



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
MAESTRÍA EN CIENCIAS (NEUROBIOLOGÍA)  
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA

EFFECTOS DE LA RESTRICCIÓN PERINATAL DE ALIMENTO SOBRE EL  
DESARROLLO DE NEURONAS DEL NÚCLEO AMBIGUO Y LA EMISIÓN DE  
VOCALIZACIONES ULTRASÓNICAS DE LAS CRÍAS.

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
MAESTRA EN CIENCIAS (NEUROBIOLOGÍA)

PRESENTA:

LIC. EN NUT. DORA DELIA LÓPEZ JIMÉNEZ

TUTOR

DR. MANUEL SALAS ALVARADO  
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

DRA. ANGÉLICA MARÍA TERRAZAS GARCÍA  
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN

DR. GERARDO ROJAS PILONI  
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA

MÉXICO, D.F. ENERO 2014



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.



**Universidad Nacional Autónoma de México**

**Instituto de Neurobiología**

**EFFECTOS DE LA RESTRICCIÓN PERINATAL DE ALIMENTO SOBRE EL  
DESARROLLO DE NEURONAS DEL NÚCLEO AMBIGUO Y LA EMISIÓN DE  
VOCALIZACIONES ULTRASÓNICAS DE LAS CRÍAS.**

**Tesis que para optar por el grado de  
Maestra en Ciencias (Neurobiología)**

**Presenta:**

**Lic. en Nut. Dora Delia López Jiménez**

**Director de Tesis  
Dr. Manuel Salas Alvarado**

**Comité Tutorial  
Dra. Angélica María Terrazas García  
Dr. Gerardo Rojas Piloni**

**México, D.F. Enero 2014**

Universidad Nacional Autónoma de México  
Instituto de Neurobiología

Los miembros del Comité Tutorial certificamos que la tesis elaborada por: Dora López Jiménez, cuyo título es: “Efectos de la restricción perinatal de alimento sobre el desarrollo de las neuronas del núcleo ambiguo y la emisión de vocalizaciones ultrasónicas de las crías”, se presenta como uno de los requisitos para obtener el grado de Maestría en Ciencias (Neurobiología) y cumple con los criterios de originalidad y calidad requeridos por la División de Estudios de Posgrado de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Firma

Presidente

Dra. Ma. Teresa Morales Guzmán

Secretario (Tutor)

Dr. Manuel Salas Alvarado

Vocal

Dr. Ismael Jiménez Estrada

Suplente

Dra. Angélica María Terrazas García

Suplente

Dra. Rocío Brenda Anguiano Serrano

Aprobado por el Comité Académico

\_\_\_\_\_  
Coordinador del Programa

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Dr. Manuel Salas por la oportunidad y confianza que me ha brindado durante el proceso de formación de la maestría, por la entrega y dedicación diaria en la realización de este proyecto.

Al Comité Tutoral: Dra. Angélica María Terrazas García, Dr. Gerardo Rojas Piloni y Dr. Manuel Salas Alvarado, por la revisión, sugerencias y aportación para mejorar este proyecto.

A los integrantes de grupo de trabajo del laboratorio (C-03), María Carmen Torrero y Mirelta Regalado Ortega, por su apoyo, paciencia y aportación a este trabajo.

Así como a los estudiantes y al auxiliar del laboratorio C-03 que con su compañía, afecto y comentarios me impulsaron a seguir adelante en cada momento.

Agradecimientos a:

A la Dirección General de Estudios de Posgrado (DGAPA) de la UNAM. Este proyecto fue apoyado parcialmente a través de los proyectos de PAPIIT, No: IN 207310, e IN200413.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología  
Becario No: 406644

A la unidad de enseñanza del INB/UNAM por los generosos apoyos para la realización de los enlaces académicos-administrativos de la Maestría.

A la Unidad de Microscopía del INB, por el apoyo brindado, en particular a la Biol. Lorena López Sánchez por su asesoría en la recolección de imágenes de microscopía.

## RESUMEN

Las alteraciones cerebrales asociadas a la restricción perinatal de alimento (RPA) pueden perturbar diferentes procesos plásticos como el aprendizaje, la memoria y la fonación. Los cuales se han interpretado como el resultado de la interferencia en la organización anatómica de las diferentes áreas cerebrales en desarrollo. Se sabe que en la rata neonata la malnutrición prenatal interfiere con la elaboración de las vocalizaciones ultrasónicas (VUs) mediante mecanismos poco conocidos. La porción caudal del núcleo ambiguo (Ambc), la cual inerva los músculos intrínsecos de la laringe para producir la fonación, constituye un sistema básico para la comunicación ultrasónica. El cual ha sido poco estudiado en sujetos afectados por la RPA. Por otra parte, durante el desarrollo postnatal, el fenómeno incrementado de plasticidad neuronal puede modificar las conductas cognitivas como la memoria y el aprendizaje. La plasticidad juega un papel fundamental en el mejoramiento de la función cerebral. El masaje corporal puede acelerar el crecimiento físico e inducir neurogénesis en diferentes áreas del cerebro. Para analizar los efectos de la RPA, y del masaje se evaluaron mediante la técnica de Golgi-Cox, 20 neuronas motoras multipolares del Ambc por grupo en las siguientes condiciones: Control (C), Desnutrido (D), Control Estimulado (CE) y Desnutrido Estimulado (DE) a tres edades del desarrollo (8,12, y 15 días de edad). El masaje fue aplicado diariamente por 10 min, del día postnatal 4 al 15. Los resultados indicaron que la RPA redujo el número de ramas y la densidad dendrítica de estas neuronas, e indujo cambios espectrales en la emisión de VUs disminuyendo las frecuencias e intensidades en la vocalización descendente. Finalmente, el estudio es relevante tomando en cuenta que la estimulación de tipo masaje durante el periodo pre-destete puede atenuar los efectos de hipoplasia neuronal causada por la RPA.

## SUMMARY

The brain alterations associated to perinatal food restriction may disturb different plastic processes like learning, memory and phonation. Which have been interpreted as a result of an interference with the anatomical organization of the different developing brain areas. It is known that in the rat pup, prenatal malnutrition interferes with the elaboration of ultrasonic vocalizations (UVs) by little known mechanisms. The neuronal caudal portion of the nucleus ambiguous (Ambc), which innervates the laryngeal intrinsic muscles to produce phonation, a basic UVs communication system, which has been poorly studied in subjects affected by perinatal undernutrition. On the other hand, during postnatal development, the enhanced in plasticity phenomena can modify cognitive behaviors such as learning and memory. Plasticity plays a fundamental role in improving brain function. Thus, the body massage may accelerates the physical growth and induce neurogenesis at different areas of the brain. Furthermore, to analyze perinatal undernutrition and body massage effects, 20 multipolar motoneurons of the Ambc were evaluated by the Golgi-Cox technique under the following experimental conditions: Control (C), Underfed (U), Control Stimulated (CS), and Underfed Stimulated (US) at 8, 12, and 15 postnatal days. Body massage was applied during a daily 10 min period from 4 to 15 postnatal days. The results indicated that perinatal undernutrition reduced the number and the dendritic density of these neurons, and induced spectral changes in the UVs emission decreasing the frequency and intensity of the descendant call. Finally, the neuronal findings could be relevant on the view that massage during the pre-weaning period may ameliorate the hypoplastic neuronal alterations caused by perinatal food restriction.

## ÍNDICE

RESUMEN .....	i
SUMMARY.....	ii
I. INTRODUCCIÓN .....	1
II. ANTECEDENTES.....	4
2.1. Características del sonido.....	5
2.2. Emisión de vocalizaciones en roedores .....	8
2.3. Vocalizaciones en crías de rata .....	9
2.4. Estructuras bucales que regulan la emisión de VUs .....	13
2.5. Desnutrición y desarrollo del lenguaje .....	21
2.6. Desnutrición y estimulación sensorial.....	23
2.6.1. Efectos de la estimulación táctil en el desarrollo .....	26
III. JUSTIFICACIÓN.....	28
IV. HIPÓTESIS .....	30
V. OBJETIVOS.....	30
5.1. Objetivo general .....	30
5.2. Objetivos específicos .....	30
VI. SUJETOS, MATERIAL Y MÉTODOS.....	31
6.1. Sujetos experimentales .....	31
6.2. Diseño experimental .....	34
6.2.1 Modelo de desnutrición.....	34
6.2.2 Registro de Vocalizaciones.....	36
6.3. Técnicas Experimentales .....	39
6.3.1 Técnica de Golgi-Cox .....	39
6.3.2 Método de Sholl .....	40
6.3.2 Estimulación táctil (ET) .....	40
6.4. Análisis estadístico.....	43



6.4.1	Análisis del desarrollo físico .....	43
6.4.2	Análisis del desarrollo neuronal.....	43
6.4.3	Análisis de las vocalizaciones .....	43
<b>6</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>44</b>
6.2	Efectos de la RPA sobre el desarrollo físico .....	44
6.2.1	Cambios en el peso corporal.....	44
6.2.2	Cambios en el peso cerebral .....	44
6.2.3	Influencia sobre el porcentaje de la apertura de oídos .....	45
6.2.4	Influencia sobre el porcentaje de la apertura de los párpados ...	47
6.3	Efectos sobre el árbol dendrítico de neuronas multipolares.....	48
6.3.1	Efectos sobre parámetros del perikarya .....	48
6.3.2	Efectos sobre el número de órdenes dendríticos.....	51
6.3.3	Efectos sobre la densidad de las ramas dendríticas.....	54
6.4	Efectos sobre la emisión de VUs de las crías .....	59
6.4.1	Cambios en la tasa de emisión de vocalizaciones .....	59
6.4.2	Análisis espectral de la vocalización descendente .....	61
<b>7</b>	<b>DISCUSIÓN .....</b>	<b>65</b>
7.2	Fenómenos que pueden propiciar los cambios en el desarrollo físico .....	65
7.3	Mecanismos asociados al desarrollo neuronal.....	66
7.4	Efectos de rehabilitación inducidos por la estimulación táctil .....	68
7.5	Mecanismos asociados a la intensidad de la emisión de vocalizaciones.....	71
<b>IX.</b>	<b>REFERENCIAS .....</b>	<b>74</b>
<b>X.</b>	<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>91</b>

## I. INTRODUCCIÓN

En el mundo 1020 millones de personas sufren hambre, 53 millones de ellas ubicados en América Latina. La pobreza alimentaria alcanzó un nivel de 13.8% en el año 2006, y ascendió a 30% en el año 2009. La deficiencia en capacidades intelectuales fue de 20.7 % en el año 2006, y ascendió a 25.1% en el 2008 (UNICEF, 2009). En México, el último censo poblacional indicó que hay 39 millones de menores de 18 años, de los cuales el 53.8 (21.4 millones) se hallan en pobreza. La permanencia anual de la desnutrición crónica infantil en el país, fue de 12.7% (1.2 millones) de los niños y niñas menores de 5 años que viven en zona urbana, mientras que para la población indígena se reflejó en el 25.6 % (2.4 millones), (UNICEF, 2011). De acuerdo con la estadística nacional el 11.1% de los niños menores de 5 años, que viven en zona urbana, y el 20.9% de los niños de zona rural presentan desnutrición crónica, haciendo un total del 13.6% del total de la población infantil en México (Gutiérrez et al., 2012). Los casos de desnutrición a pesar de las diferencias en clasificaciones muestran que los daños por restricción de alimento afectan principalmente a infantes durante la gestación y desarrollo postnatal.

El periodo perinatal (que comprende parte del periodo prenatal, y las primeras semanas post natales) constituye una fase crítica para el desarrollo cerebral del neonato, debido a la concurrencia de procesos citogenéticos de alta importancia, como lo son: la neurogénesis, angiogénesis, diferenciación, migración, sinaptogénesis, gliogénesis, y mielinización celular, que darán origen al establecimiento del SNC, al menos demostrado en roedores (Fowden y Forjead, 2004). A medida que avanza el desarrollo, las neuronas diferenciadas, que ya están preparadas para funcionar, pueden, ante diferentes tipos de estimulación sensorial, cambiar su respuesta. Este cambio sugiere que los estímulos ambientales modifican la morfología y la función de los diversos grupos neuronales del organismo, incrementando su potencialidad funcional, en el fenómeno conocido como plasticidad neuronal (Fagiolini et al., 2009; Jobe et al., 2012). Al nacimiento, en las especies altriciales (especies que al nacer presentan

gran inmadurez motora, sensorial y homeostática), en desarrollo, se hace necesario mantener la comunicación con la madre que les provea de cuidados para su supervivencia. Por ello, las crías emiten una variedad de señales sensoriales de distinta naturaleza, que son reconocidas por la madre para atender sus necesidades. Dentro de estas señales, se halla la emisión de vocalizaciones ultrasónicas (VUs), que se sabe tiene un papel importante en la comunicación que se establece entre la madre y su cría (Farrell y Alberts, 2002).

La naturaleza de estas vocalizaciones se ha caracterizado en distintos modelos animales de aves y mamíferos (pingüinos, perros, murciélagos y roedores) (Balcome y McCracken, 1992; Lengagne et al., 1997; Ulanovsky y Moss, 2008). En los roedores, y más específicamente en la rata neonata, se ha reportado su emisión en respuesta a variados estímulos como lo son la baja temperatura, hipoxia, y la separación maternal (Hofer, 1996; Shair et al., 2002; Alleva et al., 2006; Stevenson et al., 2009). Asimismo, se ha propuesto que, esta emisión tiene como propósito atraer el auxilio, y la atención materna con el fin de acarrear a la cría hacia el nido, y proporcionarle estimulación táctil a través de diversas conductas como lo son la posición de campana (arqueamiento de la espalda y disposición ventral de la madre hacia la cría), el lamido corporal y ano-genital (Brouette-Lahlou et al., 1992). Dichas atenciones permitirán en el neonato que, regule su temperatura corporal, se alimente o se le permita la defecación y la micción (Weaver et al., 2004). Así, se ha demostrado que la estimulación táctil materna induce la activación de sistemas hormonales favoreciendo el crecimiento de la cría (Schanberg et al., 2003; Weaver et al., 2004; Macrí y Würbel, 2006). También se ha demostrado ampliamente que un factor que influye en la emisión de VUs, es la condición de nutrición del neonato y su edad (Juntunen et al., 1978; Tonkiss et al., 2003; Márquez, 2005). Se ha reportado que, las crías desnutridas durante el periodo prenatal emiten menor número de vocalizaciones en comparación con las crías bien alimentadas a la edad de 8 días (Tonkiss et al., 2003). Sin embargo, poco se conoce acerca de los efectos sobre la tasa de emisión (cantidad y duración) y estructura espectral (frecuencias e intensidades) de las vocalizaciones emitidas por las crías desnutridas en respuesta a la

separación maternal en días posteriores a los 8 días, sin que otros factores inductores se encuentren presentes, como es la baja de temperatura corporal.

De esta manera, y basándose en los fenómenos de la organización morfológica y funcional del cerebro y sus interacciones con los diferentes nichos ecológicos que se suceden durante el periodo perinatal, es posible inducir cambios morfológicos en respuesta a estímulos tanto ambientales como de la nutrición, y que definidos a lo largo del establecimiento de los circuitos neuronales, puedan modificar la comunicación con fundamento en la emisión de las vocalizaciones de las crías (Alberts y Cramer, 1988).

Por otra parte, se ha establecido en el modelo de la rata, que la estimulación sensorial temprana en crías recién nacidas, además de promover el desarrollo neuronal y su función a través de distintos mecanismos, es capaz de atenuar la respuesta al estrés tanto a corto como a largo plazo (Acolet et al., 1993; Salas et al., 2001; Hernández et al., 2007; Richards et al., 2012). Tomando en cuenta estos hallazgos, en el presente estudio se analiza la emisión de VUs de crías de rata Wistar desnutrida durante el periodo perinatal, en respuesta a la separación materna inmediata, así como los efectos de dicha desnutrición, y de la estimulación táctil tipo masaje corporal sobre la morfología neuronal de una de las estructuras del tallo cerebral, el núcleo ambiguo porción caudal (Ambc) que regula la actividad laríngea necesaria para la emisión de VUs.

## II. ANTECEDENTES

La comunicación en la vida temprana es dependiente del intercambio de señales sensoriales, provenientes de los órganos de los sentidos que se encuentran en proceso de maduración en el contexto del ambiente uterino, del nido, grupales y sociales (Alberts y Cramer, 1988). Estos estímulos pueden ser olfativos, gustativos, visuales, auditivos, y táctiles.

Los estímulos generados por las crías usualmente desencadenan una conducta adaptativa por parte de la madre (Rosenzweig y Bennett, 1996; Amato et al., 2005). Esta conducta favorece el desarrollo del neonato, y también, modifica el contexto de la emisión de vocalizaciones por parte de las crías. Por otra parte, la percepción de estos estímulos da origen a la transmisión e integración de patrones de información codificada, que enriquecen la organización de los circuitos neuronales, para posteriormente dar una respuesta versátil a dicho estímulo (Segura et al., 2001). En este contexto, las vocalizaciones y otras señales emitidas por las crías son fundamentales para su desarrollo y adaptación en el medio externo.

En los roedores, la percepción de estímulos, como el cambio de temperatura ambiental es de vital importancia, dado que se encuentra ligado al funcionamiento celular (Bettschen et al., 2004). Por esta razón, la rata como especie que procrea crías altriciales, y quienes, tienen una incapacidad homeotérmica, requieren de la temperatura del medio ambiente para mantener su temperatura corporal. Esta situación es provista principalmente por el contacto físico materno y la inclusión en un nido (Bettschen et al., 2004). Por lo que, la falta de contacto materno y la separación del nido genera en las crías la necesidad de emisión de VUs para atraer la atención y el cuidado de la madre (Amato et al., 2005).

Las VUs pueden ser emitidas en diversos rangos de frecuencia; actualmente se han caracterizado y evaluado dichas vocalizaciones en diversas circunstancias, unas de ellas asociadas a la hipoxia, y la hipotermia, caracterizadas por un rango de emisión de 20-45kHz (Choi y Brown, 2003). Mientras que en respuesta a la separación de la madre y asociadas a la interacción social se han reportado en un rango de 50-75kHz (Harmon et al., 2008). Asociado a la emisión de VUs se

encuentra ligada la activación del sistema acústico que permite recibir señales sonoras, para integrar y emitir una respuesta a través de la vocalización iniciada en la laringe. Cabe mencionar, que la apertura de oídos se realiza durante la segunda semana de vida, y consecuentemente está limitada la entrada de señales a través de esta vía (Chang et al., 2005). Sin embargo, la captación de señales por conducción ósea, permite tempranamente a la cría recibir información proveniente de las VUs emitidas por la madre, probablemente ligadas a la interacción necesaria para la comunicación madre-cría (Chang et al., 2005). Por lo tanto, las VUs son importantes para la comunicación entre los congéneres. Dicha emisión ha sido objeto de estudio arduo en los últimos años (Wetzel et al., 1980; Hofer, 1996; Shair et al., 2002; Branchi, 2006) y dichas VUs se han evaluado a través del análisis espectral del sonido emitido por la madre o por la cría. Para tratar de comprender este fenómeno, es necesario conocer y entender las características del sonido, y el contexto de la emisión de VUs.

## **2.1. Características del sonido**

Para comprender las características del sonido emitido por las ratas, es necesario tomar en cuenta los aspectos básicos de las propiedades del mismo. Físicamente, el sonido es definido como el cambio de presión resultado de la vibración y dispersión de ondas sonoras propagadas en el medio ambiente (Brown, 2010). El sonido es una onda longitudinal que al propagarse en un medio elástico y continuo, genera una variación de presión local. Esta onda cuenta con magnitudes físicas que son la frecuencia [número de repeticiones de la onda por segundo (Hz)], y la amplitud [indica la energía que contiene una onda medida en decibeles (dB)]. Estas unidades al graficarse contra el tiempo resultan en las conocidas propiedades del sonido, como lo es el tono, la intensidad y el timbre (Figura 1). Las unidades mencionadas pueden definirse de la siguiente manera:



orificio (glotis), que permite el flujo de aire continuo (Figura 2), lo cual favorece la emisión del sonido (Ludlow, 2005).

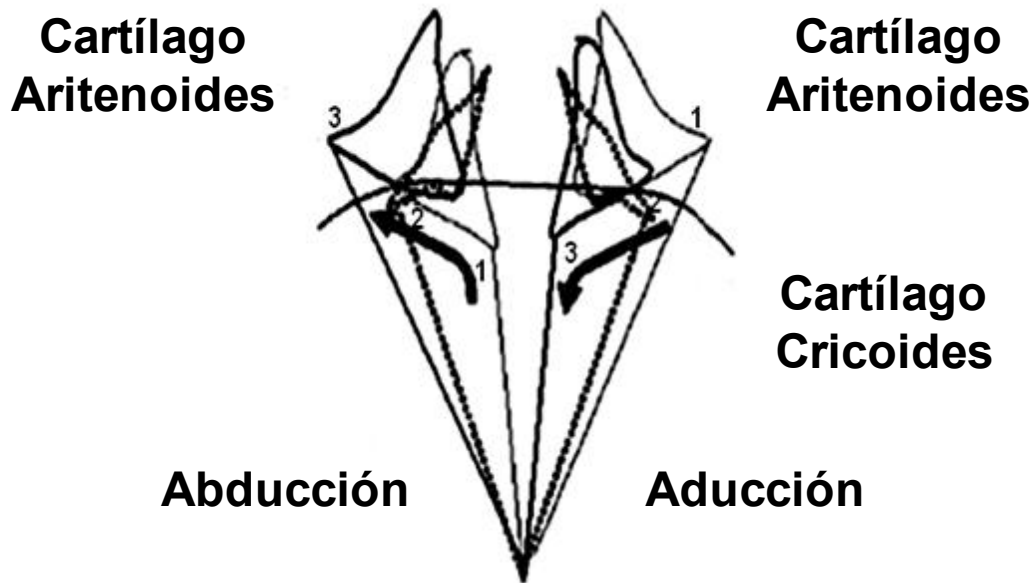


Figura 2. Esquema del movimiento progresivo (1, 2, 3) del cartílago durante la aducción y la abducción. (Modificada de Ludlow, 2005).

La diversidad de emisión de sonido es amplia, y en este sentido, el sonido emitido puede ser de distintos tipos (audible, infrasonido y ultrasonido), todos ellos han sido clasificados para su comprensión de acuerdo a la percepción del oído humano (Zeskind et al., 2011). El oído humano puede percibir frecuencias de emisión de 20Hz a 20kHz. En particular la rata, puede emitir y percibir frecuencias mayores a 20kHz (Branchi, 2006).

El sonido audible: Corresponde al generado por las ondas sonoras que tiene un rango de frecuencia de 20 a 20,000Hz (Branchi, 2006; Zeskind et al., 2011).

El infrasonido: Son los sonidos producidos por ondas sonoras que tienen frecuencias por debajo del rango audible, es decir menor a 20Hz.

El ultrasonido: Corresponde a ondas sonoras producidas con frecuencias mayores a 20kHz, que se han reportado hasta los 120kHz (Zeskind et al., 2011).



## **2.2. Emisión de vocalizaciones en roedores**

En los roedores se puede apreciar la emisión de tres sonidos diferentes:

- 1) Las vocalizaciones audibles, que se componen de una frecuencia principal, y numerosas frecuencias armónicas, que son perceptibles al oído humano (Zeskind et al., 2011).
- 2) Los chasquidos caracterizados por tener una duración corta, y no contar con una frecuencia fundamental distinguida, ya que la banda de frecuencias en las que se presenta es amplia y son perceptibles al oído humano (Márquez, 2005).
- 3) Los ultrasonidos, contruidos por el sonido puro que se presentan con una alta frecuencia, la cual puede variar tal como su intensidad durante la vocalización (Riede, 2011).

Los ultrasonidos y las vocalizaciones audibles son producidos durante la fase de espiración del ciclo respiratorio. Los sonidos audibles a diferencia de los ultrasonidos se amplifican a través de la cavidad buco-nasal enriqueciéndose con las ondas cuasi estacionarias (formantes), que corresponden a sus frecuencias armónicas o acompañantes, mientras que los ultrasonidos provienen exclusivamente de la cavidad bucal, se generan por los movimientos exclusivos de la laringe, y se componen de la frecuencia fundamental y sus armónicas puras sin la amplificación en la cavidad nasal (Riede, 2011).

Los sonidos emitidos, tienen una distribución de la energía sonora con diferentes frecuencias armónicas, que al digitalizarse generan un espectro proveniente de la intensidad de las mismas. La estructura de las VUs puede ser estudiada mediante el análisis espectral de dicha emisión. Actualmente, diversos autores han estudiado las características de esta emisión en los roedores, y así se han descrito varios tipos de vocalizaciones con diferente espectro. Por ejemplo, se

muestran los espectrogramas característicos y su descripción con base en la forma de las VUs emitidas por crías con malnutrición en respuesta a la separación materna, y su baja de temperatura corporal en un periodo de 2 minutos a los 7, 9, y 11 días de edad (Figura 3), (Tonkiss et al., 2003).

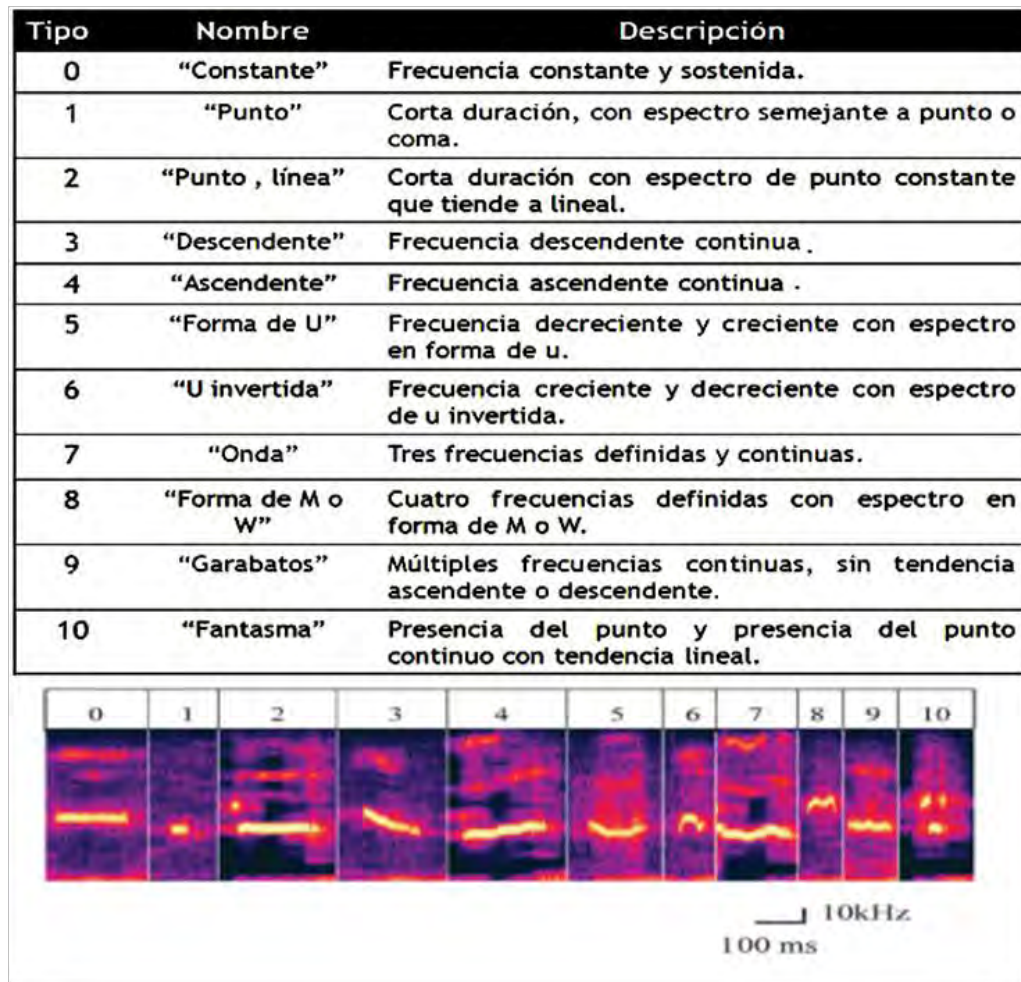


Figura 3. Descripción del tipo de espectro característico de la vocalización en la rata. (Modificada de Tonkiss et al., 2003).

### 2.3. Vocalizaciones en crías de rata

Dentro de las relaciones madre-cría en los roedores, se despliegan una serie de conductas que permiten la vinculación materno-filial en el periodo postnatal (Figura 4), (Fleming et al., 1999; Numan, 2006; Wu y de Groat, 2006; Moriceau et al.,

2010). En este contexto, es necesaria la comunicación madre-cría, donde las vocalizaciones emitidas por los neonatos provocan la atención de la madre ante las necesidades fisiológicas de éstos.

