



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**EVALUACIÓN DE LOS RITMOS DE INGESTA DE AGUA  
Y EFICIENCIA DE APRENDIZAJE ESPACIAL EN LA RATA  
HEMбра JUVENIL CON MALNUTRICIÓN PERINATAL**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE**

**BIÓLOGA**

**PRESENTA**

**CAROLINA ARAGÓN CANTÚ**



**DIRECTOR DE TESIS  
DRA. PILAR DURÁN HERNÁNDEZ  
CIUDAD UNIVERSITARIA, D.F. 2016**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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.

## Hoja de datos del Jurado

1. Datos del alumno  
Aragón  
Cantú  
Carolina  
5512972946  
Universidad Nacional Autónoma de México  
Facultad de Ciencias  
Biología  
304581636
2. Datos del Tutor  
Doctora  
Pilar  
Durán  
Hernández
3. Datos del sinodal 1  
Doctor  
Manuel  
Miranda  
Anaya
4. Datos del sinodal 2  
M. en C.  
Enrique  
Moreno  
Sáenz
5. Datos del sinodal 3  
Doctora  
Leticia  
Granados  
Rojas
6. Datos del sinodal 4  
Doctora  
Marcela  
Arteaga  
Silva
7. Datos del trabajo escrito  
Evaluación de los ritmos de ingesta de agua y eficiencia de aprendizaje espacial en la rata hembra juvenil con malnutrición perinatal.  
pp. 80.  
2016.

## Índice

1. Resumen	3
2. Introducción	4
3. Antecedentes	
Periodos críticos del desarrollo	8
Ritmos circadianos	15
Expresión de los ritmos circadianos en mamíferos	18
Procesos cognoscitivos	21
4. Planteamiento del problema	30
5. Hipótesis	31
6. Objetivos	
General	31
Particulares	31
7. Material y método	32
8. Resultados	
Peso	39
Evaluación del proceso de aprendizaje	39
Comparación de la eficiencia de aprendizaje	50
Memoria a corto y largo plazo	53
Evaluación del ritmo de ingesta de agua	55
9. Discusión	61
10. Conclusiones	72
11. Referencias bibliográficas	74

## Resumen

El término malnutrición se refiere a una condición provocada por una dieta en la que uno o más de los nutrientes esenciales no están disponibles, o por lo menos no en las proporciones adecuadas, a pesar de tener el contenido calórico diario adecuado. Desnutrición, por otro lado, se refiere a la condición propiciada por una dieta en la que ninguno de los nutrientes requeridos por el organismo están disponibles en cantidades suficientes y que generalmente carece del contenido calórico adecuado.

La malnutrición proteínica durante periodos críticos del desarrollo perinatal puede provocar deficiencias estructurales, en particular en el sistema nervioso central, de carácter permanente.

Diversos estudios muestran que organismos sometidos a alteraciones nutricionales durante periodos críticos del desarrollo no presentan patrones normales de aprendizaje, lo que sugiere alteraciones en las estructuras cerebrales relacionadas con la memoria y el aprendizaje, como el hipocampo y la corteza prefrontal. Paralelamente, existen evidencias que sugieren que existe un control circadiano de procesos cognoscitivos, tales como atención, memoria y aprendizaje, en particular de la consolidación de la memoria espacial.

El Núcleo Supraquiasmático es la estructura encargada de orquestar los ritmos circadianos en los mamíferos. Se ha observado que ratas con malnutrición proteínica crónica desarrollan alteraciones en el ritmo diario de ingesta de agua. Estudios inmunohistoquímicos del Núcleo Supraquiasmático de estos organismos muestran que la fuerza de acoplamiento entre los osciladores disminuye significativamente ante el insulto de la malnutrición proteínica crónica.

Estudios realizados hasta el momento que evalúan los efectos de la malnutrición perinatal sobre el desempeño en pruebas de memoria y aprendizaje espacial han arrojado conclusiones controversiales. Resultados obtenidos en pruebas que consideran la distribución temporal de dichas tareas sugieren que el desempeño en éstas puede estar modulado temporalmente.

En este trabajo se evaluó el desempeño de ratas hembras juveniles en una prueba para evaluar el aprendizaje y la memoria espacial en cuatro puntos temporales del día, con el fin de comprobar si el ritmo diario de estos procesos cognoscitivos se encuentra afectado, como resultado de la malnutrición proteínica perinatal. Paralelamente se evaluó el ritmo de ingesta de agua para observar los efectos sobre éste de la malnutrición proteínica perinatal en ratas hembras juveniles.

Los resultados muestran que las ratas que fueron sometidas a malnutrición hipoproteínica perinatal presentan una curva de aprendizaje diferente a la de los organismos control. No se encontró una relación directa entre la hora del día en la que fueron realizadas las pruebas y el desempeño de los organismos, sin embargo sí se observan algunas diferencias.

## Introducción

La Organización Mundial de la Salud (OMS) en 2014 define a la nutrición como la ingesta de alimentos en relación con las necesidades dietéticas del organismo y considera que una buena nutrición es una dieta suficiente y equilibrada. Actualmente la población humana mundial enfrenta una crisis de salud pública, derivada en gran medida por trastornos nutricionales de diversas índoles. La ignorancia y malas prácticas generalizadas sobre la alimentación, hacen que este problema no se limite únicamente a países en vías de desarrollo (Morgane, *et al.*, 1993).

La nutrición durante los primeros momentos de la vida representa una de las principales variables que afectan directamente la formación, crecimiento y organización funcional de un organismo. Una dieta inadecuada durante el primer periodo de la vida tiene el potencial de influenciar adversamente el desarrollo en general y en particular el del cerebro, que está programado génicamente para crecer más rápido que el resto del cuerpo (Laus, *et al.*, 2011).

El término malnutrición se refiere a una dieta en la que al menos uno de los nutrientes esenciales no está disponible en proporción adecuada, sin embargo el contenido energético es o supera al requerido por el organismo. Desnutrición, en cambio, implica una dieta en la que el contenido energético es inadecuado, generalmente son inadecuadas las cantidades de varios nutrientes esenciales (Morgane, *et al.*, 2002).

La malnutrición hipoproteínica, en la que la ingesta de proteínas está por debajo de los requerimientos del organismo, es de particular interés, ya que estas moléculas representan uno de los principales constituyentes estructurales y funcionales de los organismos, especialmente durante periodos en los que el organismo las necesita más rápido de lo que las puede sintetizar el mismo, como es el caso del desarrollo perinatal.

La malnutrición proteínica perinatal severa (MPP) ha sido reconocida como causante de reducciones en el número de neuronas, sinapsis, arborizaciones dendríticas y mielinización. Todas estas dan como resultado una reducción en el tamaño del cerebro, una corteza cerebral más delgada y un crecimiento más lento. Estas alteraciones del sistema nervioso central (SNC) están asociadas a retrasos en diversas funciones cognoscitivas y motrices (Morgane, *et al.*, 1993; Laus, *et al.*, 2011).

Las proteínas son consideradas como el nutriente más importante durante el desarrollo de funciones neurológicas, debido a que gran parte de los aminoácidos son neurotransmisores (o sus precursores), así como enzimas y hormonas. Las proteínas no cruzan la barrera placentaria de manera significativa, por lo que la ingesta adecuada de todos los aminoácidos esenciales es crucial durante el embarazo (Morgane, *et al.*, 2002).

La nutrición es probablemente el factor ambiental que mayor influencia tiene sobre el feto y el neonato, desempeña un papel crucial en la maduración y el desarrollo funcional del SNC. La MPP afecta adversamente al cerebro en desarrollo de diversas maneras. Esta afección depende, principalmente, del

momento específico en que se presente la MPP, siendo muy relevante cuando el SNC se encuentra en desarrollo. Los efectos de la MPP son permanentes, si ocurren durante los periodos críticos de desarrollo del SNC, ya sean prenatales o posnatales. Los efectos permanentes se producirán en la morfología, fisiología y neuroquímica del cerebro, teniendo impacto directo sobre sus funciones, particularmente en la esfera del desarrollo cognoscitivo (Morgane, *et al.*, 1993). La MPP ejerce efectos adversos agudos sobre el desarrollo en particular durante el periodo temprano de procesos organizacionales, tales como la neurogénesis, la migración celular y la diferenciación, así como durante el momento de mayor aumento de tamaño del SNC. La MPP da como resultado una variedad de disfunciones y afecta la capacidad del organismo para interactuar con el medio ambiente, produciendo un aislamiento funcional (Morgane, *et al.*, 1993).

El desarrollo físico, químico y fisiológico del cerebro y el comportamiento, en todas las especies superiores se desarrolla a partir de la interacción continua entre el bagaje génico y los factores ambientales. Entre estos se encuentran las variables nutricionales, culturales, así como la enfermedad y oportunidades de educación (Morgane, *et al.*, 1993).

El papel que la nutrición desempeña sobre la maduración y el desarrollo funcional del SNC está directamente relacionado con el aporte de energía y nutrientes necesarios para la constitución de estructuras celulares y diversos sistemas metabólicos esenciales.

Las inadecuaciones nutricionales son consideradas como uno de los principales problemas en la población infantil. En particular la MPP representa a



uno de los principales factores que afectan el desarrollo del cerebro (Laus, *et al.*, 2011).

Diversos estudios realizados en poblaciones humanas en países en vías de desarrollo han mostrado que la MPP tiene una influencia negativa en el desarrollo cognoscitivo. Estos estudios han demostrado, incluso, correlaciones significativas entre la MPP y déficits en habilidades analíticas, de razonamiento, de lenguaje, memoria de trabajo visuoespacial, de funciones visuoespaciales, de memoria y aprendizaje. Además del desempeño intelectual, incluyendo pruebas de IQ y grado de escolaridad (Laus, *et al.*, 2011).

Asimismo se observó que al dar suplementos alimenticios durante el desarrollo, posterior al nacimiento, se elevaron los niveles de actividad de los infantes, lo que tuvo una influencia positiva en la interacción social con los padres y el medio, estímulos que a su vez son un factor esencial en el desarrollo cognoscitivo (Laus, *et al.*, 2011).

## Antecedentes

### Periodos críticos del desarrollo

El desarrollo del cerebro incluye la síntesis de componentes celulares y paralelo a estos eventos ocurre la neurogénesis, la gliogénesis, la migración y la diferenciación celular, acompañados por el aumento en el tamaño celular, estos procesos ocurren a diferentes velocidades y en diferentes momentos durante el desarrollo.

El periodo sensible del desarrollo (PSD) cerebral comprende desde la concepción hasta el final del *growth spurt* o momento de mayor aumento de tamaño del cerebro (en roedores coincide con el destete, día posnatal 21), tiempo durante el cual se llevan a cabo los procesos de diferenciación, migración, reproducción celular, muerte celular programada, gliogénesis, neurogénesis, conexión y desconexión. Así los estímulos, ya sean positivos o negativos, a los que el SNC está expuesto durante este periodo, tendrán un efecto permanente en la estructura y función del mismo (Morgane, *et al.*, 1993).

La idea de que hay momentos durante el desarrollo en los que el organismo se encuentra particularmente vulnerable a un insulto fue desarrollada por Altman y colaboradores en 1970. Establecen que el tipo y magnitud de las consecuencias de un trastorno sobre una estructura dependerán del estadio del desarrollo durante el que se presente dicha perturbación; estos momentos cruciales en el desarrollo del SNC fueron nombrados periodos críticos del desarrollo (PCD).

Los PCD son momentos específicos durante el desarrollo del SNC que están comprendidos dentro del PSD. Morgane y colaboradores en 1993 retoman el concepto de Altman sobre los PCD y elaboran sobre éste. Establecen que los PCD son el periodo de mayor actividad de eventos específicos, tales como la neurogénesis, gliogénesis, migración celular, diferenciación celular, entre otros. Los PCD se definen como ventanas temporales durante el desarrollo en los que se generan estructuras y establecen patrones de conectividad intrínsecos entre estructuras cerebrales, durante los cuales las unidades funcionales son especialmente susceptibles a influencias ambientales específicas (Morgane, *et al.*, 2002; Purves, *et al.*, 2004).

Este concepto se basa en la observación de que los procesos del desarrollo y organizacionales pueden ser alterados en mayor medida durante aquellos momentos en los que se están llevando a cabo con mayor rapidez, entendiéndose que las áreas del cerebro tienden a desarrollarse en saltos y en conjuntos discretos, en oposición a la idea de que lo hacen lento y de manera continua y uniforme. Todos los procesos del desarrollo tienen un periodo crítico ya que ninguno se lleva a cabo de manera uniforme (FIGURA 1). Scott (1979) señala que la duración y relevancia de los PCD dependen de las tasas de cambio en el proceso. El curso de la tasa de cambio puede ser de tres maneras:

1. El evento sucede rápido durante un periodo breve y luego cesa y se completa abruptamente; este es el caso más común.
2. El proceso inicia rápido y luego se extiende por un largo periodo, pero de manera lenta.

3. Los procesos organizacionales suceden intermitentemente en tasas elevadas, por lo que existen varios PCD en la misma estructura, un ejemplo de esto es el aprendizaje en mamíferos.

Los PCD se definen también en torno a la plasticidad. Una vez que el proceso organizacional cesa sólo queda cierto grado de plasticidad (Morgane, *et al.*, 1993). Esto es de particular relevancia para el desarrollo del SNC ya que la mayor parte de los eventos son únicos, lo que significa que después de completados no se repetirán. Por lo tanto, es crucial que el organismo disponga de la materia y energía necesarias para llevar a cabo este proceso de manera adecuada en el momento en que ha sido programado. Es por ello que un insulto durante este momento impedirá que se lleve a cabo de manera adecuada el proceso, por lo que traerá consigo consecuencia adversas, como malformaciones en las estructuras. Al utilizar modelos animales que permitan hacer un acercamiento a la condición en el ser humano, los momentos de los eventos de crecimiento fetal deben compararse con relación a tiempos gestacionales análogos (FIGURA 1).

La maduración del SNC y el desarrollo de las capacidades de comportamiento óptimo depende de tres factores críticos:

1. Hereditarios, i.e. directrices génicas.
2. Complejidad y grado de estimulación ambiental.
3. Nutrición adecuada y balanceada (van Gelder, *et al.*, 1984).

También está claro que las directrices génicas sólo pueden ser llevadas a cabo si el estado nutricional de la madre es adecuado y si después del nacimiento permea un ambiente estimulante y dirigido hacia el aprendizaje (Morgane, *et al.*, 1993).

De acuerdo con Levitsky (1975) la MPP es uno de los factores no génicos que afectan el desarrollo del cerebro y pueden alterar adversamente la capacidad del organismo para interactuar y lidiar con el medio ambiente.

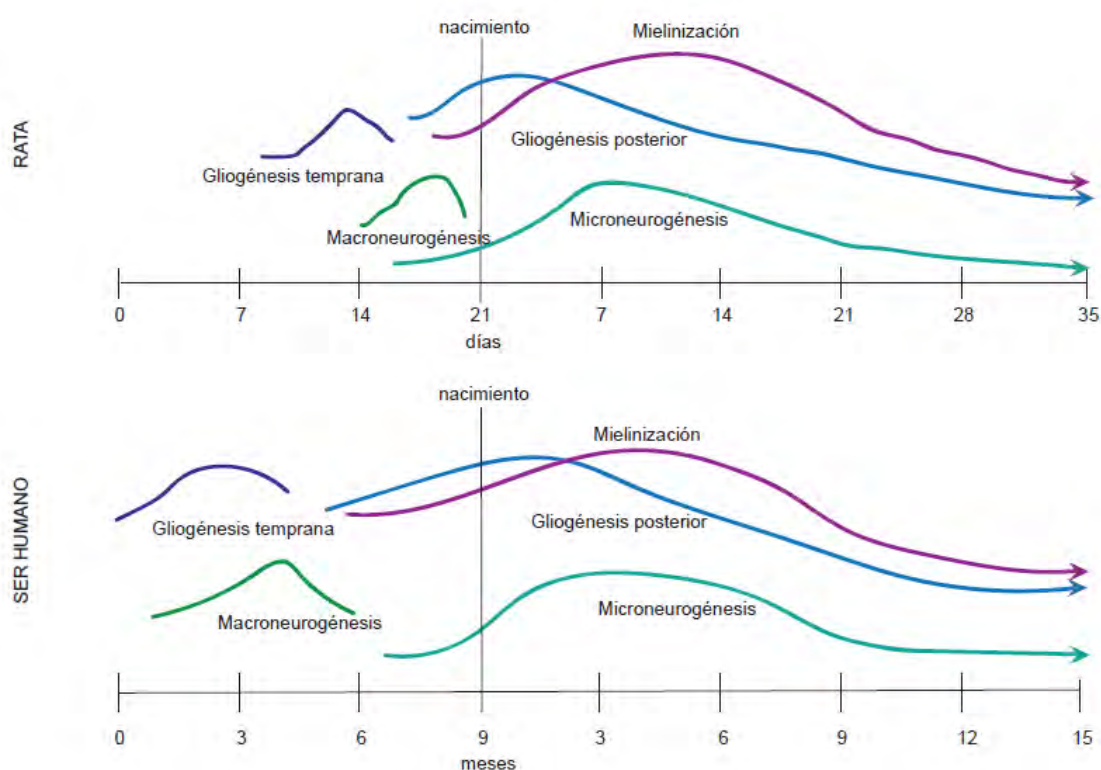


FIGURA 1. Comparación de las tasas en las que se presentan los principales eventos en el desarrollo del SNC de ratas y seres humanos. El periodo perinatal se considera como el periodo sensible, las curvas corresponden a los periodos vulnerables mientras que los valores más altos en ellas representan los PCD. Las flechas en las curvas de Mielinización, Gliogénesis posterior y Microneurogénesis indican que continúan posteriormente a lo que se muestra en las gráficas (Modificado de Morgane, *et al.*, 1993).

Morgane y colaboradores (1993) señalan que el momento durante el desarrollo prenatal en el que se presenta el insulto es un factor determinante del defecto provocado por el insulto, más que el tipo de insulto. Existen diversos tipos de malformaciones producidas por la MPP, incluyendo alteraciones en la histoarquitectura y topología neural, así como en la pérdida de neuronas o fallas en la migración de éstas, lo que ocasiona que el peso del cerebro y el tamaño sean diferentes al de un organismo normal. Estas malformaciones se observan a partir de estudios morfométricos y conductuales. En varias instancias ocurre una relación anormal en la proporción de células, alteraciones en el ciclo celular, distorsiones en circuitos microneuronales o macroneuronales (FIGURA 2). La proporción alterada de neurona/glía puede producir anomalías, incluyendo la alteraciones en las migración y ensamble de unidades funcionales.

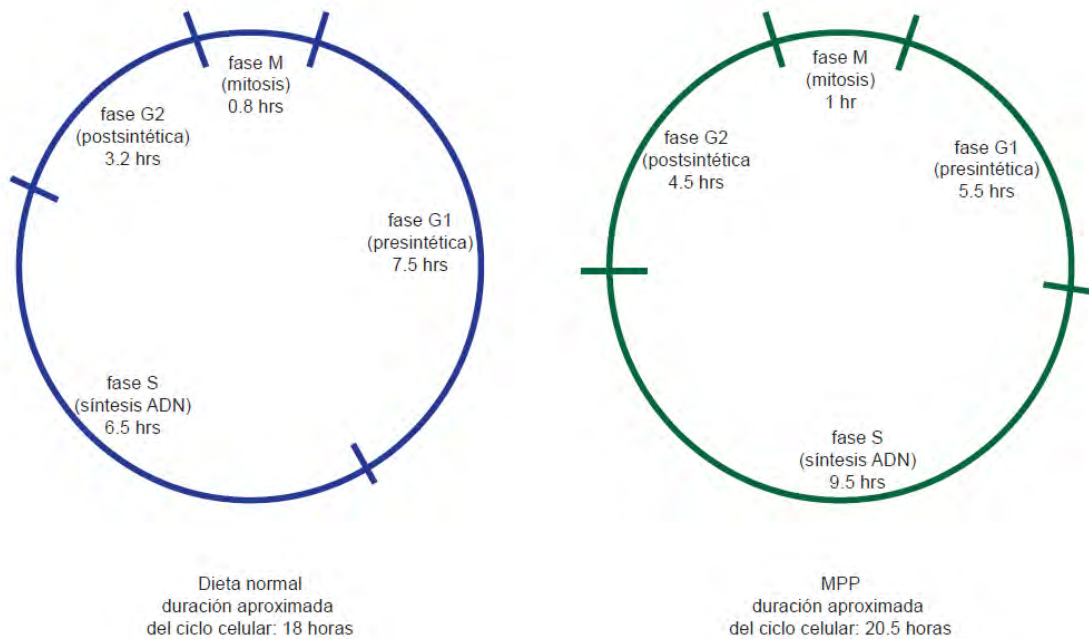


FIGURA 2. Efectos de la MPP en el ciclo celular de células precursoras de neuronas en ratas. La MPP retrasa la división celular al prolongar el tiempo total del ciclo celular, lo que da como resultado un menor número de neuronas (Modificado de Morgane, *et al.*, 1993).

