17,16)} = 2,3830258$	$P = 0,1422061$	
AR vs AR+ida	$F_{(1,23,22)} = 0,5859718$	$P = 0,4521157$	
ida vs AR+ida	$F_{(1,17,16)} = 5,3056358$	$P = 0,0350108$	*

Tabla 16. Número de heces IDA

GRUPO	VALOR F	VALOR P	SIGNIFICANCIA
control vs AR	$F_{(1,24,23)} = 0,1988047$	$P = 0,6598564$	
control vs ida	$F_{(1,18,17)} = 53,749184$	$P = 1,172E-06$	***
control vs AR+ida	$F_{(1,24,23)} = 0,1357377$	$P = 0,7159250$	
AR vs ida	$F_{(1,17,16)} = 37,152069$	$P = 0,0000154$	***
AR vs AR+ida	$F_{(1,23,22)} = 0,0136986$	$P = 0,9078893$	
ida vs AR+ida	$F_{(1,17,16)} = 49,838452$	$P = 2,699E-06$	***

Tabla 17. Total actividad acumulada MF, 2 minutos

GRUPO	VALOR F	VALOR P	SIGNIFICANCIA
control vs AR	$F_{(1,20,19)} = 6,2041091$	$P = 0,0221656$	*
control vs mf	$F_{(1,21,20)} = 0,5362511$	$P = 0,4724856$	
control vs AR+mf	$F_{(1,18,17)} = 10,276216$	$P = 0,0051841$	**
AR vs mf	$F_{(1,24,23)} = 3,1931754$	$P = 0,0871345$	
AR vs AR+mf	$F_{(1,21,20)} = 0,6615279$	$P = 0,4255984$	
mf vs AR+mf	$F_{(1,22,21)} = 6,3210306$	$P = 0,0201513$	*

Tabla 18. Total actividad acumulada MF, 5 minutos

GRUPO	VALOR F	VALOR P	SIGNIFICANCIA
control vs AR	$F_{(1,20,19)} = 17,345898$	$P = 0,0005258$	***
control vs mf	$F_{(1,21,20)} = 1,6499783$	$P = 0,2136415$	
control vs AR+mf	$F_{(1,18,17)} = 13,882109$	$P = 0,0016807$	**
AR vs mf	$F_{(1,24,23)} = 7,3512659$	$P = 0,0124546$	*
AR vs AR+mf	$F_{(1,21,20)} = 0,0623548$	$P = 0,8053588$	
mf vs AR+ida	$F_{(1,22,21)} = 5,2905132$	$P = 0,0317948$	*

Tabla 19. Total actividad acumulada MF, 10 minutos

GRUPO	VALOR F	VALOR P	SIGNIFICANCIA
control vs AR	$F_{(1,20,19)} = 16,704694$	$P = 0,0006279$	***
control vs mf	$F_{(1,21,20)} = 1,3993611$	$P = 0,2507025$	
control vs AR+mf	$F_{(1,18,17)} = 8,4599433$	$P = 0,0097826$	**
AR vs mf	$F_{(1,24,23)} = 2,8734529$	$P = 0,1035497$	
AR vs AR+mf	$F_{(1,21,20)} = 1,0608430$	$P = 0,3153187$	
mf vs AR+mf	$F_{(1,22,21)} = 0,7491720$	$P = 0,3965193$	

Tabla 20. Total actividad acumulada MF, 2 minutos vs 5 minutos

GRUPO	VALOR F	VALOR P	SIGNIFICANCIA
control vs control	$F_{(1,17,16)} = 116,13924$	$P = 9,606 E-09$	***
AR vs AR	$F_{(1,23,22)} = 27,379228$	$P = 0,0000300$	***
mf vs mf	$F_{(1,25,24)} = 58,672869$	$P = 6,750 E-08$	***
AR+mf vs AR+mf	$F_{(1,19,18)} = 29,409160$	$P = 0,0000375$	***

Tabla 21. Total actividad acumulada MF, 5 minutos vs 10 minutos

GRUPO	VALOR F	VALOR P	SIGNIFICANCIA
control vs control	$F_{(1,17,16)} = 36,925548$	$P = 0,0000160$	***
AR vs AR	$F_{(1,23,22)} = 16,386861$	$P = 0,0005364$	***
mf vs mf	$F_{(1,25,24)} = 10,080757$	$P = 0,0040798$	**
AR+mf vs AR+mf	$F_{(1,19,18)} = 21,215877$	$P = 0,0002193$	***

Tabla 22. Medida de ansiedad MF, 5 minutos

GRUPO	VALOR F	VALOR P	SIGNIFICANCIA
control vs AR	$F_{(1,20,19)} = 0,4479520$	$P = 0,5113608$	
control vs mf	$F_{(1,21,20)} = 2,6577889$	$P = 0,1186926$	
control vs AR+mf	$F_{(1,18,17)} = 0,8832003$	$P = 0,3604892$	
AR vs mf	$F_{(1,24,23)} = 0,4666852$	$P = 0,5013402$	
AR vs AR+mf	$F_{(1,21,20)} = 0,0630522$	$P = 0,8042971$	
mf vs AR+mf	$F_{(1,22,21)} = 0,1334223$	$P = 0,7185628$	

Tabla 23. Medida de ansiedad MF, 10 minutos

GRUPO	VALOR F	VALOR P	SIGNIFICANCIA
control vs AR	$F_{(1,20,19)} = 0,4442698$	$P = 0,5130818$	
control vs mf	$F_{(1,21,20)} = 0,7406782$	$P = 0,3996437$	
control vs AR+mf	$F_{(1,18,17)} = 0,4276897$	$P = 0,5218739$	
AR vs mf	$F_{(1,24,23)} = 0,0337369$	$P = 0,8558770$	
AR vs AR+mf	$F_{(1,21,20)} = 0,0017030$	$P = 0,9674912$	
mf vs AR+mf	$F_{(1,22,21)} = 0,0486528$	$P = 0,8275546$	

Tabla 24. Número de heces MF

GRUPO	VALOR F	VALOR P	SIGNIFICANCIA
control vs AR	$F_{(1,20,19)} = 3,2998663$	$P = 0,0850966$	
control vs mf	$F_{(1,21,20)} = 28,623171$	$P = 0,0000309$	***
control vs AR+mf	$F_{(1,18,17)} = 1,2764220$	$P = 0,2742550$	
AR vs mf	$F_{(1,24,23)} = 18,657892$	$P = 0,0002539$	***
AR vs AR+mf	$F_{(1,21,20)} = 0,1885548$	$P = 0,6687706$	
mf vs AR+mf	$F_{(1,22,21)} = 17,792909$	$P = 0,0003856$	***

Prepulso

Tabla 25. Respuesta de sobresalto IDA, latencia

GRUPO	VALOR F	VALOR P	SIGNIFICANCIA
control vs AR	$F_{(1,22,21)} = 0,0189855$	$P = 0,8917205$	
control vs ida	$F_{(1,24,23)} = 0,9704272$	$P = 0,3348239$	
control vs AR+ida	$F_{(1,23,22)} = 0,9015997$	$P = 0,3526682$	
AR vs ida	$F_{(1,23,22)} = 0,3660275$	$P = 0,5513676$	
AR vs AR+ida	$F_{(1,22,21)} = 0,4142214$	$P = 0,5268014$	
ida vs AR+ida	$F_{(1,24,23)} = 0,0221463$	$P = 0,8829954$	

Tabla 26. Respuesta de sobresalto IDA, intensidad pico

GRUPO	VALOR F	VALOR P	SIGNIFICANCIA
control vs AR	$F_{(1,22,21)} = 6,4868026$	$P = 0,0187689$	*
control vs ida	$F_{(1,24,23)} = 4,7102316$	$P = 0,0405577$	*
control vs AR+ida	$F_{(1,23,22)} = 6,7432839$	$P = 0,0164623$	*
AR vs ida	$F_{(1,23,22)} = 2,5528355$	$P = 0,1243614$	
AR vs AR+ida	$F_{(1,22,21)} = 0,0908419$	$P = 0,7660738$	
ida vs AR+ida	$F_{(1,24,23)} = 1,9798173$	$P = 0,1727799$	

Tabla 27. Respuesta de sobresalto IDA, intensidad área

GRUPO	VALOR F	VALOR P	SIGNIFICANCIA
control vs AR	$F_{(1,22,21)} = 7,5995329$	$P = 0,0118202$	*
control vs ida	$F_{(1,24,23)} = 5,0195820$	$P = 0,0350153$	*
control vs AR+ida	$F_{(1,23,22)} = 9,1088279$	$P = 0,0063237$	**
AR vs ida	$F_{(1,23,22)} = 2,2110350$	$P = 0,1512592$	
AR vs AR+ida	$F_{(1,22,21)} = 0,1656639$	$P = 0,6881133$	
ida vs AR+ida	$F_{(1,24,23)} = 3,4894909$	$P = 0,0745526$	

Tabla 28. Prepulso frente a línea base IDA. Valor Pico, inhibición

GRUPO	VALOR F	VALOR P	SIGNIFICANCIA
control vs AR	$F_{(1,22,21)} = 0,1181500$	$P = 0,7344673$	
control vs ida	$F_{(1,24,23)} = 0,2750348$	$P = 0,6052187$	
control vs AR+ida	$F_{(1,23,22)} = 0,9547536$	$P = 0,3391352$	
AR vs ida	$F_{(1,23,22)} = 0,0113284$	$P = 0,9162473$	
AR vs AR+ida	$F_{(1,22,21)} = 0,3408489$	$P = 0,5655584$	
ida vs AR+ida	$F_{(1,24,23)} = 0,2911938$	$P = 0,5948766$	

Tabla 29. Respuesta de sobresalto MF, latencia

GRUPO	VALOR F	VALOR P	SIGNIFICANCIA
control vs AR	$F_{(1,16,15)} = 0,0243431$	$P = 0,8780954$	
control vs mf	$F_{(1,21,20)} = 0,0039437$	$P = 0,9505498$	
control vs AR+mf	$F_{(1,21,20)} = 1,4797652$	$P = 0,2379731$	
AR vs mf	$F_{(1,20,19)} = 0,0623552$	$P = 0,8054912$	
AR vs AR+mf	$F_{(1,20,19)} = 1,9516752$	$P = 0,1793926$	
mf vs AR+mf	$F_{(1,25,24)} = 1,8545664$	$P = 0,1859004$	

