

Grupo 1. Conejo

- Ángela Calzado
- Elena Palencia
- Andrea Rojas
- Adrián Segovia
- Anastasia Stoliarov

Introducción

Los conejos pertenecen a la familia de los *Leporidae*. Su hábitat natural consta de madrigueras, donde se establecen grupos sociales con jerarquías dentro de los mismos (1). En este caso en particular, se empleó la especie de conejo *Oryctolagus cuniculus* (L. 1758) (raza Rex) para realizar estudios de patologías pulmonares. En el laboratorio se observó un cambio en la conducta de los animales, concretamente, comenzaron a pelearse cuando antes no lo hacían. Se sospechó que esto podría ser consecuencia de un incremento en los niveles de estrés. Esto se confirmó midiendo los niveles de cortisol en sangre, detectándose un aumento de su concentración, lo que genera alteraciones en los resultados obtenidos en los diversos experimentos. Por ende, se plantea desarrollar un nuevo programa de enriquecimiento, con el fin de mejorar y garantizar el bienestar animal. En particular, la propuesta consiste en estabular a los conejos en un nuevo modelo de jaula, que permita simular las condiciones naturales de una madriguera. Esto bajo la premisa de que el propio alojamiento puede representar un factor de estrés para el animal.

En el presente trabajo se detallará el método empleado para la estimación de la N, así como para el desarrollo del diseño experimental que se empleará para el análisis de los datos obtenidos tras la incorporación del nuevo programa de enriquecimiento ambiental.

Diseño experimental

- Objetivos del experimento

Disminuir los niveles de estrés de los conejos, lo cual se espera que se vea reflejado en una reducción de los niveles de cortisol en sangre, siendo éste el objetivo principal (en base al cual se ha establecido este diseño experimental). Consecuencia de esto, como objetivo secundario, se espera poder observar una disminución en el número de peleas (sobre todo entre machos).

- Hipótesis del estudio:

Animales con enriquecimiento disminuirán sus niveles de colesterol así como frecuencia de peleas según se adapten a este.

- Fuentes de variación

- **Tratamiento** ($\alpha_{\text{tratamiento}}$): Enriquecimiento ambiental basado en jaulas de doble piso acopladas a una rampa. El piso inferior será modificado para asemejarse a una madriguera.
- **Unidades experimentales (N)**: 8 Jaulas (*ver apartado de Cálculo Muestral*)
- **Ruido**: Sexo (α_{sexo}), día ($\alpha_{\text{día}}$), día de tratamiento ($\alpha_{\text{día-tratamiento}}$), grupo (α_{grupo}) y error (ϵ) que no podemos explicar.

- Reparto de nuestra muestra en los distintos grupos:

- **Aleatorización:** se ha observado que los niveles de cortisol son muy dispares según el momento del ciclo circadiano. Por lo tanto, pese al riesgo de introducir un sesgo en el diseño experimental, no se podrá aleatorizar el momento del día en el que se adquieren las muestras de sangre de cada conejo (se debe intentar, en la medida de lo posible, tener una hora establecida para obtener las medidas). No obstante, este sesgo se ve, en cierta medida, paliado por el hecho de ser un modelo pareado.

- Especificar medidas

1. Medidas de cortisol en sangre antes (2 días alternos) y después (4 días alternos) de poner los conejos en las jaulas nuevas.
2. Contaje de la frecuencia de peleas cada dos horas de grabación.

- Especificar el modelo

Se diseña un modelo pareado (cada conejo será su propio control), de medidas repetidas, de modo que puede hacerse un seguimiento de los parámetros experimentales. Tanto para determinar los niveles de cortisol ($\mu = \text{ng/mL}$ de cortisol en sangre) como para estudiar comportamiento social ($\mu = \text{frecuencia de peleas}$, es decir, nº de peleas por cada 2h de grabación), emplearemos el siguiente modelo de análisis experimental de los datos:

$$y = \mu + \alpha_{\text{sexo}} + \alpha_{\text{tratamiento}} + \alpha_{\text{día}} + \alpha_{\text{día-tratamiento}} + \alpha_{\text{grupo}} + \varepsilon$$

- Análisis

Dada la gran cantidad de factores que podrían estar contribuyendo al efecto observable, el análisis se realizará por medio de un four-way ANOVA.