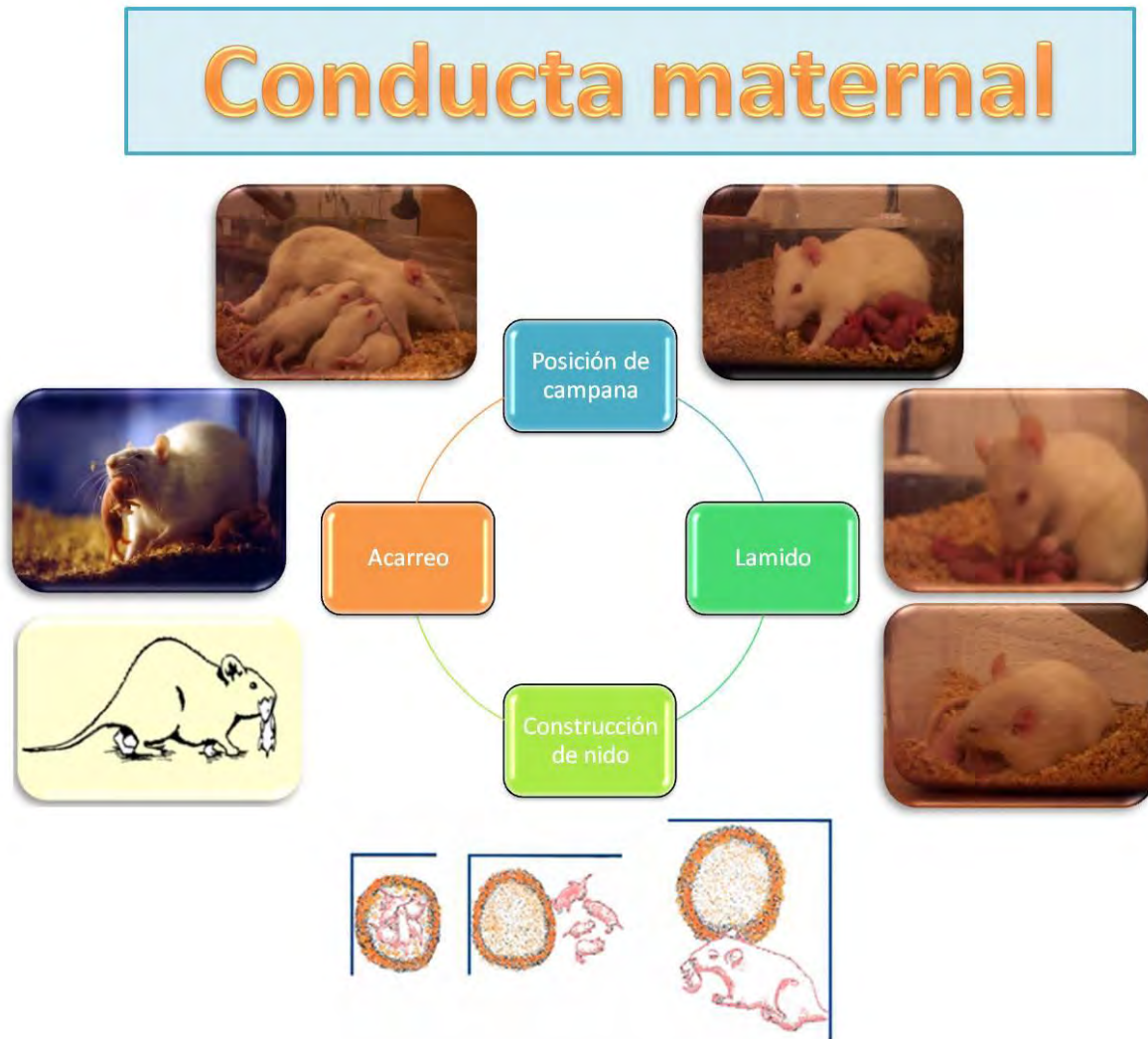


Figura 4. Etograma de la conducta materna que permite el cuidado de la cría durante la etapa postnatal. Las VUs se expresan en el contexto de la conducta materna.

La emisión de VUs en las crías presenta varias características, que se han medido en tres aspectos específicos: uno de ellos es la organización temporal, la cual conceptualmente se refiere a la medición en dos aspectos: uno es a través de la duración [duración en milisegundos (ms) de la vocalización ultrasónica

individual], o por el intervalo [periodo de tiempo entre el término de la vocalización y el inicio de la siguiente vocalización], la segunda forma es a través de un estudio espectral, en donde se cuantifica dentro de una muestra de vocalizaciones, la frecuencia mínima [el pico de frecuencia mínima alcanzada en la vocalización (F1)], la frecuencia máxima [el pico de frecuencia máxima alcanzada en la vocalización (F2)], la amplitud máxima [intensidad en dB, alcanzada en la vocalización (F3)], la frecuencia última [la frecuencia final en la vocalización (F4)]. Así como las intensidades que se alcanzan cuando se presentan dichas frecuencias acompañantes, y la frecuencia fundamental [la frecuencia sostenida en la vocalización (F0)]. Todos estos parámetros, pueden ser evaluados como aspectos integrales de la vocalización. Otra forma de reportarlas es mediante la desviación estándar, y la varianza de la frecuencia fundamental entre las vocalizaciones de distintos individuos. La tercera forma es mediante una estructura acústica, basada en categorías de los espectrogramas de la vocalización; dichas características de la vocalización van cambiando conforme avanza la edad de la cría (Zeskind et al., 2011).

En este concepto de mediciones, se sabe que el número de vocalizaciones es reducido al nacimiento, pero presenta un pico de incremento aproximadamente en el día 11 ó 12 postnatal. De acuerdo con algunos estudios la duración de la vocalización, el pico de la frecuencia y el complejo espectral se incrementa con la edad, mientras que la amplitud de la frecuencia fundamental se reduce (Brudzynski et al., 1999; Blumberg et al., 2000; Brudzynski et al., 2005). Además dichas vocalizaciones, se ven modificadas en frecuencia y duración por factores como la temperatura, la disminución de oxígeno del ambiente, el estrés y la edad del recién nacido (Saucier et al., 2008). En varios estudios realizados durante la etapa del desarrollo de la rata (Brudzynski et al., 1999), se han descrito espectros característicos de dicha emisión (Figura 3). Por ejemplo se puede observar, que la duración, el ancho de banda, y la frecuencia se incrementan de manera significativa a medida de que la edad de la cría avanza, en respuesta a un periodo de separación materna (Figura 5) (Brudzynski et al., 1999).

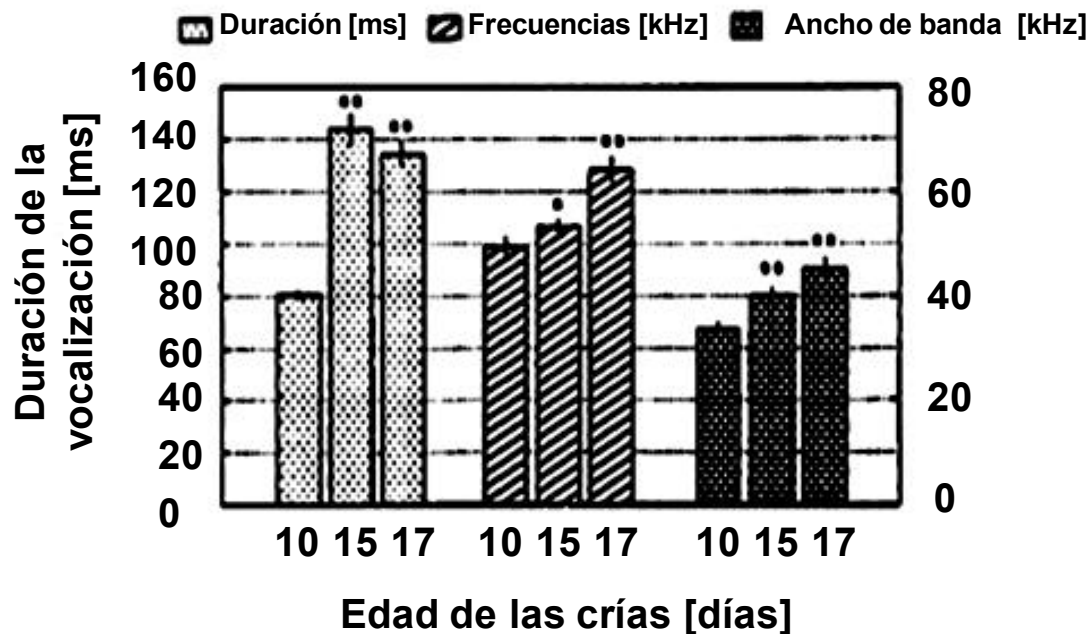


Figura 5. Emisión de vocalizaciones ultrasónicas en crías de roedores de 10 a 17 días de edad, en respuesta a la separación materna previa, y la separación inmediata del nido, a temperatura de 6 grados. (Modificada de Brudzynski et al., 1999).

Por otra parte, los estímulos sensoriales juegan un papel crucial en la emisión de vocalizaciones por parte de las crías. No solo los efectos por cambio de temperatura y separación materna, también los aromas y la estimulación táctil modifican la emisión de VUs en la crías, ya que la cría emite menor número de VUs cuando se expone al nido, que cuando no se encuentra expuesto a éste; así mismo, reduce su emisión cuando se encuentra en el nido sucio dentro de su caja (Oswalt y Meier, 1975; Conely y Bell, 1978). La producción de vocalizaciones por parte de las crías altriciales, es sensible como podemos apreciar a los cambios en el desarrollo físico, al cuidado materno y a los cambios ambientales. Por otra parte, en estudios recientes se ha sugerido que los cambios en la producción de VUs refleja las alteraciones en el estado de estrés de la cría (Hofer, 1996; Branchi et al., 2001). Estudios tanto en infantes como en crías de rata con malnutrición se presentan efectos en la emisión de vocalizaciones y deficiencia en el lenguaje (Tonkiss et al., 2003; Nassar et al., 2011).

## **2.4. Estructuras bucales que regulan la emisión de VUs**

Las VUs se inician en la fase de inspiración, y se ejecutan durante la fase de espiración del ciclo respiratorio. Dado que, las VUs son sonidos exclusivos de la cavidad bucal, por ende son dependientes de la inervación de los músculos laríngeos intrínsecos, que permiten regular los movimientos de las cuerdas vocales y de la glotis (Duarte et al., 2006; Riede, 2011). La glotis es importante para dos aspectos, uno es la fonación, y el otro es el mecanismo de defensa ante el paso accidental de líquidos o de alimento, que bajo la forma de pequeños fragmentos puede obstruir el paso de aire.

En los seres humanos la producción de la voz requiere de tres componentes básicos: uno de ellos es la fuerza para generar el flujo de aire, el segundo es el mecanismo para convertir el flujo de aire en ondas sonoras, y el tercero la amplificación selectiva de las ondas sonoras, para producir una señal que pueda ser interpretada por el cerebro como lenguaje. En la rata los dos primeros componentes son claros, pero aún se desconoce si existe la amplificación selectiva debido al amplio uso del ultrasonido y si los espectrogramas son el reflejo de dicho lenguaje. Sin embargo, para fines de comprensión de los mecanismos fisiológicos de producción de la voz, se parte de la comprensión de cómo funciona la laringe, y del entendimiento de los conceptos básicos aerodinámicos.

Para producir la voz, las cuerdas vocales se abren y se cierran en respuesta a la interacción de la fuerza del flujo de aire y de la fuerza tisular de la laringe. Cuando las cuerdas se abren o se cierran, se produce una onda de presión longitudinal que se propaga a través del tracto vocal, cuya frecuencia a su vez se compone de varias armónicas. Uno de los componentes aerodinámicos elementales en este fenómeno, es la presión subglotal ( $P_{th}$ ), ya que en una respiración pasiva, las cuerdas vocales van a la línea central de la glotis, el aire proveniente de los pulmones fluye causando un incremento de la  $P_{th}$  que abre las cuerdas vocales. Cuando estas se desplazan a los extremos, permiten que el aire que fluye reduzca la presión entre ambas, y que la tensión en los músculos

regrese las cuerdas a la línea central, este fenómeno se repite de manera cíclica y es esencial en el proceso de la fonación (Ludlow, 2005).

Estudios en seres humanos control sin entrenamiento ni padecimientos auditivos o vocales ante la pronunciación repetitiva de la sílaba “pae” demostraron que el incremento de Pth, y el rango de declive del flujo máximo de aire inducen el incremento en la intensidad de la voz, mediante el registro del flujo de aire, la intensidad del sonido y la Pth (Holmberg et al., 1987). Mostrando que los cambios de inercia en el movimiento del flujo de la onda en el tracto vocal, y la diferencia en la fase horizontal en el movimiento de la cuerda vocal pueden inducir cambios en la frecuencia fundamental (F0) de dichos sujetos.

Por otro lado, se ha sugerido que la F0 se asocia posiblemente al cambio de presión subglotal, debido a que con fundamento en los registros electromiográficos (EMG) obtenidos *in vivo*, durante la vibración de la cuerda vocal ante la pronunciación de una sílaba “i” se mostró que a medida que se incrementa la Pth se incrementa la F0. Estableciéndose una correlación lineal entre ambos registros, definiendo que el sostenimiento de la Pth se haya ligado a la intensidad (Plant et al., 2009). Sin embargo, los cambios generados en la F0 reflejan diferencias en el control muscular entre los sujetos, ya que la activación de los músculos laríngeos afecta la posición de la cuerda.

De acuerdo con estudios histológicos, la construcción de la cuerda vocal se haya distribuida en cuerpos celulares que constituyen el músculo tiroaritenoides (TA) y una capa adyacente de fibras de tejido colágeno que forman el epitelio de la cuerda vocal; por ende los cuerpos celulares están disponibles para activar los cambios de rigidez y elongación mediada por la activación del músculo TA, mientras que la capa de epitelio se relaja o contrae dependiendo de la activación del cricotiroideo (CT) y del TA en conjunto (Chhetri et al., 2011). Estos estudios electrofisiológicos en caninos, mediante la estimulación del nervio laríngeo superior (NLS) y el nervio laríngeo recurrente (NLR) muestran que la frecuencia fundamental, y sus armónicas aparecen abruptamente cuando la Pth se incrementa (Figura 6).

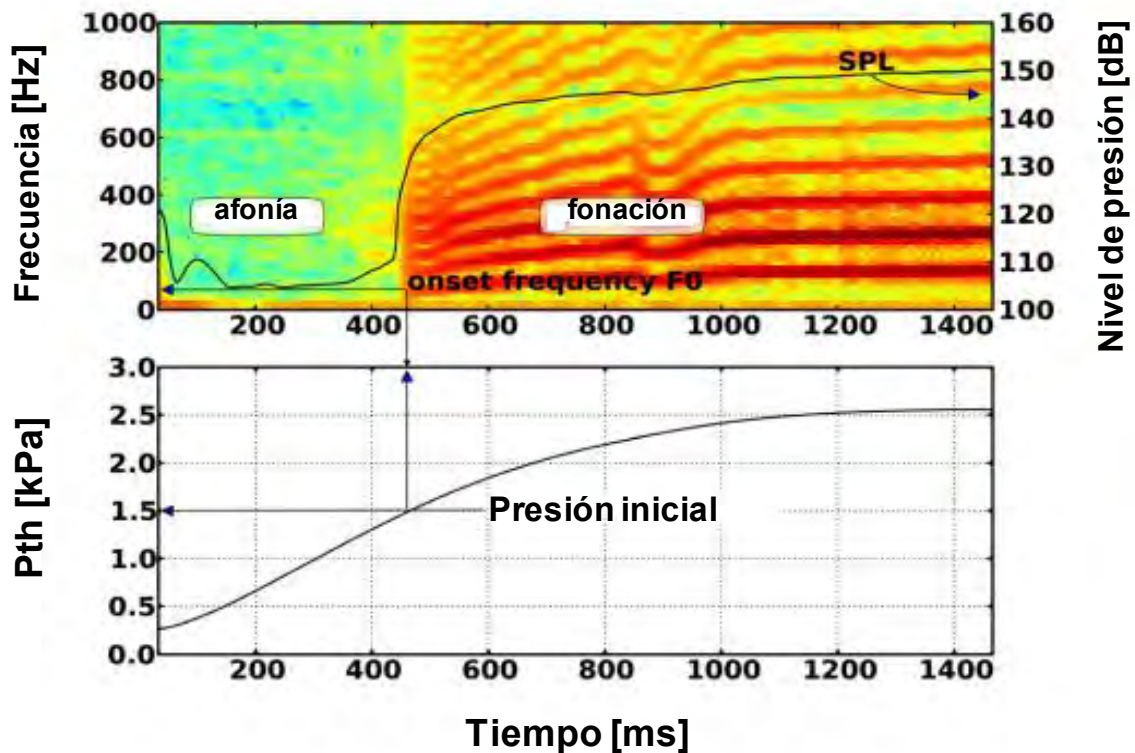


Figura 6. Cambios en F0 y Pth ante la estimulación con una duración de (1500ms), por activación del nervio laríngeo superior (NLS) y del nervio laríngeo recurrente (NLR) en caninos. En la parte superior se presenta el espectrograma acústico subglotal y en la gráfica inferior la respuesta en la presión subglotal. (Modificada de Chhetri et al., 2011).

Además se ha observado que la estimulación bilateral activa de los músculos abductores (TA/LCA/IA) responde a su máxima activación mediados por el NLR y que la actividad simétrica bilateral del CT responde a su máxima activación mediado por el NLS (Figura 7).



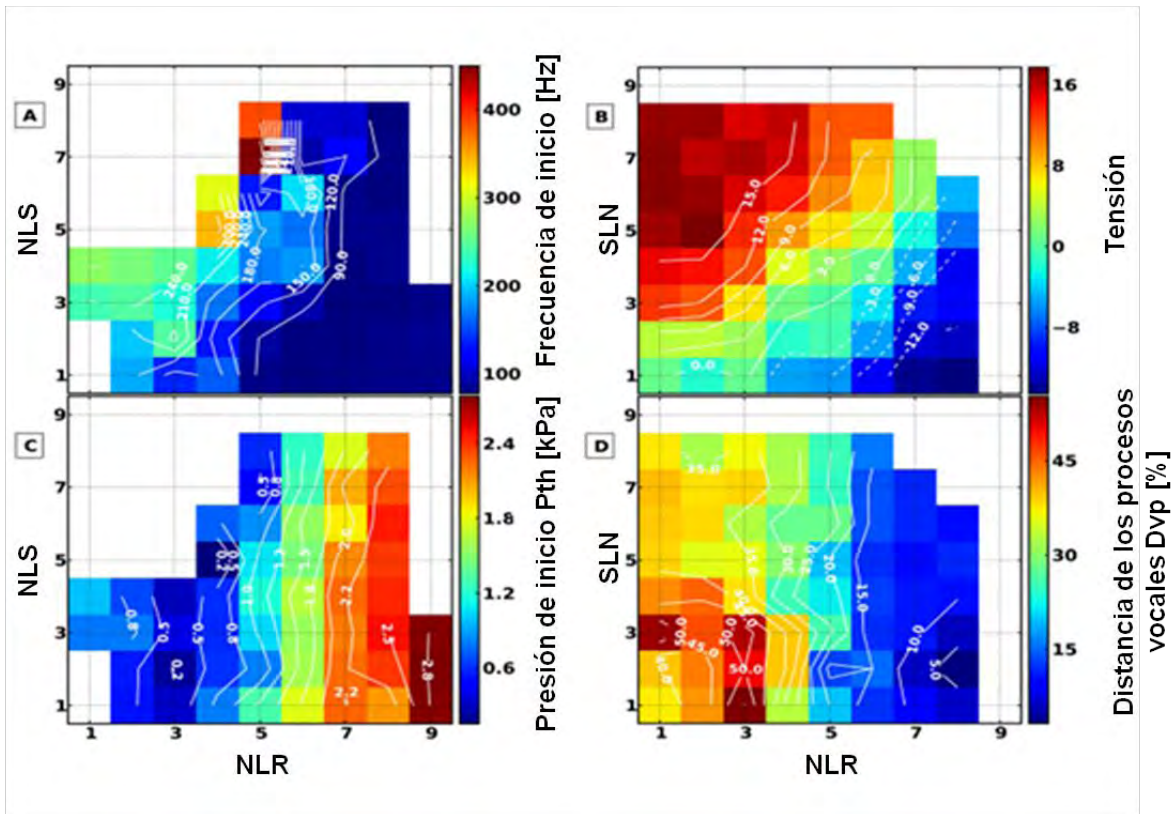


Figura 7. Gráficos de activación muscular ante la estimulación aplicada en el NLS y NLR (después de la división de las ramas del PCA para activar el músculo CT y los abductores respectivamente. 1: CT en contraste con los abductores (TA/LCA/IA). En (A) respuesta de la F0, (B) tensión, (C) presión subglotal (Pth), (D) distancia glotal entre los procesos vocales (Dvp). (Modificada de Chhetri et al., 2011).

Por lo tanto, el control de la inervación de estos músculos es crucial para la vibración de las cuerdas vocales, y para definir los parámetros de la voz, tales como la frecuencia fundamental, las armónicas acompañantes, y la aerodinámica laríngea (Figura 8), (Chhetri et al., 2010; 2011).

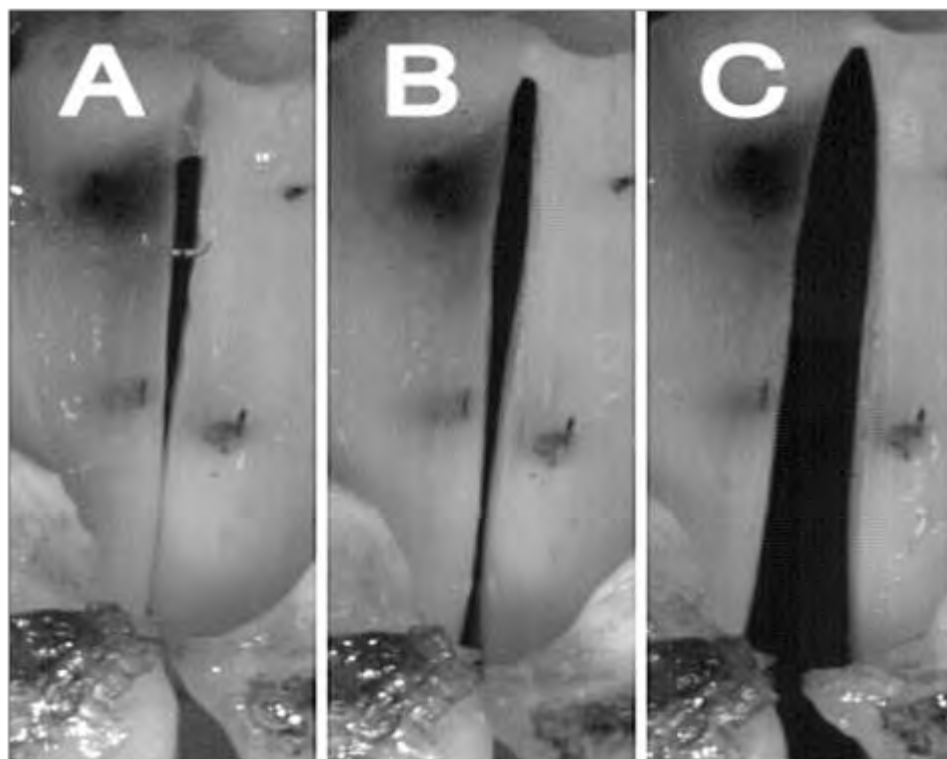


Figura 8. Imágenes de la configuración glotal ante la activación muscular máxima (estimulación en NLR para la activación de los músculos LCA/IA y NLS para la activación del CT), mostrando los cambios en la postura prefonatoria, en regiones de transición de fonación a la afonía. En (A) LCA/IA nivel 5 vs CT nivel 1, (B) LCA/IA nivel 5 vs CT nivel 6, (C) LCA/IA nivel 5 vs CT nivel 11. Los niveles corresponden al grado de activación que lleva a la contracción de los músculos. (Tomada de Chhetri et al., 2011).

No obstante, se ha estudiado la respuesta neuronal en los núcleos del tallo cerebral, y se ha observado que las motoneuronas del núcleo ambiguo se sincronizaban con la emisión de ultrasonido (Figura 9), y que las lesiones en el NLR y el NLS alteraban la función glotal normal (Yajima y Hayashi, 1983).

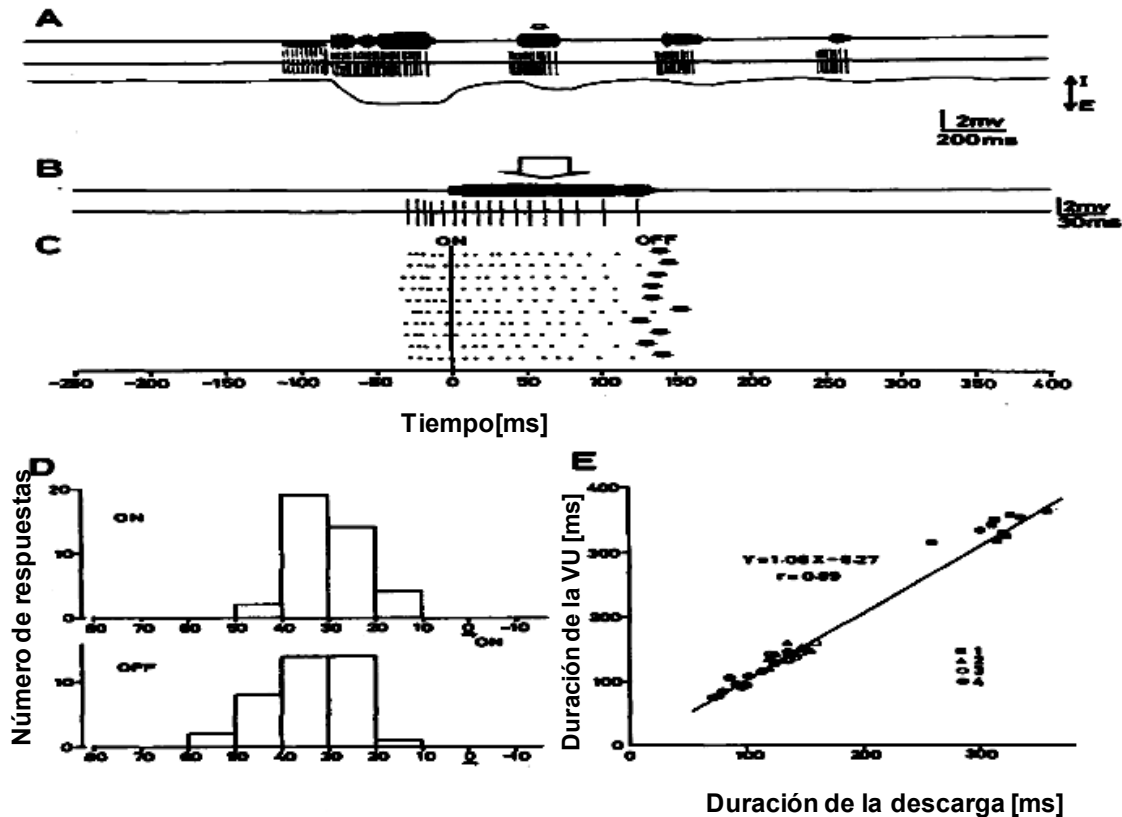


Figura 9. (A) Descarga típica durante la unidad de ultrasonido (US). En la parte superior el registro del ultrasonido, en la parte medial la descarga neuronal de la división ventral del Amb, en la parte inferior la fase de respiración. La parte lineal refiere el artefacto del estímulo. En (B) la descarga neuronal completa cuando aparece el segundo componente de la vocalización presentada en una escala de tiempo expandido. En (C) el despliegue de 10 unidades de descarga que se alinean al despliegue de los componentes del sonido. La flecha negra indica el término del ultrasonido. En (D) histogramas de tiempo al on y al off. Las abscisas corresponden al inicio y término del ultrasonido on y off. Observe cómo la descarga neuronal es puntual en un periodo de tiempo al inicio y al final del ultrasonido. En (E) duración del ultrasonido en función de la duración de la descarga, donde el coeficiente de correlación lineal es de 0.99, el cual responde a una ecuación lineal  $Y=1.06 X-6.27$ . (Modificada de Yajima y Hayashi, 1983).

Sin embargo, estos disparos parecen ser sólo el silencio y el inicio de la emisión, mientras que otras partes del núcleo pudieran modular la vocalización, por ende el núcleo ambiguo juega un papel integrador en los reflejos que resultan en la emisión de la vocalización (Yajima y Hayashi, 1983).

Por otro lado, los estudios actuales se han enfocado en el análisis de los fenómenos aerodinámicos de las vocalizaciones ultrasónicas de 22 y 55kHz en la rata adulta, empleando la actividad electromiográfica (EMG) de los músculos intrínsecos de la laringe (TA y CT) encontrándose que tanto en la vocalización de 22kHz como en la vocalización de 50kHz se generan cuando la actividad muscular y la Pth se elevan (Figuras 10 y 11). Sin embargo, a diferencia de los seres humanos la F0 fundamental se incrementa, mientras la Pth se sostiene, por lo que sugiere que no se relacionan directamente (Riede, 2011).

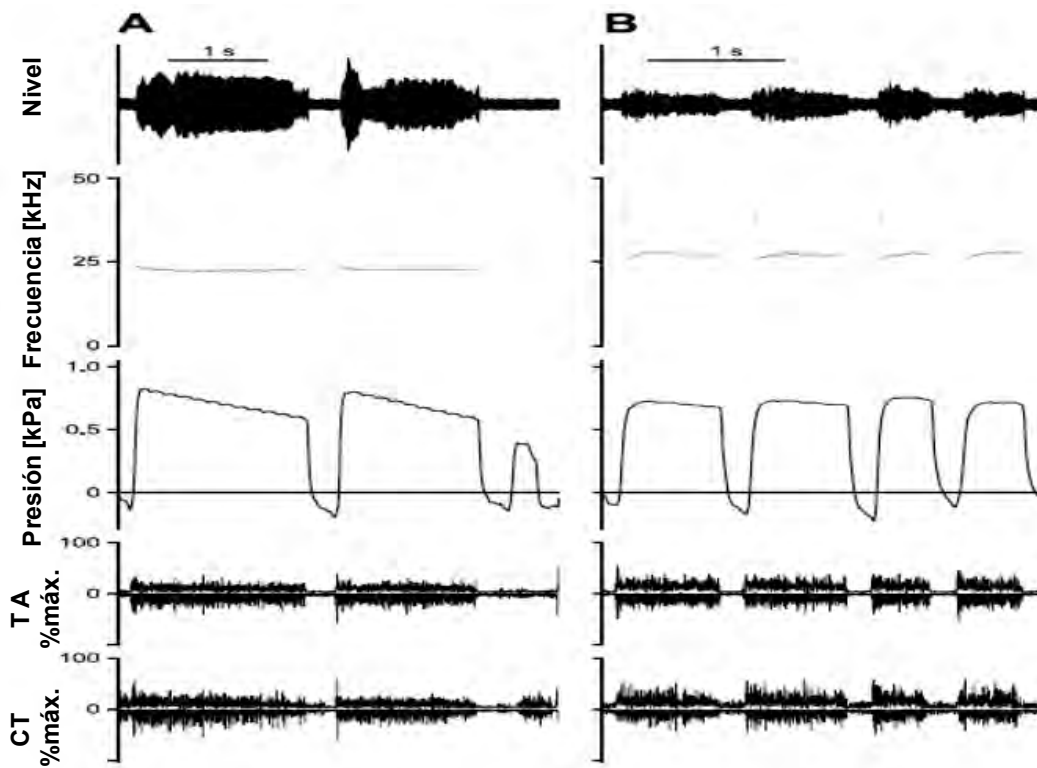


Figura 10. Presión subglotal y actividad EMG de los músculos TA Y CT durante la vocalización de 22kHz de dos sujetos (A y B), (Modificada de Riede, 2011).

