

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA



**"INTERACCIÓN ENTRE DESNUTRICIÓN PERINATAL Y
ESTIMULACIÓN SENSORIAL: DISCRIMINACIÓN OLFATORIA
EN LA RATA INFANTE"**

TESIS

**Que para obtener el Grado de Maestra en Ciencias
(Neurobiología)**

PRESENTA:

Lic. En Psic. Marina Ruiz Díaz

Asesor: Dr. Manuel Salas Alvarado

Juriquilla, Querétaro.

2006



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

La presente tesis se realizó en el Instituto de Neurobiología, Campus Juriquilla, Querétaro, Universidad Nacional Autónoma de México bajo la tutoría del Dr. Manuel Salas Alvarado. Con el apoyo parcial del proyecto IN210903 de la DGAPA/UNAM y las becas de CONACYT No.184899 y el complemento de la UNAM No. 504010914.

AGRADECIMIENTOS

Mi más sincero agradecimiento al Dr. Manuel Salas y a la Lic. María Carmen Torrero por su asesoría, por su orientación y apoyo incondicional durante la realización de mi tesis.

A mi Comité Tutorial, a la Dra. Teresa Morales, al Dr. Miguel Condés por su apoyo en la revisión de mi tesis en cada tutorial presentado, por sus puntuales observaciones y acertados comentarios.

A mi Jurado Revisor, al Dr. León Cintra, Dr. Ismael Jiménez, la Dra. Gabriela Morali por sus valiosos comentarios, críticas y sugerencias.

Al Dr. Carlos Arámburo como Director del Instituto y al Dr. Raúl Paredes como Coordinador de la Maestría, por las facilidades otorgadas dentro del Instituto de Neurobiología durante mis estudios de maestría.

Al Apoyo Técnico de Mirelta Regalado, Gerardo Rojas y Pilar Durán, quienes siempre estuvieron dispuestos a orientarme en cualquier momento.

A las Unidades de Apoyo, Martín García en el Bioterio, María del Pilar Galarza en la Biblioteca y Leonor Casanova en la Unidad de Enseñanza, por las facilidades y apoyo otorgadas para el uso de las instalaciones.

A las secretarias Yolanda y Magda de la Unidad de Enseñanza quienes siempre me apoyaron en la realización de trámites.

DEDICATORIAS

Agradezco y dedico de manera especial mi trabajo de tesis a mi madre Marina Díaz Ezquerro, quien siempre me ha apoyado incondicionalmente en todas mis decisiones y ayudado a lograr todas mis metas.

Al amor de mi vida, Alfonso Castro, por que siempre estuvo a mi lado durante todos los malos y buenos momentos que pasé, ayudándome e impulsándome con su amor.

A Dios por permitirme realizar todos mis sueños y su presencia como fortaleza y guía en cada paso que doy en mi vida.

A mi familia, tíos y primos que siempre me han apoyado y creído en mí.

A mis maestros, quienes impartieron sus clases y me motivaron a continuar con los estudios y de quienes pude aprender de sus conocimientos y experiencias tan valiosas.

Al Dr. Miguel Condés, quien con sus enseñanzas y sugerencias me alentó y ayudó siempre a ser mejor.

A mis compañeras de laboratorio, Lore, Mire, Susy, Carmen y Kari, quienes fueron un gran apoyo y sobre todo por brindarme y crear una gran amistad.

A mis compañeros de maestría y amigos especiales, como Yvonne, Yuritzia, Jeans, Nestor y Gina quienes fueron ayuda y apoyo indispensable para mis estudios.

A mis grandes y respetables amigos, el Dr. Salas y Carmelita quienes siempre estuvieron motivándome, dándome su cariño y con sus palabras y enseñanzas acertadas me ayudaron a madurar y crecer como profesional y como persona.

ÍNDICE

	PÁGINAS
RESUMEN.....	ii
SUMMARY.....	iii
AGRADECIMIENTOS.....	iv
DEDICATORIAS.....	vi
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. ANTECEDENTES.....	5
2.1. Interacción sensorial en el hábitat uterino.....	5
2.2. Pre funcionalidad del recién nacido	6
2.3. Vía Olfatoria	7
2.4. Neurotransmisores de la vía olfatoria.....	14
2.5. Efectos de la restricción perinatal de alimento.....	17
2.6. Neurogénesis del substrato vagal de la rata	18
2.7. Estimulación sensorial temprana	22
2.8. Inervación autonómica del corazón.....	22
2.9. Características de la habituación	26
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	29
4. HIPÓTESIS	29
5. OBJETIVOS.....	30
5.1. OBJETIVO GENERAL	30
5.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	30
6. MATERIAL Y MÉTODOS	30
6.1. Animales	31
a) Grupo Control sin Estimulación (GC)	31
b) Grupo Desnutrido (GD)	31
c) Grupo Control Estimulado (GCE)	32
d) Grupo Desnutrido Estimulado (GDE)	32
6.2. Desarrollo físico de los animales.....	33

6.3. Estimulación sensorial	33
6.4. Procedimiento Conductual	34
Dispositivo de Registro	34
7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	39
8. RESULTADOS	42
8.1. Efectos sobre el desarrollo físico	42
8.1.1. Peso corporal.	42
8.1.2. Apertura de meatos auditivos externos y párpados.....	43
8.2. Efectos de la dieta y la estimulación sensorial temprana en la frecuencia cardíaca basal a través del desarrollo.	43
8.2.1. Habitación de la frecuencia cardíaca ante la estimulación a dos olores.....	45
8.2.2. Efectos sobre la capacidad de discriminación olfatoria.	51
9. DISCUSIÓN	53
10. CONCLUSIONES	62
11. REFERENCIAS	64
12. ÍNDICE DE FIGURAS Y GRÁFICAS	79

RESUMEN

INTERACCIÓN ENTRE DESNUTRICIÓN PERINATAL Y ESTIMULACIÓN SENSORIAL: DISCRIMINACIÓN OLFATORIA EN LA RATA INFANTE

En ratas Wistar de 4, 7 y 12 días de edad controles (GC), desnutridas (GD), controles estimuladas (GCE) y desnutridas estimuladas (GDE), se evaluó la discriminación al acetato de amilo y menta. Se utilizó la habituación a un olor y habituación cruzada a otro, midiendo la bradicardia asociada a éstos. La desnutrición se provocó reduciendo el alimento de la madre gestante (G1-G12, 50%; G13-G18, 60% y G19-G21, 100%). Continuó la desnutrición de crías (día 1-12P), intercambiando en la camada (cada 12 h) a una madre ligada y a otra sin ligadura de sus conductos galactóforos. Se estimuló a las crías aplicando masaje corporal suave (5 min/día). La desnutrición, redujo el peso corporal y retrasó la apertura de los oídos y ojos. La frecuencia cardíaca basal de las crías aumentó gradualmente con la edad en todos los grupos pero más en el GCE, posiblemente relacionado con la estimulación sensorial temprana. Los olores indujeron habituación y deshabituación en todos los grupos, modificándose en los GCE pero no así en los GD y sin variación en la edad. La habituación cruzada a un segundo olor, indica que la discriminación olfatoria ya opera desde esta etapa temprana del desarrollo. Los coeficientes de variabilidad de la bradicardia de las crías expuestas a los olores, se redujeron gradualmente. El hallazgo sugiere la existencia de correlación entre, la magnitud de la habituación y la deshabituación de las crías. La bradicardia provocada por los olores, es un modelo valioso para estudiar la discriminación temprana guiada por el olfato.

SUMMARY

PERINATAL UNDERNUTRITION AND SENSORIAL STIMULATION INTERACTION: OLFACTORY DISCRIMINATION IN PUP RATS

Olfactory discrimination to amyl acetate and menthol of Wistar rats at 4, 7 and 12 days of age in control (CG), undernourished (UG), control stimulated (SG), and undernourished stimulated (USG) subjects was evaluated. In all subjects the habituation to an odor and the cross-habituation to a different odor as assessed by measuring associated bradychardia were compared. During the gestational period undernutrition was performed by food intake restriction of dams (days G1-G12, 50%; G13-G18; 60% and G19-G21, 100%). Neonatal undernutrition continued by placing the pups (12 h) with a normal mother and (12h) with a foster ligated mother. Daily sensory stimulation (days 1-12 of age) of pups was provided by giving soft body massage (5 min/day). Undernourished rats with or without stimulation exhibited body weight reductions, and a one-day delay in ear- and eye-opening. Basal beat frequencies of pups gradually increased with age, specially in SG subjects, possibly related with the massage to which USG pups did not respond. Pups exposure to the odors resulted in habituation followed by cross-habituation phenomena (lost of first habituation) that were only modified by the sensory stimulation factor, although diet and age interactions were necessary for the olfactory discrimination appearance. The cross-habituation to a second odor indicates that olfactory discrimination is already operating at this early developmental stage, accompanied by significant reductions in the bradychardia coefficient of variability. The heart rate variations following the exposure to different odors may be a useful model to assess the olfactory discrimination at these early stages of life.

1. INTRODUCCIÓN

Los recién nacidos de especies altriciales tienen una gran dependencia de los cuidados maternos debido esencialmente a su notable inmadurez motora, sensorial y homeostática que no les permite ser autosuficientes para sobrevivir ante las demandas del medio ambiente, tales como termorregulación, eliminación de excretas, alimentación, evitación de los depredadores, etc. (Anokhin, 1964). Así, durante esa etapa su interacción con la madre se establece esencialmente vía de los sistemas somatosensorial, olfatorio y gustativo ya que la vista y la audición aún son poco funcionales.

Durante las primeras horas del nacimiento al establecerse el ritmo de la respiración, el recién nacido comenzará a operar de manera rudimentaria su sistema olfatorio en respuesta a señales químicas contenidas en las excretas provenientes del cuerpo de la madre, del líquido amniótico remanente del parto, de la leche materna y del ambiente del nido, que suspendidas en el aire ingresarán a las cavidades nasales para activar los receptores olfatorios de la mucosa nasal. De esta manera, el recién nacido iniciará la comunicación con la madre desarrollando sus capacidades discriminatorias a los olores, concurriendo esto con el desarrollo de la sensibilidad gustativa (Steiner, 1979; Wilson y Sullivan, 1994). El reconocimiento temprano de la madre y de los olores del nido a través del olfato es expresado por la rata recién nacida como reducción de sus movimientos corporales y aceleración de la actividad eléctrica del bulbo olfatorio (BO). Estas respuestas se han definido como la “impronta olfatoria” a semejanza de la “impronta o seguimiento” locomotor de los recién nacidos de especies precociales como las aves que siguen a la madre después de la eclosión (Lorenz, 1935; Schapiro y Salas, 1970).

En la rata, la neurogénesis de las células mitrales, en penacho, granulares y sus conexiones en el BO se llevan a cabo durante la etapa prenatal, continuando la formación de células granulares al período neonatal, junto con la formación de glomérulos olfatorios y células periglomerulares (Hinds, 1968; Woo y Leon, 1991). La organización estructural del BO del adulto se alcanza aproximadamente a los 15 días de edad, aunque la maduración electrofisiológica del adulto se logra hasta los 30 días

posparto (Salas y col., 1969). En este sentido, el canal olfatorio tiene la característica de ser funcional antes de alcanzar la organización estructural y la plasticidad del animal adulto en lo que usualmente se reconoce como pre funcionalidad del recién nacido (Brake y col., 1988). El conocimiento existente de las características de la conducta guiada por el olfato en la rata adulta y otros mamíferos es abundante incluyendo al ser humano (Imamura y col., 1992; Brennan y Keverne, 1997; Coopersmith y Leon, 1988; Wilson, 2000). Sin embargo, poco se sabe acerca de la capacidad de discriminación olfatoria y de sus propiedades plásticas en las ratas infantiles que contribuye al establecimiento del aprendizaje temprano a los olores, la ingesta y degustación de los alimentos y al reconocimiento de los congéneres que será de gran utilidad a lo largo del período de la vida (Wilson y Sullivan, 1994; Fletcher y Wilson, 2001). Asimismo, poco es lo que se conoce acerca de las alteraciones que la desnutrición pre y postnatal (perinatal) genera en las capacidades de discriminación en la vía olfatoria, y sus posibles repercusiones en el aprendizaje, el reconocimiento de congéneres y el desarrollo de la conducta social a largo plazo.

La restricción perinatal de alimento como factor nocivo del ambiente, tiene severas repercusiones en la organización del Sistema Nervioso Central (SNC) y su función, que incluyen entre otras a las alteraciones a nivel de las regiones telencefálicas, diencefálicas y del tallo cerebral. En la mayoría de los casos estas alteraciones provocan reducción en la formación de neuronas, migración neuronal incompleta e hipoplasia neuronal con reducción significativa de los árboles dendríticos, espinas y deficiente conectividad sináptica (Salas y col., 1974; Morgane y col., 1992; Torrero y col., 2003). En el contexto de la vía olfatoria se conoce que la privación temprana de alimento reduce el número de células granulares del BO y su conectividad con las células mitrales y en penacho, deteriorando el desarrollo de la inhibición olfatoria y de la capacidad de discriminación del BO (Math y Davrainville, 1980). Asimismo, se han descrito alteraciones a nivel de la amígdala y el hipocampo cuya participación en la discriminación y percepción olfatoria están bien documentadas (Ahmed y col., 1987; Díaz-Cintra y col., 1991; Escobar y Salas, 1993). El bulbo olfatorio y sus elementos estructurales tienen gran capacidad plástica para reorganizarse anatómica y funcionalmente, ante los cambios en el ingreso frecuente de la información

olfativa. Así, la exposición frecuente a diversos olores incrementa el número de ramas dendríticas y sus espinas en las células mitrales, ocurriendo el fenómeno contrario con atrofia del BO cuando se reduce el ingreso olfatorio al ocluir uno o ambos poros nasales (Meisami, 1976; Panhuber y Laing, 1987; Loranca y Salas, 2001).

Por otro lado, la estimulación sensorial temprana a base de separación breve de las crías de la madre, de masaje corporal suave y exposición diaria hacia ambientes enriquecidos en estímulos sensoriales durante el período neonatal, es capaz de promover el desarrollo neuronal, incrementando el grosor de la neocorteza, el número de ramas dendríticas y espinas, el contenido de acetilcolina y su enzima degradante, la maduración de los potenciales corticales provocados y el desarrollo de funciones cognitivas (Rosenzweigh y col. 1969; Schapiro y Vukovich, 1970; Leah y col., 1985; Sirevaag y Greenough, 1988; Plotsky y Meaney, 1993; Rosenzweigh y Bennett, 1996; Francis y col., 1996; Regalado y col., 1999; Salas y col., 2001).

En los mamíferos incluyendo a la rata adulta, toda actividad de movimiento o cambio de postura invariablemente se asocia a un incremento en la frecuencia cardíaca, la presión sanguínea y el gasto cardíaco, que permiten proveer de oxígeno y nutrimentos a los tejidos involucrados en la respuesta (Ganong, 1998). La inversa (disminución de la frecuencia cardíaca) es cierta cuando el sujeto entra en una fase de reposo con mínima actividad corporal. A esta capacidad de ajuste de la frecuencia cardíaca a las demandas del movimiento corporal, se le ha denominado el “acoplamiento cardiosomático” (Obrist, 1976). Estas variaciones en la actividad cardíaca están reguladas tanto localmente como por el sistema nervioso autónomo, cuyas acciones inciden sobre la actividad del corazón y de los vasos sanguíneos para mantener la homeostasis en el medio interno (Berne y Levy, 1992; Ganong, 1998). Sin embargo, la rata recién nacida hasta alrededor del día 12 posparto presenta respuestas cardiovasculares opuestas a las del adulto, esto es, bradicardia ante las demandas de actividad de movimiento, desconociéndose los mecanismos de su generación (Hofer y Reiser, 1969; Haroutunian y Campbell, 1981; Martin y Alberts, 1982). La regulación cardiovascular es dependiente de la actividad del sistema nervioso autónomo, que al nacimiento aún muestra notable inmadurez pero que es suficiente para ejercer tanto acciones excitadoras como inhibitorias en la frecuencia cardíaca para promover ajustes

homeostáticos (Adolph, 1957; Hofer y Reiser, 1969). Esta inmadurez va asociada a la neurogénesis de las estructuras autonómicas que regulan el control de la frecuencia cardíaca, a nivel del tallo cerebral y de la médula espinal (Nosaka y col., 1979; Altman y Bayer, 1980).

Una dificultad importante para determinar las capacidades de discriminación sensorial de los animales inmaduros, es la elección de una prueba conductual que las crías puedan ejecutar, que sea confiable con respecto al estímulo que la genera y que dé resultados claros en un período corto de tiempo. En los animales maduros y los seres humanos, la discriminación sensorial puede evaluarse con el paradigma de habituación cruzada en el que un estímulo se presenta repetidamente a intervalos regulares para inducir el fenómeno de la habituación. Enseguida, se presentan de manera individual y repetida estímulos olfatorios diferentes pero de características funcionales similares para probar si hay o no generalización en la respuesta de habituación al estímulo original (habituación cruzada o deshabituación) (Fletcher y Wilson, 2001).

Tomando en consideración que las ratas recién nacidas presentan una notable inmadurez, que el grado de desarrollo estructural y funcional del BO en esa etapa es rudimentario pero es la principal vía que permite la comunicación con la madre. Asimismo, que la desnutrición perinatal afecta el desarrollo y la función de estructuras de la vía olfatoria y que la estimulación sensorial temprana diaria a base de masaje y exposición a un ambiente enriquecido en estímulos sensoriales permite restituir el daño estructural, en este estudio, se analizó la ontogenia de la discriminación olfatoria en crías desnutridas, y desnutridas a las que se proporciona estimulación sensorial, utilizando la habituación a un estímulo olfativo y la habituación cruzada a un segundo olor, cuantificando las respuestas de frecuencia cardíaca provocadas por la exposición a diferentes olores. De esta manera, se determinó el efecto de la desnutrición pre y postnatal en ratas infantes sobre la capacidad de discriminación olfatoria, y sí la estimulación sensorial temprana puede revertir los efectos de la desnutrición sobre esta capacidad funcional.

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Los recién nacidos de especies altriciales tienen una marcada inmadurez que limita su interacción con la madre y el medio ambiente. No obstante la notable inmadurez, los sistemas somatosensorial, olfatorio y gustativo permiten la comunicación con la madre. Paralelamente, se sabe que la organización anatómica y funcional del sistema olfatorio concurre con los períodos prenatal y postnatal, siendo muy susceptible de dañarse por factores epigenéticos como la restricción de alimento. Considerando que, 1) es poca la información disponible acerca del aprendizaje temprano guiado por el olfato en la rata recién nacida, y 2) que la estimulación sensorial temprana mediante masaje y exposición a un ambiente enriquecido en estímulos sensoriales, puede revertir los efectos nocivos asociados al daño perinatal; en el presente trabajo, se investigó el efecto de la desnutrición pre y postnatal sobre la capacidad de discriminación olfatoria mediante la respuesta de habituación de la frecuencia cardíaca de la rata infante Wistar, y cómo la estimulación sensorial temprana puede revertir los efectos de la desnutrición sobre esta capacidad.

2. ANTECEDENTES

En especies altriciales como la rata, la relación madre-crías se establece desde el embarazo, cuando el feto en formación tiene a su disposición todos los elementos necesarios para su crecimiento, y para el mantenimiento óptimo de sus precarias condiciones de desarrollo. El hábitat uterino es único en cuanto que provee al feto de una rica fuente de nutrimentos, factores de crecimiento, oxígeno, líquidos corporales, le mantiene libre de excesos de metabolitos y a una temperatura corporal con mínimas variaciones. En la rata, alrededor del día 10 de gestación el producto de la concepción pasa de un estadio de embrión al de feto que culminará en el día 21 del embarazo cuando, con la ayuda materna enfrentará el parto, uno de sus primeros grandes retos con el mundo exterior al momento del nacimiento.

2.1. Interacción sensorial en el hábitat uterino

En especies altriciales el vínculo que se establece entre la madre y su camada, se genera desde etapas muy tempranas del desarrollo del feto cuando a través del sistema somatosensorial se reconoce la actividad de movimiento de la madre. En efecto, en etapas intermedias de la gestación, el feto está sometido a la sensación de tacto fino que provoca sobre su piel la fluidez y tibieza del líquido amniótico, a las rutinas de movimiento y a los cambios posturales que la madre ejecuta durante sus actividades en la vigilia y el sueño (Scheibel y col., 1973; Ackerman, 2000). Esta actividad no volitiva durante la interacción madre-feto, iniciará una comunicación no verbal principalmente sensorial, que tendrá gran repercusión en el desarrollo cerebral del producto con efectos a lo largo de su existencia.

Sin embargo, durante la gestación tardía, los sistemas quimio sensoriales, olfato y gusto se sumarán al funcionamiento temprano del sistema somatosensorial para iniciar la comunicación a través de señales químicas con la madre, al detectar componentes de la dieta materna que transportados por la circulación feto placentaria

formarán parte del líquido amniótico para impactar a los receptores del gusto y el olfato del feto (Alberts y Cramer, 1988).

Dan apoyo a este conocimiento los frecuentes movimientos de las manos del feto dirigidos hacia la boca, que provocan primordios de succión y lamido, que también serán relevantes para promover durante la etapa postnatal el ejercicio de las manos en actividades más elaboradas como el comer, beber líquidos y adiestrarse en el uso manual de instrumentos para la ingesta de alimentos permitiéndoles la supervivencia ante su medio ambiente sin la dependencia materna (Tudella y col., 2000).

2.2. Pre funcionalidad del recién nacido

Durante las primeras horas del nacimiento al establecerse el ritmo de la respiración, la mucosa olfatoria del recién nacido comenzará a ponerse en contacto con las partículas odoríficas provenientes particularmente del cuerpo de la madre y del ambiente próximo al nido, que suspendidas en el aire ingresarán a las cavidades nasales para activar a los receptores olfatorios. Bajo estas condiciones, la rata recién nacida después de numerosos ensayos y errores desarrollará, en el curso de la primera semana de edad, los inicios de sus capacidades de discriminación a los olores en conjunción con el desarrollo de la sensibilidad gustativa (Salas, y col., 1970; Schapiro y Salas, 1970; Mair y col., 1982; Wilson y Leon, 1986; Mistretta y Labyak, 1994; Rubio y col., 2004).

En la rata recién nacida, el desarrollo e inicio de la función olfatoria son precoces, ya que mediante el análisis del desarrollo electrofisiológico del bulbo olfatorio (BO), es posible registrar la actividad eléctrica en el día 2 postnatal (Salas y col., 1969). Asimismo, es factible reconocer el incremento en las frecuencias del electro olfatograma y reducción de la actividad motora, asociados a la estimulación con flujo de aire conteniendo olores provenientes de la madre y del ambiente del nido, sin cambios ostensibles en el registro durante la exposición de otros olores como el olor del alimento de fórmula o de ácido acético (Salas y col., 1970; Schapiro y Salas, 1970). A las respuestas eléctricas del BO y de la actividad de movimiento de la rata recién nacida ante la presencia de olores provenientes de la madre y el nido, se les ha denominado la

“impronta olfatoria” en alusión a la respuesta de seguimiento locomotor o impronta de los recién nacidos de especies precociales como las aves descrita por el etólogo austriaco Konrad Lorenz (1935).