En el caso de la variabilidad asociada al sexo (α_{sexo}) se establece como hipótesis nula:

$$H_0: \alpha_M = \alpha_H$$

Para determinar la variabilidad ($\alpha_{\text{tratamiento}}$) que se podría explicar por el tipo de tratamiento (jaula no enriquecida o jaula enriquecida), se plantea la siguiente hipótesis nula:

$$H_0: \Delta_{\text{tratamiento}} = 0$$

Otros tipos de variabilidad a tener en cuenta, como se ha mencionado, son las asociadas al día en el cual se realiza la toma de muestra o se graba el comportamiento ($\alpha_{\text{día}}$), cuántos días han transcurrido desde que se ha administrado el nuevo tratamiento (días en la nueva jaula con enriquecimiento; $\alpha_{\text{día-tratamiento}}$), así como la variabilidad específica de grupo (conejos que conviven en la misma jaula; α_{grupo}). La hipótesis nula para cada uno de los casos, será la siguiente:

$$H_0: \alpha_{\text{día1}} = \alpha_{\text{día2}} = \dots = \alpha_{\text{díaN}}$$

$$H_0: \alpha_{\text{día1-tratamiento}} = \alpha_{\text{día2-tratamiento}} = \dots = \alpha_{\text{díaN-tratamiento}}$$

$$H_0: \alpha_{\text{grupo1}} = \alpha_{\text{grupo2}} = \dots = \alpha_{\text{grupoN}}$$

- Calcular el número de observaciones que necesitan realizarse
 - Niveles de cortisol a partir de muestras de sangre que serán recolectadas en días alternos (evitando inducir estrés, asegurando obtener los datos necesarios para mantener una tendencia), durante 7 días.
 - Observación de 2 horas diarias de grabación (10:00-11:00 y 22:00 a 23:00) durante 7 días para cuantificar el número de peleas.

Cálculo del tamaño muestral

Datos de diferentes artículos donde se miden niveles de cortisol en sangre en conejos para analizar el efecto de un determinado enriquecimiento en el estrés, han sido empleados como referencia para realizar los cálculos (2). Una vez definidos estos (108 ± 24 ng/mL para la condición de estrés; 80 ± 8 ng/mL en conejos no estresados), así como la potencia ($1-\beta = 0.95$) y significancia ($\alpha = 0.05$) pertinentes, se procede a calcular el tamaño muestral (N); en este caso, hará referencia al número de jaulas. Se ha empleado con este fin el programa G*Power.

A la hora de elegir el tipo de análisis, se ha empleado el modelo estadístico “*Means: Difference Between two dependent means (matched-pairs)*”. A pesar de que el modelo es pareado de muestras repetidas, por falta de datos suficientes, se optó por esta opción para realizar el cálculo (Figura 1). Sin embargo, una vez obtenidos los datos experimentales, el análisis estadístico se realizará teniendo en cuenta que se trata de un modelo de muestras repetidas (ver apartado de *Diseño Experimental*).