Tabla 30. Respuesta de sobresalto MF, intensidad pico

GRUPO	VALOR F	VALOR P	SIGNIFICANCIA
control vs AR	$F_{(1,16,15)} = 1,6580762$	$P = 0,2173759$	
control vs mf	$F_{(1,21,20)} = 1,1850060$	$P = 0,2892833$	
control vs AR+mf	$F_{(1,21,20)} = 0,0078292$	$P = 0,9303729$	
AR vs mf	$F_{(1,20,19)} = 0,1175582$	$P = 0,7354622$	
AR vs AR+mf	$F_{(1,20,19)} = 2,1113726$	$P = 0,1625252$	
mf vs AR+mf	$F_{(1,25,24)} = 1,7073493$	$P = 0,2037127$	

Tabla 31. Respuesta de sobresalto MF, intensidad área

GRUPO	VALOR F	VALOR P	SIGNIFICANCIA
control vs AR	$F_{(1,16,15)} = 2,1471838$	$P = 0,1634777$	
control vs mf	$F_{(1,21,20)} = 3,1455171$	$P = 0,0913645$	
control vs AR+mf	$F_{(1,21,20)} = 0,1233975$	$P = 0,7290519$	
AR vs mf	$F_{(1,20,19)} = 0,0113717$	$P = 0,9161938$	
AR vs AR+mf	$F_{(1,20,19)} = 3,9822348$	$P = 0,0605222$	
mf vs AR+mf	$F_{(1,25,24)} = 4,9420536$	$P = 0,0358834$	*

Tabla 32. Prepulso frente a línea base MF. Valor Pico, inhibición

GRUPO	VALOR F	VALOR P	SIGNIFICANCIA
control vs AR	$F_{(1,16,15)} = 0,5070066$	$P = 0,4890199$	
control vs mf	$F_{(1,21,20)} = 0,1480033$	$P = 0,7045112$	
control vs AR+mf	$F_{(1,21,20)} = 0,4293326$	$P = 0,5197827$	
AR vs mf	$F_{(1,20,19)} = 0,2138779$	$P = 0,6489970$	
AR vs AR+mf	$F_{(1,20,19)} = 0,5121250$	$P = 0,4829230$	
mf vs AR+mf	$F_{(1,25,24)} = 0,1615708$	$P = 0,6912716$	

Cilindro rotatorio

Tabla 33. Número de caídas IDA, 1^{er} día

GRUPO	VALOR F	VALOR P	SIGNIFICANCIA
control vs AR	$F_{(1,10,9)} = 4,8826542$	$P = 0,0544743$	
control vs ida	$F_{(1,11,10)} = 21,923076$	$P = 0,0008646$	***
control vs AR+ida	$F_{(1,11,10)} = 18,404908$	$P = 0,0015859$	**
AR vs ida	$F_{(1,10,9)} = 7,9659788$	$P = 0,0199684$	*
AR vs AR+ida	$F_{(1,10,9)} = 6,0976816$	$P = 0,0356083$	*
ida vs AR+ida	$F_{(1,11,10)} = 0,0697674$	$P = 0,7970393$	

Tabla 34. Número de caídas IDA, 2^o día

GRUPO	VALOR F	VALOR P	SIGNIFICANCIA
control vs AR	$F_{(1,10,9)} = 31,387081$	$P = 0,0003332$	***
control vs ida	$F_{(1,11,10)} = 0,0073855$	$P = 0,9332112$	
control vs AR+ida	$F_{(1,11,10)} = 2,0660146$	$P = 0,1811590$	
AR vs ida	$F_{(1,10,9)} = 17,610205$	$P = 0,0023188$	**
AR vs AR+ida	$F_{(1,10,9)} = 62,801570$	$P = 0,0000238$	***
ida vs AR+ida	$F_{(1,11,10)} = 1,5806451$	$P = 0,2372370$	

Tabla 35. Número de caídas IDA, 3^{er} día

GRUPO	VALOR F	VALOR P	SIGNIFICANCIA
control vs AR	$F_{(1,10,9)} = 13,547070$	$P = 0,0050704$	**
control vs ida	$F_{(1,11,10)} = 0,2439024$	$P = 0,6320686$	
control vs AR+ida	$F_{(1,11,10)} = 4,5458845$	$P = 0,0588120$	
AR vs ida	$F_{(1,10,9)} = 15,940739$	$P = 0,0031454$	**
AR vs AR+ida	$F_{(1,10,9)} = 85,910594$	$P = 6,707-E06$	***
ida vs AR+ida	$F_{(1,11,10)} = 1,8000000$	$P = 0,2093831$	

Tabla 36. Número de caídas IDA, total

GRUPO	VALOR F	VALOR P	SIGNIFICANCIA
control vs AR	$F_{(1,10,31)} = 7,1293379$	$P = 0,0256190$	*
control vs ida	$F_{(1,11,34)} = 4,4286295$	$P = 0,0616165$	
control vs AR+ida	$F_{(1,11,34)} = 13,959731$	$P = 0,0038702$	**
AR vs ida	$F_{(1,10,31)} = 44,411869$	$P = 0,0000922$	***
AR vs AR+ida	$F_{(1,10,31)} = 142,91208$	$P = 7,952E-07$	***
ida vs AR+ida	$F_{(1,11,34)} = 3,6724313$	$P = 0,0843147$	

Tabla 37. Números de caídas IDA, 1^{er} día vs 3^{er} día

GRUPO	VALOR F	VALOR P	SIGNIFICANCIA
control vs control	$F_{(1,11,10)} = 29,891745$	$P = 0,0002740$	***
AR vs AR	$F_{(1,9,8)} = 0,04624277$	$P = 0,8351158$	
ida vs ida	$F_{(1,11,10)} = 8,4120335$	$P = 0,0158240$	*
AR+ida vs AR+ida	$F_{(1,11,10)} = 37,926391$	$P = 0,0001071$	***

Tabla 38. Número de respuestas pasivas IDA, 1^{er} día

GRUPO	VALOR F	VALOR P	SIGNIFICANCIA
control vs AR	$F_{(1,10,9)} = 0,1055718$	$P = 0,7526684$	
control vs ida	$F_{(1,11,10)} = 7,3529411$	$P = 0,0218723$	*
control vs AR+ida	$F_{(1,11,10)} = 0,0000001$	$P = 0,9999999$	
AR vs ida	$F_{(1,10,9)} = 9,0371900$	$P = 0,0148069$	*
AR vs AR+ida	$F_{(1,10,9)} = 0,2045454$	$P = 0,6617803$	
ida vs AR+ida	$F_{(1,11,10)} = 8,9285714$	$P = 0,0136184$	*

Tabla 39. Número de respuestas pasivas IDA, 2^o día

GRUPO	VALOR F	VALOR P	SIGNIFICANCIA
control vs AR	$F_{(1,10,9)} = 8,6086956$	$P = 0,0166467$	*
control vs ida	$F_{(1,11,10)} = 0,7377049$	$P = 0,4105126$	
control vs AR+ida	$F_{(1,11,10)} = 0,0588235$	$P = 0,8132670$	
AR vs ida	$F_{(1,10,9)} = 4,0715438$	$P = 0,0743849$	
AR vs AR+ida	$F_{(1,10,9)} = 6,7974205$	$P = 0,0284015$	*
ida vs AR+ida	$F_{(1,11,10)} = 0,9756097$	$P = 0,3465811$	

Tabla 40. Número de respuestas pasivas IDA, 3^{er} día

GRUPO	VALOR F	VALOR P	SIGNIFICANCIA
control vs AR	$F_{(1,10,9)} = 2,2667660$	$P = 0,1664373$	
control vs ida	$F_{(1,11,10)} = 22,068965$	$P = 0,0008444$	***
control vs AR+ida	$F_{(1,11,10)} = 2,4752475$	$P = 0,1467271$	
AR vs ida	$F_{(1,10,9)} = 12,202053$	$P = 0,0067964$	**
AR vs AR+ida	$F_{(1,10,9)} = 1,0970528$	$P = 0,3222265$	
ida vs AR+ida	$F_{(1,11,10)} = 0,7200000$	$P = 0,4159931$	

Tabla 41. Números de respuestas pasivas IDA, total

GRUPO	VALOR F	VALOR P	SIGNIFICANCIA
control vs AR	$F_{(1,10,31)} = 3,7821612$	$P = 0,0836652$	
control vs ida	$F_{(1,11,34)} = 9,8327137$	$P = 0,0105870$	*
control vs AR+ida	$F_{(1,11,34)} = 4,0604026$	$P = 0,0715698$	
AR vs ida	$F_{(1,10,31)} = 15,340909$	$P = 0,0035283$	**
AR vs AR+ida	$F_{(1,10,31)} = 11,045454$	$P = 0,0088910$	**
ida vs AR+ida	$F_{(1,11,34)} = 2,1428571$	$P = 0,1739483$	

Tabla 42. Números de respuestas pasivas IDA, 1^{er} día vs 3^{er} día

GRUPO	VALOR F	VALOR P	SIGNIFICANCIA
control vs control	$F_{(1,11,10)} = 0,2000000$	$P = 0,6642514$	
AR vs AR	$F_{(1,9,8)} = 1,5999989$	$P = 0,2415039$	
ida vs ida	$F_{(1,11,10)} = 1,2376237$	$P = 0,2919576$	
AR+ida vs AR+ida	$F_{(1,11,10)} = 1,9756097$	$P = 0,1900153$	

Tabla 43. Número de giros IDA, 1^{er} día

GRUPO	VALOR F	VALOR P	SIGNIFICANCIA
control vs AR	$F_{(1,10,9)} = 15,034090$	$P = 0,0037463$	**
control vs ida	$F_{(1,11,10)} = 6,2500000$	$P = 0,0314468$	*
control vs AR+ida	$F_{(1,11,10)} = 25,000000$	$P = 0,0005373$	***
AR vs ida	$F_{(1,10,9)} = 0,1055718$	$P = 0,7526684$	
AR vs AR+ida	$F_{(1,10,9)} = 0,2671614$	$P = 0,6177031$	
ida vs AR+ida	$F_{(1,11,10)} = 1,199E-15$	$P = 0,9999996$	

Tabla 44. Número de giros IDA, 2^o día

GRUPO	VALOR F	VALOR P	SIGNIFICANCIA
control vs AR	$F_{(1,10,9)} = 0,7639377$	$P = 0,4048176$	
control vs ida	$F_{(1,11,10)} = 2,4257425$	$P = 0,1504134$	
control vs AR+ida	$F_{(1,11,10)} = 9,4117647$	$P = 0,0118841$	*
AR vs ida	$F_{(1,10,9)} = 3,6532769$	$P = 0,0882700$	
AR vs AR+ida	$F_{(1,10,9)} = 12,697639$	$P = 0,0060870$	**
ida vs AR+ida	$F_{(1,11,10)} = 0,0495049$	$P = 0,8284055$	