Por otra parte, esta pre funcionalidad que muestra el recién nacido dependerá del desarrollo prenatal del substrato neuronal involucrado en la olfacción, así como es sabido que, en la rata la neurogénesis de las células mitrales, en penacho y granulares junto con sus conexiones y la formación de glomérulos en el BO, el desarrollo amigdalino e hipocámpico tienen sus comienzos en etapas prenatales y solo algunas continúan en el período neonatal (Hinds, 1968; Altman, 1969; Díaz-Cintra y col., 1991; Woo y Leon, 1991; Escobar y Salas, 1993; Vassar y col., 1994). Todos estos elementos estructurales alcanzan las características cercanas a las del animal adulto alrededor de los 15 días de edad, aunque su actividad eléctrica solo se complete hasta los 30 días postparto (Salas y col., 1969). Así, el sistema olfatorio como otros sistemas sensoriales pasa por una etapa de funcionalidad previa en la cual puede operar exitosamente aún en la estrechez de las demandas del ambiente ecológico del nido (Steiner, 1979; Brake y col., 1988).

Durante los últimos años, el estudio de la conducta guiada u orientada por el olfato ha sido motivo de intenso análisis en el animal adulto incluyendo al hombre (Imamura y col., 1992; Brennan y Keverne, 1997; Wilson, 2000). Asimismo, aunque se tiene conocimiento de la capacidad de las ratas infantiles para aprender utilizando el olfato, poco se conoce acerca de sus habilidades para la discriminación olfatoria durante el período postnatal temprano y sus posibles implicaciones en el desarrollo de la conducta social (Wilson y Sullivan, 1994; Fletcher y Wilson, 2001).

2.3. Vía Olfatoria

Los mamíferos pueden detectar una enorme variedad de estímulos químicos odorantes, se estima que los humanos, por ejemplo, pueden detectar 10,000 hasta 100,000 diferentes compuestos volátiles. Asimismo, algunos olores con composición química casi idéntica pueden generar diferentes percepciones olfatorias. Adicionalmente, el sistema olfatorio también detecta feromonas, que son productos

químicos liberados por los animales que estimulan respuestas hormonales o conductuales en los miembros de la misma especie (Buck, 2004).

El sistema olfatorio es importante para las funciones de reproducción, maternales, de ingesta de líquidos, regulación neuroendocrina, respuesta emocional, agresión y reconocimiento de congéneres, depredadores y presas. También juega un papel fundamental en la selección del alimento, así como en la percepción de los sabores que resultan de la integración de las señales olfatorias y gustativas.

Las moléculas odoríficas al unirse a los receptores de membrana generan un fenómeno de transducción de la señal en las neuronas receptoras olfatorias, localizadas en el epitelio olfatorio dentro de la cavidad nasal, la cual se encuentra segmentada y tiene un volumen de 156mm^3 a las 7 semanas y 257mm^3 a las 16 semanas de edad. La superficie total de la cavidad nasal en la rata en las mismas edades es de 799mm^2 y $1,344\text{mm}^2$ respectivamente (Gross y col., 1982, citado en Hebel y Stromberg, 1986).

Cada neurona receptora olfatoria, está provista en su polo apical por lo menos de 10 cilios que se proyectan hacia la superficie de la mucosa olfatoria. Estas neuronas presentes en la mucosa olfatoria, tienen axones largos que se introducen a través de orificios pequeños ubicados en el hueso etmoides que se encuentra por encima de ellas, para hacer conexiones sinápticas con neuronas del BO en la zona de los glomérulos olfatorios. El BO es una estructura redondeada como una perilla, bastante grande en animales con sentido agudo del olfato (macrosmáticos), pero disminuye su tamaño relativo cuando esta habilidad decrece (microsmáticos), como es el caso de los seres humanos.

Se ha identificado una larga familia de multigenes que codifican para los receptores olfatorios (ROs) que son expresados en las neuronas receptoras olfatorias del epitelio olfatorio y se ha determinado que los ratones tienen alrededor de 1,000 diferentes ROs, mientras que los humanos tienen alrededor de 350. Cada gen RO es expresado en un pequeño porcentaje de neuronas que son exclusivas de una zona particular, sugiriendo que la información olfatoria está organizada en grandes bloques previos al funcionamiento del BO, y que cada neurona puede expresar solo un gen RO. Por esta razón, se ha determinado que cada señal enviada por una neurona al cerebro proviene de un receptor específico. Un RO puede reconocer múltiples olores y un

simple olor es detectado por múltiples ROs, pero diferentes olores son reconocidos por diferentes combinaciones de ROs. Esto indica que la familia de ROs se utiliza de una manera combinatoria para codificar la identidad de cada olor. Se detectan gran variedad de olores, y por lo tanto codificados por diferentes combinaciones de ROs, pero cada RO sirve como un componente del código de varios olores. Por lo tanto, diferentes olores tienen diferentes “códigos receptores”, ya que aunque un olor sea detectado por solo tres tipos de ROs, este esquema combinatorio puede teóricamente generar al menos un billón de diferentes códigos de olor. Esto explica como los humanos y otros mamíferos no solamente pueden detectar un número ilimitado de compuestos volátiles sino que también los pueden distinguir (Buck, 2004).

Las estructuras del sistema olfatorio de la rata conforman una gran porción de la región basal del cerebro anterior. La parte más anterior del sistema son los BOs. De ambos BOs emergen numerosas fibras que constituyen, los tractos olfatorios laterales, los cuales proyectan a la región de la amígdala. Los tubérculos olfatorios se ubican a los lados del nervio óptico, también se reconoce una fisura prominente que forma el borde lateral de estas estructuras y que corre posteriormente a lo largo del borde de la corteza piriforme denominada el surco o cisura rinal (Hamilton, 1976).

Sin embargo, el BO no es sólo un conjunto de neurópilos (dendritas, axones y neuronas) simples sino que este substrato tiene conexiones que le confieren dos propiedades funcionales que son comunes a todos los sistemas sensitivos: la inhibición lateral y el control de retroalimentación negativa de la información aferente. La vía de retroalimentación más prominente la forman proyecciones axonales procedentes de las células mitrales y las células en penacho de segundo orden, que hacen sinapsis excitatorias con células granulares que a su vez inhiben a las células vecinas de segundo orden. Una característica interesante de estas sinapsis es que son dendrodendríticas (las células granulares son neuronas de axón corto) y recíprocas. La excitación y la inhibición ocurren de manera simultánea, en direcciones opuestas en la misma sinapsis y desempeñan un papel importante para la discriminación olfatoria.

También se encuentran las células periglomerulares, que como neuronas de axón corto tienen la función de inhibición lateral a nivel de los glomérulos olfatorios mediante sinapsis recíprocas con las células de segundo orden y conexiones directas

desde los axones olfatorios. El sistema olfatorio es mucho más antiguo que otros sentidos, en especies diferentes al hombre como la rata, el ratón, el cobayo, el gato, etc., en los cuales una proporción mucho mayor del cerebro está directa o indirectamente relacionada con la olfacción. En el ser humano, las reminiscencias de este sistema básico de motivación y emoción a base de señales químicas aún pueden verse en las proyecciones olfatorias hacia el sistema límbico. Lo que parece haber ocurrido en el transcurso de la evolución es que la motivación secundaria a la exposición a estímulos químicos que solo adquieren su significado mediante la experiencia y el aprendizaje, ha crecido constantemente en importancia relativa a la de la motivación olfatoria primaria asociada a estímulos relacionados con funciones primitivas. Por esta razón, las estructuras límbicas que fueron originalmente subordinadas al olfato ahora no son primariamente olfatorias, y el nombre de rinencéfalo (“cerebro olfatorio”) que a veces se le da al sistema límbico es incorrecto en los animales filogenéticamente más evolucionados. (Carpenter, 1998).

El procesamiento de las señales olfatorias abarca varios niveles. La entrada de la señal olfatoria se lleva a cabo a partir de la recepción de las moléculas odoríferas en los receptores de la mucosa olfatoria, que son neuronas bipolares cuyo axón proyecta hacia el BO a través de la placa cribosa de la base del cráneo. Los axones primarios hacen sinapsis con las prolongaciones dendríticas de las células mitrales y en penacho formando así los glomérulos olfatorios los cuales son las principales unidades integradoras aferentes del BO. Los axones de estas neuronas proyectan vía del nervio olfatorio y de ahí pasan a formar parte de la comisura anterior para enviar la información al BO contralateral. El circuito local del BO, a base de glomérulos participa activamente en el procesamiento de la información olfatoria entrante antes de ser transmitida a centros superiores donde establecen una segunda sinapsis en la vía. La información es relevada a las áreas olfatorias secundarias de la corteza olfatoria y regiones subcorticales las cuales proveen asimismo conexiones centrífugas que regresan al bulbo olfatorio principal. Así, el núcleo olfatorio anterior conecta los dos BOs a través de la porción anterior de la comisura anterior, el tubérculo olfatorio y la corteza piriforme. Esta última región está considerada como la principal región de discriminación olfatoria. De esta región la señal es enviada al núcleo cortical de la amígdala, a los núcleos

talámicos, específicamente al núcleo medial dorsal y al área entorrinal, la cual mantiene proyecciones amplias con el hipocampo (Paxinos, 2004) (Ver Fig. 1).

En los sistemas sensoriales de los animales vertebrados, las neuronas periféricas son las que responden a los estímulos ambientales y transmiten esta señal a centros sensoriales más altos en el cerebro donde son procesados para permitir la discriminación de la información sensorial compleja (Buck y Axel, 1991).

Los centros que participan en la percepción olfatoria incluyen un número de áreas, tales como la corteza piriforme, el tubérculo olfatorio, el núcleo cortical de la amígdala, el núcleo olfatorio anterior, porciones del hipocampo, corteza entorrinal lateral y de la ínsula. El tubérculo olfatorio y la corteza piriforme proyectan a otras regiones corticales olfatorias y al núcleo medio dorsal del tálamo. Se considera que estas regiones, corticales y talámicas juntas pueden estar involucradas en la percepción consciente de los olores. El núcleo cortical de la amígdala y el área entorrinal son componentes del sistema límbico que pudieran participar en el procesamiento afectivo de los olores (Buck, 2001).

Finalmente, hay importantes conexiones entre la corteza piriforme, el núcleo olfatorio anterior y la amígdala al hipotálamo medial y lateral, que proporcionan rutas neuronales mediante las cuales los estímulos olfatorios pueden causar efectos endocrinos y autonómicos evidentes como la salivación y otras respuestas secretoras al olor de alimentos, así como influir en la selección de la comida (Paxinos, 2004). Así, de manera indirecta el BO mantiene amplias conexiones al hipotálamo para las respuestas endocrinas y autonómicas.

Existen varios sitios en los cuales la cognición y la discriminación pueden expresarse, dado que todas las regiones olfatorias son estructuras corticales, incluyendo el bulbo olfatorio, corteza olfatoria anterior, corteza piriforme, y corteza entorrinal. En suma, una parte importante de la información olfatoria es guiada a la neocorteza vía del tálamo y otras estructuras subcorticales. Estudios fisiológicos realizados en monos sugieren que de cierto modo la discriminación se lleva a cabo en la corteza orbito frontal lateral y posterior. Esta información olfatoria tiene como relevo al tálamo medio dorsal o por rutas córtico corticales (Takagi, 1984, citado en Paxinos, 2004). Hay estudios que muestran que el circuito neocortical olfatorio vía del tálamo,

como el tubérculo olfatorio, la corteza insular, y la corteza piriforme reciben aferencias de los axones de las células mitrales, el tubérculo olfatorio y la corteza piriforme proyectando a los núcleos dorso medial y submedial del tálamo. El dorso medial del tálamo proyecta a la corteza orbitofrontal posterior, por lo que se sabe que ésta pudiera ser la vía que guía las señales para la discriminación olfatoria (Paxinos, 2004). La Figura 2 presenta las posibles conexiones del sistema olfatorio principal en la rata.

Por otro lado, las feromonas parecen ser detectadas primeramente por neuronas sensoriales en el órgano vomeronasal, una estructura olfatoria separada en el septum nasal que se encuentra en la cavidad nasal. Las señales sensoriales son relevadas de este órgano por el bulbo olfatorio accesorio y de ahí la información viaja hasta la amígdala medial y el hipotálamo, áreas implicadas en los efectos hormonales y conductuales de las feromonas (Buck, 2004).

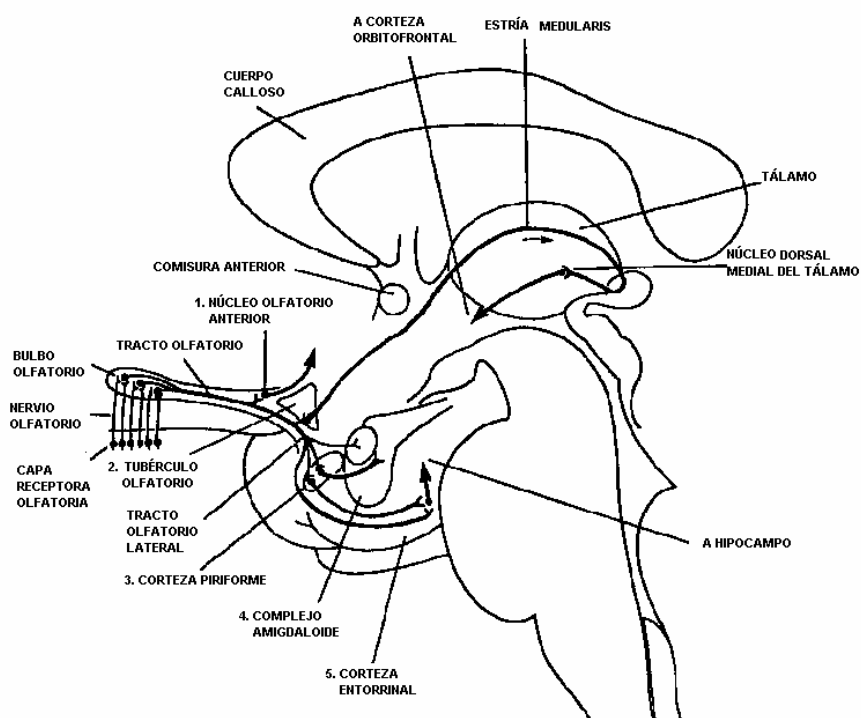


Fig.1. Vía Olfatoria y principales estructuras involucradas en la vía (modificado de Kandel, 1985).

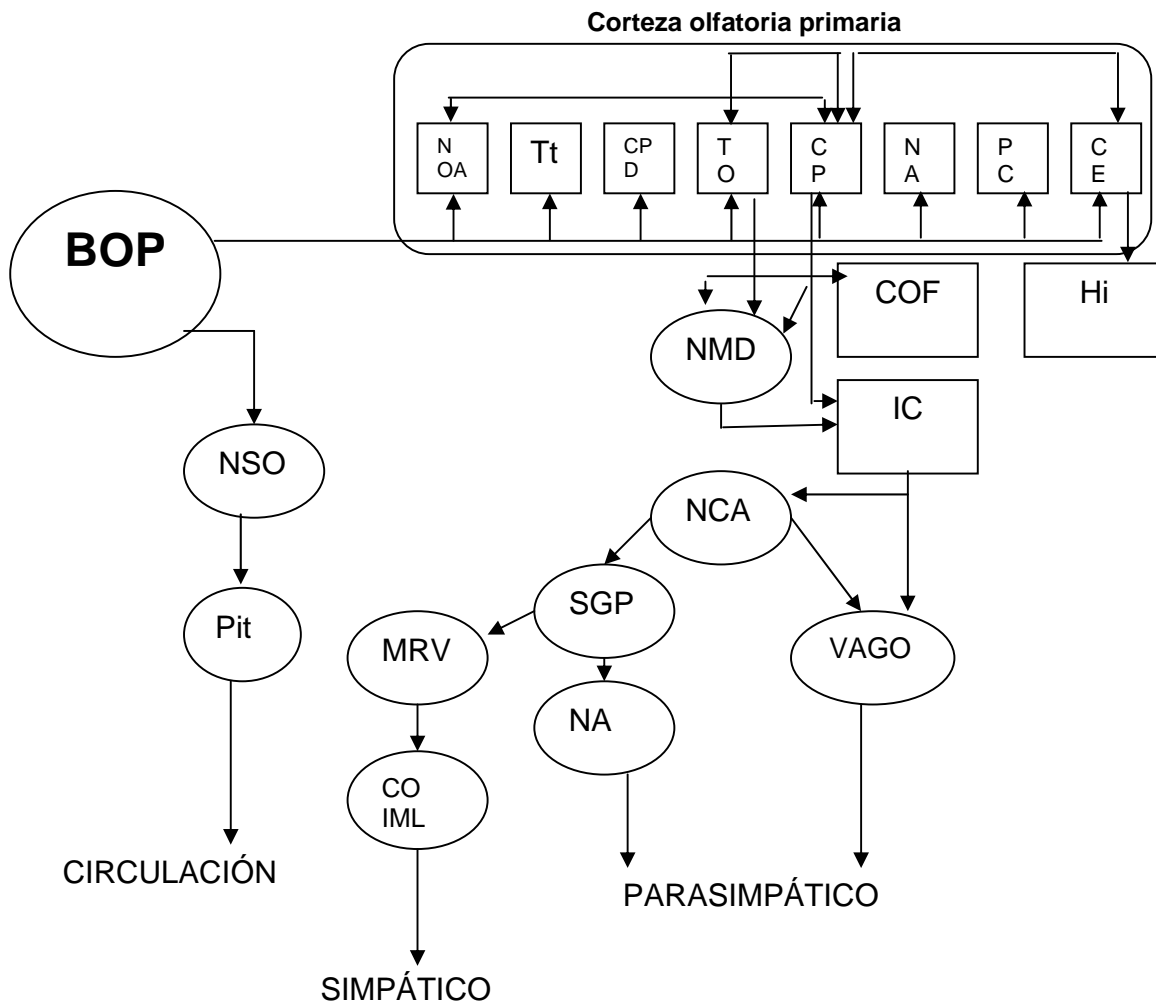


Fig. 2. Conexiones del sistema olfatorio principal con énfasis en los posibles circuitos que median las respuestas eferentes tales como cambios autonómicos y hormonales. Las estructuras corticales están en cuadros, y las estructuras subcorticales en elipses. BOP, Bulbo olfatorio principal; Tt, tenia tectorial; CPD, Corteza peduncular dorsal, TO, Tubérculo olfatorio; CP, corteza piriforme; NOA, Núcleo Olfatorio Anterior; NA, núcleo amigdalóide anterior cortical; PC, núcleo amigdalóide posterior cortical; CE, Corteza Entorrinal; Hi, hipocampo; COF, Corteza orbital frontal; IC, corteza insular, NMD, Núcleo medial dorsal; NCA, Núcleo central de la amígdala, SGP, sustancia gris periacueductal; NA, núcleo ambiguo; VAGO, núcleo motor dorsal de vago; NSO, núcleo supraóptico; Pit, pituitaria; MRV, Médula rostroventrolateral; COIML, Columna de células intermediolaterales del nivel torácico de la médula espinal (Paxinos, 2004).

2.4. Neurotransmisores de la vía olfatoria

Las vías del gusto y el olfato que detectan señales químicas provenientes tanto del medio ambiente externo como del interno del organismo, requieren de la participación de un gran número de neurotransmisores que se liberan en diferentes nichos celulares para intervenir en el procesamiento de las señales en el sistema nervioso central (Halász y Shepherd, 1983). En efecto, los fenómenos de transducción a nivel de los receptores de la mucosa olfativa, su conducción como señales eléctricas por el cableado axonal, el procesamiento de éstas en unidades funcionales del BO (glomérulos olfatorios) que se transmiten, retroalimentan e integran en las diferentes estaciones de relevo siguiendo la ruta del canal olfativo, requieren de un variado número de neurotransmisores. Sería muy simplista pensar que el manejo del gran número de funciones básicas para la supervivencia del organismo llevadas a cabo por el sistema olfativo, fuesen solo el resultado de la participación de un número reducido de neurotransmisores como ocurre en otras regiones del SNC.

De esta manera, en los fenómenos de transducción periférica que ocurren a nivel de los cilios de las células receptoras de la mucosa olfatoria se ha sugerido la participación del ácido glutámico, el óxido nítrico y la carnosina que a nivel de los receptores olfatorios participan generando los cambios iónicos a nivel de las membranas de los receptores. Cuando la despolarización local no alcanza los niveles de disparo, se promueve la generación de potenciales eléctricos generadores, y una vez que por adición se alcanza el umbral de disparo se produce el potencial de acción propagado que inicia la activación de las neuronas del BO, participando en la discriminación de las señales olfativas (Tresguerres, 1992; Berne y Levy, 1992). Esta parte del proceso de la activación del sistema nervioso, es de gran relevancia debido a que constituye la vía de conexión con el mundo exterior, a través de las partículas odoríferas liberadas en el aire atmosférico y provenientes de diversas fuentes de olores que son fundamentales para la detección del alimento, el reconocimiento de los congéneres, de los depredadores, del estado actual del mundo exterior y de la detección de la pareja para los fines de las actividades de reproducción de la especie.

De estudios recientes se ha establecido que el sistema olfatorio se desarrolla básicamente de la misma forma que el sistema visual del recién nacido y que es posible identificar receptores AMPA y NMDA como los puntos clave del circuito olfatorio a nivel de los filamentos de las neuronas receptoras (Franks y col., 2005). Estos receptores de membrana, son proteínas ubicadas en los puntos de recepción de las neuronas que son más susceptibles al glutamato. De esa forma, los cambios en las redes de neuronas tienden a establecer rutas o caminos de baja resistencia a la actividad eléctrica para propiciar el cambio plástico asociado al aprendizaje.

De los hallazgos experimentales obtenidos mediante el marcaje con anticuerpos monoclonales o policlonales contra algunos neurotransmisores, se conoce que las neuronas mitrales y en penacho reciben las señales eléctricas aferentes de la mucosa olfativa a través de sus árboles dendríticos como elementos constitutivos de los glomérulos olfatorios, que las transmiten por sus axones siguiendo el camino del nervio olfatorio. Esta activación neuronal requiere de la participación del glutamato y/o del aspartato, de la dopamina y la sustancia P que generan potenciales de acción eferentes modulados en su descarga, por sistemas de retroalimentación que inhiben la descarga neuronal y en el que participan la acetilcolina, la serotonina y la noradrenalina provenientes de poblaciones neuronales ubicadas en los núcleos del rafe y en el *locus coeruleus* del tallo cerebral (Switzer y col., 1985; Berne y Levy, 1992). Las propias células mitrales y en penacho (macroneuronas) a través de sus axones activan a las neuronas pequeñas granulares para promover inhibición lateral en las mismas macroneuronas a nivel de sus árboles dendríticos (Halász y Shepherd, 1983).

Las neuronas pequeñas periglomerulares confinadas en la periferia de los glomérulos olfatorios utilizan para su funcionamiento acetilcolina, GABA, dopamina, encefalina y sustancia P (Switzer y col., 1985). Bajo su acción se genera inhibición de las neuronas mitrales y en penacho, y esta inhibición es revertida por la acción de las encefalinas liberadas en terminales axónicas provenientes de la amígdala medial y del hipocampo. En el BO de la rata los receptores μ se localizan en los glomérulos y en la parte profunda de la capa plexiforme externa, mientras que los receptores δ se ubican en la capa plexiforme interna.

Las neuronas granulares utilizan noradrenalina, GABA, dopamina, somatostatina, acetilcolina y encefalina, y bajo su actividad se inhibe la descarga de las células mitrales y en penacho suspendiéndose la descarga de potenciales de acción hacia las estructuras centrales del encéfalo.