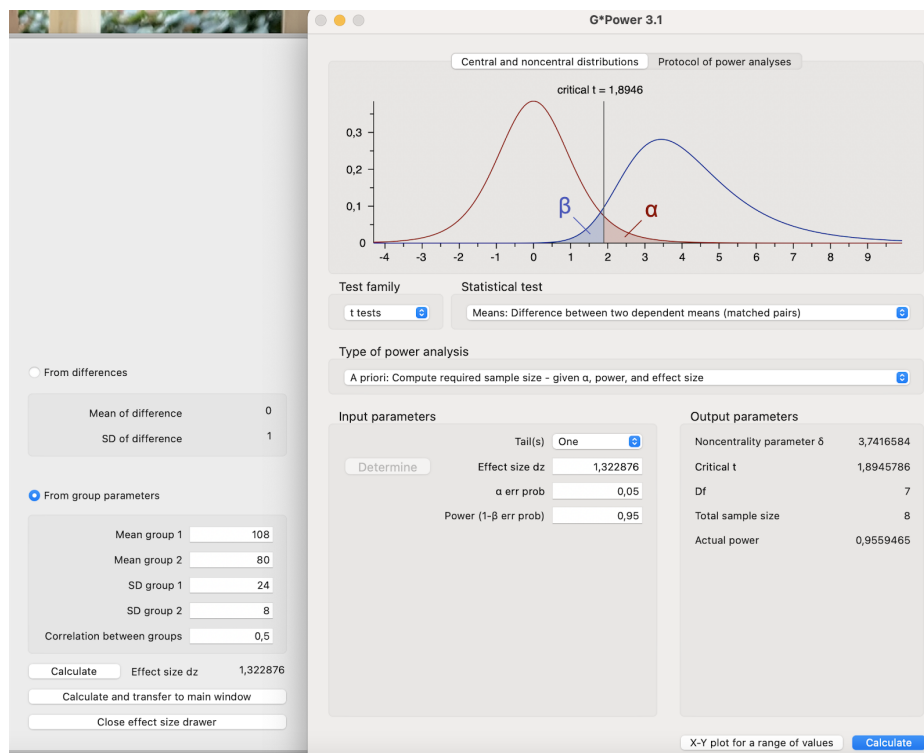


Figura 1: Cálculo del tamaño muestral (N). Captura del programa G*Power en el que se reflejan los datos utilizados para el cálculo de N. Media del grupo 1 = 108 ng/mL; Media del grupo 2 = 80 ng/mL; desviación

estándar del grupo 1 (jaula) = 24 ng/mL; desviación estándar del grupo 2 (jaula) = 8 ng/mL; correlación entre grupos = 0,5. El programa nos devuelve una N de 8.

Se obtiene una N de 8 jaulas. Como en cada jaula se alojan 2 conejos, se emplearán 16 conejos en total para este experimento.

Referencias:

- (1) Villafuerte, R., & Delibes-Mateo, M. (2007). Atlas de Mamíferos Terrestres. Índice taxonómico. Obtenido de Ministerio para la Transición Ecológica y el Reto Demográfico: https://www.miteco.gob.es/es/biodiversidad/temas/inventarios-nacionales/ieet_mami_oryctolagus_cuniculus_tcm30-99858.pdf
- (2) Feng, Y., Fan, H., Liang, X., Wang, X., Gao, G., & Gun, S. (2022). Environmental enrichment changes rabbits' behavior, serum hormone level and further affects cecal microbiota. PeerJ.

Grupo 2. Depresión

ALUMNOS:

Castillo Alemán, Julia.

Del Cerro Legaz, María.

González Díaz, Daniel.

Hernández Seco, Alejandro.

Ontiveros Sales, Nebai.

Pordomingo González, Andrés.

Introducción

La depresión es una enfermedad o trastorno mental que se caracteriza por una profunda tristeza, decaimiento anímico, baja autoestima, pérdida de interés por todo y disminución de las funciones psíquicas. De ahí la importancia de continuar estudiando nuevos tratamientos que permitan mejorar los síntomas de este trastorno que afecta a un alto porcentaje de la población.

Siguiendo esta línea, el objetivo de nuestro estudio es estudiar la eficacia de un nuevo antidepresivo, la esketamina, para el tratamiento de esta enfermedad en modelos murinos. Para comprobarlo, se emplea un modelo de depresión en ratas y posteriormente se estudiará el efecto de la esketamina sobre un test de suspensión de la cola.

La prueba de suspensión por la cola es similar a la prueba de natación forzada, pero evita los problemas de la hipotermia y el estrés asociado con la natación forzada. Los animales se suspenden por sus colas y se mide la cantidad de "inmovilidad". Los períodos más largos de inmovilidad se asocian con mayores puntuaciones de depresión y la inmovilidad pueden revertirse con el tratamiento antidepressivo.

