



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

“DESARROLLO DE UNA PRUEBA CONDUCTUAL
PARA EL ESTUDIO DE DISTINTOS TIPOS
DE APRENDIZAJE PERINATALEN EL CONEJO
DOMÉSTICO (*Oryctolagus cuniculus*)”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
B I Ó L O G A
P R E S E N T A :

MARÍA CRISTINA TELLO RAMOS

TUTORA
DRA. ROBYN ELIZABETH HUDSON

2008



FACULTAD DE CIENCIAS
UNAM



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

<p>1. Datos del alumno Tello Ramos María Cristina 56 80 06 14 Universidad Nacional Autónoma de México Facultad de Ciencias Biología 401052853</p>
<p>2. Datos del tutor Dra. Robyn Elizabeth Hudson</p>
<p>3. Datos del sinodal 1 Dra. Margarita Martínez Gómez</p>
<p>4. Datos del sinodal 2 Dr. Gabriel Roldán Roldán</p>
<p>5. Datos del sinodal 3 Dr. Carlos Alberto Lara Rodríguez</p>
<p>6. Datos del sinodal 4 Dr. Amando Bautista Ortega</p>
<p>7. Datos del trabajo escrito Desarrollo de una prueba conductual para el estudio de distintos tipos de aprendizaje perinatal en el conejo doméstico (<u>Oryctolagus cuniculus</u>) 73 p 2008</p>

A Oni

AGRADECIMIENTOS

A mi directora de tesis la Dra. Robyn Hudson por todo el apoyo y los sabios consejos.

A los miembros del jurado Dra. Margarita Martínez-Gómez, Dr. Gabriel Roldán Roldán, Dr. Carlos Lara y Dr. Amando Bautista por su tiempo y las oportunas sugerencias.

Al Dr. Hans Distel por compartir su experiencia.

A los integrantes del Laboratorio de Psicobiología del Desarrollo del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM por la ayuda y amistad, principalmente a la Técnica Académica Carolina Rojas Castañeda por su excelente asistencia técnica y a la Dra. Ivette Caldelas por las palabras compartidas.

Al Lic. Eduardo Tello por su arte.

A PAPIIT IN200203-3 por el apoyo económico.

“Los sentimientos más tiernos y las ideas más sucias quedaban al descubierto ante aquella pequeña y ávida nariz, que aún no era una nariz de verdad, sino sólo un botón, un órgano minúsculo y agujerado que no paraba de retorcerse, esponjarse y temblar.” (Süskind, 1985)

Índice

RESUMEN	i
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Aprendizaje	1
1.2 Aprendizaje de olores durante el desarrollo	3
1.3 El conejo como modelo para el estudio de aprendizaje de olores durante el desarrollo temprano	6
2. OBJETIVO	13
3. PREDICCIONES	13
4. METODOLOGÍA GENERAL	14
4.1 Animales	14
4.2 Diseño experimental	15
4.3 Estímulos olfatorios	17
4.4 Condicionamiento clásico postnatal	18
4.5 Aprendizaje incidental prenatal	18
4.6 Análisis de la conducta	19
4.7 Análisis de datos	22
5. ARENA DE PRUEBA: PROTOTIPO 1	23
5.1 Diseño de la arena	23
5.2 Procedimiento experimental	24
5.3 Análisis de la conducta	25
5.4 Resultados	26
5.5 Discusión	29
6. ARENA DE PRUEBA: PROTOTIPO 2	31
6.1 Diseño de la arena	31
6.2 Procedimiento experimental	32
6.3 Análisis de la conducta	34
6.4 Resultados	35

6.5	Discusión	42
7.	ARENA FINAL	43
7.1	Diseño de la arena	43
7.2	Procedimiento experimental	44
7.3	Análisis de la conducta	47
7.4	Resultados	47
7.5	Discusión	53
8.	DISCUSIÓN GENERAL	56
9.	REFERENCIAS	59
10.	ANEXOS	66

RESUMEN

Las crías neonatas del conejo doméstico presentan una oportunidad especial para el estudio comparativo de las conductas que son resultado de dos tipos diferentes de aprendizaje de olores; el aprendizaje asociativo y el aprendizaje incidental. En estudios previos, se han condicionado gazapos a presentar la conducta estereotipada de búsqueda de pezón al aparear el evento de amamantamiento con un olor particular. Por otro lado, se ha observado que, dentro de una arena, los gazapos se orientan hacia el mismo olor del alimento que la madre consumió durante la gestación de éstos.

Debido a que en estudios previos no se han puesto a prueba los dos tipos de aprendizaje dentro de una sola arena, el presente trabajo buscó desarrollar una arena experimental que permitiera el análisis conductual tanto del condicionamiento clásico como del aprendizaje incidental de odorantes. El desarrollo de dicha arena fue paulatino, dando como resultado dos arenas prototipo, que permitieron finalmente la construcción de una tercera arena de prueba más adecuada.

Para poner a prueba el aprendizaje asociativo, un grupo de gazapos fue amamantado durante tres días consecutivos por una hembra lactante cuyo vientre había sido previamente perfumado ya sea con la colonia Chanel N° 5 o con extracto de comino. Por otra parte, los olores que se utilizaron para el aprendizaje incidental (tratamiento prenatal) fueron los terpenos de naranja y el comino, los cuales se incluyeron en la dieta de las madres gestantes a partir de la 3ª semana de gestación.

Las dos arenas prototipo fueron descartadas después de que los distintos grupos experimentales no mostraron diferencias en la media del tiempo y de las frecuencias en las que los gazapos realizaban las conductas registradas tanto del lado de la arena con el olor experimental, como del lado sin olor. Sin embargo, en la arena final se pudo observar que los gazapos que fueron condicionados pasaron significativamente más tiempo en el lado de la arena con el olor experimental y que sólo realizaron la conducta estereotipada de búsqueda de pezón en ese lado. Por su parte, los grupos

control y prenatal no pasaron significativamente más tiempo de un lado que del otro de la arena.

Finalmente se concluyó que dado que los contextos en los que se da el condicionamiento clásico y el aprendizaje incidental son fundamentalmente diferentes e inclusive mutuamente excluyentes, las respuestas conductuales de estos no se pueden presentar bajo un mismo arreglo experimental.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Aprendizaje

El aprendizaje se puede entender como la generación de representaciones sensoriales internas duraderas que dependen de la experiencia, permitiendo que los sujetos sean capaces de obtener y al mismo tiempo usar, información del medio (Dudai 1990, Hudson 1999). Gracias a que los animales son capaces de retener esa información, su repertorio conductual puede ser modificado por la experiencia, dependiendo de la habilidad de aprendizaje que tenga cada individuo, haciendo del aprendizaje un mecanismo adaptativo de enorme importancia (Alcock 1998). El aprendizaje, incluso en etapas tempranas de desarrollo, resulta de gran utilidad para los animales, los cuales van generando a lo largo de sus vidas conductas cada vez más complejas que responden de mejor manera a las demandas del medio y a la historia de vida particular de cada individuo (Dudai 1990, Hudson *et al.* 1998, Kandel *et al.* 2001, Leahey y Haris 2001).

En estudios conductuales con crías neonatas se han observado conductas tan complejas como las vocalizaciones al momento de eclosionar en aves, o la búsqueda de pezón en crías de mamíferos. Dichas conductas permiten el estudio del aprendizaje en etapas tempranas del desarrollo de un individuo (Michel y Moore 1995). La impronta, por ejemplo, es una forma de aprendizaje en la cual los individuos que son expuestos a un estímulo, usualmente en las etapas tempranas de vida, forman una rápida asociación con éste y posteriormente pueden mostrar conductas sociales con estímulos similares al que estuvieron expuestos durante los primeros días de vida (Alcock 1998). Un ejemplo de impronta se presenta en los pinzones zebra macho (*Taeniopygia guttata*) criados en cautiverio y cuyas madres tenían el pico pintado de algún color en específico; al crecer y tener la misma oportunidad de cortejar tanto a hembras con el pico de diferente color que el de la madre como a machos con el pico del mismo color del de la madre, los pinzones prefirieron cortejar a los machos (Alcock 1998). Asimismo, se ha

demostrado que para algunas especies de aves existe incluso el aprendizaje prenatal tanto para odorantes como para estímulos auditivos (Malakoff 1999).

Independientemente de la etapa de desarrollo en la que se encuentre un individuo, se reconocen tres tipos principales de aprendizaje

1. **Aprendizaje no-asociativo**, en el cual los organismos se habitúan o se sensibilizan a un estímulo específico. La habituación es la disminución gradual de la respuesta que tiene un individuo a un estímulo después de que éste ha sido presentado una y otra vez. Por otra parte, la sensibilización es el aumento en la intensidad de la reacción que se produce ante un estímulo que ha sido presentado anteriormente (Dudai 1990, Liberman 2004).
2. **Aprendizaje asociativo**, en el cual los individuos detectan la posible relación que existe entre un evento relevante y una señal que lo anticipa, ya sea un estímulo o una acción (Leahey y Harris 2001), y se divide en condicionamiento clásico y condicionamiento operante, respectivamente. En términos generales, el condicionamiento clásico se puede definir como la asociación que se forma entre un estímulo condicionado (un estímulo que normalmente no provoca una respuesta reflejo) y una respuesta incondicionada (normalmente llamada reflejo, pues sólo se presenta ante un estímulo en específico), que posteriormente será nombrada como respuesta condicionada, es decir, que se forma una asociación entre dos estímulos, anteriormente inexistente. De esta manera, el individuo aprende la relación que existe entre dos eventos (Leahey y Harris 2001, Liberman 2004). El condicionamiento operante, por su parte, se produce cuando un evento importante sigue a una conducta del individuo, en lugar de a un estímulo, como sucede para el condicionamiento clásico. El resultado del condicionamiento operante es un cambio en la probabilidad de que se presente la conducta (Liberman 2004).

3. **Aprendizaje incidental**, en el cual los organismos adquieren la información sobre el medio al entrar en contacto con los estímulos de éste de forma contingente o dentro de una situación que no se puede definir (Dudai 1990). Se ha observado que tanto humanos, como otros animales, son capaces de adquirir información sobre el medio al encontrarse con estímulos que son captados de manera “incidental”. La palabra incidental se refiere a la ausencia de una situación que se pueda identificar de manera específica; sin embargo, al igual que en el aprendizaje asociativo, esa situación tiene una relevancia potencial (Dudai 1990). La respuesta conductual que se produce del aprendizaje incidental es de naturaleza latente, es decir, que no se presenta justo después del proceso de aprendizaje, sino cuando una situación tiene elementos similares a los que había cuando inicialmente se dio el aprendizaje. En estudios clásicos de Tolman y Honzik (1930, citado en Tarpy 2000), se observó que ratas que habían sido “familiarizadas” con un laberinto durante diez sesiones sin recibir una recompensa al recorrerlo, mostraron una mejora repentina después de tan sólo una sesión con recompensa, teniendo una media de errores incluso más baja que la de aquellos sujetos que fueron condicionados por medio de una recompensa desde el inicio del experimento (Tarpy 2000).

1.2. Aprendizaje de olores durante el desarrollo

Para muchas especies animales, el olfato juega un papel importante a lo largo de la vida ayudando a encontrar alimento, pareja sexual e incluso detectando predadores. Para las crías del salmón sockeye (*Oncorhynchus nerka*), por ejemplo, la impronta del olor del medio en el que eclosionan eventualmente les permitirá regresar al mismo lugar para reproducirse (Barinaga 1999). Asimismo, para muchas especies de mamíferos el olfato también tiene un papel importante, despertando no sólo respuestas fisiológicas, como la salivación que se produce ante el olor de comida, sino también de comportamiento en relación con los miembros de la misma

especie, permitiendo la interacción y comunicación entre éstos (Agosta 1992). Los conejos, por ejemplo, dependen de los olores que están presentes en las secreciones de glándulas cutáneas especializadas, en la orina o en las heces fecales, tanto para marcar su territorio, como para identificar la edad, rango social y estado físico de otros individuos (Mykytowycz 1968, Mykytowycz *et al.* 1984). Además, se ha observado que las crías de los mamíferos generalmente poseen la habilidad de asociar los olores específicos de diferentes contextos y posteriormente exhibir patrones conductuales distintivos en presencia de cada odorante aprendido (Schaal *et al.* 2002). Algunas crías neonatas dependen en gran parte del sentido del olfato, tanto para su sobrevivencia inmediata, es decir, su alimentación, como para la formación de relaciones duraderas con otros miembros de su especie, por ejemplo con la madre o los hermanos. Se ha visto por ejemplo, que las crías de las musarañas europeas (*Crocidura reussula*, *Crocidura leucodon*), muestran impronta al olor del individuo que las amamanta (ya sea la madre biológica o nodrizas) siguiendo el olor de éste incluso si proviene de un pedazo de tela que ha sido impregnado con ese olor (Alcock 1998). Los hurones adultos (*Mustela putonius*) dirigirán la conducta de búsqueda de manera más insistente hacia el odorante de la presa a la que fueron expuestos durante el tercer mes de vida (Rehn *et al.* 1986). En estudios con bebés humanos de 4 a 16 horas de nacidos, se observó que, 24 horas después de haber pareado un odorante cítrico con un masaje, orientaron preferentemente la cabeza al odorante cítrico que a un odorante floral nuevo (Schaal *et al.* 2002).

Dado que las crías de varias especies de mamíferos como las ratas, ratones, conejos, hurones e incluso humanos no sólo son capaces de percibir olores sino también aprenderlos, el estudio del aprendizaje puede aprovechar las etapas tempranas de la vida de esas especies (Hudson 1993a, Schaal *et al.* 2002). Asimismo, los odorantes también son estímulos que pueden condicionarse fácilmente en especies como ratas y conejos (Hudson 1985, Hudson y Distel 1986). Desde 1958 Ivanitskii (citado en Hudson 1985) demostró que las crías del conejo son capaces de responder de manera

condicionada a un odorante pareado con el evento del amamantamiento. En 1982 Pedersen y Blass encontraron que las crías de rata pueden condicionarse en el primer día de nacimiento para responder al odorante artificial de limón (citado en Hudson 1985).

El olfato también resulta conveniente en el estudio del aprendizaje perinatal, ya que existen evidencias de que varias especies animales aprenden olores, tanto postnatal como prenatalmente (Barinaga 1999, Hudson y Distel 1999, Malakoff 1999, Schaal *et al.* 2002). Se ha determinado que en comparación con otros sentidos, como la visión o el oído, el olfato se presenta más temprano dentro del desarrollo de varias especies de mamíferos (Gottlieb 1971). Por ejemplo, tanto estudios anatómicos como conductuales en infantes humanos preterminales sugieren que existe una sensibilidad química a odorantes a partir de la semana 28 de gestación (Hudson y Distel 1999), mientras que otros sentidos no se han desarrollado a tal grado aún después del nacimiento. De hecho, existen varios estudios que indican que el medio en el que los fetos se desarrollan es un medio oloroso (Beauchamp y Bartoshuk 1997, Schaal *et al.* 1995) que posteriormente ayudará al reconocimiento de odorantes que rodean el medio postnatal de un bebé. Hepper (1988; citado en Galef 2003) observó que al alimentar a ratas gestantes con ajo se aumentaba la preferencia postnatal de las crías al odorante de ajo. Para las ratas, así como para varias especies de mamíferos, especialmente para las crías altriciales, el sentido del olfato será esencial después del nacimiento (Hofer *et al.* 1976, Teicher y Blass 1977).

Por otra parte, el olfato proporciona una buena oportunidad para estudiar el aprendizaje incidental, ya que la mayoría de los olores se aprende de esta manera (Issanchou *et al.* 2002). En experimentos con humanos se ha determinado que el aprendizaje incidental de olores ayuda al reconocimiento de los olores que están presentes en la vida cotidiana de las personas. Durante un experimento en humanos se dejó que los sujetos realizaran diferentes tareas dentro de un cuarto que había sido ligeramente odorizado sin que los sujetos lo supieran. Después de un periodo de descanso

se les presentó una serie de imágenes de diferentes ambientes, incluyendo el salón en el que habían trabajado junto con 12 olores, entre los cuales estaba el olor al que habían sido expuestos y se les pidió que clasificaran qué olor correspondía de mejor manera con cada imagen. Se encontró que los sujetos asignaron una correspondencia más alta entre el olor y la imagen del cuarto en el que trabajaron, que los sujetos control, a los que no se les presentó el olor del cuarto (Degel y Köster 1999).