El BO recibe varios sistemas aferentes de origen central que participan modificando su actividad neuronal, tal es el caso del contingente de fibras serotoninérgicas originadas en los núcleos del rafe que termina a nivel de los glomérulos olfatorios (Araneda y col., 1989). Durante el desarrollo postnatal de la rata el rango de sus arborizaciones excede al rango de crecimiento de los glomérulos y se distribuyen en los somas de las neuronas periglomerulares y dentro de la propia trama de dendritas y axones de los glomérulos olfatorios (Morilak y col., 1993). Un contingente de axones centrales adicionales con dirección al BO es el sistema noradrenérgico nacido en las neuronas del locus coeruleus que alcanza el BO vía del haz medio del cerebro anterior y que termina en la capa plexiforme interna y en la capa de células granulares (Halász, 1990). El desarrollo de este contingente de fibras correlaciona con la maduración de las influencias noradrenérgicas y su interacción entre las células granulares y mitrales. La destrucción bilateral del locus coeruleus disminuye el contenido de norepinefrina en el BO e impide el aprendizaje olfatorio asociativo en el recién nacido (Sullivan y col., 1993). Este tipo de conexiones del BO con aferentes del tallo cerebral es posible que opere ajustando funciones primitivas como el sueño, los estados de alerta, las respuestas asociadas al estrés, la discriminación a los olores y el aprendizaje de tipo asociativo entre otras.

La figura 3 resume la organización de la estructura neuronal básica del BO de la rata, y la ubicación tentativa de los distintos neurotransmisores que se liberan en el BO de ésta, para modular la transducción, el funcionamiento de los glomérulos y la descarga de los axones hacia los relevos centrales del canal sensorial olfatorio donde se llevan a cabo las sensaciones, percepciones y el carácter hedónico de los olores. Asimismo, los efectos centrales que modulan la actividad del corazón, la función respiratoria y la ingesta de alimento entre otras funciones.

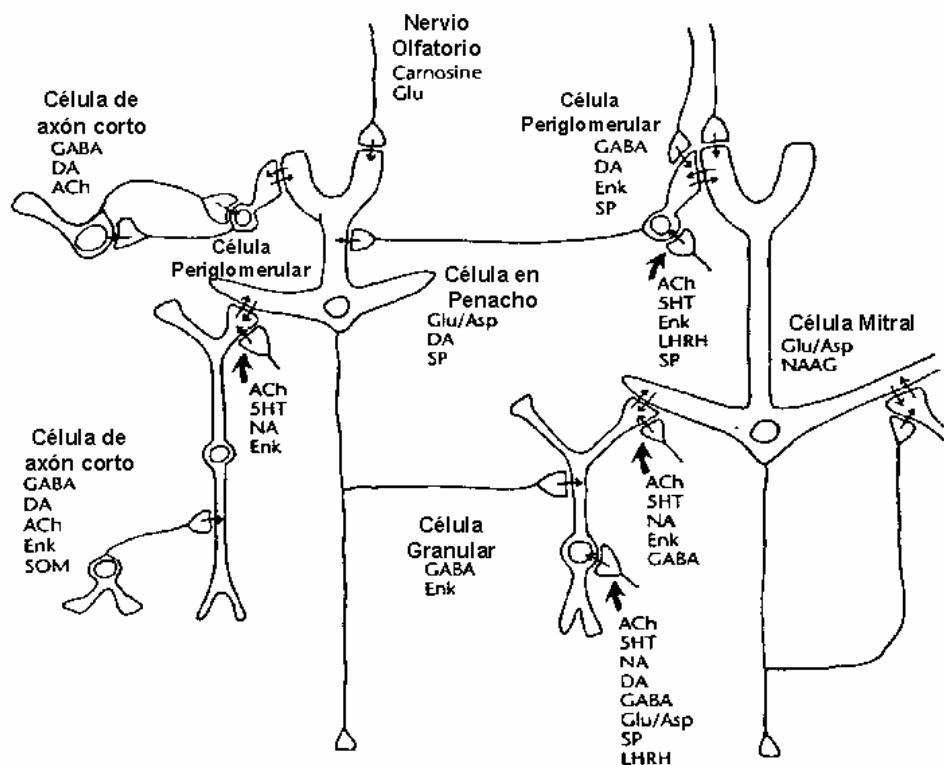


Fig. 3. Organización estructural básica del BO y los distintos neurotransmisores que se liberan. (Modificado de Halász y Shepherd, 1983)

2.5. Efectos de la restricción perinatal de alimento

La restricción perinatal de alimento es un factor nocivo medio ambiental no programado genéticamente, que con fundamento en numerosos estudios se conoce que deteriora severamente el desarrollo cerebral y su función (Morgane y col., 1992). Así, en el contexto de la vía olfatoria se conoce que la restricción de alimento empleando diversos modelos de desnutrición, reduce el número de las células granulares del BO y su conectividad con las células mitrales y en penacho, deteriorando el desarrollo de la inhibición olfatoria, juzgado a través de la prolongada duración de la postdescarga provocada por la estimulación eléctrica del nervio olfatorio (Math y Davrainville, 1980).

Debido a que en la rata, los paradigmas de desnutrición perinatal experimental utilizados se asocian en mayor o menor grado con un componente de privación sensorial, se ha reconocido que cuando se reduce o se incrementa el ingreso de señales olfatorias, se altera el crecimiento dendrítico de las neuronas mitrales, en penacho y granulares (Math y Davrainville, 1980; Panhuber y Laing, 1987). Paralelamente, se ha establecido que la restricción temprana de alimento reduce el número de ramas dendríticas y su extensión en las neuronas de relevos importantes de la vía olfatoria, que incluyen entre otras al núcleo central de la amígdala temporal y al hipocampo (Ahmed y col., 1987; Díaz-Cintra y col., 1991; Escobar y Salas, 1993; García-Ruíz y col., 1993).

En relación con el curso temporal que sigue la amplitud de los potenciales eléctricos provocados por estimulación acústica repetida, a intervalos regulares durante sesiones diarias subsecuentes (habituaación neuronal aferente), se ha observado que los infantes humanos desnutridos tienen un período de habituación más prolongado en relación a sus controles. Asimismo, cuando se cambian las características de frecuencia de los estímulos auditivos o se interrumpe su secuencia de presentación, se suspende la habituación pero se requiere nuevamente un número mayor de estímulos repetitivos para volver a reinstalarla (Lester y col., 1975). Estos hallazgos se han interpretado como ocasionados por el desarrollo deficiente de mecanismos inhibitorios centrales, que lentifican el proceso de modulación del ingreso de señales auditivas a lo largo de la vía estimulada (Lester y col., 1975).

2.6. Neurogénesis del substrato vagal de la rata

Durante el análisis de la conducta emergente temprana de las especies altriciales como el hombre y los roedores, el desarrollo ontogenético del substrato neuronal que regula una función particular, invariablemente tiene gran relevancia porque permite definir cuándo y con qué nivel de complejidad el desarrollo del substrato es suficiente o no para que el patrón de conducta del recién nacido se exprese y permita su adaptación hacia el medio ambiente. De este modo, es pertinente, para tomar con certidumbre como efector de la discriminación temprana a los olores a una víscera como el corazón,

revisar someramente la inervación parasimpática involucrada en su lentificación contráctil en respuesta a diferentes señales medio ambientales.

En este contexto, los primeros estudios realizados particularmente en el perro y en el gato, mostraron que la estimulación eléctrica del núcleo dorsal del nervio vago y el núcleo ambiguo de animales adultos, provocaba en la mayoría de los casos bradicardia, con muy pocos estudios describiendo la ausencia de efectos o resultados inconsistentes (Miller y Bowman, 1916; Borinson y Dojman, 1970; Weiss y Priola, 1972; Laborde, 1988). En paralelo con los estudios de estimulación eléctrica, los análisis histológicos de la región bulbopontina de animales como el conejo, el pichón, gato, perro y rata han revelado que el substrato neuronal principal relacionado directamente con la inhibición de la actividad del corazón es el núcleo motor dorsal del nervio vago y secundariamente el núcleo ambiguo (Nosaka y col., 1978). En un estudio detallado del tallo cerebral de la rata y estimulando eléctricamente el núcleo dorsal del nervio vago, se ha mostrado que la estimulación eléctrica de este nervio provoca consistentemente bradicardia. Asimismo, inyectando la enzima peroxidasa de rábano a las raíces cardíacas del mismo mostraron que efectivamente el núcleo motor dorsal del nervio vago es el sitio principal de ubicación de las neuronas moduladoras del corazón, seguido por el núcleo ambiguo, el núcleo del fascículo solitario, el núcleo comisural y el área postrema que inervan el corazón (Nosaka y col., 1979). Parece haber una conexión directa del núcleo motor dorsal del vago con el corazón, e indirectamente de los demás relevos mencionados con la víscera cardíaca.

Sin embargo, a pesar de este importante conocimiento realizado en animales adultos, para estudios llevados a cabo durante la etapa infantil, es necesario mencionar la neurogénesis del substrato neuronal que participa en los mecanismos de la modulación del corazón. Así, de los trabajos de Altman y Bayer (1979), utilizando la técnica de la timidina marcada con el isótopo radiactivo tritio (H3) que se incorpora al DNA conforme avanzan las divisiones celulares va agotando gradualmente la marca radiactiva que impacta las placas radiográficas e indica los calendarios de nacimientos neuronales (Figura 4).

Las neuronas que constituyen al núcleo motor dorsal del vago se forman en un 90% el día gestacional (G) 12, alrededor de un 8% en el día G13 y el 2% en los días

G15 y G16. El núcleo ambiguo inicia su neurogénesis con un 10% en el día G1-, en el G14 con un 28%, el pico máximo de neurogénesis con un 60% ocurre en el día G15 y con un 2% termina en el día G16. El núcleo solitario inicia su formación de neuronas con un 5% en el día G12, sigue con un 60% en el día G13, continúa con un 25% en el día G14 y termina con un 10% en el día G15. Finalmente, el área postrema ubicada en la parte baja del piso del IV ventrículo inicia su neurogénesis en el día G14 con un 25%, seguida del 15% en el día G15 y con un 16% en el día G16. El resto (46%) se extiende hasta antes del parto (ver Figura 3). Así que resumiendo, las macroneuronas de los cúmulos de neuronas que participan en la modulación de la actividad del corazón están ya organizadas y son eficientes al momento del nacimiento. Sin embargo, las neuronas pequeñas o granulares de distintas estaciones de relevo en las vías sensoriales y centrales, aún están incompletas al nacimiento (40%) y terminarán su desarrollo al nivel del animal adulto hasta alrededor de la tercera semana de la vida postnatal (Mair y col., 1982; Frazier –Cierpial y Brunjes, 1989). Por lo tanto, es de esperarse que el cambio funcional del corazón de bradicardia a taquicardia durante los primeros días de la vida postnatal, dependa en gran medida de la ampliación y complejidad de los circuitos neuronales participantes en cada función durante esta etapa del desarrollo, para adaptarse a las demandas establecidas por el medio interno y externo del organismo.

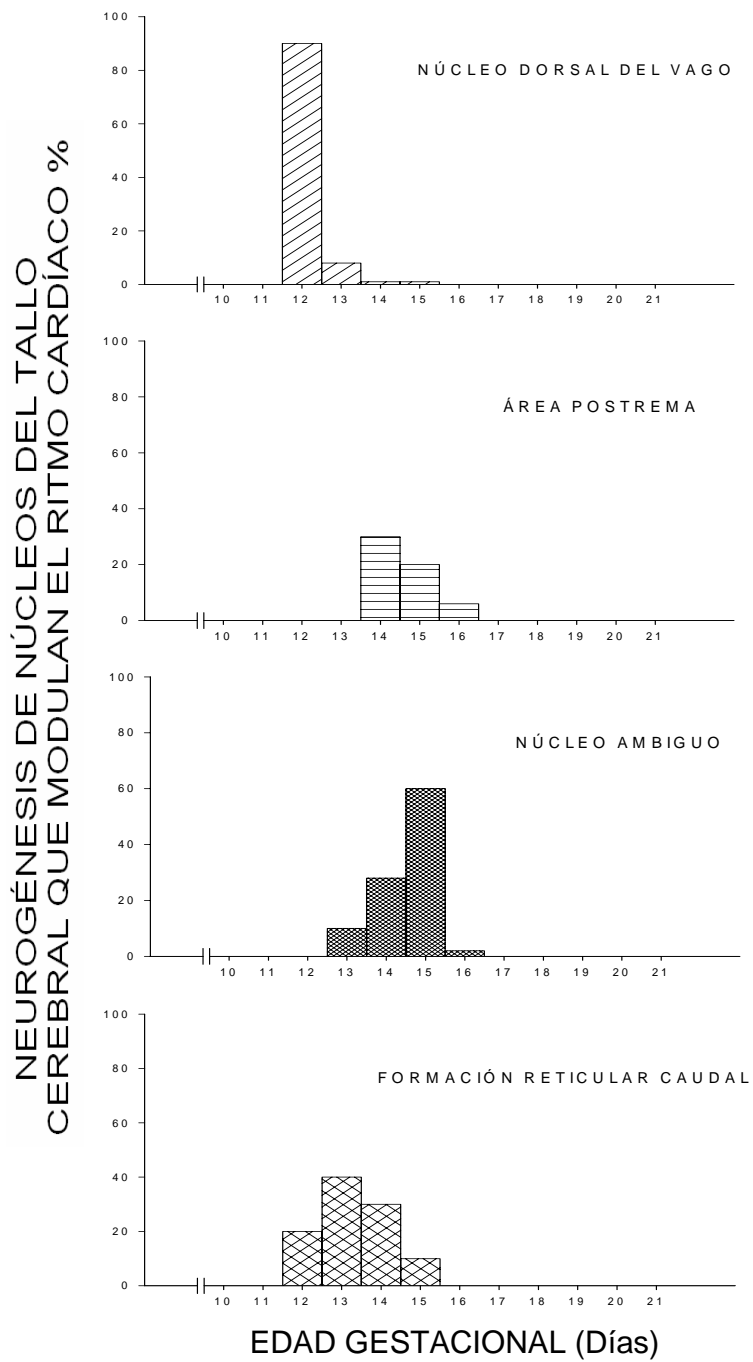


Fig. 4. Neurogénesis en el tallo cerebral (Modificado de Nosaka y col., 1979; Altman y Bayer, 1980, 1995).

2.7. Estimulación sensorial temprana

De estudios previos se sabe que la estimulación sensorial temprana aplicada diariamente y por períodos breves a los recién nacidos bajo la forma de masaje, frotamiento corporal suave, cambios posturales o mediante la exposición a un ambiente enriquecido en estímulos sensoriales, es capaz de promover el desarrollo neuronal en diferentes partes del SNC. Así, puede incrementarse el grosor del área visual de la corteza cerebral, su contenido en acetilcolina y su enzima degradante la acetilcolinesterasa (Rosenzweig y col., 1969). También la experiencia sensorial temprana, puede incrementar el número de ramas y de espinas dendríticas a nivel de las neuronas piramidales grandes de la corteza cerebral (Schapiro y Vukovich, 1970; Spinelli y col., 1980; Sirevaag y Greenough, 1988; Rosenzweig y Bennett, 1996). En paralelo al incremento en el desarrollo neuronal, la generación de la actividad eléctrica provocada por estímulos visuales se ve incrementada y el proceso de la habituación por la aplicación de estímulos repetitivos se instala con mayor rapidez en los animales previamente estimulados (Leah y col., 1985). La aplicación de estimulación sensorial temprana en el neonato restringido de alimento a largo plazo puede ayudar a revertir las alteraciones de la capacidad exploratoria, la conducta maternal y la respuesta al estrés durante la adultez (Levitsky y Barnes, 1972; Salas y col., 1984; Escobar y Salas, 1987; Francis y col., 1996; Regalado y col., 1999; Meaney y col., 2000).

2.8. Inervación autonómica del corazón

El ritmo y la fuerza de contracción del corazón están regulados por impulsos nerviosos llegados a esta víscera vía del sistema nervioso autónomo. Este sistema está constituido por un conjunto de estructuras nerviosas ubicadas en el tallo cerebral y la médula espinal cuyas acciones son dirigidas hacia el medio interno a través de la división simpática y parasimpática del mismo (Purves y col., 2001). Con respecto al aparato cardiovascular, las fibras parasimpáticas llegan al corazón por el nervio vago,

en tanto que las fibras simpáticas derivan de la zona del ganglio estrellado proyectándose al miocardio por los nervios cardíacos superiores (Frendson y Spurgeon, 1995).

El estímulo del nervio vago inhibe en distintos grados el funcionamiento del corazón, al reducir la intensidad y la frecuencia de su contracción (efecto inotrópico negativo) y el ritmo de conducción de los impulsos dentro del sistema excito-conductor del corazón. Las descargas de impulsos nerviosos del sistema simpático sobre el corazón, incrementan la fuerza de contracción (efecto inotrópico positivo) y el ritmo cardíaco así como promueven la vasodilatación coronaria y la conducción de impulsos nerviosos.

La frecuencia natural del ritmo cardíaco tiende a ser mas rápida en animales pequeños, y proporcionalmente va disminuyendo según aumenta la talla corporal. El corazón tiene una regulación nerviosa intrínseca automática por medio del sistema excito-conductor del mismo constituido por los nodos sino-auricular (marcapaso) y auriculo-ventricular, el haz de His y sus ramas y la red de Purkinje. El nervio vago libera acetilcolina en sus terminales próximas al marcapaso del corazón, inhibiendo la actividad cardíaca (bradicardia). Por el contrario, el sistema simpático estimula la función del corazón liberando en sus terminales el neurotransmisor noradrenalina (Frendson y Spurgeon, 1995).

Las aferencias cardíacas del sistema parasimpático incluyen mecanorreceptores y quimiorreceptores ubicados en aurículas y ventrículos, vasos coronarios y pericardio. Los barorreceptores y quimiorreceptores ubicados en el arco aórtico viajan centralmente vía del nervio vago (nervio de Cyon). Los barorreceptores del seno carotideo y quimiorreceptores del cuerpo carotideo viajan a través del nervio glossofaríngeo (nervio de Hering). Los axones de estos nervios hacen sinapsis en los ganglios nodoso y petroso respectivamente, ambos ubicados en el agujero yugular, la segunda neurona de esta vía hace sinapsis en interneuronas especializadas en la porción caudal del núcleo del tracto solitario ubicado en el bulbo raquídeo (Zhang y Ashwell, 2001).

Las eferencias cardíacas del sistema parasimpático se originan en las neuronas presinápticas de los núcleos ambiguo y dorsal del vago, siendo el segundo el principal sistema eferente al corazón. Los impulsos nerviosos generados en esos núcleos por

señales medio ambientales, se transmiten vía de ambos nervios vagos hasta el marcapaso del corazón y el nodo A-V, donde se ubican las neuronas postsinápticas, cuyas descargas se propagan por el haz de His, sus ramas y la red de Purkinje iniciando la despolarización del miocardio del vértice a la base y del endocardio al pericardio de los ventrículos una vez que terminó la despolarización de las aurículas.

La descarga aferente sensorial proveniente de los diferentes sensores del organismo puede modificar la actividad del corazón, aunque se sabe que hay nervios específicos que forman el lado aferente de los reflejos cardíacos, los cuales funcionan según la ley de Mare que señala que “la frecuencia cardíaca tiene valor inversamente proporcional al de la tensión arterial”, lo que significa que al aumentar la presión, se hace más lenta la frecuencia y si la presión baja, el ritmo cardíaco entonces se acelera” (Chusid y McDonald, 1958; Friendson y Spurgeon, 1995). De esta manera, tanto la bradicardia refleja como la vasodilatación periférica ocurren si los nervios aferentes de los receptores del cayado de la aorta y del seno carotídeo son estimulados por la hipertensión, la cual distiende la aorta y el seno carotídeo activando a los receptores correspondientes. El nervio aórtico es una rama del vago también conocido como nervio depresor cardíaco, en tanto que el nervio del seno carotídeo es un rama pequeña del glosofaríngeo que se arboriza en dicho seno, este seno carotídeo es una dilatación de la porción terminal de la carótida primitiva ubicada en el origen de las arterias carótidas externa e interna (Friendson y Spurgeon, 1995).

En condiciones fisiológicas, la ejecución de cualquier actividad de movimiento, cambio postural o activación de un canal sensorial, provoca una demanda de oxígeno y nutrimentos por parte de los tejidos del organismo involucrados en esa acción. Concomitantemente con esas acciones y de manera automática, hay un ajuste cardiovascular tal que la frecuencia cardíaca se acelera, incrementándose también la presión arterial y el gasto cardíaco (Berne y Levy, 1992; Ganong, 1998). Estos ajustes en el sistema cardiovascular tienen como propósito el satisfacer las demandas de oxígeno y nutrimentos de los tejidos en acción, de tal suerte que se mantengan las condiciones de homeostasis del medio interno y el funcionamiento celular de aparatos y sistemas. Sin embargo, durante los primeros días después del nacimiento estos ajustes

no están bien establecidos debido fundamentalmente a la notable inmadurez del sistema nervioso autónomo que aún no alcanza su plena maduración (Adolph, 1957).

Por estudios realizados en los últimos años, se sabe que esta circunstancia particular de inmadurez del recién nacido altricial se asocia a respuestas de adaptación de la función cardiovascular opuestas a las del animal maduro y o adulto. En efecto, se sabe que en la rata recién nacida hasta aproximadamente las dos primeras semanas de edad, la exposición a estímulos sensoriales olfatorios provoca de manera consistente un efecto de bradicardia. Por otro lado, la aplicación repetida a intervalos regulares de estímulos olfatorios de un mismo tipo, desencadena una reducción gradual de la bradicardia inicial que va progresivamente reduciéndose en lo que se considera equivalente al fenómeno de la habituación (Hofer, 1978; Best y col., 2005) (ver Fig. 5). De esta forma el proceso de la habituación al olor en la rata recién nacida cuantificado a través de la bradicardia, pudiera utilizarse como un índice del aprendizaje tanto en animales normales como en los restringidos tempranamente de alimento durante el período perinatal.

En la división parasimpático, el sistema nervioso autónomo es conocido por producir desaceleración cardíaca, se sabe que esta respuesta contiene dos componentes con dos acciones similares. La mayoría de las células ganglionares están localizadas en el nodo sino-auricular, y en el tejido de conducción aurículo-ventricular. Estudios experimentales han mostrado que el nervio vago derecho inerva primordialmente el nodo sino-auricular, mientras que el nervio vago izquierdo inerva principalmente al tejido de conducción aurículo-ventricular, la estimulación intensa del vago derecho causa bradicardia o paro cardíaco, si la estimulación es de muy alta intensidad. Por el otro lado, la estimulación del vago izquierdo ejerce su influencia moduladora en el tejido conductor para producir varios grados de bloqueo del nodo aurículo-ventricular. La división simpática nerviosa al corazón está constituida por los nervios cardioaceleradores, dado que la estimulación de fibras de nervios postganglionares adrenérgicos al corazón producen un incremento en la frecuencia cardíaca y la intensidad de la contractilidad miocárdica. Así como con el vago, las fibras de ambos lados del sistema simpático tienden a ejercer efectos diferenciales cuando se les estimula por separado. La estimulación del ganglio estrellado izquierdo puede

causar un pronunciado incremento en la fuerza de la contractilidad miocárdica con un cambio mínimo en la frecuencia cardíaca (Hockman, 1987).