Las malformaciones ocasionadas por la MPP son generalmente sutiles, principalmente involucran distorsiones en la proporción de neuronas, atopías celulares debido a migración celular anormal, alteraciones de eventos regresivos, tal como la muerte celular, ramificación axonal y eliminación sináptica (FIGURA 3). Todas las anteriores representan aspectos de distorsiones ontogénicas, más que de lesiones focales (Morgane, *et al.*, 1993).

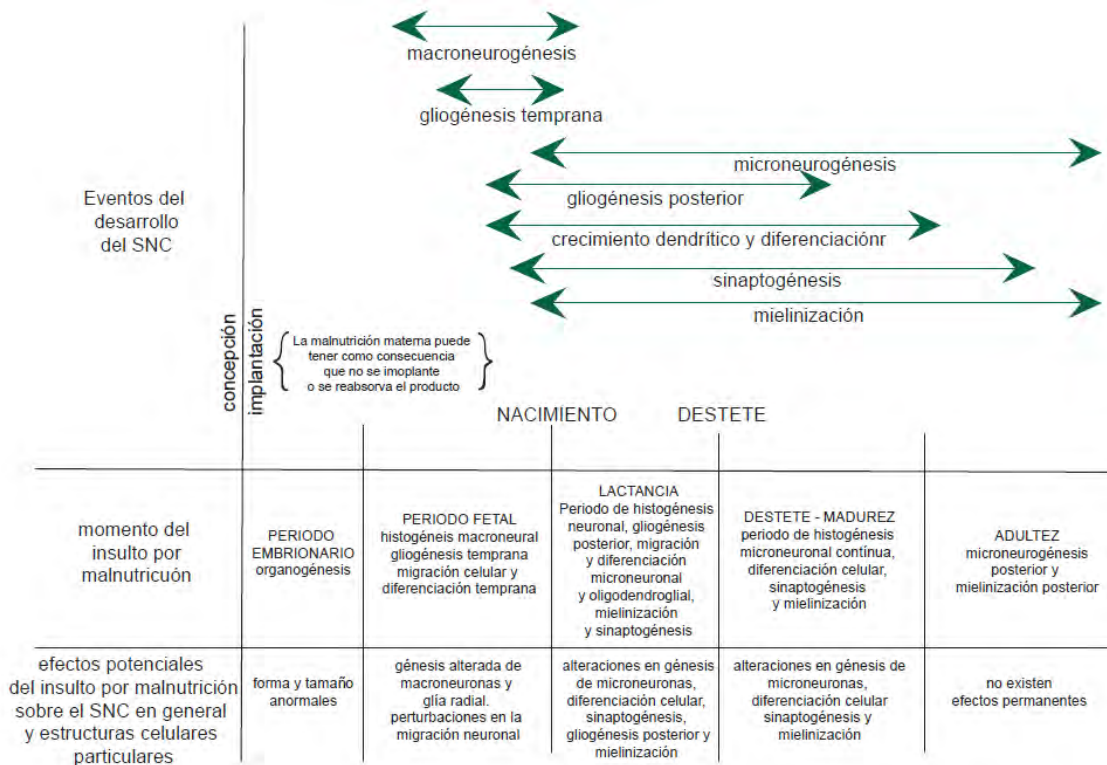


FIGURA 3. Eventos del desarrollo del SNC en relación a la MPP. Se indican efectos potenciales sobre el cerebro en general y en particular sobre la organización celular (Modificado de Morgane, *et al.*, 1993).

Aquellas malformaciones congénitas reflejan *grosso modo*, muerte celular extensiva, cambios drásticos de la tasa mitótica, fallas masivas o del momento específico en el que se da la migración y la diferenciación celular, los cuales representan deficiencias drásticas en los procesos ontogénicos y dan como resultado anomalías graves y severas (Morgane, *et al.*, 1993).

Este tipo de insultos difusos, suelen dañar en mayor medida, el acervo de células proliferativas en el cerebro en desarrollo. Suelen afectar la histogénesis, principalmente debido al retraso de la proliferación celular y en segundo lugar, debido a la modificación del metabolismo proteínico (FIGURA 2; Blackwell, *et al.*, 1969).

El modelo de MPP en *Rattus norvegicus* (cepa Sprague Dawley) aplicado en los estudios de Morgane y su grupo usualmente da como resultado la falla parcial de procesos organizacionales neuronales básicos, ocasionando algunos defectos organizacionales, y en humanos, a anormalidades funcionales en el área general del desarrollo cognitivo. De esta manera los trastornos derivados de la MPP tienden a ser patologías sutiles en vez de evidentes (Morgane, *et al.*, 1993).

La distribución temporal y tasa de desarrollo de las diferentes áreas del cerebro se mantiene conservada entre los mamíferos de manera general con variaciones mínimas. Las diferencias residen en el momento del nacimiento en relación con el estadio de maduración del cerebro (FIGURA 1). En humanos el PSD comprende del tercio final de la gestación a los primeros dos años de vida, mientras que en las ratas de las dos primeras semanas de gestación hasta el final de la tercera semana de vida. Un insulto nutricional durante este periodo tiene el



potencial de causar daños irreversibles a nivel morfológico, neurofisiológico, neuroquímico y funcional (Morgane, *et al.*, 1993; Laus, *et al.*, 2011).

### Ritmos circadianos

Los organismos están sujetos a las condiciones ambientales en las que se desarrollan, que a su vez están determinadas en gran medida por fenómenos geofísicos. La mayoría de estos fenómenos se presentan de forma cíclica, con diferentes periodos. Los seres vivos han desarrollado diversas adaptaciones para adecuarse a estas variaciones cíclicas, los ritmos biológicos geofísico-dependientes.

Los ritmos biológicos endógenos son variaciones periódicas de procesos bioquímicos, fisiológicos y conductuales que permiten a los organismos anticiparse a las condiciones periódicas del medio y dar una respuesta adecuada, marcando el tiempo en el que es mejor realizar o responder a tareas específicas (Moore-Ede, 1986).

La rotación de la tierra sobre su propio eje produce los ciclos de luz oscuridad con duración constante. En respuesta a este fenómeno geofísico, los organismos presentan ritmos biológicos circadianos, que se caracterizan por tener un periodo aproximado a 24 horas, al igual que el ciclo de luz oscuridad. Además exhiben las características de:

- a) Ser endógenos y de libre corrimiento. El ritmo circadiano es innato, es heredado y no puede aprenderse. Un organismo, al estar aislado de

cualquier estímulo externo, continúa expresando un ritmo circadiano con un periodo cercano a 24 horas.

- b) Compensar la temperatura. Mantienen el periodo de las variables fisiológicas aún cuando existan cambios en la temperatura ambiental.
- c) Se sincronizan o reajustan a partir del estímulo de algunos factores externos. Las señales externas que tienen la capacidad de sincronizar a un organismo se conocen como *zeitgebers* o sincronizadores (Dunlap, *et al.*, 2004).

Los ritmos circadianos tienen cuatro propiedades básicas, que se describen matemáticamente mediante funciones cosenoidales (FIGURA 4):

- periodo ( $\tau$ ). Intervalo de tiempo entre dos sucesos de la misma magnitud.
- mesor. Valor medio de la variable de interés en un periodo.
- amplitud. Magnitud de la diferencia entre la magnitud más alta (cresta) y la más baja (valle) de un periodo.

- fase. Magnitud de una variable en un momento dado. El momento en el que alcanza el valor máximo se conoce como acrofase

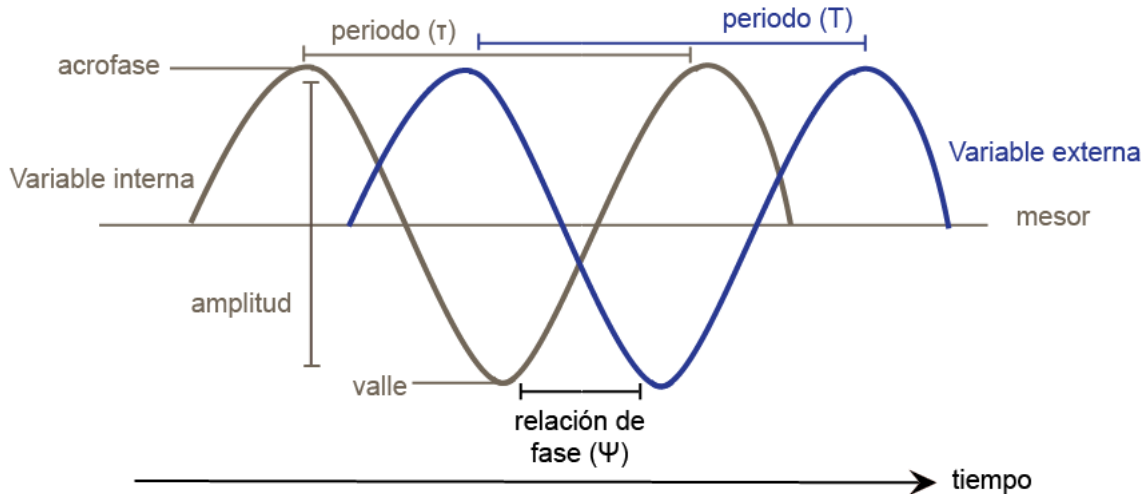


FIGURA 4. Propiedades de los ritmos biológicos.

Los ritmos circadianos están gobernados por un reloj biológico, que consiste en diversas estructuras encargadas de orquestarlos a través de diversos mecanismos, estos varían en los diferentes organismos. El reloj biológico está encargado de mantener la cronostasia o distribución de las funciones en ventanas temporales (Escobar, *et al.*, 2002; Perrau-Lenz *et al.*, 2004).

A los valores del periodo de las oscilaciones de las condiciones ambientales se les denominan T (FIGURA 4). Cuando un periodo endógeno se sincroniza a un factor externo, se dice que está ajustado o sincronizado a T. El periodo de T produce una respuesta en el periodo endógeno (representado por  $\tau$ ) y a la relación que existe entre la señal ambiental y el ritmo del organismo se denomina relación de fase ( $\Psi$ ) (Daan, *et al.*, 1978).

En el estudio de los ritmos biológicos es importante definir el momento en el que inician los estímulos, para lo cual se utilizan los términos Tiempo Circadiano (CT por sus siglas en inglés) y el del *Zeitgeber* (ZT por sus siglas en inglés). El CT se refiere a condiciones ambientales constantes, incluyendo la luz, mientras que el ZT implica el uso de un estímulo sincronizador, mientras que todas las demás condiciones ambientales permanecen constantes (Dunlap, *et al.*, 2004).

La luz es el *zeitgeber* más efectivo, sin embargo también hay otros sincronizadores no fóticos como la temperatura, señales sociales, fármacos, actividad física y acceso al alimento, entre otros. Existen estímulos que aparentemente modifican una respuesta pero en realidad no tienen un efecto sobre el reloj biológico, lo que se conoce como enmascaramiento. Estos estímulos influyen sobre la respuesta mientras se presentan, sin embargo al desaparecer se puede comprobar que no sincronizaron el reloj circadiano del organismo. Para que haya sincronización el estímulo debe tener efecto sobre el periodo del ritmo, tener una relación de fase estable y debe controlar la fase (Aschoff, *et al.*, 1999).

#### Expresión de ritmos circadianos en mamíferos

Se ha demostrado que en mamíferos la estructura encargada de determinar el ritmo circadiano, también conocida como oscilador maestro o marcapasos, es el Núcleo Supraquiasmático (NSQ) (Golombek, 1997), situado en la región ventral del hipotálamo (FIGURA 5).

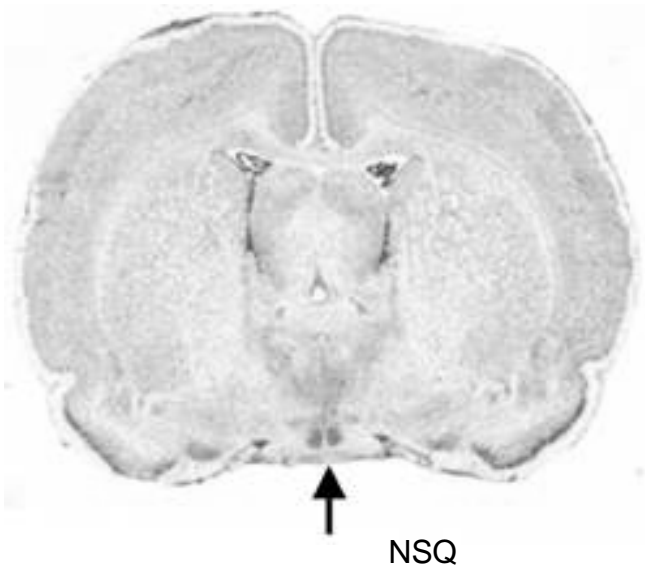


FIGURA 5. Sección coronal con tinción Nissl de un cerebro de rata en el que se observa el NSQ (Schwartz, 2000).

El sistema circadiano está compuesto por células de la retina especializadas, conocidas como ganglionares, las cuales actúan como fotorreceptores, las cuales representan la vía aferente, las células ganglionares conectadas al NSQ, estructura que genera y modula la señal circadiana y las vías eferentes (FIGURA 6), constituidas por nervios y señales hormonales de glándulas anexas, que comunican al NSQ con los sistemas efectores (Yamazaki, *et al.*, 2002).

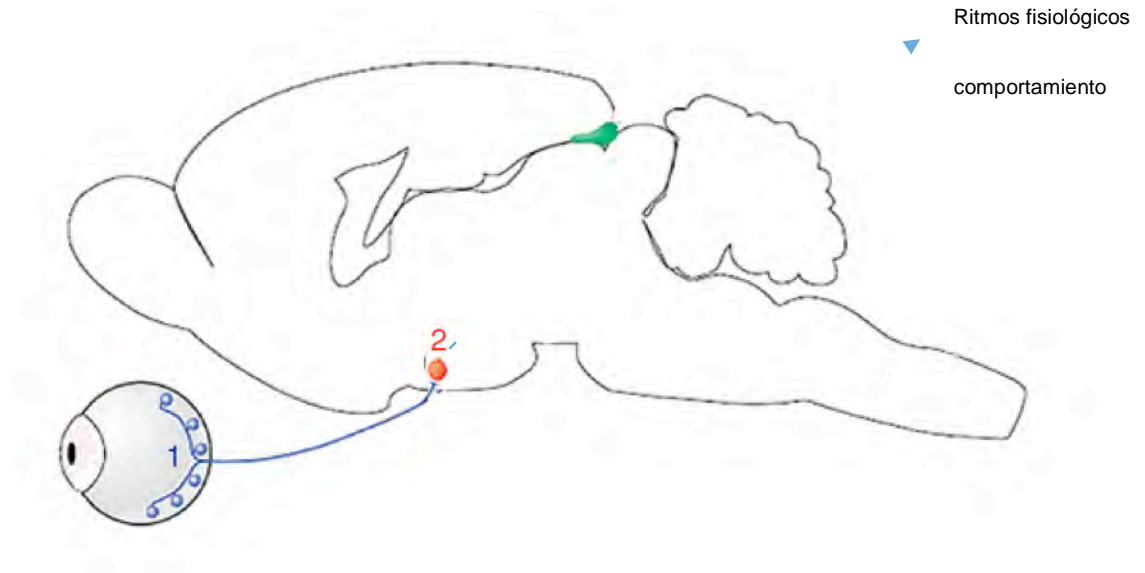


FIGURA 6. Esquema del sistema circadiano en la rata (modificado de Berson, 2003). 1. Células ganglionares de la retina, 2. NSQ.

El NSQ es una estructura pareada, es decir se encuentra en ambos hemisferios cerebrales, lateral al tercer ventrículo y sobre el quiasma óptico. Está compuesto por una cantidad pequeña de células, el neuropilo es muy complejo, con muchos tipos de sinapsis. Axones pequeños inervan al núcleo desde varias direcciones, mientras que las dendritas de las neuronas que conforman al NSQ se proyectan fuera de él. Las neuronas del NSQ poseen colaterales locales que terminan en otras neuronas dentro del núcleo y algunos axones permiten la conexión entre ambos núcleos (Klein, *et al.*, 1991). El NSQ secreta diversos neurotransmisores con una regionalización y temporalización específicas, como lo son Arginina-Vasopresina (AVP), Neuropeptido Y (NPY), Péptido Vasoactivo Intestinal (VIP), ácido  $\gamma$ -amino butírico (GABA) (Klein, *et al.*, 1991).

En el NSQ se pueden distinguir regiones estructurales, diferenciadas por su citoarquitectura y citoquímica. La corteza y el núcleo, también nombrados en

ocasiones ventrolateral y dorsomedial, respectivamente (FIGURA 7; Klein, *et al.*, 1991; Dunlap, *et al.*, 2004). Los axones que conectan los dos lados del núcleo entre sí aparentemente involucran a todos los neurotransmisores encontrados en el NSQ, sugiriéndose un cierto grado de comunicación entre los dos núcleos. A pesar de que la eliminación de uno de los núcleos no implica la extinción del ritmo, sí se observan alteraciones en la sincronización a la luz y cambios en el periodo del ritmo (Klein, *et al.*, 1991). Debido a lo anterior, se ha descrito un modelo de reloj circadiano en el que se reconoce un marcapasos complejo que consiste en dos osciladores acoplados que son afectados diferencialmente por la luz, uno sincronizado al sol saliente (M, por sus siglas en inglés) y otro al sol poniente (E, por sus siglas en inglés) (Pittendrigh, *et al.*, 1976; Daan, *et al.*, 1978, Jagota, *et al.*, 2000). Se ha observado un fenómeno de separación del ritmo de actividad locomotriz en dos componentes que corren libremente con diferentes periodos y que pueden volverse estables hasta 180° de distancia entre ellos conocido como *splitting* (Jagota, *et al.*, 2000).

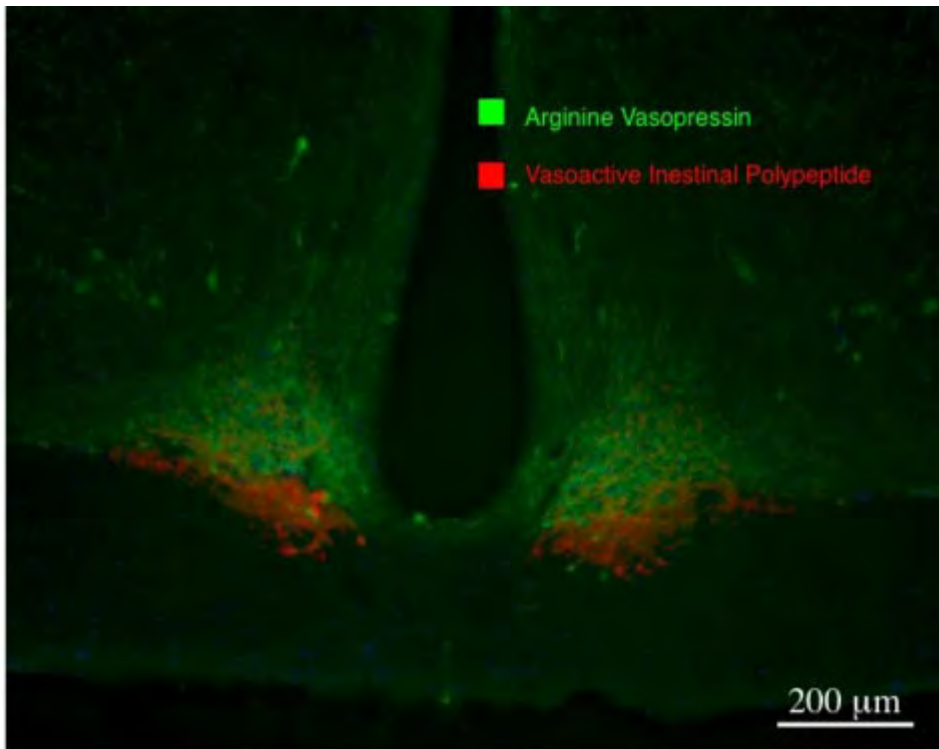


FIGURA 7. Inmunohistoquímica de la expresión de proteínas AVP y VIP en una sección coronal de NSQ de rata.