Ya que las crías de mamíferos potencialmente aprenden odorantes tanto por condicionamiento clásico como incidentalmente, el uso de odorantes para comparar los dos tipos de aprendizaje y sus consecuentes respuestas conductuales puede aprovecharse.

Sin embargo, el estudio conductual en crías neonatas de mamíferos presenta dificultades metodológicas, ya que sus capacidades sensoriales y conductuales son limitadas, por lo que es necesario utilizar pruebas que se adecuen a las capacidades especiales de los animales en desarrollo. Además, se deben buscar métodos que minimicen la perturbación de la relación madre-cría que normalmente se presenta cuando se experimenta con crías neonatas y que consecuentemente puede afectar los resultados.

En el presente estudio se exploran, de manera conductual, el aprendizaje asociativo (en forma de condicionamiento clásico) y el aprendizaje incidental de odorantes en gazapos (crías neonatas) del conejo doméstico *Oryctolagus cuniculus*.

1.3. El conejo como modelo para el estudio de aprendizaje de olores durante el desarrollo temprano

Durante la gestación la coneja (*Oryctolagus cuniculus*) excava una madriguera y la acondiciona con hojas de pasto, pelo del pecho y heces fecales (Hudson *et al.* 1996, González-Mariscal 2001). El parto es rápido, en tan solo 10 ó 15 minutos una coneja puede expulsar hasta 15 crías (Hudson y Distel 1998, Hudson 1999). En seguida del parto la coneja se va del nido y

no regresa sino hasta 24 horas después y sólo durante 3 a 5 minutos. Cuando la coneja entra al nido se pone sobre la camada y permanece quieta durante todo el evento de amamantamiento, sin proveer ningún cuidado o asistencia a los gazapos. El amamantamiento termina cuando la hembra de manera súbita, salta del nido, lo tapa y no vuelve hasta transcurridas otras 24 horas (Hudson y Distel 1998). Durante los pocos minutos que dura el amamantamiento, las crías deben buscar, encontrar, mamar y cambiar de pezón en varias ocasiones (Hudson y Distel 1983). El periodo de amamantamiento dura aproximadamente 26 días después del parto y da lugar al destete (Hudson *et al* 1996, Hudson y Disel 1998). Los gazapos empiezan a salir del nido entre el día 13 y el 18, pues ya pueden mantener una temperatura corporal estable y la coordinación locomotora ha mejorado (Hudson y Distel 1982, Distel y Hudson 1985). Después del destete la coneja no vuelve a asistir a sus crías en nada, por lo que éstas deberán alimentarse por sí solas (Bilko *et al.* 1994).

El estado físico en el que nacen los gazapos es inmaduro. Con excepción del olfato, el equilibrio y la percepción somatosensorial, los sentidos no están bien desarrollados (Hudson y Distel 1982). Los gazapos nacen sin pelo, con ojos y canales auditivos cerrados y con poca coordinación locomotora, aunque son capaces de desplazarse eficientemente, es decir, pueden orientarse y encontrar los pezones de la madre con rápidos movimientos de cuerpo y de cabeza (Hudson y Distel 1983, Coureaud y Schaal *et al.* 2000, Bautista *et al.* 2005). Durante las dos semanas siguientes a su nacimiento, las crías de conejo van desarrollando diversos reflejos como el digital, la geotaxia negativa y palpebral (que es el reflejo de cerrar los párpados ante un estímulo, ya sea visual o mecánico) (Hem 1987). Al mismo tiempo, les empieza a salir el pelo y los canales auditivos se van abriendo (Hudson y Distel 1982). Al séptimo día los gazapos empiezan a percibir la luz y se orientan por sonidos (Gottlieb 1971). Para el día 27 las crías han aumentado 12 veces su peso de nacimiento y finalmente son capaces de valerse por sí mismos (Hudson y Distel 1982, Distel y Hudson 1985).

En cada evento de amamantamiento, los gazapos beben hasta 25% de su propio peso, para lo cual deben ser capaces de localizar un pezón y beber de él, y durante los pocos minutos que la madre los visita, cambiar de pezón varias veces, al mismo tiempo que los hermanos hacen lo mismo. Se ha determinado que los gazapos dependen del olfato para localizar y succionar los pezones de la madre guiándose por el olor de la feromona de búsqueda de pezón que se encuentra en el vientre y la leche de la madre (Hudson y Distel 1983, 1984, Hudson *et al.* 1990, Keil *et al.* 1990, Schaal *et al.* 2003). Ante el olor de dicha feromona los gazapos presentan una conducta altamente estereotipada, en la que la cabeza del gazapo zigzaguea con movimientos cortos y rápidos mientras el hocico está en contacto con la piel del vientre de la madre y permite que el gazapo se prenda del pezón (Hudson y Distel 1983, Distel y Hudson 1985; Fig 1.1).

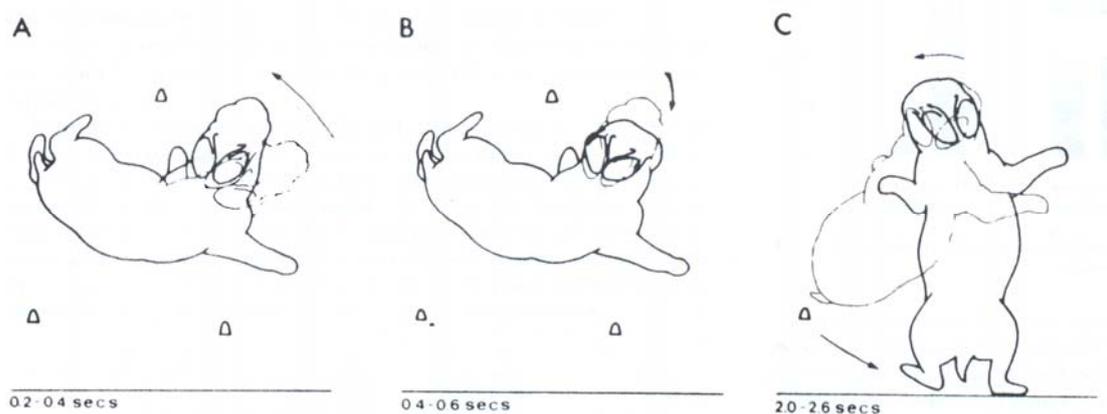


Fig. 1.1. Esquema del comportamiento de un gazapo con 4 días de edad encima del vientre de una coneja lactante. A: el gazapo mueve la cabeza de un lado a otro rápidamente con movimientos zigzagueantes, B: búsqueda en la piel de la hembra y C: el gazapo se prende del pezón y encoje el cuerpo. Imagen adaptada de Hudson y Distel 1983.

Asimismo, se ha determinado que los gazapos que nacen por cesárea y que no tienen ninguna experiencia de amamantamiento postnatal también presentan la conducta estereotipada de búsqueda de pezón cuando entran en contacto con una hembra lactante (Hudson 1985). En otros estudios, se encontró que gazapos anósmicos (ya sea por bulbectomía o exposición de sulfato de zinc en las fosas nasales) fueron completamente incapaces de prenderse de los pezones de una hembra lactante (Distel y Hudson 1985,

1987), estableciendo que los gazapos dependen completamente del olfato para localizar y poder mamar de los pezones. Posteriormente, los grupos de Hudson y Distel, y de Coureaud y Schaal probaron que los gazapos, con tan sólo un día de haber nacido, también son capaces de discriminar olfativamente a conespecíficos por medio de los odorantes emitidos por los vientres de éstos y consecuentemente mostrar una clara preferencia a las hembras lactantes (Hudson y Distel 1984, Hudson *et al.* 1990, Coureaud y Schaal 2000). Los resultados de estas investigaciones sugieren que la habilidad olfativa de los gazapos no sólo les permite amamantarse eficientemente sino también les permite discriminar los olores emitidos por conespecíficos, haciendo evidente la importancia que tiene el olfato en su vida.

Asimismo se sabe que los gazapos son capaces de aprender olores que están presentes durante el amamantamiento. Gazapos que fueron amamantados por hembras cuyos vientres habían sido previamente perfumados con un odorante artificial, rápidamente aprendieron a asociar el evento de amamantamiento con éste. Con tan sólo un evento de emparamiento de 3 minutos, los gazapos mostraron toda la secuencia conductual de búsqueda de pezón y de amamantamiento en el vientre de una coneja no lactante, e incluso, en el vientre de una gata que había sido perfumada con el odorante artificial (Hudson 1985, Hudson y Distel 1987, Kindermann *et al.* 1991, 1994). Así mismo, en estudios posteriores se sugirió, que el aprendizaje temprano de olores depende de un periodo sensible y que representa una forma de impronta olfativa (Hudson 1993b, Kindermann *et al.* 1994).

Además de asociar los olores que se encuentran presentes durante el amamantamiento, los gazapos también han mostrado que aprenden los olores que se encuentran presentes en su ambiente, por ejemplo el nido. Los gazapos que simplemente fueron expuestos a odorantes artificiales durante un día demostraron una preferencia a éstos cuando se les permitió “escoger” entre el odorante experimental y otro control (Hudson 1993b). En estudios

recientes, se vio que los gazapos son capaces de orientarse correctamente hacia el olor del nido a partir del primer día postnatal (Garay 2004).

Ya que el aprendizaje incidental aparentemente no depende de ninguna recompensa inmediata, es probable que sirva para que el individuo se familiarice, por medio del olfato, con su entorno (Hudson y Distel 1999), lo que será de gran ayuda después del periodo de amamantamiento, ya que permitirá reconocer los olores de la dieta de la madre. Es así que, bajo las circunstancias en las que los gazapos se desarrollan, la oportunidad que tienen las crías de aprender por observación directa qué planta pueden comer después del destete, es poca (Bilkó *et al.* 1993, Albäcker *et al.* 1995, Hudson *et al.* 1996). Asimismo, se ha demostrado (Bilko *et al.* 1994, Semke *et al.* 1995, Coureaud *et al.* 2002) que durante la gestación los fetos de los conejos son capaces de aprender los olores de los alimentos que consume la madre y que la experiencia prenatal es uno de los factores que permite el reconocimiento de los olores de los alimentos que los gazapos comerán después del destete (Bilko *et al.* 1994, Hudson 1999). Gazapos con tan sólo un día de edad que, por vía de la dieta de la madre fueron expuestos prenatalmente al olor del enebro, mostraron una fuerte preferencia hacia dicho olor (Semke *et al.* 1995). Semke *et al.* (1995) observaron que hay un aumento en la sensibilidad para estímulos específicos al nivel del epitelio olfatorio para los odorantes experimentales a los que los gazapos fueron expuestos prenatalmente.

Las crías del conejo europeo son un modelo idóneo para el estudio del aprendizaje de olores durante el desarrollo temprano. Además de que es un animal comúnmente usado en estudios de laboratorio, fácil de manipular gracias al limitado cuidado materno que reciben y que poseen un sistema olfatorio bien desarrollado, tienen la capacidad de aprender olores asociados con el evento de amamantamiento, así como los olores del ambiente pre y postnatal.

Aunque el gazapo es un buen modelo para el estudio de diferentes tipos de aprendizaje de olores, el estudio de las conductas en crías neonatas

puede ser complicado tanto por las limitantes del desarrollo sensorial y motor como por la forma de presentar los estímulos adecuadamente para que puedan responder conductualmente a dicho olor.

Las arenas de prueba que se han utilizado en investigaciones previas han resultado adecuadas para el estudio de conductas específicas. Por ejemplo, en estudios sobre el condicionamiento clásico con olores, el análisis conductual se enfocaba en la conducta de búsqueda de pezón, ya sea en el vientre de una coneja lactante que había sido anestesiada o en una arena cuadrada sobre una piel de conejo (Hudson 1985, Hudson y Distel 1986, 1987, Kinderman *et al.* 1991, 1994, Hudson *et al.* 2002). Aunque estas arenas fueron útiles en tanto que los gazapos mostraron la conducta estereotipada de búsqueda de pezón, la observación conductual se limitó principalmente a esa conducta, dejando fuera otras que también pueden ser indicativas del aprendizaje de olores, como lo es la orientación hacia la parte de la arena que tiene el olor aprendido. Posteriormente, se hicieron estudios de aprendizaje de olores en arenas experimentales que se basaban en la orientación de los gazapos hacia olores experimentados prenatalmente o hacia el olor del nido (p. ej. Fig. 1.2.). Dichos estudios midieron principalmente el desplazamiento y la orientación de los gazapos hacia un olor específico; sin embargo, las arenas en las que se realizaron dichos estudios no cumplían con las condiciones apropiadas para la expresión de la conducta de búsqueda de pezón (Semke *et al.* 1995, Garay 2004).

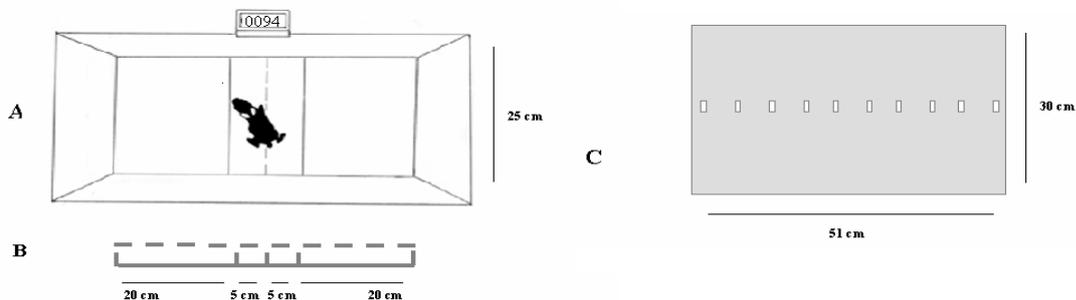


Figura 1.2. Arena experimental para el estudio de la orientación de los gazapos hacia olores. A) La arena vista desde arriba mostrando la zona inicial en el centro y las dos zonas de igual tamaño en ambos lados. B) Base de la arena vista lateral C) Vista lateral de la pared de la arena (Esquema tomado de Garay 2004).

Por lo anterior, el presente trabajo propone el desarrollo de una arena de prueba que se adecue a las características y necesidades especiales del gazapo. Así mismo, se buscó hacer una arena de prueba que permitiera el estudio más detallado del repertorio conductual que presentan los gazapos como consecuencia del aprendizaje de olores. Finalmente, también se buscó que la arena de prueba permitiera comparar las diferencias conductuales que son resultado del condicionamiento clásico así como del aprendizaje incidental.

El desarrollo de dicha prueba, fue paulatino, dando como resultado dos arenas prototipo, que finalmente permitieron la construcción de una tercera arena de prueba más adecuada.

2. OBJETIVO

Desarrollar una prueba conductual que permita el análisis conductual del aprendizaje perinatal de odorantes en crías del conejo doméstico (*Oryctolagus cuniculus*) y la observación comparativa de conductas que son resultado tanto del condicionamiento clásico como del aprendizaje incidental.

3. PREDICCIONES

Se espera que en una prueba conductual adecuada:

- 1) Los gazapos que fueron condicionados por exposición a un odorante experimental durante el amamantamiento, permanezcan más tiempo en el área de la arena que tiene este odorante y que ante el mismo, presenten la respuesta estereotipada de búsqueda de pezón.

- 2) Los gazapos con aprendizaje incidental (tratamiento prenatal) permanezcan más tiempo dentro del área de la arena que tiene el odorante al que fueron expuestos prenatalmente y que ante dicho odorante no presenten la conducta de búsqueda de pezón.

- 3) Los gazapos control, sin experiencia previa de los odorantes experimentales, permanecerán indistintamente en cualquier área de la arena sin importar el odorante que esté presente y que no presentarán la conducta de búsqueda de pezón.

4. METODOLOGÍA GENERAL

El presente trabajo se llevó a cabo dentro de las instalaciones del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM, en el Laboratorio de Psicobiología del Desarrollo, durante el periodo comprendido de la primavera del 2004 al verano del 2005. Los animales utilizados durante el estudio se mantuvieron y trataron de acuerdo con los lineamientos para el tratamiento de animales de investigación del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México.

4.1. Animales

A lo largo del estudio se ocuparon 37 camadas (con un promedio de seis gazapos cada camada) obteniendo un total de 190 gazapos del conejo doméstico (*Oryctolagus cuniculus*) de raza chinchilla. Todas las conejas gestantes y lactantes, junto con sus crías, se mantuvieron en jaulas individuales de 60 cm de altura x 20 cm x 45 cm. Los sujetos de estudio tuvieron agua y comida (Conejos Engorda, Malta Cleyton, México) *ad libitum*, la temperatura fue controlada (20 ± 2 °C), la humedad ambiental se mantuvo entre el 40-60% y el ciclo de luz-oscuridad fue de 16:8 hrs, respectivamente, prendiendo la luz a las 10:00 hrs. Las conejas de edad madura fueron apareadas entre las 11:00 y 13:00 horas.