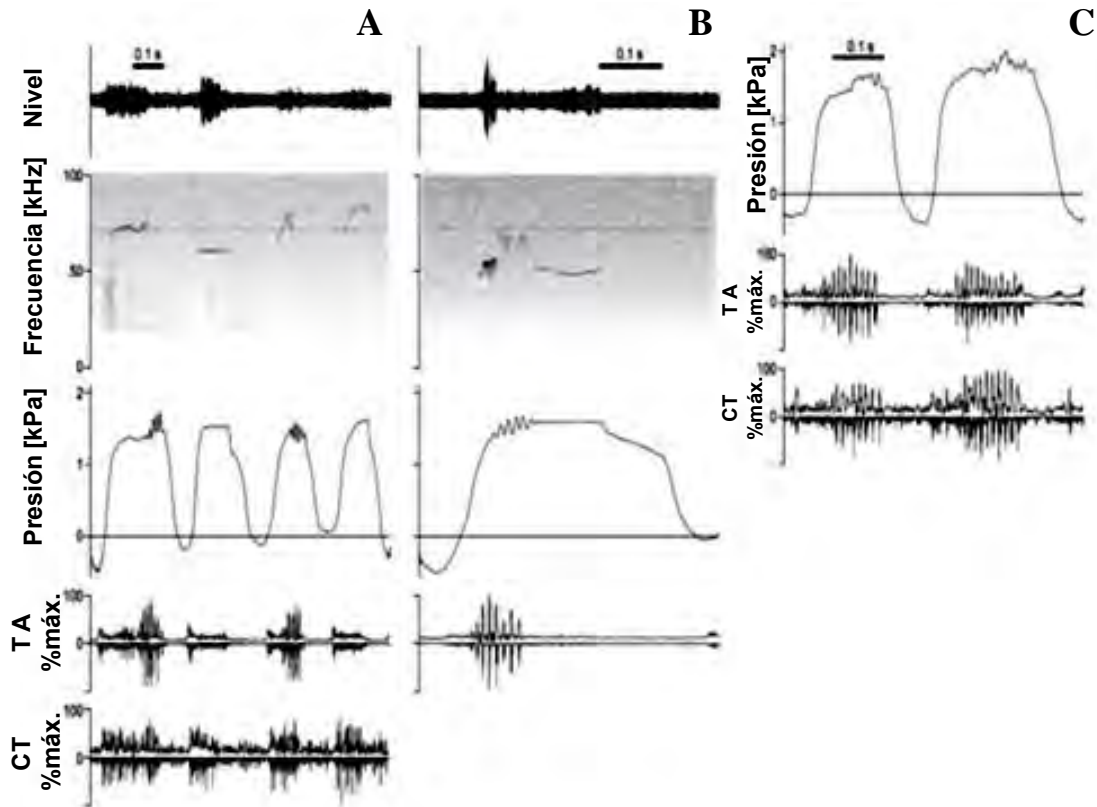


Figura 11. Actividad EMG de los músculos TA y CT durante la vocalización de 50kHz de tres sujetos (A, B, C); como se observa las frecuencias moduladas se asocian a la respuesta corta de EMG. En C el sonido no fue registrado pero la señal de presión es similar a la de los sujetos donde se registró la vocalización. (Modificada de Riede, 2011).

Por consecuencia tanto en otras especies como en la rata se requiere de una coordinación de actividad muscular y de mecanismos aerodinámicos para la producción de la vocalización, en este caso ultrasónica. Sin embargo, la correlación precisa del mecanismo parece no ser idéntica entre las especies, ya que la regulación de los músculos laríngeos en la rata no presenta una respuesta pasiva en comparación con los reportados en seres humanos (Riede, 2011). Sin embargo, las estructuras mantienen un correlato funcional y estructural como lo son, las áreas de tallo cerebral (Yajima y Hayashi, 1983), lo cual lo hace un modelo adecuado para el entendimiento de los fenómenos vocales. De estudios de colocalización de marcaje generado por la inyección en los nervios NLS y NLR,

se conoce que, los núcleos del tallo cerebral juegan un papel importante en la regulación de su actividad. Entre estos núcleos se haya el núcleo ambiguo porción caudal y porción ventral (Pascual-Font et al., 2006; Bautista et al., 2010). El núcleo Amb es una columna de células situadas en la formación reticular entre el núcleo trigémino espinal y el complejo olivar inferior, que se extiende desde el nivel de la decusación del lemnisco medial hasta el tercio rostral del complejo olivar inferior, compuesto de neuronas motoras inferiores colinérgicas multipolares en su mayoría. Los axones de estas neuronas situadas en la parte caudal del Amb, forman la porción craneal del nervio espinal accesorio, que se proyectan en situación caudal a las fibras del vago, para posteriormente unirse a las fibras del nervio vago formando el NLR. Como resultado de esta vía de inervación eferente se regula parte de la inervación de los músculos intrínsecos de la laringe necesaria para la emisión de las vocalizaciones, y para el caso de los roedores la emisión de vocalizaciones de carácter ultrasónico (Riede, 2011). Se sabe que las neuronas de la parte caudal del núcleo, forman parte del control de la actividad respiratoria no generadora de ritmo respiratorio, pero que es esencial para el establecimiento de la ritmicidad respiratoria, y el flujo de aire por la glotis. Asimismo, la convergencia del NLS con la raíz del nervio vago, es también importante, en un contexto general para la emisión de vocalizaciones, ya que regula también el músculo CT implicado en los cambios posturales primordiales para la fonación (Wang et al., 2006; Ai et al., 2007).

## **2.5. Desnutrición y desarrollo del lenguaje**

La disponibilidad de alimento durante el desarrollo es de vital importancia para el organismo, con ello se llevan a cabo los fenómenos de neurogénesis, diferenciación, especialización y establecimiento de circuitos neuronales. Así, la deficiencia de alimento durante el periodo perinatal afecta la estructura y función cerebral. De estudios en roedores se sabe que, bajo condiciones de ayuno crónico las neuronas de estructuras del tallo cerebral reducen su número, desarrollo dendrítico y conectividad sináptica con otras estructuras. Dicho daño ocasiona que

se reduzca la posibilidad de recibir, integrar y dar respuesta a las señales provenientes de diversas estructuras sensoriales en su camino a la corteza cerebral. Uno de estos estímulos son las vocalizaciones emitidas por las crías, por lo que su alteración disminuye la posibilidad de demandar la atención materna para su supervivencia en el hábitat del nido y sus cercanías al interrumpirse o alterarse la comunicación con la madre (Perez et al., 2002; Tonkiss et al., 2003; Márquez, 2005). Estudios en infantes humanos con desnutrición crónica de tipo marasmo (caracterizado por emaciación muscular, deficiencia multi vitamínica y bajo peso para la talla) fueron evaluados en el aspecto de recepción, expresión y lenguaje total por la prueba arábica de lenguaje (ALT) y coeficiente de inteligencia basada en la escala de Stanford-Binet, dicho estudio mostró que el lenguaje es deficiente para la edad, y su edad mental es menor respecto a los niños bien alimentados (Nassar et al., 2011).

Otros estudios han evaluado las características del llanto de los bebés con desnutrición crónica y han reportado cambios en la frecuencia fundamental, así como en los máximos y mínimos del espectro de dicho llanto (Juntunen et al., 1978). Asimismo, en los últimos años se ha estudiado la emisión de las vocalizaciones de las crías que fueron sometidas a la restricción de alimento durante el periodo prenatal, y se ha reportado que se disminuye la emisión por parte de estos animales comparados con sus controles en edades tempranas en específico algunos tipos de vocalizaciones (Figura 12).

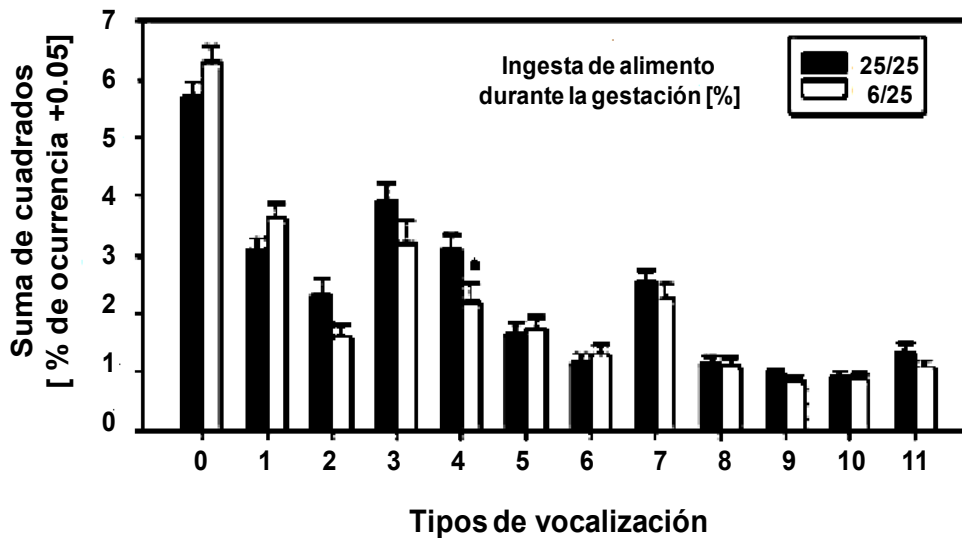


Figura 12. Media de la ocurrencia de tipos de vocalización en 30 vocalizaciones de crías malnutridas vs crías control. (Modificada de Tonkiss et al., 2003).

## 2.6. Desnutrición y estimulación sensorial

Existe una secuencia de maduración en los sistemas sensoriales tanto en los seres humanos como en la rata, que obedece a un programa establecido genéticamente que se expresa durante el periodo perinatal, y que sufre grandes cambios estructurales y funcionales provocados por la edad y la estimulación sensorial medioambiental. Así, el sistema de tacto presión es el primero en iniciar su maduración, seguido de la sensibilidad térmica, la función vestibular, la olfacción, el gusto, la audición y la visión (Figura 13); (Gottlieb, 1971; Alberts, 1984; Soriano et al., 2006; Ocelli et al., 2011).



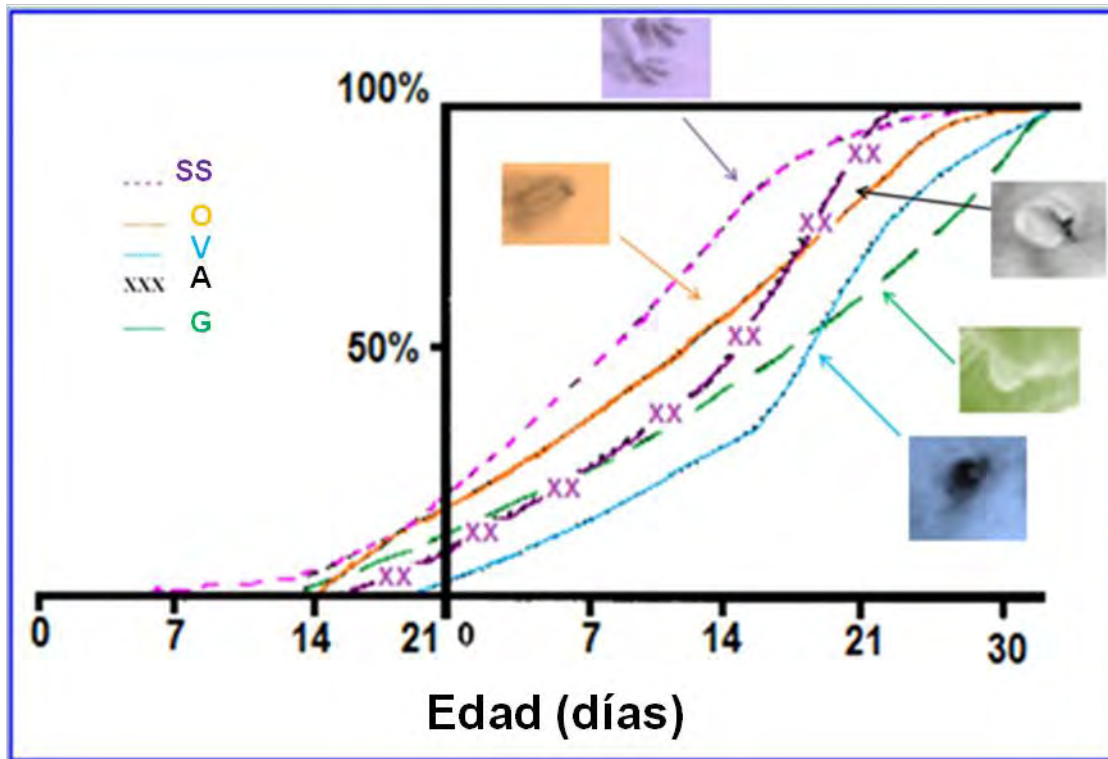


Figura 13. Curso temporal del desarrollo de los sistemas sensoriales durante la etapa perinatal de la rata (SS= somatosensorial, O=olfativo, V=visual, A=auditivo y G= gustativo). (Modificada de González, 2003).

De acuerdo a diversos estudios, se conoce que la desnutrición perinatal en la rata retarda la maduración de los sistemas sensoriales, y causa la expresión alterada de diversos patrones de movimiento. Estos conducen a una disminución significativa en el ingreso de señales que viajan a través de las aferentes somato sensoriales, auditivas y visuales que pueden ser significativas para la ejecución a largo plazo del aprendizaje y el desarrollo social (Callison y Spencer, 1968; Salas et al., 2001; González et al., 2001; Torrero et al., 2003). De manera relevante, varios estudios sugieren que hay una convergencia de las vías en la región temporal a nivel de la parte posterior de la corteza auditiva, y que dicha región puede estar gobernada por mecanismos comunes de los sistemas sensoriales auditivo y táctil, que posteriormente logran establecer contacto con la vía visual en la región temporal-occipital (Ocelli et al., 2011).

Por otra parte, tanto la desnutrición prenatal como la neonatal en la rata recién nacida se haya asociada con distintos grados de privación sensorial, que se

han involucrado también en la génesis de las alteraciones en el desarrollo del SNC. De esta manera, se ha documentado que la separación de crías recién nacidas de la madre por periodos breves de 15 minutos, o de 3 a 6 horas, durante las primeras 3 semanas de vida, activan de manera diferencial el eje hipotálamo-hipófisis-adrenal durante la respuesta al estrés en la etapa adulta (Plotsky y Meaney, 1993). Por otra parte, se ha sugerido que los efectos positivos del manoseo (estimulación sensorial grupal por corta duración), en el desarrollo físico de las crías se encuentran ligados a la mejoría del cuidado maternal (Levine et al., 1994; Liu et al., 1997; Francis et al., 1999). Asimismo, se ha comprobado que la exposición diaria a un ambiente enriquecido en estímulos sensoriales donde el recién nacido puede dar y recibir estimulación somato sensorial, resultan en incrementos del peso corporal y cerebral, del grosor de la corteza cerebral, del aumento de espinas dendríticas y arborizaciones neuronales. También en incrementos de la liberación del factor de crecimiento neurotrófico (NGF), factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF) y de neurotrofina-3 (NT-3) en diferentes regiones cerebrales (Schapiro y Vukovich, 1970; Greenough et al., 1990; Pham et al., 1999; Ickes et al., 2000; Turner et al., 2003; Farmer et al., 2004).

Los cambios morfológicos antes mencionados se correlacionan con incrementos en la actividad eléctrica neuronal, mejora en la conducta exploratoria, el cuidado maternal, el aprendizaje espacial y la respuesta al estrés (Leah et al., 1985; Rosenzweigh y Bennett, 1996; Fleming et al., 1999; Michel y Cabanac, 1999; Adlar y Cotman, 2004). Además, la estimulación sensorial temprana se ha utilizado para atenuar las alteraciones conductuales asociadas con la desnutrición perinatal, y la privación parcial sensorial, incluyendo el deficiente cuidado maternal (Salas et al., 1984; Pascual y Figueroa, 1996; Regalado et al., 1999; Salas et al., 2001; Rubio et al., 2004). De acuerdo a experimentos realizados tanto en seres humanos recién nacidos como en la rata neonata, se sabe que la separación de la madre provoca decrementos significativos en la liberación tanto de la hormona de crecimiento (GH) como de la enzima ornitina descarboxilasa (OD) cerebral que promueve la síntesis de proteínas en el plasma y el tejido cerebral. Además se sabe que la elevación de glucocorticoides activa la síntesis de OD (Seiler, 2004). Por el

contrario, la estimulación de la piel del recién nacido con un cepillo de pelo fino durante varios minutos restituye a valores fisiológicos los niveles de GH y OD en el tejido cerebral (Schanberg y Field, 1987). Estos experimentos, ponen de manifiesto los efectos sorprendentes que tiene la estimulación de tacto y presión durante la etapa perinatal para incidir en el desarrollo cerebral y la expresión de diversos componentes de la conducta y el desarrollo neuronal (Soriano et al., 2006).

#### 2.6.1. Efectos de la estimulación táctil en el desarrollo

El útero materno es una estructura que sirve al feto, como barrera de protección selectiva a estímulos ambientales, debido a que los sistemas de sensación y percepción en el feto se encuentran en fase de desarrollo, y por lo tanto anatómicamente incompletos (Gotlieb, 1971). La selectividad a los estímulos permite recibir información importante proveniente del medio ambiente al feto, en el contexto denominado pre funcionalidad de los sistemas sensoriales. Los estímulos olfativos, gustativos, sonoros, táctiles y vestibulares en el útero pueden modificar la conducta del feto generando experiencia temprana que le será de utilidad para la adaptación futura a nuevos cambios y demandas ambientales a las que se tenga que exponer (Smotherman y Robinson, 1988). La respuesta táctil se inicia muy temprano durante la vida fetal, acompañando a la aparición de contracciones rítmicas de la parte anterior del tórax denominadas “flexiones cefálicas”, de ocurrencia aparentemente espontánea ya que no se identifica un estímulo en particular que las provoque (Angulo, 1932; Smotherman et al., 1986).

Aún es motivo de discusión, si estas flexiones cefálicas son de origen meramente muscular o producto de actividad nerviosa temprana, que hace contraer los grupos musculares correspondientes (Alberts y Cramer, 1988). Este tipo de actividad de movimiento parece tratarse de un patrón evolutivo muy conservado, ya que surge en embriones de vertebrados diversos como la lamprea, tiburón, anfibios, reptiles, pájaros y mamíferos.

El surgimiento de la sensibilidad táctil se ha estudiado en ratas preñadas (día G18) y anestesiadas (lidocaína aplicada en médula espinal) abriendo una ventana en la pared abdominal, exponiendo los cuernos uterinos cubiertos con suero fisiológico caliente (37° C) y con iluminación adecuada (Smotherman et al., 1986). Bajo estas condiciones, y aplicando estimulación táctil directa, suave y discreta a zonas limitadas de la piel del feto (técnica de observación fetal en baño), seccionado la pared uterina y manteniendo la unión del cordón umbilical entre la placenta y el útero, pueden observarse y medirse las respuestas de movimiento asociadas a la estimulación táctil (Galigher y Kozloff, 1971).

Con esta metodología se ha descrito que la estimulación táctil, genera respuestas de movimiento desde el día embrionario 16 al 20 siguiendo una progresión rostrocaudal. Así, esta secuencia de maduración inicia en la zona de los cojinetes labiales, (G 16 a G17), siguiendo a las partes laterales de la cara y el primordio del pabellón auricular (G17 a G18). Posteriormente, se extiende a la zona de las patas (G17 a G19), se extiende al área de las manos y las muñecas (G18) y terminando en el área del abdomen (G17 a G20) (Narayanan et al., 1971). Al final de la gestación y debido a la pérdida de líquido amniótico por el aumento en talla del feto y la recesión de la placenta, el feto incrementa su respuesta táctil y sus movimientos (Alberts y Cramer, 1988). La actividad de movimientos del feto en la cavidad amniótica genera una creciente estimulación vestibular al flotar éste en el líquido amniótico, sometido por las fuerzas geomagnéticas y responder a los cambios en la aceleración lineal y angular de los movimientos de la madre embarazada (Alberts y Cramer, 1988).

A partir del trabajo de parto y del inicio del periodo neonatal, la estimulación táctil jugará un papel crucial para el desarrollo del SNC de los recién nacidos ya que provocará la liberación de varias hormonas y factores de crecimiento que actuarán sobre el tejido cerebral en desarrollo. Debe tenerse en cuenta que la estimulación táctil puede darse en toda la superficie corporal, mientras que la estimulación de los otros canales sensoriales sólo puede realizarse en la extremidad cefálica.

### III. JUSTIFICACIÓN

La RPA afecta el desarrollo del SNC en etapa temprana modificando la respuesta al estrés, induciendo apoptosis neuronal, reducción de la densidad dendrítica y sinaptogénica, modificando la integración de información en las distintas redes neuronales. Los efectos conductuales a largo plazo de la RPA son la baja en los distintos tipos de memoria, el aprendizaje, y el lenguaje entre otros. Los efectos fisiológicos son cambios en la regulación de la frecuencia cardíaca y respiratoria, en el metabolismo energético y hormonal principalmente en hormona de crecimiento, insulina, glucocorticoides y hormona tiroidea. La rata representa un excelente modelo experimental por la similitud al ser humano en el desarrollo físico y fisiológico para caracterizar los daños provocados por la RPA. Poco se ha estudiado su repercusión en el lenguaje, particularmente en la generación de las vocalizaciones ultrasónicas (VUs), y en las estructuras del tallo cerebral necesarias para producirlo. Se desconoce el daño provocado por la RPA en el núcleo ambiguo porción caudal (Ambc), núcleo implicado en la ejecución de las VUs, las cuales forman parte del mecanismo de comunicación madre-cría, indispensable en los neonatos para sobrevivir en el ámbito del nido y sus alrededores. La exposición a ambientes enriquecidos y estimulación de carácter sensorial favorece la activación de factores de crecimiento, la sinaptogénesis y el incremento en la densidad dendrítica en hipocampo, tallo cerebral, y corteza pre frontal entre otras. Además de inducir la maduración de los sistemas sensoriales, regulación de frecuencia cardíaca y respiratoria, ganancia de peso corporal y cerebral, incremento en la mineralización ósea, y disminución en la concentración de corticoides del plasma en respuesta a un estímulo estresante (Lund et al., 1999; Chen, 2009; Guzzetta et al., 2009). Por ello, en este estudio se busca promover la rehabilitación de estructuras cerebrales afectadas por la RPA, y favorecer la mejoría en la emisión de vocalizaciones por parte de la cría, e indirectamente mejorar la comunicación madre-cría. Con base en la siguiente pregunta: ¿Cuál es el efecto de la RPA sobre la morfología neuronal del Ambc, y sus efectos sobre la comunicación ultrasónica, así como la rehabilitación inducida por la ET?; para dar respuesta a esta pregunta se propusieron tres estrategias; en

el experimento I, se analizó los efectos de la desnutrición perinatal sobre el desarrollo de las neuronas del Ambc. En el experimento II, se registró las VUs emitidas por las crías desnutridas únicamente en el día 15 de edad en respuesta a la separación maternal, cuando la capacidad para emitir VUs y el desarrollo de la vía auditiva han alcanzado un grado importante en su maduración, y en el experimento III, se evaluó el efecto rehabilitador de la estimulación táctil (ET) de tipo masaje corporal sobre los posibles daños ocasionados por la desnutrición perinatal en las neuronas del Ambc.

#### **IV. HIPÓTESIS**

4.1 La restricción perinatal al alimento (RPA) reducirá la densidad dendrítica en las motoneuronas del Ambc de las crías durante el periodo predestete.

4.2 La RPA reducirá la tasa de emisión y las frecuencias e intensidades en las vocalizaciones ultrasónicas de tipo descendente de las crías desnutridas a la edad de 15 días.

4.3 La estimulación táctil (ET) tendrá efectos de rehabilitación sobre la densidad dendrítica de las motoneuronas del Ambc posiblemente afectada por la RPA.

#### **V. OBJETIVOS**

##### **5.1. Objetivo general**

Estudiar los efectos de la RPA sobre la morfología neural del Ambc de la cría y su repercusión en la emisión de VUs, así como los efectos de una estimulación táctil de tipo masaje corporal sobre esa morfología.

##### **5.2. Objetivos específicos**

5.2.1 Caracterizar las alteraciones en la morfología neuronal del Ambc relacionadas con la RPA en las crías de 8,12, y 15 días de edad.

5.2.2 Caracterizar los efectos de la ET sobre la morfología neuronal del Ambc, en las crías a los 8,12, y 15 días de edad, posiblemente afectadas por la RPA.

5.2.3 Valorar los efectos de la RPA sobre las VUs emitidas durante la separación materna a la edad de 15 días en crías desnutridas.

## **VI. SUJETOS, MATERIAL Y MÉTODOS**

El estudio se realizó en crías macho de la variedad Wistar (*Rattus norvegicus*) reproducidas en el bioterio del Instituto de Neurobiología, Campus Juriquilla Querétaro de la Universidad Nacional Autónoma de México. Las crías y sus madres permanecieron en ciclos de luz- oscuridad de 12 h, (luces encendidas 08:00-20:00 h); con temperatura controlada a  $23 \pm 2^{\circ}$  C; humedad del 40 al 50%, alimentadas acorde a sus requerimientos y acceso libre al agua. El protocolo experimental que se utilizó en el presente estudio fue aprobado por el Comité de Bioética del Instituto de Neurobiología de la UNAM, que está acorde con la norma internacional para el uso y manejo de animales de experimentación (NRC, 2003).

### **6.1. Sujetos experimentales**

Para la obtención de las crías sujetos de estudio se siguió el siguiente procedimiento:

Se aparearon 12 ratas hembras vírgenes (200-300g) con machos adultos normales en cajas de plástico transparente (60x40x20 cm<sup>3</sup>), con agua y alimento (Lab Diet 5001) *ad libitum*. Colocando 4 hembras y dos machos por caja. Diariamente (09:00h) se realizaron frotis vaginales y mediante microscopia de luz se reconoció la presencia de espermatozoides. El día de la observación de éstos, se consideró como día 0 de gestación (G0). Tres días antes del parto, las hembras gestantes fueron colocadas en cajas individuales de maternidad de policarbonato de (48x27x20 cm<sup>3</sup>). Para la verificación de la fecha de parto de las ratas preñadas, se revisaron las cajas de maternidad diariamente por la mañana (09:00h), y por la noche (20:00h). En caso de identificar crías recién nacidas, o que la madre se encontrase pariendo, se registró esa fecha como día 0 de edad (P0). A las 24 h postparto, se mezcló a las crías de madres que hubiesen parido el mismo día, ajustándose cada camada a un total de 8 crías por madre (4 hembras y 4 machos); (Figura 14). Este procedimiento de redistribución de crías a cada una de las madres, tuvo como propósito el reducir la influencia de posibles factores



genéticos y diferencias biológicas entre las camadas que pudieran afectar los resultados del estudio (Sala-Catala et al., 2005).

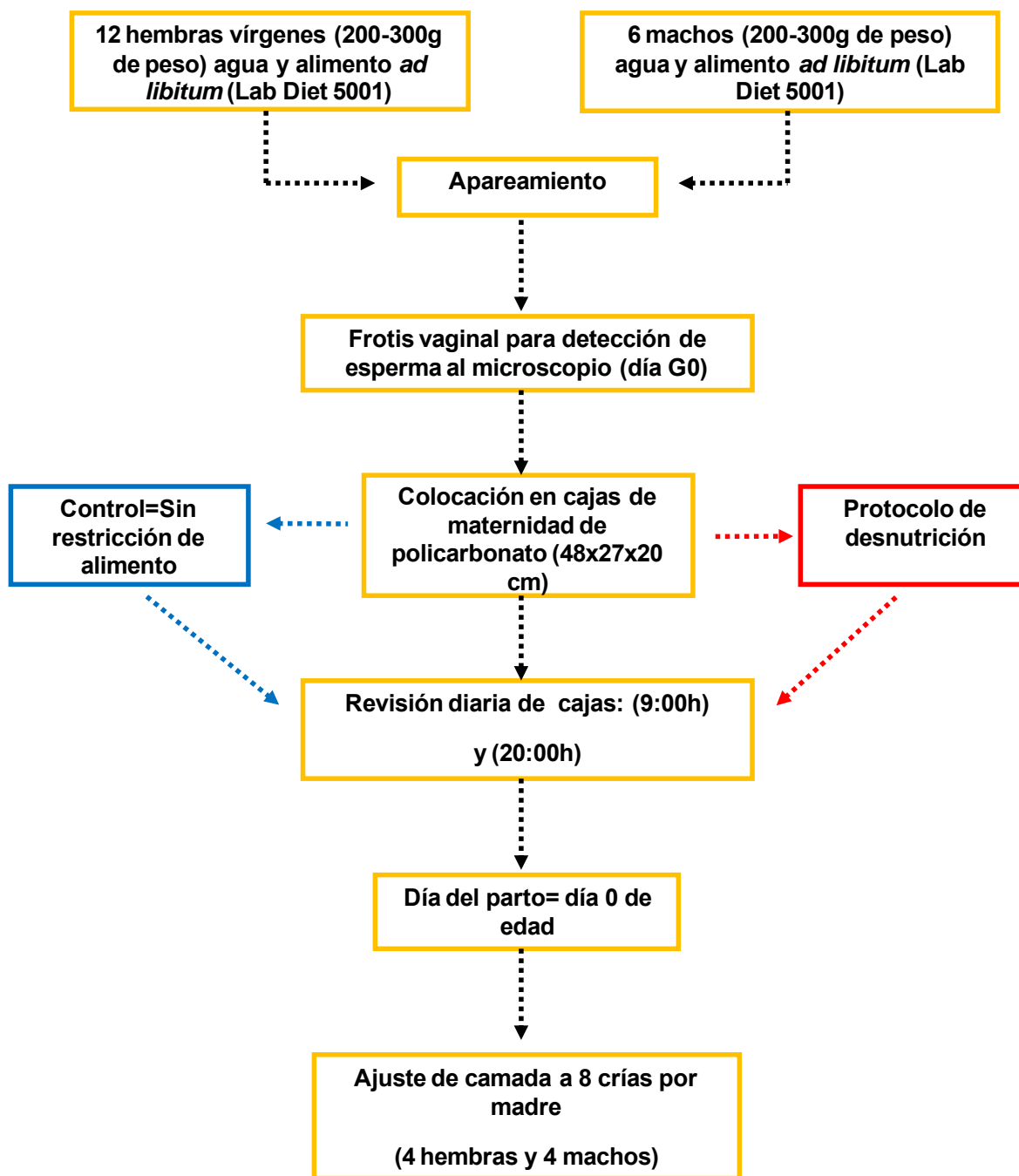


Figura 14. Procedimiento de obtención y distribución de sujetos por camada para el estudio, en amarillo el procedimiento efectuado para todos los grupos, en rojo el paso siguiente para la obtención de los grupos desnutrido y desnutrido estimulado, y en azul marino el de los grupos control.