Tabla 45. Número de giros IDA, 3^{er} día

GRUPO	VALOR F	VALOR P	SIGNIFICANCIA
control vs AR	$F_{(1,10,9)} = 0,3027857$	$P = 0,5955482$	
control vs ida	$F_{(1,11,10)} = 5,863039$	$P = 0,0359771$	*
control vs AR+ida	$F_{(1,11,10)} = 8,9658848$	$P = 0,0134740$	*
AR vs ida	$F_{(1,10,9)} = 3,9175996$	$P = 0,0791496$	
AR vs AR+ida	$F_{(1,10,9)} = 6,3351091$	$P = 0,0329322$	*
ida vs AR+ida	$F_{(1,11,10)} = 0,100000$	$P = 0,7583315$	

Tabla 46. Números de giros IDA, total

GRUPO	VALOR F	VALOR P	SIGNIFICANCIA
control vs AR	$F_{(1,10,31)} = 0,3027587$	$P = 0,5955481$	
control vs ida	$F_{(1,11,34)} = 5,8630394$	$P = 0,0359771$	*
control vs AR+ida	$F_{(1,11,34)} = 8,9658848$	$P = 0,0134740$	*
AR vs ida	$F_{(1,10,31)} = 3,9175996$	$P = 0,0791496$	
AR vs AR+ida	$F_{(1,10,31)} = 6,3351091$	$P = 0,0329322$	*
ida vs AR+ida	$F_{(1,11,34)} = 0,1000000$	$P = 0,7583315$	

Tabla 47. Números de giros IDA, 1^{er} día vs 3^{er} día

GRUPO	VALOR F	VALOR P	SIGNIFICANCIA
control vs control	$F_{(1,11,10)} = 3,7500000$	$P = 0,0815534$	
AR vs AR	$F_{(1,9,8)} = 2,0000000$	$P = 0,1950155$	
ida vs ida	$F_{(1,11,10)} = 0,3278688$	$P = 0,5795620$	
AR+ida vs AR+ida	$F_{(1,11,10)} = 1,1951219$	$P = 0,2999338$	

Tabla 48. Número de heces IDA, 1^{er} día

GRUPO	VALOR F	VALOR P	SIGNIFICANCIA
control vs AR	$F_{(1,10,9)} = 21,490056$	$P = 0,0012266$	**
control vs ida	$F_{(1,11,10)} = 0,8653846$	$P = 0,3741480$	
control vs AR+ida	$F_{(1,11,10)} = 0,0289017$	$P = 0,8683962$	
AR vs ida	$F_{(1,10,9)} = 26,917037$	$P = 0,0005730$	***
AR vs AR+ida	$F_{(1,10,9)} = 21,346186$	$P = 0,0012540$	**
ida vs AR+ida	$F_{(1,11,10)} = 1,2436548$	$P = 0,2908502$	

Tabla 49. Número de heces IDA, 2º día

GRUPO	VALOR F	VALOR P	SIGNIFICANCIA
control vs AR	$F_{(1,10,9)} = 6,0625053$	$P = 0,0360274$	*
control vs ida	$F_{(1,11,10)} = 0,841121$	$P = 0,3806630$	
control vs AR+ida	$F_{(1,11,10)} = 0,841121$	$P = 0,3806630$	
AR vs ida	$F_{(1,10,9)} = 13,032927$	$P = 0,0056583$	**
AR vs AR+ida	$F_{(1,10,9)} = 13,007960$	$P = 0,0056889$	**
ida vs AR+ida	$F_{(1,11,10)} = 0,0000112$	$P = 0,9973917$	

Tabla 50. Número de heces IDA, 3º día

GRUPO	VALOR F	VALOR P	SIGNIFICANCIA
control vs AR	$F_{(1,10,9)} = 0,2391107$	$P = 0,6365442$	
control vs ida	$F_{(1,11,10)} = 0,059171$	$P = 0,8127272$	
control vs AR+ida	$F_{(1,11,10)} = 0,2453987$	$P = 0,6310380$	
AR vs ida	$F_{(1,10,9)} = 0,1194209$	$P = 0,7376033$	
AR vs AR+ida	$F_{(1,10,9)} = 0,0010639$	$P = 0,9746908$	
ida vs AR+ida	$F_{(1,11,10)} = 0,1052631$	$P = 0,7522875$	

Tabla 51. Número de heces IDA, total

GRUPO	VALOR F	VALOR P	SIGNIFICANCIA
control vs AR	$F_{(1,10,31)} = 10,112276$	$P = 0,0019777$	**
control vs ida	$F_{(1,11,34)} = 1,926557$	$P = 0,1680460$	
control vs AR+ida	$F_{(1,11,34)} = 0,691861$	$P = 0,4074018$	
AR vs ida	$F_{(1,10,31)} = 20,178980$	$P = 0,0000194$	***
AR vs AR+ida	$F_{(1,10,31)} = 15,405165$	$P = 0,0001621$	***
ida vs AR+ida	$F_{(1,11,34)} = 0,276675$	$P = 0,5999871$	

Tabla 52. Número de caídas MF, 1º día

GRUPO	VALOR F	VALOR P	SIGNIFICANCIA
control vs AR	$F_{(1,20,19)} = 0,0053300$	$P = 0,9425633$	
control vs mf	$F_{(1,21,20)} = 0,4947618$	$P = 0,4899191$	
control vs AR+mf	$F_{(1,18,17)} = 2,1278135$	$P = 0,1628762$	
AR vs mf	$F_{(1,24,23)} = 0,1152066$	$P = 0,7373723$	
AR vs AR+mf	$F_{(1,21,20)} = 2,5697852$	$P = 0,1245989$	
mf vs AR+mf	$F_{(1,22,21)} = 4,320445$	$P = 0,0505433$	

Tabla 53. Número de caídas MF, 2º día

GRUPO	VALOR F	VALOR P	SIGNIFICANCIA
control vs AR	$F_{(1,20,19)} = 0,0001075$	$P = 0,9918342$	
control vs mf	$F_{(1,21,20)} = 0,0024587$	$P = 0,9609442$	
control vs AR+mf	$F_{(1,18,17)} = 5,2818680$	$P = 0,0345086$	*
AR vs mf	$F_{(1,24,23)} = 0,0019507$	$P = 0,9651521$	
AR vs AR+mf	$F_{(1,21,20)} = 6,0288539$	$P = 0,0233496$	*
mf vs AR+mf	$F_{(1,22,21)} = 5,0314962$	$P = 0,0358061$	*

Tabla 54. Número de caídas MF, 3º día

GRUPO	VALOR F	VALOR P	SIGNIFICANCIA
control vs AR	$F_{(1,20,19)} = 1,0505904$	$P = 0,3182447$	
control vs mf	$F_{(1,21,20)} = 0,2534836$	$P = 0,6201330$	
control vs AR+mf	$F_{(1,18,17)} = 4,5937796$	$P = 0,0468476$	*
AR vs mf	$F_{(1,24,23)} = 0,4158463$	$P = 0,5253975$	
AR vs AR+mf	$F_{(1,21,20)} = 4,8913337$	$P = 0,0387967$	*
mf vs AR+mf	$F_{(1,22,21)} = 3,9060476$	$P = 0,0613944$	

Tabla 55. Número de caídas MF total

GRUPO	VALOR F	VALOR P	SIGNIFICANCIA
control vs AR	$F_{(1,20,61)} = 0,0610941$	$P = 0,8074259$	
control vs mf	$F_{(1,21,64)} = 0,0550097$	$P = 0,8169490$	
control vs AR+mf	$F_{(1,18,55)} = 5,1680918$	$P = 0,0362628$	*
AR vs mf	$F_{(1,24,73)} = 0,0012271$	$P = 0,9723576$	
AR vs AR+mf	$F_{(1,21,64)} = 4,7904789$	$P = 0,0406516$	*
mf vs AR+mf	$F_{(1,22,67)} = 5,6777165$	$P = 0,0267075$	*

Tabla 56. Número de caídas MF, 1º día vs 3º día

GRUPO	VALOR F	VALOR P	SIGNIFICANCIA
control vs control	$F_{(1,17,16)} = 14,993799$	$P = 0,0013506$	**
AR vs AR	$F_{(1,23,22)} = 5,5604395$	$P = 0,0276748$	*
mf vs mf	$F_{(1,25,24)} = 13,752361$	$P = 0,0010969$	**
AR+mf vs AR+mf	$F_{(1,19,18)} = 11,533212$	$P = 0,0032194$	**

Tabla 57. Número de respuestas pasivas MF, 1^{er} día

GRUPO	VALOR F	VALOR P	SIGNIFICANCIA
control vs AR	$F_{(1,19,18)} = 4,2437587$	$P = 0,0541541$	
control vs mf	$F_{(1,21,20)} = 2,6353530$	$P = 0,1201662$	
control vs AR+mf	$F_{(1,18,17)} = 0,0000939$	$P = 0,9923782$	
AR vs mf	$F_{(1,23,22)} = 1,2243043$	$P = 0,2804703$	
AR vs AR+mf	$F_{(1,20,19)} = 4,675959$	$P = 0,0435509$	*
mf vs AR+mf	$F_{(1,22,21)} = 2,8889665$	$P = 0,1039540$	

Tabla 58. Número de respuestas pasivas MF, 2^o día

GRUPO	VALOR F	VALOR P	SIGNIFICANCIA
control vs AR	$F_{(1,20,19)} = 0,0285714$	$P = 0,8675589$	
control vs mf	$F_{(1,21,20)} = 0,1002147$	$P = 0,7548525$	
control vs AR+mf	$F_{(1,18,17)} = 0,0489847$	$P = 0,8274760$	
AR vs mf	$F_{(1,24,23)} = 0,0369181$	$P = 0,8493181$	
AR vs AR+mf	$F_{(1,21,20)} = 0,0088047$	$P = 0,9261749$	
mf vs AR+mf	$F_{(1,22,21)} = 0,0061047$	$P = 0,9384619$	

Tabla 59. Número de respuestas pasivas MF, 3^{er} día

GRUPO	VALOR F	VALOR P	SIGNIFICANCIA
control vs AR	$F_{(1,19,18)} = 4,5692307$	$P = 0,0465241$	*
control vs mf	$F_{(1,21,20)} = 1,9192739$	$P = 0,1811944$	
control vs AR+mf	$F_{(1,18,17)} = 0,8551467$	$P = 0,3680417$	
AR vs mf	$F_{(1,24,23)} = 0,6561391$	$P = 0,4262281$	
AR vs AR+mf	$F_{(1,21,20)} = 0,4321024$	$P = 0,5184532$	
mf vs AR+mf	$F_{(1,21,20)} = 0,0455151$	$P = 0,8332193$	