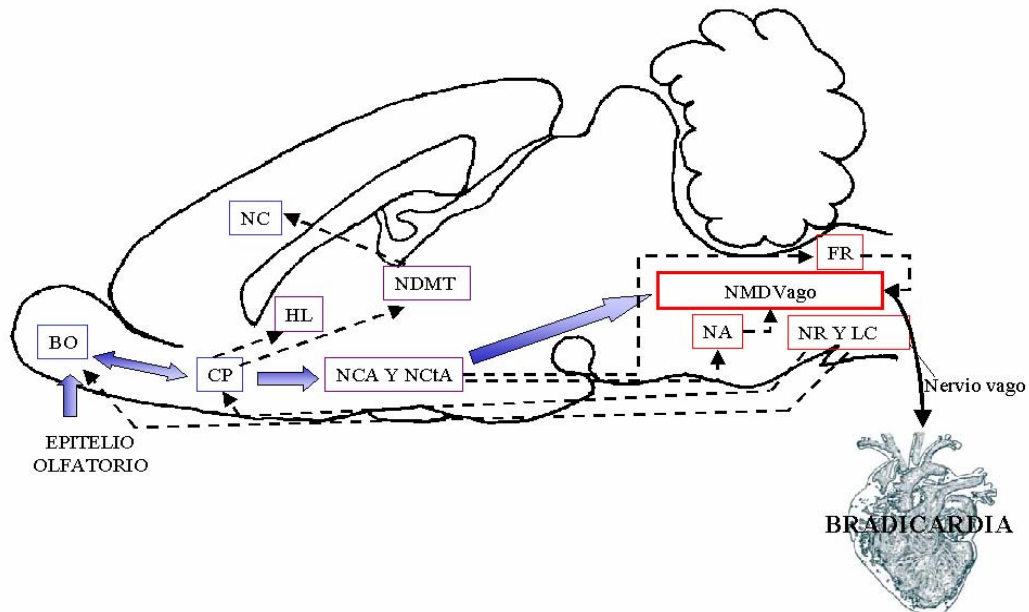


Fig. 5. Posible vía olfatoria (líneas gruesas continuas) involucrada en la respuesta de bradicardia (Best y col., 2005). Otras estructuras aferentes al núcleo motor dorsal del vago (líneas discontinuas) (Nosaka y col., 1979; Paxinos, 2004). BO, bulbo olfatorio; CP, corteza Piriforme; NCA, Núcleo cortical de la amígdala; NctA, Núcleo central de la amígdala; NDMT, Núcleo dorsal medial del tálamo; HL, Hipotálamo lateral; NC, neocorteza; FR, Formación reticular; NMDVago, Núcleo Motor dorsal del vago; NR, Núcleo del Rafe; LC, Locus Coeruleus.

2.9. Características de la habituación

Uno de los factores más importantes que modifican el comportamiento en humanos es el aprendizaje. Aprendizaje es la adquisición de conocimiento acerca del mundo, y la memoria es la retención o almacenamiento de ese conocimiento.

Se han descubierto dos clases principales de aprendizaje; aprendizaje asociativo y no asociativo. En el aprendizaje no asociativo el organismo es expuesto una vez o repetidas veces a una sola clase de estímulo e incluye la habituación y la sensibilización. Este procedimiento provee una oportunidad al organismo de aprender acerca de las propiedades de ese estímulo. En cambio en el aprendizaje asociativo, el organismo aprende acerca de la relación de un estímulo con otro (condicionamiento clásico) o acerca de la relación de un estímulo con su propio comportamiento (condicionamiento operante).

El más común de los aprendizajes no asociativos es la habituación. La habituación, primeramente estudiada por el biólogo ruso Ivan Pavlov (1951), es un decremento en la respuesta refleja manifestada de manera conductual a un estímulo repetido. La deshabituación puede ocurrir cuando se presenta otro estímulo que interfiera en la presentación repetida del estímulo constantemente repetitivo, o que el estímulo primario cambie (Hockman, 1987). Así también es definida como “el decremento en la respuesta seguida de una estimulación repetida con el mismo estímulo” (Thompson y Spencer, 1966), siendo considerada como una forma básica del aprendizaje, dado que requiere de un sistema nervioso central intacto (Morokuma, y col., 2004).

De acuerdo con Thompson y Spencer (1966) y Prado-Alcalá (1991), el fenómeno de la habituación considerado como el decremento en la respuesta ante la presentación repetida de un estímulo que carece de contenido emocional para el individuo, presenta varias características: 1) La estimulación repetida produce un decremento en la respuesta; 2) Ocurre una recuperación de la respuesta cuando cesa la estimulación; 3) Con series repetidas de estímulos se produce una mayor habituación; 4) La habituación es inversamente proporcional a la intensidad de la estimulación; 5) La habituación es directamente proporcional a la frecuencia de la estimulación; 6) La recuperación de la respuesta puede retardarse aplicando estímulos adicionales después de que la respuesta ha desaparecido, y 7) La presentación de otro estímulo (generalmente de mayor intensidad) produce la reaparición de la respuesta (“deshabituación”).

Este mecanismo de deshabituación o también llamado “habituación cruzada”, se ha utilizado como un procedimiento para conocer la capacidad de discriminación ante dos estímulos diferentes. La discriminación se ha descrito como la capacidad de responder ante un estímulo después de haber sido extinguida una respuesta previa a un estímulo diferente, ya sea en cuanto al tipo de estímulo o en magnitud del mismo (Prado-Alcalá, 1991). Sin embargo, Kuhlman y col., (1988) ha definido la habituación como “la cesación de todos los componentes de una reacción que inició, excepto en el parpadeo, sobre dos estímulos secuenciales” y encontró que la media del número de estímulos requeridos para la habituación se decrementa de acuerdo con el avance de las etapas de maduración (gestacionales) (citado en Morokuma y col., 2004). La

habitación como una forma de aprendizaje no asociativo, ha sido considerada como una función cognitiva fundamental que subyace a habilidades cognitivas futuras, tales como procesos de discriminación perceptual.

La estimulación continua por medio de un olor puede producir un proceso de habitación, observándose una clara disminución de la respuesta. La habitación se ha descrito como un proceso diferenciable de la capacidad de adaptación de las respuestas en los receptores, dado que la habitación es considerada como un proceso central que involucra respuestas de estructuras superiores cerebrales. Sin embargo, la adaptación o desensibilización de los receptores olfatorios es descrita como la pérdida de la habilidad de responder rápidamente ante una estimulación continua medida directamente a nivel de la actividad de los receptores sensoriales (Kratskin, 1995). Como se mencionó anteriormente la habitación es el decremento de la respuesta ante una estimulación repetitiva y ésta puede ser medida a través de parámetros conductuales como son la emisión de respuestas autonómicas (electrocardiograma, electromiograma, respuestas psicogalvánicas, contracción pupilar y diversos reflejos). La fatiga de neurotransmisores o fatiga del efector, ha sido definida como el decremento en la respuesta localizada a nivel de un neuroefector o que afecten procesos efectores. Se ha discutido que la fatiga, siendo también un proceso central, no puede ser interrumpida por un proceso de deshabitación, no existiría una recuperación en la respuesta al cambio de estímulo si existiera una fatiga en los efectores (Thompson y Spencer, 1966).

Se asume que fibras centrifugas de la formación reticular y estructuras relacionadas (núcleos del rafe, hipotálamo lateral, hipocampo, etc.) cursan con varios receptores sensoriales periféricos o núcleos que actúan para inhibir la respuesta en la periferia, reduciendo la actividad en los sistemas sensoriales. Por lo tanto, esta inhibición se dice que se desarrolla durante la estimulación repetitiva y resulta en la evocación de la respuesta de habitación (Thompson y Spencer, 1966).

4. HIPÓTESIS

Tomando en consideración lo anterior, en el presente estudio se plantea lo siguiente:

1. La restricción prenatal y postnatal de alimento en la rata infante, disminuirá la capacidad de discriminación olfatoria.

2. La disminución de la capacidad de discriminación olfatoria en la rata desnutrida pre y postnatalmente podrá ser revertida mediante la estimulación sensorial temprana a base de masaje corporal.

5. OBJETIVOS

5.1. OBJETIVO GENERAL

Generar conocimiento acerca del funcionamiento de la capacidad discriminatoria de las vías sensoriales en la rata desnutrida durante la vida temprana.

5.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Caracterizar la capacidad de discriminación olfatoria de la rata infante desnutrida durante los períodos prenatal y postnatal mediante la respuesta de habituación de la frecuencia cardíaca y deshabitación ante dos diferentes olores.

2. Revertir las posibles deficiencias en la capacidad de discriminación olfatoria, de la rata infante desnutrida pre y postnatalmente, mediante la aplicación de estimulación sensorial temprana.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

Para el presente estudio se utilizaron crías recién nacidas de ratas de la variedad Wistar (*Rattus norvegicus*) de ambos sexos entre el día 1 al 12 de edad, nacidas en el bioterio del Instituto de Neurobiología de la UNAM, Campus Juriquilla. Las crías y sus madres permanecieron bajo condiciones de 12 h de luz (08:00 - 20:00 h) por 12 h de oscuridad, con temperatura controlada a $23\pm 2^{\circ}\text{C}$, humedad del 40-50%, con libre acceso al agua y al alimento (chow de Purina) según el grupo experimental.

El protocolo y las maniobras experimentales que se utilizaron en el estudio, fueron aprobados por el Comité de Bioética del Instituto de Neurobiología de la UNAM. Asimismo, están acordes con las normas internacionales establecidas para el manejo y uso de animales de experimentación (NIH y la National Academy of Science, 2003).

6.1. Animales

a) Grupo Control sin Estimulación (GC)

Con el propósito de obtener crías ($n=24$) recién nacidas del grupo control, se pusieron en cruce 3 ratas hembra vírgenes adultas (200-300 gr) por caja, con 2 machos adultos normales en cajas de plástico transparente (50 X 40 X 20 cm) con agua y alimento (chow de Purina) *ad libitum*. Diariamente por las mañanas, (09:00 h) se realizaron frotis vaginales con el propósito de detectar mediante microscopía de luz, la presencia de espermatozoides, asignándose ese día como día 0 de gestación. Tres días antes del parto las hembras gestantes se colocaron en cajas individuales de maternidad, de plástico transparente (45 X 30 X 20 cm), con aserrín en el piso (3 cm de altura), agua y alimento (chow de Purina) *ad libitum*. Con el propósito de verificar la fecha del parto se revisaron diariamente las cajas de maternidad por la mañana (09:00 h) y por la noche (20:00 h). En caso de encontrarse crías con la madre o que ésta estuviese pariendo, se anotó esa fecha como día 0 de edad. Transcurridas 24 h

después del parto, se mezclaron las crías provenientes de varias madres que hubiesen parido el mismo día, ajustándose cada camada a un total de 8 crías por madre (4 hembras y 4 machos). El procedimiento de redistribución de crías a cada una de las madres, tuvo como propósito el minimizar la participación de posibles factores genéticos y diferencias biológicas entre las camadas que pudieran influir en los resultados del estudio (Diagramas 1 y 2).

b) Grupo Desnutrido (GD)

El número total de crías desnutridas ($n=24$) que se utilizaron en el estudio, provinieron de por lo menos 3 diferentes camadas. Una semana antes de que las hembras de este grupo se pusieran en cruce con 2 machos normales de edad similar, se les mantuvo con el 60% (9 gm) de la dieta (chow de Purina) que ingieren normalmente cada día. Las ratas embarazadas se alimentaron del día G1 al G12 con el 50% (7.5 gm) de la dieta, de G13 al G18 con el 60% (9 gm) y de G19 al G21 con el 100% (15 gm) de la misma dieta. Este período de desnutrición prenatal se escogió, debido a que las neuronas de las estructuras del SNC que regulan la sensibilidad olfatoria y la modulación de la contractilidad del corazón, tienen su formación de neuronas grandes (macroneurogénesis) y el inicio de la generación de neuronas pequeñas (microneurogénesis) durante la etapa prenatal (Altman, 1969; Altman y Bayer, 1980; Altman y Bayer, 1995). A partir del nacimiento, los recién nacidos desnutridos continuaron su restricción de alimento (días 1-12 postparto) al ser alimentados por 2 madres nodrizas, estando una de ellas ligada de sus conductos galactóforos. De esta manera, las crías desnutridas succionaron libremente (12 h) al permanecer con la madre normal, y siguieron desnutriéndose al succionar (12 h) a la madre ligada de sus conductos galactóforos. Este segundo período de desnutrición, fue concurrente con la microneurogénesis (células granulares) que se extiende desde los últimos días de la gestación hasta los 45 días postparto (Altman, 1969; Ahmed y col., 1987). En este paradigma de desnutrición postnatal se atenúan los efectos de la privación sensorial de las crías, al permanecer en constante interacción con la madre, los hermanos y el ambiente del nido (Lynch, 1976).

c) Grupo Control Estimulado (GCE)

Este grupo de animales (n=24), estuvo integrado por las crías recién nacidas de madres que fueron alimentadas a libre demanda, bajo las mismas condiciones experimentales de los sujetos del grupo GC, pero que además recibieron diariamente estimulación sensorial temprana. Los recién nacidos de este grupo provinieron de un total de 3 diferentes camadas.

d) Grupo Desnutrido Estimulado (GDE)

Los sujetos que formaron este grupo (n=24), fueron crías que se desnutrieron durante el período prenatal y neonatal como los animales del GD, pero que también recibieron estimulación sensorial temprana como las crías del grupo GCE. Las crías de este grupo se obtuvieron de un total de 3 diferentes camadas.

6.2. Desarrollo físico de los animales

Con el propósito de evaluar los efectos de los paradigmas experimentales sobre el desarrollo físico de los animales, se tomó el peso corporal en los días 4, 7 y 12 de edad. Asimismo, con el propósito de medir la apertura de los meatos auditivos externos y de los párpados, las mediciones se realizaron en dos grupos adicionales GC y GD ya que las mediciones se extendieron más allá del período de análisis de la habituación, estos datos se tomaron entre los días 8 al 16 de edad. Para este fin, se utilizó una escala de valores relativos, teniéndose un valor de 1, cuando estuvieron cerrados; 2, cuando estuvieron abiertos al 50% y 3, cuando se abrieron al 100%. El peso corporal y la apertura de meatos auditivos y párpados se determinaron con la finalidad de corroborar la efectividad del paradigma de desnutrición y del grado de maduración que las crías fueron obteniendo.

6.3. Estimulación sensorial

Con el propósito de revertir las posibles alteraciones en la capacidad de discriminación guiada por el olfato de los animales sometidos a la restricción prenatal y neonatal de alimento, se aplicó a las crías recién nacidas controles (GCE) y desnutridas (GDE) estimulación sensorial temprana.

La estimulación sensorial consistió en aplicar diariamente (10:00-12:00h) masaje corporal suave y continuo a las crías durante 5 min en una caja de plástico con aserrín (20 X 20 X 10 cm) del día 1 al 12 de edad (para todos los grupos estimulados), bajo el calor de una lámpara con luz roja (75 W) (Fig. 6). Así, durante el masaje, las crías recibieron estimulación táctil, de presión suave, térmica, auditiva, vestibular y olfatoria. El procedimiento usado para dar estimulación sensorial, se llevó a cabo dentro de un cuarto anexo al área principal del laboratorio (2.10 X 2.20 X 2.20 Mt) que amortigua el sonido, el cual estuvo a 26°C e iluminado con luz roja (75 W).



Fig. 6. Estimulación sensorial mediante la aplicación de masaje diario.

6.4. Procedimiento Conductual

Dispositivo de Registro

El dispositivo utilizado para registrar la discriminación olfatoria, constó de tres cajas de plástico transparente (14.5 X 14.5 X 8.0 cm) con volumen de 3.5 Lt cada una, comunicadas entre sí por medio de tubos de plástico (0.5 cm de diámetro), conectados a una llave de 3 vías que permitió cambiar la dirección del flujo de aire (2 Lt/seg) generado por una bomba de respiración artificial para roedores marca Palmer (Fig. 7).

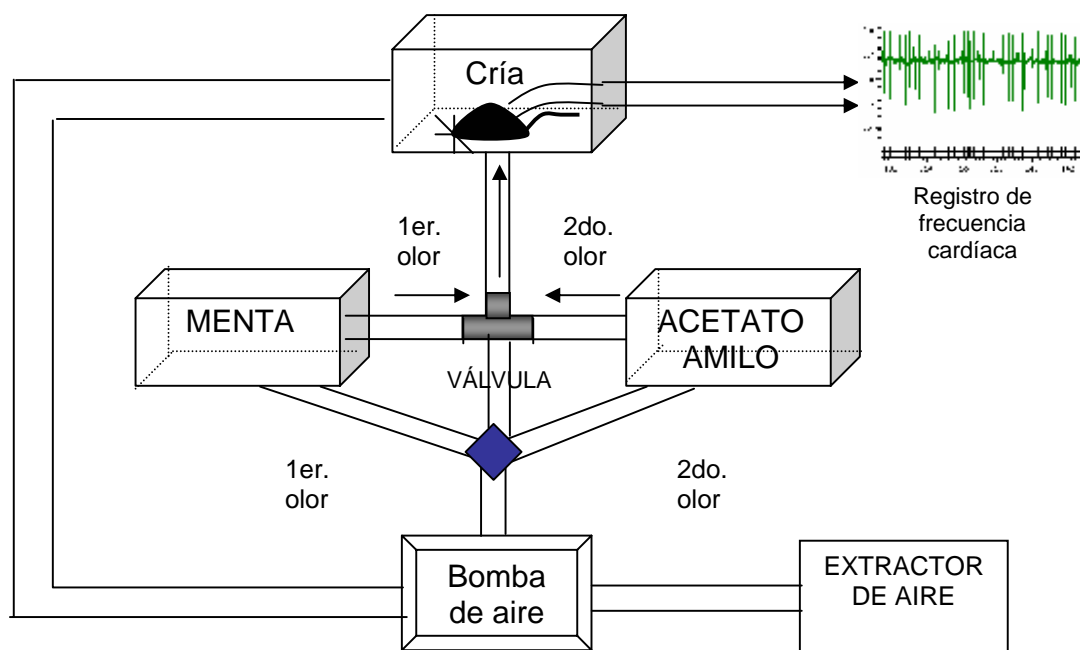


Fig. 7. Dispositivo de registro para la discriminación olfatoria en crías recién nacidas. Cría conectada a un polígrafo mediante la colocación de electrodos para registrar el electrocardiograma.

En una de las cajas, se colocó a una cría recién nacida y dentro de cada una de las otras dos, se introdujo una caja de Petri de vidrio de 5 cm de diámetro, conteniendo 1 ml de una solución volátil con olor diferente (1:10 diluido en glicina, 2 min antes de la prueba, conteniendo aproximadamente 200 ppm de cada olor). A las crías se les colocaron dos electrodos de cobre humedecidos con pasta electrolítica y fijados con cinta adhesiva a la superficie de la piel del tórax de ambos flancos, estos electrodos se conectaron a un polígrafo marca Grass modelo 79-C desde donde se enviaba la señal hacia un osciloscopio marca Tektronix, modelo 502-A, para ser grabada con una grabadora marca Vetter Digital modelo 4000^a. Posteriormente se enviaron las señales a un discriminador de ventana marca WPI modelo 121, y así, mediante un conversor analógico-digital marca CED Micro 1401 se procesaron y analizaron mediante un software Spike 4. Este sistema de registro permitió obtener la frecuencia cardíaca y evaluar sus cambios en respuesta a la exposición repetida de aire conteniendo un olor determinado (acetato de amilo o menta) con el cual se habituó (OH) a cada sujeto. Los estímulos fueron presentados en exposiciones repetidas (sesiones) de 20 soplos por min., con duración de 20 seg, a intervalos sin olor de 100 seg, repitiendo 15 veces cada ciclo con el primer olor. Al concluir la estimulación olfatoria repetitiva con un olor

particular, se cerró la vía de paso del aire, y se abrió la del conducto que llevó el flujo de aire con el segundo olor (OC) iniciando el nuevo ciclo de estimulación olfatoria (Fig. 8).

La estimulación olfatoria para provocar la habituación en el latido cardíaco de los sujetos experimentales, se realizó utilizando acetato de amilo (200 ppm, de un total de 1ml (Sigma), diluido en 9 ml de glicina y extracto de menta, 1 ml (Laboratorios Just), diluido en 9 ml de glicina, administrado en forma aleatoria y reciclando el aire durante los intervalos inter-estímulo mediante la bomba de aire. En todos los casos, la caja utilizada para un olor particular fue siempre la misma cambiando solamente la secuencia para aparear los distintos olores.

Terminada cada prueba, se lavó la caja que contuvo a la cría, con jabón neutro y se secó el recipiente conectándose un ventilador que removió los remanentes ambientales de los distintos olores utilizados en la prueba conductual. En todos los casos las pruebas de discriminación olfatoria guiadas por el olfato se realizaron (15:00-18:00 h) dentro de una cámara de madera (90 X 70 X 60 cm) iluminada con una lámpara colocada a 50 cm de altura con luz roja (75 W), mantenida entre 26-27° C y colocada dentro de una cámara amortiguada al sonido (3.00 X 3.00 X 2.10 Mt) anexa al área principal del laboratorio. Con el propósito de motivar a las crías recién nacidas para la discriminación olfatoria, se las separó de la madre y del nido 1 h antes de iniciar el experimento dentro de una incubadora mantenida a 28° C. Después de la colocación de electrodos se dio un tiempo de 15 min de habituación en la cámara de registro y estabilización de la frecuencia cardíaca normal.

Las pruebas de discriminación olfatoria de las crías, se llevaron a cabo los días 4, 7 y 12 postparto empleando 4 grupos independientes de animales para cada edad. En todos los casos, se tomaron 2 crías de cada camada (1 hembra y 1 macho) de un total de 8 camadas (n= 8 crías por camada). De esta manera se, tuvo un total de 8 crías por grupo y 8 crías por edad (4 hembras y 4 machos) provenientes de 8 camadas diferentes, teniéndose un gran total de 32 crías por grupo y 24 crías por edad en las pruebas conductuales.