Cálculo del tamaño muestral

Para calcular el tamaño muestral se emplea el programa G*Power. Para ello, se determina un nivel alpha de 0.05 (coef de determinación=0.95) y un nivel beta de 0.1 (potencia=0.9), y se parte de los valores obtenidos por el estudio de referencia de Shinde et al. (2015):

Grupo	Media (en segundos)	DT (en segundos)
Experimental	160"	17.33"
Control	226.83"	8.20"

Siguiendo los datos anteriores, se obtendría un tamaño muestral total de n=4 (2ratas/grupo). Debido a que el diseño experimental de Shinde et al. (2015) está realizado con Fluoxetina, un antidepressivo que ha demostrado ser muy eficaz para el tratamiento de la depresión, suponemos que nuestros datos nos darán un mayor tiempo de inmovilidad en el grupo experimental. Por tanto, nuestra tabla será la siguiente:

Grupo	Media (en segundos)	DT (en segundos)
Experimental	198"	13.20"
Control	226.83"	8.20"

Siguiendo los datos anteriores, se obtendría un tamaño muestral total de $n=8$ (4ratas/grupo).

Diseño experimental

Siguiendo el diseño experimental de Silva Pereira et al. (2019), se emplea una muestra total de 4 ratas macho de raza *Dawley Sprague*, divididas aleatoriamente en dos grupos: uno control y uno experimental. Como criterios de exclusión se consideran problemas motores. Para generar el modelo de depresión, se aplican inyecciones subcutáneas con ACTH (100 $\mu\text{g}/0.1$ ml/rata/día) durante 14 días a ambos grupos. A lo largo de este periodo se registran de forma cualitativa conductas propias de depresión, como anhedonia, problemas de sueño/ cansancio, fatiga, reducción en la interacción social o alteraciones en la alimentación. Pasados estos 14 días, se utiliza una única dosis de esketamina (15 mg/kg) media hora antes de comenzar la prueba, disuelta en una solución salina al 0.9% por vía subcutánea al grupo experimental, mientras que se le administra por la misma vía el vehículo salino al grupo de control.

Se realiza un test de suspensión de la cola, consistente en el siguiente procedimiento (Shinde et al., 2015): las ratas son aisladas visual y auditivamente y suspendidas a 58 cm de la superficie con una cinta adhesiva ubicada a 1 cm del final de la cola, durante 5 minutos. Mediante un software se graba la actividad de las ratas y se recopilan los datos para obtener los segundos de inmovilidad, considerando inmovilidad estar colgado de forma pasiva y sin ningún tipo de movimiento.

Se estima que los animales depresivos (grupo de control) pasarán más tiempo inmóviles en comparación con los animales tratados con esketamina, considerando como medida la media de segundos que se pasan inmóviles. Para comprobarlo, se realizará una t de Student para dos muestras independientes.

$$H_0: \mu_{\text{Control}} \leq \mu_{\text{Experimental}}$$

$$H_1: \mu_{\text{Control}} > \mu_{\text{Experimental}}$$

Se estima que la media de tiempo que pasan inmóviles las ratas control será significativamente mayor que las ratas tratadas con antidepressivo.

Bibliografía

Pereira, Vitor Silva; Joca, Sâmia R.L.; Harvey, Brian H.; Elfving, Betina; Wegener, Gregers (2019). Esketamine and rapastinel, but not imipramine, have antidepressant-like effect in a treatment-resistant animal model of depression. *Acta Neuropsychiatrica*, 1–8. doi:10.1017/neu.2019.25.

Shinde, V., Yegnanarayan, R., Shah, P., Gupta, A., & Pophale, P. (2015). Antidepressant-like activity of flunarizine in modified tail suspension test in rats. *North American journal of medical sciences*, 7(3), 100–103. <https://doi.org/10.4103/1947-2714.153921>

Grupo 4/ Ratón:

- Raquel García
- Ricardo Arancón
- Cristina Rodríguez-Osorio
- Miguel Rubio
- Selín Cristina Rodríguez