Para el estudio se formaron 6 grupos experimentales (n=5 crías/grupo/edad); (Figura 15) que se describen a continuación:

1. Grupo Control (C): Ratas crías macho nacidas de madres sin privación de alimento, con libre acceso al agua y que además, permanecieron todo el tiempo con la madre en el nido teniendo libre acceso a la succión.
2. Grupo Control Vocalizaciones (CV): Ratas crías machos provenientes de madres sin privación al alimento, que fueron sujetas al registro de vocalizaciones en el día 15 postnatal.
3. Grupo Control Estimulado (CE): Ratas crías macho originadas de madres sin privación de alimento, que fueron sujetas a estimulación táctil por 10 min del día 4 al día 15 postnatal.
4. Grupo Desnutrido (D): Ratas crías macho provenientes de madres desnutridas durante la gestación y sometidas los días posteriores al nacimiento a intercambio de madre nodriza cada 12h, limitando así su tiempo de succión, pero manteniendo la interacción con la madre y la camada.
5. Grupos Desnutrido Vocalizaciones (DV): Ratas crías macho desnutridas de la misma forma que el grupo anterior (D), pero que estuvieron sujetas al registro de vocalizaciones en el día 15 postnatal.
6. Grupo Desnutrido Estimulado (DE): Ratas crías macho desnutridas de la misma forma que el grupo (D), pero que estuvieron sujetas a estimulación táctil por 10 min del día 4 al día 15 postnatal.

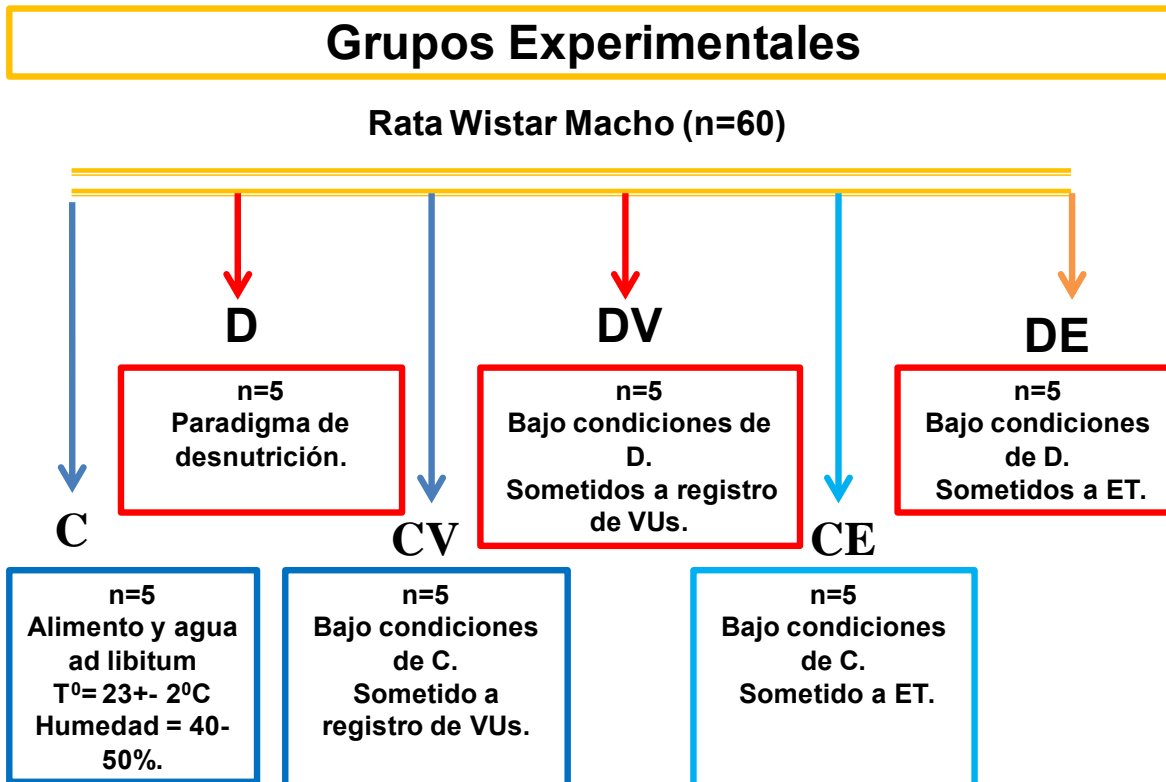


Figura 15. Descripción general de los grupos experimentales en azul claro el grupo CE, en rojo los grupos D, DV y DE, en azul marino el grupo C.

## 6.2. Diseño experimental

### 6.2.1 Modelo de desnutrición

El procedimiento por el cual se indujo la desnutrición perinatal a las crías sujeto de estudio, se realizó de acuerdo al método de reducción del porcentaje de ingesta de alimento a lo largo del periodo de gestación (Figura 16). Este protocolo de desnutrición se eligió debido a que las estructuras del tallo cerebral que regulan la emisión de vocalizaciones en la rata, se desarrollan a partir de primeros 15 días de la gestación (Altman y Bayer, 1980). La desnutrición perinatal se continuó de acuerdo al método de ligadura de los conductos galactóforos de la madre e intercambio de madres nodrizas en la camada cada 12 h durante los 15 días consecutivos al nacimiento (Figura 16). Mediante el uso de este modelo se

atenúan en las crías los efectos de la privación sensorial al interactuar los neonatos entre ellos y con la madre en el medioambiente del nido (Lynch, 1976).

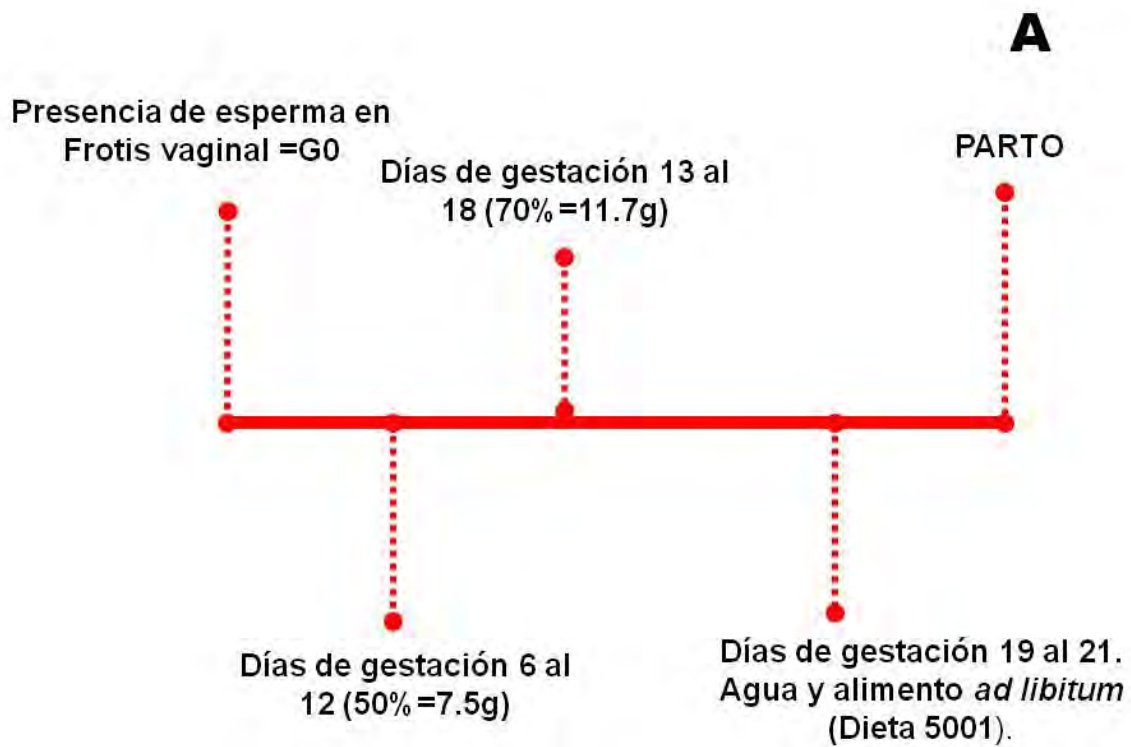


Figura 16 (A). Método de reducción de ingesta de alimento por porcentaje de la dieta durante la gestación que fue aplicada para los grupos D y DE.

**B**

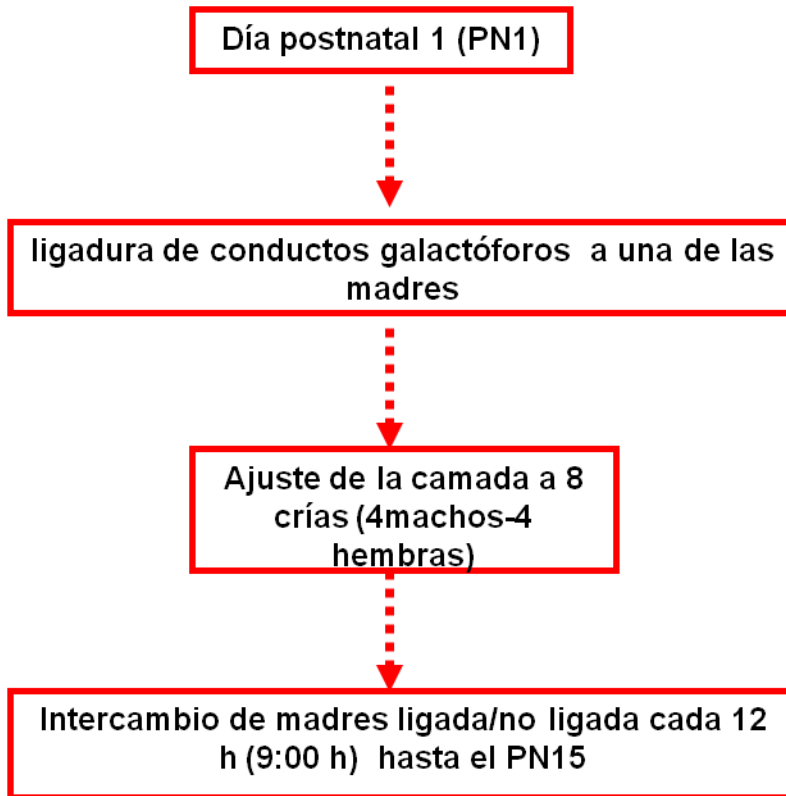


Figura 16 (B). Método de ligadura e intercambio de madres nodrizas por el cual se continuó la desnutrición perinatal para los grupos D y DE.

### 6.2.2 Registro de Vocalizaciones

Las vocalizaciones ultrasónicas de las crías fueron registradas el día 15 postnatal, durante un periodo de 10 minutos en respuesta a la separación maternal y del nido. El experimento se realizó a la 7:00 am. Previamente, se colocó a la camada en un cuarto (2.10x2.20x2.20 m<sup>3</sup>) amortiguado al sonido y a temperatura controlada de 23° C e iluminado con luz roja (75W) por 30 min previos al registro, para familiarizar a los sujetos con el ambiente del cuarto.

Para el registro se colocó a la cría en una caja de acrílico (23x16x16 cm<sup>3</sup>), la cual contenía un micrófono para ultrasonido (Mini-3, Ultra Sound Advice, Sweden) colocado a la mitad de la caja, a 10 cm de altura sobre la base. La caja se encontraba sobre un cojín térmico (Hp-500 12x24", Homeomedics, USA) para

controlar la temperatura. Las VUs fueron obtenidas mediante el uso de un micrófono para ultrasonido, el cual se ajustó en un rango de frecuencia de 20kHz a 100kHz, este mismo se encontraba sujeto en un soporte metálico y conectado a una computadora durante el experimento. Las VUs fueron grabadas en forma de señal audible mediante el software (Bat Sound Software Spectro Analyzer 3.0). Las vocalizaciones grabadas fueron contadas y caracterizadas en función de los espectros reportados en la literatura (Tonkiss et al., 2003). Posteriormente, se seleccionó la vocalización con mayor incidencia en el registro. Dicha vocalización correspondió a la vocal de tipo descendente. Se cuantificó la intensidad alcanzada en este pico para cada una de estas frecuencias. En la imagen se puede observar la ventana del registro y como se fue aislando dicha vocal (Figura 17). Enseguida se aislaron 10 vocales de este tipo, y se realizó un análisis espectral (Branchi et al., 2006; Ise y Ohta, 2009; Stevenson et al., 2009) mediante la aplicación de la transformación de Fourier, obteniendo la descomposición espectral dentro de la vocal, se cuantificó las frecuencias F0 como el valor de la frecuencia sostenida, F1 como el pico mínimo, la F2 como el pico máximo, la F3 como la frecuencia en la que se produjo el pico con mayor intensidad, y F4 como el pico último (Figura 18).

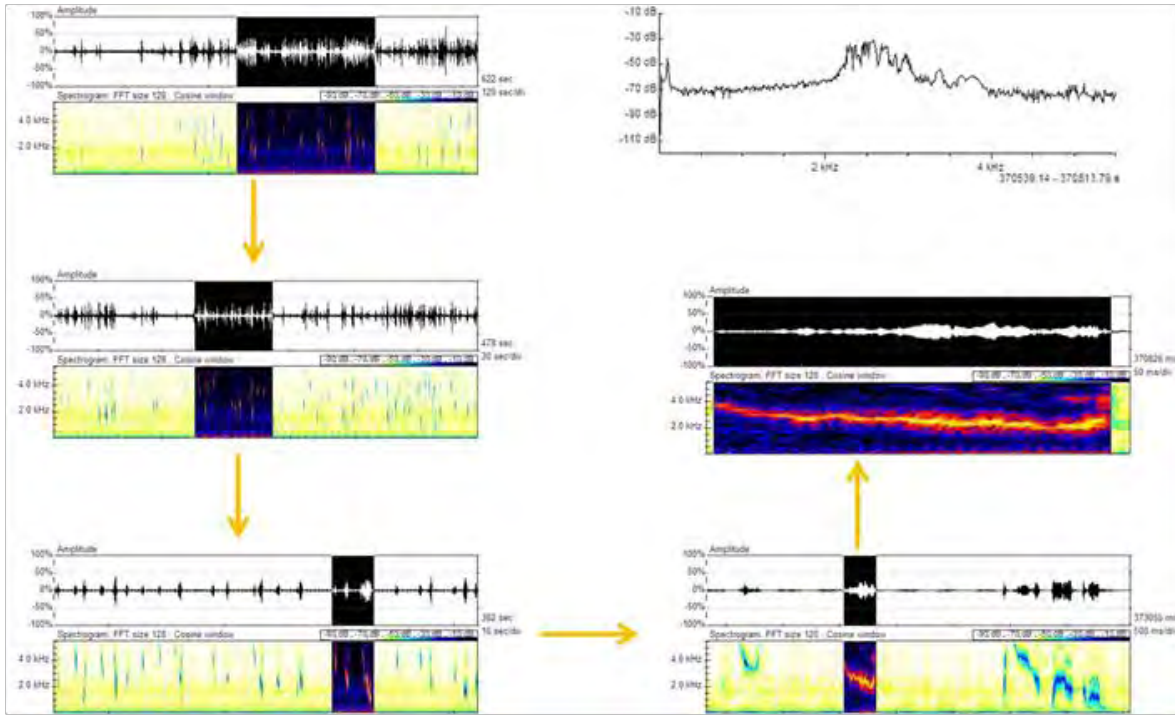


Figura 17. Procedimiento para aislar las vocalizaciones, y realizar el análisis espectral de la vocalización descendente.

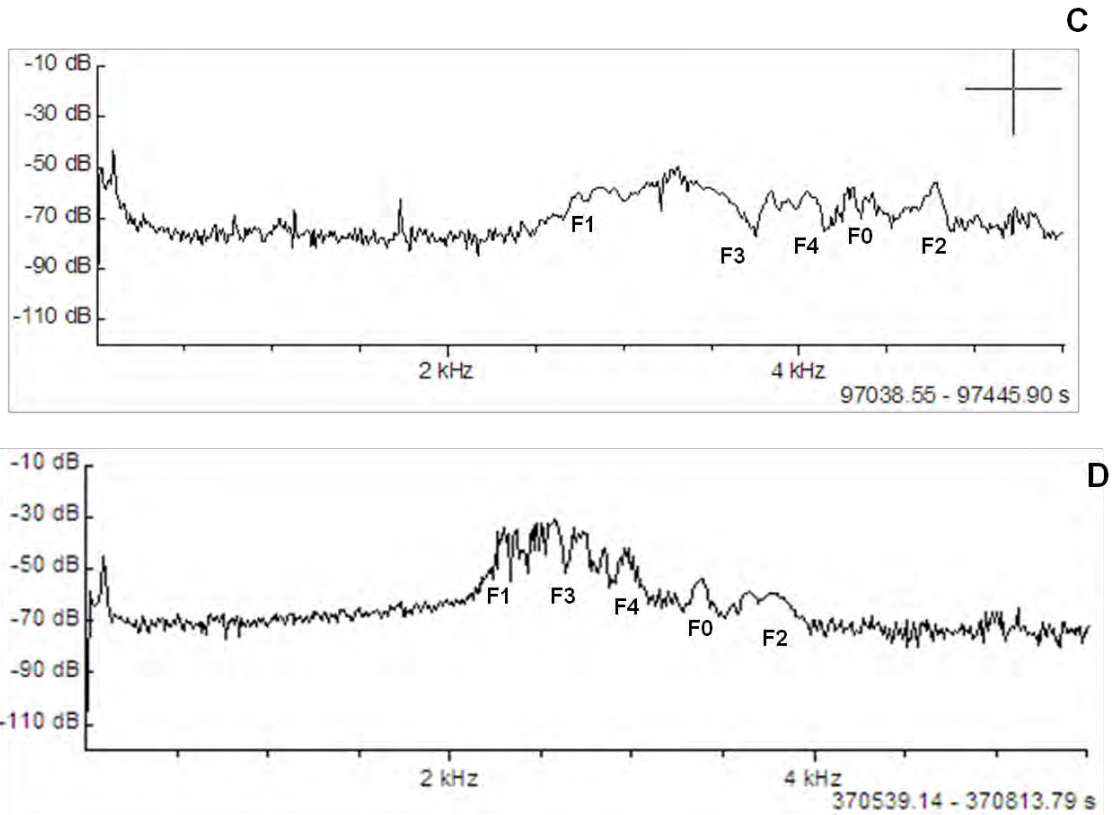


Figura 18. Ejemplo del análisis espectral de la vocalización descendente (n=10), de los grupos control (C), y desnutrido (D).

## 6.3. Técnicas Experimentales

### 6.3.1 Técnica de Golgi-Cox

Para el estudio de la morfología del Ambc en las crías se utilizó la técnica de Golgi Cox empleando como fijador dicromato de potasio y el cloruro mercúrico, esta solución permite generar depósitos del componente en las proteínas de membrana y así teñir la estructura externa de las neuronas. Para ello, se realizó el procedimiento siguiente:

Se decapitó a las crías machos de cada grupo a los días 8,12, y 15 de edad. Para ello, se aplicó como anestésico general pentobarbital sódico (10mg/kg peso) vía intraperitoneal, posteriormente se decapitó con guillotina al animal, y se extrajo el cerebro. A continuación el cerebro se pesó y se cortó en 3 bloques de 0.5 cm, colocando éstos en el fijador por un periodo de 20 a 30 días, manteniéndolos en la oscuridad a temperatura ambiente. Al término de este periodo, se deshidrató el tejido en alcohol con diferentes graduaciones (50, 70, 90 y 100%) por periodos de 20 minutos. Enseguida, se colocaron en solución de éter-alcohol vol/vol por 24 h. Posteriormente, fueron incluidos en celoidina al 15% y secados en vapores de cloroformo absoluto por 5 min en un desecador. Una vez secados, se realizaron cortes coronales de 120  $\mu\text{m}$  y se revelaron en microdol (Kodak), seguido de la deshidratación en alcohol graduado 50, 70, 80, 90, 100%, isopropílico, y tolueno. Se montaron dichos cortes en portaobjetos, y se observaron al microscopio de luz (Leica Diastar). Así mismo, se localizó la parte caudal del núcleo ambiguo de acuerdo con las coordenadas de Bregma 13.24-13.68 reportadas en el atlas para la rata (Paxinos y Watson, 1986).

La morfología neuronal se realizó en 5 células motoras multipolares por animal, condición y edad; en ellas se cuantificaron los parámetros del soma (área, perímetro, diámetro esférico, longitud mayor, y factor de forma), así como el número de ramas y la densidad dendrítica.



### 6.3.2 Método de Sholl

El número de ramas y la densidad dendrítica se evaluaron mediante el método de Sholl, el cual consiste en colocar el soma neuronal en el centro de 7 círculos concéntricos separados uno del otro por una distancia de 40.4  $\mu\text{m}$  (Sholl, 1956). El número de ramas se calificó considerando a las dendritas que surgen del soma como de primer orden, las que emergen de éstas como de segundo orden y así sucesivamente. La densidad dendrítica se midió cuantificando el número de círculos que cruza dicha rama, como se observa en la Figura 19.

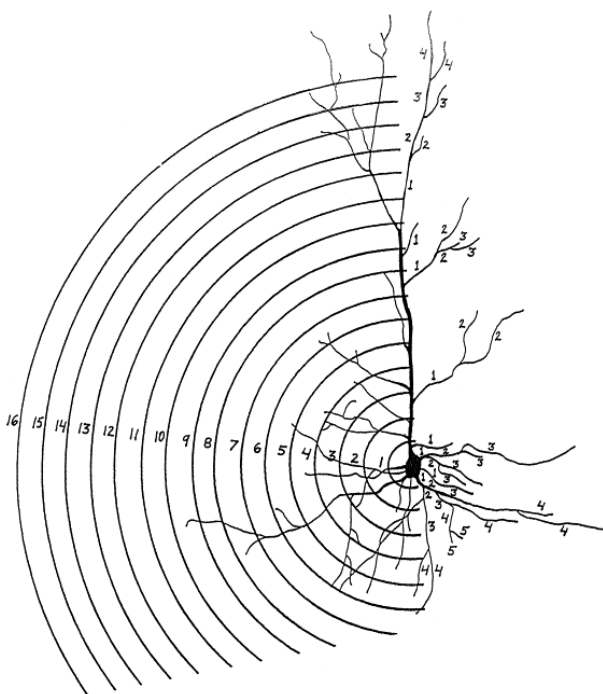


Figura 19. Técnica de círculos concéntricos, nótese el orden de aparición de las ramas dendríticas y su densidad.

### 6.3.2 Estimulación táctil (ET)

La ET se aplicó a las crías de los grupos GCE y GDE. Diariamente (días, P4-P15) fueron estimulados a base de masaje corporal suave y continuo (10 min); empleando guantes de cirujano y bajo el calor de una lámpara de luz roja (75W). De esta manera, cada cría recibía estimulación táctil, de presión suave y vestibular bajo condiciones de temperatura controlada. La ET se realizó en un cuarto anexo al área principal del laboratorio ( $2.10 \times 2.20 \times 2.20 \text{ m}^3$ ) que amortiguó el sonido y se

mantuvo a 27° C, e iluminado con luz roja (75W) que minimiza los efectos estresantes que provoca la luz blanca (Williams, 1971). La temperatura se mantuvo constante durante los 30 min previos al experimento y fue registrada 3 veces mediante un (IR mini termómetro laser, modelo 42500) a lo largo de cada estimulación.

La ET se llevó a cabo en cada región de acuerdo a las secuencias (Figura 20) que se describen a continuación:

- *Columna corporal:* Se colocó a la cría en decúbito ventral y se le masajeó suavemente de la cadera hacia la cabeza en 16 tiempos siguiendo una trayectoria circular. Posteriormente, se realizó la misma operación en dirección contraria durante 1 minuto.
- *Brazos y piernas:* Se tomó la extremidad y se le masajeó suavemente como si fuese un rodillo de izquierda a derecha y viceversa (6 veces). Posteriormente, se las flexionó hacia arriba llevándose la extremidad hacia el abdomen durante 1 minuto para cada par de extremidades.
- *Cadera:* el masaje se realizó aplicándolo en forma de círculos, jalándose suavemente de arriba hacia abajo y viceversa (6 veces) durante 30seg.
- *Abdomen:* colocando a la cría en decúbito ventral, se introdujeron los dedos por debajo, hasta alcanzar el abdomen, y se masajeó con delicadeza en forma circular hacia abajo (6 veces) por 30seg.
- *Cabeza y pinas:* Se dio el masaje de forma circular, moviendo a la cría suavemente de lado a lado y de arriba hacia abajo. Las pinas se estimularon en forma circular, desplazándolas suavemente hacia atrás (6 veces), durante 1 minuto.
- *Cuerpo completo:* Para finalizar se rotó suavemente todo el cuerpo (6 veces), repitiéndose la operación 2 veces con el propósito de estimular el sistema vestibular.

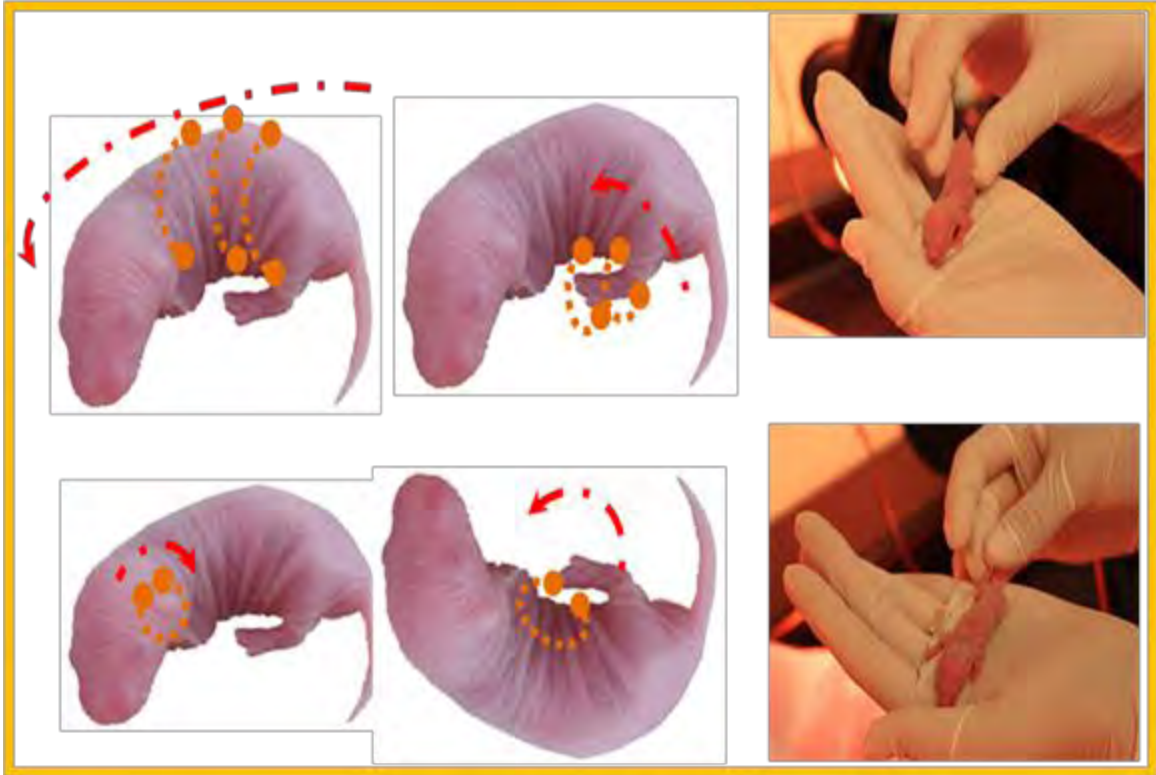


Figura 20. Secuencias realizadas en la estimulación táctil tipo masaje aplicada a los grupos DE y CE, en donde los círculos en naranja corresponden a la posición inicial de los dedos del investigador, las flechas indican la dirección de la estimulación.

Por último, con el propósito de evaluar los efectos de la desnutrición y la ET sobre el desarrollo físico de los animales, se registró el peso corporal de las crías en los días 4, 8, 12, y 15 postnatales. Asimismo, se determinó la apertura de párpados y oídos de los mismos, asignándose un puntaje de 1, cuando se encontraron iniciando su apertura (0%); 2, cuando estuvieron abiertos al 50% y 3, cuando su apertura fue del 100%.

## **6.4. Análisis estadístico**

### **6.4.1 Análisis del desarrollo físico**

Para analizar los datos de unidades relativas provenientes de la apertura de oídos y párpados, se empleó la prueba de Kruskal-Wallis, la cual, por ser no paramétrica no requiere que los datos tengan distribución normal. Con ello, se busca saber si las muestras son significativamente diferentes. Debido a que este método permite identificar si los cambios en las variables independientes tienen efecto sobre la variable dependiente y su grado de asociación con la misma. Para los datos de peso corporal se empleó un ANOVA de tres vías teniendo como factores la edad, la alimentación y la estimulación táctil. La prueba post-hoc aplicada a estos datos fue de Fisher LSD, con un nivel de significancia de  $p \leq 0.05$ .

### **6.4.2 Análisis del desarrollo neuronal**

Para analizar las características del soma (área y perímetro) de las neuronas multipolares se realizó un ANOVA de 3 vías considerando los factores alimentación, edad y estimulación táctil. Debido a que esta prueba nos permite evaluar si la interacción entre factores afecta a la variable dependiente o no. Con ello, se busca conocer si las medias de las muestras definidas por los niveles del factor son iguales o diferentes. Por otro lado, para la arborización dendrítica y su densidad se evaluaron empleando ANOVA de 4 vías con una medida repetida, considerando los factores de edad, alimentación, estimulación y número de ramas o densidad como variable de medida repetida. Para los totales solo se consideró el ANOVA de 3 vías, ya que no se cuenta con la medida repetida en este caso. Para reportar dichas diferencias encontradas se empleó la prueba post-hoc de Fisher LSD con un nivel de significancia de  $p \leq 0.05$ .