Aguilar-Roblero *et al.* (1997), establecen que el ritmo de ingesta de agua está modulado por el NSQ y que es un marcador de actividad en ratas.

#### Procesos cognoscitivos

Se ha mostrado que el hipocampo (FIGURA 8) desempeña un papel importante en procesos cognoscitivos relacionados con la memoria, el aprendizaje, la atención, la inteligencia y la personalidad (Gluck, *et al.*, 2001). La atención implica la selección de un estímulo sensorial particular o un proceso mental para su análisis, está relacionada con la actividad theta del hipocampo (Purves, *et al.*, 2004). El aprendizaje es el proceso a través del cual, a partir de la experiencia, el sistema nervioso adquiere nueva información, implica conexiones sinápticas creadas por exposiciones repetidas a eventos regulares en el ambiente,



lo que se observa a través de cambios en el comportamiento (Gluck, *et al.*, 2001; Purves, *et al.*, 2004). La memoria se refiere a la codificación, almacenaje y recuperación de la información aprendida. Se han descrito, de manera cualitativa, dos tipos de memoria en los humanos, la memoria declarativa, que implica el almacenamiento y recuperación del material que está disponible conscientemente y, por lo tanto, puede ser expresada verbalmente; y la memoria no declarativa o de procedimientos, aquella que no es consciente, al menos no a detalle, y que involucra habilidades y asociaciones que son adquiridas y recuperadas a nivel inconsciente, como la memoria de trabajo (Purves, *et al.*, 2004).

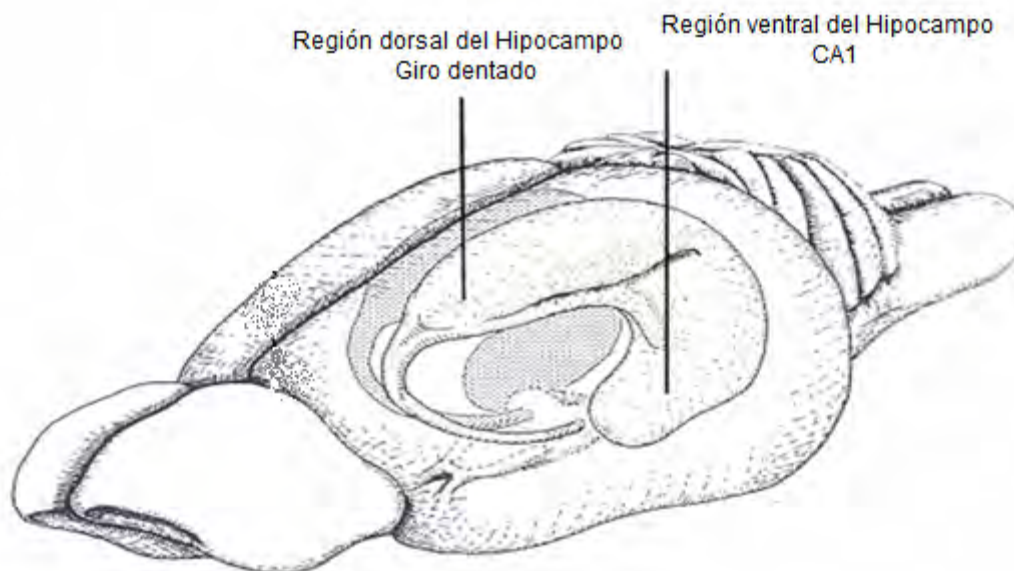


FIGURA 8. Neuroanatomía del Hipocampo en la rata.

El hipocampo también está involucrado en la memoria espacial, que implica la construcción de un mapa mental del medio, a partir del cual un organismo puede navegar en sus alrededores (Gluck, *et al.*, 2001). Un lugar es una colección o configuración de imágenes que son integradas en una percepción unificada del

lugar físico sobre el que se está situado, que además integra pistas del medio percibidas por otros sentidos, como el olfato. Entonces, el aprendizaje espacial puede ser considerado como un caso especial de aprendizaje configuracional: la habilidad de relacionar elementos para formar una memoria compleja (Gluck, *et al.*, 2001). Desde esta perspectiva es posible relacionarla con la memoria declarativa que también consiste en varios componentes separados que son unificados para formar una memoria única y compleja (Gluck, *et al.*, 2001; Purves, *et al.*, 2004).

La neurogénesis en el hipocampo ocurre en el periodo prenatal y se extiende hasta el periodo posnatal temprano, tanto en ratas como en humanos (FIGURA 9). Cambios en el funcionamiento del hipocampo, tales como déficits en contacto sináptico y sistemas de neurotransmisores, que se cree que constituyen las bases neuroquímicas para los procesos de memoria, pueden producir déficits en el aprendizaje espacial y en la memoria.

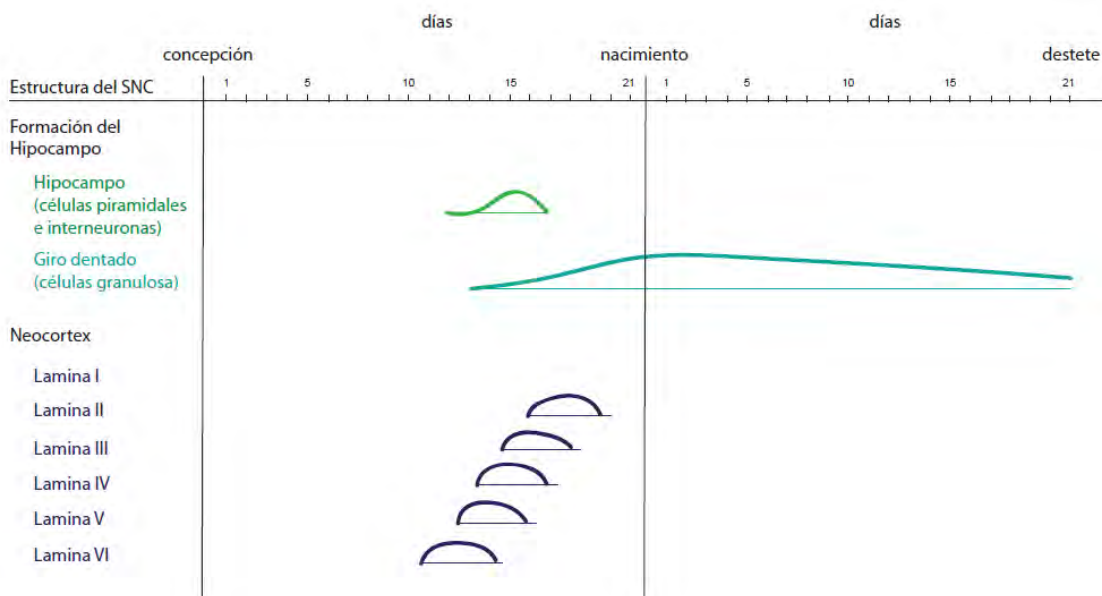


FIGURA 9. Representación gráfica de los PCD en referencia específica a las estructuras relacionadas con el aprendizaje y la memoria espacial, en ratas.

De acuerdo con la teoría del mapa cognoscitivo o mapa allocéntrico, el hipocampo es una estructura en el SNC involucrada en el aprendizaje de procesos y almacenamiento de representaciones espaciales del medio en mapas cognitivos (Einchenbaum, 2002). El término mapa cognoscitivo se refiere al establecimiento de relaciones entre las señales ambientales con un lugar determinado y sus posiciones relativas; estos procesos resultan en la construcción de una representación espacial del ambiente y permiten al animal usar dichas representaciones para guiarse en un contexto espacial específico (Einchenbaum, 2002). A través de la inspección, manipulación, o movimientos locomotrices en el ambiente (lo que constituye la exploración del animal), se adquiere información, se procesa y se da como resultado un tipo de representación cognoscitiva del medio. Las ratas con MPP tardan más en desempeñarse en tareas de navegación espacial y tienen estrategias de navegación menos precisas en la fase de adquisición del aprendizaje. Un modelo ampliamente usado para estudiar estos proceso de aprendizaje y memoria espacial en las ratas es el Laberinto Acuático de Morris (LAM) (Einchenbaum, 2002; Laus, *et al.*, 2011).

Una de las técnicas más utilizadas para estudiar el aprendizaje espacial fue desarrollada por Richard Morris en 1984: el LAM, que consiste en un recipiente con agua suficiente para permitir el nado de una rata, en el que se coloca una plataforma fuera del alcance de la vista del animal. A medida que la rata nada alrededor del recipiente, eventualmente encontrará la plataforma. Los organismos normales toman poco tiempo en aprender a encontrar caminos relativamente

directos hacia la plataforma, guiándose a partir de las señales visuales del entorno (Morris, 1984; Gluck, *et al.*, 2001).

Morgane y colaboradores (1993) mencionan a la formación hipocampal como un excelente modelo para el estudio de la MPP, debido a que se conocen la mayor parte de conexiones establecidas entre sus neuronas, el arreglo citoarquitectónico y la conectividad que han sido estudiados de manera cuantitativa en animales normales.

Laus y colaboradores (2011), a partir del análisis de estudios de desempeño cognoscitivo en ratas con MPP realizados en décadas recientes, concluyen que:

- a) ratas con MPP generalmente requieren más tiempo para aprender las tareas en las pruebas de aprendizaje.
- b) cuando aprenden, les toma más tiempo extinguir los comportamientos aprendidos en las pruebas de aprendizaje.
- c) la MPP promueve una reactividad emocional a estímulos aversivos o dolorosos y en situaciones en las que el desempeño del organismo depende de procesos de atención sutiles o complejos.

Estos cambios en el comportamiento de organismos con MPP se han explicado como el resultado de la rigidez de comportamiento o inflexibilidad cognoscitiva, que consisten en dificultades para adaptarse o procesar información de contextos complejos o cambiantes y es característica de organismos con MPP (Laus, *et al.*, 2011; Tonkiss, *et al.*, 1990a).

A pesar de que algunos estudios no muestran diferencias significativas en el desempeño en el LAM, entre los organismos malnutridos y sus pares controles en tareas de memoria y aprendizaje espacial, algunos otros estudios con ratas sometidas a MPP muestran que estos animales toman más tiempo en aprender las tareas y tienen dificultad en retener la información aprendida (Laus, *et al.*, 2011). En general los estudios realizados hasta el momento en materia de MPP y sus efectos en el desempeño en pruebas para evaluar la memoria y el aprendizaje espacial han arrojado conclusiones controversiales (Tonkiss, *et al.*, 1993, Fukuda, *et al.*, 2002; Partadiredja, *et al.*, 2011).

Sin embargo, resultados obtenidos en pruebas que consideran la distribución temporal de dichas tareas sugieren que el desempeño en éstas puede estar modulado temporalmente. Valentinuzzi y colaboradores (2004) realizaron un diseño experimental para probar la memoria de trabajo en el LAM en el que consideran dos momentos del día, uno a la mitad del periodo de actividad y el segundo durante el periodo de reposo. Reportan diferencias significativas entre estos dos grupos, existiendo un mejor desempeño en la tarea durante la fase de actividad de los organismos.

Posteriormente, Durán y colaboradores (2011) realizaron un estudio en el que evaluaron la memoria de trabajo en diferentes puntos circadianos. En sus resultados reportan un ritmo de aprendizaje y una diferencia significativa entre la expresión del ritmo de los organismos de acuerdo a la nutrición perinatal a la que fueron expuestos (FIGURA 10).

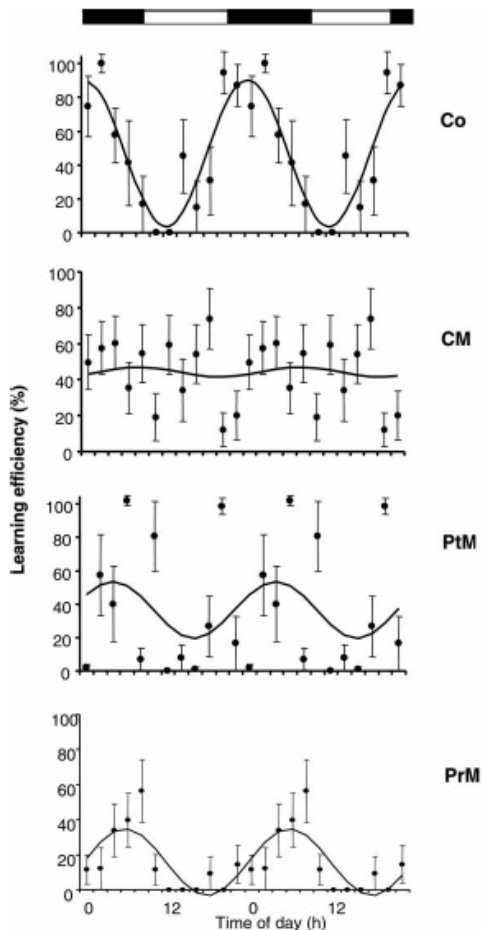


FIGURA 10. Comparación de la eficiencia de aprendizaje (%) de los grupos que fueron sometidos a diversos protocolos de malnutrición proteínica. Control (Co), Malnutrición proteínica crónica perinatal (CM), malnutrición proteínica posnatal (PtM) y malnutrición proteínica prenatal (PrM). Se encontró un ritmo en la memoria de trabajo. Existen diferencias significativas en el ritmo entre los grupos experimentales de acuerdo a la nutrición al que fueron sometidos. No se encontró un ritmo en los organismos que fueron sometidos a malnutrición proteínica perinatal crónica (Resultados de Durán, *et al.*, 2011).

Por otro lado, se ha observado que ratas con MPP desarrollaron alteraciones en el ritmo diario de ingesta de agua. Además los estudios inmunohistoquímicos del NSQ en estos organismos sugieren que la fuerza de coordinación entre los osciladores disminuye significativamente ante dicho estímulo. Así, los autores sugieren que el NSQ puede ser afectado por alteraciones nutricionales en el periodo perinatal, ya sea directa o indirectamente. (Aguilar-Roblero, *et al.*, 1997).

Existen evidencias que indican que existe un control circadiano en procesos de atención, algunos tipos de memoria y aprendizaje, en particular de la consolidación de la memoria espacial (Benca, *et al.*, 2009; Eckel-Mahan, *et al.*, 2008).

Los componentes del reloj molecular son expresados ampliamente a través del cerebro y la capacidad de estos genes para cambiar, entre activadores transcripcionales y represores, sugiere que pueden orquestrar un control circadiano de la expresión génica neuronal y la actividad neuronal a partir de su influencia sobre la función de neurotransmisores y receptores involucrados en la regulación de procesos cognoscitivos. Por ejemplo, proyecciones del NSQ al *Locus Coeruleus* (LC) facilitan la regulación circadiana de la actividad noradrenérgica y son importantes para la transición entre atención enfocada y la flexibilidad conductual (Benca, *et al.*, 2009).

Estudios han demostrado que las perturbaciones en las relaciones recíprocas entre el reloj molecular y otros sistemas de neurotransmisores pueden llevar a funciones cerebrales y comportamientos alteradas en general (Benca, *et al.*, 2009).

Ratones mutantes que carecen del gen *NPAS2*, análogo del gen *CLOCK*, muestran déficits en el aprendizaje de paradigmas de miedo contextual, sugiriendo que el *NPAS2* desempeña un papel importante en la adquisición de tipos específicos de memoria (Benca, *et al.*, 2009).

Estos ejemplos ilustran que el NSQ media las salidas del reloj circadiano; y las interacciones mediadas por el reloj molecular con neurotransmisores y otros procesos neuronales son complejas y desempeñan un papel importante en la regulación de una amplia variedad de comportamientos, incluyendo procesos cognoscitivos (Benca, *et al.*, 2009).

Las salidas del NSQ son capaces de producir ritmicidad celular sostenida y sincrónica tanto en tejidos centrales como periféricos dando como resultado la organización temporal de ritmos moleculares y conductuales a través del cuerpo (Benca, *et al.*, 2009).

La capacidad para aprender y recordar varía a través del día y ha sido demostrado que bajo condiciones controladas exhibe *bona fide* ritmos circadianos, i. e. de periodo aproximado de 24 horas que son generados endógenamente y pueden ser sincronizados por el ciclo de luz-oscuridad (Benca, *et al.*, 2009).

Existe una variedad de mecanismos neurofisiológicos que han sido elucidados como responsables de la organización circadiana de los procesos cognoscitivos. Estos incluyen regulación de inervación noradrenérgica de la corteza, expresión de genes reloj en el NSQ e hipocampo, densidad de espinas dendríticas y transporte de serotonina (Benca, *et al.*, 2009).



## Planteamiento del problema

Existe evidencia que sugiere que los procesos de aprendizaje, memoria y expresión del ritmo circadiano de ingesta de agua se encuentran alterados debido a la malnutrición gestacional (Morgane, *et al.*, 1993). A su vez, se ha propuesto una modulación rítmica endógena de los procesos de aprendizaje y memoria, por lo que es probable que deficiencias nutricionales durante el periodo perinatal modifiquen la expresión del ritmo circadiano de ingesta de agua, así como los procesos de memoria y aprendizaje (Aguilar-Roblero, *et al.*, 1997; Durán, *et al.*, 2011), por sí mismos y en relación con la distribución temporal en la que se realizan estos procesos. Uno de los principales problemas de salud en México es la prevalencia de exceso de peso corporal y desórdenes metabólicos (Secretaría de Salud (SS), 2011). Esto representa un indicador del estado nutricional de la población en general. Específicamente 73.3% de las mujeres que tienen más de veinte años presentan problemas nutricionales (SS, Instituto Nacional de Salud Pública (INSP), 2006). Esto podría implicar a su vez, que la nutrición perinatal de los productos de cualquiera de estas mujeres al embarazarse se vería comprometido por estas condiciones. Por lo que es de gran importancia comprender cómo estos desórdenes metabólicos pueden estar afectando procesos durante el desarrollo perinatal y sus efectos posteriores en el organismo, lo que permitiría plantear soluciones puntuales, tanto preventivas como paliativas, a partir de lo cual se desprende la realización de este trabajo.

## **Hipótesis**

Si la malnutrición durante el periodo perinatal temprano representan un efecto deletéreo sobre el desarrollo en general, y en particular del SNC, entonces se encontrarán modificaciones en los procesos cognoscitivos de memoria espacial, su distribución temporal y el ritmo de ingesta de agua.

## **Objetivos**

General:

- Evaluar la manifestación del ritmo diario de ingesta de agua y la memoria espacial en un modelo de malnutrición hipoproteínica perinatal.

Particulares:

- Evaluar el ritmo circadiano a través del ritmo de ingesta de agua.
- Evaluar la memoria espacial mediante el uso del laberinto acuático de Morris considerando cuatro puntos temporales.
- Determinar la eficiencia de aprendizaje espacial y su acrofase en los diferentes grupos experimentales.
- Comparar la manifestación del ritmo y el desempeño en el laberinto acuático de Morris en dos modelos nutricionales hipoproteínicos.

## Material y método

### a) Modelo animal

El estudio se realizó con ratas (*Rattus norvegicus*) de la cepa Sprague Dawley. Los registros conductuales fueron realizados en hembras entre los 45 y 90 días de edad. Los organismos fueron obtenidos del Bioterio de la Facultad de Ciencias UNAM, en donde fueron mantenidos en condiciones de temperatura e iluminación constantes.

### b) Protocolo de malnutrición proteínica

Se utilizó una versión del modelo de malnutrición proteínica perinatal aguda (MPP) utilizado por Morgane y colaboradores (1993), que consistió en seleccionar al azar hembras que hubieran alcanzado la madurez sexual. Fueron colocadas por parejas en cajas. Se les administró alimento isocalórico hipoproteínico (6% caseína), el acceso fue *ad libitum* desde dos semanas previas a los apareamientos y hasta el momento del destete, para así asegurar la malnutrición proteínica perinatal (Mpp) de las crías.

Para las cruzas se colocó a un macho por cada dos hembras, por caja. Una vez concluidos 3 ciclos estrales (12 días), o ante la detección de hembras preñadas, se retiraron a los machos y se separaron las hembras, una en cada caja. Las hembras preñadas fueron revisadas diariamente para monitorear su estado y el día de nacimiento de las crías.