Tabla 60. Números de respuestas pasivas MF, total

GRUPO	VALOR F	VALOR P	SIGNIFICANCIA
control vs AR	$F_{(1,20,61)} = 4,0593295$	$P = 0,0583017$	
control vs mf	$F_{(1,21,64)} = 2,5538472$	$P = 0,1257056$	
control vs AR+mf	$F_{(1,18,55)} = 0,2115689$	$P = 0,6513687$	
AR vs mf	$F_{(1,24,73)} = 0,6084277$	$P = 0,4433339$	
AR vs AR+mf	$F_{(1,21,64)} = 1,5074462$	$P = 0,2337839$	
mf vs AR+mf	$F_{(1,22,67)} = 0,6943791$	$P = 0,4140565$	

Tabla 61. Números de respuestas pasivas MF, 1^{er} día vs 3^{er} día

GRUPO	VALOR F	VALOR P	SIGNIFICANCIA
control vs control	$F_{(1,17,16)} = 0,5130260$	$P = 0,4841558$	
AR vs AR	$F_{(1,23,22)} = 2,5976676$	$P = 0,1212760$	
mf vs mf	$F_{(1,25,24)} = 2,3047619$	$P = 0,1420419$	
AR+mf vs AR+mf	$F_{(1,19,18)} = 0,0620689$	$P = 0,8060759$	

Tabla 62. Número de giros MF, 1^{er} día

GRUPO	VALOR F	VALOR P	SIGNIFICANCIA
control vs AR	$F_{(1,20,19)} = 2,3141092$	$P = 0,1446732$	
control vs mf	$F_{(1,21,20)} = 1,5092160$	$P = 0,2335193$	
control vs AR+mf	$F_{(1,18,17)} = 2,6217532$	$P = 0,1238091$	
AR vs mf	$F_{(1,24,23)} = 1,2474309$	$P = 0,2755758$	
AR vs AR+mf	$F_{(1,21,20)} = 0,0704721$	$P = 0,7933676$	
mf vs AR+mf	$F_{(1,22,21)} = 0,9653890$	$P = 0,3370181$	

Tabla 63. Número de giros MF, 2^o día

GRUPO	VALOR F	VALOR P	SIGNIFICANCIA
control vs AR	$F_{(1,20,19)} = 0,1101739$	$P = 0,7435797$	
control vs mf	$F_{(1,21,20)} = 0,5231848$	$P = 0,4778612$	
control vs AR+mf	$F_{(1,18,17)} = 0,1409714$	$P = 0,7119608$	
AR vs mf	$F_{(1,24,23)} = 0,8998452$	$P = 0,3522846$	
AR vs AR+mf	$F_{(1,21,20)} = 0,0056360$	$P = 0,9409021$	
mf vs AR+mf	$F_{(1,22,21)} = 0,8872899$	$P = 0,3569236$	

Tabla 64. Número de giros MF, 3^{er} día

GRUPO	VALOR F	VALOR P	SIGNIFICANCIA
control vs AR	$F_{(1,20,19)} = 0,5433043$	$P = 0,4700715$	
control vs mf	$F_{(1,21,20)} = 0,0952426$	$P = 0,7608067$	
control vs AR+mf	$F_{(1,18,17)} = 0,1680257$	$P = 0,6869916$	
AR vs mf	$F_{(1,24,23)} = 1,1321081$	$P = 0,2983698$	
AR vs AR+mf	$F_{(1,21,20)} = 0,1427592$	$P = 0,7095333$	
mf vs AR+mf	$F_{(1,22,21)} = 0,5071485$	$P = 0,4842133$	

Tabla 65. Números de giros MF, total

GRUPO	VALOR F	VALOR P	SIGNIFICANCIA
control vs AR	$F_{(1,20,61)} = 0,7813833$	$P = 0,3877673$	
control vs mf	$F_{(1,21,64)} = 0,0168003$	$P = 0,8981649$	
control vs AR+mf	$F_{(1,18,55)} = 0,5329593$	$P = 0,4753059$	
AR vs mf	$F_{(1,24,73)} = 1,3406206$	$P = 0,2588071$	
AR vs AR+mf	$F_{(1,21,64)} = 0,0681818$	$P = 0,7966726$	
mf vs AR+mf	$F_{(1,22,67)} = 0,9965910$	$P = 0,3295016$	

Tabla 66. Números de giros MF, 1^{er} día vs 3^{er} día

GRUPO	VALOR F	VALOR P	SIGNIFICANCIA
control vs control	$F_{(1,17,16)} = 5,3271889$	$P = 0,0346904$	
AR vs AR	$F_{(1,23,22)} = 1,3372884$	$P = 0,2599163$	
mf vs mf	$F_{(1,25,24)} = 5,0232558$	$P = 0,0345245$	*
AR+mf vs AR+mf	$F_{(1,19,18)} = 1,0175879$	$P = 0,3264607$	

Tabla 67. Número de heces MF, 1^{er} día

GRUPO	VALOR F	VALOR P	SIGNIFICANCIA
control vs AR	$F_{(1,20,19)} = 2,1709837$	$P = 0,1570110$	
control vs mf	$F_{(1,21,20)} = 0,5603448$	$P = 0,4628344$	
control vs AR+mf	$F_{(1,18,17)} = 2,9004599$	$P = 0,1067653$	
AR vs mf	$F_{(1,24,23)} = 5,7001733$	$P = 0,0255684$	*
AR vs AR+mf	$F_{(1,21,20)} = 0,0792489$	$P = 0,7812099$	
mf vs AR+mf	$F_{(1,22,21)} = 6,9159113$	$P = 0,0156575$	*

Tabla 68. Número de heces MF, 2^o día

GRUPO	VALOR F	VALOR P	SIGNIFICANCIA
control vs AR	$F_{(1,20,19)} = 3,2453349$	$P = 0,0875190$	
control vs mf	$F_{(1,21,20)} = 2,0643316$	$P = 0,1662411$	
control vs AR+mf	$F_{(1,18,17)} = 1,987853$	$P = 0,0012253$	**
AR vs mf	$F_{(1,24,23)} = 0,5455358$	$P = 0,4676182$	
AR vs AR+mf	$F_{(1,21,20)} = 5,3490502$	$P = 0,0314995$	*
mf vs AR+mf	$F_{(1,22,21)} = 13,512139$	$P = 0,0014063$	**

Tabla 69. Número de heces MF, 3^{er} día

GRUPO	VALOR F	VALOR P	SIGNIFICANCIA
control vs AR	$F_{(1,20,19)} = 0,0322977$	$P = 0,5764793$	
control vs mf	$F_{(1,21,20)} = 6,5143800$	$P = 0,0189813$	*
control vs AR+mf	$F_{(1,18,17)} = 0,7043887$	$P = 0,4129600$	
AR vs mf	$F_{(1,24,23)} = 3,1232402$	$P = 0,0904508$	
AR vs AR+mf	$F_{(1,21,20)} = 2,0614506$	$P = 0,1665231$	
mf vs AR+mf	$F_{(1,22,21)} = 11,515801$	$P = 0,0027395$	**

Tabla 70. Número de heces MF, total

GRUPO	VALOR F	VALOR P	SIGNIFICANCIA
control vs AR	$F_{(1,20,61)} = 0,001173$	$P = 0,9667749$	
control vs mf	$F_{(1,21,64)} = 12,04065$	$P = 0,0006400$	***
control vs AR+mf	$F_{(1,18,55)} = 0,052440$	$P = 0,8191461$	
AR vs mf	$F_{(1,24,73)} = 9,031172$	$P = 0,0029577$	**
AR vs AR+mf	$F_{(1,21,64)} = 0,032853$	$P = 0,8563553$	
mf vs AR+mf	$F_{(1,22,67)} = 6,851399$	$P = 0,0095176$	**

Cinta giratoria

Tabla 71. Cinta IDA 25 metros/minuto, 5^o

GRUPO	VALOR F	VALOR P	SIGNIFICANCIA
control vs AR	$F_{(1,10,9)} = 17,215798$	$P = 0,0024873$	**
control vs ida	$F_{(1,11,10)} = 7,1641814$	$P = 0,0232279$	*
control vs AR+ida	$F_{(1,11,10)} = 2,8884145$	$P = 0,1200592$	
AR vs ida	$F_{(1,10,9)} = 17,551934$	$P = 0,0023428$	**
AR vs AR+ida	$F_{(1,10,9)} = 142,20338$	$P = 8,121E-07$	***
ida vs AR+ida	$F_{(1,11,10)} = 62,877581$	$P = 0,0000127$	***

Tabla 72. Cinta MF 25 metros/minuto, 5^o

GRUPO	VALOR F	VALOR P	SIGNIFICANCIA
control vs AR	$F_{(1,11,10)} = 5,6310097$	$P = 0,0390783$	*
control vs mf	$F_{(1,12,11)} = 10,574629$	$P = 0,0077096$	**
control vs AR+mf	$F_{(1,8,7)} = 1,6880666$	$P = 0,2350090$	
AR vs mf	$F_{(1,12,11)} = 0,0744704$	$P = 0,7899908$	
AR vs AR+mf	$F_{(1,8,7)} = 5,2258733$	$P = 0,0561361$	
mf vs AR+mf	$F_{(1,9,8)} = 8,1007885$	$P = 0,0216053$	*

Reconocimiento de objetos

Tabla 73. Índice de discriminación IDA, entrenamiento

GRUPO	VALOR F	VALOR P	SIGNIFICANCIA
control vs AR	$F_{(1,59,58)} = 0,0681527$	$P = 0,7949704$	
control vs ida	$F_{(1,35,34)} = 0,5010815$	$P = 0,4835320$	
control vs AR+ida	$F_{(1,38,37)} = 1,3517908$	$P = 0,2524096$	
AR vs ida	$F_{(1,47,46)} = 1,2126851$	$P = 0,2765300$	
AR vs AR+ida	$F_{(1,50,49)} = 2,7401654$	$P = 0,1042464$	
ida vs AR+ida	$F_{(1,26,25)} = 0,2421865$	$P = 0,6269251$	

Tabla 74. Índice de discriminación IDA, memoria corto plazo

GRUPO	VALOR F	VALOR P	SIGNIFICANCIA
control vs AR	$F_{(1,59,58)} = 0,4710036$	$P = 0,3952603$	
control vs ida	$F_{(1,35,34)} = 7,3349393$	$P = 0,0105092$	*
control vs AR+ida	$F_{(1,38,37)} = 0,5573000$	$P = 0,1600675$	
AR vs ida	$F_{(1,47,46)} = 9,5592695$	$P = 0,0233749$	*
AR vs AR+ida	$F_{(1,50,49)} = 0,0425348$	$P = 0,4374581$	
ida vs AR+ida	$F_{(1,26,25)} = 6,8411889$	$P = 0,049886$	*