Diagrama 1: Material y Métodos
Condición Experimental: Controles

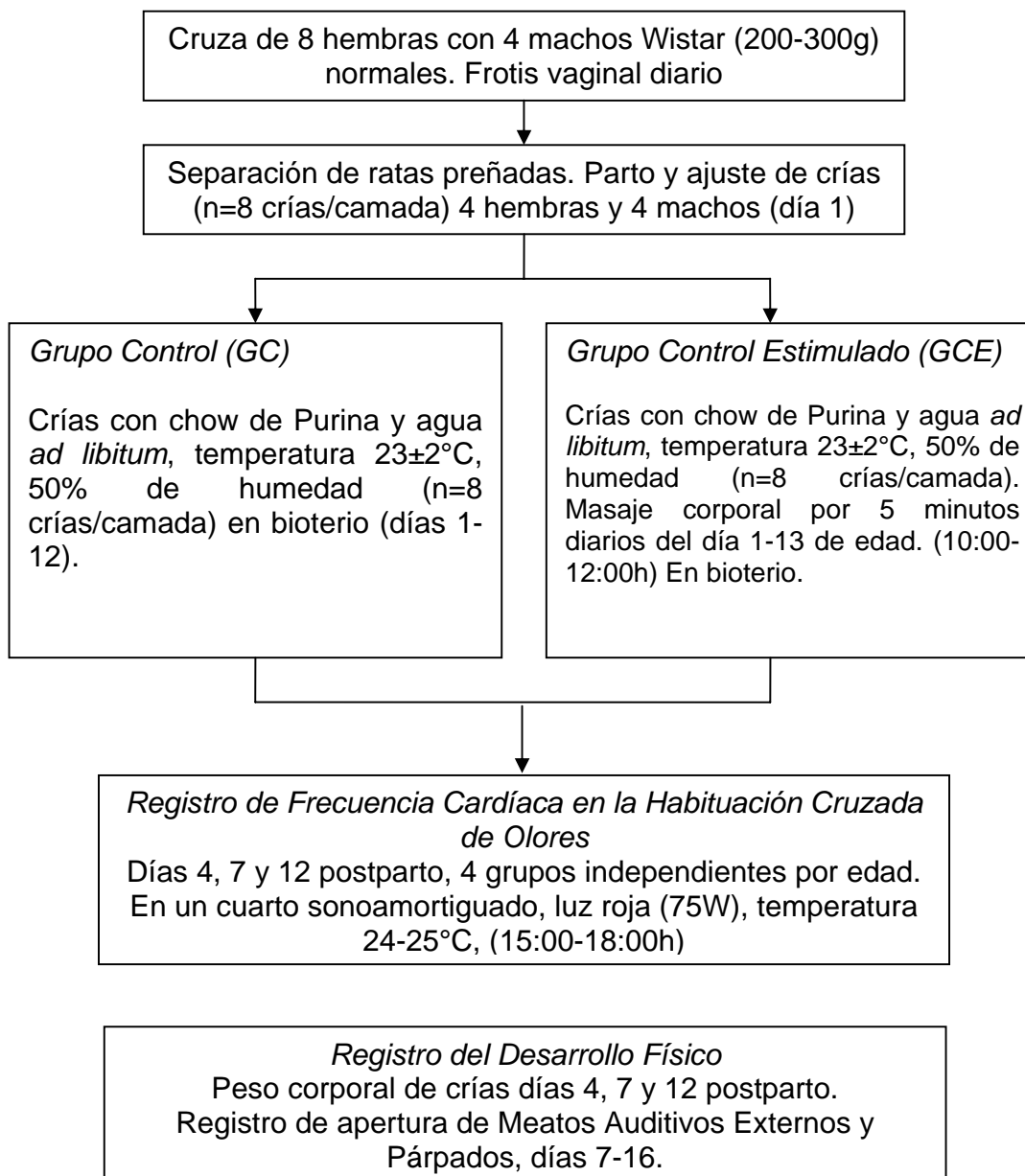
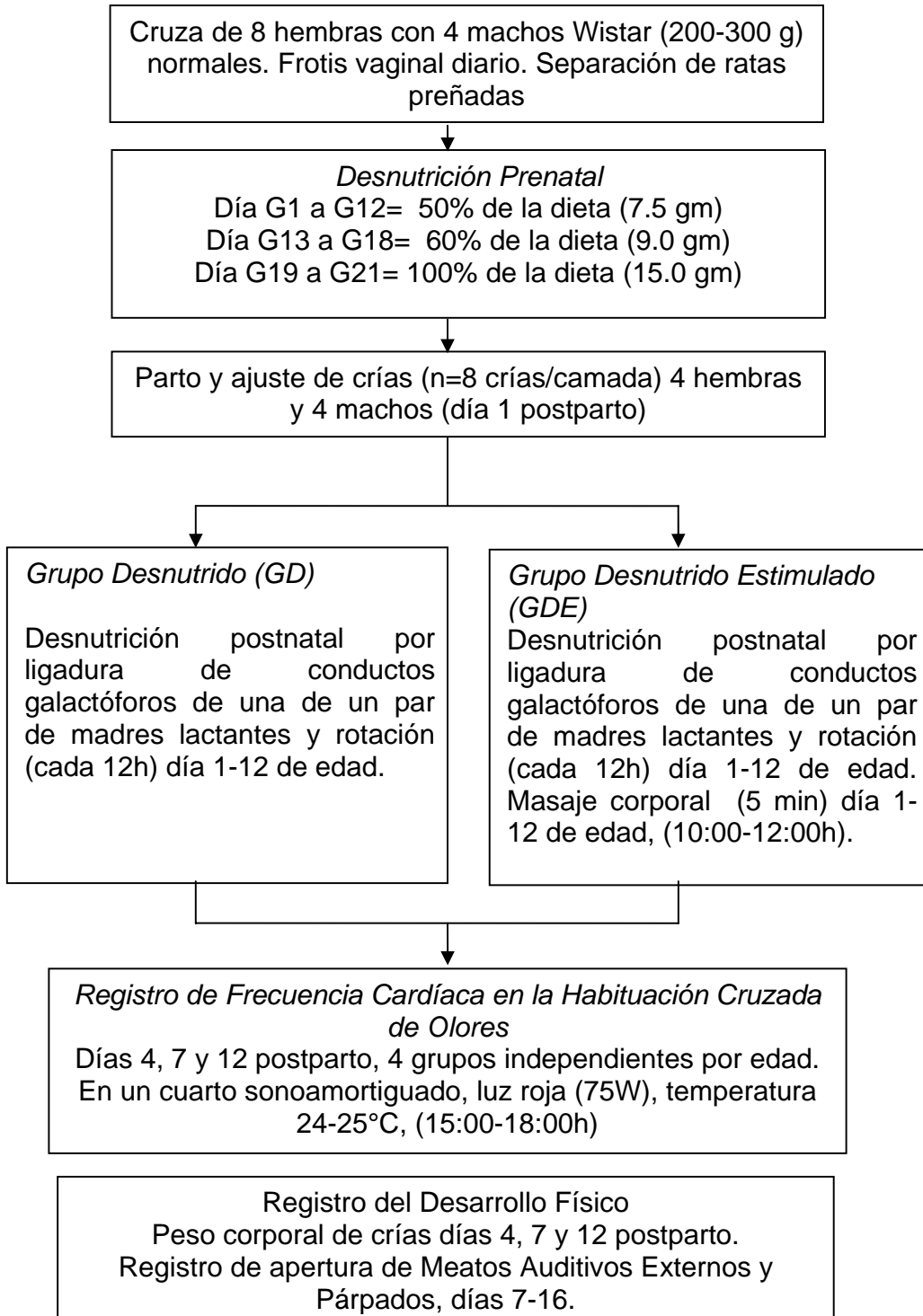


Diagrama 2: Material y Métodos
Condición Experimental: Desnutridos



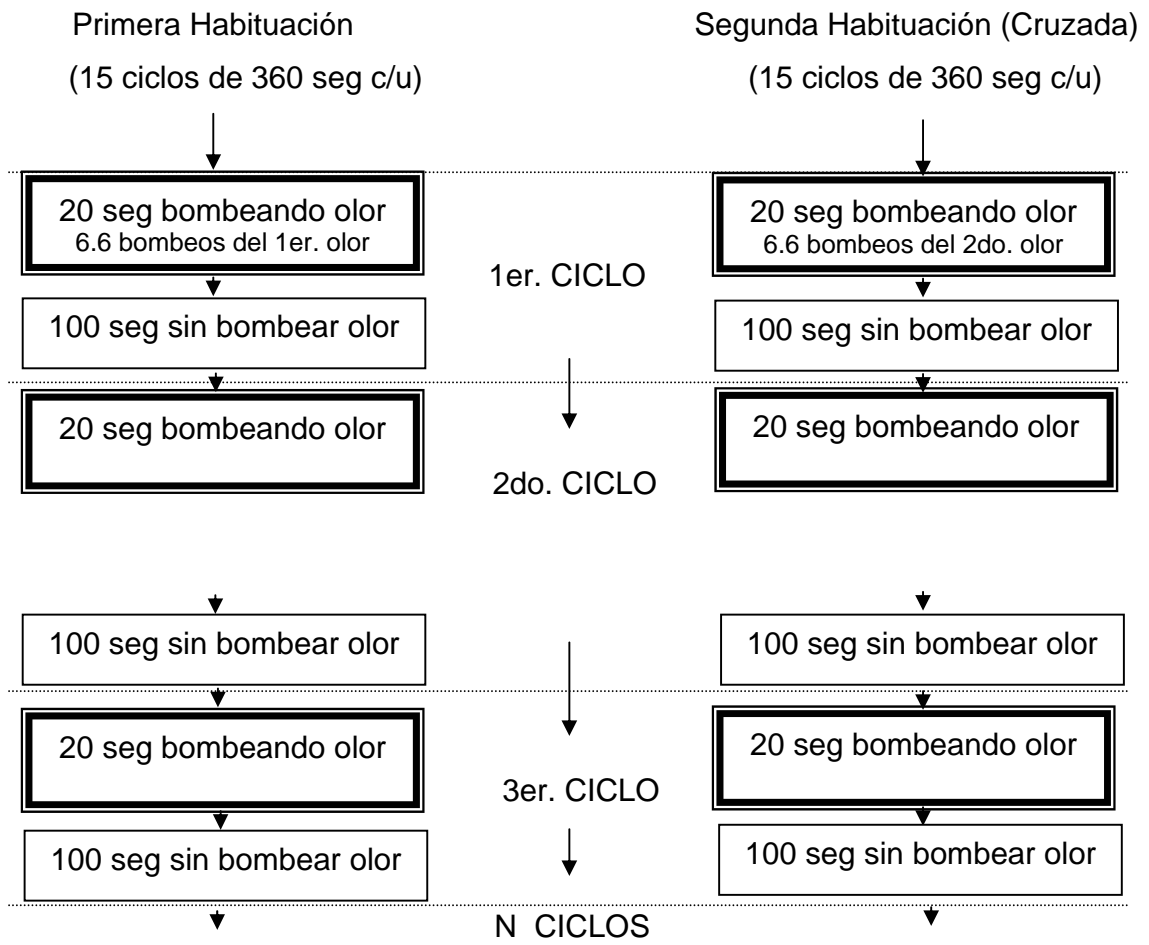


Fig. 8. Procedimiento de habitación y habitación cruzada. Olores: menta y acetato de amilo al azar.

7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para el análisis del peso corporal por edad se utilizó un ANOVA de dos vías 4 (condiciones experimentales) X 3 (edades). Para el caso de las comparaciones *post-hoc* se utilizó la prueba de Least Significant Difference (LSD) de Fisher en comparaciones múltiples de los grupos, ya que esta prueba considera a la N total para realizar las comparaciones entre dos muestras independientes.

Para el análisis de la apertura de meatos auditivos externos y párpados se consideraron el grupo control y desnutrido, en las diez edades registradas, para corroborar el efecto del paradigma de desnutrición, utilizando comparaciones con la prueba de U de Mann-Whitney.

Se tomaron registros de las mediciones de las frecuencias cardíacas basales para cada edad en las diferentes condiciones, y se utilizó un ANOVA multifactorial de 3 vías, 3 (edad) X 2 (dieta) X 2 (estimulación sensorial). Las comparaciones *post-hoc* se realizaron con la prueba LSD de Fisher.

De acuerdo a estudios previos, las muestras y el tipo de análisis basado en el método de la habituación y deshabituación de la frecuencia cardíaca, el registro de los puntajes experimentales se basó en el análisis de las diferencias encontradas en la disminución de la frecuencia cardíaca contra la frecuencia cardíaca basal (FCB = 10 seg inmediatos anteriores a la bradicardia) (ver Fig. 9). Se seleccionaron 3 muestras de entre las 15 sesiones para cada olor presentado. Para la primera muestra se tomó la diferencia entre la FCB y el primer puntaje mas bajo inmediato a la primera sesión de estimulación (primera bradicardia = S1). La segunda muestra fue la diferencia entre la FCB y el puntaje mas bajo inmediato a la séptima sesión de estimulación (considerada como una muestra intermedia= S2), y la última muestra fue la diferencia entre la FCB y el puntaje mas bajo inmediato a la quinceava sesión de estimulación (S3) y así para ambos olores (ver Fig. 10). Para lo cual se obtuvieron 3 muestras del primer olor y 3 muestras del segundo olor para cada animal. Dichos datos fueron analizados con un ANOVA multifactorial de 5 vías, 2 (olores) x 3 (muestras/sesiones tomadas de cada olor) x 4 (condición/tratamiento) x 2 (sexo) x 2 (olor inicial) cuando la primera

estimulación fue menta y cuando la primera estimulación fue acetato de amilo, para cada edad.

Para el análisis de la discriminación olfatoria se tomaron las diferencias en cuanto al cambio en la FC entre la última sesión de estimulación del primer olor y la primera sesión de estimulación del segundo olor. Dichos datos fueron analizados por medio de un ANOVA multifactorial de 3 vías, 2 (dieta) x 2 (estimulación sensorial) x 3 (edad). Se realizaron comparaciones post-hoc con la prueba LSD de Fisher para las diferencias entre grupos.

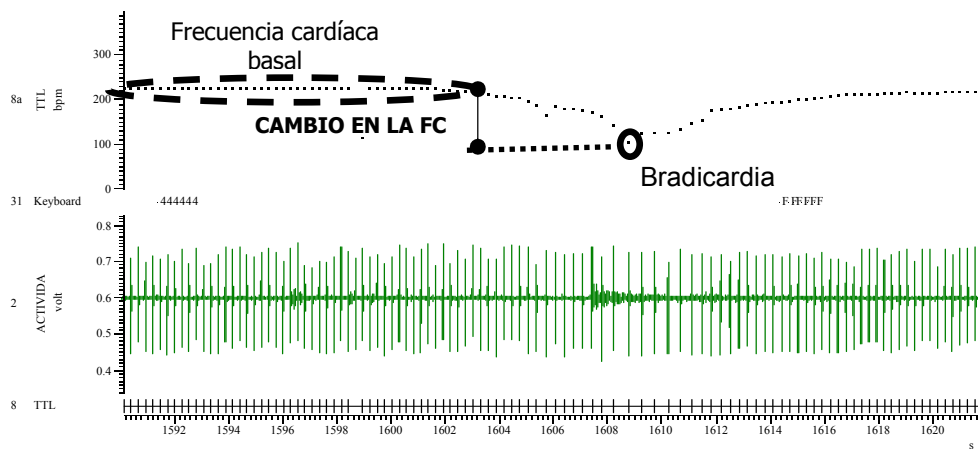


Fig. 9. Variables del registro electrocardiográfico consideradas para las mediciones de las bradicardias en términos de cambio de frecuencia cardíaca.

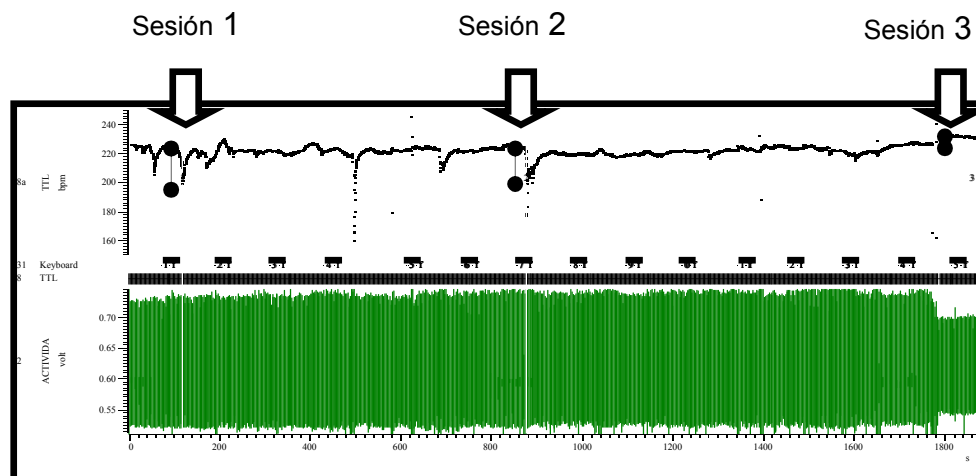


Fig. 10. Toma de muestras por sesiones. Tres sesiones a lo largo de las quince estimulaciones para cada olor.

8. RESULTADOS

8.1. Efectos sobre el desarrollo físico.

8.1.1. Peso corporal.

El desarrollo de las diferencias en el peso corporal se evaluó registrando su valor en los días 4, 7 y 12 postnatales de los distintos grupos experimentales. Los resultados mostraron que en cuanto al tratamiento hubo una reducción significativa en el peso corporal de los grupos desnutridos, comparados con sus controles, $F(3,6)=25.1114$, $p<0.0001$ a lo largo de las tres edades registradas.

En las pruebas post hoc de LSD de Fisher para comparar los grupos tratados en cada una de las edades, se encontró una reducción consistente y significativa ($p<0.0001$) de peso corporal en los sujetos desnutridos (GD y GDE) comparados con sus controles (GC y GCE) a lo largo de los días del estudio (ver Fig. 11).

Asimismo, se encontraron diferencias significativas en el día 7 entre el GC y el GCE.

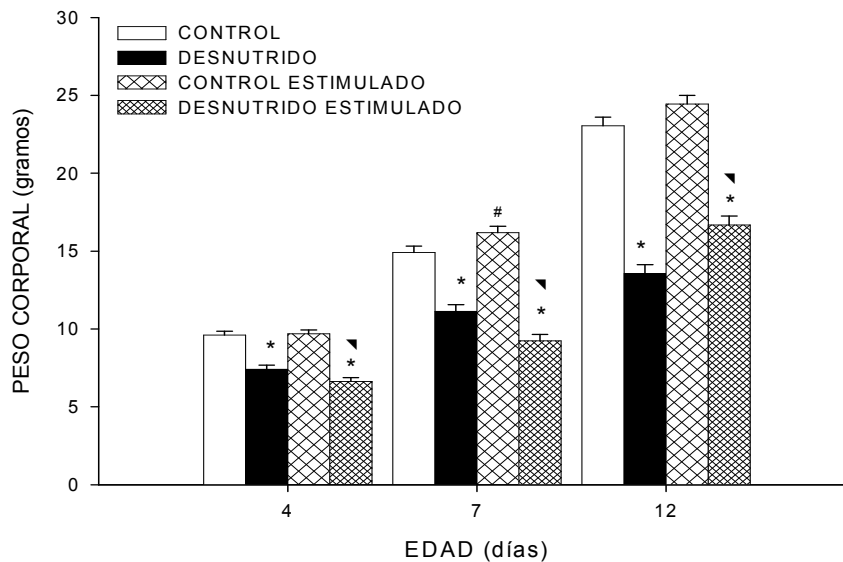


Fig.11. Pesos Corporales ($n=8$ sujetos /grupo) de los grupos GC, GD, GCE y GDE. Los símbolos indican diferencia significativa * $p<0.0001$, prueba LSD Fisher, entre los grupos GC y, GD en las tres edades; el símbolo \blacktriangledown $p<0.0001$ indica diferencia significativa entre los grupos GD vs. GDE en las tres edades, y el símbolo # $p<0.0001$ indica diferencia significativa entre el grupo GC vs. GCE en la edad de 7 días.

8.1.2. Apertura de meatos auditivos externos y párpados.

La apertura de meatos auditivos externos ($n= 8$ sujetos/grupo) mostró una diferencia estadísticamente significativa $p<0.05$ con la prueba U en diferentes edades, tales como 7, 8, 12, 13 y 14 días, mostrando que los animales desnutridos completan la apertura de meatos auditivos el día 15 mientras que los controles lo hacen un día antes.

La apertura de párpados ($n= 8$ sujetos/grupo) mostró diferencias significativas en la prueba U $p<0.05$ en las edades de 12, 14 y 15 días entre el grupo control y desnutrido, demostrando que los animales desnutridos sufren, asimismo, un retraso de un día en la apertura completa de párpados comparados con sus controles quienes tienen una apertura el día 15 de edad (Fig. 12).

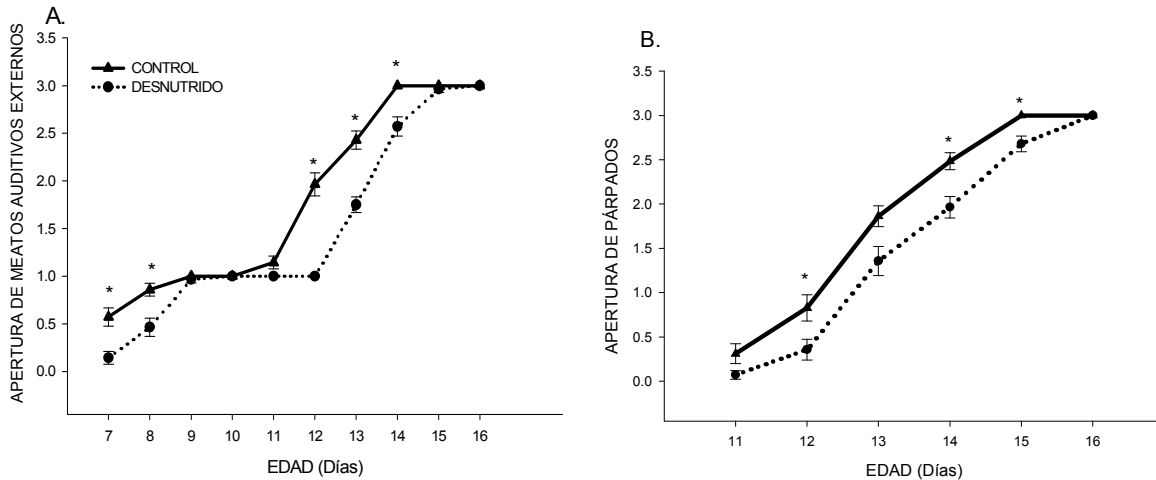


Fig 12. Apertura de meatos auditivos externos (A) y de párpados (B), ($n= 8$ sujetos /grupo) del GC y GD. Los símbolos * $p<0.0001$ indican diferencia significativa entre el grupo GC vs. GD. Nótese el retardo de 1 día en la apertura de ambos canales sensoriales.

8.2. Efectos de la dieta y la estimulación sensorial temprana en la frecuencia cardíaca basal a través del desarrollo.

Las comparaciones generales (ANOVA) en la frecuencia cardíaca basal de las crías, asociadas a la dieta, condiciones de estimulación y edad se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Análisis multifactorial de las diferencias en la frecuencia cardíaca basal asociada a los factores experimentales considerados.

FACTOR	GI	F	P <	
A. EDAD	2, 72	123.78	0.0001	
B. DIETA	1, 72	46.94	0.0001	
C. ESTIMULACIÓN	1, 72	20.89	0.0001	
D. SEXO	1, 72	1.54	0.217	NS
A X B	2, 72	4.06	0.021	
A X C	2, 72	0.183	0.832	NS
B X C	1, 72	21.55	0.0001	
A X B X C	2, 72	5.321	0.006	

NS; diferencias no significativas.

La Tabla 1, muestra que todos los factores experimentales considerados modificaron significativamente la frecuencia cardíaca basal de las crías con excepción del factor sexo.

La interacción entre los factores experimentales considerados mostró efectos significativos únicamente entre la dieta X la edad, $F(2, 72) = 4.06$, $p < 0.02$; entre la dieta X la estimulación, $F(1, 72) = 21.55$, $p < 0.0001$ y entre edad X la dieta X la estimulación, $F(2, 72) = 5.32$, $p < 0.006$.

Los resultados de las pruebas *post hoc* se muestran en la Fig. 13. En el día 4 se encontraron diferencias significativas ($p < 0.001$) entre los grupos GCE vs. GC, GD y GDE. En el día 7 se encontraron diferencias entre los grupos GC vs. GD y GDE, y del GCE vs. GD y GDE. En el día 12 se encontraron diferencias significativas entre los grupos GCE vs. GC, GD y GDE (Fig. 13).

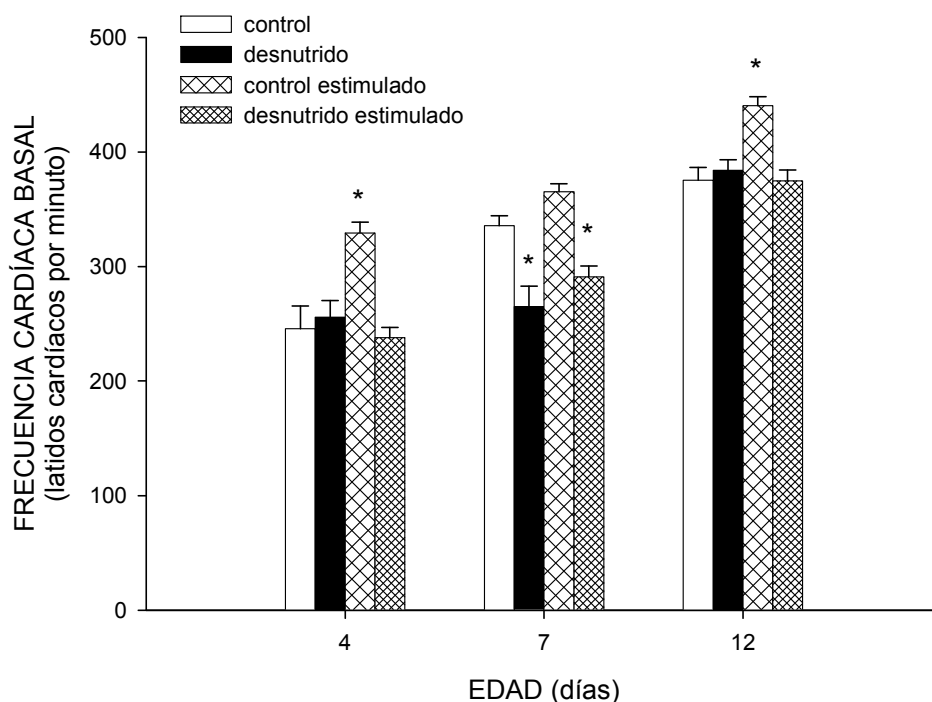


Fig. 13. Frecuencia cardíaca basal de crías en desarrollo. Los símbolos * indican diferencias significativas entre los grupos ($p < 0.0001$) GC vs. GD, GCE y GDE. Nótese como la frecuencia cardíaca basal se fue incrementando con el desarrollo.