Se consideró un periodo de lactancia de 21 días posteriores al parto (dp21). Al destete, las crías fueron separadas en grupos de 8 a 10 organismos. A partir de este momento se administraron agua y alimento (25% caseína) *ad libitum* (FIGURA 11).

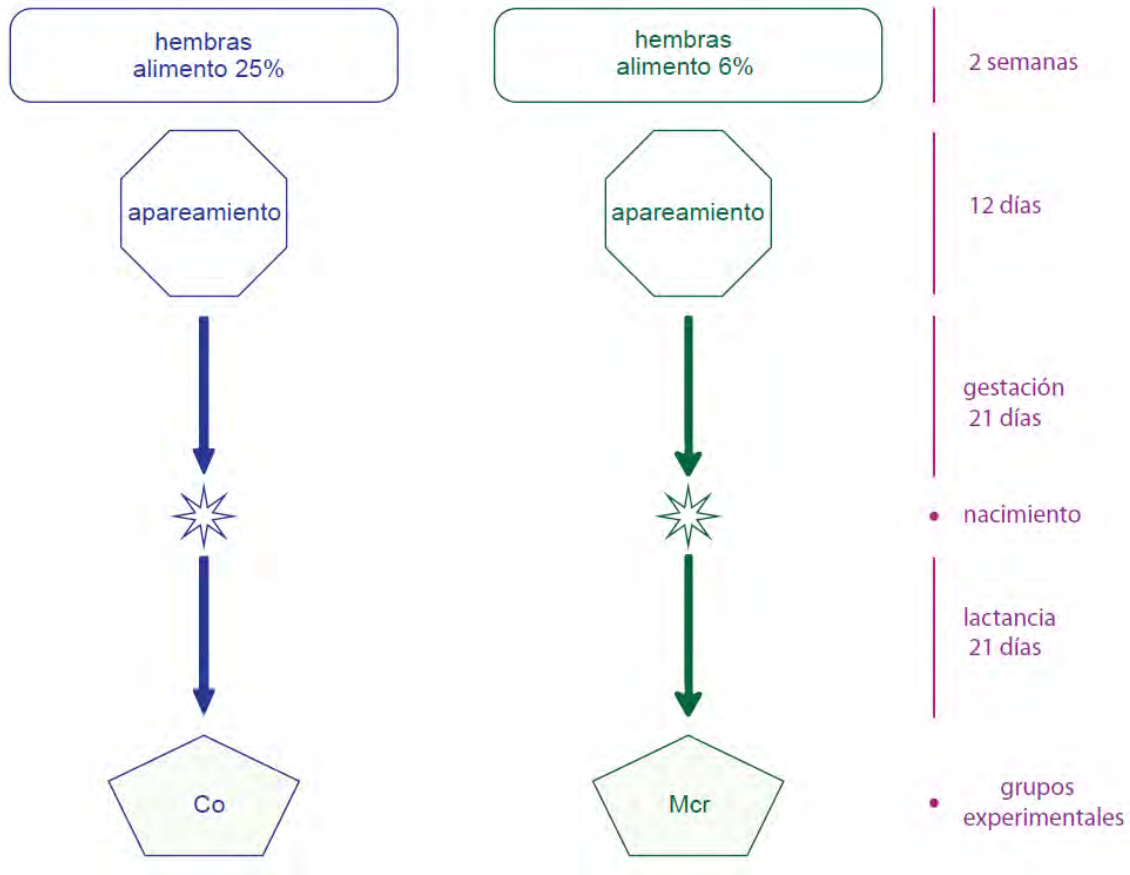


FIGURA 11. Esquema del protocolo de MPP utilizado en este estudio (adaptado de Morgane, *et al.*, 1993).

### c) Grupos experimentales

- Grupos. Los organismos se dividieron en dos grupos de acuerdo a la nutrición perinatal:

Control (Co). Descendientes de madres alimentadas con dietas isocalóricas, normoproteínicas, 25% caseína, n=20. Para la obtención de los organismos control se realizó el procedimiento descrito en el protocolo de malnutrición, manteniendo la dieta 25% caseína.

Malnutridas crónicas (Mcr). Descendientes de madres alimentadas con dietas isocalóricas, hipoproteínicas, 6% caseína, n=20.

- Subgrupos. Los organismos fueron subdivididos de acuerdo a la hora del día en el que realizaron las pruebas conductuales:

7hrs. Corresponde a 1 hora después del encendido de luces, n=4.

13hrs. Corresponde a 7 horas después del encendido de luces, n=4.

19hrs. Corresponde a 13 horas después del encendido de luces, n=4.

1hrs. Corresponde a 19 horas después del encendido de luces, n=4.

d) Evaluación del ritmo circadiano de ingesta de agua

En el día 45 posnatal (dp45) los organismos fueron separados en cajas individuales. Se inició el registro de la ingesta de agua utilizando un circuito construido específicamente para este estudio, que consiste en un sensor colocado en la boquilla del bebedero conectado a un amplificador que a su vez está conectado a una computadora, en la que se registran los datos utilizando el programa ACTIBIO.

En total se realizó la evaluación del ritmo a 16 organismos seleccionados al azar, n=8 grupo Control y n=8 grupo Malnutridas crónicas. A su vez, por razones prácticas, se seleccionaron 4 organismos al azar de cada grupo para invertirles el ciclo de iluminación.

El protocolo consistió en mantener a los organismos durante 25 días (dp45 a dp70) en L:O u O:L 12:12, según el caso; a partir del dp70 al dp80 se mantuvieron en oscuridad constante. El dp80 se cambiaron las condiciones

a L:O u O:L 12:12, correspondiendo a los primeros 25 días; el registro continuó durante 10 días más (FIGURA 12).

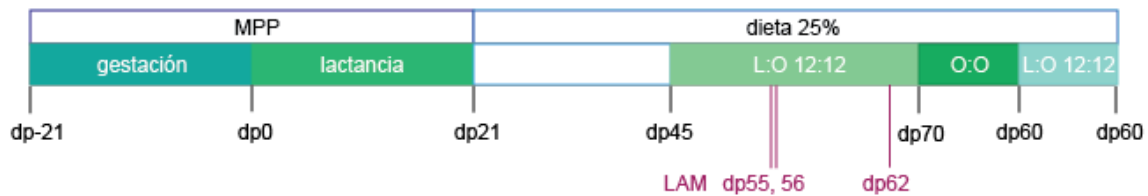


FIGURA 12. Línea del tiempo de los protocolos experimentales utilizados en este trabajo.

#### e) Evaluación de la memoria espacial

Se utilizó una adaptación del LAM para evaluar el proceso de aprendizaje y la memoria espacial a corto y largo plazo.

El LAM se realizó dentro de una tina de 90 cm de diámetro de color negro, lo suficientemente profunda para permitir el nado de los organismos. Dentro se colocó una plataforma (P en FIGURA 13) negra de 15 x 15 cm en el centro de uno de los cuadrantes en los que se dividió la tina como referencia (FIGURA 13: 1, 2, 3 y 4). Se llenó de agua, de tal forma que la plataforma quedara oculta a la vista.

En el perímetro de la tina, en medio de cada cuadrante, se marcaron 3 puntos, A, B y C (FIGURA 13).

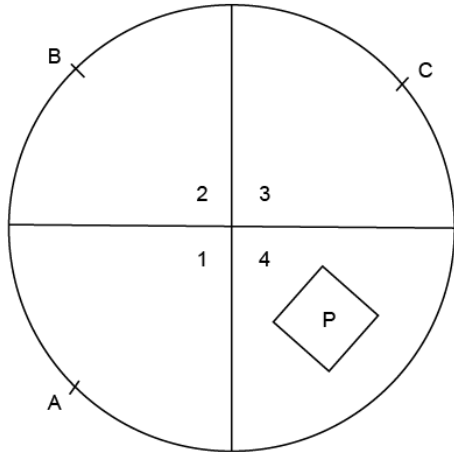


FIGURA 13. Representación gráfica del modelo del LAM utilizado en este trabajo. A, B y C representan los puntos a partir de los cuales se colocaba al organismo para que explorara el laberinto en búsqueda de la Plataforma (P). 1, 2, 3 y 4 representan los cuadrantes virtuales en los que fue dividida la tina como referencia. El diámetro es de 90 cm.

Alrededor de la tina se colocaron señales visuales (FIGURA 14) a partir de las cuales los organismos pudieran orientarse hacia la plataforma.

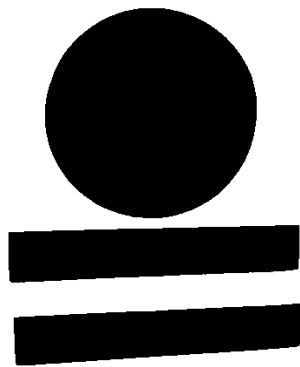


FIGURA 14. Señales visuales utilizadas en el LAM.

La evaluación del proceso de aprendizaje y atención se realizó a través de 10 ensayos consecutivos durante el primer día (dp 55), los cuales se repitieron el día siguiente (dp 56). Para la memoria espacial a corto plazo se

aplicó una prueba inmediatamente después de los 10 ensayos del segundo día y para la memoria espacial a largo plazo, una prueba en el octavo día (dp 62).

Previo a los 10 ensayos del primer día, se realizó un entrenamiento para enseñarles a nadar hacia la plataforma, sosteniéndolas delicadamente por debajo de las patas delanteras, mientras los organismos nadan.

Cada ensayo consistió en colocar a la rata sobre la plataforma para exploración del entorno, pasados 30 segundos, llevar a la rata bloqueando su campo de visión, a alguno de los puntos A, B o C, elegido al azar. A partir de este momento se le permitió nadar libremente durante 60 segundos o hasta que encontrara la plataforma. En caso de no hacerlo se le guió hacia P mientras nadaba, permitiéndole observar el entorno. Para dichos ensayos se midió el tiempo que tardaron en encontrar la plataforma (latencia de escape), velocidad de nado y distancia recorrida.

Las pruebas consistieron en colocar a la rata sobre la plataforma durante 30 segundos, se le guió, mientras se bloqueaba su campo de visión, hacia alguno de los puntos A, B o C elegido al azar; se extraía la plataforma de la tina y se permitió nadar libremente al organismo durante 60 segundos. Se midió el tiempo que pasaron explorando el cuadrante 4, la velocidad de nado y distancia recorrida.



f) Análisis de datos

Los datos de ingesta de agua fueron analizados utilizando los programas Excel (Microsoft), Actiview y Chronosfit.

Los datos del LAM se obtuvieron y fueron procesados utilizando el programa Anymaze (Stoelting Co).

Los análisis estadísticos fueron realizados utilizando los programas Sigma Plot (Systat Software Inc.), Origin Lab (OriginLab Corporation) y Excel (Microsoft).

## Resultados

### Peso

Se obtuvo el peso de los organismos el dp55. La media del peso de los organismos Co fue  $162.9 \pm 4.5$  g, mientras que la de los Mcr  $129.1 \pm 8.4$  g. Lo que representa un déficit de 20% para el grupo Mcr (FIGURA 15); a partir de una t de Student ( $p=0.05$ ) se determinó que la diferencia fue significativa.

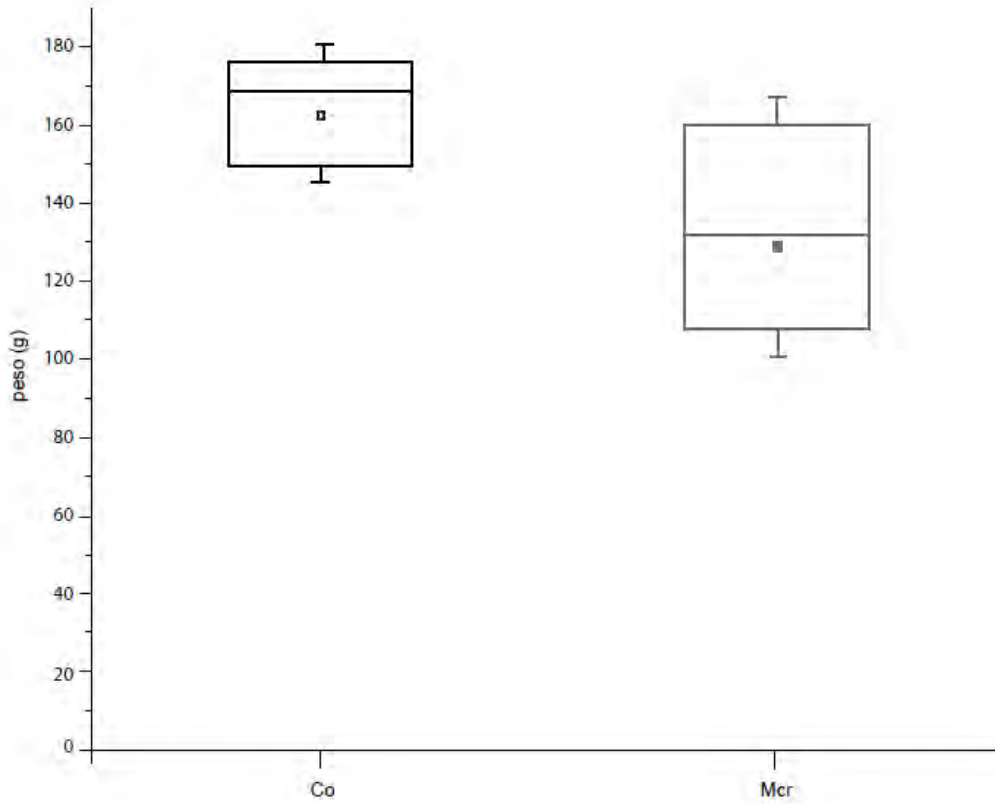


FIGURA 15. Comparación del peso en g (media  $\pm$ esm) de los organismos de los grupos Co y Mcr en el dp55.

## Evaluación del proceso de aprendizaje y memoria espacial

*Proceso de aprendizaje. Primera fase de ensayos, dp55*

Se obtuvo la latencia de escape (media  $\pm$ esm) de cada ensayo en el día 1 por subgrupo (FIGURA 16). En general, durante los primeros ensayos los organismos tardaron más tiempo en encontrar P y conforme realizan la tarea consecutivamente, disminuyó la latencia, lo que caracteriza la eficiencia de aprendizaje.

En todos los subgrupos, el grupo Co muestra una mayor eficiencia de aprendizaje, se encontraron diferencias significativas entre Co y Mcr (post hoc Fisher's LSD,  $p=0.05$ ) en algunos ensayos de los subgrupos 7 y 19 (\* en FIGURA 16).

Al comparar los subgrupos los organismos Co muestran un proceso de aprendizaje más uniforme que los Mcr. Los subgrupos Mcr 7 y Mcr 19 presentan una curva de aprendizaje deficiente con respecto al resto de los subgrupos, marcada por la relación entre el valor de  $y - R^2$  (TABLA 1).

El grupo Mcr presenta una mayor varianza en cuanto a los valores de latencia de escape. En el grupo Co, en general, la varianza disminuye conforme transcurren los ensayos.

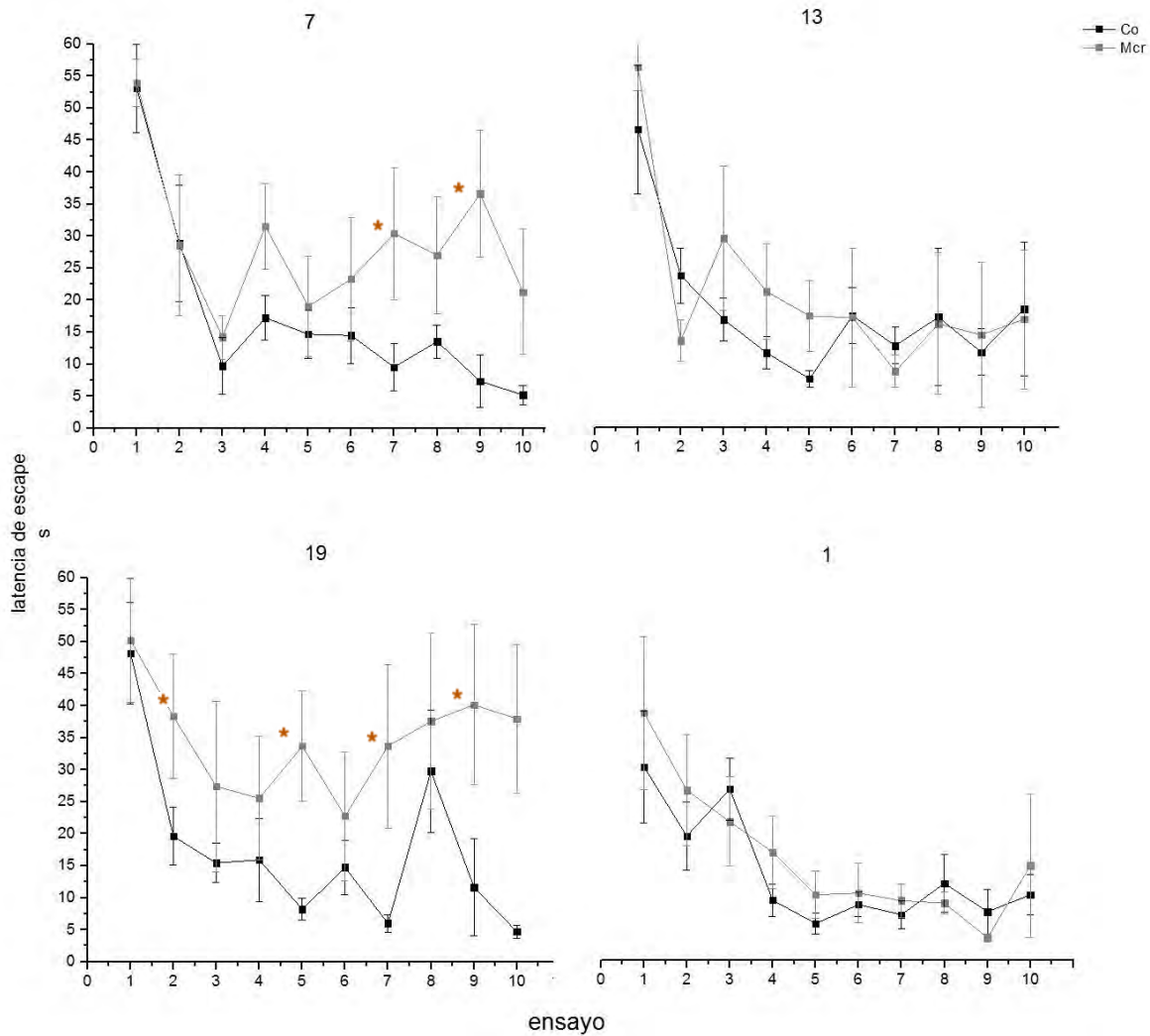


FIGURA 16. Comparación de las gráficas de la latencia de escape (tiempo en encontrar la plataforma en segundos, media  $\pm$ esm) de cada ensayo por subgrupo durante el día 1; las diferencias significativas están marcadas con \*. En el sentido de las manecillas del reloj, comenzando por la gráfica superior izquierda, se muestran los subgrupos Co7 vs Mcr7, Co13 vs Mcr13, Co1 vs Mcr1, Co19 vs Mcr19.

El ajuste exponencial a las gráficas de latencia de escape para la primera etapa de ensayos muestra que Mcr7 y Mcr19, al obtener un coeficiente de determinación  $>0.1$  presentan un desempeño pobre en relación con los demás subgrupos (TABLA 1), es decir, conforme realizan más ensayos no son capaces de encontrar la plataforma con mayor facilidad.

subgrupo	ecuación regresión exponencial	coeficiente de determinación	subgrupo	ecuación regresión exponencial	coeficiente de determinación
Co7	$y = 38.56e^{-0.186x}$	$R^2 = 0.7058$	Mcr7	$y = 30.016e^{-0.02x}$	$R^2 = 0.0273$
Co13	$y = 24.385e^{-0.073x}$	$R^2 = 0.2052$	Mcr13	$y = 31.752e^{-0.097x}$	$R^2 = 0.3512$
Co19	$y = 30.678e^{-0.144x}$	$R^2 = 0.3804$	Mcr19	$y = 34.081e^{-0.001x}$	$R^2 = 0.0002$
Co1	$y = 23.306e^{-0.126x}$	$R^2 = 0.4422$	Mcr1	$y = 34.994e^{-0.177x}$	$R^2 = 0.6201$

TABLA 1. Comparación del ajuste exponencial de las gráficas de la latencia de escape por subgrupo durante la primera etapa de ensayos.