Las hembras gestantes fueron revisadas diariamente, durante la mañana, con intervalos de dos horas para determinar la fecha y aproximadamente la hora de nacimiento de las crías. En el caso de los partos inducidos con oxitocina (ver 4.5), se separaron las crías al momento de nacer. Después del nacimiento las crías se pesaron y se marcaron con plumones de distintos colores en las orejas. El día del nacimiento se registró como día 0. Independientemente del experimento, cada día a la misma hora, los gazapos se pesaron y remarcaron y después fueron regresados a sus madres o nodrizas (en el caso de los gazapos de estudios prenatales; ver 4.5) para ser amamantados. Finalmente, cada gazapo se volvió a pesar después de comer,

con el objetivo de mantener un registro de la ingesta de leche diaria. Cada camada se separó de la madre y se mantuvo en una caja nido de cartón de 14.5 cm altura x 23 cm x 12.5 cm, la cual fue acondicionada con papel absorbente, pelo de la madre o nodriza y retazos de franela. De cada camada se escogieron los seis gazapos más pesados, por ser éstos los que tienen mayor probabilidad de sobrevivir (Drummond *et al.* 2000, Coureaud *et al.* 2000, Coureaud y Schaal 2000). Para algunas camadas, el número de gazapos estudiados fue menor, ya sea porque nacieron menos gazapos, o porque algunos gazapos de la camada nacieron débiles y murieron antes de 24 horas.

No se determinó el sexo de las crías, ya que esto resulta difícil además de que en estudios previos no se han encontrado diferencias en el crecimiento o conducta de hembras y machos neonatos (Drummond *et al.* 2000, Bautista *et al.* 2003, 2005).

4.2. Diseño experimental

El estudio abarcó un total de tres experimentos independientes. Para cada experimento se desarrolló una arena de experimentación, con el objetivo de probar y estandarizar el registro conductual de dos tipos diferentes de aprendizaje. Para cada arena experimental hubo un periodo de prueba, en la que se evaluó su utilidad. Las primeras dos arenas experimentales (prototipo 1 y 2) fueron descartadas después del análisis de estadística descriptiva de las conductas de los gazapos, concluyendo que dichas arenas eran inadecuadas. Fue hasta la construcción de la tercera arena experimental (arena final), que se incluyeron todos los grupos experimentales.

Tabla 4.1. Diseño experimental

Experimento	Arena	Grupos experimentales	Camadas
Prototipo 1	Arena en forma de un cubo abierto (6 cm altura x 7 cm x 7 cm)	1. Condicionamiento clásico con Chanel N°5	4 camadas (21 gazapos en total)
Prototipo 2	Arena en forma de cubo (10 cm altura x 10 cm x 10 cm) con "brazos" (10 cm altura x 4 cm x 4 cm)	1. Control de condicionamiento clásico 2. Condicionamiento clásico con Chanel N°5 3. Control de aprendizaje incidental 4. Aprendizaje incidental (prenatal) con terpenos de naranja.	9 camadas (2 control y 7 experimentales) (44 gazapos en total)
Arena final	Arena ovalada (7 cm altura x 17 cm x 25 cm)	1. Control 2. Condicionamiento clásico con Chanel N°5. 3. Condicionamiento clásico con extracto de comino. 4. Aprendizaje incidental (prenatal) con extracto de comino.	5 camadas por cada grupo (para el grupo prenatal se usaron 9 camadas, con menos gazapos), (125 gazapos en total)

4.3. Estímulos olfatorios

Se decidió trabajar con la fragancia conocida Chanel N°5 como estímulo olfativo para el condicionamiento clásico, ya que en trabajos previos del Laboratorio de Psicobiología del Desarrollo del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM, ha mostrado ser una sustancia práctica y eficaz en el condicionamiento de gazapos (Hudson *et al.* 2002). La fragancia Chanel N°5 es un odorante conspicuo, fácilmente reconocible incluso para el olfato del humano (lo que hace su manejo en el laboratorio más fácil), de amplia distribución (por lo que es fácil de conseguir) y no es tóxico.

Para el caso del aprendizaje incidental (prenatal) se decidió trabajar con un olor que fuera artificial (que no se encontrara naturalmente en el hábitat de los conejos), inocuo y no tóxico. También se buscó que fuera reconocido por el olfato humano con facilidad. Los terpenos de naranja son sustancias con estructuras complejas que se usan frecuentemente en la industria alimenticia y que son fáciles de administrar al ser mezclados en agua. Se investigaron las proporciones usadas en la industria alimenticia y se agregaron los terpenos en una solución de alcohol al 0.1% (Heldman y Lund 1992) al agua que bebieron las conejas gestantes. Se mantuvo un registro del volumen de agua con terpenos de naranja que las hembras gestantes consumieron. Después de notar el bajo consumo de agua con terpenos por parte de las hembras gestantes, se decidió cambiar a un olor que estuviera respaldado por investigación previa.

En estudios recientes sobre aprendizaje perinatal con el conejo europeo se manipuló el olor de la dieta de hembras gestantes y lactantes al agregar una solución de extracto de comino al agua que bebían las hembras así como al espolvorear las croquetas que comían. Los gazapos de madres con la dieta de comino permanecieron más tiempo dentro de la mitad de la arena que tenía el olor del comino. Así mismo, se ha determinado que, por lo menos para el caso del humano (y se asume es igual para el conejo), el comino no es tóxico y también es capaz de entrar al compartimiento fetal (Coureaud *et al.* 2002).

4.4. Condicionamiento clásico postnatal

Los gazapos fueron condicionados durante tres días. Ya sea, los días 0, 1, 2 o empezando a partir del día 4. Todos los días los gazapos fueron amamantados por una hembra lactante cuyo vientre había sido previamente perfumado con la colonia Chanel N° 5 o extracto de comino (el comino se usó para condicionar sólo en el caso del experimento de la arena final). El odorante se aplicaba 10 minutos antes del amamantamiento con un hisopo que había sido introducido y saturado en un frasco con el odorante. Se aplicaba el odorante de tal manera que la mayor concentración estuviera alrededor del área de cada pezón. Tanto previa como posteriormente al amamantamiento, los gazapos se pesaban uno por uno, se remarcaban y se dejaban tranquilos hasta el día siguiente. Al término de los tres días de condicionamiento los gazapos se introdujeron, en el mismo horario en el que normalmente amamantarían (pues es el momento en el que los gazapos están más activos; Hudson y Distel 1982, Gilge 1993, Caldelas *et al.* 2005), a la arena de prueba para hacer las observaciones conductuales. Todas las pruebas conductuales duraron 180 sec, y fueron grabadas en video con una cámara Panasonic M9000 en video formato VHS, fijada con un tripié justamente por encima de la arena de prueba, para su posterior análisis en cámara lenta, segundo por segundo.

4.5. Aprendizaje incidental prenatal

Se ha determinado que es a partir de la última semana de gestación cuando los gazapos desarrollan las conexiones neuronales que se presupone pueden dar origen al aprendizaje de olores (Coureaud *et al.* 2002). Se administró el terpeno de naranja o el extracto de comino (prototipo 2 y arena final, respectivamente) en el agua que las madres gestantes bebieron sólo durante la 3^a. y 4^a. semanas de gestación, hasta el día de nacimiento de los gazapos (en el caso del experimento de la arena final las croquetas también se “espolvorearon” con comino).

Las conejas aceptaron el agua y las croquetas con comino consumiendo las mismas cantidades de agua y comida que las conejas control (700 ml – 1000 ml cada 24 horas). Debido a que en los estudios de aprendizaje prenatal de Bilkó *et al.* (1994) y Coureaud *et al.* (2002) se vio que los gazapos también son capaces de aprender los olores de la dieta de la madre mediante la ingesta de leche materna, se debió impedir la ingesta de la misma por parte de las crías neonatas. Se revisó a las conejas diariamente y en algunas ocasiones se administró oxitocina (1 ml; Oxitopisa) para inducir el parto y prevenir la ingesta de leche de la propia madre de los gazapos al asignar una nodriza para cada camada “de comino”. Al nacer, las crías se separaron de la madre, se pesaron, marcaron y se introdujeron en la jaula de la nodriza asignada para que los amamantara cada 24 horas. Al igual que el grupo de los gazapos condicionados, los gazapos del tratamiento prenatal se mantuvieron en cajas nido aparte de la nodriza.

4.6. Análisis de la conducta

Para el análisis conductual de cada experimento, primero se hizo la descripción de las conductas que se registrarían posteriormente. En hojas de registro (anexos 1 a 3) se anotó la frecuencia y duración de diferentes conductas, de las cuales siete fueron comunes en las tres arenas de prueba:

Contacto con olor (Cco) La nariz o cabeza del gazapo está tocando el lugar donde se puso el estímulo.

Contacto sin olor (Cso) La nariz o cabeza del gazapo está tocando el lugar, del lado sin olor, equivalente al otro lado de la arena que tiene el olor experimental.

Búsqueda de pezón (Bp) El gazapo sumerge la nariz en el estímulo, la cabeza se mueve enérgicamente en forma zigzagante, apoya el peso del

cuerpo en las patas delanteras hundiendo la cabeza en el piso, las orejas se juntan y la cola se levanta. El estado del gazapo es muy excitado.

Rascar (R) El cuerpo del gazapo está presionado contra el piso mientras se repiten movimientos de rascado que se producen con las patas de enfrente, mientras que las traseras siguen presionadas contra el piso.

Escapar (E) La cabeza del gazapo se encuentra por encima de cualquier pared de la arena después de haber escalado por ésta.

Desplazamiento (D) El gazapo se mantiene en movimiento constante, la mayor parte del cuerpo cambia de lugar dentro de la arena aunque sea por un segundo, la cabeza se encuentra erguida.

Quieto (Q) El gazapo se mantiene en el mismo lugar, por un periodo mayor a un segundo.

Asimismo, se midió la duración en segundos que los gazapos pasaron en cada uno de los cuadrantes de las distintas arenas. Se colocó un acetato cuadriculado sobre el monitor el cual proyectaba el video en cámara lenta segundo por segundo para registrar las posiciones de cada gazapo (anexos 1 a 3).

Para el prototipo 1 se registraron además cuatro parámetros espaciales, denominados cuadrantes (cuadrantes 1 al 4), con un área igual para cada uno (Fig. 5.2). El cuadrante 1 y 2 formaban la parte anterior izquierda y derecha, respectivamente, de la arena; mientras que los cuadrantes 3 y 4, la parte posterior. Se registró al gazapo dentro de un cuadrante específico si la cabeza de éste o la mayoría de su superficie corporal estaba dentro del área delimitada como el cuadrante.

Para el prototipo 2 los parámetros espaciales fueron los mismos que para el prototipo 1, exceptuando la inclusión de los dos brazos de la arena (Fig. 6.2).

En el caso de la arena final se registró tanto la duración de ocho parámetros espaciales (Fig. 7.2.), como la frecuencia y duración de seis conductas adicionales, que fueron resultado de una observación más detallada.

La arena final, al igual que las arenas anteriores, se dividió en cuatro partes principales denominadas cuadrantes (cuadrantes 1 al 4), los cuales se dividieron conforme al eje mayor y el eje menor de la arena. Sin embargo, en la arena final, los cuatro cuadrantes principales fueron a su vez divididos en dos áreas; perímetro y centro, sumando ocho posiciones en total. El perímetro de cada cuadrante comprendió un borde de 1.5 cm de ancho (tamaño aproximado de la cabeza de los gazapos) a partir de la pared de la arena.

La definición operacional de las conductas adicionales registradas fue la siguiente:

Búsqueda en general (B) De manera calmada el gazapo mueve la cabeza de un lado a otro, sumerge la nariz en la piel y recorre el área “detalladamente”.

Rascar relajado (Rr) Las patas delanteras del gazapo se contraen y se estiran repetidamente, de manera “relajada”, en un área determinada, sin desplazarse.

Asomar la cabeza (Ac) La cabeza del gazapo se encuentra por encima de cualquier borde, la cabeza permanece fuera de la arena por más de un segundo.

Succión (S) El gazapo mueve las mandíbulas con movimientos repetitivos que simulan la succión durante el amamantamiento.

“Convulsiones” (C) El gazapo no está en movimiento aparente, el cuerpo, particularmente el vientre se mueve de manera repentina en modo de “espasmos”.

Movimiento (M) El gazapo no se desplaza, pero la cabeza, u otra parte del cuerpo, se mueve.

4.7. Análisis de datos

Para los experimentos de los prototipos 1 y 2 sólo se utilizó análisis de estadística descriptiva sacando el promedio, la media y desviación estándar de las variables. Con dicho análisis fue suficiente para revelar la ausencia de diferencias entre los grupos o condiciones en cualquiera de las conductas registradas.

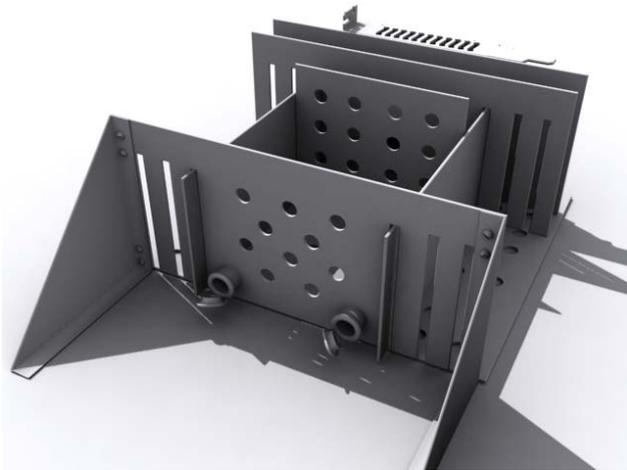
Para el análisis de las conductas mostradas en la arena final, además de la estadística descriptiva que se hizo en el estudio de las dos arenas previas, también se realizaron pruebas de probabilidad no paramétricas: ANOVA de Kruskal-Wallis para grupos independientes, ANOVA de Friedman para medidas repetidas, y en el caso de significancia, ambas pruebas fueron seguidas por una comparación múltiple de Dunn. Para hacer la comparación pareada del mismo grupo se utilizó una prueba de rangos asignados de Wilcoxon. Con estas pruebas se comparó los porcentajes del tiempo que los gazapos pasaron en las diferentes áreas de la arena en cada una de las tres condiciones. Se utilizaron pruebas no paramétricas debido al tamaño relativamente pequeño de las muestras, a la alta variabilidad individual y a que los datos no presentaron una distribución normal. Todas las pruebas fueron de dos colas y para todas se tomó un valor de $\alpha \leq 0.05$ como el nivel de significancia.

5. ARENA DE PRUEBA: PROTOTIPO 1

La motivación detrás de la construcción de una nueva arena de prueba, fue la búsqueda de un método práctico y sencillo de evaluación del aprendizaje de olores que fue adquirido en diferentes condiciones (tipos de aprendizaje) en crías neonatas del conejo doméstico. Se buscó que la arena experimental fuera pequeña, lo que facilitaría la búsqueda y ubicación del olor aprendido por parte de los gazapos, además de fácil de transportar. También se pensó en hacer una arena que fuera ajustable al tamaño de los gazapos permitiendo el estudio del aprendizaje en diferentes etapas de desarrollo. Se pensó en que la presentación de los odorantes fuera intercambiable o ajustable previniendo la contaminación o saturación de un olor en toda la arena. De igual manera, se buscó que la arena estuviera bien ventilada permitiendo que la concentración más alta del estímulo estuviese en un punto específico.

5.1. Diseño de la arena

El primer prototipo tenía la forma de un cubo abierto por la parte de arriba formado por cuatro paredes. El tamaño de la arena fue de 6 cm de altura x 7 cm x 7 cm, pero, ya que las paredes de la arena eran ajustables, era posible modificar el tamaño de ésta dependiendo del tamaño del gazapo (Fig 5.1.). La arena podía hacerse más ancha o larga, 4 cm a la vez, llegando a medir hasta 6 cm de altura x 15 cm x 15 cm. Tanto los lados como la base de la arena fueron hechos con cartón batería de 2.5 mm. En la parte posterior de la arena se colocó un extractor de aire (AOC System Blower FC-2000) que fue adaptado para la corriente. Se perforaron hoyos de 0.5 cm de diámetro en dos lados de la arena permitiendo un flujo de aire por toda la arena. La parte anterior de la arena contaba con dos agujeros equidistantes en los cuales se colocaban tubos Eppendorf (capacidad de 1.5 ml) a los que se les había cortado la punta y dentro de los cuales se colocaba un hisopo con el olor experimental o un hisopo con agua en el caso del lado control.