8.2.1. Habitación de la frecuencia cardíaca ante la estimulación a dos olores.

El análisis multifactorial mostró diferencias estadísticamente significativas en cuanto a la frecuencia cardíaca en 3 muestras (sesiones), tomadas del período de estimulación de ambos olores en las 3 diferentes edades, por efecto de la estimulación ($p < 0.02$), no siendo así en cuanto a la dieta ni a la edad, estas diferencias se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2. Análisis multifactorial de la frecuencia cardíaca de crías recién nacidas durante la habituación primaria y secundaria a dos olores.

FACTOR	GI	F	P <	
A. EDAD	2, 168	2.50	0.08	NS
B. DIETA	1, 168	2.12	0.14	NS
C. ESTIMULACIÓN	1, 168	5.47	0.02	
A X B	2, 168	0.88	0.41	NS
A X C	2, 168	0.48	0.61	NS
B X C	1, 168	9.20	0.002	
A X B X C	2, 168	3.81	0.02	

NS; diferencias no significativas.

Con relación a las interacciones entre los factores, se encontró diferencias significativas en la interacción entre la dieta X la estimulación, $F(2, 168) = 9.20$, $p < 0.002$; entre la edad X la dieta X la estimulación, $F(2, 168) = 3.81$, $p < 0.02$ y entre la edad X la dieta X la estimulación, $F(2, 168) = 3.81$, $p < 0.02$.

En cuanto al factor sesiones de presentación de ambos olores a lo largo del estudio, se encontró diferencia significativa, $F(2, 336) = 77.17$, $p < 0.001$.

Se tomaron tres muestras a lo largo de todo el registro de cada olor, como se mencionó anteriormente, de las cuales se tomó la sesión 1 como la inicial del procedimiento de habituación, y se pretendió comparar con la última sesión de estimulación de olor para conocer la disminución significativa y comprobar así el procedimiento de habituación. Asimismo, la deshabituación sería comprobada al comparar la última sesión del primer olor, con la primera del segundo olor, para conocer si existió nuevamente una respuesta, la cual previamente había disminuido.

Los resultados de las pruebas *post hoc* se muestran en la Fig. 14. Considerando como la primera habituación la diferencia entre la sesión 1 y sesión 3 del primer olor; la segunda habituación es la diferencia entre la sesión 1 y la sesión 3 del segundo olor, y la discriminación como la diferencia entre la sesión 3 del olor 1 y la sesión 1 del olor 2. En el día 4 se encontró diferencia significativa ($p < 0.05$) en el GD y GCE en la primera habituación, en la segunda y en la diferencia entre ambas; en el GDE se encontraron

diferencias en la primera habituación y en la diferencia entre ambas habituaciones; no encontrando diferencias significativas en el GC. En el día 7 se encontraron diferencias significativas ($p < 0.005$) en el GC en la segunda habituación y diferencia entre ambas, en el GD hay diferencias significativas en la primera habituación, en el GCE diferencias en la primera y segunda habituación y entre estas dos, sin embargo no existe diferencia significativas en el GDE. En el día 12 se encontraron diferencias significativas ($p < 0.001$) en el GC en la primera habituación, en el GD diferencias en la segunda habituación y entre estas dos, en el GCE diferencias en la primera y segunda habituación, y en el GDE únicamente en la segunda habituación (Fig. 14).

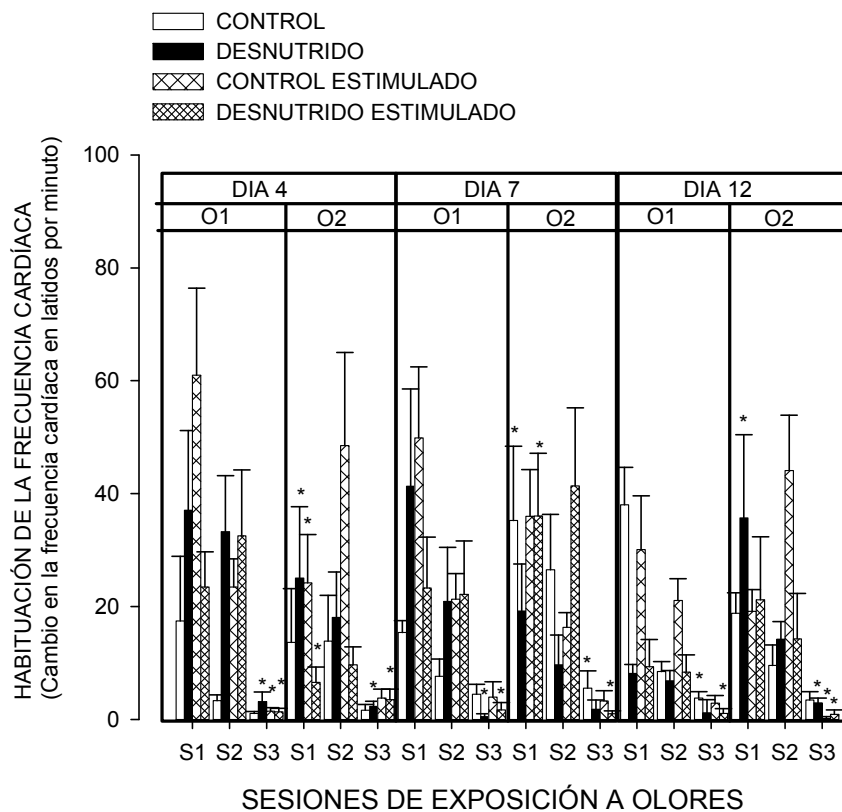


Fig. 14. Gráficas de las respuestas de bradicardia por edad y por las sesiones de exposición al olor a través del tiempo en los grupos GC, GD, GCE y GDE. Los símbolos indican diferencias significativas ($p < 0.01$) entre las S1 y S3 de ambos olores y las diferencias entre S3 del olor 1 y la S1 del olor 2.

8.2.1.1. Coeficientes de variabilidad durante el procedimiento de habituación y deshabituación olfatoria.

Se presentan los datos estadísticos de las medias y desviaciones estándar de los cambios en la frecuencia cardíaca de las crías en el procedimiento de habituación, para conocer la capacidad discriminadora olfatoria y los coeficientes de variabilidad en el procedimiento de habituación y deshabituación ante la estimulación de dos olores (Ver Tabla 3).

El análisis estadístico mostró que la variabilidad es significativamente mayor al inicio del procedimiento de habituación ante la presencia de cualquiera de los olores en todas las condiciones. Sin embargo, al final del proceso de habituación la variabilidad se vió disminuida ante ambos olores indicando que ocurrió un proceso de homogenización de la respuesta y confirmando la aparición del proceso de homogenización de la bradicardia a la estimulación olfatoria.

Asimismo, se observó cómo esta heterogeneidad de la respuesta entre los grupos al inicio del procedimiento de habituación, se ve disminuida a la edad de 12 días sugiriendo un proceso de maduración estructural ya que los animales responden de manera semejante ante dicha estimulación (Fig. 15).

Tabla 3. Coeficientes de variabilidad (C.V.) evaluados durante el proceso de habituación y deshabituación olfatoria de la rata con diferentes tratamientos experimentales durante el desarrollo.

SESIÓN	DIA 4							
	CONTROL		DESNUTRIDO		CONTROL ESTIMULADO		DESNUTRIDO ESTIMULADO	
	MEDIA (± DE)	C.V.	MEDIA (± DE)	C.V.	MEDIA (± DE)	C.V.	MEDIA (± DE)	C.V.
O1A	17.44 (±32.38)	60.11	37.05 (±39.90)	42.97	60.98 (±43.57)	31.13	23.48 (±17.58)	13.16
O1B	3.34 (±2.79)	2.32	33.27 (±28.05)	23.64	23.46 (±14.04)	8.40	32.50 (±33.09)	33.69
O1C	1.08 (±0.88)	0.71	3.15 (±4.86)	7.50	1.46 (±1.76)	2.12	1.32 (±1.88)	2.67
O2A	13.62 (±26.99)	53.50	25.03 (±35.75)	51.05	24.19 (±24.21)	24.23	6.57 (±7.68)	8.97
O2B	13.83 (±23.03)	38.34	18.08 (±22.72)	28.55	48.51 (±46.59)	44.74	9.66 (±9.03)	8.44
O2C	1.65 (±2.72)	4.46	2.34 (±2.42)	2.51	3.75 (±4.54)	5.49	3.50 (±5.37)	8.23

SESIÓN	DIA 7							
	CONTROL		DESNUTRIDO		CONTROL ESTIMULADO		DESNUTRIDO ESTIMULADO	
	MEDIA (± DE)	C.V.	MEDIA (± DE)	C.V.	MEDIA (± DE)	C.V.	MEDIA (± DE)	C.V.
O1A	15.40 (±5.86)	2.23	41.33 (±48.71)	57.41	49.85 (±35.67)	25.52	23.28 (±25.40)	27.71
O1B	7.61 (±8.63)	9.80	20.90 (±27.04)	34.98	21.30 (±12.83)	7.72	22.15 (±26.77)	32.35
O1C	4.46 (±4.90)	5.38	0.51 (±1.45)	4.08	3.97 (±7.67)	14.81	1.71 (±3.52)	7.24
O2A	35.21 (±37.34)	39.59	19.20 (±23.58)	28.96	36.00 (±23.36)	15.15	36.03 (±31.45)	27.45
O2B	26.51 (±27.10)	28.95	9.67 (±14.96)	23.14	16.33 (±7.38)	3.33	41.35 (±39.18)	37.12
O2C	5.55 (±8.65)	13.48	1.80 (±4.59)	11.69	3.23 (±5.18)	8.30	0.98 (±1.48)	2.23

SESIÓN	DIA 12							
	CONTROL		DESNUTRIDO		CONTROL ESTIMULADO		DESNUTRIDO ESTIMULADO	
	MEDIA (± DE)	C.V.	MEDIA (± DE)	C.V.	MEDIA (± DE)	C.V.	MEDIA (± DE)	C.V.

O1A	38.00 (±18.91)	9.41	8.12 (±4.44)	2.42	30.09 (±26.84)	23.94	9.36 (±13.48)	19.41
O1B	8.51 (±4.82)	2.72	6.84 (±5.07)	3.77	21.07 (±10.89)	5.62	8.38 (±8.70)	9.03
O1C	3.76 (±3.35)	2.99	1.18 (±6.48)	35.29	2.83 (±3.95)	5.51	1.07 (±2.46)	5.65
O2A	18.82 (±10.22)	5.55	35.71 (±41.68)	48.64	19.16 (±10.94)	6.24	21.16 (±31.56)	47.07
O2B	9.55 (±10.23)	10.95	14.20 (±8.84)	5.50	44.10 (±27.72)	17.42	14.27 (±22.69)	36.07
O2C	3.41 (±4.29)	5.38	2.92 (±2.42)	2.00	0.12 (±1.09)	9.90	0.89 (±2.25)	5.68

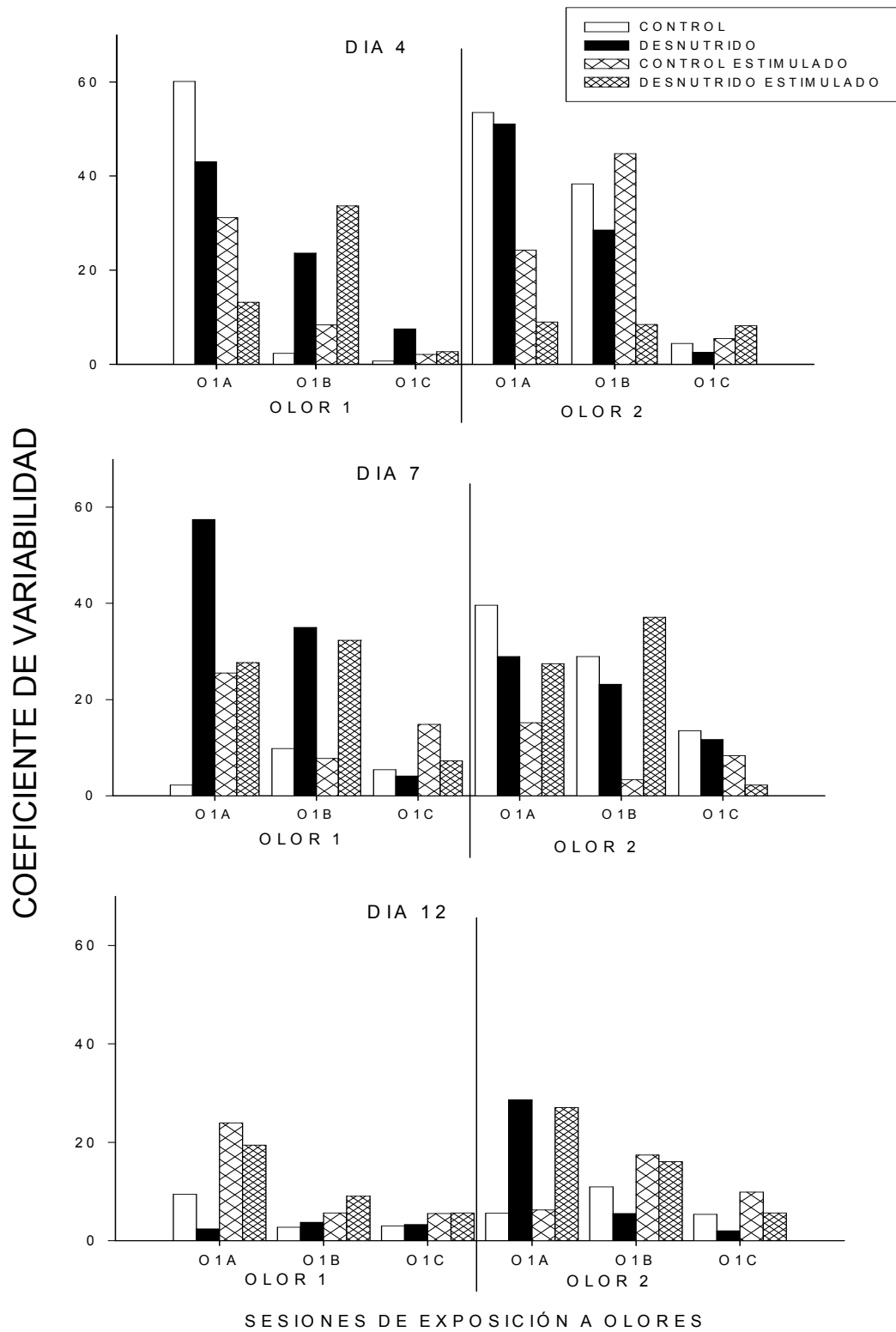


Fig.15. Gráficas de los coeficientes de variabilidad en cada edad probada con el procedimiento de habituación de la frecuencia cardíaca.

8.2.2. Efectos sobre la capacidad de discriminación olfatoria.

Los efectos de la condición nutricional y de la estimulación sensorial sobre la capacidad de discriminación olfatoria, se muestran en la Tabla 4 y las comparaciones *post hoc* entre los grupos en las diferentes edades se muestran en la Fig. 16.

Tabla 4. Comparación estadística de diferentes factores experimentales sobre la discriminación olfatoria de la rata en desarrollo.

FACTOR	GI	F	P <	
A. EDAD	2, 48	5.87	0.005	
B. DIETA	1, 48	2.10	0.153	NS
C. ESTIMULACIÓN	1, 48	12.69	0.0008	
A X B	2, 48	3.39	0.04	
A X C	2, 48	2.78	0.07	NS
B X C	1, 48	1.24	0.27	NS
A X B X C	2, 48	2.68	0.78	NS

NS; diferencias no significativas.

Los resultados del ANOVA mostraron diferencias estadísticamente significativas asociadas a la edad ($p < 0.005$) y la estimulación ($p < 0.0008$), sin embargo, no se encontró diferencias significativas por la dieta.

En cuanto a las interacciones entre los factores solo fue significativa la interacción entre la dieta X la edad, $F(2, 48) = 3.39$, $p < 0.04$.

Los análisis de las pruebas *post hoc* realizados en cada día del estudio se muestran en la Fig. 14. En el día 4 se encontraron diferencias significativas ($p < 0.005$) entre los grupos GCE vs. GC, GD y GDE. En el día 7 se encontraron diferencias entre los grupos GC vs. GCE, GD vs. GCE, GC y GDE. Finalmente, en el día 12 no se encontraron diferencias significativas en la discriminación olfatoria entre los grupos.

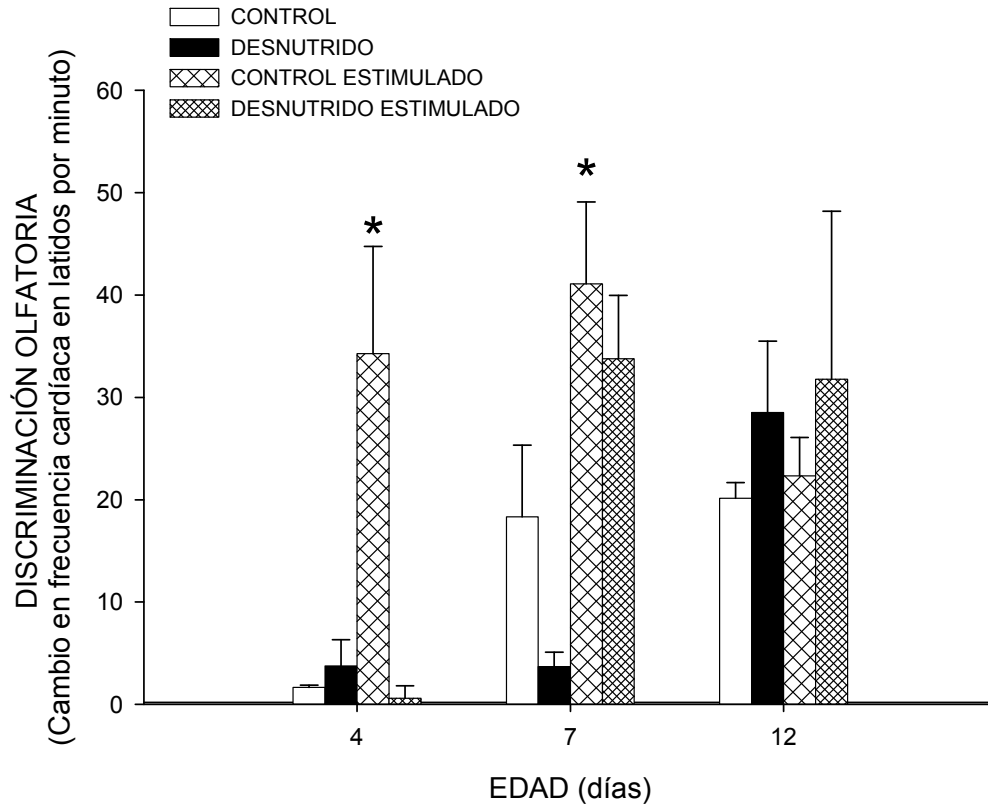


Fig. 16. Gráfica de la capacidad de discriminación olfatoria de crías recién nacidas de acuerdo a las respuestas de bradicardia durante el proceso de habituación olfatoria y deshabitación. Los símbolos indican diferencias significativas $*(p < 0.01)$ entre GCE vs. GC y $*(p < 0.05)$ entre GCE vs. GD.

9. DISCUSIÓN

Los hallazgos experimentales obtenidos en el presente estudio muestran que tanto la desnutrición perinatal como la estimulación sensorial temprana, provocan cambios significativos en el desarrollo físico de las crías a lo largo de los días de estudio, que van asociados a incrementos en la frecuencia cardíaca basal y a disminuciones en la misma provocadas por la exposición repetida a intervalos regulares con acetato de amilo y menta, posiblemente a través de mecanismos neuronales diferentes. Estos cambios en la frecuencia cardíaca relacionados a la exposición de estímulos olfatorios, confirman que la rata recién nacida es capaz de habituarse y deshabituarse discriminando entre un olor y otro, modificándose poco por el tipo de dieta, pero significativamente por la edad y la estimulación sensorial temprana.

De numerosos estudios realizados tanto en los seres humanos como en los animales de experimentación se sabe que la restricción perinatal de alimento en calidad y cantidad, provoca severas alteraciones en el desarrollo físico que se asocian invariablemente con alteraciones a corto y a largo plazo en el desarrollo cerebral y sus funciones (para revisión ver Salas, 1998; Morgane y col., 1992, 1993). En este sentido, los hallazgos experimentales mencionados de reducciones significativas consistentes en el peso corporal de los animales desnutridos y desnutridos con estimulación sensorial con respecto a sus testigos (Fig. 11), están en línea con los resultados obtenidos en estudios previos empleando paradigmas de restricción de alimento similares o con algunas variantes (Lynch, 1976; Crnic, 1980; Díaz-Cintra 1991; Salas y col., 1991; Lokoyanov y Andrade, 2000; Segura y col., 2004; Rubio y col., 2004; Torrero y col., 2005). En todos los grupos experimentales utilizados en el presente estudio, se observó un incremento gradual del peso corporal a lo largo de los días registrados, con reducciones significativas en los valores del grupo desnutrido y tendencias a los 12 días de edad a incrementarse el peso corporal, cuando concurrió la ingesta normal de alimento o la restricción de alimento con la estimulación sensorial temprana (ver Fig. 11).

Por otra parte, la reducción en el peso corporal aquí reportada se acompañó de retardo significativo de un día tanto en la apertura de los meatos auditivos externos

como de los párpados con respecto a los grupos testigo (Fig. 12), que también están acordes con los hallazgos de estudios previos tanto de nuestro grupo de trabajo como del de otros autores (Escobar y Salas, 1993; Regalado y col., 1999; Almeida y col., 2001). Finalmente, aunque no se cuantificó de manera sistemática en los animales de los grupos desnutridos, éstos presentaron reducción de la talla corporal así como, pelo corto, delgado y raramente implantado, que concuerdan con estudios anteriores y que comprueban la efectividad del paradigma de restricción de alimento utilizado para interferir con el desarrollo cerebral y su funcionamiento (Pérez-Torrero y col., 2003; Torrero y col., 2005).

Aunque en el presente estudio no fue cuantificado el desarrollo del canal olfatorio, sin embargo por diversos estudios se sabe que la restricción de alimento se asocia a deficiencias en la capacidad del BO para atenuar la postdescarga eléctrica provocada por la estimulación del nervio olfatorio, sugiriéndose que la formación de interneuronas inhibitorias del bulbo olfatorio está reducida (Math y Davrainville, 1980). Asimismo, la succión láctea de las crías desnutridas por su separación parcial diaria (12 h) en una incubadora, está alterada posiblemente por incapacidad olfatoria de éstas para detectar las feromonas perimamarias maternas (Roth y Rosenblatt, 1968; Teicher y Blass, 1976; Torrero y col., 2000).