Tabla 75. Índice de discriminación IDA, memoria largo plazo

GRUPO	VALOR F	VALOR P	SIGNIFICANCIA
control vs AR	$F_{(1,59,58)} = 4,2771107$	$P = 0,0530982$	
control vs ida	$F_{(1,35,34)} = 1,6811458$	$P = 0,0235035$	*
control vs AR+ida	$F_{(1,38,37)} = 3,1834850$	$P = 0,0825885$	
AR vs ida	$F_{(1,47,46)} = 10,240117$	$P = 0,0404909$	*
AR vs AR+ida	$F_{(1,50,49)} = 0,0744807$	$P = 0,7860681$	
ida vs AR+ida	$F_{(1,26,25)} = 7,5780162$	$P = 0,0378426$	*

Tabla 76. Índice de discriminación IDA, entrenamiento vs memoria corto plazo

GRUPO	VALOR F	VALOR P	SIGNIFICANCIA
control vs control	$F_{(1,47,46)} = 1,5897872$	$P = 0,2137142$	
AR vs AR	$F_{(1,71,70)} = 7,0123948$	$P = 0,0099949$	**
ida vs ida	$F_{(1,23,22)} = 4,4403870$	$P = 0,0467253$	*
AR+ida vs AR+ida	$F_{(1,29,28)} = 0,1856681$	$P = 0,6698457$	

Tabla 77. Índice de discriminación IDA, memoria corto plazo vs largo plazo

GRUPO	VALOR F	VALOR P	SIGNIFICANCIA
control vs control	$F_{(1,47,46)} = 1,1589527$	$P = 0,2872966$	
AR vs AR	$F_{(1,71,70)} = 0,1751720$	$P = 0,6768369$	
ida vs ida	$F_{(1,23,22)} = 0,0069872$	$P = 0,9341387$	
AR+ida vs AR+ida	$F_{(1,29,28)} = 0,0862707$	$P = 0,7711389$	

Tabla 78. Índice de discriminación IDA, entrenamiento vs largo plazo

GRUPO	VALOR F	VALOR P	SIGNIFICANCIA
control vs control	$F_{(1,47,46)} = 0,0370484$	$P = 0,8482137$	
AR vs AR	$F_{(1,71,70)} = 9,3320274$	$P = 0,0031845$	**
ida vs ida	$F_{(1,23,22)} = 3,6758513$	$P = 0,0682829$	
AR+ida vs AR+ida	$F_{(1,29,28)} = 0,5411720$	$P = 0,4680654$	

Tabla 79. Número de toques totales IDA, entrenamiento

GRUPO	VALOR F	VALOR P	SIGNIFICANCIA
control vs AR	$F_{(1,59,58)} = 1,6477573$	$P = 0,2043692$	
control vs ida	$F_{(1,35,34)} = 2,8929627$	$P = 0,0980976$	
control vs AR+ida	$F_{(1,38,37)} = 2,1103130$	$P = 0,1554227$	
AR vs ida	$F_{(1,47,46)} = 8,5757235$	$P = 0,0005283$	***
AR vs AR+ida	$F_{(1,50,49)} = 7,4864227$	$P = 0,0086343$	**
ida vs AR+ida	$F_{(1,26,25)} = 0,0856775$	$P = 0,7721616$	

Tabla 80. Número de toques totales IDA, memoria corto plazo

GRUPO	VALOR F	VALOR P	SIGNIFICANCIA
control vs AR	$F_{(1,59,58)} = 0,2992085$	$P = 0,5864775$	
control vs ida	$F_{(1,35,34)} = 2,9911744$	$P = 0,0927900$	
control vs AR+ida	$F_{(1,38,37)} = 1,1747901$	$P = 0,2854317$	
AR vs ida	$F_{(1,47,46)} = 6,3615335$	$P = 0,0151864$	*
AR vs AR+ida	$F_{(1,50,49)} = 3,1630112$	$P = 0,0815286$	
ida vs AR+ida	$F_{(1,26,25)} = 0,4233645$	$P = 0,5211986$	

Tabla 81. Número de toques totales IDA, memoria largo plazo

GRUPO	VALOR F	VALOR P	SIGNIFICANCIA
control vs AR	$F_{(1,59,58)} = 1,1963516$	$P = 0,2785739$	
control vs ida	$F_{(1,35,34)} = 0,1390061$	$P = 0,7115853$	
control vs AR+ida	$F_{(1,38,37)} = 0,2826884$	$P = 0,5981225$	
AR vs ida	$F_{(1,47,46)} = 1,4762300$	$P = 0,2305651$	
AR vs AR+ida	$F_{(1,50,49)} = 2,2316412$	$P = 0,1416222$	
ida vs AR+ida	$F_{(1,26,25)} = 0,0064537$	$P = 0,9366103$	

Tabla 82. Número de toques totales IDA, entrenamiento vs memoria corto plazo

GRUPO	VALOR F	VALOR P	SIGNIFICANCIA
control vs control	$F_{(1,47,46)} = 0,1258371$	$P = 0,7244090$	
AR vs AR	$F_{(1,71,70)} = 0,0909676$	$P = 0,7638447$	
ida vs ida	$F_{(1,23,22)} = 0,0001448$	$P = 0,9905074$	
AR+ida vs AR+ida	$F_{(1,29,28)} = 0,2057335$	$P = 0,6536281$	

Tabla 83. Numero de toques totales IDA, memoria corto plazo vs largo plazo

GRUPO	VALOR F	VALOR P	SIGNIFICANCIA
control vs control	$F_{(1,47,46)} = 0,7347083$	$P = 0,3958050$	
AR vs AR	$F_{(1,71,70)} = 0,3213876$	$P = 0,5725883$	
ida vs ida	$F_{(1,23,22)} = 0,2504661$	$P = 0,6217168$	
AR+ida vs AR+ida	$F_{(1,29,28)} = 0,0202177$	$P = 0,8879488$	

Tabla 84. Número de heces IDA, entrenamiento

GRUPO	VALOR F	VALOR P	SIGNIFICANCIA
control vs AR	$F_{(1,11,10)} = 0,1401869$	$P = 0,7159125$	
control vs ida	$F_{(1,11,10)} = 2,0338983$	$P = 0,1842888$	
control vs AR+ida	$F_{(1,11,10)} = 1,4457831$	$P = 0,2569036$	
AR vs ida	$F_{(1,11,10)} = 0,8709677$	$P = 0,3726730$	
AR vs AR+ida	$F_{(1,11,10)} = 0,6650246$	$P = 0,4337853$	
ida vs AR+ida	$F_{(1,11,10)} = 0,0000001$	$P = 0,9999999$	

Tabla 85. Número de heces IDA, memoria corto plazo

GRUPO	VALOR F	VALOR P	SIGNIFICANCIA
control vs AR	$F_{(1,11,10)} = 7,3134328$	$P = 0,0221479$	*
control vs ida	$F_{(1,11,10)} = 0,3103448$	$P = 0,5897188$	
control vs AR+ida	$F_{(1,11,10)} = 1,2376237$	$P = 0,2915976$	
AR vs ida	$F_{(1,11,10)} = 3,0710659$	$P = 0,1102438$	
AR vs AR+ida	$F_{(1,11,10)} = 2,6470588$	$P = 0,1348005$	
ida vs AR+ida	$F_{(1,11,10)} = 0,1219512$	$P = 0,7341695$	

Tabla 86. Número de heces IDA, memoria largo plazo

GRUPO	VALOR F	VALOR P	SIGNIFICANCIA
control vs AR	$F_{(1,11,10)} = 3,4000000$	$P = 0,0949885$	
control vs ida	$F_{(1,11,10)} = 6,6852146$	$P = 0,0271551$	*
control vs AR+ida	$F_{(1,11,10)} = 0,5810616$	$P = 0,4634967$	
AR vs ida	$F_{(1,11,10)} = 0,9302325$	$P = 0,3575465$	
AR vs AR+ida	$F_{(1,11,10)} = 0,3800475$	$P = 0,5513529$	
ida vs AR+ida	$F_{(1,11,10)} = 1,9120458$	$P = 0,1968322$	

Tabla 87. Número de heces IDA, total

GRUPO	VALOR F	VALOR P	SIGNIFICANCIA
control vs AR	$F_{(1,59,178)} = 6,211123$	$P = 0,0177309$	*
control vs ida	$F_{(1,35,106)} = 6,131140$	$P = 0,0184195$	*
control vs AR+ida	$F_{(1,38,115)} = 2,592966$	$P = 0,1165861$	
AR vs ida	$F_{(1,47,142)} = 0,260571$	$P = 0,6130229$	
AR vs AR+ida	$F_{(1,50,151)} = 0,194701$	$P = 0,6618243$	
ida vs AR+ida	$F_{(1,26,79)} = 0,7068788$	$P = 0,4063560$	

Tabla 88. Índice de discriminación MF, entrenamiento

GRUPO	VALOR F	VALOR P	SIGNIFICANCIA
control vs AR	$F_{(1,20,19)} = 1,7297285$	$P = 0,2040978$	
control vs mf	$F_{(1,21,20)} = 3,1158496$	$P = 0,0927993$	
control vs AR+mf	$F_{(1,18,17)} = 1,0328597$	$P = 0,3237346$	
AR vs mf	$F_{(1,24,23)} = 0,1877349$	$P = 0,6688449$	
AR vs AR+mf	$F_{(1,21,20)} = 0,0949897$	$P = 0,7611141$	
mf vs AR+mf	$F_{(1,22,21)} = 0,5565393$	$P = 0,4639277$	

Tabla 89. Índice de discriminación MF, memoria corto plazo

GRUPO	VALOR F	VALOR P	SIGNIFICANCIA
control vs AR	$F_{(1,20,19)} = 1,6439815$	$P = 0,0112043$	*
control vs mf	$F_{(1,21,20)} = 0,0636053$	$P = 0,0234593$	*
control vs AR+mf	$F_{(1,18,17)} = 0,7777808$	$P = 0,0500000$	
AR vs mf	$F_{(1,24,23)} = 3,4431576$	$P = 0,0763747$	
AR vs AR+mf	$F_{(1,21,20)} = 5,0017697$	$P = 0,0398749$	*
mf vs AR+mf	$F_{(1,22,21)} = 0,7089829$	$P = 0,4092687$	