A



B

Figura 5.1. Esquema del prototipo # 1. A) La arena vista desde enfrente, donde cada uno de los dos tubos Eppendorf contiene un hisopo con el olor experimental o con agua, respectivamente. Las rejillas laterales fueron diseñadas para que la arena se pudiera adecuar al tamaño del gazapo. Se puede ver que en la parte trasera de la arena había tres paredes, las cuales pretendían amortiguar las vibraciones causadas por el extractor. B) Extractor adaptado a la arena y a la corriente.

5.2. Procedimiento experimental

Animales

Se usó un total de 21 gazapos de cuatro camadas (una camada sólo tuvo tres gazapos, mientras que las otras tres camadas se formaron de seis gazapos cada una). Se trabajó con las crías a partir de 24 horas después de haber nacido, marcado como día 1, hasta el día 4 en el que fueron introducidos en la arena de prueba. Se registró el peso de cada gazapo al nacer (53.8 ± 13.8 g) así como antes y después de cada episodio de amamantamiento. En el día 4 se escogieron los seis gazapos más pesados de cada camada (69.9 ± 13.1 g) y se introdujeron uno por uno en la arena de prueba.

Tratamiento

Cada gazapo se condicionó con Chanel N°5 durante tres episodios de amamantamiento empezando el día 1 hasta el día 3. El procedimiento para

el condicionamiento de los gazapos siguió el mismo procedimiento descrito previamente (ver 4.4).

Pruebas conductuales

En el día 4, en el mismo horario normal de amamantamiento, se introdujeron los gazapos en la arena experimental uno por uno en el siguiente orden:

Cada gazapo realizó la prueba conductual dos veces, esperando aproximadamente 30 minutos antes de entrar a la arena por segunda ocasión. En una condición, el estímulo estaba presente en una de las dos mitades de la arena, mientras que en la condición control no había ningún estímulo olfativo experimental dentro de la arena. Dicho orden de prueba permitió un diseño balanceado en el cual cada gazapo tuvo la condición experimental y la condición control. Para los primeros gazapos de la camada la primera condición fue la control, mientras que para los últimos gazapos la primera condición fue la experimental. Se colocó a los gazapos en la mitad de la arena, con el hocico frente a la parte anterior y se les dejó libres (Fig. 5.2). Las pruebas conductuales duraron 180 seg, y fueron grabadas en video formato VHS, para el análisis posterior de las conductas descritas anteriormente (ver 4.6).

5.3. Análisis de la conducta

El análisis conductual de la grabación de cada gazapo se realizó segundo a segundo en cámara lenta, registrando las conductas en una hoja de registro (anexo 1). El área total de la arena se dividió en cuatro cuadrantes (área antero/posterior del lado con olor y área antero/posterior sin olor) registrando la posición del animal y la presencia de seis conductas específicas: búsqueda de pezón, desplazamiento, “escape” y rascado, así como el contacto con el estímulo y quieto (ver 4.6).

5.4. Resultados

Al ser introducidos en la arena, los gazapos daban vueltas continuas, se levantaban en las patas traseras apoyándose en los muros y rascaban el piso de ésta. Sus movimientos eran rápidos y difíciles de registrar, aún en cámara lenta. Después del primer minuto dentro de la arena, la actividad de los gazapos empezó a disminuir. Al encontrarse con una esquina, se detenían por un par de segundos, y en ocasiones se quedaban quietos durante un minuto completo.

El análisis conductual mostró que cuando el Chanel N° 5 estaba presente los gazapos pasaron prácticamente el mismo tiempo en el lado con el olor experimental que en el lado sin olor (90.3 ± 28.2 seg y 89.3 ± 28.5 seg, respectivamente) y este también fue el caso para todas las conductas registradas (Fig 5.2). Así mismo, los gazapos no pasaron más tiempo en la parte delantera, donde se encontraba el estímulo experimental, que en la parte posterior (89.6 ± 24.8 seg y 90.3 ± 24.8 seg, respectivamente). Ningún gazapo respondió al olor experimental con la conducta de búsqueda de pezón. Sólo un gazapo tuvo contacto con el tubo Eppendorf que contenía el odorante por más de 4 seg; en general los gazapos no tocaban los tubos Eppendorf sin importar si tuviera o no el estímulo.

En la condición control, en la que la arena no tenía el olor experimental, los gazapos respondieron de igual manera. Los gazapos no permanecieron más tiempo en el lado de la arena que correspondía al lado con estímulo de la condición experimental que en el lado correspondiente al lado sin estímulo (85.5 ± 18.97 seg y 94.2 ± 18.8 seg). Es decir, que los gazapos pasaron el mismo tiempo de un lado que del otro de la arena.

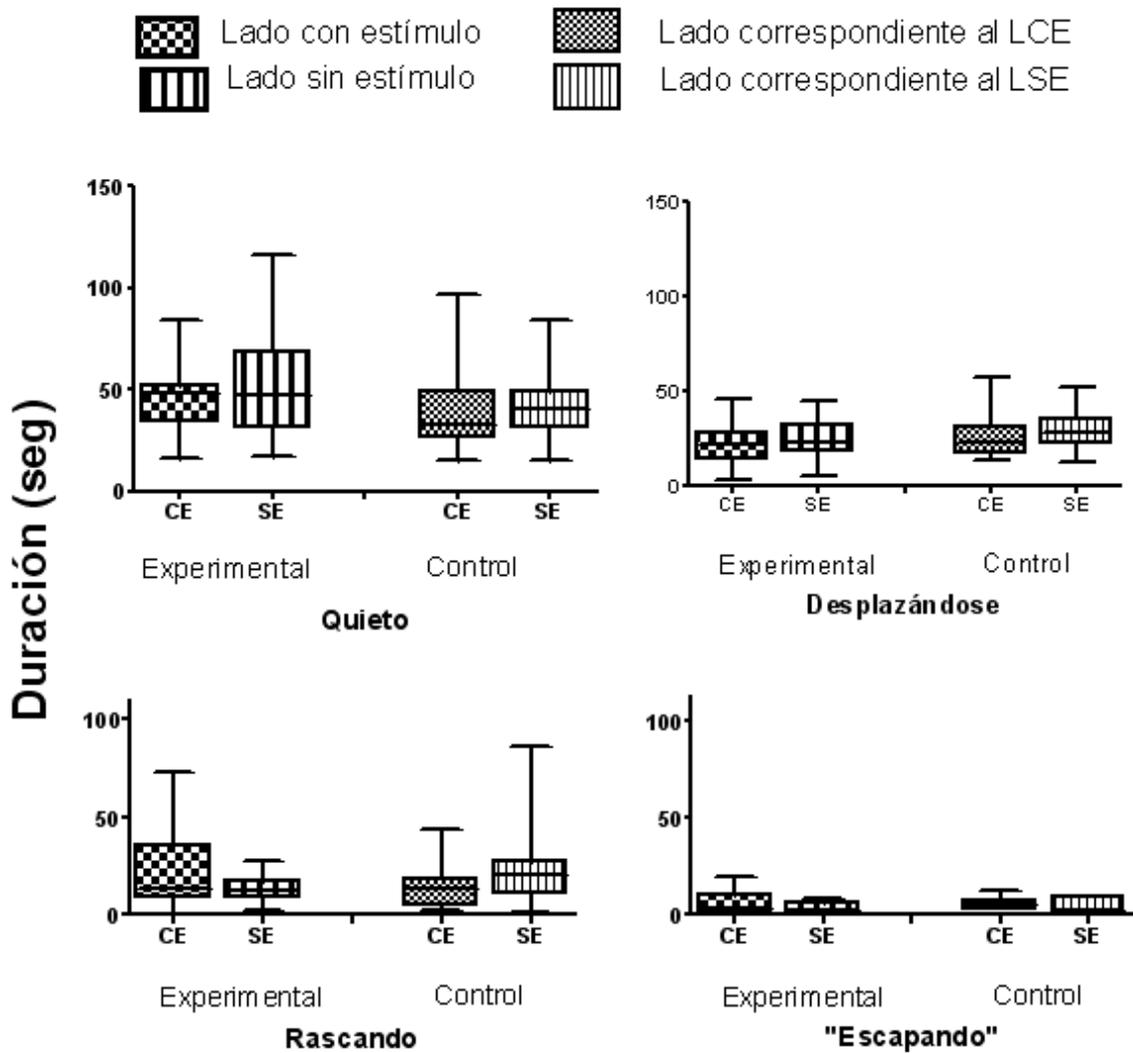


Fig. 5.2. El tiempo en segundos que los gazapos desplegaron cada una de las conductas registradas. Se compara la duración de cada conducta tanto en la condición con Chanel N° 5 como en la condición Control, así como el tiempo que los sujetos realizan las conductas en cada lado de la arena, con o sin estímulo. Las líneas horizontales dentro de las cajas son medianas, las cajas representan el rango de los intercuartiles y los bigotes muestran el rango absoluto (n=21). CE = lado con estímulo, SE = lado sin estímulo, LCE = lado correspondiente al lado con estímulo (condición Control) y LSE = lado correspondiente al lado sin estímulo (condición Control).

De igual manera, la frecuencia con la que los gazapos realizaron cada conducta fue similar entre el lado con el olor experimental y el lado sin olor. Así mismo, la frecuencia con la que realizaron las diferentes conductas fue muy similar entre la condición experimental y control (Fig. 5.3).

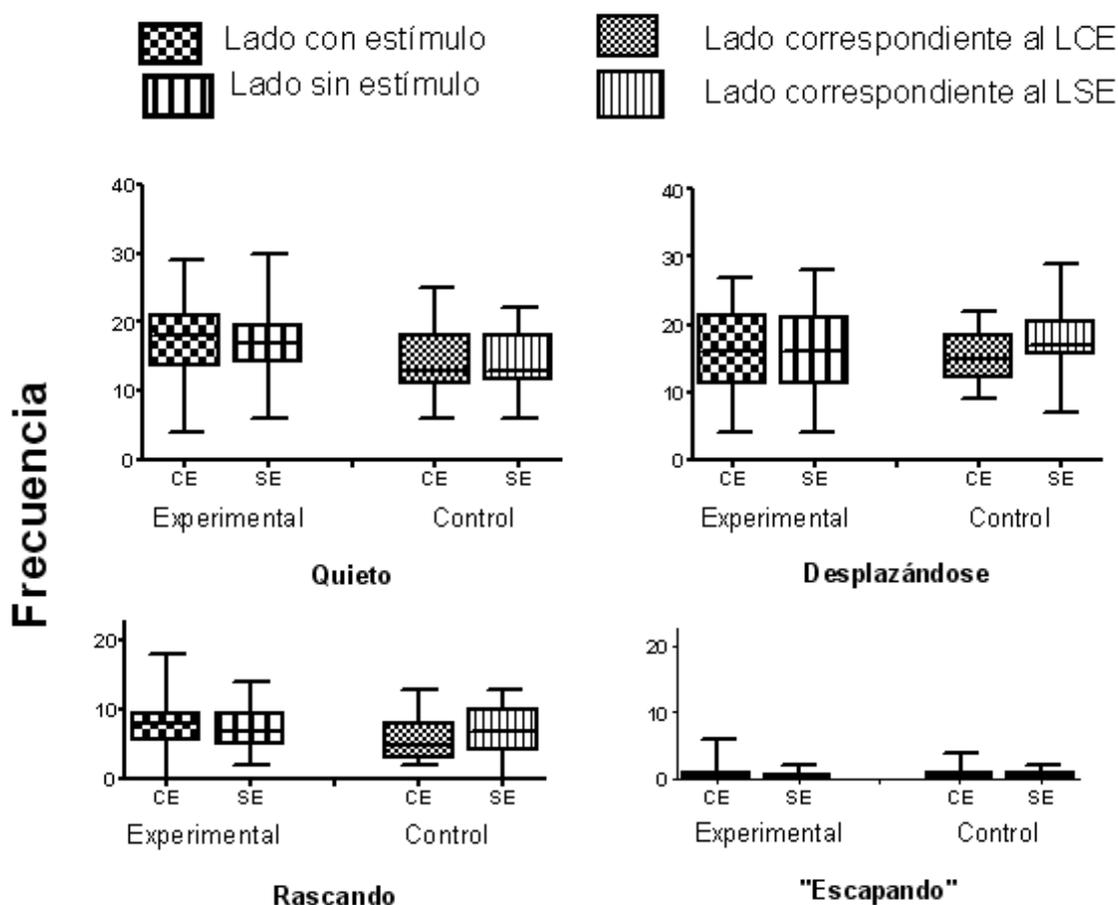


Fig. 5.3 La frecuencia con la que los gazapos desplegaron cada conducta registrada tanto en la condición con Chanel N° 5 como en la condición Control, así como la frecuencia con la que los sujetos realizan las conductas en cada lado de la arena, con o sin estímulo. Las líneas horizontales dentro de las cajas son medianas, las cajas representan el rango de los intercuartiles y los bigotes muestran el rango absoluto (n=21). CE= lado con estímulo, SE= lado sin estímulo, LCE=lado correspondiente al lado con estímulo (condición Control) y LSE= lado correspondiente al lado sin estímulo (condición Control).

Según los resultados, los gazapos no mostraron preferencia alguna hacia el lado de la arena con el estímulo experimental y tampoco se observó diferencia en la duración o frecuencia de las conductas que realizaron en cada lado, sin importar la presencia o ausencia del olor experimental en la arena. La respuesta que los gazapos tuvieron tanto en la condición experimental como la condición control, fueron tan similares, que incluso con el análisis de estadística descriptiva no mostró diferencia entre los datos, por lo que no se realizaron pruebas estadísticas de probabilidad.

5.5. Discusión

Los gazapos no se orientaron preferentemente al olor de la fragancia Chanel Nº 5 y nunca mostraron la conducta de búsqueda de pezón. Esto se puede tener dos posibles explicaciones. La primera, sugiere que los gazapos no fueron condicionados, es decir no asociaron el olor del Chanel Nº 5 con el evento de amamantamiento y consecuentemente en presencia de éste no mostraron la respuesta de búsqueda de pezón. La segunda propone que las condiciones de la prueba fueron inadecuadas para que los gazapos realizaran, ya sea, la conducta de búsqueda de pezón, la orientación hacia el lado de la arena con el olor experimental, o alguna otra conducta que denote aprendizaje del olor experimental.

La primera explicación parece poco probable, ya que en varios estudios anteriores con crías de conejo que fueron expuestas al olor del Chanel Nº 5 durante el amamantamiento, se demostró que los gazapos sí pueden asociar esta fragancia con el evento del amamantamiento y mostrar la conducta de búsqueda de pezón al entrar en contacto con el olor en un contexto experimental diferente al evento de amamantamiento (Hudson 1985, Hudson y Distel 1986, 1987, Kinderman *et al.* 1991, 1994, Hudson *et al.* 2002). Asimismo, el condicionamiento se llevó a cabo de acuerdo al procedimiento de los estudios mencionados y ya que los gazapos ganaron peso después de los eventos de amamantamiento indicando que estuvieron en directo contacto con el olor experimental dentro de un contexto de recompensa, es posible decir que el método de condicionamiento no fue la causa del resultado obtenido. Por lo tanto, sugerimos que la ausencia de la conducta de búsqueda de pezón no significa necesariamente que los gazapos no hayan aprendido el olor experimental.

De hecho, la segunda explicación parece ser más probable, ya que ciertas características del prototipo 1 pudieron haber dificultado que los gazapos realizaran la conducta de búsqueda de pezón o que se orientaran “preferentemente” hacia el lado de la arena con el olor experimental. Anteriormente se ha determinado que, en conejas lactantes cuyos vientres

han sido rasurados, la conducta de búsqueda de pezón de los gazapos se ve entorpecida sin la presencia del pelo en el vientre de la hembra lactante (Hudson y Distel 1983). Lo anterior sugiere que los gazapos difícilmente mostrarían la conducta de búsqueda de pezón sobre una superficie lisa, tal como lo era el piso de cartón de la arena. Además, frecuentemente se observó a los gazapos tratando de escapar de la arena ayudándose de las patas delanteras para escalar las paredes y apoyar la cabeza sobre la cornisa de la arena.