Al graficar el coeficiente de la eficiencia de aprendizaje (media  $\pm$ esm) para cada ensayo durante el día 1, por subgrupo (FIGURA 17) es evidente que el desempeño del grupo Co en general fue mejor, acercándose al valor 1 conforme aumentan los ensayos. En el subgrupo Mcr 19 se observa como del ensayo 1 al 6 aumenta el coeficiente de la eficiencia de aprendizaje; sin embargo del 7 al 10 cae nuevamente.

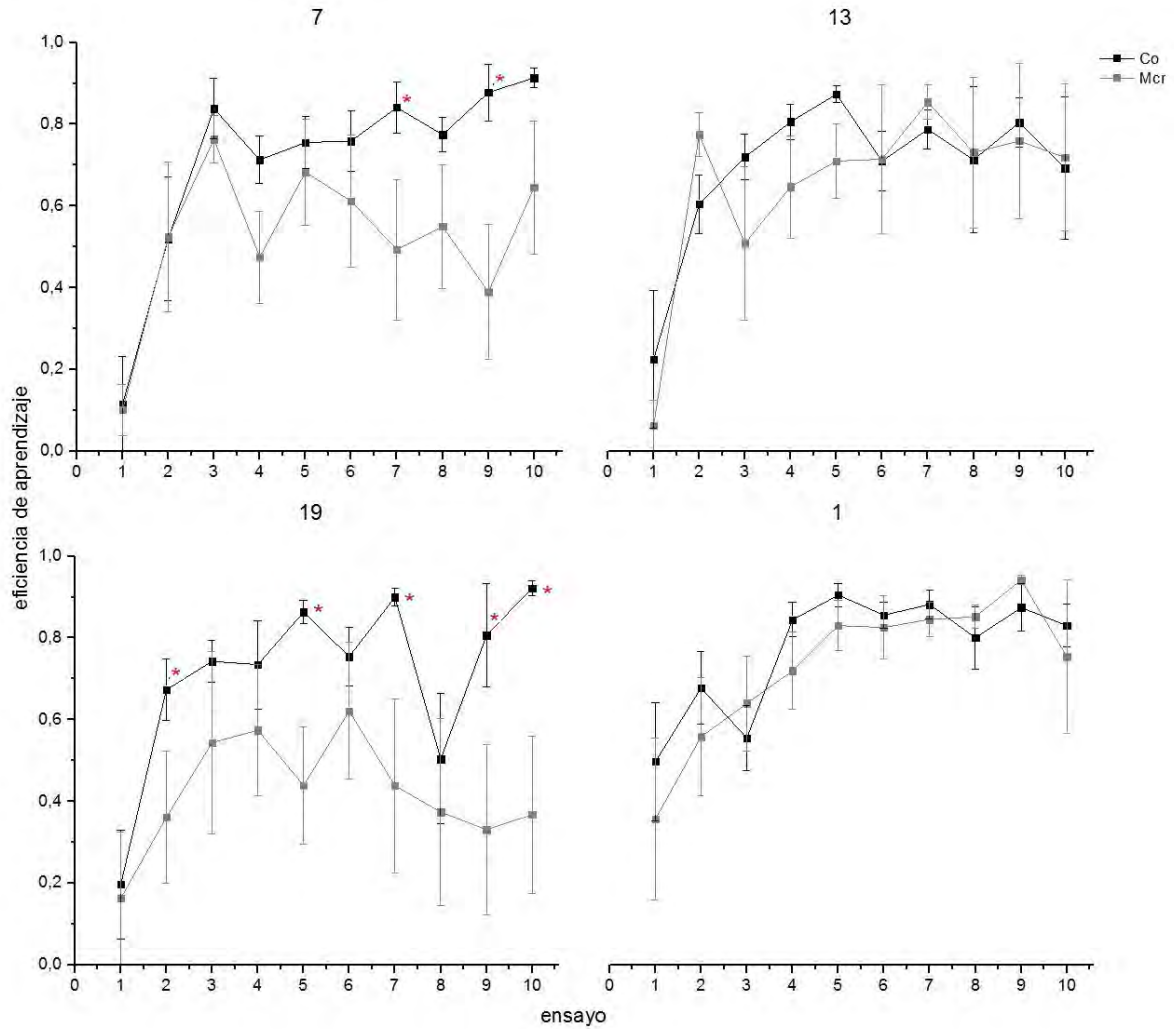


FIGURA 17. Comparación del coeficiente de la eficiencia de aprendizaje (media  $\pm$ esm) de cada ensayo durante el día 1 por subgrupo; las diferencias significativas se indican con \*. En el sentido de las manecillas del reloj, comenzando por la gráfica superior izquierda, se muestran los subgrupos Co7 vs Mcr7, Co13 vs Mcr13, Co1 vs Mcr1, Co19 vs Mcr19.

En general la distancia recorrida (media  $\pm$ esm) en cada ensayo en el día 1 por subgrupo (FIGURA 18) en general disminuyó conforme realizaron cada ensayo. Una distancia menor indica un recorrido más eficiente al dirigirse hacia P. Se observa un recorrido más eficiente en los subgrupos Co1 y Mcr1. Se encontraron diferencias significativas entre los grupos Co y Mcr en 7 y 19. Los subgrupos Mcr 7

y Mcr19 recorrieron distancias mayores, lo que es consistente con la latencia de escape observada.

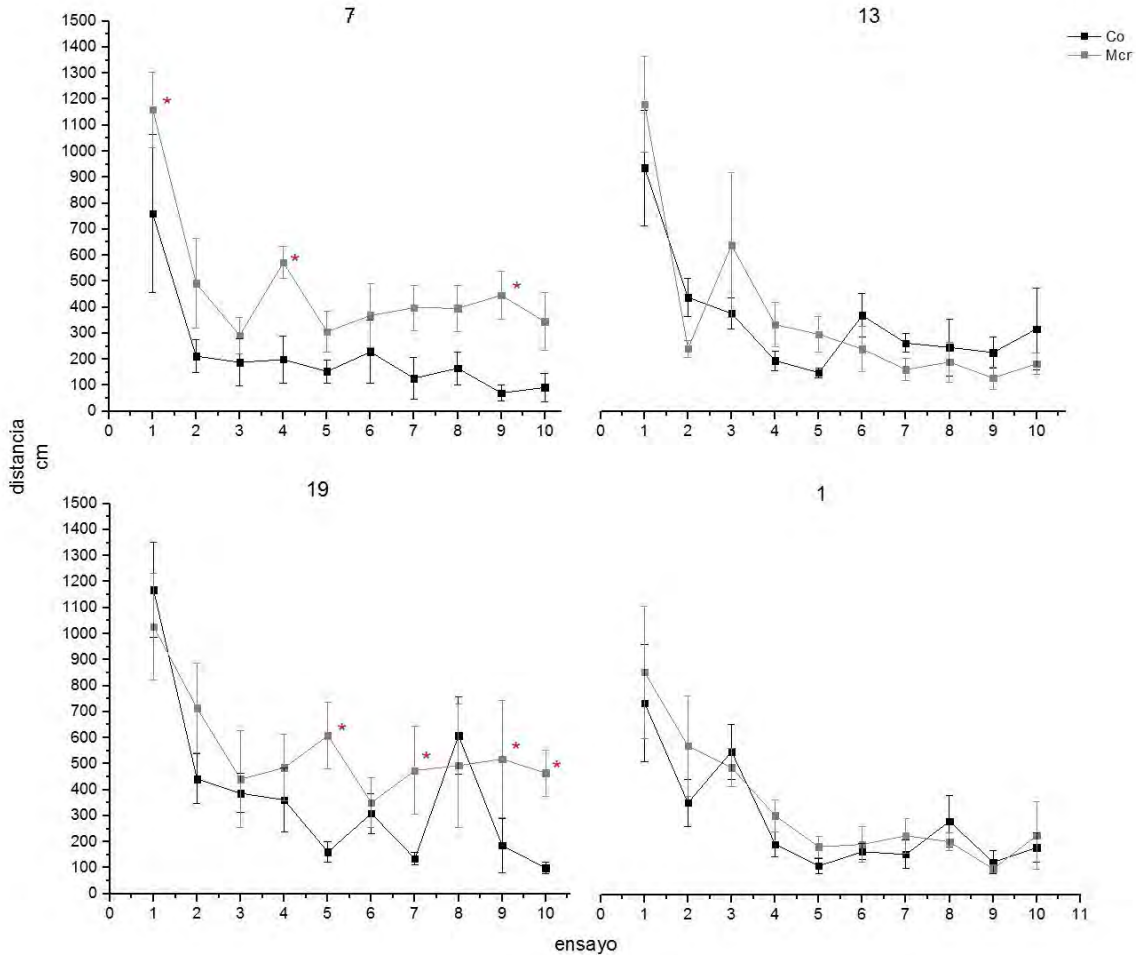


FIGURA 18. Distancia recorrida (media  $\pm$ esm) en cada ensayo durante el día 1 por subgrupo; las diferencias significativas se indican con \*. En el sentido de las manecillas del reloj, comenzando por la gráfica superior izquierda, se muestran los subgrupos Co7 vs Mcr7, Co13 vs Mcr13, Co1 vs Mcr1, Co19 vs Mcr19.

Los subgrupos Co7, Mcr7, Co13 y Mcr13 mantuvieron una velocidad de nado (FIGURA 19) relativamente constante; en los subgrupos Co19, Mcr19, Co1 y Mcr1 tiende a disminuir. No hay diferencias significativas entre la velocidad de nado de los subgrupos.

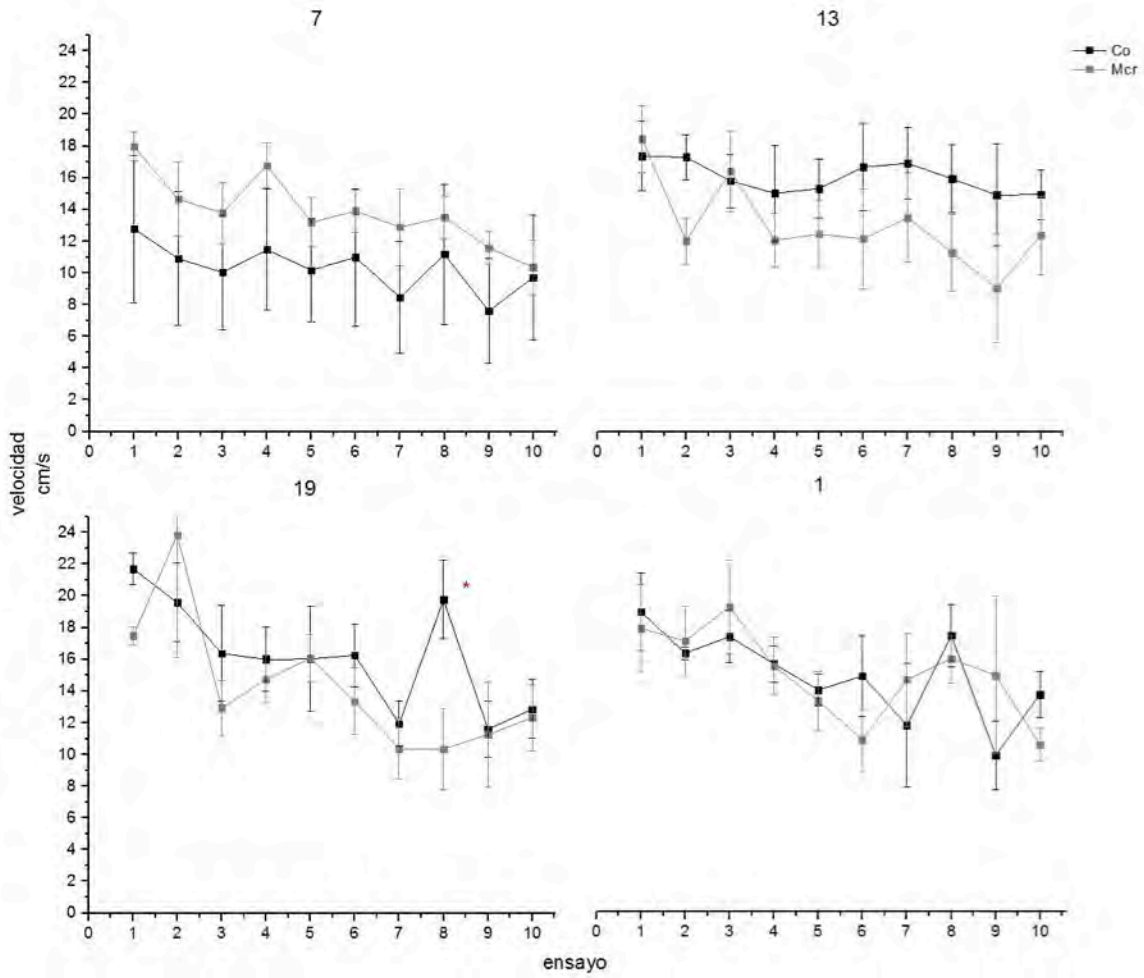


FIGURA 19. Velocidad de nado (media  $\pm$ esm) en cada ensayo durante el día 1 por subgrupo; las diferencias significativas se indican con \*. En el sentido de las manecillas del reloj, comenzando por la gráfica superior izquierda, se muestran los subgrupos Co7 vs Mcr7, Co13 vs Mcr13, Co1 vs Mcr1, Co19 vs Mcr19.



Al comparar la latencia de escape durante la segunda etapa de ensayos (FIGURA 20), se observa que en general los dos grupos experimentales tienen un desempeño más uniforme en la tarea. Únicamente se observan diferencias significativas entre Co19 y Mcr19 (\*, FIGURA 20).

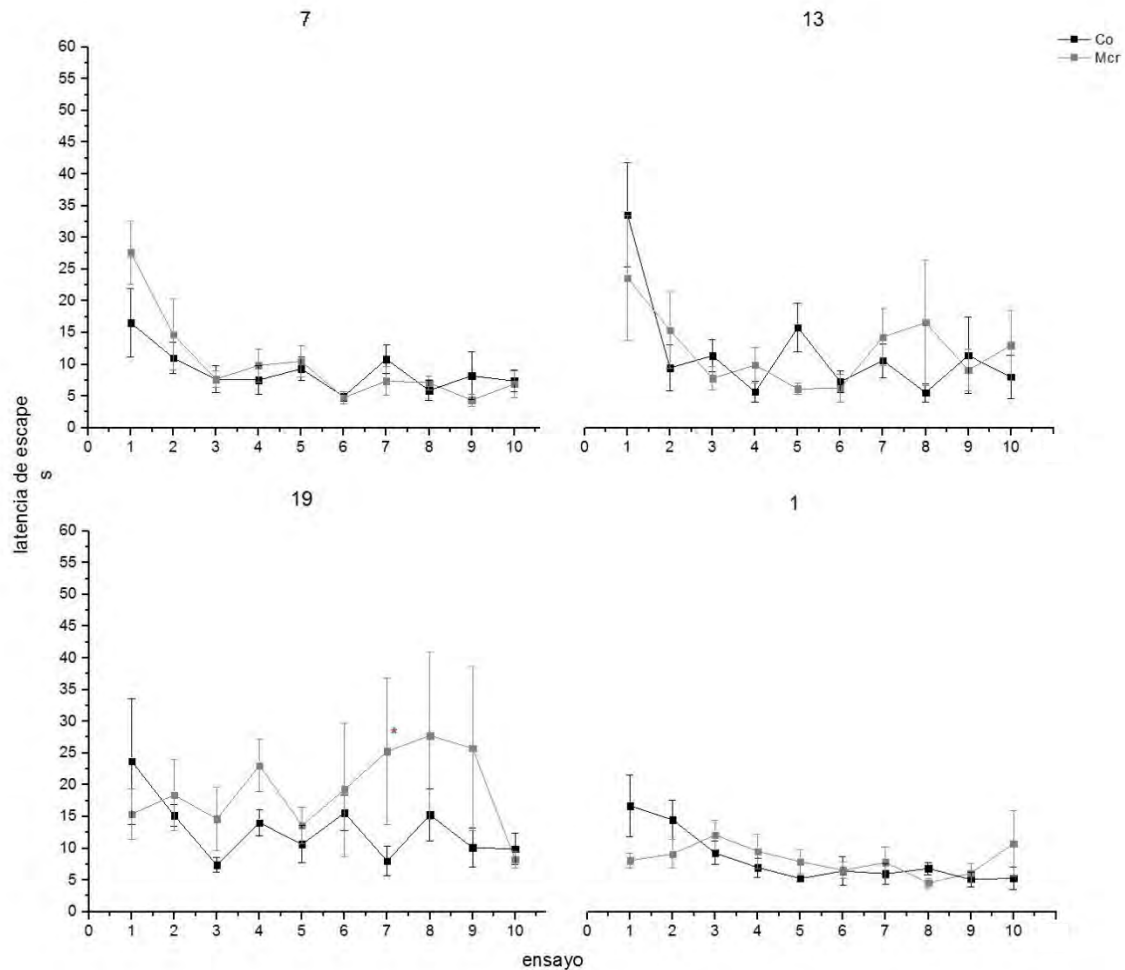


FIGURA 20. Latencia de escape (media  $\pm$ esm) de cada ensayo por subgrupo durante la segunda fase; las diferencias significativas se indican con \*. En el sentido de las manecillas del reloj, comenzando por la gráfica superior izquierda, se muestran los subgrupos Co7 vs Mcr7, Co13 vs Mcr13, Co1 vs Mcr1, Co19 vs Mcr19.

Los subgrupos Co1 y Mcr1 muestran una mayor retención de la tarea (FIGURA 21). En cuanto a los demás subgrupos, se observa que en general la eficiencia de aprendizaje aumenta con respecto a la primera fase de ensayos.

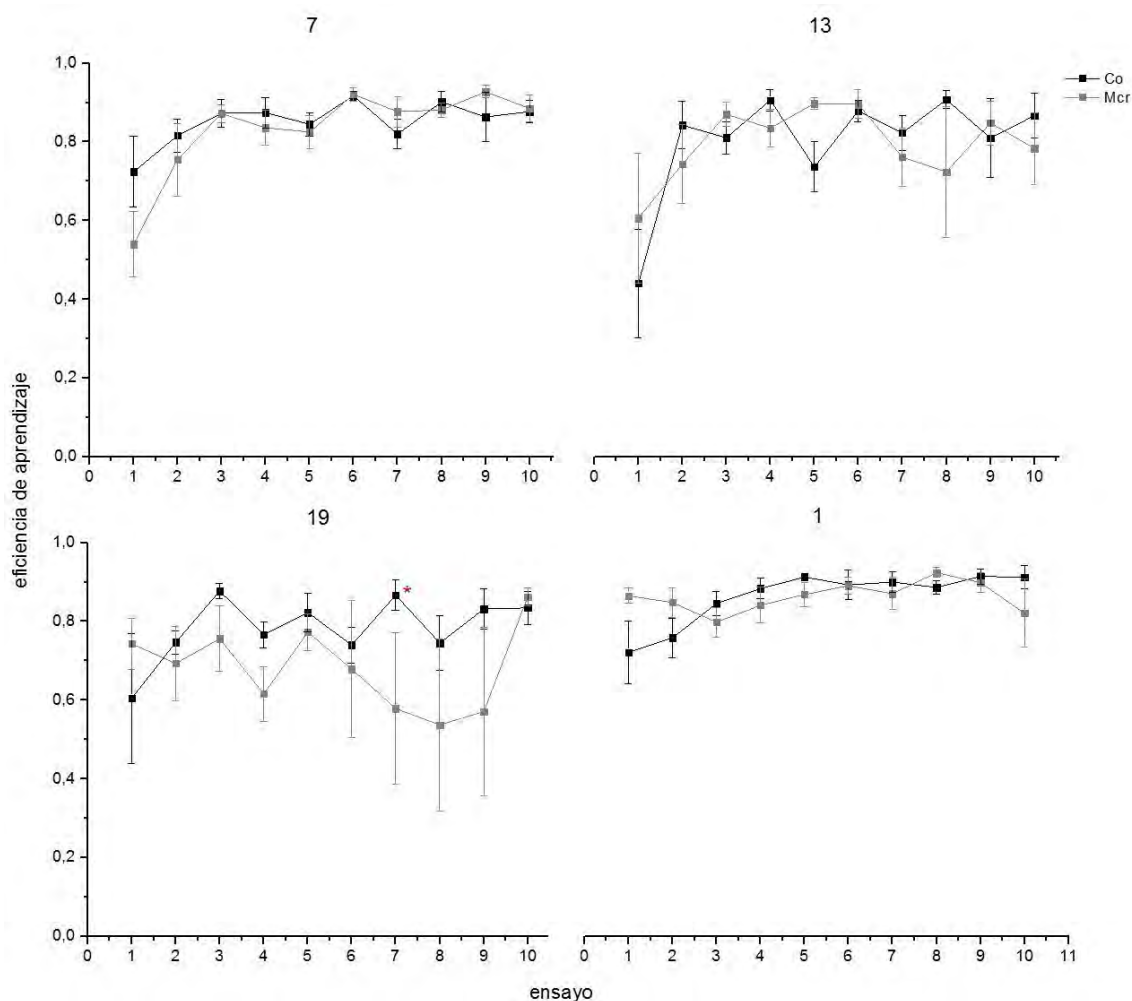


FIGURA 21. Eficiencia de aprendizaje (media  $\pm$ esm) de cada ensayo por subgrupo durante la segunda fase; las diferencias significativas se indican con \*. En el sentido de las manecillas del reloj, comenzando por la gráfica superior izquierda, se muestran los subgrupos Co7 vs Mcr7, Co13 vs Mcr13, Co1 vs Mcr1, Co19 vs Mcr19.