### **6.4.3 Análisis de las vocalizaciones**

Para la tasa de vocalizaciones se reporta el número de vocalizaciones emitidas, y su duración promedio en un total de 10 minutos de registro, seccionado en 2

bloques de tiempo de 5 minutos, los datos se analizaron empleando una prueba de ANOVA de 2 vías teniendo como factor la condición de alimentación y el bloque de tiempo. Mientras que para la vocalización de tipo descendente en su análisis espectral ( $n=10$ ), considerando las frecuencias: F0, F1, F2, F3, y F4; así como sus intensidades se realizó un ANOVA de una vía ya que para este caso sólo se consideró el factor de condición de alimentación.

## **6 RESULTADOS**

### **6.2 Efectos de la RPA sobre el desarrollo físico**

#### **6.2.1 Cambios en el peso corporal**

Las comparaciones estadísticas entre los grupos mostraron reducciones significativas asociadas a la ET,  $F(1,64)= 60.40$ ,  $p<0.0001$ , a la dieta,  $F(1,64)= 275.95$ ,  $p<0.0001$ , y a la edad,  $F(3,64)= 368.76$ ,  $p<0.0001$ . Con interacciones significativas de la dieta x la edad,  $F(3,64)= 4.82$ ,  $p<0.004$ , y la ET x la edad,  $F(3,64)= 11.06$ ,  $p<0.0001$ . Las comparaciones post hoc a lo largo de los días del estudio se presentan en la Tabla 1 mostrándose que el peso corporal en todos los grupos va incrementándose gradualmente hasta el día 15 de edad; teniendo en general los sujetos del grupo D los menores pesos corporales ( $p<0.05$ ), con respecto a los otros grupos, particularmente a los sujetos del grupo C y CE; y sólo siendo significativamente menores ( $p<0.05$ ) en los días 8 y 15 postparto con respecto al grupo DE (ver Tabla 1). Nótese que los valores del grupo CE son significativamente mayores que los del grupo C en el día 15 postnatal. Asimismo, que los valores del grupo DE por efecto de la ET son mayores a los sujetos del grupo D que no recibieron la ET en el día 15 de edad.

#### **6.2.2 Cambios en el peso cerebral**

Las comparaciones estadísticas entre los pesos cerebrales correspondientes a los distintos grupos experimentales mostraron que la ET modificó el peso cerebral; se redujo significativamente el peso cerebral por el factor de la dieta, y fue modificado por la edad. También hubo efectos significativos de interacción entre dieta x la

edad y la ET x la dieta x la edad. Las comparaciones post hoc a lo largo de los días del estudio indicaron que los sujetos del grupo D mostraron reducciones significativas en sus pesos cerebrales (Tabla 1).

Edad (días)	GRUPOS					
	C	D	Peso cerebral			
			CE	DE		
8	0.844 ± 0.017	0.600 ± 0.0001 *	0.960 ± 0.024 ▼	0.666 ± 0.023 ◆		
12	1.260 ± 0.018	0.960 ± 0.009 *	1.266 ± 0.022 ▼	1.052 ± 0.031 ◆		
15	1.404 ± 0.023	1.151 ± 0.021 *	1.380 ± 0.037 ▼	1.238 ± 0.009 ◆		
Total	1.169 ± 0.064	0.903 ± 0.061 *	1.202 ± 0.049	0.985 ± 0.064 ◆		
Peso corporal						
4	9.666 ± 0.178	6.708 ± 0.388 *	9.640 ± 0.293	7.996 ± 0.199 ◆		
8	15.004 ± 1.214	7.546 ± 0.217 *	17.094 ± 0.291 ▼	10.514 ± 0.666 ◆		
12	20.854 ± 0.618	13.262 ± 0.597 *	24.088 ± 0.364 ▼	18.272 ± 1.650 ◆		
15	25.082 ± 0.557	18.210 ± 0.937 *	28.640 ± 0.467 ▼	21.594 ± 0.542 ◆		
Total	17.651 ± 1.381	11.431 ± 1.102 *	19.865 ± 1.658 ▼	14.594 ± 1.341 ◆		
		Peso cerebral		Peso corporal		
Factores	df	F	p<	df	F	p<
A) Est	1,48	20.13	0.0001	1,64	60.407	0.0001
B) Dieta	1,48	358.20	0.0001	1,64	275.956	0.0001
C) Edad	2,48	597.13	0.0001	3,64	368.764	0.0001
AxB	1,48	3.70	NS	1,64	1.880	NS
BxC	2,48	1.92	NS	3,64	4.824	0.004
AxC	2,48	3.01	NS	3,64	11.060	0.0001
AxBxC	2,48	3.85	0.028	3,64	0.363	NS

Tabla 1. Medias y errores estándar del peso corporal y cerebral de los grupos D, DE, CE, DE a los 8, 12, y 15 días de edad, los símbolos indican la comparación post-hoc significativa  $p < 0.05$ , el \* (C vs. D) el ▼ (C vs. CE), el ◆ (D vs. DE).

### 6.2.3 Influencia sobre el porcentaje de la apertura de oídos

En cuanto al porcentaje en la apertura de oídos en el día 12 de edad son mínimas diferencias entre los grupos, con retraso de apertura en los sujetos del grupo D. El grupo C inicia su apertura en el día 10 postnatal y la concluye al día 15. Obsérvese el retraso en el desarrollo en la apertura de oídos en el grupo D, que

aún al día 15 postnatal no ha completado su apertura; mientras que el grupo DE que refleja los efectos de la estimulación táctil sobre la desnutrición, no se iguala a la de los grupos C y CE al día 15 de edad. El grupo CE no muestra diferencias significativas de aceleración del proceso ni retraso del mismo respecto al grupo C en los diferentes días de evaluación (Figura 21).

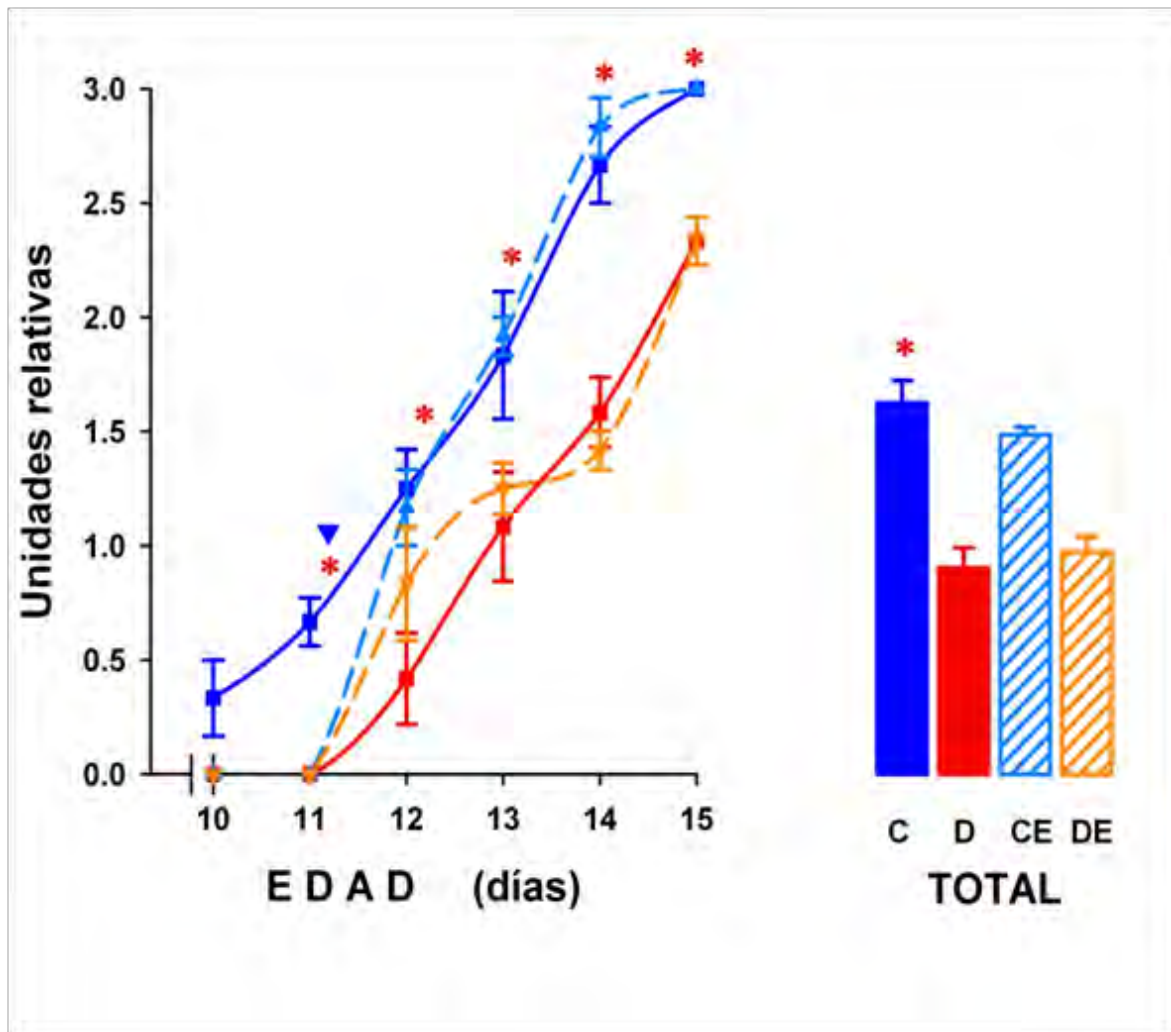


Figura 21. Medias y errores estándar de los puntajes [1(0%), 2(50%), 3(100%)] de apertura de oídos obtenidos por los sujetos de los 4 grupos experimentales, comparación por la prueba de Kruskal-Wallis. Las barras en azul marino corresponden al grupo C, en rojo el grupo D, en azul claro el grupo CE y en naranja el grupo DE. El \* indica las diferencias significativa de la comparación post-hoc  $p < 0.05$  entre los grupos C vs. D.



#### 6.2.4 Influencia sobre el porcentaje de la apertura de los párpados

El porcentaje de la apertura de los párpados correspondiente a cada uno de los distintos grupos experimentales en los días 13, 14, y 15 días de edad se muestra en la Figura 22. En el día 13 los porcentajes de apertura son mínimos, y sin diferencias entre los distintos grupos. Por el contrario, en los días 14 y 15 de edad los porcentajes se incrementan gradualmente en todos los grupos, siendo mayor el incremento gradual en el grupo CE al 100% de su apertura. Obsérvese los efectos de la ET en el grupo DE que muestra un retraso inicial ligero en el día 13, pero que al día 14 y 15 postnatal se restablece su curso de desarrollo en un nivel cercano a los valores de los grupos C y CE.

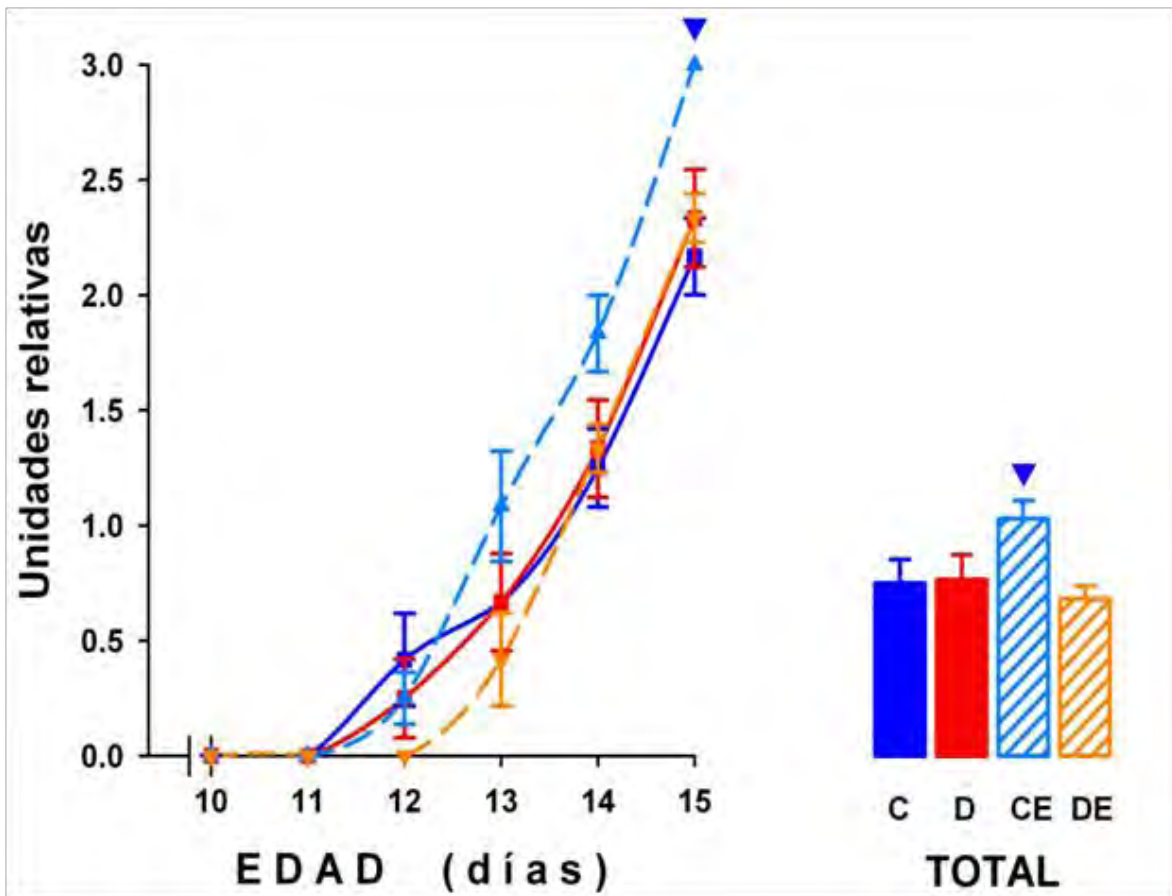


Figura 22. Medias y errores estándar de los puntajes [1(0%), 2(50%), 3(100%)] obtenidos por los sujetos de los grupos experimentales. En barras en azul correspondientes al grupo C, en rojo las del grupo D, en azul claro las del grupo CE, y en naranja el grupo DE. El (▲) corresponde a la comparación post-hoc por la prueba de Fisher  $p < 0.05$  para los grupos C vs CE.



### **6.3 Efectos sobre el árbol dendrítico de neuronas multipolares.**

#### 6.3.1 Efectos sobre parámetros del perikarya

##### 6.3.1.1 Cambios en el área de sección del soma neuronal

Las comparaciones estadísticas entre las muestras del área de sección transversal de los diferentes grupos experimentales mostraron efectos significativos asociados la edad,  $F(2,228)= 8.97$ ,  $p<0.0001$ , y a la ET,  $F(1,228)= 28.13$ ,  $p<0.0001$ . Asimismo, se encontraron interacciones significativas entre el factor ET x la edad,  $F(2,228)= 9.12$ ,  $p<0.0001$ , la ET x la dieta,  $F(1,228)= 11.57$ ,  $p<0.0007$ , y la edad x la dieta,  $F(2,228)= 6.03$ ,  $p<0.002$ . Las comparaciones post hoc a lo largo de los días del estudio mostraron reducciones significativas ( $p<0.05$ ) en los sujetos del grupo D vs los del grupo C en los días 8 y 12 de edad (Figura 23); incremento significativo ( $p<0.05$ ) en las ratas del grupo CE vs las del grupo C sólo en el día 15 de edad; también hubo incrementos significativos ( $p<0.05$ ) en los valores del grupo US vs D en los días 8, 12, y 15 de edad (Figura 23). Las comparaciones acumuladas del área de sección transversal del soma de las neuronas multipolares, en los diferentes grupos experimentales a lo largo de los días del estudio (Total), mostraron reducción significativa ( $p<0.05$ ) en los sujetos del grupo D vs. el grupo C, e incrementos significativos ( $p<0.05$ ) en los valores de los grupos CS vs. los del grupo C, y los de los sujetos del grupo US vs. los del grupo D.

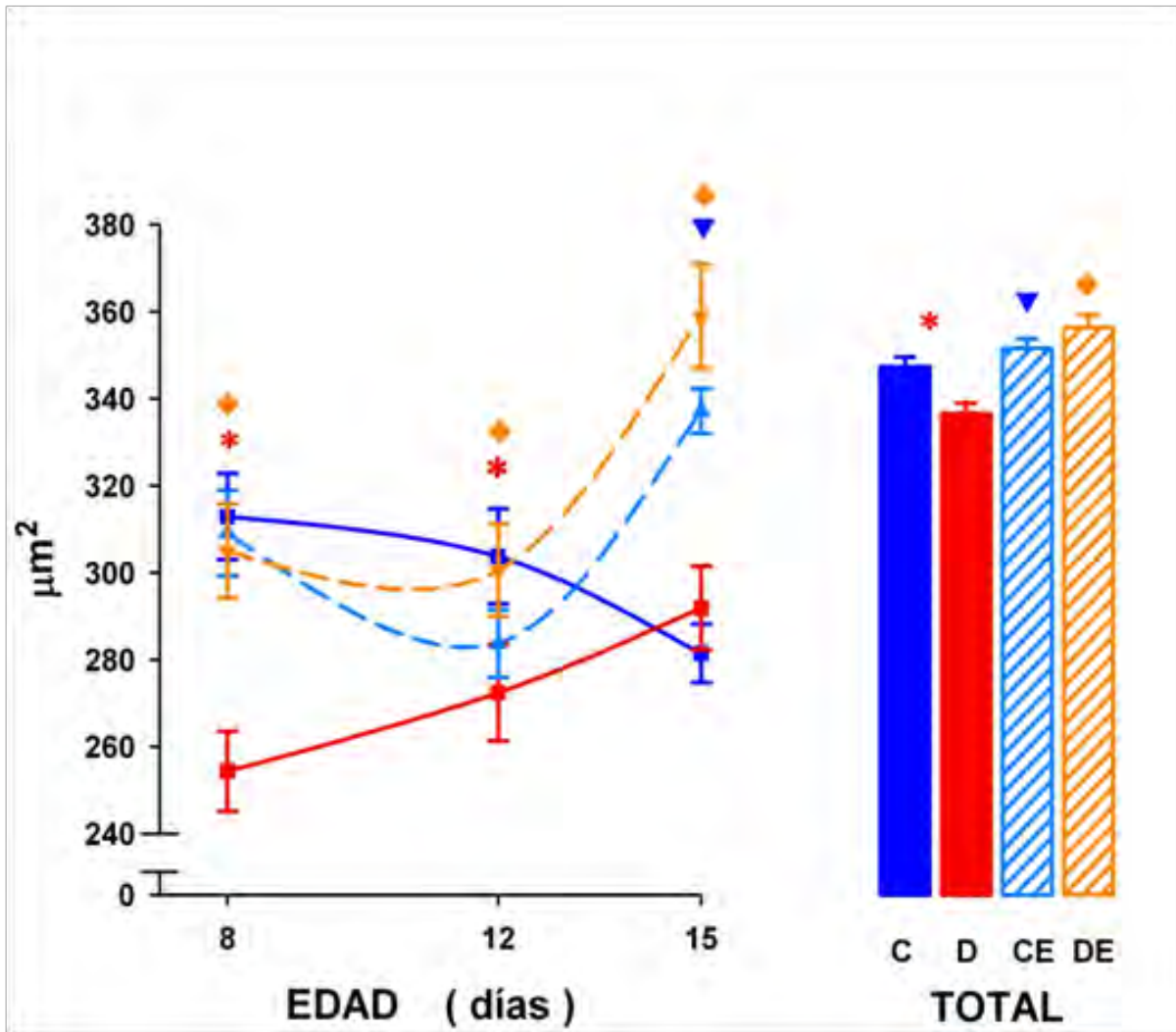


Figura 23. Medias y errores estándar del área del soma de las neuronas multipolares a la edad de 8, 12, 15 días postnatales. La línea en azul marino grupo C, en rojo el grupo D, en azul claro al grupo CE y en naranja el grupo DE. Los \* indican las diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre los grupos C y D. El ▼ (C vs CE) y ◆ el (D vs. DE).

### 6.3.1.2 Cambios en el perímetro de soma neuronal

El análisis de las comparaciones de valores del perímetro somático entre los diferentes grupos experimentales a lo largo del estudio mostraron efectos significativos de reducción asociados a la dieta,  $F(1, 228) = 14.76$ ,  $p < 0.0001$ , cambios significativos relacionados con la edad,  $F(2, 228) = 4.31$ ,  $p < 0.01$ , y la ET,  $F(1, 228) = 20.93$ ,  $p < 0.0001$ . El análisis estadístico también reveló efectos de

interacción sólo entre la ET y la edad,  $F(2,228)= 7.15$ ,  $p<0.0009$ . Las comparaciones post hoc a lo largo de los días del estudio, se muestran en la Figura 24. En esta figura se indica que los perímetros somáticos obtenidos del grupo D v. el grupo C se redujeron significativamente sólo en el día 8 de edad. También, los valores del grupo CE vs. los del grupo C se incrementaron significativamente ( $p<0.05$ ) sólo en el día 15 de edad; por otra parte, los valores del grupo DE vs. los del grupo D se incrementaron significativamente ( $p<0.05$ ) en los días 8 y 15 de edad. Las comparaciones acumuladas del perímetro de los somas neuronales multipolares obtenidos de los diferentes grupos experimentales en los días del estudio (Total), indicaron disminución significativa en los valores del grupo D vs. los del grupo C. Asimismo, los valores correspondientes a los grupos CE vs. los del grupo C, y los del grupo DE vs. los del grupo D se incrementaron significativamente ( $p<0.05$ ).

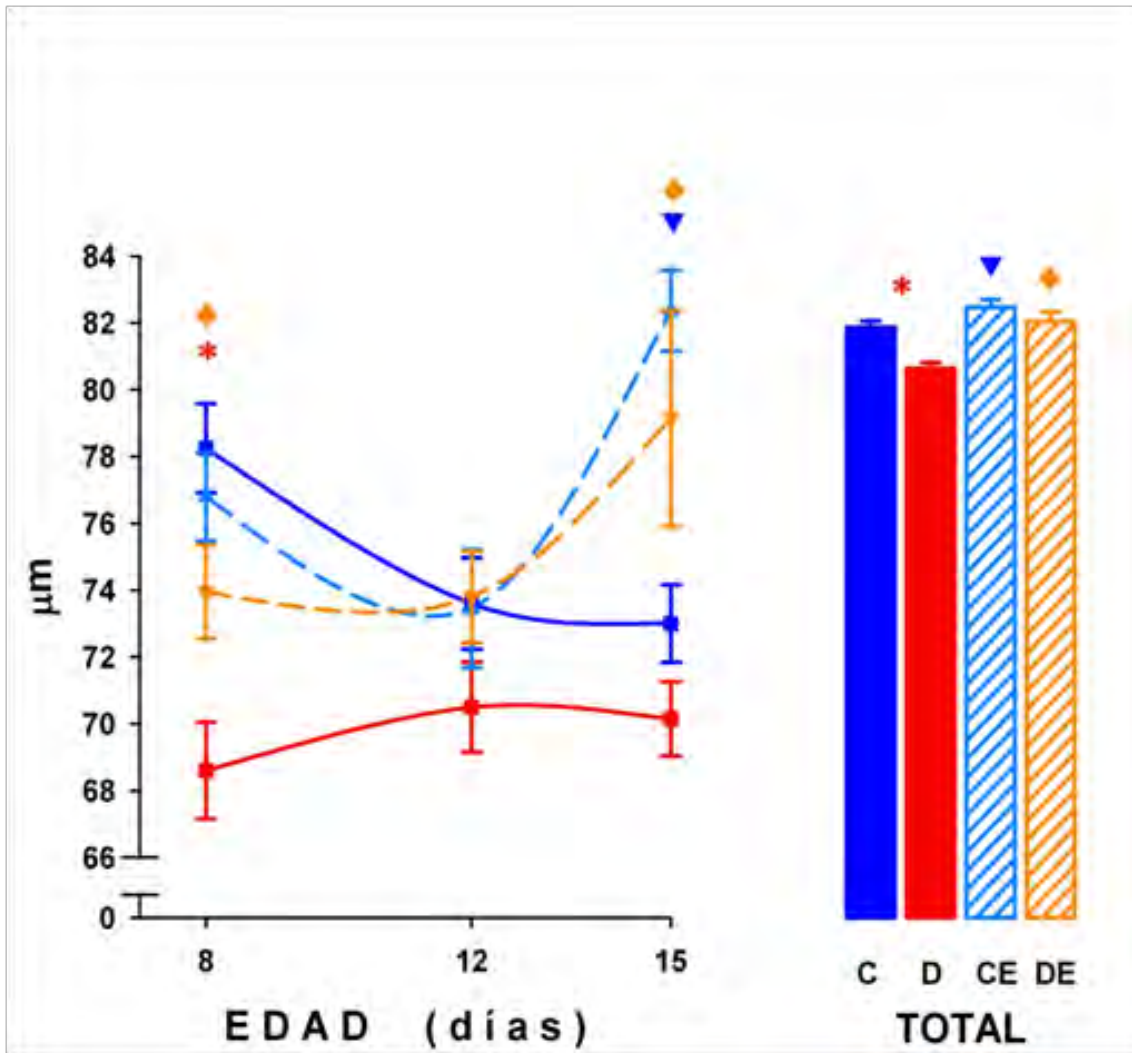


Figura 24. Medias y errores estándar del perímetro del soma de las neuronas multipolares de los sujetos de los 4 grupos experimentales a la edad de 8, 12, y 15 días. En la azul marino el grupo C, en rojo el grupo D, en azul claro el grupo CE y en naranja el grupo DE. El (\*) indica que fueron significativamente distintas ( $p < 0.05$ ) C vs. D, el C vs. CE ( $\blacktriangledown$ ) y el entre D vs DE ( $\blacklozenge$ ).

### 6.3.2 Efectos sobre el número de órdenes dendríticos

Las comparaciones estadísticas en el número de los órdenes dendríticos de las neuronas multipolares entre los diferentes grupos experimentales, indicaron reducciones por la edad,  $F(2,228) = 46.55$ ,  $p < 0.0001$ , la aplicación de ET,  $F(1,228) = 104.44$ ,  $p < 0.0001$ , y efectos significativos sobre el número de ramas de todos los grupos experimentales a lo largo de los diferentes órdenes,  $F(5,1140) = 2591.35$ ,  $p < 0.0001$ . Por otra parte, hubo interacciones significativas entre el factor

edad y la dieta,  $F(2,228)= 14.97$ ,  $p<0.0001$ , y la ET por la edad,  $F(2,228)= 26.17$ ,  $p<0.0001$ . Las comparaciones post hoc obtenidas de los diferentes órdenes dendríticos mostraron reducciones significativas ( $p<0.05$ ) en las ramas de 3rd orden de los sujetos del grupo D vs. el grupo C en las 3 edades estudiadas. Asimismo, un incremento significativo en el grupo CE vs. el C ( $p<0.05$ ) en las ramas de 3rd, a los 12 y 15 días de edad, y en el 4th orden a los 8 y 15 días de edad, y en el orden 5th a los 15 días postparto (Figura 25). Por otra parte, hubo incrementos significativos en el número de las ramas dendríticas de los sujetos DE vs. los del D en los órdenes 3rd y 4rd en todos los días del estudio (Figura 25). También se encontraron efectos significativos en las interacciones de los factores ET x edad x dieta x órdenes dendríticos,  $F(2,228)= 52.12$ ,  $p<0.0001$ . Las comparaciones acumuladas del número de órdenes dendríticos a lo largo de los 3 días del estudio (Total), indicaron reducción significativa ( $p<0.05$ ) en los sujetos del grupo D vs. los del grupo C a los 8 y 15 días de edad; incrementos significativos ( $p<0.05$ ) en los sujetos del US vs. los del grupo D a los 8 y 15 días de edad; e incrementos significativos ( $p<0.05$ ) en los sujetos CE vs. los C en los días 12 y 15 del estudio (Figura 25).

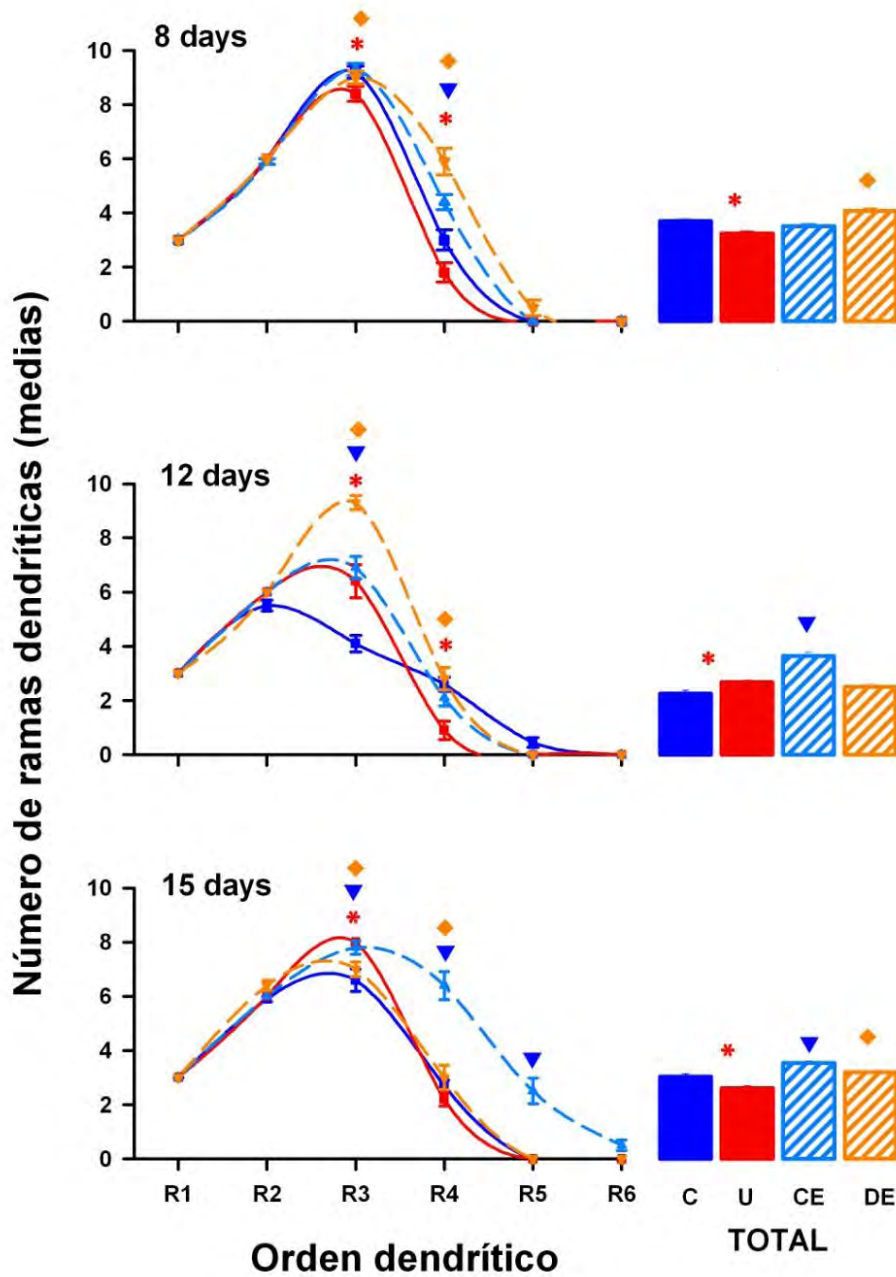


Figura 25. Medias y errores estándar de número de ramas de 1, 2, 3, 4, 5, 6 orden dendrítico a la edad de 8, 12, 15 días. En azul el grupo C, en rojo el grupo D en azul marino el grupo CE, y en naranja el grupo DE. El \* indica que las medidas de los grupos C vs D fueron significativamente diferentes ( $p < 0.05$ ), el ▼ (C vs CE) y el ◆ (D vs DE).