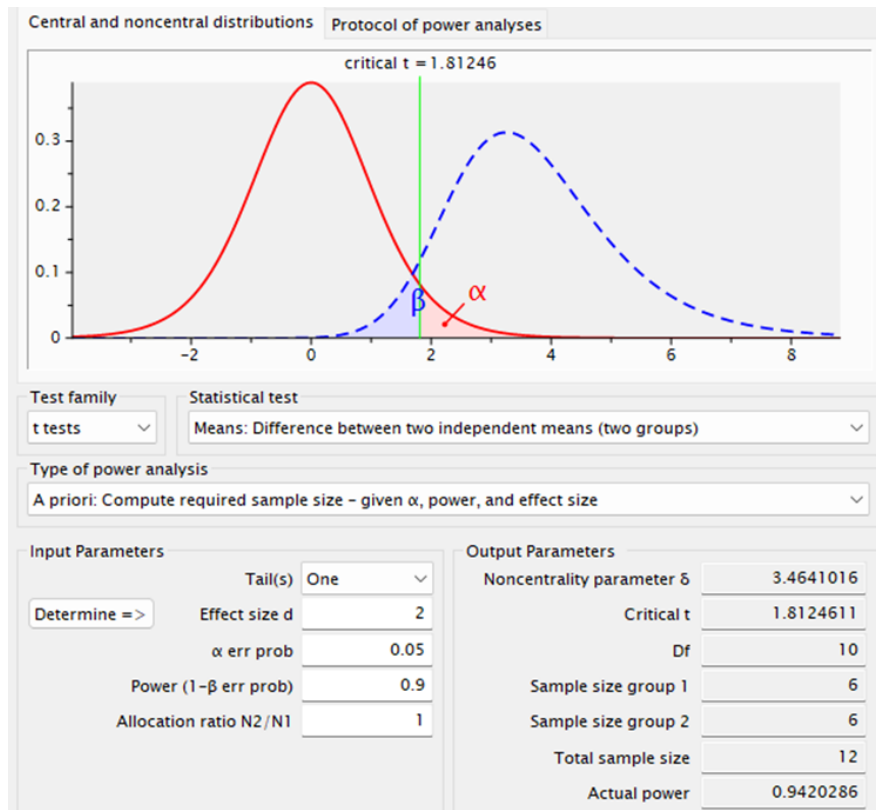
Introducción:

La cepa de ratones **C57BL/6J** es la más utilizada en investigación (Matsuo et al., 2010). Por ello, resulta de gran importancia tratar de mejorar sus condiciones de vida. El objetivo global del presente proyecto es mejorar el bienestar tanto físico como psicológico de los ratones de la cepa C57BL/6 empleados en nuestra línea de investigación, mediante la mejora de sus condiciones de habitabilidad, así como potenciando el desarrollo de su conducta normal. Esto se hará introduciendo nuevos elementos de enriquecimiento ambiental (EA).

Cálculo del tamaño muestral:

En primer lugar hemos definido la unidad experimental como la cubeta, puesto que el enriquecimiento ambiental (que sería equivalente al tratamiento) tiene efecto en todos los animales de la jaula. Por tanto, hemos calculado el número de cubetas necesarias para nuestro experimento utilizando los siguientes parámetros: nivel de confianza del 95%, potencia del 10% y relación señal-ruido (d) de 2.

No hemos encontrado datos de varianzas y medias que pudieran ser de interés para nuestro cálculo del tamaño muestral en la bibliografía, puesto que los trabajos anteriores hacen referencia a ratones con patologías específicas u otras situaciones que no son comparables con nuestro estudio. Además, pretendemos evaluar la eficacia del enriquecimiento ambiental mediante varios protocolos, por lo que, para simplificar el cálculo, hemos decidido establecer un valor de relación señal-ruido = 2, que nos permite observar diferencias que pueden ser detectables (dos veces el valor de la desviación típica) y emplear un número adecuado de cubetas (y por tanto de animales). El cálculo mediante G-power es el siguiente:



Por tanto, tendríamos dos grupos de cubetas: 6 con EA (Enriquecimiento Ambiental) y 6 sin EA que actuarán como control. Además, para evitar un posible sesgo causado por el sexo, en cada uno de los grupos 3 cubetas contendrán ratones macho y las otras 3 ratones hembra (bloqueando la variable del sexo). Los ratones de cada sexo se asignarán a cada grupo de forma aleatoria.

La evaluación del efecto del EA se medirá por distintos procedimientos una vez hayan pasado 6 semanas desde la introducción del EA:

- Extracción de sangre y análisis de niveles de corticosterona por inmunoensayo.
- Ensayo de laberinto en cruz elevada.
- Ensayo de campo abierto.
- Ensayo de reconocimiento de objeto novedoso.