El prototipo 1 se planteó como una simplificación de arenas anteriores, restringiendo el tamaño y con ello el área de búsqueda de los gazapos. Sin embargo, es posible que dado el tamaño, el olor experimental se haya propagado por toda la arena, lo que dificultaría la discriminación de la procedencia del estímulo experimental. Se puede decir que los resultados obtenidos sugirieron que la arena no cumplía con las características necesarias para el estudio del condicionamiento clásico de olores en las crías del conejo.

6. ARENA DE PRUEBA: PROTOTIPO 2

Dado los resultados de las pruebas realizadas en el prototipo 1, se decidió cambiar el tamaño, el piso de la arena y hacer ajustes a la forma en que se presentaba el estímulo, para que así, la prueba de preferencia de áreas de la arena fuera más fácil de evaluar.

6.1. Diseño de la arena

El segundo prototipo tenía forma de un cubo cuyas paredes anteriores, izquierda y derecha, eran intersectadas en 45° por un cubo de casi la cuarta parte del área del cubo central. El tamaño del cubo central fue de 10 cm de altura x 10 cm x 10 cm, y los cubos laterales de 10 cm de altura x 4 cm x 4 cm. Además de la añadidura de estos dos pequeños “brazos”, se cubrió el piso de cartón con un pedazo de peluche blanco para cada experimento (Fig. 6.1).

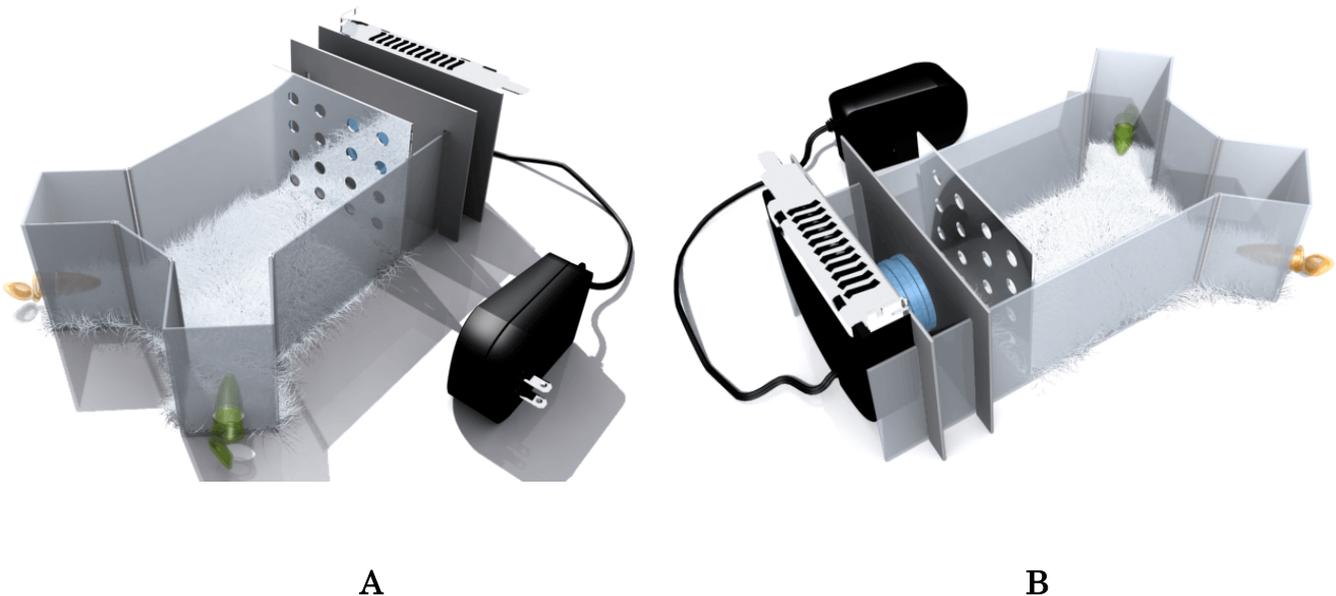


Figura 6.1. Prototipo de arena # 2. A) La arena vista desde enfrente. B) La arena vista desde atrás. La arena consistía en un área abierta que al frente se dividía en dos brazos. En cada brazo había un tubo Eppendorf el cual servía para colocar el estímulo. Además el piso era de peluche lo que simulaba un ambiente más natural para el gazapo. También incluía un extractor de aire y una separación entre el gazapo y éste.

En la parte anterior de cada brazo se hizo un agujero en el que se colocaba un tubo Eppendorf, dentro del cual, se podía colocar un hisopo con el olor experimental o un hisopo con agua. Los brazos permitían que la procedencia de cada estímulo fuera más clara y por lo tanto la respuesta de los gazapos a éste, fácil de cuantificar. El tamaño de dichos brazos fue cuidadosamente diseñado para que fuera del tamaño de la cabeza y medio torso del gazapo. Lo anterior se hizo con la finalidad de evitar que los gazapos quedaran atrapados en los brazos. En la parte posterior de la arena se volvió a colocar el extractor de aire (AOC System Blower FC-2000) (Fig. 6.2).

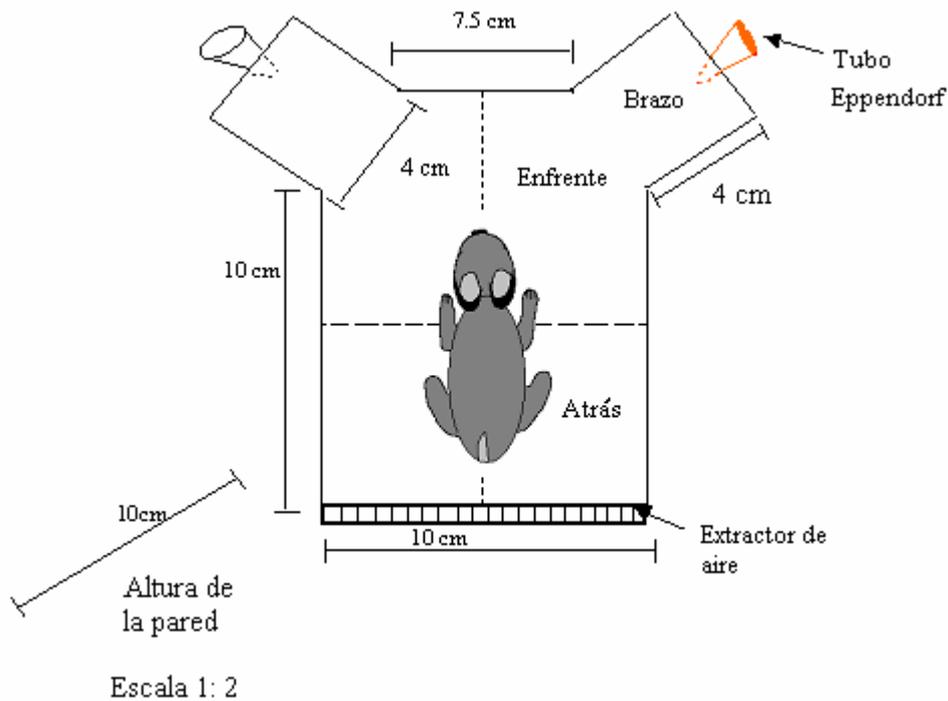


Fig. 6.2. Dimensiones del prototipo 2. Proporción real de un gazapo en la arena.

6.2. Procedimiento experimental

Animales

El estudio constó de dos grupos experimentales y dos grupos control (uno para cada grupo experimental), trabajando con nueve camadas en total. Para estudiar el condicionamiento clásico con la fragancia Chanel N° 5 se

usaron cuatro camadas experimentales (n=19 gazapos) y una camada control (n=4 gazapos). Después, se usaron otras tres camadas experimentales (n=15 gazapos) para estudiar el aprendizaje incidental (prenatal) con terpenos de naranja y una camada control (n=6 gazapos). En ambos casos, los grupos control se formaron a partir de gazapos que no habían sido condicionados o que no habían tenido experiencia prenatal, respectivamente.

Para los experimentos del prototipo 2, se trabajó con crías que se empezaron a condicionar desde el día 0, es decir, durante el primer evento de amamantamiento (colocando Chanel N° 5 en los pezones de la madre un día antes de que nacieran) y hasta el día 2. Se registró el peso de cada gazapo al nacer (45.2 ± 10.1 g) así como antes y después de cada episodio de amamantamiento. En el día 3 se escogieron los gazapos más pesados (53.7 ± 13 g) y se introdujeron uno por uno en la arena de prueba.

Por su parte, los gazapos del grupo de aprendizaje incidental se separaron de la madre al nacer, se pesaron y al día siguiente (día 1) se escogieron los gazapos más pesados (52 ± 5.9 g) y se hicieron las primeras pruebas conductuales, después se les asignó una nodriza y se mantuvieron de igual manera que el grupo del condicionamiento clásico. En el día 3 los gazapos se introdujeron a la arena para una segunda prueba conductual.

Tratamiento

Cada gazapo del grupo experimental del condicionamiento clásico se condicionó con Chanel N°5 durante tres episodios de amamantamiento empezando desde el día en que nacieron hasta el día 2. El procedimiento para el condicionamiento de los gazapos siguió el mismo método descrito previamente (ver 4.4).

A partir de la 3ª semana de gestación las madres de los gazapos del grupo experimental del aprendizaje incidental recibieron la solución de terpenos de naranja dentro del agua que bebieron diariamente. Inmediatamente después de nacer, las crías fueron separadas de la madre. Los gazapos de este grupo experimental se pusieron a prueba en dos días

diferentes (1 y 3), dos veces cada ocasión (cuatro veces por individuo) utilizando terpenos de naranja como el odorante experimental. El método que se siguió para la producción y administración de la solución de los terpenos de naranja a las hembras gestantes y el mantenimiento de los gazapos es el descrito previamente (ver 4.5).

Pruebas conductuales

En la arena experimental cada gazapo realizó la prueba conductual dos veces, esperando aproximadamente 30 minutos antes de ser colocado en la arena por segunda ocasión. En una condición, el estímulo estaba presente en una de las dos mitades de la arena, mientras que en la condición control no había ningún estímulo olfatorio experimental dentro de la arena.

Para el grupo del aprendizaje incidental el procedimiento fue el mismo, con la variante de que los gazapos de este grupo fueron probados en los días 1 y 3.

Para ambos grupos, el orden de entrada a la arena fue similar al descrito previamente en el capítulo anterior. Se usó un diseño balanceado para los cuatro grupos experimentales (controles, condicionamiento con Chanel N° 5 y aprendizaje incidental) en el que algunos gazapos de la camada tuvieron la condición experimental en la primera ocasión que entraron a la arena y la condición control durante la segunda, mientras que el resto de los gazapos tuvieron primero la condición control y después la condición experimental. De igual manera, se colocó a los gazapos en la mitad de la arena, con el hocico frente a la parte anterior y se les dejó libres (Fig. 6.2). Las pruebas conductuales también duraron 180 seg, y fueron grabadas en video formato VHS para el análisis posterior de las conductas descritas anteriormente (ver 4.6).

6.3. Análisis de la conducta

El análisis conductual se centró en las diferentes áreas que el gazapo visitó durante la prueba conductal. El área total de la arena se dividió en seis

partes (brazos 1 y 2, cuadrantes anteriores 1 y 2, así como cuadrantes posteriores 3 y 4) registrando la posición del animal y la presencia de las mismas siete conductas que en el prototipo 1: búsqueda de pezón, contacto con el estímulo, contacto sin el estímulo, rascado, escapar, desplazamiento y quieto las cuales ya han sido descritas arriba en 4.6. Posteriormente se hizo el análisis de la grabación de cada gazapo segundo a segundo en cámara lenta, marcando las conductas en una hoja de registro (anexo 2).

6.4. Resultados

Al revisar diariamente a las hembras gestantes con el tratamiento de terpenos de naranja, se notó que éstas no bebieron la misma cantidad de agua que las hembras gestantes control (700 ml- 1000 ml), bebiendo en algunas ocasiones tan poco como aproximadamente 300 ml de agua al día.

Durante las pruebas conductuales los gazapos se mantuvieron muy activos, pasaban más tiempo en la parte anterior de la arena, recargándose en las paredes de los brazos de la arena. Se rascaban y se levantaba sobre las patas traseras ayudándose de las paredes de los brazos de la arena, alternaban el desplazamiento continuo con momentos de descanso, principalmente en los brazos de la arena. En general, los gazapos de todos los grupos, pasaron significativamente más tiempo en la parte anterior que en la parte posterior de la arena (122 ± 29.6 seg vs. 51 ± 24.6 ; prueba de rangos asignados de Wilcoxon: $W = 990$, $n = 44$, $p < 0.0001$), y éste fue el caso sin importar si el olor experimental estaba o no presente (Grupo condicionado con Chanel N° 5: $W = 188$, $n = 19$, $p < 0.0002$ y $W = 187$, $n = 19$, $p < 0.005$, con y sin Chanel N° 5 presente, respectivamente. Grupo prenatal con terpenos de naranja: $W = 120$, $n = 15$, $p < 0.007$ y $W = 80$, $n = 15$, $p < 0.02$, con y sin terpenos de naranja presente, respectivamente). Al parecer los brazos de la arena eran lugares atractivos para los gazapos independientemente de la condición experimental, pues en ellos descansaban y trepaban.

Para el caso del experimento con Chanel N° 5, ya sea cuando éste estaba presente o en la condición Control, los gazapos pasaron un tiempo

similar en el lado con el olor experimental que en el lado sin olor (91 ± 35 seg y 78 ± 30 seg, en presencia del Chanel N° 5; 80.7 ± 34 seg y 82.2 ± 30.9 seg, en la condición Control), incluyendo el tiempo en cada brazo. La camada control, del experimento con Chanel N° 5, presentó resultados parecidos. Tanto en la presencia del olor experimental, como en la condición Control, los gazapos pasaron tiempos similares en el lado de la arena con olor y en el lado sin olor (87 ± 15.4 seg y 91 ± 16.9 seg, en presencia del Chanel N° 5; 95 ± 28.5 seg y 84 ± 28.3 seg, en la condición Control).

En cuanto a las conductas realizadas, se observó que una vez más los gazapos, tanto del grupo experimental como del grupo control, pasaron más tiempo desplazándose o quedándose quietos en comparación con el tiempo que dedicaron a las conductas de escape y rascado. No se observó en ninguna condición, que algún gazapo realizara la conducta estereotipada de búsqueda de pezón. Así mismo, tampoco hubo diferencia en el tiempo o en el lado de la arena en la que los gazapos realizaron cada conducta cuando el estímulo experimental estaba o no presente (Fig. 6.3).