Tabla 90. Índice de discriminación MF, memoria largo plazo

GRUPO	VALOR F	VALOR P	SIGNIFICANCIA
control vs AR	$F_{(1,20,19)} = 0,3968355$	$P = 0,0369310$	*
control vs mf	$F_{(1,21,20)} = 0,0234493$	$P = 0,0298287$	*
control vs AR+mf	$F_{(1,18,17)} = 0,2670077$	$P = 0,0380030$	*
AR vs mf	$F_{(1,24,23)} = 0,5312138$	$P = 0,4734538$	
AR vs AR+mf	$F_{(1,21,20)} = 0,0113611$	$P = 0,9161773$	
mf vs AR+mf	$F_{(1,22,21)} = 0,3598599$	$P = 0,5550024$	

Tabla 91. Índice de discriminación MF, entrenamiento vs memoria corto plazo

GRUPO	VALOR F	VALOR P	SIGNIFICANCIA
control vs control	$F_{(1,17,16)} = 2,6817237$	$P = 0,1210194$	
AR vs AR	$F_{(1,23,22)} = 23,653866$	$P = 0,0000733$	***
mf vs mf	$F_{(1,25,24)} = 16,206179$	$P = 0,0004937$	
AR+mf vs AR+mf	$F_{(1,19,18)} = 2,4240908$	$P = 0,1368901$	

Tabla 92. Índice de discriminación MF, memoria corto plazo vs largo plazo

GRUPO	VALOR F	VALOR P	SIGNIFICANCIA
control vs control	$F_{(1,17,16)} = 2,0369044$	$P = 0,1727466$	
AR vs AR	$F_{(1,23,22)} = 2,5692346$	$P = 0,1232221$	
mf vs mf	$F_{(1,25,24)} = 0,4994631$	$P = 0,4865415$	
AR+mf vs AR+mf	$F_{(1,19,18)} = 0,3922784$	$P = 0,5389665$	

Tabla 93. Índice de discriminación MF, entrenamiento vs largo plazo

GRUPO	VALOR F	VALOR P	SIGNIFICANCIA
control vs control	$F_{(1,17,16)} = 85,312883$	$P = 8,196E-08$	***
AR vs AR	$F_{(1,23,22)} = 5,9557406$	$P = 0,0231828$	*
mf vs mf	$F_{(1,25,24)} = 11,859302$	$P = 0,0021169$	**
AR+mf vs AR+mf	$F_{(1,19,18)} = 4,9425146$	$P = 0,0392497$	*

Tabla 94. Número de toques totales MF, entrenamiento

GRUPO	VALOR F	VALOR P	SIGNIFICANCIA
control vs AR	$F_{(1,20,19)} = 1,3512049$	$P = 0,2594609$	
control vs mf	$F_{(1,21,20)} = 6,8131984$	$P = 0,0167526$	*
control vs AR+mf	$F_{(1,18,17)} = 0,5017127$	$P = 0,4883479$	
AR vs mf	$F_{(1,24,23)} = 1,9811673$	$P = 0,1726394$	
AR vs AR+mf	$F_{(1,21,20)} = 0,0845666$	$P = 0,7741959$	
mf vs AR+mf	$F_{(1,22,21)} = 2,3034159$	$P = 0,1440011$	

Tabla 95. Número de toques totales MF, memoria corto plazo

GRUPO	VALOR F	VALOR P	SIGNIFICANCIA
control vs AR	$F_{(1,20,19)} = 0,0010320$	$P = 0,9747070$	
control vs mf	$F_{(1,21,20)} = 0,3235674$	$P = 0,5758042$	
control vs AR+mf	$F_{(1,18,17)} = 1,0627153$	$P = 0,3170410$	
AR vs mf	$F_{(1,24,23)} = 0,3449833$	$P = 0,5626890$	
AR vs AR+mf	$F_{(1,21,20)} = 1,0698773$	$P = 0,3133189$	
mf vs AR+mf	$F_{(1,22,21)} = 1,6979956$	$P = 0,2066579$	

Tabla 96. Número de toques totales MF, memoria largo plazo

GRUPO	VALOR F	VALOR P	SIGNIFICANCIA
control vs AR	$F_{(1,20,19)} = 5,7136632$	$P = 0,0273494$	*
control vs mf	$F_{(1,21,20)} = 5,3339038$	$P = 0,0317146$	*
control vs AR+mf	$F_{(1,18,17)} = 6,1568802$	$P = 0,0238418$	*
AR vs mf	$F_{(1,24,23)} = 0,0021201$	$P = 9,9636715$	
AR vs AR+mf	$F_{(1,21,20)} = 0,0682450$	$P = 0,7965806$	
mf vs AR+mf	$F_{(1,22,21)} = 0,0892145$	$P = 0,7681136$	

Tabla 97. Número de toques totales MF, entrenamiento vs memoria corto plazo

GRUPO	VALOR F	VALOR P	SIGNIFICANCIA
control vs control	$F_{(1,17,16)} = 6,1412447$	$P = 0,0247367$	*
AR vs AR	$F_{(1,23,22)} = 1,5150645$	$P = 0,2313657$	
mf vs mf	$F_{(1,25,24)} = 0,3884162$	$P = 0,5390112$	
AR+mf vs AR+mf	$F_{(1,19,18)} = 4,9270163$	$P = 0,0395244$	*

Tabla 98. Número de toques totales MF, memoria corto vs largo plazo

GRUPO	VALOR F	VALOR P	SIGNIFICANCIA
control vs control	$F_{(1,17,16)} = 2,0369044$	$P = 0,1727466$	
AR vs AR	$F_{(1,23,22)} = 0,6986319$	$P = 0,4122301$	
mf vs mf	$F_{(1,25,24)} = 1,4550031$	$P = 0,2394835$	
AR+mf vs AR+mf	$F_{(1,19,18)} = 0,0291629$	$P = 0,8663083$	

Tabla 99. Número de heces MF, entrenamiento

GRUPO	VALOR F	VALOR P	SIGNIFICANCIA
control vs AR	$F_{(1,20,19)} = 1,2472727$	$P = 0,2779986$	
control vs mf	$F_{(1,21,20)} = 2,6558744$	$P = 0,1188175$	
control vs AR+mf	$F_{(1,18,17)} = 1,0448101$	$P = 0,3210319$	
AR vs mf	$F_{(1,24,23)} = 9,5793364$	$P = 0,0051071$	**
AR vs AR+mf	$F_{(1,21,20)} = 0,0018446$	$P = 0,9661680$	
mf vs AR+mf	$F_{(1,22,21)} = 8,3478260$	$P = 0,0087754$	**

Tabla 100. Número de heces MF, memoria corto plazo

GRUPO	VALOR F	VALOR P	SIGNIFICANCIA
control vs AR	$F_{(1,20,19)} = 2,2215414$	$P = 0,1525120$	
control vs mf	$F_{(1,21,20)} = 2,9846396$	$P = 0,0994696$	
control vs AR+mf	$F_{(1,18,17)} = 0,4071764$	$P = 0,5319083$	
AR vs mf	$F_{(1,24,23)} = 0,2483242$	$P = 0,6229894$	
AR vs AR+mf	$F_{(1,21,20)} = 2,1670970$	$P = 0,1565544$	
mf vs AR+mf	$F_{(1,22,21)} = 2,9978304$	$P = 0,0980429$	

Tabla 101. Número de heces MF, memoria largo plazo

GRUPO	VALOR F	VALOR P	SIGNIFICANCIA
control vs AR	$F_{(1,20,19)} = 4,4453781$	$P = 0,0484995$	*
control vs mf	$F_{(1,21,20)} = 0,0361714$	$P = 0,8510789$	
control vs AR+mf	$F_{(1,18,17)} = 8,3071650$	$P = 0,0103450$	*
AR vs mf	$F_{(1,24,23)} = 2,3822556$	$P = 0,1363686$	
AR vs AR+mf	$F_{(1,21,20)} = 0,1665907$	$P = 0,6874962$	
mf vs AR+mf	$F_{(1,22,21)} = 3,5816929$	$P = 0,0722865$	

Tabla 102. Número de heces MF, total

GRUPO	VALOR F	VALOR P	SIGNIFICANCIA
control vs AR	$F_{(1,20,61)} = 0,0223634$	$P = 0,8816176$	
control vs mf	$F_{(1,21,64)} = 4,4052071$	$P = 0,0397798$	*
control vs AR+mf	$F_{(1,18,55)} = 0,5820972$	$P = 0,4487515$	
AR vs mf	$F_{(1,24,73)} = 8,8923384$	$P = 0,0038029$	**
AR vs AR+mf	$F_{(1,21,64)} = 0,6952414$	$P = 0,4074885$	
mf vs AR+mf	$F_{(1,22,67)} = 14,399301$	$P = 0,0003203$	***

Evitación Pasiva

Tabla 103. Latencia IDA, entrenamiento

GRUPO	VALOR F	VALOR P	SIGNIFICANCIA
control vs AR	$F_{(1,10,9)} = 1,3783872$	$P = 0,2705063$	
control vs ida	$F_{(1,11,10)} = 0,4587234$	$P = 0,5135843$	
control vs AR+ida	$F_{(1,11,10)} = 4,7388934$	$P = 0,0545304$	
AR vs ida	$F_{(1,10,9)} = 0,7208146$	$P = 0,4178864$	
AR vs AR+ida	$F_{(1,10,9)} = 1,8248532$	$P = 0,2097175$	
ida vs AR+ida	$F_{(1,11,10)} = 6,5194519$	$P = 0,0287000$	*

Tabla 104. Latencia IDA, memoria corto plazo

GRUPO	VALOR F	VALOR P	SIGNIFICANCIA
control vs AR	$F_{(1,10,9)} = 0,9500930$	$P = 0,3551645$	
control vs ida	$F_{(1,11,10)} = 0,0340593$	$P = 0,8572696$	
control vs AR+ida	$F_{(1,11,10)} = 0,1115719$	$P = 0,7452607$	
AR vs ida	$F_{(1,10,9)} = 0,6663649$	$P = 0,4353948$	
AR vs AR+ida	$F_{(1,10,9)} = 0,4795443$	$P = 0,5061017$	
ida vs AR+ida	$F_{(1,11,10)} = 0,022086$	$P = 0,8848126$	

Tabla 105. Latencia IDA, memoria largo plazo

GRUPO	VALOR F	VALOR P	SIGNIFICANCIA
control vs AR	$F_{(1,10,9)} = 0,1855833$	$P = 0,6767515$	
control vs ida	$F_{(1,11,10)} = 0,6673739$	$P = 0,4329998$	
control vs AR+ida	$F_{(1,11,10)} = 1,4097313$	$P = 0,2625388$	
AR vs ida	$F_{(1,10,9)} = 1,6059092$	$P = 0,2368745$	
AR vs AR+ida	$F_{(1,10,9)} = 3,8360673$	$P = 0,0818298$	
ida vs AR+ida	$F_{(1,11,10)} = 0,0351586$	$P = 0,8550136$	