Según nuestra hipótesis, deberían bajar los niveles de estrés (y por tanto de corticosterona en sangre) y ansiedad en los animales expuestos a EA (laberinto elevado en cruz), aumentar la conducta de exploración (campo abierto) y mejorar la memoria como ejemplo de capacidad cognitiva (ensayo de reconocimiento de objeto novedoso), por lo que las hipótesis nulas y alternativas correspondientes serían las siguientes:

$$H_{0(corticosterona)}: \hat{y} \geq y$$

$$H_{A(corticosterona)}: \hat{y} < y$$

$$H_{0 \text{ (ansiedad)}}: \hat{y} \geq y$$

$$H_{A \text{ (ansiedad)}}: \hat{y} < y$$

$$H_{0 \text{ (exploración)}}: \hat{y} \leq y$$

$$H_{A \text{ (exploración)}}: \hat{y} > y$$

$$H_{0 \text{ (memoria)}}: \hat{y} \neq y$$

$$H_{A \text{ (memoria)}}: \hat{y} = y$$

Según los grupos establecidos, las diferencias pueden venir causadas por:

- Enriquecimiento ambiental (α_{EA}).
- Sexo (α_{sexo}).
- Interacción entre EA-sexo ($\alpha_{EA\text{-sexo}}$).
- Variabilidad que no podemos explicar (ϵ).

$$y = \mu + \alpha_{EA} + \alpha_{Sexo} + \alpha_{EA-Sexo} + \epsilon$$

El análisis estadístico de los resultados de los dos grupos (control y ambiente enriquecido) y sexos será realizado por medio de un test *two-way ANOVA*, donde esperamos observar diferencias significativas en el grupo expuesto al EA respecto al control.

Bibliografía:

Matsuo, N., Takao, K., Nakanishi, K., Yamasaki, N., Tanda, K., & Miyakawa, T. (2010). Behavioral profiles of three C57BL/6 substrains. *Frontiers in behavioral neuroscience*, 4, 29

Grupo 5:

- Paula Sánchez
- Julia Isidro
- Maria Losa
- Inés Cabrera
- Jose Luis Pérez

Introducción:

M. unguiculatus es la especie de jerbo más usada en para experimentación de las 103 pertenecientes a la subfamilia Gerbillinae (parte de la familia Muridae). En este caso, se utilizaron estos animales para estudios de epilepsia, debido a que son animales más propensos a sufrir de estas crisis. Recientemente se ha observado una tendencia agresiva de las hembras hacia los machos y la presencia de estereotipias relacionadas con el estrés. Se sospecha que este aumento de los niveles de estrés en los animales puede ser debida al entorno. Por ello, se propone un nuevo programa de enriquecimiento ambiental que

consta de la instalación de madrigueras en las jaulas, de forma a simular las condiciones naturales de los jerbos.

Nuestra hipótesis de partida es la siguiente:

$$H_0: \mu_c = \mu_T$$

$$H_1: \mu_c > \mu_T$$

Siendo μ la media de tiempo de cavado de los animales.

A continuación se detalla el procedimiento de estimación de la N, así como el diseño experimental.

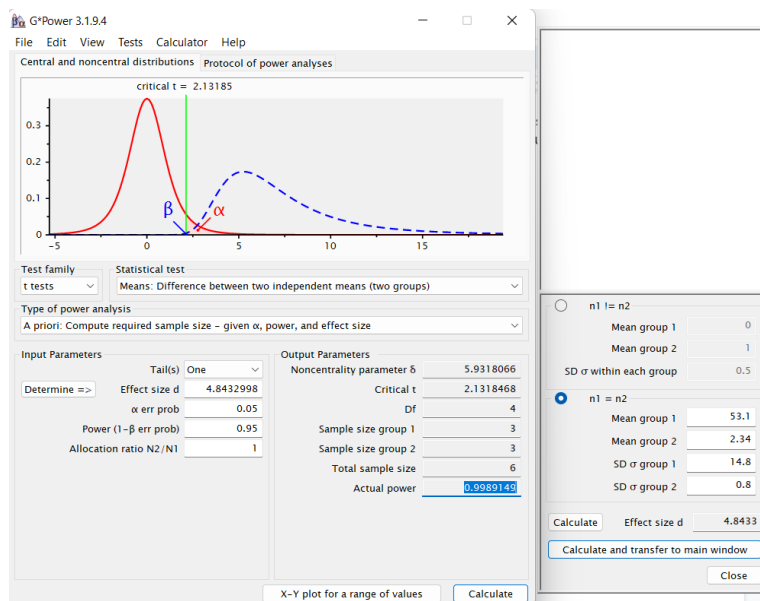
1) Cálculo del tamaño muestral:

Se establece la jaula como unidad experimental, dado que es un tratamiento que se aplica al conjunto de animales de la misma. Se considera la excavación como una estereotipia cuando el tiempo de cacao supera los x segundos. A partir de los datos recopilados de fuentes bibliográficas, se establece una media de cavado (μ) y desviación típica (σ):

- grupo control (sin tratamiento):
 - $\mu_c = 53,1s$
 - $\sigma_c = 14,8s$
- grupo tratamiento:
 - $\mu_T = 2,34s$
 - $\sigma_T = 0,8s$

Así mismo, para calcular el tamaño muestral se se establecen los parámetros de significancia ($\alpha = 0.05$) y potencia ($1-\beta = 0.95$). El tamaño del efecto se calcula con G-power ($d = 4.84$):

Se obtiene una por tanto, 3 jaulas con el (presencia de



N = 6: tenemos jaulas control y tratamiento madriguera).

2) Diseño experimental

En cada jaula habrá 5 jerbos. Ya que las hembras son más territoriales y agresivas que los machos, y como son animales monógamos con ciclos reproductivos muy cortos, todos los animales utilizados en el experimento son machos. Por lo tanto no existe variabilidad debida al sexo.

Para analizar el comportamiento de los animales y poder medir la estereotipia de cavado:

- Se harán grabaciones de los grupos experimentales y controles, ya que es una forma eficaz, no invasiva y no intrusiva de obtener información sobre los diferentes comportamientos. Se instalará una cámara por jaula de forma fija para que grabe en plano cenital y permita hacer un muestreo de barrido continuo de los animales.
- Estas grabaciones se realizarán 3 veces, serán de 30 minutos cada una y durante 3 días consecutivos.
- Los videos se analizarán automáticamente con un programa que habrá que entrenar previamente para que detecte las estereotipias de cavado.

Dado que se trata de un animal polifásico, sin ciclos de sueño definidos y picos de actividad a lo largo de todo el día, la toma de muestras se aleatoriza, mediante la creación de cuadrados latinos. Esto permite estudiar la posible influencia del momento de la medición sobre la estereotipia de cavado. Por lo que el momento del día también pasará a ser un **factor o variable independiente**, que se introduce con la finalidad de reducir el posible ruido experimental durante el análisis estadístico de los resultados.

Grupo control:

	Día 1	Día 2	Día 3
Jaula 1	M	N	T
Jaula 2	T	M	N
Jaula 3	N	T	M

Grupo experimental:

	Día 1	Día 2	Día 3
Jaula 1	T	N	M
Jaula 2	M	T	N
Jaula 3	N	M	T

Las medidas se realizarán los mismos tres días para reducir una posible variabilidad entre los grupos. Este protocolo se repetirá una semana más tarde de forma a contar con más medidas.

La variabilidad puede, por tanto, puede estar causada por:

- Tratamiento (T): presencia o no de madriguera
- Momento del día en el que se toman las muestras (MD)

$$y = \mu + \alpha_T + \alpha_{MD} + \varepsilon$$

Se realiza un *two-way ANOVA* para analizar los datos obtenidos y valorar el efecto del tratamiento sobre las estereotipias de cavado de los animales.

Bibliografía:

- T. Poole (Ed.), *The UFAW Handbook on the Care and Management of Laboratory Animals*, vol. 1, Blackwell Science Publications, Oxford (2003), pp. 345-355
- P.H. Beynon, J.E. Cooper (Eds.), *Manual of Exotic Pets*, British Small Animal Veterinary Association, Gloucestershire, UK (1991), pp. 31-38
- Arnold, C. E., & Estep, D. Q. (1994). Laboratory caging preferences in golden hamsters (*Mesocricetus auratus*). *Laboratory animals*, 28(3), 232–238.
<https://doi.org/10.1258/002367794780681598>