De igual manera, la frecuencia de las diferentes conductas fue muy similar entre la condición experimental y control. Así mismo, la frecuencia con la que los gazapos realizaron cada conducta fue similar entre el lado con el olor experimental y el lado sin olor (Fig. 6.4)

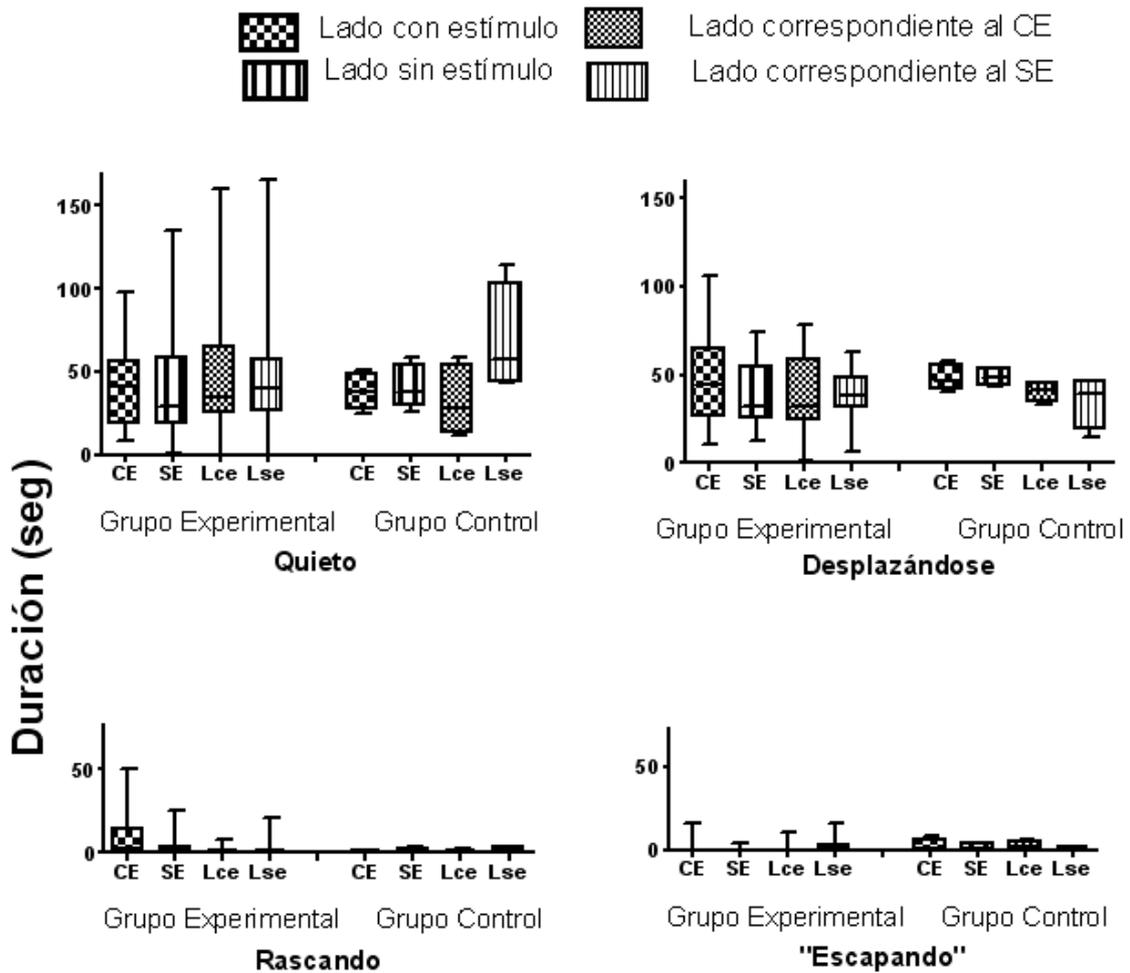


Fig. 6.3. Los segundos que los gazapos experimentales y control desplegaron cada una de las conductas registradas. Se compara la duración de cada conducta tanto en la condición con Chanel N° 5 como en la condición Control, así como el tiempo que los sujetos realizan las conductas en cada lado de la arena, con o sin estímulo. Las líneas horizontales dentro de las cajas son medianas, las cajas representan el rango de los intercuartiles y los bigotes muestran el rango total (n=19 animales experimentales, n= 4 animales control). CE= lado con estímulo, SE= lado sin estímulo, Lce =lado correspondiente al lado con estímulo (condición Control) y Lse = lado correspondiente al lado sin estímulo (condición Control).

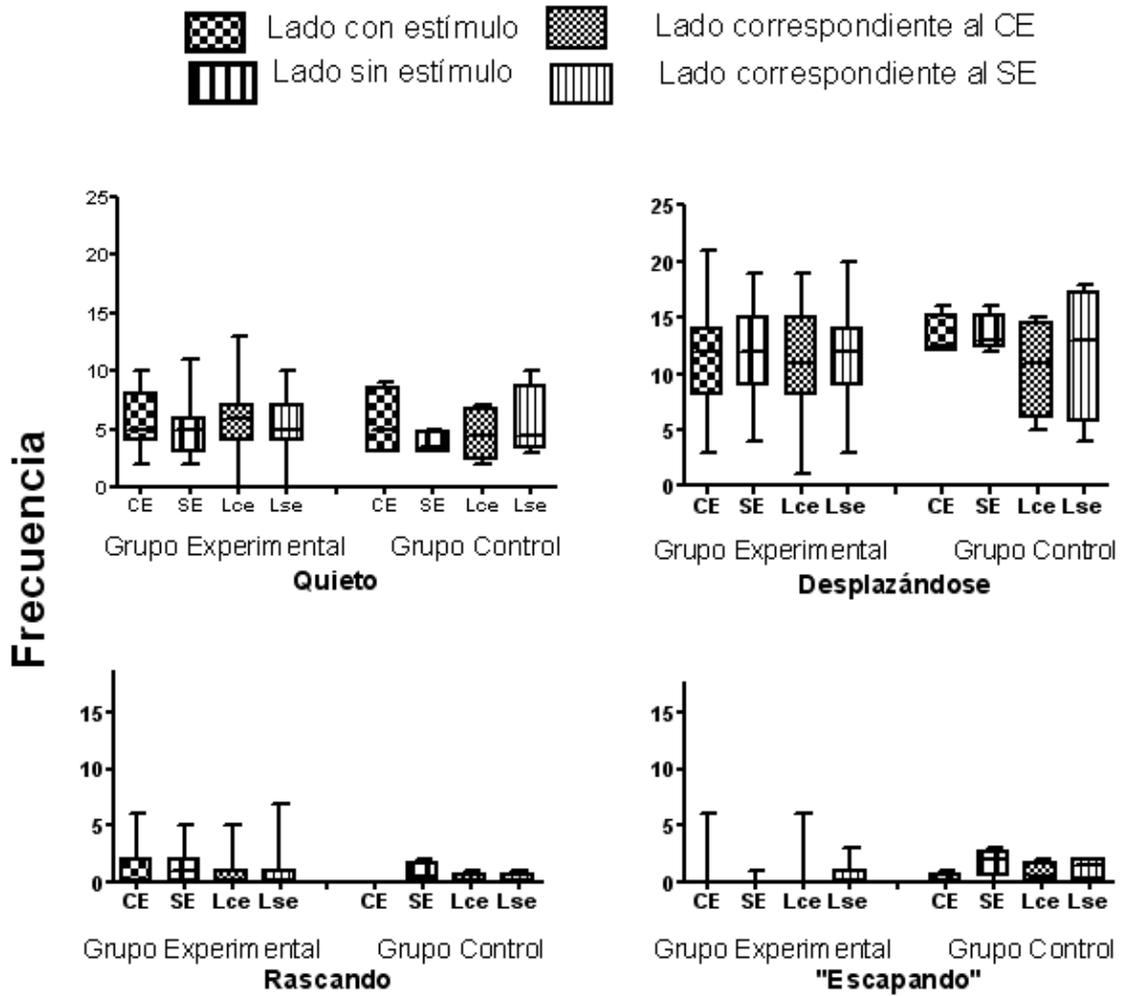


Fig. 6.4 Se compara las frecuencias de cada conducta tanto en la condición con Chanel N° 5 como en la condición Control, así como la frecuencia con la que los sujetos realizan las conductas en cada lado de la arena, con o sin estímulo. Las líneas horizontales dentro de las cajas son medianas, las cajas representan el rango de los intercuartiles y los bigotes muestran el rango total (n=19 animales experimentales, n= 4 animales control). CE= lado con estímulo, SE= lado sin estímulo, Lce =lado correspondiente al lado con estímulo (condición Control) y Lse = lado correspondiente al lado sin estímulo (condición Control).

Para el experimento prenatal con terpenos de naranja, los resultados fueron similares. Debido a que la desviación estándar fue menor en el día 3 y a para hacer una mejor comparación con los gazapos condicionados con Chanel N° 5, los resultados reportados a continuación sólo representan los experimentos del día 3.

Los gazapos del tratamiento con terpenos de naranja tampoco mostraron preferencia por alguno de los lados de la arena, ya fuera cuando el olor experimental estaba presente o durante la condición Control (84 ± 21.1 seg en el lado con el estímulo y 95.8 ± 21 seg en lado sin el estímulo, en condición con terpenos de naranja; 86 ± 25.9 seg en el lado correspondiente al lado con estímulo y 88.6 ± 27.1 seg en el lado correspondiente al lado sin estímulo, en condición Control). Para la camada control los resultados fueron similares. Tanto en la presencia del olor experimental, como en la condición Control, los gazapos pasaron tiempos parecidos en el lado con olor y en el lado sin olor (75.6 ± 29.3 seg y 103.5 ± 28.3 seg, en presencia de los terpenos de naranja; 107.1 ± 41.2 seg y 72.5 ± 41.9 seg, en la condición control).

En cuanto a las conductas realizadas, se observó que tanto el grupo experimental como el grupo control, pasaron más tiempo desplazándose o quedándose quietos en comparación del tiempo que dedicaron a las conductas de escape y rascado. Así mismo, tampoco hubo diferencia en el tiempo o en el lado de la arena en la que los gazapos realizaron cada conducta cuando el estímulo experimental estaba o no presente (Fig. 6.5).

De igual manera, al comparar las frecuencias con las que los gazapos realizaron cada conducta, otra vez no se encontraron diferencias entre el lado de la arena con olor o sin olor, así como entre las camadas experimentales y la camada control (Fig. 6.6).

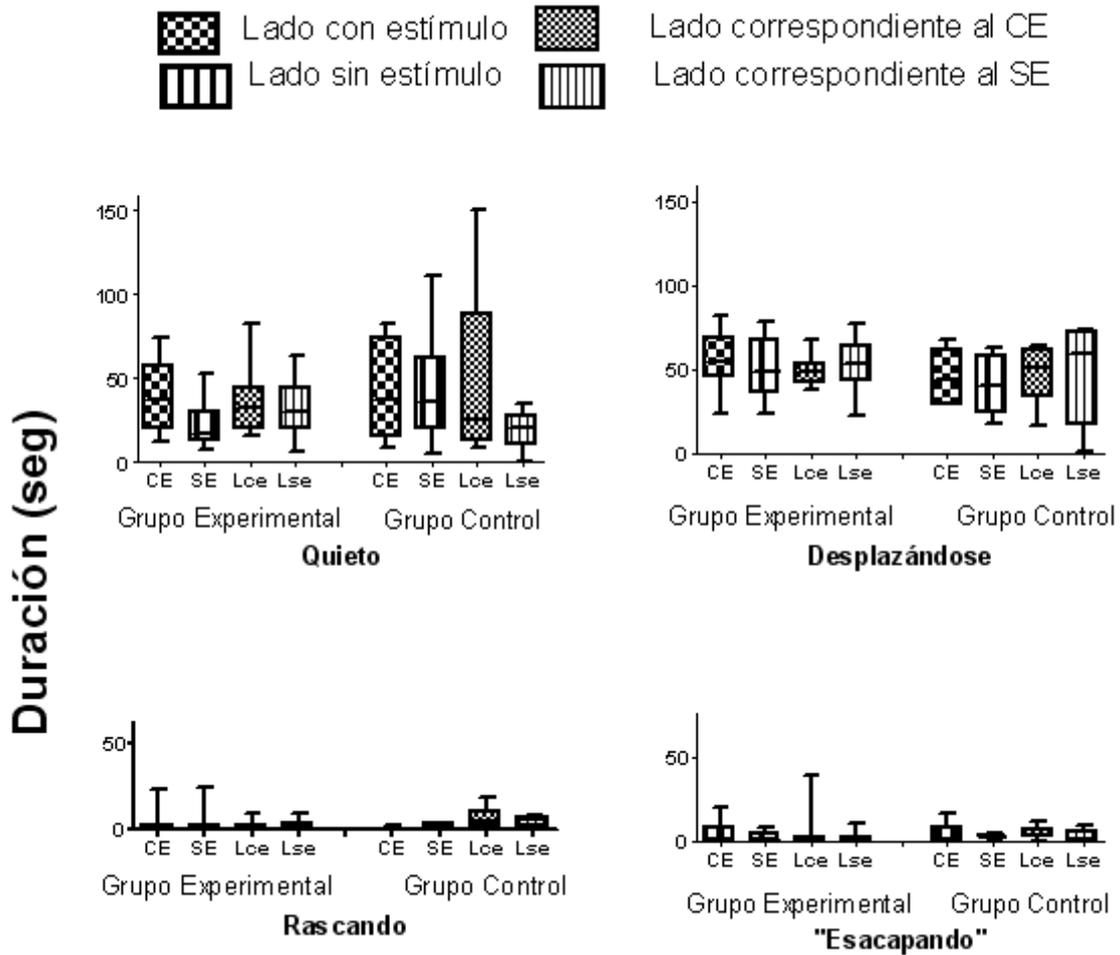


Fig. 6.5. Los segundos que los gazapos experimentales y control desplegaron cada una de las conductas registradas. Se compara la duración de cada conducta tanto en la condición con terpenos de naranja como en la condición Control, así como el tiempo que los sujetos realizan las conductas en cada lado de la arena, con o sin estímulo. Las líneas horizontales dentro de las cajas son medianas, las cajas representan el rango de los intercuartiles y los bigotes muestran el rango total (n=15 animales experimentales, n=6 animales control). CE= lado con estímulo, SE= lado sin estímulo, Lce =lado correspondiente al lado con estímulo (condición Control) y Lse = lado correspondiente al lado sin estímulo (condición Control).

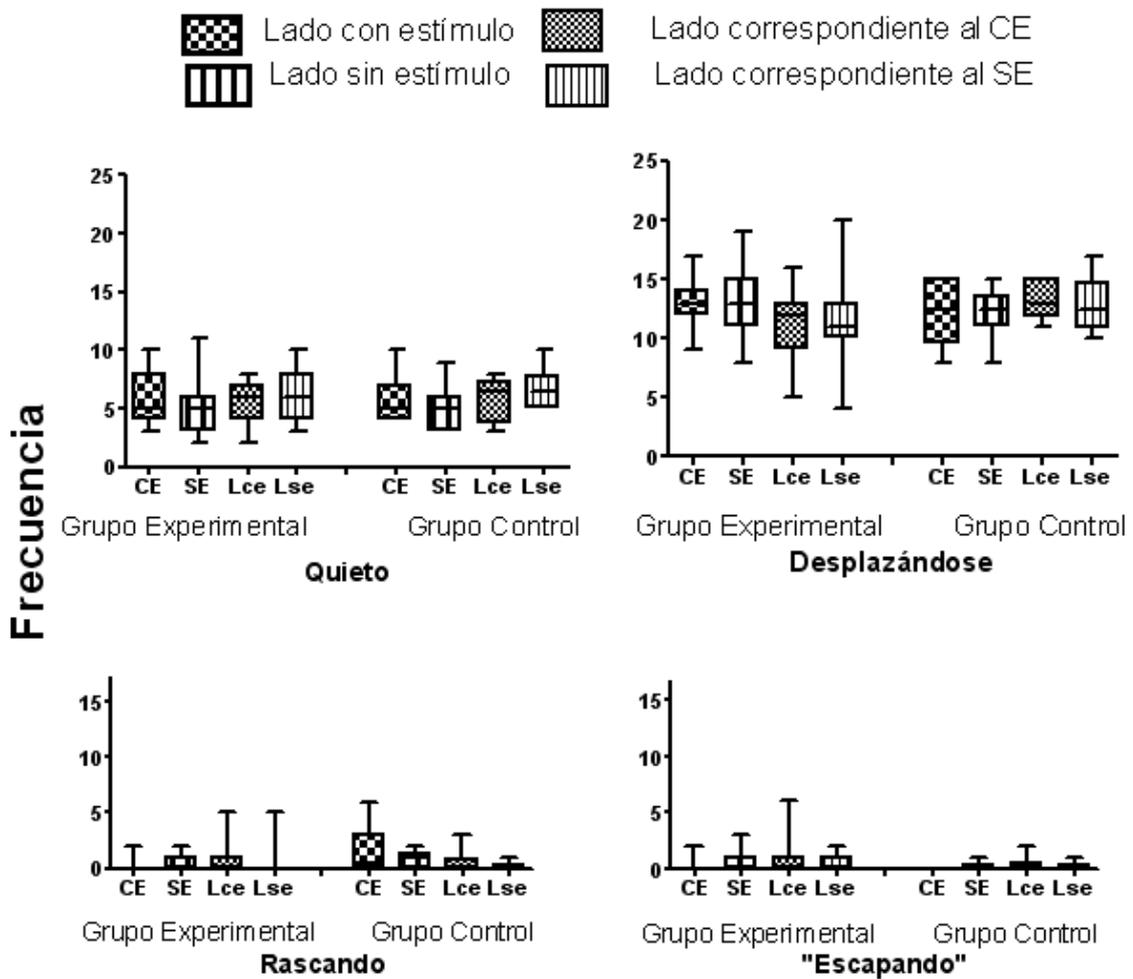


Fig. 6.6. Se compara las frecuencias de cada conducta tanto en la condición con terpenos de naranja como en la condición Control, así como la frecuencia con la que los sujetos realizan las conductas en cada lado de la arena, con o sin estímulo. Las líneas horizontales dentro de las cajas son medianas, las cajas representan el rango de los intercuartiles y los bigotes muestran el rango total. CE= lado con estímulo, SE= lado sin estímulo, LCE=lado correspondiente al lado con estímulo (condición Control) y LSE= lado correspondiente al lado sin estímulo (condición Control).