Tabla 106. Latencia IDA, entrenamiento vs memoria corto plazo

GRUPO	VALOR F	VALOR P	SIGNIFICANCIA
control vs control	$F_{(1,11,10)} = 9,5442481$	$P = 0,0114561$	*
AR vs AR	$F_{(1,9,8)} = 4,6084768$	$P = 0,0641003$	
Ida vs ida	$F_{(1,11,10)} = 13,239107$	$P = 0,0045476$	**
AR+ida vs AR+ida	$F_{(1,11,10)} = 20,415896$	$P = 0,0011110$	**

Tabla 107. Latencia IDA, memoria corto plazo vs memoria largo plazo

GRUPO	VALOR F	VALOR P	SIGNIFICANCIA
control vs control	$F_{(1,11,10)} = 7,4316290$	$P = 0,0213357$	*
AR vs AR	$F_{(1,9,8)} = 3,91121189$	$P = 0,0833476$	
ida vs ida	$F_{(1,11,10)} = 2,2396212$	$P = 0,1653922$	
AR+ida vs AR+ida	$F_{(1,11,10)} = 2,0562398$	$P = 0,1821041$	

Tabla 108. Latencia MF, entrenamiento

GRUPO	VALOR F	VALOR P	SIGNIFICANCIA
control vs AR	$F_{(1,19,18)} = 1,6825557$	$P = 0,2109657$	
control vs mf	$F_{(1,21,20)} = 0,0171995$	$P = 0,8969693$	
control vs AR+mf	$F_{(1,18,17)} = 1,6720144$	$P = 0,2132858$	
AR vs mf	$F_{(1,23,22)} = 2,1514447$	$P = 0,1565858$	
AR vs AR+mf	$F_{(1,20,19)} = 0,2400303$	$P = 0,6297934$	
mf vs AR+mf	$F_{(1,22,21)} = 2,1708126$	$P = 0,1554840$	

Tabla 109. Latencia MF, memoria corto plazo

GRUPO	VALOR F	VALOR P	SIGNIFICANCIA
control vs AR	$F_{(1,19,18)} = 1,3182999$	$P = 0,2641849$	
control vs mf	$F_{(1,21,20)} = 2,2283757$	$P = 0,1511040$	
control vs AR+mf	$F_{(1,18,17)} = 7,3444037$	$P = 0,0148596$	*
AR vs mf	$F_{(1,23,22)} = 0,0647589$	$P = 0,8014899$	
AR vs AR+mf	$F_{(1,20,19)} = 1,8224757$	$P = 0,1928833$	
mf vs AR+ida	$F_{(1,22,21)} = 1,3608805$	$P = 0,2564623$	

Tabla 110. Latencia MF, memoria largo plazo

GRUPO	VALOR F	VALOR P	SIGNIFICANCIA
control vs AR	$F_{(1,19,18)} = 2,8135475$	$P = 0,1107505$	
control vs mf	$F_{(1,21,20)} = 7,6623009$	$P = 0,0118642$	*
control vs AR+mf	$F_{(1,18,17)} = 1,5029821$	$P = 0,2369253$	
AR vs mf	$F_{(1,23,22)} = 0,3576939$	$P = 0,5558973$	
AR vs AR+mf	$F_{(1,20,19)} = 0,1941358$	$P = 0,6644686$	
mf vs AR+ida	$F_{(1,22,21)} = 1,3890529$	$P = 0,2517475$	

Tabla 111. Latencia MF, entrenamiento vs memoria corto plazo

GRUPO	VALOR F	VALOR P	SIGNIFICANCIA
control vs control	$F_{(1,17,16)} = 4,6088755$	$P = 0,0474810$	*
AR vs AR	$F_{(1,21,20)} = 8,3858870$	$P = 0,0089366$	**
mf vs mf	$F_{(1,25,24)} = 1,6966681$	$P = 0,2050855$	
AR+mf vs AR+mf	$F_{(1,19,18)} = 3,6098744$	$P = 0,0735789$	

Tabla 112. Latencia MF, memoria corto plazo vs memoria largo plazo

GRUPO	VALOR F	VALOR P	SIGNIFICANCIA
control vs control	$F_{(1,17,16)} = 0,4203630$	$P = 0,5259523$	
AR vs AR	$F_{(1,21,20)} = 1,3245241$	$P = 0,2633560$	
mf vs mf	$F_{(1,25,24)} = 3,2109940$	$P = 0,0857631$	
AR+mf vs AR+mf	$F_{(1,19,18)} = 0,3983411$	$P = 0,5358801$	

Condicionamiento Clásico

Tabla 113. Respuesta condicionada IDA, porcentaje

GRUPO	VALOR F	VALOR P	SIGNIFICANCIA
control vs AR	$F_{(1,10,9)} = 6,3108135$	$P = 0,0180407$	*
control vs ida	$F_{(1,11,10)} = 0,9102428$	$P = 0,3482146$	
control vs AR+ida	$F_{(1,11,10)} = 4,0247080$	$P = 0,0545856$	
AR vs ida	$F_{(1,10,9)} = 3,4434713$	$P = 0,0740571$	
AR vs AR+ida	$F_{(1,10,9)} = 0,8211574$	$P = 0,3725744$	
ida vs AR+ida	$F_{(1,11,10)} = 1,4392828$	$P = 0,2403088$	

Tabla 114. Respuesta condicionada MF, porcentaje

GRUPO	VALOR F	VALOR P	SIGNIFICANCIA
control vs AR	$F_{(1,11,10)} = 18,425341$	$P = 0,0001909$	***
control vs mf	$F_{(1,12,11)} = 9,4124464$	$P = 0,0047446$	**
control vs AR+mf	$F_{(1,8,7)} = 10,239477$	$P = 0,0034058$	**
AR vs mf	$F_{(1,12,11)} = 1,8083854$	$P = 0,1894947$	
AR vs AR+mf	$F_{(1,8,7)} = 2,3398830$	$P = 0,1373193$	
mf vs AR+mf	$F_{(1,9,8)} = 0,0013105$	$P = 0,9713782$	

Intruso

Tabla 115. 1ª vez que se huelen IDA, 1^{er} día

GRUPO	VALOR F	VALOR P	SIGNIFICANCIA
control vs AR	$F_{(1,9,8)} = 0,7051593$	$P = 0,4254372$	
control vs ida	$F_{(1,11,10)} = 2,7285646$	$P = 0,1295767$	
control vs AR+ida	$F_{(1,11,10)} = 1,8960072$	$P = 0,1985664$	
AR vs ida	$F_{(1,9,8)} = 23,634556$	$P = 0,0012533$	**
AR vs AR+ida	$F_{(1,9,8)} = 15,709090$	$P = 0,0041567$	**
ida vs AR+ida	$F_{(1,11,10)} = 0,2671755$	$P = 0,6164709$	

Tabla 116. 1ª vez que se huelen IDA, 2º día

GRUPO	VALOR F	VALOR P	SIGNIFICANCIA
control vs AR	$F_{(1,9,8)} = 11,132874$	$P = 0,0102830$	*
control vs ida	$F_{(1,11,10)} = 2,4138920$	$P = 0,1513135$	
control vs AR+ida	$F_{(1,11,10)} = 0,0103092$	$P = 0,9211331$	
AR vs ida	$F_{(1,9,8)} = 2,8866213$	$P = 0,1277449$	
AR vs AR+ida	$F_{(1,9,8)} = 10,097925$	$P = 0,0130420$	*
ida vs AR+ida	$F_{(1,11,10)} = 2,2288261$	$P = 0,1663191$	

Tabla 117. 1ª vez que se huelen IDA, 1^{er} día vs 2^o día

GRUPO	VALOR F	VALOR P	SIGNIFICANCIA
control vs control	$F_{(1,11,10)} = 0,8506417$	$P = 0,3780861$	
AR vs AR	$F_{(1,7,6)} = 3,0567107$	$P = 0,1309900$	
ida vs ida	$F_{(1,11,10)} = 0,5284047$	$P = 0,4839475$	
AR+ida vs AR+ida	$F_{(1,11,10)} = 0,3448275$	$P = 0,5700757$	

Tabla 118. 1ª vez que se pelean IDA, 1^{er} día

GRUPO	VALOR F	VALOR P	SIGNIFICANCIA
control vs AR	$F_{(1,9,8)} = 5,0018610$	$P = 0,0557303$	
control vs ida	$F_{(1,11,10)} = 0,9577030$	$P = 0,3508472$	
control vs AR+ida	$F_{(1,11,10)} = 4,8964983$	$P = 0,0513164$	
AR vs ida	$F_{(1,9,8)} = 0,7506976$	$P = 0,4114863$	
AR vs AR+ida	$F_{(1,9,8)} = 0,1612035$	$P = 0,6985625$	
ida vs AR+ida	$F_{(1,11,10)} = 1,2903972$	$P = 0,2824656$	

Tabla 119. 1ª vez que se pelean IDA, 2^o día

GRUPO	VALOR F	VALOR P	SIGNIFICANCIA
control vs AR	$F_{(1,9,8)} = 0,3077987$	$P = 0,5942014$	
control vs ida	$F_{(1,11,10)} = 0,9240920$	$P = 0,3590703$	
control vs AR+ida	$F_{(1,11,10)} = 2,2446682$	$P = 0,1649611$	
AR vs ida	$F_{(1,9,8)} = 3,4005657$	$P = 0,1024053$	
AR vs AR+ida	$F_{(1,9,8)} = 6,0725993$	$P = 0,0390581$	*
ida vs AR+ida	$F_{(1,11,10)} = 0,4024365$	$P = 0,5400739$	

Tabla 120. 1ª vez que se pelean IDA, 1^{er} día vs 2^o día

GRUPO	VALOR F	VALOR P	SIGNIFICANCIA
control vs control	$F_{(1,11,10)} = 3,5150466$	$P = 0,0902858$	
AR vs AR	$F_{(1,7,6)} = 2,2251787$	$P = 0,1863751$	
ida vs ida	$F_{(1,11,10)} = 0,0002731$	$P = 0,9959325$	
AR+ida vs AR+ida	$F_{(1,11,10)} = 4,8615955$	$P = 0,0520076$	