Tanto la distancia (FIGURA 22) como la velocidad (FIGURA 23) de nado durante la segunda etapa de ensayos se mantuvieron relativamente constante en todos los

subgrupos. La velocidad de nado se mantiene en un intervalo similar de valores que en el primer día. La distancia recorrida disminuye en comparación con el primer día, lo que es consecuente con las latencias de escape, implica que hay una retención de la información espacial que permite ubicar P con mayor eficiencia.

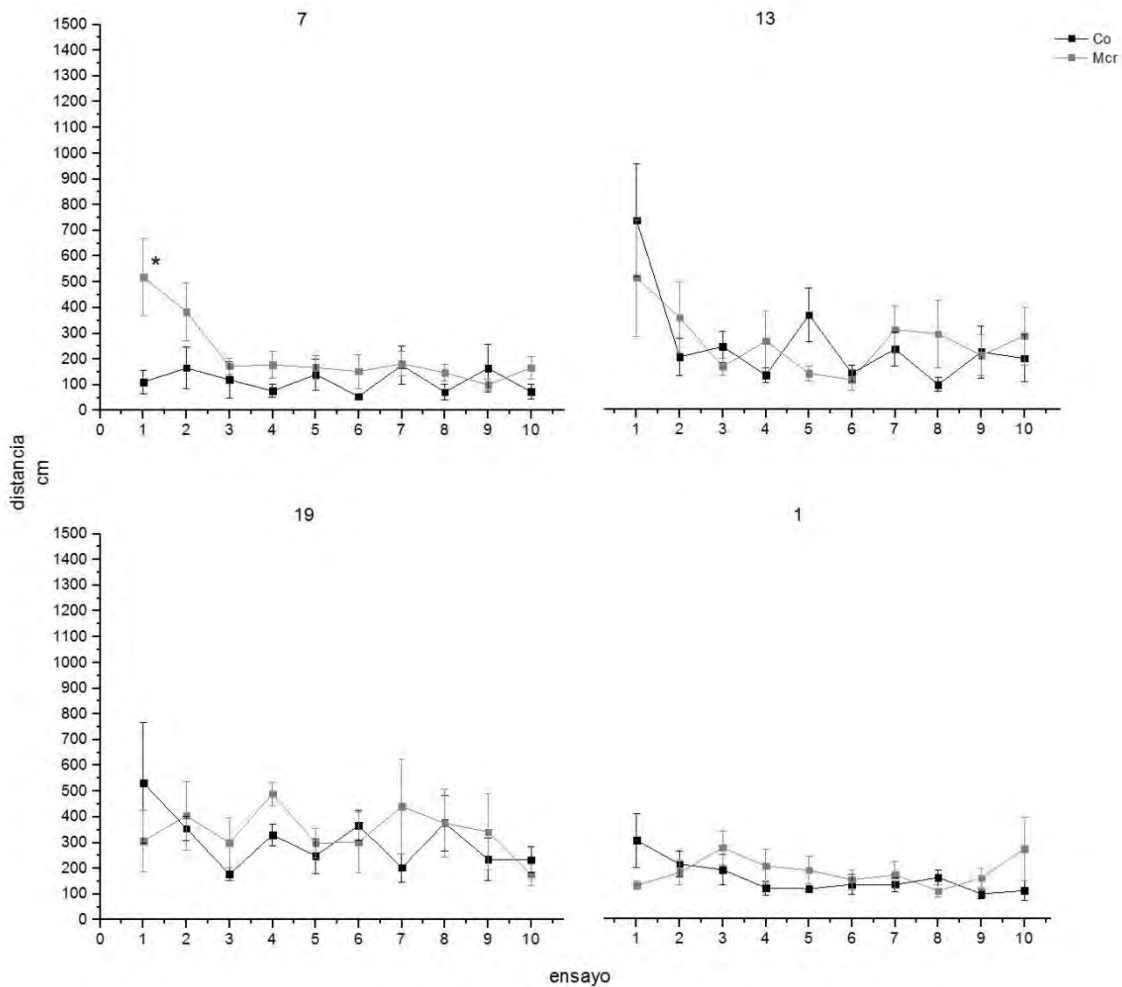


FIGURA 22. Distancia recorrida (media  $\pm$ esm) en los ensayos durante el día 2 por subgrupo; las diferencias significativas se indican con \*. En el sentido de las manecillas del reloj, comenzando por la gráfica superior izquierda, se muestran los subgrupos Co7 vs Mcr7, Co13 vs Mcr13, Co1 vs Mcr1, Co19 vs Mcr19.

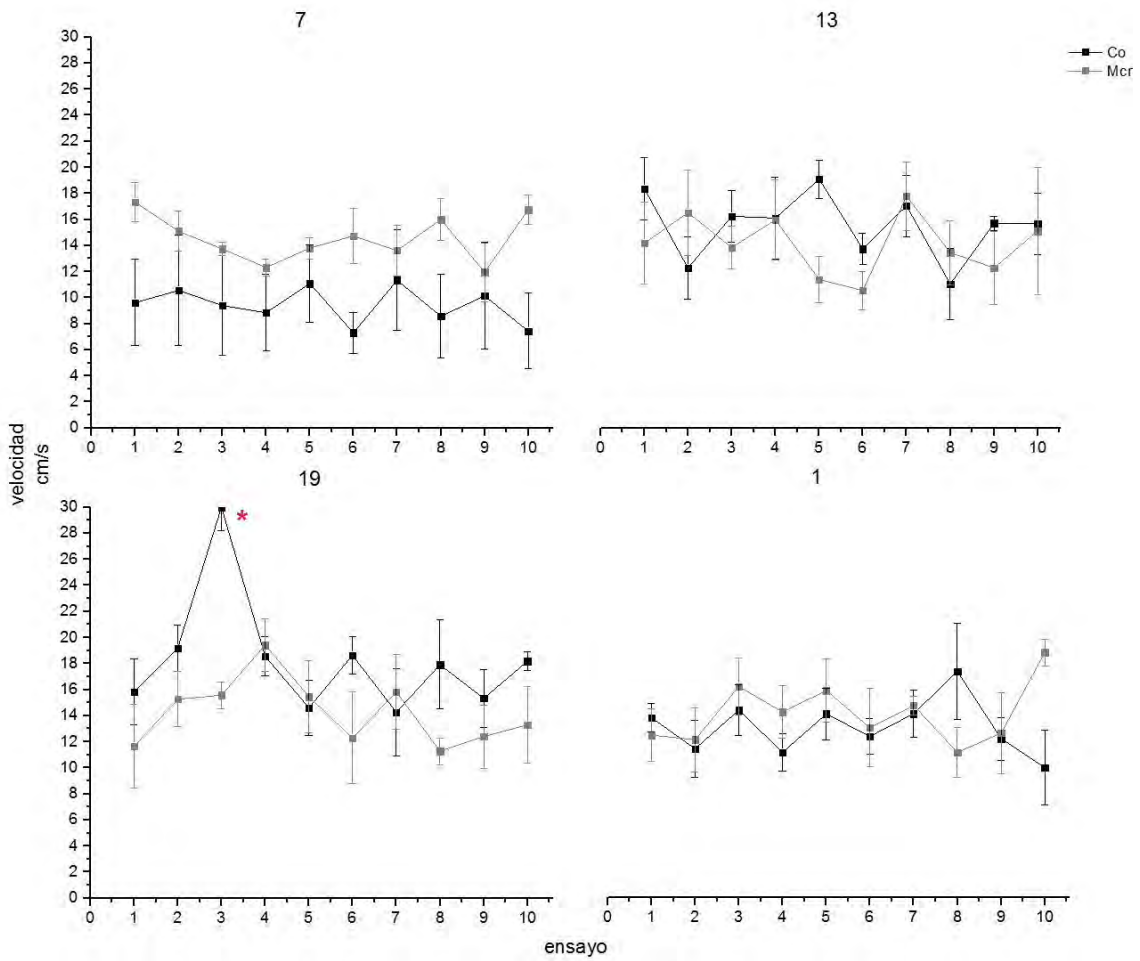


FIGURA 23. Velocidad de nado (media  $\pm$ esm) de cada ensayo por subgrupo durante la segunda fase; las diferencias significativas se indican con \*. En el sentido de las manecillas del reloj, comenzando por la gráfica superior izquierda, se muestran los subgrupos Co7 vs Mcr7, Co13 vs Mcr13, Co1 vs Mcr1, Co19 vs Mcr19.

*Comparación de la eficiencia de aprendizaje entre subgrupos durante los ensayos.*

*Etapas 1 y 2*

A partir de una prueba post hoc Fisher's LSD realizada a los datos de latencia de escape para cada ensayo por subgrupo (TABLAS 3-17) se encontró que existen más diferencias entre ensayos entre los subgrupos Mcr que entre los Co. Para los Co se encuentran diferencias significativas principalmente en el día 1, durante los primeros ensayos, entre el horario 7 con 1 y 19 con 1. Los organismos Mcr presentan más diferencias significativas durante la primera etapa de ensayos que en la segunda.

c	d	e		7	13	19	1
co	1	1	7				.
			13				
			19				.
			1				

TABLA 3.

c	d	e		7	13	19	1
co	1	3	7				.
			13				
			19				
			1				

TABLA 4.

c	d	e		7	13	19	1
co	1	8	7				
			13				
			19				.
			1				

TABLA 5.

c	d	e		7	13	19	1
co	2	1	7		.		
			13				.
			19				
			1				

TABLA 6.

c	d	e		7	13	19	1
mcr	1	1	7				
			13				.
			19				
			1				

TABLA 7.

c	d	e		7	13	19	1
mcr	1	2	7				
			13				.
			19				
			1				

TABLA 8.

c	d	e		7	13	19	1
mcr	1	5	7				
			13				
			19				.
			1				

TABLA 9.

c	d	e		7	13	19	1
mcr	1	7	7		.	.	.
			13			.	.
			19				.
			1				

TABLA 10.

c	d	e		7	13	19	1
mcr	1	8	7			.	.
			13			.	.
			19				.
			1				

TABLA 11.

c	d	e		7	13	19	1
mcr	1	9	7		.	.	.
			13			.	.
			19				.
			1				

TABLA 12.

c	d	e		7	13	19	1
mcr	1	10	7			.	.
			13			.	.
			19				.
			1				

TABLA 13.

c	d	e		7	13	19	1
mcr	2	1	7			.	.
			13				.
			19				
			1				

TABLA 14.

c	d	e		7	13	19	1
mcr	2	7	7			.	.
			13				.
			19				
			1				

TABLA 15.

c	d	e		7	13	19	1
mcr	2	8	7			.	.
			13				.
			19				
			1				

TABLA 16.

c	d	e		7	13	19	1
mcr	2	9	7			.	
			13			.	
			19				.
			1				

TABLA 17.

TABLAS 3-17. Matrices en las que se muestran las diferencias significativas entre los subgrupos para cada ensayo, los ensayos en los que no se encontraron diferencias significativas no se presentan.

Memoria a corto y largo plazo, pruebas 1 y 2, dp56 y dp62

Para determinar la memoria a corto y largo plazo se realizaron dos pruebas, la primera al finalizar la segunda etapa de ensayos, el dp56 y la segunda 7 días después, el dp62.

Ambos grupos pasaron más tiempo explorando el cuadrante 4 durante la primera prueba (FIGURA 24). En general, en la primera prueba, el grupo Co pasó más tiempo explorando el cuadrante 4 que el grupo Mcr (FIGURA 24). En la segunda prueba Mcr13 pasó significativamente más tiempo en 4 que Co13. Los grupos Co7 y Mcr7 pasaron el mismo tiempo en 4 y los grupos Co19 y Co1 pasaron más tiempo en 4 que los Mcr19 y Co19 respectivamente.



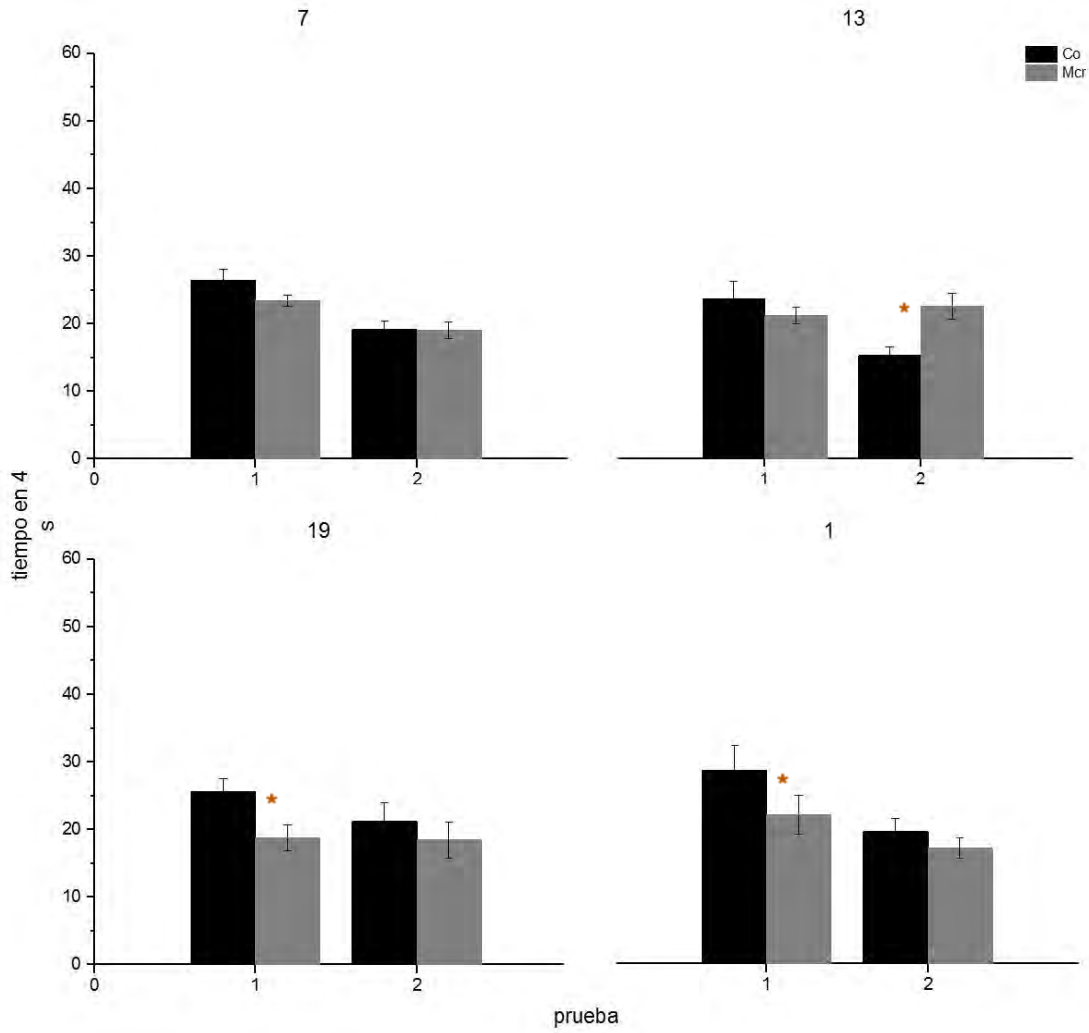


FIGURA 24. Tiempo explorando el cuadrante 4 (media  $\pm$ esm) de las pruebas por subgrupo; las diferencias significativas están marcadas con \*. En el sentido de las manecillas del reloj, comenzando por la gráfica superior izquierda, se muestran los subgrupos Co7 vs Mcr7, Co13 vs Mcr13, Co1 vs Mcr1, Co19 vs Mcr19.

Prueba 1		
	Co	Mcr
mesor	26.9	21.54
amplitud	-	-
acrofase	-	-
valor p	-	-
% ritmo	-	-

TABLA 18. Prueba Cosinor realizada al tiempo de permanencia en 4 de la prueba 1.

Prueba 2		
	Co	Mcr
mesor	18.97	19.48
amplitud	-	-
acrofase	-	-
valor p	-	-
% ritmo	-	-

TABLA 19. Prueba de Cosinor realizada al tiempo en 4 de la prueba 2.

Al realizar un análisis de COSINOR a los datos obtenidos durante las pruebas 1 y 2 para cada grupo (TABLAS 18 Y 19), no se encontró un ritmo diario. Sin embargo, sí se encuentran diferencias entre los diferentes puntos temporales por grupo experimental.

#### Evaluación del ritmo de ingesta de agua

Se obtuvieron actogramas de la ingesta de agua para dos organismos Co y cuatro Mcr. Se presentan actogramas significativos para cada grupo (Co, FIGURA 25 y Mcr, FIGURA 26). Posteriormente se muestra el actograma de un organismo Mcr que inició el registro de ingesta de agua en el dp79 (FIGURA 27).

Los organismos Co de los que se obtuvo registro de ingesta de agua presentan la característica común de que a partir de la segunda prueba en el LAM (Tercera flecha verde marcada con MM, FIGURA 25) aparece un comportamiento de libre corrimiento (*free running*) que continúa al cambiar el tratamiento a oscuridad constante (O:O, FIGURA 25). Previo a la segunda prueba en el LAM la actividad de ingesta de agua está distribuida aparentemente a la mitad de la fase de luz y la mitad de la fase de oscuridad (FIGURAS 25 Y 28).

En los registros obtenidos a partir de la actividad de ingesta de agua de los organismos Mcr (FIGURA 26) se observa menor ingesta de agua que los organismos Co y un comportamiento similar a la primera parte de los Co, en la que la actividad de ingesta de agua está dividida entre la fase de luz y la de oscuridad (FIGURA 28). En este caso (fig. 26) no se observa un libre corrimiento como en los organismos Co, incluso al entrar en O:O. En esta etapa se observa una actividad que no se logró caracterizar.

En contraste, en el actograma obtenido para el organismo Mcr que inició el registro de ingesta de agua a partir del dp79 se observa un ritmo consolidado reservado a la fase oscura del ciclo (FIGURAS 27 Y 28).