Una vez más, las respuestas que los gazapos tuvieron tanto en la condición experimental como en la condición Control, fueron tan similares, que el análisis de estadística descriptiva no mostró ninguna diferencia entre los datos de las condiciones o incluso entre los grupos experimentales, por lo que no se realizaron pruebas estadísticas de probabilidad.

6.5 Discusión

Los resultados indican que los gazapos pasaron el mismo tiempo en los dos lados de la arena, ya sea con olor, sin olor, sean grupos control o experimentales, con exposición prenatal a los terpenos de naranja o condicionados con Chanel N° 5.

Los gazapos parecían estresados intentaban escapar, escalar las paredes de la arena y rara vez se quedaban quietos en un solo lado de la arena. El extractor pudo haber formado una pequeña brisa que de hecho estresaba más a los gazapos. El hecho de que los odorantes fueran presentados en las paredes de la arena y no directamente dentro del pelo en el piso, como en estudios previos (Kindermann *et al.* 1994, Allingham *et al.* 1999, Hudson *et al.* 2002, Garay 2004), puede haber contribuido a que los gazapos no permanecieran más tiempo dentro del área con el estímulo experimental. Al recorrer la arena, los gazapos pasaban mayor tiempo en las esquinas de ésta y en particular en cualquiera de los brazos, pasando hasta un minuto en una sola esquina. Es posible que el material con el que se construyó la arena no haya sido el adecuado, puesto que los olores se impregnan en el cartón, contaminando la arena experimental. Ya que los gazapos parecían estar estresados y las conductas que se observaban fueron erráticas, se decidió volver a trabajar con una arena de prueba que tuviera un diseño más simple y que éste se acercara a arenas que en el pasado han resultado ser efectivas en el estudio del aprendizaje de olores en las crías del conejo (Kindermann *et al.* 1994, Semke *et al.* 1995, Allingham *et al.* 1999, Hudson *et al.* 2002, Garay 2004).

Aunque la solución de terpenos de naranja que se dio a beber a las hembras gestantes fue preparada según las recomendaciones de la industria química en alimentos (Heldman y Lund 1992), las hembras no bebieron normalmente, por lo que se decidió cambiar a otra sustancia que hubiera sido usada previamente.

7. ARENA FINAL

Ya que los primeros dos prototipos no mostraron ser efectivos para el estudio del aprendizaje perinatal de olores en las crías del conejo, se decidió regresar a un modelo que se acercara más a las arenas de prueba que se han usado en estudios previos y que al mismo tiempo integrara lo aprendido durante los estudios con las dos pruebas anteriores. Finalmente, se procuró tanto evitar las conductas que pueden estar relacionadas a niveles altos de ansiedad o estrés como lo es el “escape”, como promover la conducta de búsqueda de pezón.

Se introdujo un cuarto grupo experimental, constituido por gazapos que fueron condicionados postnatalmente con la misma sustancia que se usó en el tratamiento prenatal, con el objetivo de determinar si los gazapos pueden aprenderlo. Ya que en estudios recientes se manipuló exitosamente el olor de la dieta de hembras gestantes al agregar una solución de extracto de comino al agua que bebían y después se reportó la preferencia postnatal de los gazapos hacia dicho olor (Coureaud *et al.* 2002), se decidió usar el comino como la sustancia experimental del grupo prenatal.

7.1. Diseño de la arena

La arena final fue de forma oval, para que, al no haber esquinas, los gazapos no quedaran “atrapados” en éstas. Las paredes medían 7 cm de altura, el eje mayor 25 cm y el eje menor 17 cm. Dichas dimensiones, que definen la superficie de la arena, eran parecidas a las del vientre de una coneja madura, por lo que se esperó que las crías no tuvieran dificultades para recorrerla. Además de que un mayor tamaño permitiría aumentar la separación entre el lado con el estímulo y el lado sin olor, por lo que la evolución de la orientación de los gazapos sería más clara. La arena se formó a partir de una sola pieza de vidrio de borosilicato (Pyrex) y en la base se colocó un pedazo de piel real de conejo (Figs. 7.1 y 7.2). El vidrio permitió

que la arena fuera limpiada periódicamente, previniendo que los olores se impregnaran en ésta. Además, se calentó el piso de la arena de manera uniforme (36°C), al colocarla sobre un contenedor con agua caliente (baño María).

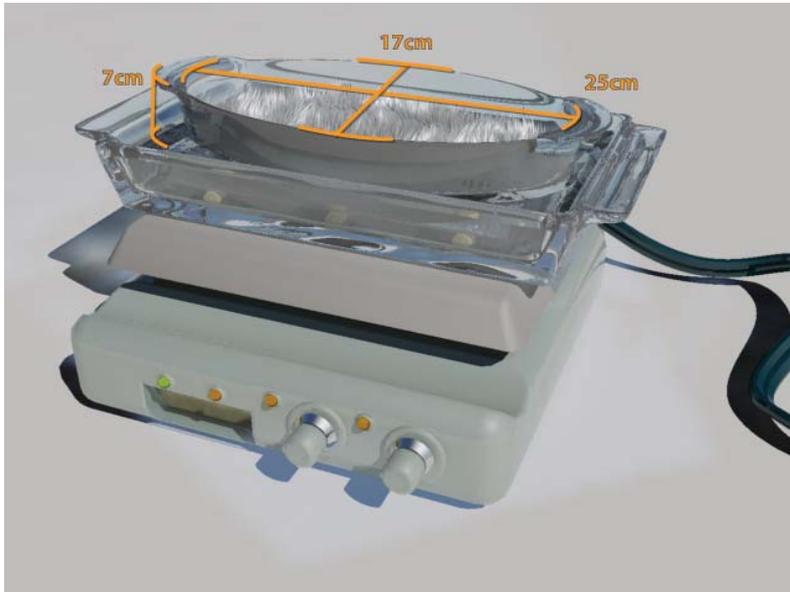


Fig. 7.1 Esquema de la arena final. La arena era sostenida dentro de un contenedor con agua mientras ésta se calentaba por medio de una plancha (Corning 6795-220). La superficie de la piel de conejo alcanzaba una temperatura de 36° C.

7.2. Procedimiento experimental

Animales

En los experimentos con la arena final se usaron un total de 125 gazapos de 24 camadas. Para el caso de los gazapos que fueron condicionados se trabajó con las crías a partir del día 0 hasta el día 4. Es preciso indicar que, debido a la repentina disminución en la natalidad de la colonia de conejos del laboratorio, tres camadas (dos del grupo condicionado con Chanel N° 5 y una del grupo condicionado con comino) fueron condicionadas a partir del día 4 después de que fueron utilizadas como controles en otros estudios conductuales de termotaxia. Se trabajó con los gazapos del grupo de aprendizaje incidental el día 1 (cuatro camadas) y el día 3 (cinco camadas), para tener continuidad con los gazapos del grupo prenatal del prototipo 2. Se registró el peso de cada gazapo al nacer (55.6 ± 10.9 g) así como antes y

después de cada episodio de amamantamiento y se trabajó con los gazapos más pesados de cada camada.

Tratamiento

Se trabajó con cuatro grupos experimentales:

- 1) Tratamiento postnatal (condicionamiento clásico), condicionamiento con Chanel N° 5 durante tres eventos de amamantamiento (n= 30); (ver 4.4).
- 2) Tratamiento postnatal (condicionamiento clásico), condicionamiento con comino durante tres eventos de amamantamiento (n= 30); (ver 4.4).
- 3) Tratamiento prenatal (aprendizaje incidental), a partir de la 3° semana de gestación las madres bebieron diariamente una solución de comino mezclada en el agua y se alimentaron de croquetas que habían sido espolvoreadas con polvo de comino (n= 35);(ver 4.5).
- 4) Tratamiento control, los gazapos no se condicionaron ni se les administró ningún odorante experimental durante la gestación o durante el amamantamiento (n= 30).

Pruebas conductuales

Independientemente del tratamiento, el día de prueba se introdujo a los gazapos en la arena experimental uno por uno con un orden determinado. Cada gazapo fue sometido a la prueba conductual dos veces, esperando aproximadamente treinta minutos antes de ser colocado en la arena por segunda ocasión. Dentro de una misma camada, cada gazapo fue presentado con dos de tres condiciones posibles. En una condición, el estímulo aprendido (Chanel N° 5 o comino, según fuera el caso) estaba presente en una de las dos mitades de la arena, en otra condición había un estímulo olfativo desconocido (comino para el tratamiento 1 y Chanel N° 5 para los tratamientos 2 y 3), mientras que en la condición “nada” no había ningún estímulo olfativo experimental dentro de la arena.

Tabla 7.1 Orden de las pruebas de los gazapos de cada camada en la arena final (ejemplo para una camada de 6 gazapos)

Gazapo	1a Condición	2a Condición
#1	Chanel N # 5	Comino
#2	Comino	Chanel N # 5
#3	Nada	Chanel N # 5
#4	Chanel N # 5	Nada
#5	Nada	Comino
#6	Comino	Nada

Cada estímulo se puso directamente en la piel de conejo. Se usaron un total de tres pieles, una para cada condición: Chanel No. 5, comino y control. En el caso de las pieles con un olor experimental, se aplicó éste sólo en una de las dos mitades de la piel en la forma de tres puntos separados uno del otro por 1 cm (Fig. 7.2). Después de cada sesión de prueba, las pieles se dejaban airear, para evitar que los olores se fijaran en las dos mitades de las pieles de manera uniforme. Se colocó a los gazapos a lo largo del eje menor de la arena y se les dejó libres. Las pruebas conductuales duraron 180 seg y fueron grabadas en video formato VHS para el análisis posterior de las conductas definidas en 7.3.

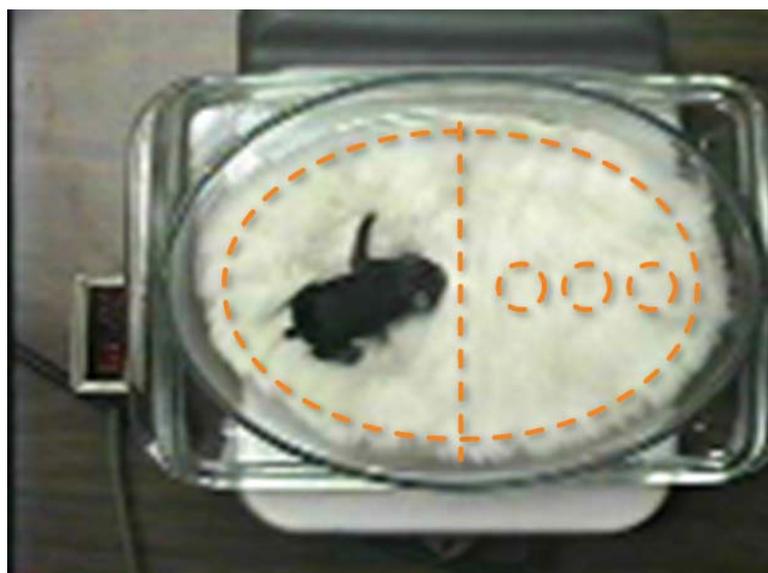


Fig. 7.2. Gazapo en la arena de prueba. Las líneas punteadas delimitan el perímetro y los dos lados de la arena. Los círculos punteados representan los tres puntos dónde se aplicaba el olor experimental.

7.3. Análisis de la conducta

El análisis conductual de la grabación de cada gazapo se realizó segundo a segundo en cámara lenta, registrando las conductas en una hoja de registro (anexo 3). El área total de la arena se dividió en cuatro partes, dividiendo la arena en dos mitades por el eje menor y después cada una de las dos partes de la arena se dividió finalmente en un área central y una periférica (Fig 7.2). Se registró la presencia de los gazapos en cada una de las cuatro áreas, así como la ejecución de un total de 13 conductas específicas: búsqueda de pezón, búsqueda general, contacto con el estímulo, contacto con el lugar correspondiente del lado de la arena sin el estímulo, rascado, rascado relajado, asomar cabeza, escapar, succión, convulsiones, movimiento, así como desplazamiento y quieto; las cuales fueron delineadas previamente (ver 4.6). Sin embargo, la mayoría de las conductas registradas (rascado, escapar succión y convulsiones) se presentaron con una frecuencia muy baja, por lo que no se hizo un análisis estadístico de dichas conductas. De esta manera, el análisis estadístico se hizo sobre el tiempo que los gazapos pasaron en los diferentes cuadrantes de la arena, incluyendo solamente la conducta de búsqueda de pezón.

7.4. Resultados

Inmediatamente después de ser colocados en la arena, los gazapos de los cuatro grupos y diferentes condiciones experimentales empezaron a desplazarse y durante los tres minutos de prueba, recorrieron toda la superficie de la arena. Se observó que los gazapos hundían la cabeza en la piel moviéndola de arriba a bajo y de un lado a otro. En algunas ocasiones, los gazapos al quedarse inmóviles presentaron rápidos movimientos de la mandíbula, anteriormente descritos como succión y después de unos segundos de permanecer quietos, mostraron pequeños espasmos. Ambas conductas, aunque se presentaron con una frecuencia baja, sólo fueron observadas dentro de la arena final.

La actividad de los gazapos fue disminuyendo paulatinamente, siendo significativamente más baja durante el tercer minuto de prueba que durante el primer minuto (Friedman ANOVA: $F = 68.3$ $n = 3$ $p < 0.0001$) y manteniendo dicha tendencia incluso en la segunda prueba ($F = 86.8$, $n = 3$, $p < 0.0001$) (Fig. 7.3).

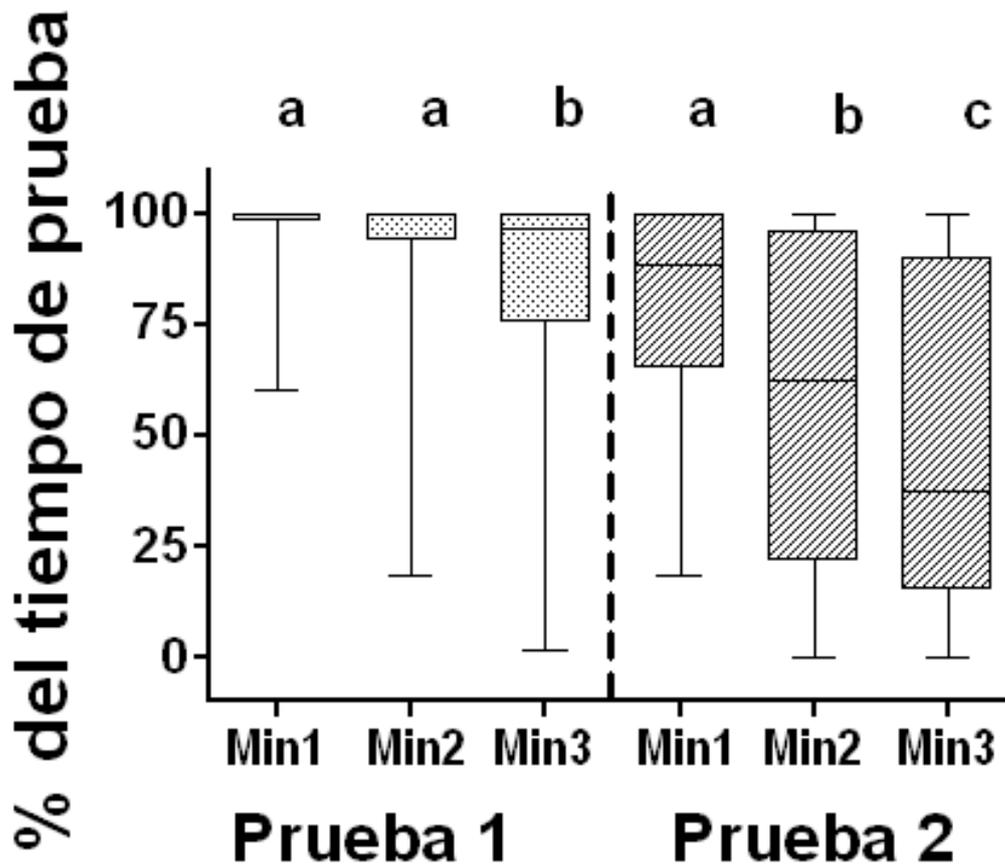


Fig. 7.3. El tiempo que los gazapos (incluyendo todos los grupos) se mantuvieron activos durante cada minuto de cada una de las dos pruebas. Las líneas horizontales dentro de las cajas son medianas, las cajas representan el rango de los intercuartiles y los bigotes muestran el rango total. Las diferentes letras que están arriba de las cajas representan diferencias significativas reportadas por comparaciones múltiples *post hoc* de Dunn que se hicieron después de la prueba ANOVA de Friedman para las pruebas 1 y 2.