El surgimiento de la capacidad de discriminación guiada por el olfato en la rata recién nacida normal ya ha sido motivo de diversos estudios en el pasado, sin embargo, aún es escaso el conocimiento que se tiene acerca de sus características en la rata neonata desnutrida, que podría ser de interés conocerlo para fines prácticos, de conocimiento básico y por sus posibles repercusiones a corto y a largo plazo en el desarrollo de la conducta social (Salas y col., 1970; Schapiro y Salas, 1970; Torrero y col., 2005).

Como se mencionó en los antecedentes, es de gran interés identificar si los recién nacidos de especies altriciales como el hombre y la rata, son capaces de discriminar vía del olfato las primeras señales sensoriales provenientes del hábitat del nido o de los productos orgánicos producidos en el cuerpo de la madre (feromonas). Desafortunadamente, los procedimientos experimentales utilizados para el estudio de la discriminación están diseñados para animales adultos que utilizan la asociación con

variados estímulos sensoriales para los fines de la discriminación de diferentes circunstancias medio ambientales. De esta manera, tiene gran relevancia validar el modelo de discriminación en el neonato, utilizando la frecuencia cardíaca como respuesta a la aplicación de estímulos olfatorios, en una etapa de la vida en la que los canales visual y auditivo y el procesamiento central de la información neuronal muestran una gran inmadurez estructural y funcional. En este sentido, los hallazgos experimentales aquí presentados de la viabilidad tanto para la habituación como para la deshabituación a dos olores diferentes, validan el uso del modelo de la respuesta del corazón ante la aplicación de estímulos olfatorios, para medir la capacidad de discriminación a los olores del recién nacido normal, desnutrido y/o sensorialmente estimulado.

Esta capacidad de discriminación medida a través del modelo de “habituación cruzada” (habituación y deshabituación), usando como respuesta natural en las crías infantiles la bradicardia, puede ser explicada como un fenómeno de estrés generado por la situación experimental como un evento novedoso, que le puede generar mecanismos fisiológicos responsivos a éste, así como el olor en sí. Se sabe que ante la entrada de estímulos sensoriales, vía del tálamo, en tareas que impliquen un tipo de aprendizaje se encuentran moduladas por estructuras sub-corticales como la amígdala e hipocampo, estas dos estructuras regulan asimismo el eje hipotálamo-hipófisis–glándulas adrenales (HHA). De esta manera, la corteza adrenal encargada de la secreción de cortisol actúa sobre el sistema simpático y parasimpático regulando la frecuencia cardíaca, así como también funciones respiratorias, tono muscular, y de expectación y preparación física ante el medio ambiente que le rodea.

Los hallazgos obtenidos del presente estudio indican que cuando se cuantifica la frecuencia cardíaca basal previa a la aplicación de estímulos odoríficos, ésta se incrementa gradualmente en sus valores con la edad y su variabilidad contrariamente se ve reducida en los grupos estimulados mediante el olfato (Fig. 13). Asimismo, llama la atención que el grupo GCE en las 3 edades estudiadas incrementa notoriamente su frecuencia basal con respecto a los otros grupos experimentales, efecto que está incluso ausente en el grupo GDE. Estos hallazgos sugieren que la estimulación sensorial temprana, afecta de manera diferente al grupo GCE con respecto al grupo

GDE incrementando en el primero su frecuencia cardíaca preparatoria a determinada acción, quizás para un mejor desempeño ante las demandas posteriores de oxígeno y nutrimentos de los tejidos del organismo que participan en esa actividad. En este mismo contexto, los resultados presentados muestran que la variabilidad en la frecuencia cardíaca en cada uno de los grupos experimentales va progresivamente reduciéndose conforme se avanza en edad, sugiriendo esto, el establecimiento gradual de los mecanismos autonómicos encargados de regular el ritmo cardíaco para su adaptación a las demandas del organismo. Estas posibilidades, encuentran fundamento en el incremento de la eficiencia funcional que va asociada tanto a las actividades físicas, como para los cambios ocurridos en los procesos cerebrales integrados ocurridos en los animales en crecimiento y en los adultos como respuesta a estímulos medio ambientales (Anokhin, 1964; Altaman y col., 1970; Obrist, 1976; Ganong, 1998). A lo largo del estudio, la frecuencia cardíaca basal de las crías de los distintos grupos experimentales, fue modificada significativamente por el factor edad, la dieta y la estimulación sensorial, que son variables que por numerosos estudios se sabe pueden modificar el desarrollo y la plasticidad de substratos neuronales con distintas propiedades funcionales en el SNC (Salas y col., 1984; Panhuber y Laing, 1987; Rosenzweigh y Bennett, 1996; Regalado y col., 1999; Granados-Rojas y col., 2004; Rubio y col., 2004).

En relación al análisis general reuniendo los valores de la primera con la segunda habituación en la bradicardia generada en crías de 3 edades, y comparando la primera con la tercera sesión de estimulaciones en respuesta a la exposición de acetato de amilo y menta, los resultados muestran que este proceso neurofisiológico va acompañado de un decremento gradual de la bradicardia a lo largo de cada una de las sesiones y en las 3 edades estudiadas (Fig. 14). Aunque en este tipo de comparaciones estadísticas solo se encontró diferencias significativas asociadas a la estimulación sensorial, y tendencias a modificarse por el factor edad, sin embargo, en las interacciones es consistente la participación de los factores dieta, estimulación sensorial y edad que inciden en la respuesta de habituación (Tabla 2). En otras palabras, estos hallazgos muestran que tanto en la exposición al primero como al segundo olor la estimulación repetida de un estímulo oloroso, fue capaz de activar el substrato neuronal

participante en el proceso de habituación temprana a los dos olores tomando como efector el corazón. Dan apoyo a estos hallazgos, experimentos previos que muestran que empleando un paradigma de estímulos odorífico y de cuantificación diferentes y como efector a la misma víscera, es posible reconocer la capacidad de habituación y deshabituación de la rata recién nacida (Fletcher y Wilson, 2001). Dado que en el presente estudio los estímulos olfativos de acetato de amilo y menta que se utilizaron son olores estructuralmente diferentes al olor a orina, excremento, secreción sudoral, alimento de dieta y feromonas distintas normalmente liberadas en el ambiente del nido, sería de gran interés en un estudio futuro, probar estímulos olfativos de esta naturaleza y reanalizar las características de la habituación y deshabituación en la rata recién nacida desnutrida y/o sensorialmente estimulada. Asimismo, evaluar el carácter hedónico que debe de estar asociado al reconocimiento materno en demanda de atención y cuidados, como un elemento fundamental para la supervivencia del recién nacido en esta etapa de la vida.

De manera consistente la discriminación olfatoria (habituación cruzada) obtenida por las comparaciones estadísticas de las muestras de la bradicardia de las crías entre los valores de la tercera muestra de habituación al primer olor versus la primera muestra de la habituación al segundo olor, mostró que los recién nacidos indistintamente del olor utilizado en la prueba presentaron la típica respuesta de deshabituación (Fig. 14). Este resultado, es congruente con el conocimiento establecido de que la habituación como un aprendizaje simple no asociativo, se interrumpe entre otras causas por la exposición a un estímulo diferente, que lleva al sujeto experimental a un nuevo ciclo de habituación cuando se mantiene el carácter repetitivo del nuevo estímulo sensorial (Thompson y Spencer, 1966; Kandel y Schwartz, 1985). Asimismo, la presencia del fenómeno de deshabituación provocado por la exposición a un segundo olor sea menta o acetato de amilo tomados al azar, es un elemento más para confirmar que el recién nacido ya tiene la capacidad para discriminar olores y aprender vía del olfato diferentes señales químicas en el hábitat del nido durante esta etapa temprana de la vida (Coopersmith y Leon, 1988).

Los hallazgos del cálculo de los coeficientes de variabilidad de las señales del ritmo del corazón, ocurridas durante el proceso de habituación al acetato de amilo y la

menta en 3 diferentes sesiones, edades y condiciones experimentales, mostraron que en el inicio de la estimulación olfatoria, los cambios en la variabilidad de la bradicardia fueron mayores que durante la parte final de la misma sesión (Tabla 3 y Fig. 15). Por otro lado, la variabilidad en los días 4 y 7 del estudio es mayor para ambos olores a lo largo de cada una de las sesiones, reduciéndose considerablemente el efecto de variación para el día 12 de edad (Fig. 15). Los hallazgos mencionados, guardan una estrecha correlación con los cambios ocurridos en la frecuencia cardíaca basal previos a la exposición de los distintos olores, excepto que en este caso serían consecuencia de la adaptación en el ritmo cardíaco a las demandas relacionadas con la exposición a los distintos olores (Fig. 13).

Tomando en consideración los hallazgos presentados de la reducción en la variabilidad del ritmo cardíaco basal, y de los cambios similares provocados en el mismo durante las exposiciones a los olores o del cambio de un olor a otro, parece claro que la respuesta cardíaca no fue modificada significativamente por la dieta, pero si por las variables edad y estimulación sensorial. Al respecto, cabe mencionar que de acuerdo a estudios morfológicos previos realizados en la rata bajo condiciones de restricción perinatal de alimento y empobrecimiento sensorial, a nivel del BO, la amígdala e hipocampo (estructuras que integran información olfatoria), hay reducción significativa del número de neuronas pequeñas, pobre crecimiento dendrítico y menor formación de contactos sinápticos que limita el funcionamiento de este canal sensorial (Math y Davrainville, 1980; Escobar y Salas, 1993; De Bassio y col., 1993; Andrade y col., 1995; Lukoyanov y Andrade, 2000; Bedi, 2003; Granados-Rojas y col., 2004; Frias y col., 2005). Paradójicamente, los resultados de este estudio no revelan mayores alteraciones asociadas a la dieta, pero si a la estimulación sensorial y la edad, que concuerdan parcialmente con estudios previos de habituación cruzada a olores, que muestran que los campos receptivos a olores de las células mitrales y en penacho no cambian significativamente con la edad examinada, ni tienen relación con las oscilaciones eléctricas locales de campo descritas a nivel del BO a pesar de su notable inmadurez al nacimiento (Fletcher y col., 2005). En paralelo, hay reportes de grandes alteraciones en la adquisición y mantenimiento del aprendizaje de tipo visuomotor, asociadas al daño prenatal del hipocampo, secundario a la reducción de proteínas en la

dieta de la rata gestante (Tonkiss y Galler, 1990; Bedi, 1992; Cordoba y col., 1994). Es posible que la habituación como aprendizaje no asociativo medido a través del ritmo cardíaco, no permita valorar efectos de restricción en la ingesta de alimento durante el período gestacional a pesar de que la neurogénesis del mecanismo modulador del tallo cerebral ocurra principalmente entre los días G11 y G16. Por otro lado, de acuerdo a estudios previos la desnutrición prenatal tiene en general menores efectos sobre el desarrollo neuronal hipocámpico comparado con la desnutrición neonatal a base de la ingesta de una dieta pobre en proteínas de la madre (Granados-Rojas y col., 2004). Asimismo, que el corazón como órgano precoz en su actividad y esencial para el funcionamiento cardiovascular al servicio de la perfusión de líquidos, de aporte de oxígeno, nutrimentos y remoción de metabolitos en el medio interno, no puede ser afectado de manera importante por la restricción en el aporte de alimento ya que comprometería la supervivencia del organismo en esta etapa temprana de la vida.

Una posibilidad alternativa para explicar la reducción de la variabilidad de las respuestas de bradicardia basal antes de la prueba de habituación, y de las provocadas por la aplicación repetitiva de estímulos olfatorios durante la habituación y deshabituación, es la influencia que tuvieron distintos estímulos estresantes sobre el desarrollo del eje HHA. En los experimentos aquí descritos, las madres gestantes de los grupos desnutridos fueron manipuladas tanto por las rutinas de aseo de la colonia, como por la restricción del alimento a la que fueron sometidas. Después del parto, las crías de los distintos grupos experimentales fueron afectadas por diversos estímulos estresantes como el intercambio de madres cada 12 h para su alimentación, el masaje corporal suave aplicado durante la estimulación sensorial temprana, a la separación materna de las crías, al exceso de estimulación que la madre provee a la mismas al retornarlas al nido y a las condiciones de novedad de las cajas de estimulación durante las pruebas de habituación y discriminación a los distintos olores. Es posible que los hallazgos de los cambios en la variabilidad de la bradicardia mencionadas, pudieran ser el reflejo de un efecto promotor de la maduración de la respuesta al estrés, que hizo que los animales tuvieran menores niveles circulantes de las hormonas del estrés (CRH, ACTH y corticoides adrenales) cuyo efecto fuese reducir la variabilidad de las respuestas de bradicardia. Apoyan esta posibilidad experimentos de separación breve o

prolongada de la madre de las crías, la manipulación suave y breve de estas últimas y la exposición hacia ambientes enriquecidos en estímulos sensoriales que puede mejorar o bien empeorar la adquisición de aprendizaje de las crías (Falkenberg y col., 1992; Servatius y Shors, 1994; Luine y col., 1996; Carvell y Simons, 1996; Meaney y col., 1996). Asimismo, de estudios que muestran que la manipulación adicional que la madre le da a sus crías al regresarlas al nido, o los propios componentes de la atención maternal antes del destete disminuyen la magnitud de las respuestas endocrinas al estrés y provocan liberación de factores tróficos (NGF, BDNF y NT-3 a nivel de la corteza cerebral, hipocampo, cerebro anterior y posterior y la amígdala temporal (Lee y Williams, 1974; Neeper y col., 1996; Meaney y col., 1996; Van Oers y col., 1998; Ickes y col., 2000; Adlard y Cotman, 2004). Lamentablemente, en el presente estudio no se midieron los contenidos de las hormonas del estrés circulantes, sin embargo es posible reconocer como viable en la interpretación de los hallazgos obtenidos la participación de un componente de estrés como se mencionó anteriormente y que podría ser motivo de análisis en estudios posteriores.

El hecho de que la dieta y la estimulación sensorial incrementen la variabilidad del ritmo cardíaco basal, sugiere la participación de un factor de maduración estructural del mecanismo modulador del corazón con la edad. Asimismo, que la estimulación sensorial incremente la variabilidad basal del corazón en el grupo GCE y no en el GDE, muestra que la restricción perinatal de alimento afectó la capacidad preparatoria del corazón para enfrentar las demandas que imponen tanto estímulos en el medio interno como el externo cuyo significado funcional aún estaría por determinarse. Estos mismos ajustes en la variabilidad del ritmo cardíaco tienen un efecto contrario de reducción sin cambios significativos entre los grupos, cuando se evalúan durante los procesos de habituación y deshabituación a lo largo de la exposición a los distintos olores. Estos hallazgos, permiten dar apoyo experimental al concepto de funcionamiento temprano del canal olfatorio (prefuncionalidad) en las especies altriciales, que permite el establecimiento precoz de la comunicación cría-madre cuando hay una reconocida inmadurez de los canales sensoriales (Salas y col., 1969, 1970).

Como se mencionó en la sección de antecedentes de esta tesis, desde el punto de vista de la función cardiovascular en la rata recién nacida hasta aproximadamente

las 2 primeras semanas de edad, la exposición a estímulos olfatorios provoca de manera consistente un efecto de bradicardia (Hofer, 1978). El cambio del ritmo cardíaco a taquicardia en atención a las demandas de oxígeno y nutrimentos por parte de los diferentes tejidos corporales, parece darse de manera gradual a partir de esa edad conforme van ocurriendo otros procesos del crecimiento físico y cerebral (Adolph, 1957). Los experimentos llevados a cabo en el presente estudio, abarcaron solo hasta el día 12 de edad, por tal razón, desconocemos si la habituación usando la bradicardia como respuesta ante la exposición a estímulos olfatorios en edades posteriores aún pueda ser de utilidad para medir la discriminación olfatoria. Lo que si es un hecho conocido es de la existencia de “áreas reflexógenas” ubicadas en la mucosa olfatoria, el mentón, las áreas de proyección de la bifurcación de la arteria carótida primitiva en el cuello, los globos oculares y el abdomen (epigastrio) que al ser activadas por estímulos olfatorios, táctiles y de presión brusca respectivamente, que en el hombre adulto son capaces de desencadenar reflejos vagales que provocan bradicardia variable e incluso paro respiratorio cuando son provocadas en forma sorpresiva y ruda (Houssay y col., 1974). Sin embargo, para nuestro conocimiento no hay evidencia experimental de la utilización en los animales y el hombre adultos de la habituación cruzada utilizando la bradicardia en respuesta a la exposición a estímulos olfatorios, debido a que se disponen de otros procedimientos para tales fines. Por lo tanto, el uso de este paradigma tendría gran utilidad para el caso de los modelos animales durante la fase del desarrollo neonatal temprano, así como para valorar los efectos de la edad y de la estimulación sensorial temprana en el estudio de las relaciones y la comunicación madre-cría durante la etapa neonatal.

10. CONCLUSIONES

1. La restricción pre y postnatal de alimento asociada o no a la estimulación sensorial temprana a base de masaje corporal, reduce significativamente el peso corporal y la apertura de los canales sensoriales auditivo y visual en la rata recién nacida. Estos hallazgos validan el empleo del paradigma experimental de desnutrición aquí utilizado para interferir con el desarrollo físico y cerebral.
2. La frecuencia cardíaca basal de las crías del grupo CE antes de las pruebas de aprendizaje, mostró un incremento gradual con la edad, que no ocurrió en los grupos experimentales C, D y DE. Es posible que la estimulación sensorial temprana, prepare a los sujetos CE para una mejor respuesta cardíaca adaptada a las demandas energéticas del medio ambiente.
3. El aprendizaje guiado por la exposición al olor al acetato de amilo y la menta, indujo en todos los grupos experimentales los procesos de habituación y deshabituación, que solo fue afectado por la estimulación sensorial temprana pero no por el tratamiento dietético perinatal. Sin embargo, se requiere de la interacción entre los distintos factores experimentales para definir los efectos de la experiencia sensorial sobre este tipo de aprendizaje.
4. Las reacciones al estrés generadas por la experiencia del experimento y la exposición novedosa a un estímulo olfatorio, fue capaz de generar respuestas de bradicardia en las crías y facilitar la habituación a la conjunción de estímulos estresantes.
5. Los coeficientes de variabilidad de la bradicardia de las crías de los distintos grupos experimentales durante la exposición a los dos olores, mostró una reducción significativa que sugiere un proceso de homogenización de respuestas

cardíacas, y que el aprendizaje se va haciendo más eficiente conforme la maduración del sistema se establece a lo largo de los días de desarrollo.

6. En todos los casos, la habituación cruzada comparando el final de la habituación al primer olor y las respuestas de bradicardia al segundo olor, mostró que las crías de todos los grupos fueron capaces de discriminar entre cada uno de los olores presentados al azar.

7. El modelo de la discriminación olfatoria de la rata recién nacida utilizando a la bradicardia provocada por la exposición repetida y uniforme a estímulos olfatorios, es un modelo valioso para el estudio de la discriminación de estímulos en esta etapa temprana de la vida.

11. REFERENCIAS

Ackerman, D. (2000). Una Historia Natural de los Sentidos. Editorial Anagrama. 360: 89-152.

Adlard, P. A. y Cotman, C. W. (2004). Voluntary exercise protects against stress-induced decreases in brain-derived neurotrophic factor protein expression. *Neuroscience*. 124: 985-992.

Adolph, E. F. (1957). Ontogeny of physiological regulations in the rat. *Quart. Rev. Biol.* 32: 89-137.

Ahmed, M. G. Bedi, K. S., Warren, M. A. y Kamel, M. M. (1987). Effect of a lengthy period of undernutrition from birth and subsequent nutritional rehabilitation on the synapse: Granule cell neuron ratio in the rat dentate gyrus. *J. Comp. Neurol.* 263: 146-158.

Alberts, J. R. y Cramer, C. P. (1988). Ecology and Experience. En: E. M. Blass (Ed.) *Developmental Psychobiology and Behavioral Ecology*. Plenum Press. New York. Pp.1-39.

Almeida, S. S. y De Araujo, M. (2001). Postnatal protein malnutrition affects play behavior and other social interactions in juvenile rats. *Physiol. Behav.* 1-15; 74: 45-51.

Altman, J. (1969). Autoradiographic and histological studies of postnatal neurogenesis: IV Cell proliferation and migration in the anterior forebrain, with special reference to persisting neurogenesis in the olfactory bulb. *J. Comp. Neurol.* 137: 433-458.

Altman, J. Sudarshan, K., Das, G.D., McCormick, N. y Barnes, D. (1970). The influence of nutrition on neural and behavioral development. III. Development of some motor, particularly locomotor patterns during infancy. *Dev. Psychobiol.* 4: 97-144.

Altman, J. y Bayer, S. A. (1979). Development of the diencephalon in the rat. VI. Re evaluation of the embryonic development of the thalamus on the basis of thymidine-radiographic datings. *J Comp. Neurol.* 188: 501-524.

Altman, J. y Bayer, S. A. (1980). Development of the brain stem in the rat. I thymidine-radiographic study of the time of origin of neurons of the lower medulla. *J. Comp. Neurol.* 194: 1-35.

Altman, J. y Bayer, S. A. (1995). Atlas of prenatal rat brain development (CRC Press Inc., Boca Raton, Florida.), p 589.

Andrade, J. P., Madeira, M. D. y Paula-Barbosa, M. M. (1995). Evidence of reorganization in the hippocampal mossy fiber synapses of adult rats rehabilitated after prolonged undernutrition. *Exper. Brain Res.* 104: 249-261.

Anokhin, P. K. (1964). Systemogenesis as a general regulator of brain development. *Progr. Brain Res.*, 9: 54-86.

Araneda, S., Magoul, R. y Calas, A. (1989). Tracing specific transmitter pathways in the rat CNS: combination of 3H serotonin retrograde labeling with immunocytochemical detection of endogenous transmitters. *J. Neurosci. Meth.* 30: 211-226.

Bedi, K. S. (2003). Nutritional effects on neuron numbers. *Nutr. Neuroscience.* 6: 141-152.

Bedi, K. S., Campbell, L. F. y Mathew, T. M. (1992). A fractionator study of the effects of undernutrition during early on rat Purkinje cell numbers (with a caveat on the use of nucleolias counting units). *J. Anat.* 1881: 199-208.

Berne, R. M. y Levy, M. N. (1992). Actividad eléctrica del corazón. En: R. M. Berne y M.N. Levy (Eds.) Fisiología. Mosby-Year Book Europe LTD. España. Pp. 197-213.

Best, A. R., Thompson, J. V., Fletcher, M. L. y Wilson, D. A. (2005). Cortical metabotropic glutamate receptors contribute to habituation of a simple odor evoked behavior. *J. Neurosci.* 25: 2513-2517.

Borinson, H. L. y Dojman, D. (1970). Persistence of cardioinhibitory response to brain ítem ischemia alter destruction of the area postrema and the dorsal vagal nuclei. *J. Physiol. (London)*, 211: 263-277.

Brake, S. C., Shair, H. y Hofer, A. M. (1988). Exploiting the nursing niche: The infant's sucking and feeding in the context of the mother-infant interaction. En: E.M. Blass (Ed.). *Developmental Psychobiology and Behavioral Ecology*. Plenum Press. New York. Pp. 347-388.

Brennan, P. A. y Keverne, E. B. (1997). Neural mechanisms of mammalian olfactory learning. *Prog. Neurobiol.* 51: 457-481.

Buck, L. B. (2001). Olfato y Gusto: Los sentidos químicos. En: Kandel, E. R. (Ed.) McGraw-Hill. Interamericana. España. Pp. 625-645.