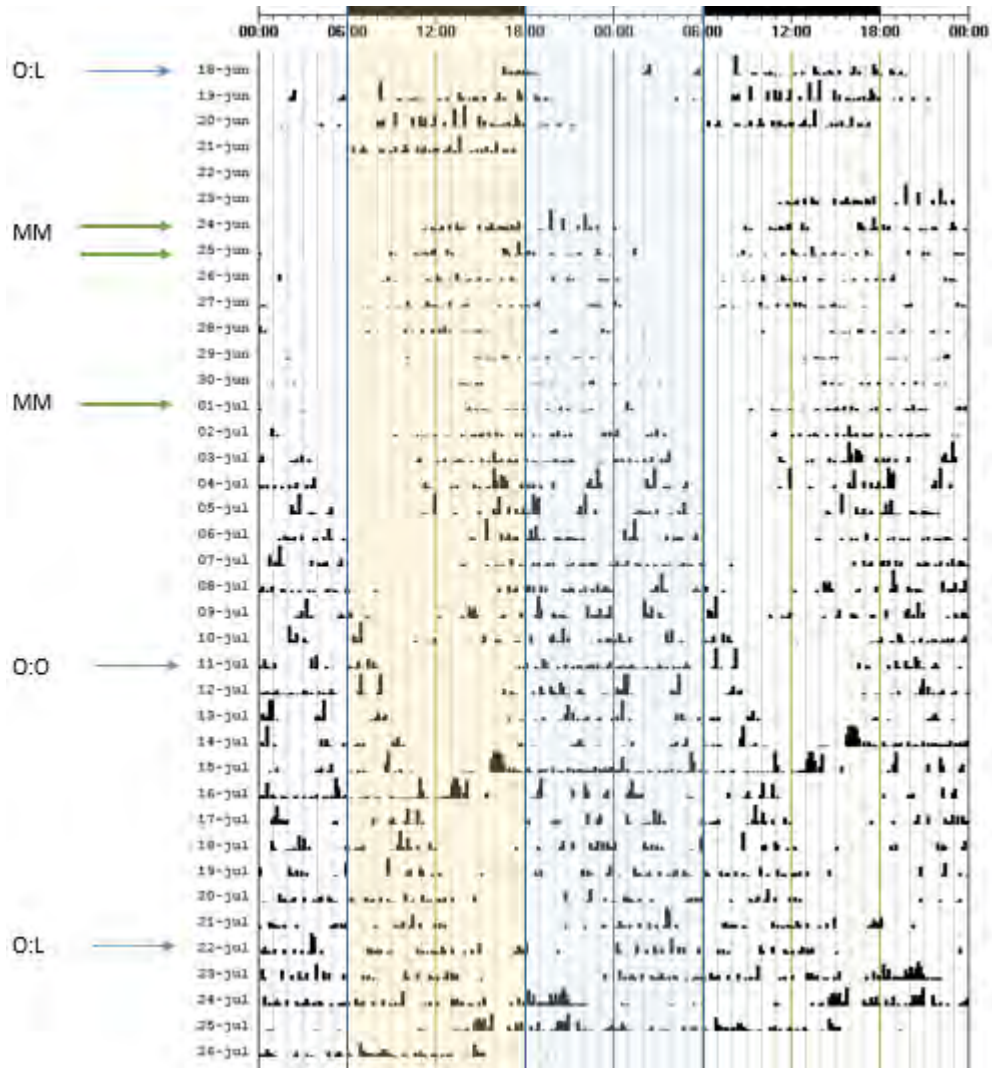


FIGURA 25. Actograma representativo de un organismo Co durante el protocolo de registro de ingesta de agua. MM representan los días en los que se realizaron las pruebas en el LAM.

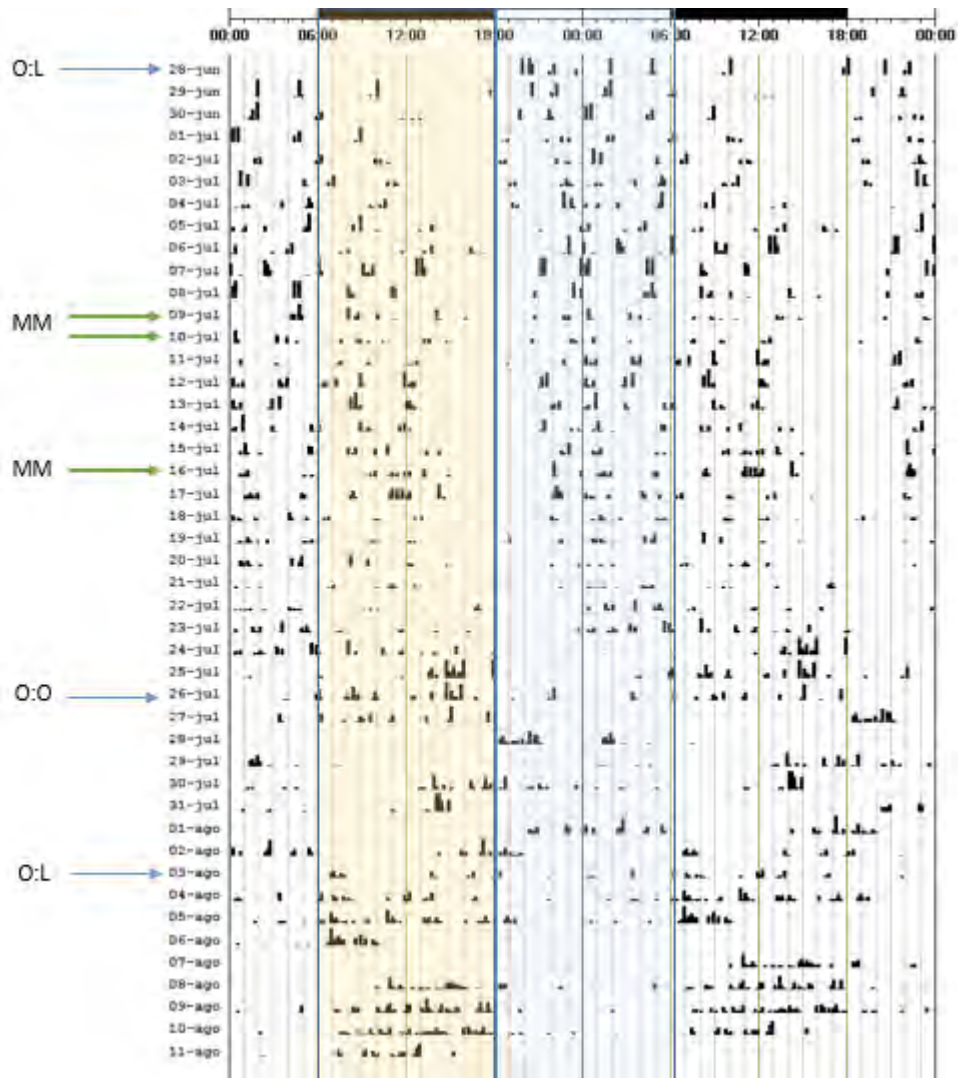


FIGURA 26. Actograma de un organismo Mcr durante el protocolo de registro de ingesta de agua. MM representan los días en los que se realizaron las pruebas en el LAM.

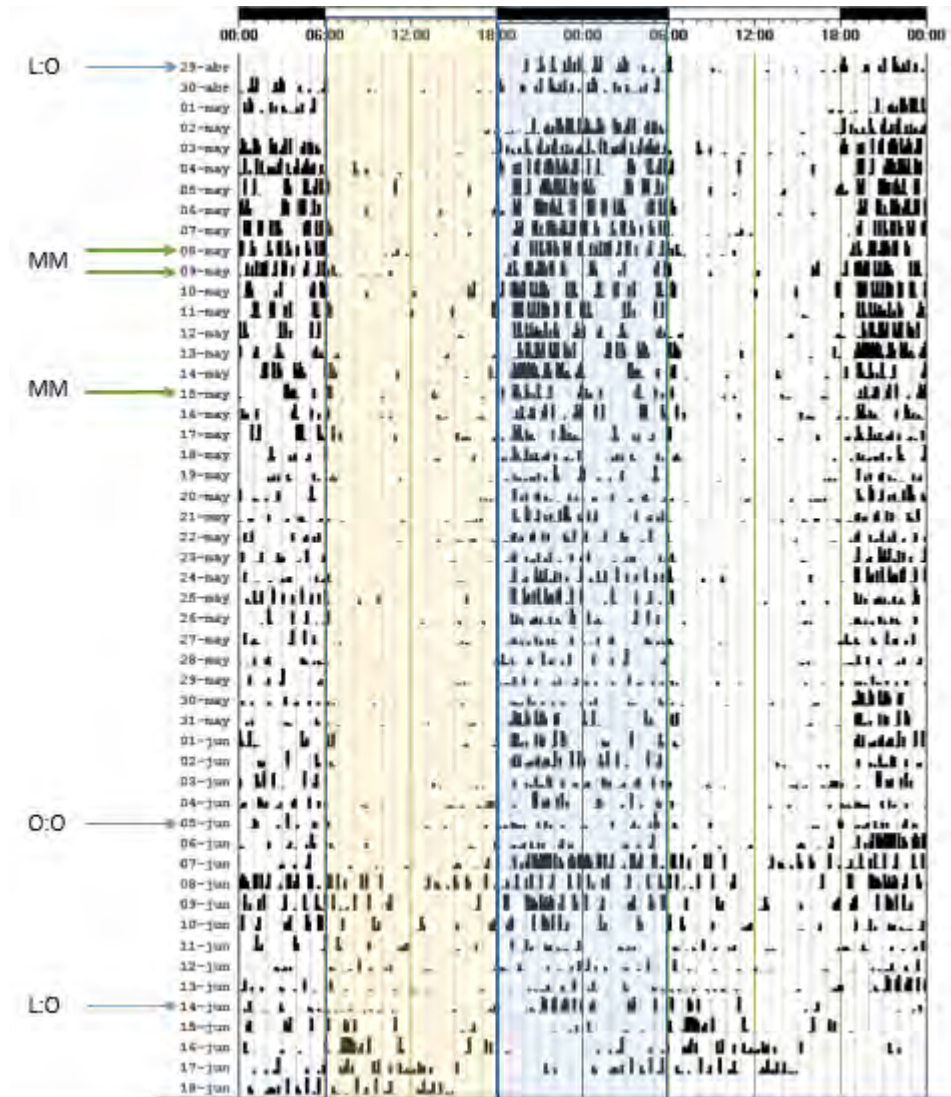


FIGURA 27. Actograma de un organismo Mcr durante el protocolo de registro de ingesta de agua. MM representan los días en los que se realizaron las pruebas en el LAM. El inicio del registro corresponde al dp79.

	$\alpha/\rho, O$	$\alpha/\rho, L$	$\alpha/\rho, L:O$
Co	1.4	1.3	1.4
Mcr	1.3	0.9	1.1

TABLA 20. Relación  $\alpha/\rho$  durante la etapa de L:O del registro de ingesta de agua de los grupos experimentales Co y Mcr. Se muestra la relación con respecto a la fase de iluminación y posteriormente con respecto a 24 horas (L:O).

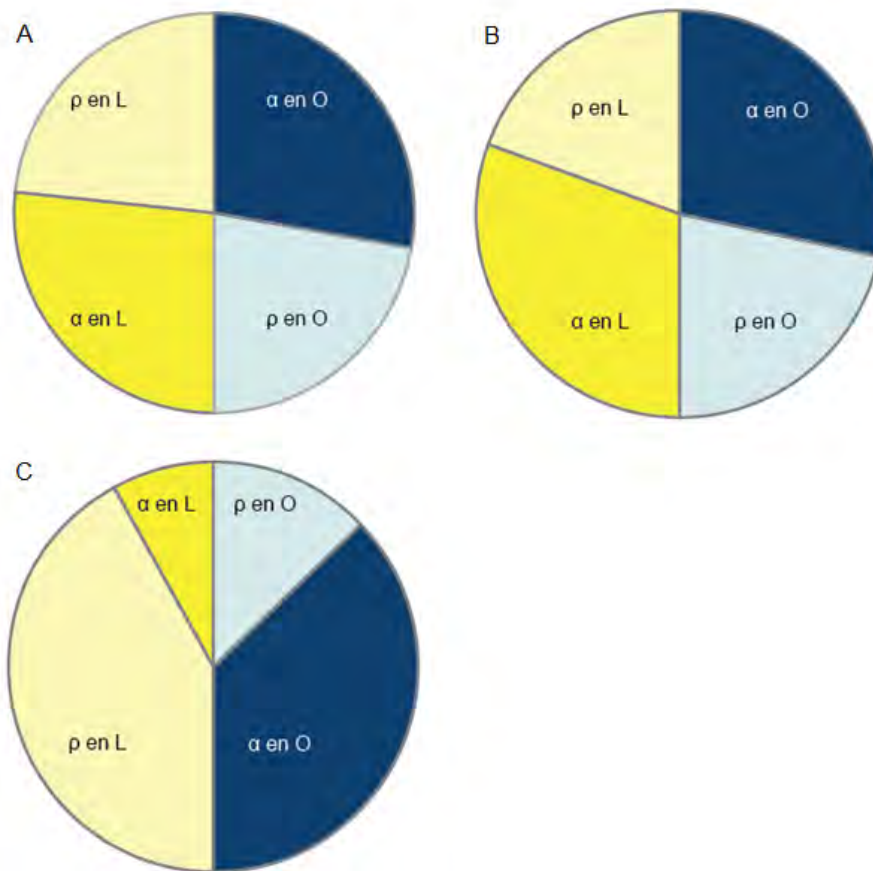


FIGURA 28. Representación gráfica del porcentaje de tiempo relativo a la fase de iluminación (amarillo Luz, azul Oscuridad, con proporción 12:12) de la relación  $\alpha/\rho$ , A. grupo Co, B. grupo Mcr y C. organismo Mcr en el que se realizó el registro de ingesta de agua a partir del dp79.

Al realizar un análisis estadístico a los registros de ingesta de agua no se encontró un periodo significativo entre 16 y 26 horas para los grupos Co y Mcr. Para el organismo Mcr que fue ingresó a registro de ingesta de agua en el dp79 se obtuvo un periodo de 24 horas.

## Discusión

### Peso

Se encontraron diferencias significativas en el peso ( $\text{media} \pm \text{sem}$ ) registrado en el dp55 entre los grupos Co y Mcr, siendo el primero mayor que el segundo en un 20%, lo que concuerda con lo reportado por Aguilar-Roblero y colaboradores (1997). El grupo Mcr presenta un error estándar sobre la media mayor al Co lo que significa que existen más diferencias entre los organismos Mcr.

### Evaluación del ritmo de aprendizaje espacial

#### *Proceso aprendizaje*

Existen diferencias en los procesos de atención, aprendizaje y memoria espacial entre los grupos Co y Mcr; el grupo Co manifiesta un aprendizaje más eficiente que el grupo Mcr en la primera etapa de los ensayos, tal como se ha reportado en estudios anteriores (Laus, *et al.*, 2011; Tonkiss, *et al.*, 1990b).

Para la primera etapa de ensayos, en el grupo Co, en general, se observó un proceso normal de atención y aprendizaje, reflejado en las curvas de adquisición en las gráficas de latencia de escape y eficiencia de aprendizaje; conforme los organismos realizaron los ensayos consecutivos, encontraron P de manera más eficiente. Se encontraron diferencias significativas en el ensayo 1 entre los subgrupos Co1-Co19 y Co1-7, Co1 con un valor menor al de los otros subgrupos (Figura 16). Valentinuzzi, *et al.* (2004) encontraron que los organismos analizados durante la fase de reposo presentan un valor menor en el primer ensayo que los que fueron analizados durante la fase de actividad; discuten que



esto se debe a una mayor motivación para explorar durante la fase activa, ya que los organismos no conocían la ubicación de P (versión de memoria de trabajo del LAM). En este estudio los organismos Co tienen una menor latencia de escape en el ensayo 1 durante su fase activa (punto 1). En la versión del LAM utilizada en este estudio, se colocó a los organismos durante 30 segundos sobre P antes de iniciar el primer ensayo, durante los cuales se les permitió hacer una exploración visual y olfativa del entorno. Es probable que de esta forma la exploración análoga a la reportada por Valentinuzzi y cols. (2004) se diera en los 30 segundos previos al primer ensayo, lo que se ve reflejado en una menor latencia de escape inicial. En cuanto a los ensayos posteriores, no se encuentran diferencias significativas relevantes entre los diferentes puntos temporales en el grupo Co. Se puede interpretar esto como un pico de atención en el punto 1, correspondiente a 19 horas después del encendido de luces, reflejado por los resultados del primer ensayo, que en ensayos posteriores son uniformes entre los grupos.

En los organismos Mcr7 y Mcr19 se observa un desempeño deficiente en la tarea, conforme realizan ensayos consecutivos, y no disminuyó significativamente la latencia. Los organismos Mcr13 y Mcr1 presentaron un desempeño más eficiente y uniforme. Esto se interpreta como mayores deficiencias en el desarrollo del SNC en el grupo Mcr, y en particular, en estructuras encargadas de modular los procesos de atención, memoria y regulación del sistema circadiano, tienen un desempeño deficiente en los puntos 7 y 19, correspondientes a una hora después del cambio de luces (7, una hora después del encendido de luces y 19, una hora después del apagado de luces).

Al comparar grupos experimentales entre sí, considerando el punto temporal en el que fueron realizados los ensayos, se encuentran mayores diferencias significativas entre el subgrupo Co19 y Mcr19, seguido por el subgrupo Co7 y el Mcr19. En cambio, los subgrupos Co13-Mcr13 y Co1-Mcr1 tuvieron un desempeño similar en los ensayos. Estos organismos tienen curvas de aprendizaje similares a las presentadas en estudios de organismos con ablación del hipocampo (Morris, *et al.*, 1984), lo que sugiere que el déficit en los procesos cognoscitivos de aprendizaje, atención y memoria espacial es exacerbado por efecto de la organización temporal de dichos procesos. Esto permite suponer una compleja relación entre el control circadiano de procesos fisiológicos subyacentes a los procesos cognoscitivos involucrados en el desempeño de la memoria espacial en el LAM.

El pico de atención y aprendizaje se presenta 7 horas después del apagado de luces, lo que corresponde a más de la mitad de la fase de oscuridad, que en este caso, esto corresponde con la fase de actividad de estos organismos. En el artículo de Valentinuzzi y colaboradores (2004) se argumenta que los organismos tuvieron aparentemente mejor desempeño en el LAM en la versión para memoria de trabajo en la fase de inactividad de los organismos; se presume que esto puede estar enmascarado por efecto de *time stamping* (Holloway, *et al.*, 1973a y 1973b), que se refiere a que los organismos presentan un mejor desempeño cuando las pruebas ocurren en la misma fase temporal que el entrenamiento, ya que los organismos para dicho estudio fueron sometidos a una etapa de entrenamiento durante la fase inactiva.

En general, el coeficiente de la eficiencia de aprendizaje (media  $\pm$ esm) para cada ensayo durante la primera etapa, muestra que el desempeño del grupo Co fue mejorando conforme se realizaban los ensayos consecutivos, acercándose al valor 1. En el subgrupo Mcr 19 se observa como a partir del ensayo 1 al 6 aumenta el valor del coeficiente, pero del 7 al 10 disminuye nuevamente. Los valores del error estándar de la media son más grandes como para poder hablar con seguridad de un patrón, pero pareciera que al principio los organismos prestan atención a la tarea y aprenden pero pierden interés a partir del ensayo 7, probablemente buscando un escape de la tina. El comportamiento de nado alrededor de la orilla de la tina buscando escapar del contexto ha sido reportado tanto en organismos malnutridos (Fukuda, *et al.*, 2002) como en organismos que fueron sometidos a las pruebas durante la etapa inactiva de su ciclo (Valentinuzzi, *et al.*, 2004).

El grupo Mcr se comportó con mayor similitud al grupo Co durante la segunda etapa de los ensayos, lo que implicaría que estos organismos son capaces de consolidar y retener la información; sin embargo el proceso de adquisición es diferente. Esto concuerda con lo que se ha reportado en la literatura hasta el momento. Dicho comportamiento se ha atribuido a la plasticidad cerebral que compensa las deficiencias citoarquitectónicas encontradas en organismos que fueron sometidos a MPP (Tonkiss, *et al.*, 1993; Valentinuzzi, *et al.*, 2004; Partadiredja, *et al.*, 2011).

A partir de pruebas realizadas en una versión del LAM, Valentinuzzi y colaboradores (2004) concluyen que existe una modulación temporal en la

memoria de trabajo y otros procesos cognoscitivos mediados por el hipocampo. Las pruebas realizadas difieren en muchos sentidos con las presentadas en este estudio. Diferencias que después del primer día de prueba desaparecen.

En general, los organismos de ambos grupos experimentales mostraron un nivel de estrés moderado al realizar la tarea, lo que les permitió mantener un estado de atención adecuado. Esto se infiere a partir de la velocidad de nado, que se mantiene con valores similares en los dos grupos y en el transcurso de las dos etapas de ensayos y pruebas. Esto también es un indicador de que no existe ninguna deficiencia motriz en los organismos que pudiera interferir con el desempeño en el LAM, por lo que se comprueba que los indicadores del proceso de aprendizaje son objetivos en cuanto a la capacidad física de los organismos.

La distancia que recorren los organismos es proporcional a la latencia de escape, por lo que presentan un patrón similar, ya que la velocidad es relativamente constante en los ensayos. Mayores distancias, tales como las observadas en la primera etapa de ensayos en los grupos Mcr7 y Mcr19, reflejan patrones de búsqueda menos eficientes, es decir una alteración en los procesos relacionados con la atención, el aprendizaje y la memoria espacial.