### 6.3.3 Efectos sobre la densidad de las ramas dendríticas

Las comparaciones estadísticas en el número de cruces dendríticos de neuronas multipolares indicaron efectos de reducción asociados a la dieta,  $F(1,228)= 18.54$ ,  $p<0.0001$ ; modificados por la edad,  $F(2,228)= 72.77$ ,  $p<0.0001$ , la ET,  $F(1,228)= 166.94$ ,  $p<0.0001$  y el factor número de intersecciones dendríticas a lo largo de los círculos concéntricos en los diferentes grupos experimentales,  $F(6,1368)= 1226.55$ ,  $p<0.0001$ . Asimismo, un efecto de interacción entre el factor edad x la dieta,  $F(2,228)= 14.97$ ,  $p<0.001$ . Las comparaciones post hoc realizadas a lo largo de los 7 círculos mostraron efectos significativos de reducción ( $p<0.05$ ) del número de intersecciones en los sujetos del grupo D en los círculos 3 y 4 a los 12 días de edad, en los círculos 2, 3, y 5 a los 12 días de edad; y en los círculos 2, 3, 4, 5, y 6 a los 15 días de edad comparados con los valores del grupo C (Figura 26). Por otra parte, hubo incremento significativo ( $p<0.05$ ) en el número de intersecciones en los CE vs el grupo C en los círculos 4 y 5 a los 8 días de edad; también hubo incrementos significativos ( $p<0.05$ ) en los círculos 2, 3, y 4 a los 12 días de edad; así mismo, aumentó significativamente ( $p<0.05$ ) el número de cruces en los círculos 3, 4, 5, 6, y 7, a los 15 días de edad (Figura 26). El grupo DE comparado con el grupo D presentó incremento significativo ( $p<0.05$ ) en el número de cruces en los círculos 3, 4, y 5 a los 8 y 12 días de edad; y en los círculos 4, 5, y 6 ( $p<0.05$ ) a los 15 días de edad. Por otra parte, se encontraron interacciones significativas entre los factores ET x edad x dieta x intersecciones dendríticas en los círculos,  $F(12,1368)= 7.92$ ,  $p<0.0001$ . Las comparaciones acumuladas del número de cruces dendríticos a lo largo de los 3 días del estudio (Total), mostraron reducción significativa ( $p<0.05$ ) en los sujetos del grupo D vs. los del C solo en el día 15 de edad. Por otra parte, incrementos significativos ( $p<0.05$ ) en el número de cruces en los grupos CE a los 8, 12, y 15 días de edad y en el grupo DE en los días 8 y 15 de edad (Figura 26).

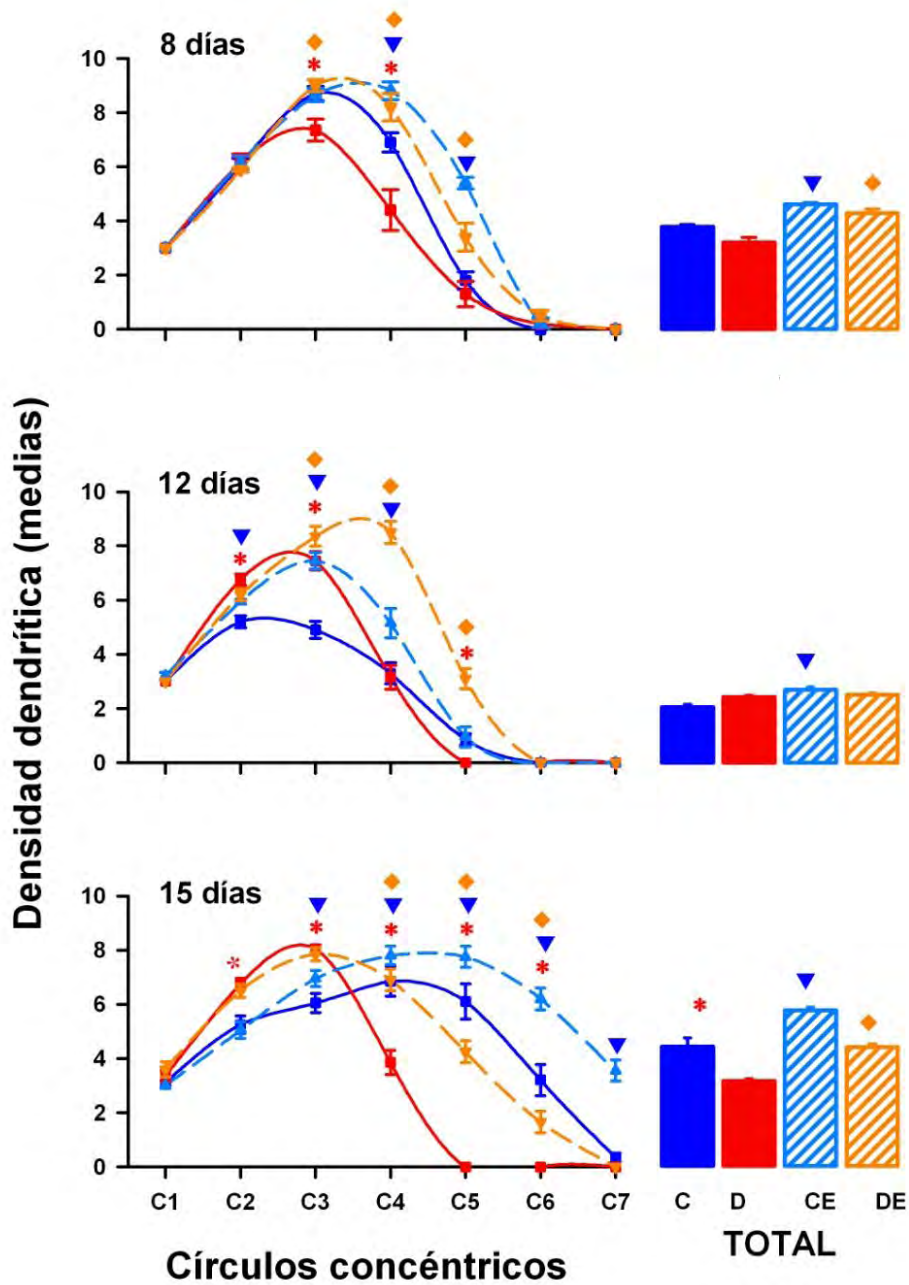


Figura 26. Medias y errores estándar de la densidad de las ramas de las neuronas multipolares, en el eje (x) el número de círculo concéntrico, la separación entre círculos de  $40.4\mu\text{m}$ . En el eje (y), la densidad dendrítica. Los símbolos [\* (C vs. D), ▼ (C vs. CE), ◆ (D vs. DE)] corresponden a las comparaciones post-hoc entre grupos resultado de la prueba de Fisher  $p < 0.05$ .



A continuación: como apoyo visual se presentan las fotomicrográficas de cortes coronales de 120  $\mu\text{m}$  en el núcleo Ambc de los diferentes grupos experimentales a la edad de 8,12, y 15 días (Figuras 27, 28, 29 y 30).

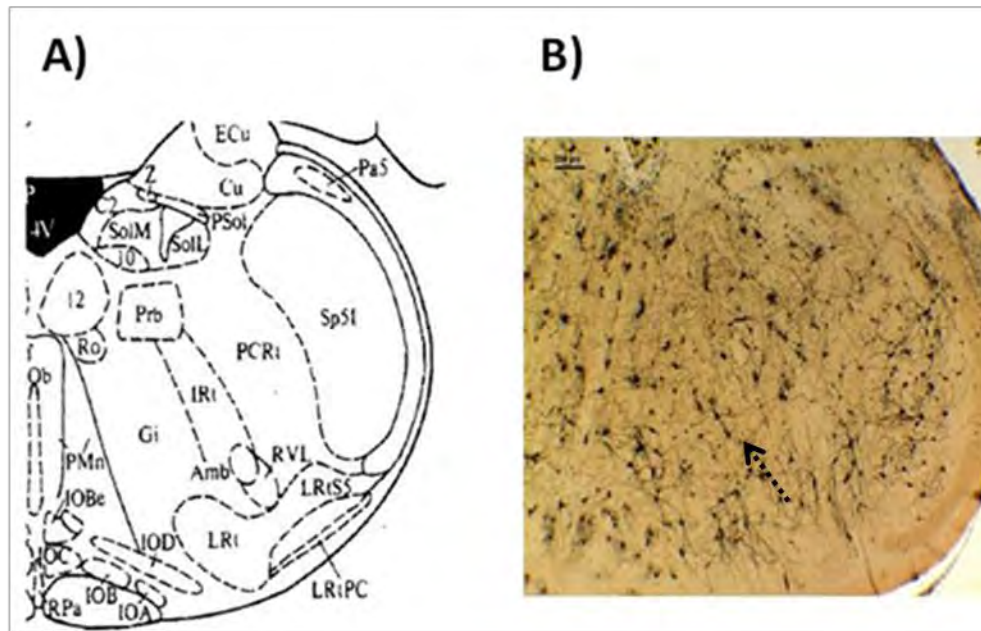


Figura 27. Esquema de ubicación de Ambc, donde se realizaron las mediciones de los grupos celulares. En A) atlas de Paxinos y Watson, 1986. Bregma -13.24 a -13.68. Interaural -4.24 a -4.68. En B) fotomicrografía (4x) en un corte coronal de 120 $\mu\text{m}$  teñido con la técnica de Golgi-Cox.

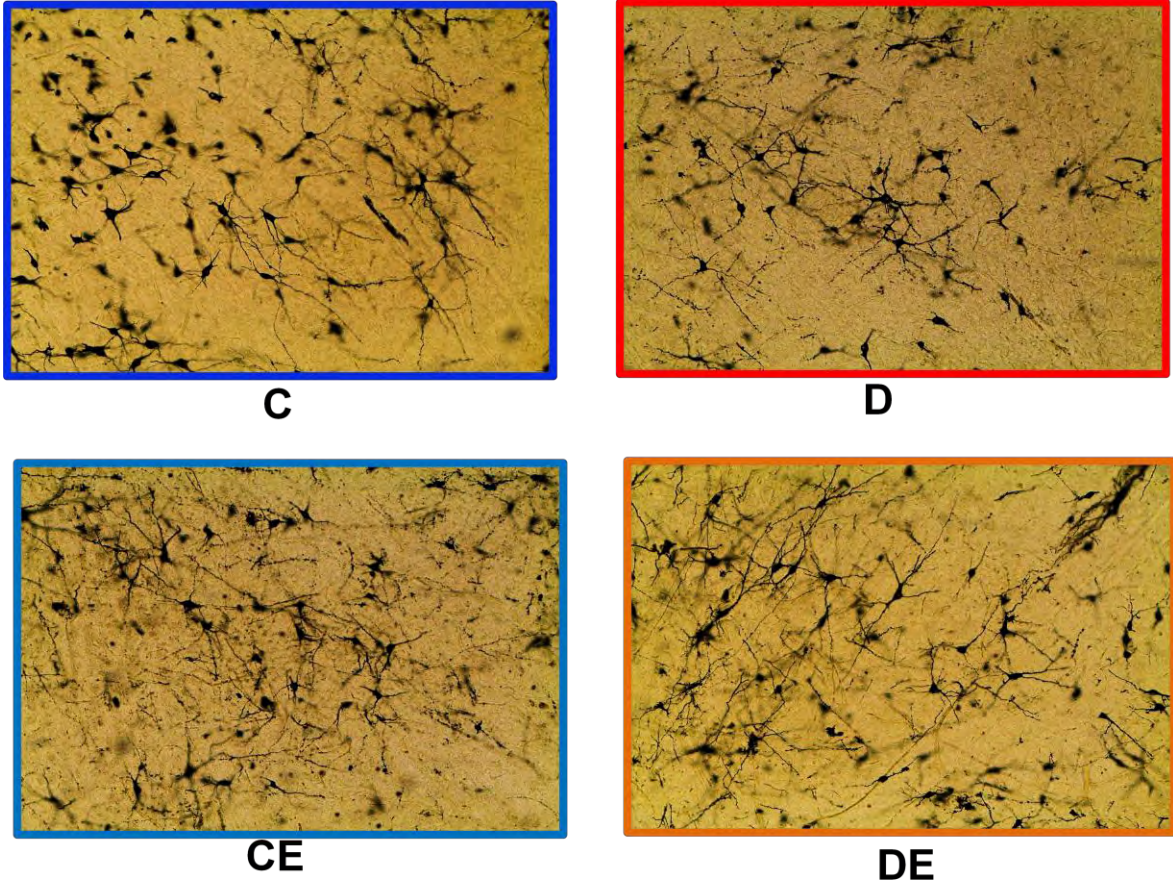
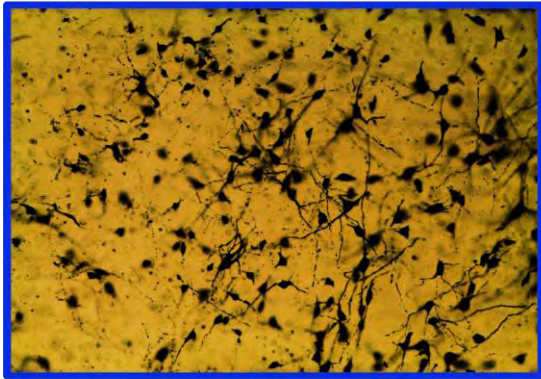


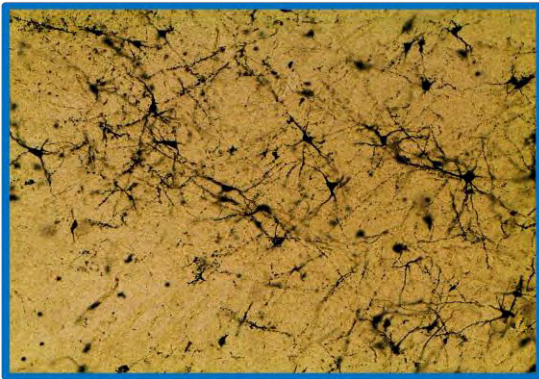
Figura 28. Fotomicrografía de cortes coronales de 120  $\mu\text{m}$  (10x) de los grupos experimentales a la edad de 8 días. En azul marino (marco) el grupo control (C), en rojo el desnutrido (D), en azul claro el grupo (CE) y en naranja el (DE). Nótese la hipoplasia causada por la RPA en el grupo D. Así mismo el CE y el DE son muy similares en su densidad a esta edad, un efecto positivo de la ET.



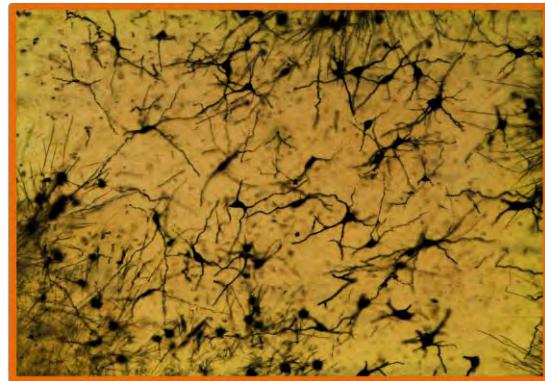
**C**



**D**



**CE**



**DE**

Figura 29. Fotomicrografía de cortes coronales de  $120\mu\text{m}$  (10x) de los diferentes grupos experimentales a la edad de 12 días. Nótese con mayor claridad la hipoplasia en las neuronas y la disminución de sus ramas dendríticas causada por la RPA el grupo D. Observe como la ET actúa inhibiendo el efecto de daño por la RPA al mantener la densidad dendrítica.



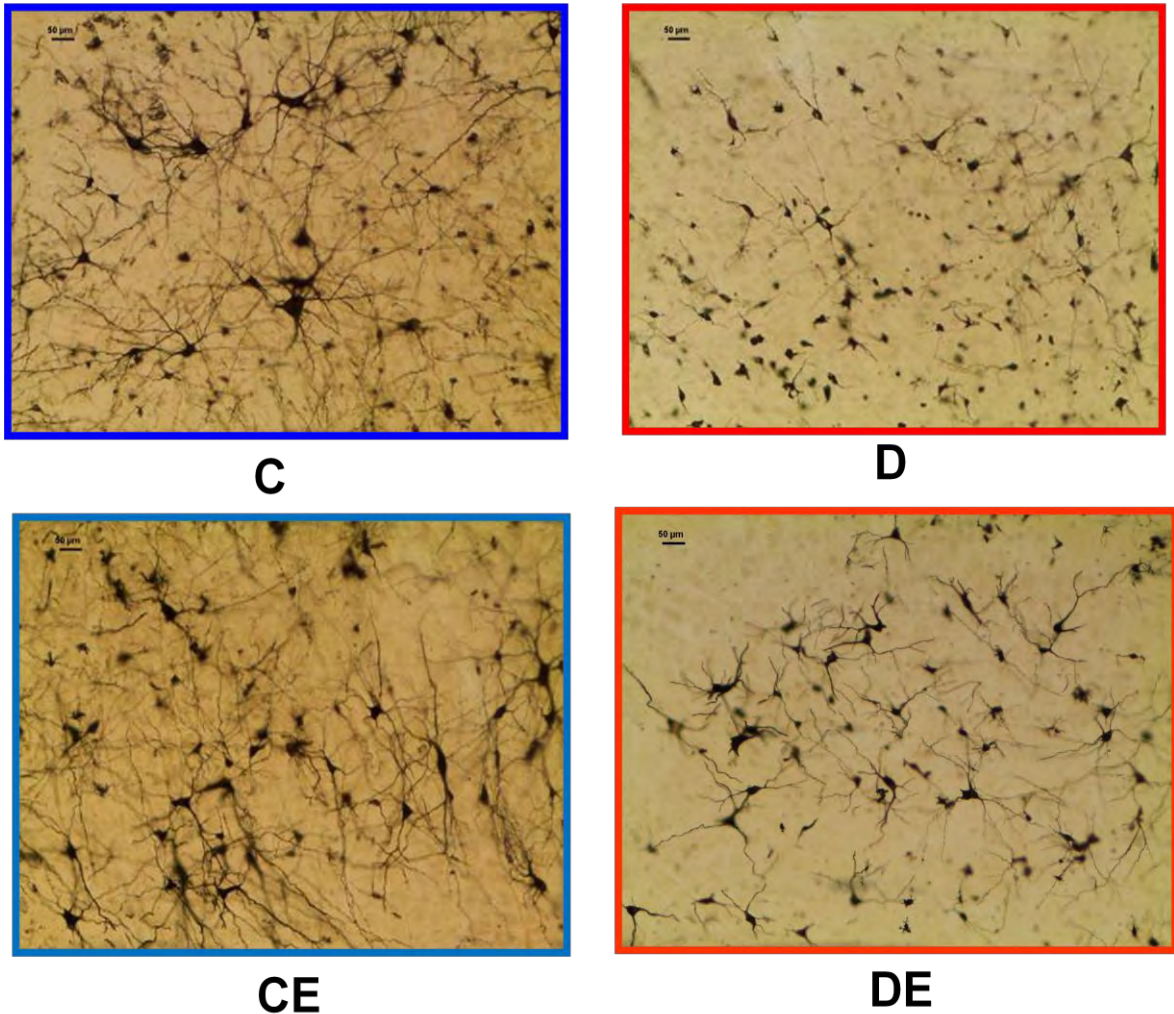


Figura 30. Fotomicrografía de cortes coronales de 120µm (10x) de los diferentes grupos experimentales a la edad de 15 días. Observe la reducción neuronal y retraimiento de la densidad dendrítica del grupo D comparado con el C. Nótese el efecto de rehabilitación que indujo la ET, inhibiendo el efecto de hipoplasia neuronal causado por la RPA.

## 6.4 Efectos sobre la emisión de VUs de las crías

### 6.4.1 Cambios en la tasa de emisión de vocalizaciones

El análisis de las comparaciones del número de vocalizaciones emitidas por bloques de tiempo mostró que la emisión es mayor en el grupo control,  $F(1,16) = 15.106$ ,  $p < 0.001$ . En el segundo bloque de tiempo del registro comparado en sí mismo. Sin embargo, comparado con el grupo D sólo existe una tendencia a la

significancia  $p=0.569$ . En el análisis de la emisión total en los 10 minutos de registro no mostró diferencias significativas. La desnutrición perinatal en consecuencia no indujo la reducción el número de vocalizaciones (Figura 31).

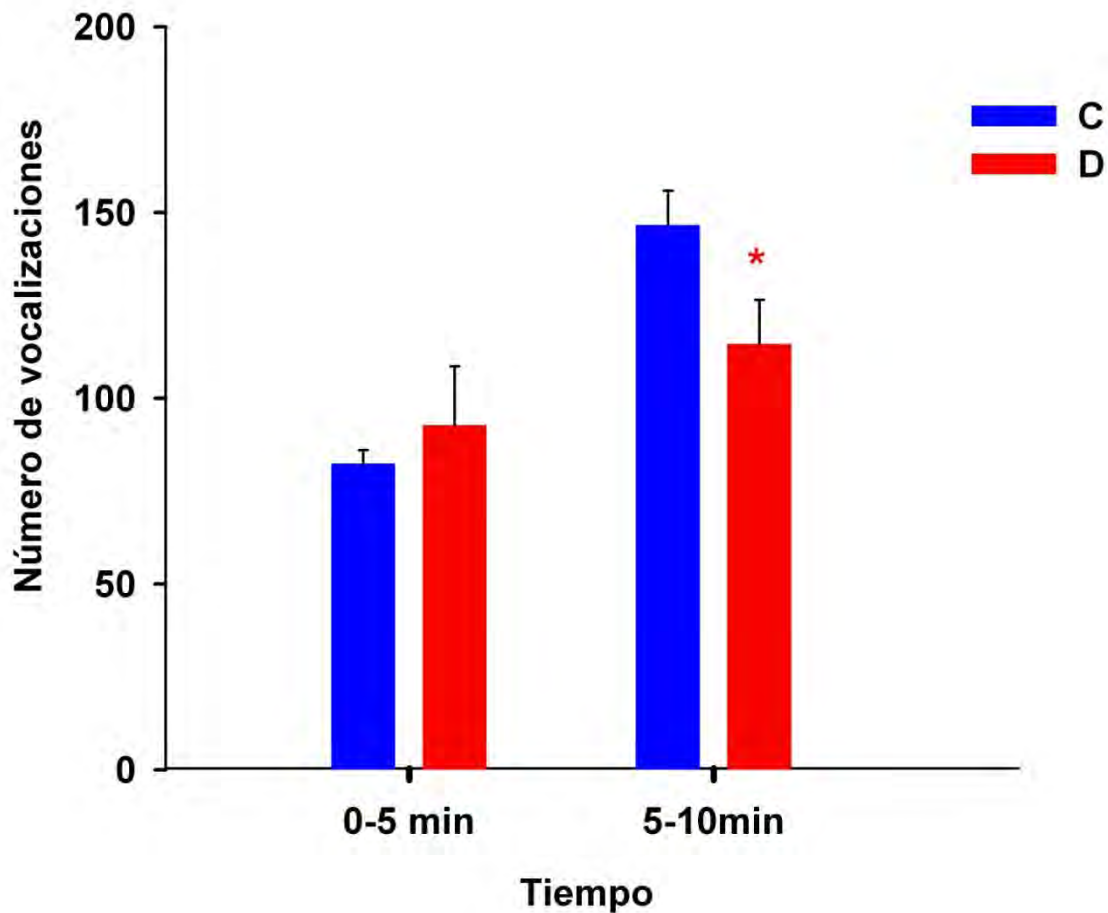


Figura 31. Medias y errores estándar del número de VUs emitidas en 10 minutos de registro en bloques de 5 minutos. El (\*) muestra la diferencia significativa del grupo C entre los bloques.

Las comparaciones por bloque de la duración promedio de la emisión de las vocalizaciones no se afectaron por la desnutrición perinatal. Ya que no se encontraron diferencias en la interacción grupo x bloque,  $F(1,16) = 0.009$ ,  $p=0.0976$  (Figura 32).

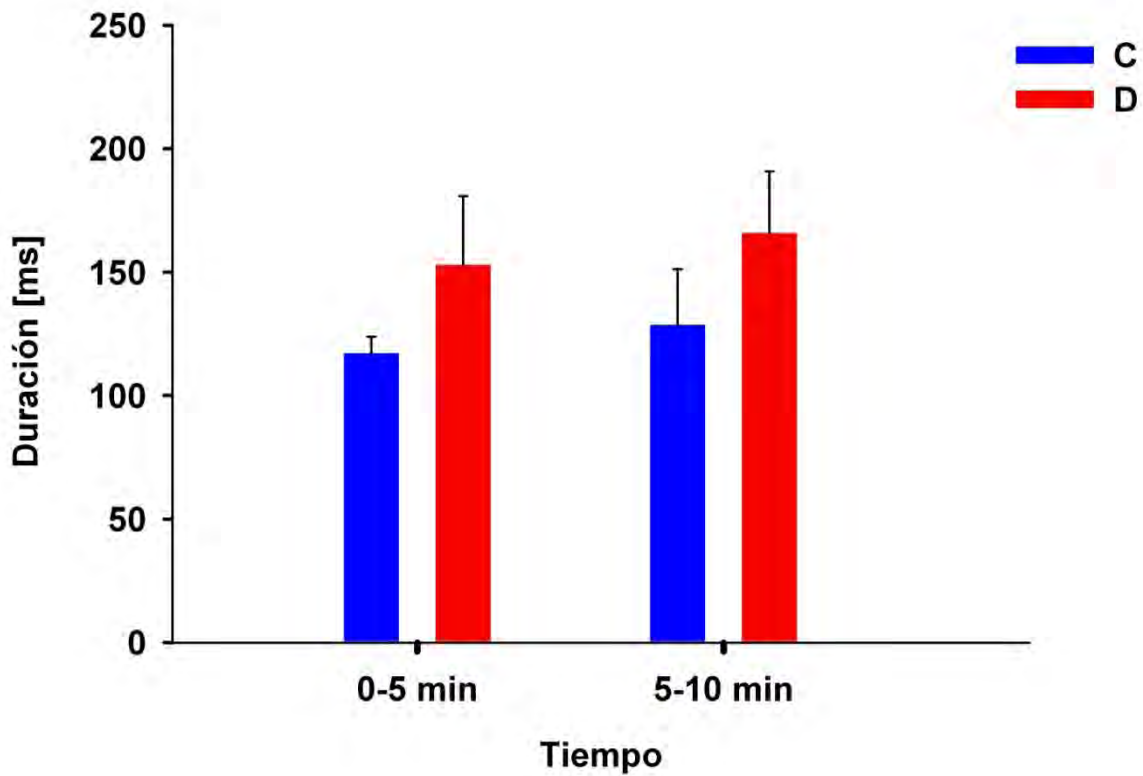


Figura 32. Medias y errores estándar de la duración promedio de las vocalizaciones emitidas en 10 minutos de registro en bloques de 5 minutos por los grupos C y D. Observe que la duración de la emisión es similar en ambos grupos para cada bloque.

#### 6.4.2 Análisis espectral de la vocalización descendente

Las comparaciones de las frecuencias de la vocal descendente (n=10) mostraron ser menores por el factor de tratamiento,  $F(1,490)=13.76$ ,  $p<0.0002$ , en el grupo C vs D. Obsérvese que la F0 y F2 no se ven afectadas por la desnutrición perinatal, ya que sus valores son similares en ambos grupos (Figura 33).

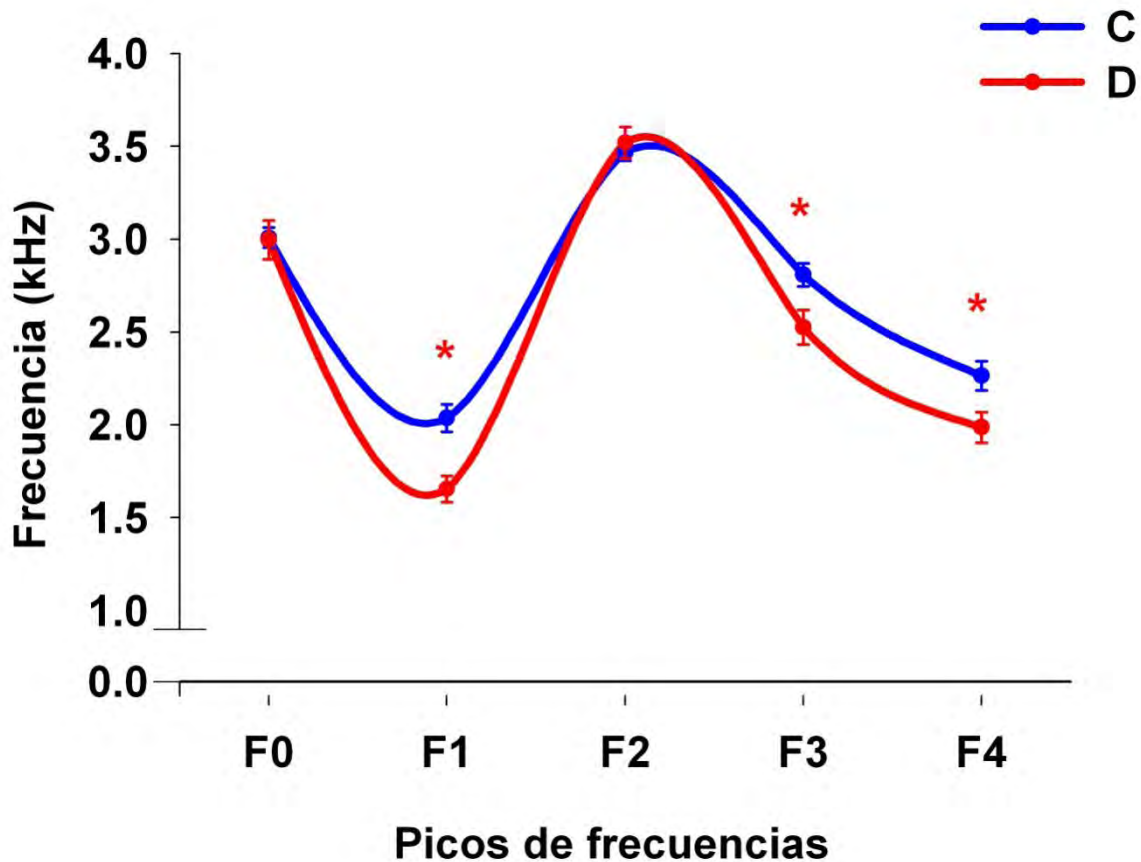


Figura 33. Análisis espectral de la vocal descendente, en el eje “x” se presentan las frecuencias: fundamental (F0), mínima (F1), máxima (F2), pico (F3), última (F4), y en el eje “y” el valor de la frecuencia en kHz. Los (\*) indican las diferencias significativas de la prueba post-hoc Fisher entre grupos.