Buck, L. D. (2004). Olfactory receptors and odor coding in mammals. *Nutrition Reviews.* 62: 184-188.

Buck, L. y Axel, R. (1991). A novel multigene family may encode odorant receptors: A molecular basis for odor recognition. *Cell Press. Cell.* 65: 175-187.

Carpenter, R. H. S. (1998). Neurofisiología. Editorial El Manual Moderno, S. A. de C. V. Pp. 328.

Carvell, G. E. y Simons, D. J. (1996). Abnormal tactile experience early in life disrupts active touch. *J. Neurosci.* 16: 2750-2757.

Chusid, J. G. y McDonald, J. J. (1958). *The Brain. Correlative Neuroanatomy and functional neurology.* Lange Medical Publications. Los Altos, California. Pp. 344.

Coopersmith, R. y Leon, M. (1988). The neurobiology of early olfactory learning. En: *Developmental Psychobiology and Behavioral Ecology.* E. M. Blass (Ed.) Plenum Press. New York. Pp. 283-308.

Cordoba, N. E., Arolfo, M. P., Brioni, J. D. y Orsingher, O. A. (1994). Perinatal undernutrition impairs spatial learning in recovered adult rats. *Acta Physiol. Pharmacol. Ther. Latinoam.* 44: 70-76.

Crnic, L. S. (1980). Models of infantile malnutrition in rats: Effects on maternal Behavior. *Dev. Psychobiol.* 13: 615-628.

De Bassio, W. A., Kemper, T. L., Tonkiss, J. y Galler, J. R. (1993). Effect of prenatal protein deprivation on postnatal granule cell generation in the hippocampal dentate gyrus. *Brain Res. Bull.* 41: 379-383.

Díaz-Cintra, S., Cintra, L., Galvan, A, Aguilar, A., Kemper, T. y Morgane, P. J. (1991). Effects of prenatal protein deprivation on postnatal development of granule cells in the fascia dentata. *J. Comp. Neurol.* 310: 356-364.

Escobar, C. y Salas, M. (1987). Ameliorating effects of early sensory stimulation on the behavior of adult rats underfed during the lactating period. *Bol. Estud. Med. Biol. Méx.* 35: 195-202.

Escobar, C. y Salas, M. (1993). Neonatal undernutrition and amygdaloid nuclear complex development: An experimental study in the rat. *Exper. Neurol.* 122: 311-318.

Falkenberg, T., Mohammed, A. K., Henriksson, B., Persson, H., Winblad, H. y Lindefors, N. (1992). Increased expression of brain derived neurotrophic factor mRNA in rat hippocampus is associated with improved spatial memory and enriched environment. *Neurosci. Lett.* 138:153-156.

Fletcher, M. L., Smith, A. M., Best, A. R. y Wilson, D. A. (2005). High frequency oscillations are not necessary for simple olfactory discriminations in young rats. *J. Neurosci.* 26: 792-795.

Fletcher, M. y Wilson, D. A. (2001). Ontogeny of odor discrimination. A method to assess novel odor discrimination in neonatal rats. *Physiol. Behav.* 74: 589-593.

Francis, D., Dioro, J., Laplante, P., Weaver, S., Seckl, J. y Meaney, M. (1996). The role of early environmental events in regulating neuroendocrine development: moms, pups, stress and glucocorticoid receptors. *Ann. NY. Acad. Sci.* 794: 132-152.

Franks, K. M. e Isaacson, J. S. (2005). Synapse-specific downregulation of NMDA receptors by early experience: a critical period for plasticity of sensory input to olfactory cortex. *Neuron.* 47:101-114.

Frazier-Cierpial, L. L. y Brunjes, P. C. (1989). Early postnatal differentiation of granule cell dendrites in the olfactory bulbs of normal and unilaterally odor-deprived rats. *Dev. Brain Res.*, 47: 129-136.

Frendson, R. D. y Spurgeon, T. L. (1995). *Anatomía y Fisiología de los Animales Domésticos*. Ed. Interamericana. México. Pp: 265-280.

Frias, C., Torrero, C., Regalado, M. y Salas, M. (2005). Organization of olfactory glomeruli in neonatally undernourished rats. *Nutri. Neurosci.* (Enviado).

Ganong, W. F. (1998). Mecanismos de regulación cardiovascular. En: Fisiología Médica. W. F. Ganong (Ed.). El Manual Moderno, S. A. de C. V. Pp. 474-484.

García-Ruiz, M., Díaz-Cintra, S., Cintra, L. y Corkidi, G. (1993). Effect of protein malnutrition on CA3 hippocampal pyramidal cells in rats of three ages. *Brain Res.* 625: 203-212.

Granados-Rojas, L., Aguilar, A. y Díaz-Cintra, S. (2004). The mossy fiber system of the hippocampal formation is decreased by chronic and postnatal but not by prenatal protein malnutrition in rats. *Nutr. Neurosci.* 7: 301-308.

Halász, N. (1990). The vertebrate olfactory system. *Chemical neuroanatomy, function and development.* Akadémiai Kiadó, Budapest. Pp. 281.

Halász, N. y Shepherd, G. M. (1983). Neurochemistry of the vertebrate olfactory bulb. *Neurosci.* 10: 579-619.

Hamilton, L. W. (1976). *Basic Limbic System anatomy of the rat.* Plenum Press. New York. EUA.

Haroutunian, V. y Campbell, B. A. (1981). Development and habituation of the heart rate orienting response to auditory and visual stimuli in the rat. *J. Comp. Physiol. Psychol.* 95: 166-174.

Hebel, R. y Stromberg, M. (1986). *Anatomy and Embriology of the Laboratory Rat.* (Eds.) BioMed Verlag. Alemania. Pp. 56.

Hinds, J.W. (1968). Autoradiographic study of histogenesis in the mouse olfactory bulb. I. Cell proliferation and migration. *J. Comp. Neurol.* 134: 305-322.

Hockman, C. H. (1987). *Essentials of Autonomic Functions: The autonomic nervous system: Fundamental concepts from anatomy, physiology, pharmacology and neuroscience for students and professionals in the health sciences*. Illinois, EUA. Pp. 40-42.

Hofer, M. A. (1978). Hidden regulatory processes in early social relationships. En: P. P. G. Bateson and P. H. Klopfer (Eds.), *Perspectives in Ethology*. Vol. 3: Social Behavior. New York: Plenum Press.

Hofer, M. A. y Reiser, M. F. (1969). The development of cardiac regulation in preweaning rats. *Psychosom. Med.* 31: 372-388.

Houssay, B. A., Caldeyro-Barcia, R., Covian, M. R., Fasciolo, J. C., Foglia, V. G., Houssay, A. B., Hug, E., Leloir, L. F., Lewis, J. T., De Soldati, L. (1974). *Fisiología Humana*, Ed. El Ateneo. Pp. 1318.

Ickes, B. R., Pham, T. M., Sanders, L. A., Albeck, D. S., Mohammed, A. H. y Granholm, CH. (2000). Long-term environmental enrichment leads to regional increases in neurotrophin levels in rat brain. *Exper. Neurol.* 164: 45-52.

Imamura, K., Mataga, N. y Mori, K. (1992). Coding of odor molecules by mitral / tufted cells in rabbit olfactory bulb: I. Aliphatic compounds. *J. Neurophysiol.* 68: 1986-2002.

Kandel, E. R. y Schwartz, J. H. (1985). *Principles of Neural Science*. Second Edition. Elsevier. Pp. 979.

Kratskin, I. L. (1995). Functional anatomy, central connections, and neurochemistry of the mammalian olfactory bulb. En: *Handbook of olfaction and gestation*. Doty, R. (Ed) Marcel Dekker. Pp. 103-126.

Laborde, J. V. (1988). Du noyau d'origine, dans le bulbe rachidien des fibres motorices ou cardiaques du nerf pneumogastrique, ou noyau cardiaque. Arch. Physiol. Norm. Pathol. 4: 397-417.

Leah, J., Allardyce, H. y Cummins, H. (1985). Evoked cortical potentials correlates of rearing environments in rats. Biol. Psychol., 20: 21-29.

Lee, M. H. S. y Williams, D. I. (1974). Change in licking behavior of rat mother following handling of young. Animal behavior. 22: 679-681.

Lester, B. M., Klein, R. E. y Martinez, S. J. (1975). The use of habituation in the study of the effects of infantile malnutrition. Dev. Psychobiol. 8: 541-546.

Levitsky, D.A. y Barnes, R. H. (1972). Nutritional and environmental interactions in the behavioral development of the rat: long-term effects. Science, 176: 68-71.

Lokoyanov, N. V. y Andrade, J. P. (2000). Behavioral of protein deprivation and rehabilitation in adult rats: relevance to morphological alterations in the hippocampal formation. Behav. Brain Res. 112: 85-97.

Loranca, A. y Salas, M. (2001). Social play development in pre-weaning olfactory deprived or stimulated rats. Brain Res. 921: 150-159.

Lorenz, K. (1935). Der kumpan in der umwel des vogels. J. Ornithol. 83: 137-213.

Luine, v., Martínez, C., Villegas, M., Magariños, A. y Mc Ewen, B. S. (1996). Restraint stress reversibly enhances spatial memory performance. Physiol. Behav. 59: 27-32.

Lynch, A. (1976). Postnatal undernutrition: an alternative method. Dev. Psychobiol. 9: 39-48.

Mair, R. G. y Gesteland, R. C. (1982). Response properties of mitral cells in the olfactory bulb of the neonatal rat. *Neuroscience*. 7: 3117-3125.

Martin, L.T. y Alberts, J. R. (1982). Associative learning in neonatal rats revealed by cardiac response patterns. *J. Comp. Physiol. Psychol.* 96: 668-675.

Math, F. y Davrainville, J. L. (1980). Electrophysiological study of the postnatal development of mitral cell activity in the rat olfactory bulb. Influence of undernutrition. *Brain Res.* 194: 223-227.

Meaney, M., Dioro, J., Francis, D., Shelley, W., Yav, J., Chapman, K. y Seckl, J. (2000). Postnatal handling increases the expression of AMPc inducible transcription factors in the rat hippocampus: the effects of thyroid hormones and serotonin. *Neurosci.* 20: 3926-3935.

Meaney, M. J., Diorio, J., Widdowson, J., Laplante, P., Caldji, C., Seckl, J. R. y Plotsky, P. M. (1996). Early environmental regulation of forebrain glucocorticoid receptor gene expression: Implications for adrenocortical responses to stress. *Dev. Neurosci.* 19: 49-72.

Meisami, E. (1976). Effects of olfactory deprivation on postnatal growth of the rat olfactory bulb utilizing a new method for production of neonatal anosmia. *Brain Res.* 107: 437-444.

Miller, F. R. y Bowman, J. T. (1916). The cardio-inhibitory center. *Am. J. Physiol.* 39: 149-153.

Mistretta, C. M. y Labyak, S. E. (1994). Maturation of neuron types in nucleus of solitary tract associated with functional convergence during development of taste circuits. *J. Comp. Neurol.* 345: 359-376.

Morgane, P. J., Austin-La France, R. J., Bronzino, J. D., Tonkiss, J. y Galler, J. R. (1992). Malnutrition and the developing nervous system. En: *The Vulnerable Brain and Environmental Risks*. R. L. Isaacson y K. F. Jensen (Eds.). Plenum Press, New York. pp. 3-43.

Morgane, P. J., Austin-La France, R. J., Bronzino, J. D., Tonkiss, J., Díaz-Cintra, S., Cintra, L., Kemper, T. y Galler, J. R. (1993). Prenatal malnutrition development of the brain. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 17: 91-128.

Morilak, D. A., Garlow, S. J. y Ciaranello, R. D. (1993). Immunocytochemical localization and description of neurons expressing serotonin 2 receptors in the rat brain. *Neurosci.* 54: 701-717.

Morokuma, S., Fukushima, K., Kawai, N., Tomonaga, M., Satoh, S. y Nakano, H. (2004). Fetal habituation correlates with functional brain development. *Behav. Brain Res.* 153: 459-463.

National Academy of Science (2003). Guide of the care and use of laboratory animals. 1-7. <http://www.nap.edu>

Neeper, S., Gomez-Pinilla, F., Choi, J. y Cotman, C. (1996). Physical activity increases mRNA for brain-derived neurotrophic factor and nerve growth factor in rat brain. *Brain Res.* 226: 49-56.

Nosaka, S., Kamaike, T. y Yasumaga, K. (1978). Central vagal organization in rats: An electrophysiological study. *Exp. Neurol.*, 60:405-419.

Nosaka, S., Yamamoto, T. y Yasunaga, K. (1979). Localization of vagal cardioinhibitory preganglionic neurons within rat brain stem. *J. Comp. Neurol.* 186: 79-92.

Obrist, P. A. (1976). The cardiovascular-behavioral interaction –As it appears today. *Psychophysiology*, 13: 95-107.

Panhuber, H. y Laing, D. G. (1987). The size mitral cells is altered when rats are exposed to an odor from their day of birth. *Dev. Brain Res.* 34: 133-140.

Pavlov, I. P. (1951). *Conditioned Reflexes*. Feldsher Akush.

Paxinos, G. (2004). *The rat nervous system*. Elsevier, Academic Press. San Diego, California. Pp. 1309.

Perez-Torrero, E., Torrero, C., Collado, P. y Salas, M. (2003). A paradigm of undernourishing and neonatal rehabilitation in the newborn rat. *Nutr. Neurosci.* 6:113-115.

Plotsky, P. M., Meaney, F., Sucheki, D. y Tilders, F. J. H. (1993). Early postnatal experience alters hypothalamic corticotrophin-releasing factor (CRF) mRNA, median eminence CRF content and stress-induced release in adult rats. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 18: 195-200.

Prado- Alcalá, R. (1991). Fisiología del aprendizaje y la memoria. En: Ninomiya, J. G. *Fisiología Humana Neurofisiología*. Manual Moderno. Cap. 15. Pp: 492-508.

Purves, D., Augustine, G. J., Fitzpatrick, D. Katz, L. C. Lamantia y McNamara, J. O. (2001). *Organización del sistema nervioso*. Editorial Médica Panamericana, México. Capítulo 1. Pp. 10-11.

Regalado, M., Torrero, C. y Salas, M. (1999). Maternal responsiveness of neonatally undernourished and sensory stimulated rats: Rehabilitation of Maternal Behavior. *Nutr. Neurosci.* 2: 7-18.

Rosenzweig, M. y Bennett, E. L. (1996). Psychobiology of plasticity: Effects of training and experience on brain and behavior. *Behav. Brain Res.* 78: 57-65.

Rosenzweig, M., Bennett, E. L., Diamond, M. C., Wu, S., Slage, R. W. y Saffran, E. (1969). Influence on environmental complexity and visual stimulation on development of occipital cortex in rat. *Brain Res.* 14: 427-445.

Roth, L. L. y Rosenblatt, J. S. (1968). Self-licking and mammary development during pregnancy in the rat. *J. Endocrinol.* 42: 363-378.

Rubio, L., Torrero, C., Regalado, M. y Salas, M. (2004). Alterations in the solitary tract nucleus of the rat following perinatal food restriction and subsequent nutritional rehabilitation. *Nutr. Neurosci.* 7: 291-300.

Salas, M. Guzman-Flores, C. y Schapiro, S. (1969). An ontogenetic study of olfactory bulb electrical activity in the rat. *Physiol. Behav.* 4: 699-703.

Salas, M. Torrero, C. y Pulido, S. (1984). Long-term alterations in the maternal behavior of neonatally undernourished rats. *Physiol. Behav.* 33: 273-278.

Salas, M., Díaz, S. y Nieto, A. (1974). Effect of neonatal food deprivation on cortical spines and dendritic development of the rat. *Brain Res.* 73: 139-144.

Salas, M., Pulido, S., Torrero, C. y Escobar, C. (1991). Neonatal undernutrition and self-grooming development in the rat: Long-term effects. *Physiol. Behav.* 50: 567-572.

Salas, M., Regalado, M. y Torrero, C. (2001). Recovery of long-term maternal behavior deficiencies of neonatally underfed rats by early sensory stimulation: effects of successive parturitions. *Nutr. Neurosci.* 4: 1-12.

Salas, M., Schapiro, S. y Guzman-Flores, C. (1970). Development of olfactory bulb discrimination between maternal and food odors. *Physiol. Behav.* 5: 1261-1264.

Salas, M., Torrero, C., Regalado, M. y Loranca, A. (1998). The hindlimb hyperextension associated to the urogenital response in newborn underfed rats. *Arch. Med. Res.* 29: 125-132.

Schapiro, S. y Salas, M. (1970). Behavioral response of infant rats to maternal odor. *Physiol. Behav.* 5: 815-817.

Schapiro, S. y Vukovich, K. (1970). Early experience effects upon cortical dendrites: a proposed model for development. *Science.* 167: 292-294.

Scheibel, M. E., Davies, T.L. y Scheibel, A. B. (1973). Maturation of reticular dendrites: loss of spines and developmental of bundles. *Exp. Neurol.* 38: 301-310.

Segura, B., Guadarrama, J. C., Pratz, G., Mercado, V., Merchant, H., Cintra, L. y Jimenez, I. (2004). Conduction failure of action potentials in sensory sural nerves of undernourished rats. *Neurosci. Lett.* 54:181-184.

Servatius, R. J. y Shors, T. J. (1994). Exposure to inescapable stress persistently facilitates associative and nonassociative learning in rats. *Behav. Neurosci.* 108: 1101-1106.

Sirevaag, A. M. y Greenough, W. T. (1988). A multivariate statistical summary of synaptic plasticity measures in rats exposed to complex, social and individual environments. *Brain Res.* 441: 386-392.

Spinelli, D. N., Jensen, F. E. y Di Prisco, G. V. (1980). Early experience on dendritic branching in normally reared kittens. *Exp. Neurol.* 68: 1-11.

Steiner, J. E. (1979). Human facial expressions in response to taste and smell stimulation. *Adv. Child Dev. Behav.* 13: 257-295.

Sullivan, R. M., Wilson, D. A., Lemon, C., Pham, C. y Gerhardt, G. A. (1993). Bilateral 6-OHDA lesion of the locus coeruleus impair associative olfactory learning in newborn rats. *Soc. Neurosci. Abstr.* 19: 565.

Switzer, R. C., De Olmos, J. y Heimer, L. (1985). Olfactory System. En: Paxinos, G. *The Rat Nervous System*. Inc. Kensington, Australia, pp. 1-30.

Teicher, M. H. y Blass, E. M. (1976). Suckling in newborn rats: Eliminated by nipple lavage, reinstated by pup saliva. *Science.* 193: 422-425.

Thompson, R. F. y Spencer, W. A. (1966). Habituation: a model for the study of neural substrates of behavior. *Psychol. Rev.* 73:16-43.

Tonkiss, J. y Galler, J. R. (1990). Prenatal protein malnutrition and working memory performance in adult rats. *Behav. Brain Res.* 40: 95-107.

Torrero, C. Perez, E., Regalado, M. y Salas, M. (2000). Pattern of sucking movements during artificial feeding of neonatally undernourished rats. *Nutr. Neurosci.* 3: 245-254.

Torrero, C., Regalado, M., Perez, E., Loranca, A. y Salas, M. (2003). Neonatal food restriction induces hypoplasia in developing facial motor neurons of rats. *Nutr. Neurosci.* 6: 317-324.

Torrero, C., Regalado, M., Pérez, E., Rubio, L. y Salas, M. (2005). Neonatal food restriction and binaural ear occlusion interfere with the cortical motor pyramids in the rat. *Nutr. Neurosci.* 8: 63-66.

Tresguerres, J. A. F. (1992). *Fisiología Humana*. (Ed) Interamericana. Pp: 500-642.

Tudella, E., Oishi, J., Puglia Bergamasco, N. H. (2000). The effect of oral- gustatory, tactile- bucal, and manual stimulation on the behavior of the hands in newborns. *Dev Psychobiol.* 37: 82-89.

Van Oers, H. J. J., de Kloet, E. R., Whelan, T. Y Levine, S. (1998). Maternal deprivation effect on the infants neural stress markers is reversed by tactile stimulation and feeding but not by suppressing corticosterone. *J. Neurosci.* 18: 10171-10179.

Vassar, R., Chao, S. K. Sitcheran, R., Nuñez, J. M., Vosshall, L. B. y Axel, R. (1994). Topographic organization of sensory projections to the olfactory bulb. *Cell.* 79: 981-991.

Weiss, G. K. y Priora, D. V. (1972). Brainstem sites for activation of vagal cardioaccelerator fibers in the dog. *Am. J. Physiol.* 223: 300-304.

Wilson, D. A. (2000). Comparison of odor receptive field plasticity in the rat olfactory bulb and anterior piriform cortex. *J. Neurophysiol.* 84: 3036-3040.

Wilson, D. A. y Sullivan, R. M. (1994). Neurobiology of early associative learning in the neonate: early olfactory learning. *Behav. Neurol. Biol.* 61: 1-18.

Wilson, D.A. y Leon, M. (1986). Early appearance of inhibition in the neonatal rat olfactory bulb. *Dev. Brain Res.* 26: 289-292.

Woo, C. C. y Leon, M. (1991). Increase in a focal population of juxtglomerular cells in the olfactory bulb associated with early learning. *J. Comp. Neurol.* 305: 49-56.

Zhang, L. y Ashwell, K. W. S. (2001). The development of cranial nerve and visceral afferents to the nucleus of the solitary tract in the rat. *Anat. Embriol.* 204: 135-151.

12. ÍNDICE DE FIGURAS Y GRÁFICAS

Fig.1. Via Olfatoria y principales estructuras involucradas en la via.

Fig. 2. Conexiones del sistema olfatorio principal con énfasis en los posibles circuitos que median las respuestas eferentes tales como cambios autonómicos y hormonales.

Fig. 3. Organización estructural básica del BO y los distintos neurotransmisores que se liberan.

Fig. 4. Neurogénesis en el tallo cerebral

Fig. 5. Posible vía olfatoria involucrada en la respuesta de bradicardia

Fig. 6. Estimulación sensorial mediante la aplicación de masaje diario

Fig. 7. Dispositivo de registro para la discriminación olfatoria en crías recién nacidas.

Diagrama 1: Material y Métodos: Controles

Diagrama 2: Material y Métodos: Desnutridos

Fig. 8. Procedimiento de habituación y habituación cruzada.

Fig. 9. Variables del registro electrocardiográfico consideradas para las mediciones de las bradicardias en términos de cambio de frecuencia cardíaca.

Fig. 10. Toma de muestras por sesiones.

Fig.11. Pesos Corporales

Fig 12. Apertura de meatos auditivos externos y de párpados

Tabla 1. Análisis multifactorial de las diferencias en la frecuencia cardíaca basal asociada a los factores experimentales considerados.

Fig. 13. Frecuencia cardíaca basal de crías en desarrollo.

Tabla 2. Análisis multifactorial de la frecuencia cardíaca de crías recién nacidas durante la habituación primaria y secundaria a dos olores.

Fig.14. Gráficas de las respuestas de bradicardia por edad y por las sesiones de exposición al olor a través del tiempo en los grupos GC, GD, GCE y GDE.

Tabla 3. Coeficientes de variabilidad evaluados durante el proceso de habituación y deshabitación olfatoria de la rata con diferentes tratamientos experimentales durante el desarrollo.

Fig.15. Graficas de los coeficientes de variabilidad en cada edad probada con el procedimiento de habituacion de la frecuencia cardiaca.

Tabla 4. Comparacion estadistica de diferentes factores experimentales sobre la discriminacion olfatoria de la rata en desarrollo.

Fig. 16. Grafica de la capacidad de discriminacion olfatoria de crias recién nacidas de acuerdo a las respuestas de bradicardia durante el proceso de habituacion olfatoria y deshabituacion.