A partir de las pruebas estadísticas realizadas a los indicadores previamente mencionados sobre el comportamiento en el LAM, no fue posible concluir que exista un ritmo diario en los procesos cognoscitivos subyacentes al desempeño en el LAM. Se observaron diferencias significativas entre las horas del día en las que se realizaron los ensayos en la primera etapa, así como en las pruebas. En particular, durante la primera fase de ensayos, entre los subgrupos

Co7 - Mcr7 y Co19 - Mcr 19, la presencia de dichas diferencias significativas, pareciera que existe un efecto de la hora del día en los organismos fueron sometidos al LAM, en la que los organismos Co se desempeñan con mayor eficiencia que los Mcr durante los primeros ensayos, en las horas correspondientes a una hora después del encendido de luces y una hora antes del apagado, lo que corresponde con la fase de reposo que se ha reportado para esta especie. Sin embargo, al realizar análisis estadísticos no se encontró una relación entre los datos que determine la existencia de un ritmo.

La temperatura del agua en la tina se mantuvo a  $22 \pm 1$  ° C, de esta manera los organismos mantienen la motivación para realizar la actividad al tiempo que se evita la fatiga observada en altas temperaturas (observaciones en el laboratorio de Biología Animal Experimental, F. Ciencias, UNAM; Committee on Guidelines for the Use of Animals in Neuroscience and Behavioral Research, 2003). Al observar los patrones de velocidad, de distancia recorrida en ambas etapas de ensayos, así como la latencia de escape en el segundo día de ensayos, se descarta la posibilidad de que exista un efecto de hipotermia que esté enmascarando las diferencias observadas en la latencia de escape de la primera etapa de ensayos en los organismos Mcr que fueron sometidos a las pruebas a las 7 a.m., y que, efectivamente, se trate de un efecto de la MPP y el efecto temporal de la realización de la prueba.

Fukuda y colaboradores (2002) presentan resultados similares a los de este estudio: existen diferencias significativas entre los organismos Mcr y Co principalmente en la primera fase de ensayos y la primera prueba. Argumentan

que esto puede deberse a las alteraciones por la MPP al hipocampo, así como el reflejo de la respuesta emocional exacerbada en estos organismos, que también ha sido reportada, siendo más susceptibles a estímulos adversos, en este caso el agua y el contexto del LAM en general.

#### *Memoria a corto y largo plazo*

El grupo Mcr presentó menor retención de la información a corto plazo que el grupo Co; se observaron diferencias significativas entre Co19-Mcr19 y Co1-Mcr1. Coincidiendo con los resultados obtenidos por Morgane y colaboradores (1993; 2001).

En la prueba correspondiente a la memoria de largo plazo (dp62), se observa un desempeño similar en ambos grupos experimentales, que en general pasaron menos tiempo en el cuadrante 4 que el día 1, con excepción del Mcr 13, que pasó significativamente más tiempo que el subgrupo Co13 en el cuadrante 4.

Se puede decir que en cuanto a la retención y consolidación de la información, no existe un patrón claro de modulación temporal ni relacionada con el tratamiento de nutrición perinatal, lo que concuerda con lo reportado por Valentinuzzi y colaboradores (2004), así como Fukuda y colaboradores (2002). Sin embargo, en un estudio paralelo a éste (próximo a publicarse), realizado en machos (misma edad, mismas condiciones experimentales) se encontró un ritmo significativo de 24 horas en los organismos control durante las pruebas.

Tonkiss y colaboradores (1993), reportan un patrón de búsqueda más organizado en organismos adultos (dp120) que en jóvenes (dp30), tanto para

organismos control como malnutridos, en las pruebas en la versión de memoria espacial distal del LAM, por lo que es importante considerar también este factor como probable efecto que pudiera enmascarar los resultados obtenidos en las pruebas de este estudio.

En un trabajo anterior (Durán, P. *et al.*, 2011) realizado con machos, se reportó que existe un ritmo diario en procesos cognoscitivos para su grupo control, lo que coincide con un estudio paralelo a éste (próximo a publicarse), realizado en machos (misma edad, mismas condiciones experimentales). En cuanto al grupo Mcr, que corresponde al grupo Mc en el estudio de Durán y colaboradores (2011), coincide con este trabajo en que no se encontró un ritmo en estos procesos, a pesar de presentar ciertas diferencias entre los momentos del día en que se realizaron las tareas.

#### Evaluación del ritmo de ingesta de agua

Al evaluar los resultados del ritmo de ingesta de agua se observan anomalías, en particular en el grupo Co. Los dos organismos de los que se obtuvieron registros (FIGURA 25) aparentemente están en lo que parece libre corrimiento en condiciones de iluminación L:O. Se puede decir que esto comienza a partir de la exposición al LAM. Valentinuzzi, *et al.*, (2004; 2007) reportan que en su laboratorio se han registrado anomalías en la expresión del ritmo circadiano a partir de pruebas realizadas en el LAM. Por lo tanto es probable que los organismos del grupo Co estén manifestando un ritmo de ingesta de agua característico en el desarrollo (Aguilar-Roblero, *et al.*, 1997), que a su vez fue perturbado por la exposición al LAM.

Sin embargo en el grupo Mcr no se observa el efecto de *free running* a partir del LAM en un fotoperiodo L:O 12:12. Debido a problemas con el aparato de registro de ingesta de agua se perdió la información de algunos organismos, por lo que no se cuenta con la n necesaria para poder concluir sobre estos resultados. Es importante realizar estudios similares en el futuro.

En el organismo Mcr que fue sometido a registro de ingesta de agua en el dp79 se observa un ritmo circadiano consolidado, con un periodo de 24 horas. Esto se adjudica a la madurez del organismo. Estos resultados concuerdan con lo reportado por Aguilar-Roblero y colaboradores (1997), en los que no encuentran diferencias entre machos y hembras, y se observan resultados similares en organismos de la misma edad que los de este trabajo. El registro de dicho organismo se realizó hasta después del dp120. Aguilar-Roblero y colaboradores (1997) reportan que en el 70% de los organismos malnutridos de su estudio presenta un splitting. En este estudio no se logra observar esto, sin embargo, se trata de un único organismo, además el registro se detiene en el dp130.

Este estudio fue realizado con hembras juveniles en las que se determinó el estado de desarrollo hormonal a partir de inspección a simple vista de la apertura vaginal. Debido a la naturaleza de los registros de ingesta de agua, se infiere que es probable que, a pesar de no presentar apertura vaginal visible, la etapa puberal hubiera comenzado, lo que a su vez pudiera alterar su conducta, tanto en la evaluación de procesos cognoscitivos, como los del ritmo circadiano. Se cree que éste pudo haber sido un factor que pudiera estar enmascarando los resultados, en particular la evaluación de la ingesta de agua. Esta posibilidad se



ve reforzada por los resultados obtenidos en un estudio paralelo a éste (próximo a publicarse), realizado en machos (misma edad, mismas condiciones experimentales) se observa un ritmo circadiano de ingesta de agua consolidado, tanto en organismos control como en malnutridos. Las diferencias que se reportan entre ambos grupos experimentales son, que los malnutridos presentan un retraso al resincronizarse al ciclo de L:O después de O:O y que presentan una  $\alpha$  más elevada en la fase de luz, cuando se encuentran en L:O. Esto sugiere diferencias debidas al sexo de los organismos.

Ha sido reportado en la literatura, que en la cepa Sprague-Dawley existe apertura vaginal entre el dp32 al 34 (Lewis, E. M., *et. al.*, 2002). Por otro lado, se ha reportado que hormonas gonadales esteroides afectan los ritmos del comportamiento y la expresión de los genes reloj. En particular, Murphy y colaboradores (2013) determinaron la expresión de genes reloj en el NSQ y tejidos periféricos de ratas que presentan ciclos estrales normales, así como de organismos ovariectomizados. Se observó que el ciclo estral tiene efectos en la fase y la distribución de fase de la expresión de *per1-luc* en el NSQ. El pico de expresión de *per1-luc* se presentó en la fase oscura sin importar la fase del ciclo estral, mientras que en los organismos ovariectomizados este efecto fue eliminado. El tratamiento de explantes de tejido del NSQ con esteroides ováricos no afectó significativamente la expresión de *per1-luc*, lo que sugiere que otras regiones del cerebro, fuera del NSQ, son las encargadas de mediar los efectos fásicos de los esteroides. Sus datos muestran que la fase del ciclo estral tiene efectos dependientes del tejido en la fase de expresión *per1-luc*, además, de sincronía de

fase entre osciladores y en la relación de fase entre algunos relojes periféricos y el ciclo de luz-oscuridad. Así mismo, sugieren que la depleción hormonal esteroidea posterior a la ovariectomía afecta al sistema circadiano. Esto sugiere que, si los organismos que se utilizaron para este estudio presentaron fluctuaciones hormonales propias del inicio del ciclo estral, incluso durante la pubertad, es posible que todos los comportamientos rítmicos observados en este estudio hayan estado enmascarados por dicha falta de hormonas.

Es evidente que existe una relación entre el ritmo circadiano y los procesos de memoria y aprendizaje; sin embargo, es necesario explorar más a fondo cuál es la relación causal entre estos dos fenómenos, ya que se ha visto que los ritmos fisiológicos afectan la expresión del ritmo conductual cognoscitivo, así como que al alterar los ritmos circadianos, se altera también el desempeño en tareas en las que se evalúan procesos como la atención y la memoria.

Todas las pruebas se hicieron a las 7:00 y 13:00 horas, correspondientes a 19:00 y 1:00 horas subjetivas para los organismos a los que se les invirtió el ciclo de iluminación. Al observar los actogramas se concluye que el ritmo circadiano se encuentra alterado, por lo que se podría interpretar que esto a su vez podría afectar el desempeño en el LAM. Es importante considerar estos resultados para esclarecer efectos en futuras investigaciones.

## Conclusiones

- Existe una modulación temporal de los procesos de atención y aprendizaje. En los organismos con MPP es más pronunciado.
- A pesar del desempeño deficiente del grupo Mcr en la primera etapa de ensayos, logran consolidar y retener la información, lo que se ve reflejado en un desempeño uniforme en la segunda etapa de ensayos.
- El efecto de la modulación temporal de los procesos de atención y aprendizaje se extingue en la segunda etapa de ensayos. No se encuentran diferencias significativas entre los grupos experimentales en este momento.
- En las pruebas de la memoria a corto plazo existe mayor efecto del grupo experimental (desempeño de los organismos Co es mejor que el de los Mcr) y mayor efecto temporal que en la segunda prueba (diferencias en cuanto al punto temporal en el que fueron realizados).
- En cuanto a la memoria a largo plazo, no se encuentran diferencias significativas entre los grupos experimentales ni en cuanto al punto temporal.
- En la evaluación del ritmo circadiano de ingesta de agua se observan efectos ontológicos en su distribución, tanto en organismos Co como Mcr. Algunas características observadas, en particular en el grupo Co podrían estar enmascaradas por efectos del desarrollo hormonal o por efectos de la exposición a la evaluación de procesos cognoscitivos en el LAM durante el desarrollo y consolidación de dicho ritmo.

- Este estudio no arroja evidencias para concluir que existe una relación directa entre la modulación circadiana del patrón de ingesta de agua y procesos cognoscitivos relativos al desempeño en el LAM.

## Referencias bibliográficas

- AGUILAR-ROBLERO, R., A. Salazar-Juárez, J. Rojas-Castañeda, C. Escobar, L. Cintra. 1997. *Organization of circadian rhythmicity and suprachiasmatic nuclei in malnourished rats*. American Physiological Society. **97**: R1321-R1331.
- ALTMAN, J., G. Das, K. Sudarshan. 1970. *The influence of nutrition on a neural and behavioral development: I. Critical review of some data on the growth of the body and brain following dietary deprivation during gestation and lactation*. Developmental Psychobiology. **3**: 281-301.
- ASCHOFF, J. 1999. *Masking and parametric effects of high-frequency light-dark cycles*. Reviews of Japanese journals of physiology. **49**(1): 11-18.
- BENCA, R., M. J. Duncan, E. Frank, C. McClung, R. J. Nelson, A. Vicentic. 2009. *Review, Biological rhythms, higher brain function, and behavior: Gaps, opportunities, and challenges*. Brain Research Reviews. **62**: 57-70.
- BERSON, D. M. 2003. *Strange vision: ganglion cells as circadian photoreceptors*. Trends Neuroscience. **26** (6): 314-20.
- BLACKWELL, B. N., R. Q. Blackwell, T. T. S. Yu, Y. S. Weng, B. F. Chow. 1969. *Further studies on growth and feed utilization in progeny of underfed mothers*. Journal of Nutrition. **97**: 79-84.
- Comitee on Guidelines for the Use of Animals in Neuroscience and Behavioral Research, National Research Council. 2003. *Guidelines for the Care and*

*Use of Mammals in Neuroscience and Behavioral Research*. Washington, DC: The National Academies Press. 209 pp.

DAAN, S., C. Berde. 1978. *Two coupled oscillators: stimulations of the circadian pacemaker in mammalian activity rhythms*. J. Theor. Biol. **70**: 297-313.

DUNLAP, J., J. J. Loros y P. J. DeCoursey. 2004. *Cronobiology, Biological timekeeping*. Sinauer Associates, U.S.A. 382 pp.

DURÁN, P., M. Miranda – Anaya, M. de J. Romero – Sánchez, K. Mondragón – Soto, L. Granados – Rojas, L. Cintra. 2011. *Time-place learning is altered by perinatal low-protein malnutrition in the adult rat*. Nutritional Neuroscience. **14** (4): 145-150.

ECKEL – MAHAN, K. L., T. Phan, S. Han, H. Wang, G. C-K Chan, Z. S. Scheiner, D. R. Storm. 2008. *Circadian oscillation of hippocampal MAPK activity and cAMP: implications for memory persistence*. Nat. Neurosci. **11** (9): 1074-1082.

EINCHENBAUM, H. 2002. *The Cognitive Neuroscience of Memory, an Introduction*. Oxford University Press. 2a edición. 416 pp.

ESCOBAR, C. 2002. *Motivación y conducta; sus bases biológicas*. Revista Mexicana de Neurociencia. **3**(1): 63.

FUKUDA, M. T. H., A. L. Françolin-Silva, S. S. Almeida. 2002. *Early posnatal protein malnutrition affects learning and memory in the distal but not proximal cue version of the Morris water maze*. Behavioural Brain Research. **133**: 271-277.

- GLUCK, M. A., C. E. Myers. 2001. *Gateway to Memory: An Introduction to Neural Network Modeling of the Hippocampus and Learning (Issues in Clinical and Cognitive Neuropsychology)*. Massachusetts Institute of Technology. 448 pp.
- GOLOMBEK, D. A. 1997. *Cronobiología humana: en busca del tiempo perdido*. Fisiología de los ritmos biológicos. En: II Curso latinoamericano de Cronobiología (Memorias). Facultad de Ciencias. UNAM. Pp 273-285.
- HOLLOWAY, F.A., R. Wansley (1973a). *Multiple retention deficits at periodic intervals after active and passive avoidance*. Behavioral Biology **9**: 1-14.
- HOLLOWAY, F.A., R. Wansley (1973b). *Multiphasic retention deficits at periodic intervals after passive-avoidance learning*. Science **180**: 208-210.
- JAGOTA, A., H. O. de la Iglesia, W. J. Schwartz. 2000. *Morning and evening circadian oscillations in the suprachiasmatic nucleus in vitro*. Nature Neuroscience. **3**: 372-376.
- KLEIN, D. C., R. Y. Moore, S. M. Reppert. 1991. *Suprachiasmatic Nucleus: The mind's clock*. Oxford University Press. 467 pp.
- LAUS, M. F., L. Duarte Manhas Ferreira Vales, T. M. Braga Costa, S. Sousa Almeida. 2011. *Review, Early postnatal protein-calorie malnutrition and cognition: a review of human and animal studies*. International Journal of Environmental Research and Public Health. **8**: 590-612.

- LEVITSKY, D. A. 1975. *Malnutrition and animal models of cognitive development*.  
En: Serban G., ed. *Nutrition and Mental Function*. New York Plenum Press.  
Pp. 75-89.
- LEWIS, E., M., J. F. Barnett, L. Freshwater, A. M. Hoberman, M. S. Christian.  
2002. *Sexual Maturation Data for CRL Sprague-Dawley Rats: Criteria and  
Confounding Factors*. *Drug and Chemical Toxicology*. **25**: 437-458.
- MORGANE P. J., R. Austin-LaFrance, J. Bronzino, J. Tonkiss, S. Díaz-Cintra, L.  
Cintra, T. Kemper, J. Galler. 1993. *Prenatal Malnutrition and Development  
of the Brain*. *Neuroscience and behavioral reviews*. **17**: 91-128.
- MORGANE P. J., D. J. Mokler, J. R. Galler. 2002. *Effects of prenatal protein  
malnutrition on the hippocampal formation, Review*. *Neuroscience and  
Biobehavioral Reviews*. **26**: 471-483.
- MORRIS, R. 1984. *Developments of a water-maze procedure for studying spatial  
learning in the rat*. *Journal of Neuroscience Methods*. **11**: 47-60.
- MURPHY, Z. C., P. Pezuk, M. Menaker, M. T. Sellix. 2013. *Effects of Ovarian  
Hormones on Internal Circadian Organization in Rats*. *Biology of  
Reproduction*. **89**(2): 35, 1-9.
- OMS. Organización Mundial de la Salud. 2014. *Nutrición*.  
[www.who.int/topics/nutrition/es/](http://www.who.int/topics/nutrition/es/)
- PARTADIREDDA, G., K. S. Bedi. 2011. *Mice undernourished before, but not after,  
weaning perform better in motor coordination and spatial learning  
tasks than well-fed controls*. *Nutritional Neuroscience*. **14**(4): 129-137.



- PERREAU – LAENZ, S., P. Pever, R. M. Buijs, A. Kalsbeek. 2004. *The biological clock: The bodyguard of temporal homeostasis*. Chronobiology International. **21**(1): 1-25.
- PITTENDRIGH, C. S., S. Daan. 1976. *A functional analysis of circadian pacemakers in nocturnal rodents. V. Pacemaker structure: a clock for all seasons*. J. Comp. Physiol. **106**: 333-335.
- PURVES, D., G. J. Augustine, D. Fitzpatrick, W. C. Hall, A. S. LaMantia, J. O. McNamara, S. M. Williams, eds. 2004. *Neuroscience*. Sinauer Associates. 3a edición. 770 pp.
- SCOTT, J. P. 1979. *Critical periods in organizational processes*. En: Falkner, F., Tanner, J. eds. *Human Growth*. Vol. 3. Neurobiology. New York. Plenum Press. Pp 223-241.
- SSA (Secretaría de Salud de México). 2011.
- INSP (Instituto Nacional de Salud Pública). Olaiz-Fernández G., Rivera-Dommarco J., Shamah-Levy T., Rojas R., Villalpando-Hernández S., Hernández-Avila M., Sepúlveda-Amor J. E., eds. 2006. *Encuesta Nacional de Salud y Nutrición*.
- TONKISS, J., J. R. Galler, R. N. Formica, B. Shukitt-Hale, R. R. Timm. 1990a. *Fetal protein malnutrition impairs acquisition of a DRL task in adult rats*. Physiological Behavior. **48**: 73-77.
- TONKISS, J. J. R. Galler. 1990b. *Prenatal protein malnutrition and working memory performance in adult rats*. Behavioral Brain Research. **40**: 95-107.

- TONKISS, J., P. Schultz, J. R. Galler. 1993. *An Analysis of Spatial Navigation in Prenatally Protein Malnourished Rats*. *Physiology and Behavior*. **55**(2): 217-224.
- VALENTINUZZI, V. S., L. Menna-Barreto, G. F. Xavier. 2004. Effect of Circadian Phase on Performance of Rats in the Morris Water Maze Task. *Journal of Biological Rhythms*. **19**(4): 312-324.
- VALENTINUZZI, V. S., G. P. Diniz, L. Menna-Barreto, G. F. Xavier. 2007. *The experience in the water maze task can affect the circadian rhythm of locomotor activity*. *Biological Rhythm Research*. **38**(6): 399-414.
- VAN GELDER, N. M. 1984. *Malnutrition, cerebral stability and intelligence*. *Microscopy electron biol. Cell*. **9**:227-243.
- YAMAZAKI, S., M. Straume. 2002. *Effect of aging on central and peripheral mammalian clock*. *Neurobiology*. **99**(16): 10801-10806.