Los valores de la intensidad a la cual se presentan las frecuencias: F0, F1, F2, F3 y F4 en la vocal descendente es menor en el grupo D versus el C por el factor de tratamiento,  $F(1,490) = 355.88$ ,  $p < 0.0001$  como se observa en la siguiente gráfica (Figura 34). En ella se puede apreciar la reducción de intensidad en decibeles alcanzada en dichas frecuencias. Nótese que en las F0 y F2 también se alteró la intensidad. Lo cual sugiere que la desnutrición perinatal reduce la intensidad de la vocalización en cada una de sus partes.

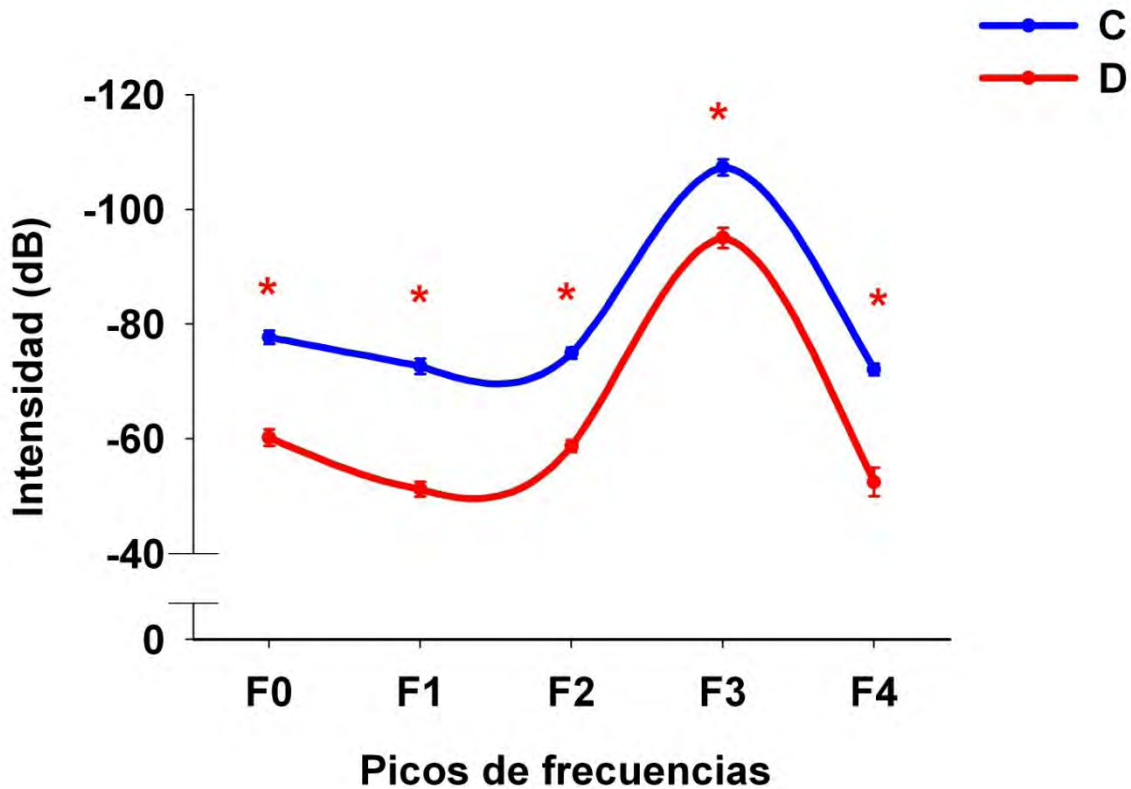


Figura 34. Análisis espectral de la vocal descendente para los grupos C y D, en el eje “x” se presentan las frecuencias: fundamental (F0), mínima (F1), máxima (F2), pico (F3), última (F4), y en el eje “y” el valor de la intensidad en dB. Los (\*) indican las diferencias significativas de la prueba post-hoc Fisher entre grupos.

Para analizar estos efectos en la intensidad se cuantificó el poder de cambio de intensidad con respecto al nivel basal de la señal (-70dB), los resultados se muestran en la siguiente gráfica (Figura 35). Nótese que la media del poder de cambio ya sea positivo o negativo sugiere que el grupo D posee una menor capacidad para incrementar su intensidad comparada con el grupo C. El valor relativo se señaló como 1 si el valor de la intensidad superó +10dB del nivel basal (-70dB), y 0 si su valor de cambio fue menor a  $\pm 10$ dB con respecto el valor basal. El promedio del valor relativo graficada como poder de cambio (delta de Dirac ( $\delta$ )) indica que el grupo D posee la mitad de la capacidad para generar dicho cambio en la intensidad comparado con el grupo C.



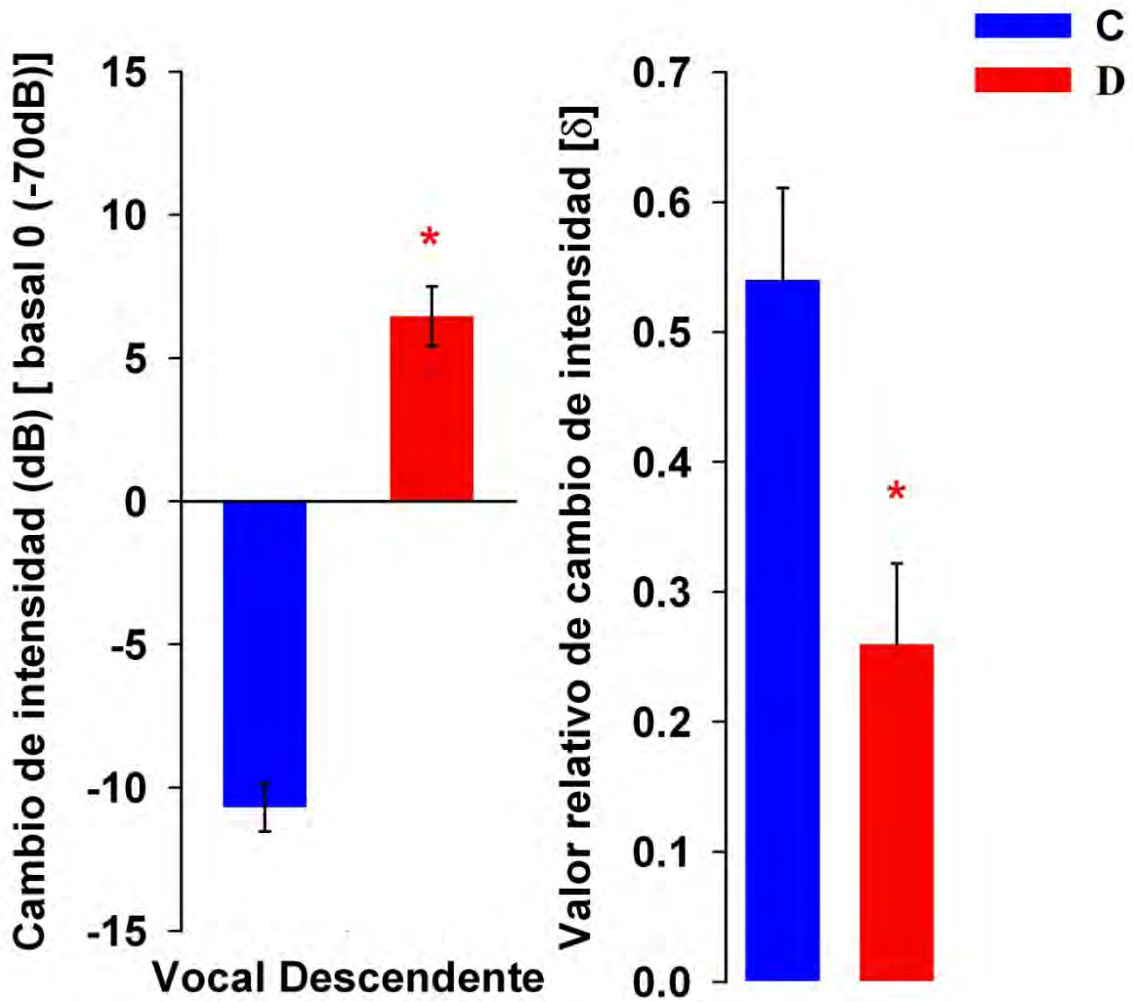


Figura 35. Valor relativo del poder de cambio de intensidad ( $\delta$ ) con respecto al nivel basal de la señal (-70dB). A la izquierda las medias  $\pm$  error estándar de la intensidad promedio de la vocal descendente. Obsérvese que el grupo D posee un valor ( $\delta$ ) de 0.26, y el grupo C una media de 0.54.

## 7 DISCUSIÓN

### 7.2 Fenómenos que pueden propiciar los cambios en el desarrollo físico

De acuerdo con los resultados de este estudio, la RPA redujo la ganancia de peso corporal y cerebral, e indujo el retraso en la apertura de meatos auditivos externos y de los párpados de las crías. La estimulación táctil (ET) favoreció la ganancia de peso corporal y cerebral a los 15 días de edad. Sin embargo, el grupo DE no se igualó al grupo control en el tiempo de apertura de oídos y párpados. El retraso en la apertura de oídos y párpados en la crías propiciado por la RPA, puede afectar el ingreso de señales ambientales vía de los sistemas (auditivo y visual) que favorecen la entrada de información para el establecimiento de los circuitos neuronales, integración y respuesta a los estímulos ambientales (Callison y Spencer, 1968; Salas et al., 2001; González et al., 2001; Torrero et al., 2003). Los efectos de la ET en el sujeto control pudieran de acuerdo a estudios recientes favorecer el reconocimiento visual a objetos novedosos (Richards et al., 2012). Entre los mecanismos que propician este efecto se reconoce el papel de factor de crecimiento epidérmico (EGF) local, ya que la inyección con EGF en crías de 4 a 21 días postnatales, induce la apertura precoz de párpados, y el surgimiento de los incisivos en los neonatos (Calamandrei et al., 1988). El EGF parece participar en la regulación local de la maduración epidérmica en la piel del neonato (Hoath et al., 1987). Por otra parte, se encuentra íntimamente relacionada a los niveles de hormonas tiroideas, principalmente la T4. Estas hormonas presentan bajos niveles en sujetos sometidos a desnutrición perinatal (Mahajan et al., 2005). Por ende, es posible que la estimulación táctil como estímulo repetitivo sobre la piel del neonato pueda inducir cambios en la producción local de factores de crecimiento como es el EGF. Sin embargo, este fenómeno de favorecimiento en el sistema visual se ha relacionado a la inducción de la elevación de factores como el factor de crecimiento de tipo insulínico 1 (IGF-1) en la corteza visual primaria, la liberación de IGF-1 es inducida por la GH, y se sabe que la GH puede incrementarse por la estimulación táctil (Schanberg et al., 1984; Guzzetta et al., 2009). Por otra parte, la integración multisensorial juega un papel crucial para el entendimiento de los

efectos de la ET, ya que recientemente se ha identificado a nivel de la corteza temporal, la influencia que tiene la actividad audio táctil en el desarrollo posterior de la corteza visual primaria (Ocelli et al., 2011; Iurilli et al., 2012). El hallazgo en este estudio del efecto promotor de la apertura de oídos pudiera estar ligado a la interrelación entre los diferentes sistemas sensoriales y hormonales (Leah et al., 1985). Respecto a la ganancia de peso corporal y cerebral, se sabe que la ET reduce los niveles de glucocorticoides, y favorece la elevación de los niveles de GH, la diversa acción de la GH sobre factores de crecimiento tales como el factor de crecimiento derivado del cerebro (BMDF) y el NGF; estos últimos se hayan involucrados en procesos de crecimiento neuronal y maduración de los circuitos (Berry et al., 2012). Otros efectos de la ET, es que eleva la actividad basal vagal y los receptores de presión en el sistema entérico, favoreciendo la actividad gástrica y la asimilación del alimento, que contribuye a la ganancia de peso corporal (Field y Diego, 2008).

### **7.3 Mecanismos asociados al desarrollo neuronal**

Considerando la hipótesis 4.1, con base en los resultados obtenidos, se acepta la hipótesis, ya que la RPA indujo cambios en la morfología neuronal del Ambc, generando una inversión del patrón de desarrollo del soma de las neuronas multipolares y produciendo un menor número de ramas, y la disminución de la densidad dendrítica. Para abordar la discusión al respecto es primordial hablar de los mecanismos de formación, y elongación dendrítica que subyacen durante el desarrollo postnatal; que tienen como finalidad el establecimiento del patrón de crecimiento neuronal, y la consolidación de los circuitos. Dichos circuitos son esenciales en el mantenimiento del desarrollo estructural, y funcional del organismo. Durante la formación de los circuitos, es primordial la estructuración de la morfología axonal, y de la arborización dendrítica. En ese contexto, la arborización dendrítica recibe múltiples entradas, incluso en las neuronas sensoriales la arborización define su campo sensorial, el rango de señales que perciben las dendritas están principalmente determinados entre otros factores por

los canales iónicos, así como por la densidad y tipo de receptores que expresan. Entre más densa sea la arborización por grosor y área que se halla cubierta por dichos receptores, mayor será la habilidad de las neuronas sensoriales para percibir el estímulo externo (Rosenzweig y Bennett, 1996). Debido a que se ha sugerido que la forma de arborización dendrítica puede interferir con la sumación y propagación de un estímulo sináptico percibido mediante las dendritas distales como sitio de iniciación del potencial sináptico, por lo que el número de dendritas distales podría modificar el control de la transmisión de dicho potencial de acción, y por ende influir en la eficacia para transmitir la información del estímulo externo (Hall y Treinin, 2011). Lo cual sugiere que la RPA vía de la reducción en la densidad de la arborización dendrítica puede limitar la entrada de señales sensoriales, interferir en la iniciación de un potencial ya que reduce el número de ramas distales y modificar la propagación del impulso, reduciendo la posibilidad de integrar información y responder a estímulos externos. Por otro lado, el orden temporal en que surgen de las dendritas primaria, secundaria, terciaria, etc. indica que el proceso de formación de ramas es dinámico, y requiere de una regulación directa ya que tanto dendritas secundarias como de cuarto orden, crecen y se retraen para regular el arreglo espacial de las ramas en paralelo, mientras las ramas de tercer orden retraen su terminación para no interferir con las de cuarto orden. El desarrollo es un proceso altamente dinámico que depende de mecanismos competitivos para formar un orden adecuado y un arreglo espacial que permita no sobrelapar las ramas (Hall y Treinin, 2011). Por ende, cambios en número y extensión interfieren con el establecimiento de este patrón espacio-temporal, así la RPA puede reducir el campo de interacción neuronal, y afectar la transmisión de impulsos. Los hallazgos de interferencia en los procesos de integración a nivel de los árboles dendríticos de las neuronas del Ambc que aquí se describen, tienen posiblemente sustento parcial en estudios recientes que muestran que tanto la morfología dendrítica, como la extensión de sus árboles tienen una razón funcional importante, debida a que se hayan altamente regulados por la acción de múltiples factores de transcripción. En estos procesos moleculares se involucra también el control post-transcripcional a través de la

síntesis de proteínas locales en las neuronas en desarrollo. En el cono, la terminal pre sináptica, y en las ramas dendríticas se requiere dicha síntesis para dirigir el patrón de crecimiento (Swanger y Bassell, 2011). Por lo que la RPA puede a través de inducir cambios en las concentraciones de dichos factores de crecimiento, reducir la síntesis de proteínas locales o afectar la actividad enzimática modificar el patrón de crecimiento para retraer las ramas dendríticas. La desnutrición induce la elevación de los glucocorticoides, y cambios en el eje Hipotálamo-Pituitaria-Adrenal (HPA) a corto y largo plazo (Chisari et al., 2001; Florian y Nunes, 2010), dicha elevación puede influir en la actividad enzimática de la OD, que a su vez está asociada a la síntesis local de proteína (Seiler, 2004). Una baja en la síntesis local se relaciona a la incapacidad intelectual, hiperexcitabilidad y neurodegeneración (Swanger y Bassell, 2011). Entonces, la RPA aplicada a los sujetos experimentales tras haber reducido la arborización, y la densidad dendrítica pudo interferir con la señalización mediante los cambios en la generación del patrón espacio temporal de la arborización dendrítica, afectando la iniciación, sumación y propagación de los potenciales, además de reducir la probabilidad de establecer más conexiones. De estudios moleculares *in vivo* se sabe de factores como el BDNF que pueden interferir con estos mecanismos induciendo neurogénesis espinal (Swanger y Bassell, 2011; Hale et al., 2011). Por ello, el BDNF es esencial para el desarrollo cerebral. Recientemente, se ha reportado que la RPA altera los niveles de factores como el BDNF (Coupé et al., 2009; Florian y Nunes, 2010). Por lo tanto, es posible que mediante estos efectos sobre dicho factor entre otros, cause los cambios observados en la arborización dendrítica de las neuronas multipolares, reduciendo la formación de nuevas ramas e interfiriendo con su crecimiento y funcionamiento en diferentes niveles del SNC.

#### **7.4 Efectos de rehabilitación inducidos por la estimulación táctil**

En la hipótesis 4.3 se sugirió que la estimulación táctil tendría efectos de rehabilitación sobre la morfología neuronal del Ambc posiblemente dañada por la RPA y basándose en los resultados de los efectos de la RPA en la morfología de

las neuronas multipolares del Ambc descrita con anterioridad, y tomando en cuenta los efectos en los grupos DE y CE que recibieron la estimulación táctil, en dónde se favoreció la formación de ramas distales de tercer y cuarto orden, así como se incrementó la densidad dendrítica, lo cual sugiere que dichos efectos son independientes de la condición del sujeto. Como se señaló con anterioridad, las ramas distales son el sitio de iniciación de un potencial, mediante la sumación de potenciales excitatorios postsinápticos (EPSPs) generados por señales sensoriales externas, por ello si la ET favoreció la generación y sostenimiento de dichas ramas sugiere un mecanismo de atenuación de los efectos del daño causado por la RPA en esta etapa de desarrollo, así como pudo incidir en el desarrollo neuronal en los sujetos control, incrementando el número de ramas y la extensión dendrítica. Lo cual pudiera tener implicaciones positivas al favorecer la sumación espacio temporal y mejorar la generación de los EPSPs en las neuronas multipolares. Otros estudios, han mostrado que el masaje corporal tiene efectos similares a los reportados en este estudio, más el incremento en la sinaptogénesis en otras áreas cerebrales tales como la corteza del cíngulo, área 3 (Cg3), amígdala (Richards et al., 2012). Por lo que la ET aplicada provee de estímulos neuro activadores como lo es el incremento en la entrada sensorial para promover el desarrollo neuronal. Tal como se ha mostrado en otros estudios de estimulación táctil en dónde los sujetos con lesión neuronal considerable, al ser expuestos a un ambiente enriquecido, presentan una mejora al incrementar la neurogénesis y sinaptogénesis comparado con sujetos que no fueron expuestos a este ambiente (Rosenzweig y Bennett, 1996; Morroni et al., 2011). En este caso, la estimulación táctil de tipo masaje provee de estímulos que probablemente promuevan el incremento en la liberación de factores de crecimiento como el NGF y al BDNF, y mejorar la generación del patrón de crecimiento dendrítico, mejorando la posibilidad de conectividad entre las neuronas de los diferentes circuitos neuronales. Se sabe que la estimulación táctil, que la madre provee a la cría permite regular el funcionamiento (programación) del eje HPA de la cría (Schanberg et al., 2003). De estudios conductuales, en los cuales se ha comparado crías con separación maternal y crías control, se reconoce que

conductas como el lamido anogenital, el aseo y el contacto físico materno tiene influencia en la estructura, y función de las neuronas hipocampales afectando a moléculas de BDNF y receptores a NMDA; teniendo impacto a largo plazo en el reconocimiento de objetos novedosos, conducta exploratoria, aprendizaje espacial y memoria, así como en los receptores a glucocorticoides influenciado por la regulación del eje HPA, teniendo así impacto en la densidad espinal y plasticidad del hipocampo (Liu et al., 2000; Weaver et al., 2004; Champagne y Curley, 2009). Estudios en roedores han mostrado que la ET puede reducir los efectos negativos producidos por la separación maternal o por estrés prenatal en el crecimiento de las crías, en la secreción de hormona del crecimiento, en el eje HPA, en el BDNF y en la expresión de sinaptofisina (Schanberg y Field, 1987; Burton et al., 2007; Chatterjee et al., 2007). Esto último sugiere que la ET de tipo masaje pudiera remedar algunos de los efectos de la ET materna, favoreciendo la síntesis de proteínas específicas locales que promueven la formación de nuevas ramas, y la elongación de las mismas, promoviendo el desarrollo dendrítico y la sinaptogénesis (McAllister, 2000). Respecto al NGF se sabe que puede inducir la supervivencia neuronal, crecimiento y plasticidad sináptica (Berry et al., 2012). Por último es posible que la acción de la ET como un estímulo inductor de formación, y elongación del árbol dendrítico previniendo el daño estructural por la RPA se encuentre ligado tanto a procesos de síntesis local de proteínas, como a la atenuación en la elevación hormonal, y al favorecimiento de la acción de los factores de crecimiento sobre el tejido neuronal (Coupé et al., 2009). Por último, es necesario resaltar que estos efectos que se presentan en el desarrollo pueden tener implicación o no tenerla en la etapa adulta, por ello es necesario para fines de la comprensión de los efectos aparentemente positivos de la estimulación, se evalúen los sujetos en otras etapas de la vida, se considere la duración, intensidad y ventana de tiempo de la aplicación de dicha estimulación, ya que puede que los efectos positivos observados no prevalezcan bajo otras condiciones de estimulación o etapas de la vida.

## 7.5 Mecanismos asociados a la intensidad de la emisión de vocalizaciones

De acuerdo con la hipótesis propuesta en dónde se sugirió que la RPA afectaría la tasa de emisión y las características de las VUs de las crías a la edad de 15 días, podemos concluir con base en los resultados obtenidos que la tasa de emisión de vocalizaciones (el número y duración) entre los grupos C y D no es diferente, lo cual indica la posibilidad de que existan mecanismos reguladores de la emisión de VUs, que se hayan preservados evolutivamente de tal forma que, los estímulos epigenéticos como lo es la RPA no alteran dichos mecanismos reguladores para producir la vocalización. Sin embargo, de acuerdo a los resultados, la RPA modificó las características de la vocalización descendente, que redujo significativamente el valor de las frecuencias mínima (F1), pico (F3) y última (F4), así como sus intensidades incluyendo la de F0 y F2 en el grupo D con respecto al grupo C. Lo cual sugiere la existencia de mecanismos moduladores para la emisión de la VUs a través de los cuales se puede modificar el mensaje en la comunicación ultrasónica. Los hallazgos obtenidos en este estudio favorecen entonces parcialmente la hipótesis propuesta. De acuerdo con la literatura, la tasa de emisión en cuanto a su duración presenta una correlación lineal con la duración del disparo neuronal del Ambc (Yashima y Hayashi, 1987), lo que sugiere que al no haberse observado cambios en la duración de la vocalización causado por la RPA, el daño en la morfología del Ambc por la RPA en menor número de ramas y retraimiento dendrítico no se haya asociado directamente a la duración de la vocalización. Por otro lado, la intensidad y frecuencia del disparo neuronal, se ha asociado a la fuerza del aire, que induce la vibración de la cuerda vocal, es decir al sostenimiento de la Psub, y a cambios instantáneos de presión en el ciclo glotal, dicha presión mantiene un correlato lineal con la intensidad de la vocalización. Los hallazgos sugieren que los mecanismos que modulan la intensidad podrían estar relacionados con los cambios en la morfología neuronal. Por lo que es posible que al afectar la arborización dendrítica y la elongación de las dendritas de dichas neuronas se pudo inducir cambios en la inervación de los músculos TA/LTA/IA y afectar la presión subglotal, reduciendo la intensidad de las frecuencias durante la



vocalización. Además de reducir el poder de cambio en la intensidad de la vocalización en el grupo desnutrido comparado con el grupo control. De acuerdo a otros estudios, sobre el tiempo de integración crítica de los formantes para la percepción de la comunicación, las frecuencias acompañantes (F1, F2, F3, y F4) son los complejos de frecuencias que surgen de la integración del contexto de la vocalización, que se forman de los picos máximos y mínimos, y son los que permiten la discriminación de un fonema, misma que propicia la respuesta a un determinado estímulo, que en este caso fue la separación materna (Geissler y Ehret, 2002). Es posible entonces que la RPA al alterar dichos formantes pueda influir en la discriminación, y percepción de la vocalización, lo cual afectaría directamente la comprensión en la comunicación madre-cría. Por otro lado, las frecuencias e intensidades alcanzadas en la vocalización, podrían oscilar de acuerdo al tipo de VUs, por lo que este estudio se haya limitado para definir si estos cambios prevalecen a lo largo de toda la compleja gama de vocalizaciones en la emisión de la comunicación ante la separación materna. Cabe señalar que existen otras estructuras asociadas al control de la emisión de vocalizaciones entre ellas el núcleo motor del facial porción caudal, complejo Böxinger, núcleo del tracto solitario porción ventro-lateral (Yajima y Hayashi, 1983). Por lo que es posible que esté efecto de reducción este asociado el daño causado por RPA en múltiples áreas del tallo cerebral afectando la integración y llegada de información necesaria para la emisión de la vocalización. Por lo tanto, se requieren estudios adicionales en diferentes estructuras, y contextos de emisión antes de establecer conclusiones definitivas acerca de los posibles mecanismos que subyacen a las hipótesis y objetivos que aquí se propusieron.

Por último, este estudio presenta diversas limitantes, una de ellas es que el estudio de los efectos se reduce a cambios morfológicos en un grupo neuronal, de un núcleo del tallo cerebral que regula la emisión de VUs, en una ventana de tiempo corta en donde la plasticidad neuronal favorece la observación de dichos resultados. Por otra parte, sólo se analiza un tipo de vocalización ultrasónica en respuesta a la separación materna, siendo la comunicación amplia y dependiente del contexto de dicha emisión y además, que se requiere de la actividad integrada

en términos de un circuito conformado por diversas estructuras cerebrales. Sin embargo, es un buen inicio para tratar de entender los procesos de activación secuencial que llevan hacia algo tan complejo como lo es el lenguaje. Por otro lado, se demuestra que la ET es una posible herramienta como tratamiento de apoyo en casos de desnutrición, debido a que no implica un costo económico para ejecutarse, los efectos positivos en el desarrollo neuronal y desarrollo físico son un buen comienzo para mejorar la recuperación morfológica y funcional de los seres humanos afectados perennemente por la pobreza y la desnutrición.

## **CONCLUSIONES**

La restricción perinatal de alimento retrasa el desarrollo físico y sensorial en las crías, y reduce el número y la densidad dendrítica de las neuronas multipolares del núcleo Ambc.

La estimulación táctil produce efectos de rehabilitación incrementando el número y densidad dendrítica neuronal, tanto de los sujetos control como en los desnutridos.

La estimulación táctil potenció la integración aferente, posiblemente a través de la liberación de factores de crecimiento, que activan procesos neuroprotectores para mantener las sinapsis y la función, independientemente de la condición nutricional.

Se sugiere que los efectos de la RPA en las neuronas multipolares del Ambc propician cambios en la inervación de los músculos intrínsecos de la laringe, reduciendo las frecuencias armónicas, y la intensidad de la emisión de las VUs de tipo descendente.

La RPA decrece el poder de cambio de intensidad en la emisión de la vocalización descendente, probablemente alterando la emisión de VUs de la cría.

Los hallazgos del estudio son valiosos para la comprensión de los procesos sensoriales complejos e integración neuronal de la información, como lo es la emisión de VUs de las crías.

## **IX. REFERENCIAS**

Acolet D, Modi N, Giannakoulopoulos X, Bond C, Weg W, Cow A, y Glover G. 1993. Changes in plasma cortisol and catecholamine concentrations in response to massage preterm infants. *Arch. Dis. Child. London.* 68, 29-31.

Adlar PA, y Cotman CW. 2004. Voluntary exercise protects against stress-induced decreases in brain-derived neurotrophic factor protein expression. *J. Neurosci. USA.* 124, 985-992.

Ai J, Epstein PN, Gozal D, Yang B, Wurster R, y Cheng ZJ. 2007. Morphology and topography of nucleus ambiguus projections to cardiac ganglia in rats and mice. *J. Neurosci. USA.* 149, 845-860.

Alberts JR. 1984. Sensory-perceptual development in the Norway rat: A view toward comparative studies. En: R. Kail y NE. Spear (Eds.), *Comparative Perspectives on the Development Memory.* (pp.65-101), New York: Plenum Press.

Alberts JR, y Cramer CP. 1988. Ecology and experience: Sources of means and meaning of developmental change. En: EM. Blass (Ed.), *Developmental Psychobiology and Behavioral Ecology. Handbook of Behavioral Neurobiology.* (pp.1-35), New York and London: Plenum Press.