Tabla 121. Número de veces que pelean IDA, 1^{er} día

GRUPO	VALOR F	VALOR P	SIGNIFICANCIA
control vs AR	$F_{(1,9,8)} = 4,5523520$	$P = 0,0654227$	
control vs ida	$F_{(1,11,10)} = 0,2899408$	$P = 0,6020374$	
control vs AR+ida	$F_{(1,11,10)} = 2,0033112$	$P = 0,1873360$	
AR vs ida	$F_{(1,9,8)} = 16,103684$	$P = 0,0038791$	**
AR vs AR+ida	$F_{(1,9,8)} = 1,0162590$	$P = 0,3429226$	
ida vs AR+ida	$F_{(1,11,10)} = 6,8597063$	$P = 0,0256371$	*

Tabla 122. Número de veces que pelean IDA, 2^o día

GRUPO	VALOR F	VALOR P	SIGNIFICANCIA
control vs AR	$F_{(1,9,8)} = 2,6617511$	$P = 0,1414327$	
control vs ida	$F_{(1,11,10)} = 1,2827822$	$P = 0,2838081$	
control vs AR+ida	$F_{(1,11,10)} = 1,084070$	$P = 0,3223069$	
AR vs ida	$F_{(1,9,8)} = 5,5727216$	$P = 0,0459108$	*
AR vs AR+ida	$F_{(1,9,8)} = 5,2760975$	$P = 0,0507096$	
ida vs AR+ida	$F_{(1,11,10)} = 0,0064020$	$P = 0,9378056$	

Tabla 123. Número de veces que pelean IDA, 1^{er} día vs 2^o día

GRUPO	VALOR F	VALOR P	SIGNIFICANCIA
control vs control	$F_{(1,11,10)} = 1,0491803$	$P = 0,3298355$	
AR vs AR	$F_{(1,7,6)} = 0,3619142$	$P = 0,5694623$	
ida vs ida	$F_{(1,11,10)} = 0,6374502$	$P = 0,4431835$	
AR+ida vs AR+ida	$F_{(1,11,10)} = 2,2421524$	$P = 0,1651758$	

Tabla 124. 1^a vez que se huelen MF, 1^{er} día

GRUPO	VALOR F	VALOR P	SIGNIFICANCIA
control vs AR	$F_{(1,19,18)} = 0,6684130$	$P = 0,4242957$	
control vs mf	$F_{(1,21,20)} = 0,1659935$	$P = 0,6880252$	
control vs AR+mf	$F_{(1,18,17)} = 13,595806$	$P = 0,0018277$	**
AR vs mf	$F_{(1,23,22)} = 1,2249586$	$P = 0,2803452$	
AR vs AR+mf	$F_{(1,20,19)} = 4,3805383$	$P = 0,0500049$	
mf vs AR+mf	$F_{(1,22,21)} = 1,5933734$	$P = 0,2206837$	

Tabla 125. 1^a vez que se huelen MF, 2^o día

GRUPO	VALOR F	VALOR P	SIGNIFICANCIA
control vs AR	$F_{(1,19,18)} = 0,1091783$	$P = 0,7448963$	
control vs mf	$F_{(1,21,20)} = 1,6053077$	$P = 0,2197085$	
control vs AR+mf	$F_{(1,18,17)} = 0,1346980$	$P = 0,7181384$	
AR vs mf	$F_{(1,23,22)} = 2,2769403$	$P = 0,1455392$	
AR vs AR+mf	$F_{(1,20,19)} = 0,0109034$	$P = 0,9179307$	
mf vs AR+mf	$F_{(1,22,21)} = 2,1284121$	$P = 0,1593869$	

Tabla 126. 1^a vez que se huelen MF, 1^{er} día vs 2^o día

GRUPO	VALOR F	VALOR P	SIGNIFICANCIA
control vs control	$F_{(1,17,16)} = 1,2488557$	$P = 0,2802712$	
AR vs AR	$F_{(1,21,20)} = 0,2104579$	$P = 0,6513551$	
mf vs mf	$F_{(1,25,24)} = 4,0676905$	$P = 0,0550313$	
AR+mf vs AR+mf	$F_{(1,19,18)} = 28,041409$	$P = 0,0000492$	***

Tabla 127. 1ª vez que se pelean MF, 1^{er} día

GRUPO	VALOR F	VALOR P	SIGNIFICANCIA
control vs AR	$F_{(1,19,18)} = 0,1463565$	$P = 0,7065215$	
control vs mf	$F_{(1,21,20)} = 1,2996701$	$P = 0,2677428$	
control vs AR+mf	$F_{(1,18,17)} = 2,3668225$	$P = 0,1423439$	
AR vs mf	$F_{(1,23,22)} = 0,7618028$	$P = 0,3921919$	
AR vs AR+mf	$F_{(1,20,19)} = 1,8277500$	$P = 0,1922690$	
mf vs AR+mf	$F_{(1,22,21)} = 0,2719246$	$P = 0,6074999$	

Tabla 128. 1ª vez que se pelean MF, 2º día

GRUPO	VALOR F	VALOR P	SIGNIFICANCIA
control vs AR	$F_{(1,19,18)} = 0,0061429$	$P = 0,9383927$	
control vs mf	$F_{(1,21,20)} = 0,6638442$	$P = 0,4248022$	
control vs AR+mf	$F_{(1,18,17)} = 0,1510995$	$P = 0,7023121$	
AR vs mf	$F_{(1,23,22)} = 0,7584015$	$P = 0,3932331$	
AR vs AR+mf	$F_{(1,20,19)} = 0,3189669$	$P = 0,5788368$	
mf vs AR+mf	$F_{(1,22,21)} = 2,1076305$	$P = 0,1613431$	

Tabla 129. 1ª vez que se pelean MF, 1^{er} día vs 2º día

GRUPO	VALOR F	VALOR P	SIGNIFICANCIA
control vs control	$F_{(1,17,16)} = 1,4383362$	$P = 0,2478687$	
AR vs AR	$F_{(1,21,20)} = 1,3659412$	$P = 0,2562528$	
mf vs mf	$F_{(1,25,24)} = 0,3352786$	$P = 0,5679625$	
AR+mf vs AR+mf	$F_{(1,19,18)} = 0,1881465$	$P = 0,6696178$	

Tabla 130. Número de veces que se pelean MF, 1^{er} día

GRUPO	VALOR F	VALOR P	SIGNIFICANCIA
control vs AR	$F_{(1,19,18)} = 0,1572943$	$P = 0,6963224$	
control vs mf	$F_{(1,21,20)} = 0,0080966$	$P = 0,9291970$	
control vs AR+mf	$F_{(1,18,17)} = 0,7158226$	$P = 0,4092693$	
AR vs mf	$F_{(1,23,22)} = 0,1382383$	$P = 0,7135957$	
AR vs AR+mf	$F_{(1,20,19)} = 0,2373438$	$P = 0,6317043$	
mf vs AR+mf	$F_{(1,22,21)} = 0,8167144$	$P = 0,3763931$	

Tabla 131. Número de veces que se pelean MF, 2^o día

GRUPO	VALOR F	VALOR P	SIGNIFICANCIA
control vs AR	$F_{(1,19,18)} = 0,1063396$	$P = 0,7481112$	
control vs mf	$F_{(1,21,20)} = 2,1955227$	$P = 0,1539970$	
control vs AR+mf	$F_{(1,18,17)} = 0,6292483$	$P = 0,4385631$	
AR vs mf	$F_{(1,23,22)} = 3,4317510$	$P = 0,0774189$	
AR vs AR+mf	$F_{(1,20,19)} = 1,3035076$	$P = 0,2677588$	
mf vs AR+mf	$F_{(1,22,21)} = 0,7616845$	$P = 0,3926719$	

Tabla 132. Número de veces que se pelean MF, 1^{er} día vs 2^o día

GRUPO	VALOR F	VALOR P	SIGNIFICANCIA
control vs control	$F_{(1,17,16)} = 1,3797559$	$P = 0,2573291$	
AR vs AR	$F_{(1,21,20)} = 1,5304890$	$P = 0,2303685$	
mf vs mf	$F_{(1,25,24)} = 0,0775725$	$P = 0,7830000$	
AR+mf vs AR+mf	$F_{(1,19,18)} = 0,1250542$	$P = 0,7277242$	

RT-PCR

Tabla 133 . Expresion del receptor Alfa2a

CEREBELO	Valor de la T de Student's para distintas observaciones						
	Grupos	Control	mf	ida	AR	AR+mf	AR+ida
Probabilidad Valor P	control		3,63000	5,42618	0,57760	2,63665	7,38170
	mf	* 0,015061		4,05770	-1,39113	-0,40004	11,59566
	ida	**0,002881	**0,009751		-2,89881	-3,16285	1,15280
	AR	0,588567	0,222915	* 0,033838		1,11374	3,61944
	AR+mf	* 0,046162	0,705645	* 0,025015	0,316046		5,18390
	AR+ida	***0,000717	***0,000084	0,301107	* 0,015229	** 0,003514	
TRONCO	Valor de la T de Student's para distintas observaciones						
	Grupos	control	mf	ida	AR	AR+mf	AR+ida
Probabilidad Valor P	control		-0,31495	-0,65058	2,11052	0,57536	6,04221
	mf	0,765521		-0,45157	2,90233	0,77815	9,30029
	ida	0,544026	0,670494		3,54634	0,94830	13,01452
	AR	0,088563	* 0,033699	* 0,016451		-0,66927	3,52196
	AR+mf	0,589971	0,471678	0,386522	0,532977		2,40380
	AR+ida	** 0,001789	***0,000242	***0,000048	* 0,016884	* 0,061332	
HIPOCAMPO	Valor de la T de Student's para distintas observaciones						
	Grupos	control	mf	ida	AR	AR+mf	AR+ida
Probabilidad Valor P	control		4,39282	-1,12507	1,74517	1,44293	4,06611
	mf	** 0,007069		-6,92329	-3,34515	-0,99463	-0,77639
	ida	0,311649	*** 0,000964		3,37307	2,26359	6,56307
	AR	0,141399	* 0,020437	* 0,019823		0,42258	2,89084
	AR+mf	0,208628	0,365583	0,073023	0,690162		0,78412
	AR+ida	** 0,009671	0,472626	** 0,001231	* 0,034153	0,468473	
CORTEZA	Valor de la T de Student's para distintas observaciones						
	Grupos	control	mf	ida	AR	AR+mf	AR+ida
Probabilidad Valor P	control		1,59241	3,41743	0,24935	3,71612	0,97055
	mf	0,172170		5,55588	-1,07074	9,07809	-0,00270
	ida	* 0,018891	** 0,002597		-2,67537	0,75090	-1,38227
	AR	0,813011	0,333226	* 0,044064		2,90628	0,70558
	AR+mf	* 0,013767	*** 0,000271	0,486526	* 0,033545		-1,54876
	AR+ida	0,376347	0,997953	0,225448	0,511954	0,182122	