- Alleva E, Santucci D, y Branch I. 2006. Analysis of ultrasonic vocalizations emitted by infant rodent. *Curr. Protoc. Toxicol. Italy.* 13, 1-14.
- Altman J, y Bayer SA. 1980. Development of the brain stem in the rat II. Thymidine-radiographic study of the time of origin of neurons of the upper medulla, excluding the vestibular and auditory nuclei. *J. Comp. Neurol. USA.* 194, 37-56.
- Angulo Y, y Gonzalez AW. 1932. The prenatal development of behavior in the albino rat. *J. Comp. Neurol. USA.* 55, 395-442.
- Amato F, Scalera E, Sali C, y Moles A. 2005. Pup call, mother rush: does maternal responsiveness affect the amount of ultrasonic vocalization in mouse pups? *Italy. Behav. Genet.* 35, 103-112.
- Balcome JP, y MacCracken GF. 1992. Vocal recognition in Mexico free-tailed bats: do pups recognize mothers? *Anim. Behav. USA.* 43, 79-87.
- Bautista TG, Sung QJ, Zhao WJ, y Pillowsky PM. 2010. Cholinergic inputs to laryngeal motoneurons functionally identified in vivo in rat: a combined electrophysiological and microscopic study. *J. Comp. Neurol. Australia.* 518, 4903-4916.
- Berry A, Bidoncci E, y Alleva E. 2012. NGF, brain and behavioral plasticity. *Neural. Plast. Italy.* 2012, 1-9.
- Bettschen D, Feldon J, y Pryce C. 2004. Circadian and temperature specific effects of early deprivation on rat maternal care and pup development: short-term markers for long term effects? *Dev. Psychobiol. Switzerland.* 45, 59-71.

- Burton CL, Chatterjee D, Chatterjee-Chakraborty M, Lovic V, Grella SL, Steiner M, y Fleming AS. 2007. Prenatal restraint stress and motherless rearing disrupts expression of plasticity markers and stress-induced corticosterone release in adult female Sprague-Dawley rats. *Brain. Res. Canada.*1158, 28-38.
- Blumberg MS, Sokoloff G, y Kent KL. 2000. A development analysis of clonidines effects on cardiac rate and ultrasound production in infant rat. *Dev. Psychobiol. USA.* 30, 186-193.
- Branchi I, Santucci D, Vitale A, y Alleva E. 1998. Ultrasonic vocalizations by infant laboratory mice: A preliminary spectrographic characterization under different conditions. *Dev. Psychobiol. Italy.* 33, 249-256.
- Branchi I, Santucci D, y Alleva E. 2001. Ultrasonic Vocalization emitted by infant rodents: a tool for assessment of neurobehavioral development. *Behav. Brain. Res. Italy.*125, 49-56.
- Branchi I. 2006. Analysis of ultrasonic vocalization emitted by infant rodents. *Current. Protoc. Toxicol. Italy.* 13, 1-14.
- Brouette-Lahlou I, Vernet-Maury E, y Vigouroux M. 1992. Role of pups' ultrasonic calls in a particular maternal behavior in Wistar rat: pup's anogenital licking. *Behav. Brain. Res. France.* 50, 147-154.
- Brown P. 2010. Fundamentals of audio and acoustics. En: D. Self (Ed.), *Audio Engineering Explained.* (pp. 5-25), Amsterdam: Elsevier Focal Press.
- Brudzynski SM. 2005. Principles of rat communication: quantitative parameters of ultrasonic calls in rats. *Behav. Genet. Canada.* 35, 85-92.

- Brudzynski SM, Kehoe P, y Callahan M. 1999. Sonographic structure of isolation induces ultrasonic calls of rat pups. *Dev. Psychobiol. Canada.* 34, 195-204.
- Callison D, y Spencer J. 1968. Effect of chronic undernutrition and/or visual deprivation upon the visual evoked potentials from the developing rat brain. *Dev. Psychobiol. USA.* 1, 196-204.
- Chang E, Bao S, Imalzomi K y Schreiner C. 2005. Development of spectral and temporal response selectivity in the auditory cortex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 102, 16460-16465.
- Champagne FA, y Curley JP. 2009. Epigenetic mechanisms mediating the long-term effects of maternal care on development. *Neurosci. Biobehav. Rev. USA.* 33, 593-600.
- Chatterjee D, Chatterjee-Chakraborty M, Rees S, Cauchi J, de Medeiros CB, y Fleming AS. 2007. Maternal isolation alters the expression of neural proteins during the development: “stroking” stimulation reverses these effects. *Brain. Res. Canada.* 1158, 11-17.
- Chen H. 2009. Massage therapy during early postnatal life promotes greater lean mass and bone growth mineralization and strength in juvenile and young adult rats. *J. Musculoskelet. Neuronal. Interact. USA.* 9, 278-287.
- Choi JS, y Brown TH. 2003. Central amygdale and lesions block ultrasonic vocalization and freezing as conditional but not unconditional responses. *J. Neurosci. USA.* 23, 8713-8721.

- Chhetri DK, Neubauer J, y Berry DA. 2010. Graded activation of intrinsic laryngeal muscles for vocal fold posturing. *J. Acoust. Soc. Am. USA.* 127, 127-133.
- Chhetri KK, Neubauer J y Berry DA. 2011. Neuromuscular control of fundamental frequency and glottal posture at phonation onset. *J. Acoust. Soc. Am. USA.* 131, 1401-1412.
- Chisari A, Giovambattista H, Parello M, y Spinedi E. 2001. Impact of maternal undernutrition on hypothalamus-pituitary- adrenal axis and adipocyte functions in male rat offspring. *Endocrine. Argentina.* 14, 375-382.
- Conely L, y Bell RW. 1978. Neonatal ultrasounds elicited by odor cues. *Dev. Psychobiol. USA.* 11, 193-197.
- Coupé B, Dutriez-Casteloot I, Breton C, Lefèvre F, Mairesse J, Dickes-Coopman A, Silhol M, Arancibia T, Lesage J, y Vieau D. 2009. Perinatal undernutrition modifies cell proliferation and brain derived neurotrophic factor levels during critical time window for hypothalamic and hippocampal development in the male rat. *J. Neuroendocrinol. France.* 21, 40-48.
- Duarte JL, de Faria FA, Ceolin DS, Cestari TM, y de Assis GF. 2006. Effects of passive smoke inhalation of the vocal cord of rats. *Braz. J. Otorhinolaryngol. Brazil.* 72, 210-216.
- Fagiolini M, Jensen CL, y Champagne FA. 2009. Epigenetic influences on brain development and plasticity. *Curr. Opin. Neurobiol. USA.* 919, 207-212.

- Field T y Diego M. 2008. Vagal activity, early growth and emotional development. *Infant. Behav. Dev. USA.* 31, 361-373.
- Farmer J, Zhao X, Van Praag H, Wodtke K, Gage FH, y Cristie BR. 2004. Effects of voluntary exercise on synaptic plasticity and gene expression in the dentate gyrus of adult male Sprague-Dawley rats in vivo. *J. Neurosci. Canada.* 124, 71-79.
- Farrel WJ, y Alberts JR. 2002. Maternal responsiveness to infant Norway rat (*Rattus Norvegicus*) ultrasonic vocalizations during the maternal behavior cycle and after steroid and experiential induction regimens. *J. Comp. Psychology. USA.* 116, 286-296.
- Fleming AS, O'Day DH, y Kraemer GW. 1999. Neurobiology of mother-infant interactions: experience and central nervous system plasticity across development and generations. *Neurosci. Biobehav. Rev. Canada.* 23, 673-685.
- Florian ML, y Nunes ML. 2010. Effects of intra-uterine and early extra-uterine malnutrition on seizure threshold and hippocampal morphometry of pup rats. *Nutr. Neurosci. Brazil.* 13, 265-273.
- Fowden AL y Forhead AJ. 2004. Endocrine mechanisms of intrauterine programming. *Reproduction. UK.* 127, 515-526.
- Francis D, Diorio J, Liu D, y Meaney MJ. 1999. Nongenomic transmission across generations of maternal behavior and stress responses in the rat. *Science. Canada.* 286, 1155-1158.
- Galigher AE, y Kozloff EN. 1971. *Essentials of practical microtechnique* (2<sup>a</sup> Ed.). Philadelphia: Lea y Febiger.



- Geissler D y Ehret G. 2002. Time critical integration of formant for perception of communication call in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 99, 9021-9025.
- Gonzalez A, Lovic V, Ward GR, Wainwright PE, y Fleming AS. 2001. Intergenerational effects of complete maternal deprivation and replacement stimulation on maternal behavior and emotionality in female rats. *Dev. Psychobiol. Canada.* 38, 11-32.
- González A. 2003. Efectos de la desnutrición perinatal y postnatal, y de la estimulación sensorial temprana sobre el desarrollo de la conducta maternal. En: Tesis de Licenciatura. (pp.31), México: Universidad del Valle de México.
- Gottlieb G. 1971. Ontogenesis of sensory function in birds and mammals En: Tobach E, Aronson LR, y Shaw E (Eds.). *The biopsychology of development.* New York: Academic Press.
- Greenough WT, Whitters GS, y Wallace CS. 1990. Morphological changes in the nervous system arising from behavioral experience: what is the evidence that they are involved in learning and memory? En: Squire LR, Lindenlaub (Eds.). *The Biology of Memory.* New York: Schattauer. Pp. 159-185.
- Gutiérrez JP, Rivera-Dommarco J, Shamah-Levy T, Villalpando-Hernández S, Francisco A, Cuevas-Nasu L, Romero-Martínez M, y Hernández-Ávila M. 2012. Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2012. Resultados Nacionales. Cuernavaca, México. Instituto Nacional de Salud Pública.

- Guzzetta A, Baldini S, Bancale A, Baroncelli L, Ciucci F, Ghirri P, Putignano E, Sale A, Viegi A, Berardi N, Boldrini A, Cioni G, y Maffei L. 2009. Massage accelerates brain development and the maturation of visual function. *J. Neurosci. Italy.* 29, 6042-6051.
- Hall DH, y Treinin M. 2011. How does morphology relate to function in sensory arbors? *Trends. Neuroci. USA.* 34, 443-451.
- Hale C, Dietz K, Varela J, Wood C, Zirlin B, Leverich L, Greene R, y Cowan C. 2011. Essential role of var guanine nucleotide exchange factors in brain-derived neurotrophic factor-induced dendritic spine growth and synapse plasticity. *J. Neurosci. USA.* 31, 12426-12436.
- Harmon KM, Cromwell HC, Burgdorf J, Moskal JR, Brudzynski SM, Kroes RA, y Panksepp J. 2008. Rats selectively bred for low levels of 50 kHz ultrasonic vocalization exhibit alterations in early social motivation. *Dev. Psychobiol. USA.* 50, 322-331.
- Hernandez M, Diego M, y Field T. 2007. Preterm infants show reduced stress behaviors and activity after 5 days of massage therapy. *Infant. Behav. Dev. USA.* 30, 557-561.
- Hoath SB, Lankshmanan J, Scott SM, y Fisher DA. 1987. Effects of thyroid hormones on epidermal growth factor concentration in neonatal mouse skin. *J. Endocrinol. USA.* 112, 308-314.
- Holmberg e, Hillman R, y Perkell J. 1987. Glottal airflow and transglottal air pressure measurement for male and female speakers in soft, normal and loud voice. 1988. *J. Acoust. Soc. Am. USA.* 84, 511-529.

- Hofer A. 1996. Multiple regulator of ultrasonic vocalization in the infant rat. *Psychoneuroendocrinology*. USA. 21, 203-217.
- Ickes BR, Pham TM, Sanders LA, Albeck DS, Mohammed AH, y Granholm A-Ch. 2000. Long-term environmental enrichment leads to region increases in neurotrophin levels in rat brain. *Exp. Neurol*. USA. 164, 45-52.
- Iurilli G, Ghezzi D, Olcese U, Lassi G, Nazzaro C, Tonini R, Tucci V, Benfanati F, y Medini P. 2012. Sound-driven synaptic inhibition in primary visual cortex. *Neuron*. Italy. 73, 814-828.
- Ise S, y Ohta H. 2009. Power spectrum analysis of ultrasonic vocalization elicited by maternal separation in rat pups. *Brain Res. Japan*. 1283, 58-64.
- Jobe EM, Mc Quate AL, y Zhao X. 2012. Crosstalk among epigenetic pathways regulates neurogenesis. *Front. Neurosci*. USA. 8, 1-15.
- Juntunen K, Sirviö P, y Michelson K. 1978. Cry analysis in infants with severe malnutrition. *Eur. J. Pediatr. Africa*. 128, 241-246.
- Leah J, Allardyce H, y Cummins H. 1985. Evoked cortical potentials correlates or rearing environments in rats. *Biol. Psychol*. USA. 20, 21-29.
- Lengagne T, Lauga J, y Jouventin P. 1997. A method of independent time and frequency decomposition of bioacoustics signals: inter-individual recognition in four species of penguins'. *J. Neurosci*. USA. 320, 885-891.

- Levine S, Berkenbosch F, Suchecki D, y Tilders FJ. 1994. Pituitary-adrenal and interleukin-6 responses to recombinant interleukin-1 in neonatal rats. *Psychoneuroendocrinology*. USA. 19, 143-153.
- Liu D, Diorio J, Tannenbaum B, Daldji C, Francis D, Freedman A, Sharma S, Pearson D, Plotsky PM, y Meaney MJ. 1997. Maternal care, hippocampal glucocorticoid receptors and hypothalamic-pituitary-adrenal responses to stress. *Science*. Canada. 277, 1659-1662.
- Liu D, Diorio J, Day JC, Francis DD, y Meaney MI. 2000. Maternal care hippocampal synaptogenesis and cognitive development in rats. *Nat. Neurosci*. Canada. 3, 799-806.
- Ludlow CL. 2005. Central Nervous system control of the laryngeal muscles in humans. *Respir. Physiol. Neurobiol*. USA. 147, 205-222.
- Lund I, Lunderberg T, Kurosawa M, y Uvnäs-Moberg K. 1999. Sensory stimulation (massage) reduces blood pressure in unanaesthetized rats. *J. Auton. Nerv. Syst*. Sweden. 78, 30-37.
- Lynch A. 1976. Postnatal undernutrition: An alternative method. *Dev. Psychobiol*. USA. 9, 39-48.
- McAllister AK. 2000. Cellular and Molecular mechanisms of dendritic growth. *Cereb. Cortex*. USA. 10, 963-973.
- Mahajan SD, Aalinkeel R, Singh S, Shah P, Gupta N, y Kochupillai N. 2005. Thyroid hormone dysregulation in intrauterine growth retardation associated with maternal malnutrition and/or anemia. *Horm. Metab. Res*. India. 37, 633-640.

- Macrí S, y Würbel H. 2006. Developmental plasticity of HPA and fear responses in rats: A critical review of maternal mediation hypothesis. *Horm. Behav. Italy.* 50, 667-688.
- Márquez K. 2005. Comunicación madre-crías durante la expresión de la conducta maternal en la rata desnutrida durante el período neonatal: emisión de vocalizaciones. En: Tesis de Maestría en Ciencias. México. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Michel C, y Cabanac M. 1999. Opposite effects of gentle handling on body temperature and body weight in rats. *Physiol. Behav. Canada.* 67, 617-622.
- Moriceau S, Roth TH, y Sullivan RM. 2010. Rodent model of infant attachment learning and stress. *Dev. Psychobiol. USA.* 52, 651-660.
- Morrone F, Kitazawa M, Drago D, Cheng D, Medeiros R y La Ferla FM. 2011. Repeated physical training and environmental enrichment induce neurogenesis and synaptogenesis following neuronal injury in an inducible mouse model. *J. Behav. Brain. Sci. USA.* 1, 199-209.
- Narayanan CH, Fox MW, y Hamburger V. 1971. Prenatal development of spontaneous and evoked activity in the rat (*Rattus Norvegicus Albinus*). *Behaviour. USA.* 40, 100-131.
- Nassar F, Shaaban Y, Younis N, y Mobdy A. 2011. Language skills and intelligence quotient of protein energy malnutrition survivors. *J. Trop. Pediatr. Egypt.* 58, 226-230.
- National Research Council. 2003. Guideline and use of mammals. En: National Research Council of the National Academics. Neuroscience

and Behavioral Research (pp. 209), Washington DC: National Academics of Press.

Numan M. 2006. Hypothalamic neural circuits regulating maternal responsiveness toward infants. *Behav. Cogn. Neurosci. USA.* 5, 163-190.

Ocelli V, Spence C, y Zampini M. 2011. Audiotactile interactions in temporal perception. *Psychon. Bull. Rev. Italy.* 18, 429-454.

Oswalt GI, y Meier GW. 1975. Olfactory, thermal, and tactual influences on infantile ultrasonic vocalization in rats. *Dev. Psychobiol. USA.* 8, 129-135.

Pascual-Font A, Marañillo E, Merchán A, Vázquez T, Sañudo JR, y Valderrama F. 2006. Proyecciones centrales del nervio laríngeo superior de la rata. *Act. Otorrinolaringol. Esp. Spain.* 57, 295-299.

Pascual R, y Figueroa H. 1996. Effects of preweaning sensorimotor stimulation on behavioral and neuronal development in motor and visual cortex of the rat. *Biol. Neonate. Chile.* 69, 399-404.

Paxinos G, y Watson CH. 1986. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates.* New York: Academic Press.

Perez TE, Torrero C, y Salas M. 2002. Neonatal nutritional features in facial motoneurons altered by prenatally food deprivation in rat. *Nutr. Neurosci. México.* 5, 263-268.

Pham TM, Ickes BR, Albeck D, Soderstrum S, Granholm S, Granholm A-Ch, y Mohammed AH. 1999. Changes in brain NGF levels and NGF

receptors in rats exposed to environmental enrichment for one year. *Neuroscience. Sweden.* 94, 279-286.

Plant RL. 2005. Aerodynamics of the human larynx during vocal fold vibration. *The laryngoscope. USA.* 115, 2087-2100.

Plotsky PM, y Meaney MJ. 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. USA.* 18, 195-200.

Richards S, Mychasiuk R, Kolb B, y Gibb R. 2012. Tactile stimulation during the development alters behaviour and neuroanatomical organization of normal rats. *Behav. Brain. Res. Canada.* 23, 86-91.

Riede T. 2011. Subglottal pressure, tracheal airflow, and intrinsic laryngeal muscle activity during rat ultrasound vocalization. *J. Neurophysiol. USA.* 106, 2580-2592.

Regalado M, Torrero C, y Salas M. 1999. Maternal responsiveness of neonatally undernourished and sensory stimulated rats: rehabilitation of maternal behavior. *Nutr. Neurosci. México.* 2, 7-18.

Rosenzweig MR, y Bennett EL. 1996. Psychobiology of plasticity: effects of training and experience on brain and behavior. *Behav. Brain. Res. USA.* 78, 57-65.

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. México.* 7, 291-300.

- Sala-Catala J, Torrero C, Regalado M, Salas M, y Ruiz-Marcos A. 2005. Movements restriction and alterations of the number of spines distributed along the apical shafts of layer V pyramids in motor primary sensory cortices of the peripubertal and adult rat. *J. Neurosci.* 133, 137-145.
- Salas M, Torrero C, y Pulido S. 1984. Long-term alterations in the maternal behavior of neonatally undernourished rats. *Physiol. Behav. México.* 33, 273-278.
- Salas M, Regalado M, y Torrero C. 2001. Recovery of long-term maternal behavioral deficiencies of neonatally underfed rats by early sensory stimulation: effects of successive parturitions. *Nutr. Neurosci. México.* 4, 311-322.
- Saucier DM, Ehresman CA, Keller AJ, Armstrong E, Elderking A, y Yager JR. 2008. Hypoxia and ischemia alters ultrasonic vocalization in the neonatal rat. *Behav. Brain. Res. Canada.* 190, 243-247.
- Schanberg SM, Evoniouk G, y Khun CM. 1984. Tactile and nutritional aspects of maternal care: specific regulators of neuroendocrine function and cellular development. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 175, 135-146.
- Schanberg MS, y Field MT. 1987. Sensory deprivation stress and supplemental stimulation in the rat pup and preterm human neonate. *Child. Dev. USA.* 58, 10171-10179.
- Schanberg MS, Ingledue VF, Lee JY, Hannun YA, y Bartolome JV. 2003. PKC $\alpha$  mediates maternal touch regulation of growth related gene expression in infant rats. *Neuropsychopharmacol. USA.* 28, 1026-1030.



- Schapiro S, y Vukovich K. 1970. Early experience effects upon cortical dendrites: a proposed model for development. *Science. USA.* 167, 292-294.
- Seiler N. 2004. Catabolism of polyamines. *Amino Acids. France.* 26, 217-233.
- Segura B, Guadarrama JC, Gutiérrez AL, Merchant H, Cintra L, y Jimenez I. 2001. Effect of perinatal food deficiencies on the compound action potential evoked in sensory nerves of developing rats. *Nutr. Neurosci. Mexico.* 4, 475-488.
- Shair HR, Brunell SA, B, Masmella JR, Boone E, y Hofer MA. 2002. Social, thermal and temporal influences on isolation induced and maternally potentiated ultrasonic vocalizations of rat pups. *Dev. Psychobiol. USA.* 42, 206-222.
- Sholl DA. 1956. *The organization of the neurons of the cerebral cortex.* New York, Hafner.
- Smotherman WP, Robinson SR, y Miller BJ. 1986. A reversible preparation for observing the behavior of fetal rats in utero: Spinal anesthesia with lidocaine. *Physiol. Behav. USA.* 37, 57-60.
- Smotherman WP, y Robinson, SR. 1988. The uterus as environment. The ecology of fetal behavior. En: *Developmental Psychobiology and Behavioral Ecology.* (E. Blass, Ed.). New York. Plenum Press.
- Soriano O, Regalado M, Torrero C, y Salas M. 2006. Contributions of undernutrition and handling to huddling development of rats. *Physiol. Behav. Mexico.* 89, 543-551.

- Stevenson CW, Goodwin PE, Tunstall B, Spicer CH, Marsden CA, y Manson R. 2009. Neonatal maternal separation alters reward-related ultrasonic vocalizations in rat dams. *Behav. Brain. Res.* UK. 200, 232-236.
- Swanger SA, y Bassell GJ. 2011. Making and braking synapses through local mRNA regulation. *Curr. Opin. Genet. Dev.* USA. 21, 214-221.
- Tonkiss J. Bonnie KE, Hudson JL, Shultz PL, Duran P, y Galler JR. 2003. Ultrasonic calls characteristics of rat pups are altered following prenatal malnutrition. *Dev. Psychobiol.* USA. 43, 90-101.
- Torrero C, Regalado M, Rubio L, Ruiz-Marcos A, y Salas M. 2003. Neonatal food restriction induces hypoplasia in developing facial motor neurons. *Nutr. Neurosci. Mexico.* 6, 317-324.
- Turner CA, Lewis MH, y King MA. 2003. Environmental enrichment: effects on stereotyped behavior and dendritic morphology. *Dev. Psychobiol.* USA. 43, 20-27.
- Ulanovsky N, y Moss CF. 2008. What the bat's voice tells the bat's brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 105, 8491-8498.
- UNICEF, 2009. Características socioeconómicas e impacto de la crisis económica global sobre la niñez de México. [www.unicef.org](http://www.unicef.org).
- UNICEF, 2011. Informe anual México. [www.unicef.org](http://www.unicef.org).
- Wang J, Irnaten M, Neff RA, Venkatesan P, Evans C, Loewy AD, Mittenleiter TC, y Mendelowitz D. 2006. Synaptic and neurotransmitter activation of cardiac vagal neurons in the nucleus ambiguus. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* USA. 940, 237-247.

- Weaver IC, Cervoni N, Champagne FA, D'Alessio AC, Sharma S, Seckl JR, Dymov S, Szyf M, y Meaney MJ. 2004. Epigenetic programming by maternal behavior. *Nat. Neurosci. Canada.* 7, 847-854.
- Wetzel DM, Kelley DB, y Campbell BA. 1980. Central control of ultrasonic vocalizations in neonatal rats: I. brain stem motor nuclei. *J. Comp. Physiol. Psychol. USA.* 4, 596-605.
- Williams DL. 1971. Maze exploration in the rat under different levels of illumination. *Anim. Behav.* 19, 365-367.
- Wu HY, y de Groat WC. 2010. Maternal separation uncouples reflex from spontaneous voiding in rat pups. *J. Urol. USA.* 175, 1148-1151.
- Yajima Y, y Hayashi Y. 1983. Ambiguous motoneurons discharging synchronously with ultrasonic vocalization in rat. *Exp. Brain. Res. Japan.* 50, 359-366.
- Zeskind PS, Macmurray MS, Garber KA, Neuspiel JM, Cox ET, Grewen KM, Mayes LC, y Johns JM. 2011. Development of translational methods in spectral analysis of human infant crying and rat pup ultrasonic vocalizations for early neurobehavioral assessment. *Front. Psychiatry.* 2, 1-16.

## X. LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Onda sonora, y sus magnitudes físicas (Modificada de Brown, 2010).....	6
Figura 2. Esquema del movimiento progresivo (1, 2, 3) del cartílago durante la aducción y la abducción (Modificada de Ludlow, 2005). .....	7
Figura 3. Descripción del tipo de espectro característico de la vocalización en la rata (Modificada de Tonkiss et al., 2003). .....	9
Figura 4. Etograma de la conducta maternal.....	10
Figura 5. Emisión de vocalizaciones ultrasónicas en crías de roedores de 10 a 17 días de edad, en respuesta a la separación materna previa, y la separación inmediata del nido, a temperatura de 6 grados. (Modificada de Brudzynski et al., 1999). .....	12
Figura 6. Cambios en F0 y Pth ante la estimulación con una duración de (1500ms), por activación del nervio laríngeo superior (NLS) y del nervio laríngeo recurrente (NLR) en caninos. (Modificada de Chhetri et al., 2011).....	15
Figura 7. Gráficos de activación muscular ante la estimulación aplicada en el NLS y NLR (después de la división de las ramas del PCA para activar el músculo CT y los abductores respectivamente. (Modificada de Chhetri et al., 2011). .....	16
Figura 8. Imágenes de la configuración glotal ante la activación muscular máxima (estimulación en NLR para la activación de los músculos LCA/IA y NLS para la activación del CT). (Tomada de Chhetri et al., 2011). .....	17
Figura 9. (A) Descarga típica durante la unidad de ultrasonido (US). (Modificada de Yajima y Hayashi, 1983). .....	18
Figura 10. Presión subglotal y actividad EMG de los músculos TA Y CT durante la vocalización de 22kHz de dos sujetos (A y B), (Modificada de Riede, 2011). .....	19
Figura 11. Actividad EMG de los músculos TA y CT durante la vocalización de 50kHz de tres sujetos (A, B, C). (Modificada de Riede, 2011). .....	20
Figura 12. Media de ocurrencia de los tipos de vocalización en 30 vocalizaciones en crías malnutridas vs crías control. (Modificada de Tonkiss et al., 2003). .....	23
Figura 13. Curso temporal del desarrollo de los sistemas sensoriales durante la etapa perinatal de la rata. (Modificada de González, 2003). .....	24
Figura 14. Procedimiento de obtención y distribución de sujetos por camada para el estudio.....	32

Figura 15. Descripción general de los grupos experimentales.....	34
Figura 16 (A). Método de reducción de ingesta de alimento por porcentaje de la dieta durante la gestación que fue aplicada para los grupos D y DE. ....	35
Figura 16 (B). Método de ligadura e intercambio de madres nodrizas por el cual se continuó la desnutrición perinatal para los grupos D y DE. ....	36
Figura 17. Procedimiento para aislar las vocalizaciones, y realizar el análisis espectral de la vocalización descendente. ....	38
Figura 18. Ejemplo del análisis espectral de la vocalización descendente (n=10), de los grupos control (C), y desnutrido (D).....	38
Figura 19. Técnica de círculos concéntricos, nótese el orden de aparición de las ramas dendríticas y su densidad.....	40
Figura 20. Secuencias realizadas en la estimulación táctil tipo masaje aplicada a los grupos DE y CE.....	42
Figura 21. Medias y errores estándar de los puntajes [1(0%), 2(50%) ,3(100%)] de apertura de oídos obtenidos por los sujetos de los 4 grupos experimentales.. ....	46
Figura 22. Medias y errores estándar de los puntajes [1(0%), 2(50%), 3(100%)] obtenidos por los sujetos de los grupos experimentales.....	47
Figura 23. Medias y errores estándar del área del soma de las neuronas multipolares a la edad de 8, 12, 15 días postnatales.. ....	49
Figura 24. Medias y errores estándar del perímetro del soma de las neuronas multipolares de los sujetos de los 4 grupos experimentales a la edad de 8, 12, y 15 días.. ....	51
Figura 25. Medias y errores estándar de número de ramas de 1, 2, 3, 4, 5, 6 orden dendrítico a la edad de 8, 12, 15 días. ....	53
Figura 26. Medias y errores estándar de la densidad de las ramas de las neuronas multipolares.....	55
Figura 27. Esquema de ubicación de Ambc, donde se realizaron las mediciones de los grupos celulares.. ....	56
Figura 28. Fotomicrografía de cortes coronales de 120 $\mu\text{m}$ (10x) de los grupos experimentales a la edad de 8 días.....	57

Figura 29. Fotomicrografía de cortes coronales de 120 $\mu$ m (10x) de los diferentes grupos experimentales a la edad de 12 días.....	58
Figura 30. Fotomicrografía de cortes coronales de 120 $\mu$ m (10x) de los diferentes grupos experimentales a la edad de 15 días.....	59
Figura 31. Medias y errores estándar del número de VUs emitidas en 10 minutos de registro en bloques de 5 minutos por los grupos C (azul) y D (rojo).....	60
Figura 32. Medias y errores estándar de la duración promedio de las vocalizaciones emitidas en 10 minutos de registro en bloques de 5 minutos por los grupos C y D. ....	61
Figura 33. Análisis espectral de la vocal descendente, en el eje “x” se presentan las frecuencias: fundamental (F0), mínima (F1), máxima (F2), pico (F3), última (F4), y en el eje “y” el valor de la frecuencia en kHz.. ....	62
Figura 34. Análisis espectral de la vocal descendente para los grupos C y D, en el eje “x” se presentan las frecuencias: fundamental (F0), mínima (F1), máxima (F2), pico (F3), última (F4), y en el eje “y” el valor de la intensidad en dB.....	63
Figura 35. Valor relativo del poder de cambio de intensidad ( $\delta$ ) con respecto al nivel basal de la señal (-70dB).. ....	64