Ya que la actividad disminuyó significativamente después del segundo minuto, tanto para la primera prueba como para la segunda, se decidió hacer los siguientes análisis estadísticos sólo para los datos registrados en el primer minuto de la primera prueba.

Al comparar con una prueba ANOVA de Kruskal-Wallis el porcentaje del tiempo que los gazapos pasaron en el lado de la arena con el olor experimental en cada una de las tres condiciones (nada, con Chanel N° 5, y con comino), se encontró que para el grupo condicionado con Chanel N°5 hubo una diferencia significativa entre las tres condiciones ($H= 6.0$, $n = 46$, $df= 2$, $p < 0.05$). Sin embargo, la diferencia en el tiempo que pasaron en el lado con olor y el lado sin olor sólo fue significativa en la condición con Chanel N°5 vs. sin olor (comparación múltiple *post hoc* de Dunn $p < 0.05$), aunque también se observó cierta tendencia a pasar más tiempo del lado de la arena con olor en la condición con comino vs. sin olor. Para el caso del grupo condicionado con comino el patrón fue similar al anterior, es decir, se reportó una diferencia significativa entre las condiciones ($H= 13.70$, $n = 29$, $df= 2$), aunque sólo lo fue para la condición con comino vs. sin olor ($p < 0.001$). Tanto el grupo prenatal (aprendizaje incidental) como el grupo control no pasaron significativamente más tiempo en el lado de la arena con alguno de los dos olores experimentales (Chanel N° 5 o comino) ($H= 5.7$ y 1.3 , $n = 27$ y 56 , $df= 2$, $p = 0.06$ y $p = 0.53$, respectivamente) (Fig. 7.4). En un estudio previo (Pacheco-Cobos *et al.* 2003) se demostró la tendencia de los gazapos a pasar más tiempo junto a las paredes de las arenas de prueba. Sin embargo, en el presente estudio se encontró que del tiempo que los gazapos pasaron en el perímetro de la arena, ninguno de los cuatro grupos experimentales pasaron significativamente más tiempo en el perímetro del lado con olor en ninguna de las tres condiciones ($H= 0.9$, 2.7 , 0.09 y 2.6 , $df= 2$, $p < 0.63$, 0.25 , 0.95 y 0.27 ; para los grupos Chanel N° 5, comino, comino prenatal y control, respectivamente) (Fig. 7.5.)

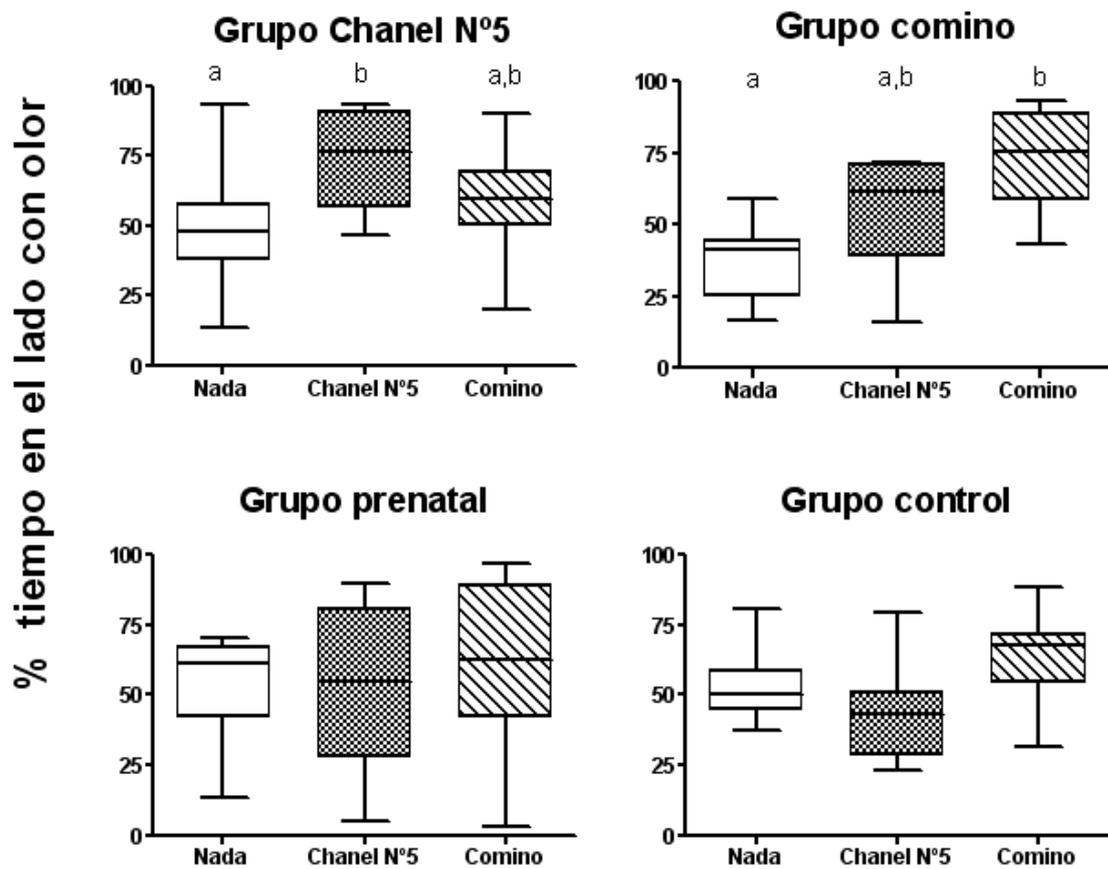


Fig. 7.4. El tiempo que los gazapos de cada grupo pasaron en el lado de la arena con el estímulo experimental, en cada una de las tres condiciones. Los datos sólo son los del primer minuto de la primera prueba. Las líneas horizontales dentro de las cajas son medianas, las cajas representan el rango de los intercuartiles y los bigotes muestran el rango total. Las diferentes letras que están arriba de las cajas representan diferencias significativas reportadas por comparaciones múltiples *post hoc* de Dunn que se hicieron después de las pruebas ANOVA de Kruskal-Wallis.

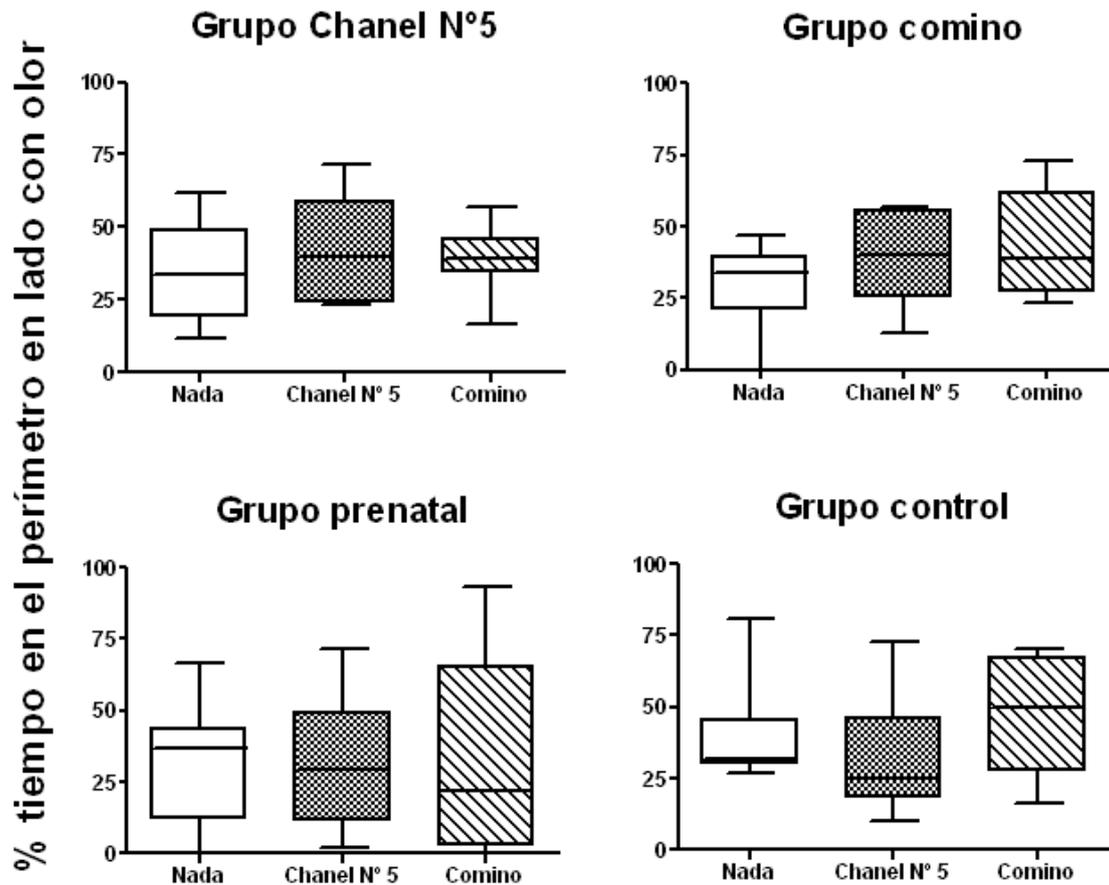


Fig. 7.5. Del tiempo que cada grupo pasó en el lado con olor, se muestra el porcentaje de éste, que los gazapos pasaron en el perímetro en cada una de las condiciones. Los datos sólo son los del primer minuto de la primera prueba. Las líneas horizontales dentro de las cajas son medianas, las cajas representan el rango de los intercuartiles y los bigotes muestran el rango total.

Al seguir con el análisis de los parámetros espaciales se encontró que del tiempo que los gazapos pasaron en el centro de la arena, los grupos Chanel N°5, prenatal y control no pasaron más tiempo en la parte central del lado con olor ($H = 0.66, 2.53$ y 0.25 $df = 2$, $p < 0.71, 0.28$ y 0.88 ; respectivamente), aunque sí se encontró una tendencia del grupo condicionado con Chanel N° 5 a pasar más tiempo en el centro de la arena en

la condición con Chanel N° 5 vs. sin olor. Sin embargo, el grupo que fue condicionado con comino, del tiempo total que pasó en el centro de la arena, sí pasó significativamente más tiempo en el centro del lado con comino ($H=7.15$, $df=2$, $p < 0.02$); (Fig. 7.6.).

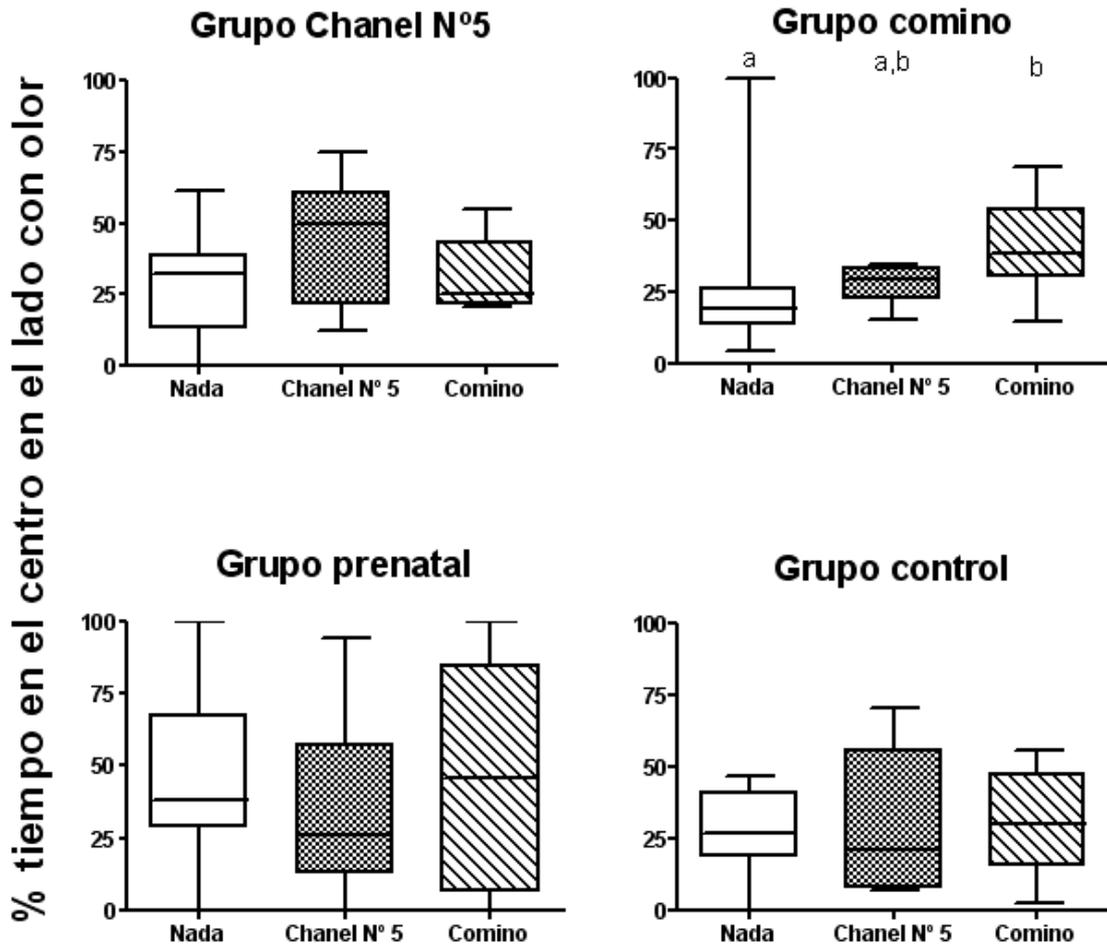


Fig. 7.6. Del tiempo que cada grupo pasó en el lado con olor, se muestra el porcentaje de éste, que los gazapos pasaron en la parte central en cada una de las condiciones. Los datos sólo son los del primer minuto de la primera prueba. Las líneas horizontales dentro de las cajas son medianas, las cajas representan el rango de los intercuartiles y los bigotes muestran el rango total. Las diferentes letras que están arriba de las cajas representan diferencias significativas reportadas por comparaciones múltiples *post hoc* de Dunn que se hicieron después de las pruebas ANOVA de Kruskal-Wallis.

Estudios previos (Hudson 1985, Hudson y Distel 1986, Hudson 1993b) mostraron que los gazapos responden ante un odorante condicionado durante el evento de amamantamiento con la conducta estereotipada de búsqueda de pezón, por lo que se analizó el tiempo que los gazapos realizaron dicha conducta en cada lado de la arena. Al hacer una prueba de rangos asignados de Wilcoxon que comparó los porcentajes de tiempo que los gazapos realizaron la conducta de búsqueda de pezón de cada lado de la arena para la condición con el olor experimental vs. sin olor, se encontró que los grupos condicionados hicieron la conducta de búsqueda de pezón significativamente más en el lado de la arena con el olor experimental que en el lado de la arena sin olor (grupo Chanel N° 5: $W = 21$, $n = 9$, $p < 0.03$, grupo comino: $W = 21$, $n = 10$, $p < 0.03$) y que dicha conducta se realizó casi exclusivamente en la parte central de la arena en contacto directo con los puntos del olor experimental. También se encontró que los gazapos de ambos grupos condicionados casi no realizaron la conducta de búsqueda de pezón cuando el olor experimental al cual no fueron condicionados estuvo presente (Fig. 7.7.). En la gráfica no se incluyen al grupo control y al grupo prenatal debido a que en ninguno de los gazapos de estos dos grupos presentó dicha conducta.

7.5. Discusión

Ya que ambos grupos condicionados postnatalmente pasaron más tiempo en el lado de la arena con el olor experimental (Chanel N° 5 y comino, respectivamente) y debido a que mostraron la conducta de búsqueda de pezón significativamente más en el lado con el olor experimental que en el lado sin olor, o en el lado con el olor experimental al que no habían sido condicionados, se puede decir que ambos grupos fueron condicionados exitosamente ya que los gazapos aprendieron a asociar el evento de amamantamiento con el olor experimental. Por lo tanto, se piensa que la arena de prueba sí permite la observación conductual del aprendizaje de olores por condicionamiento clásico.

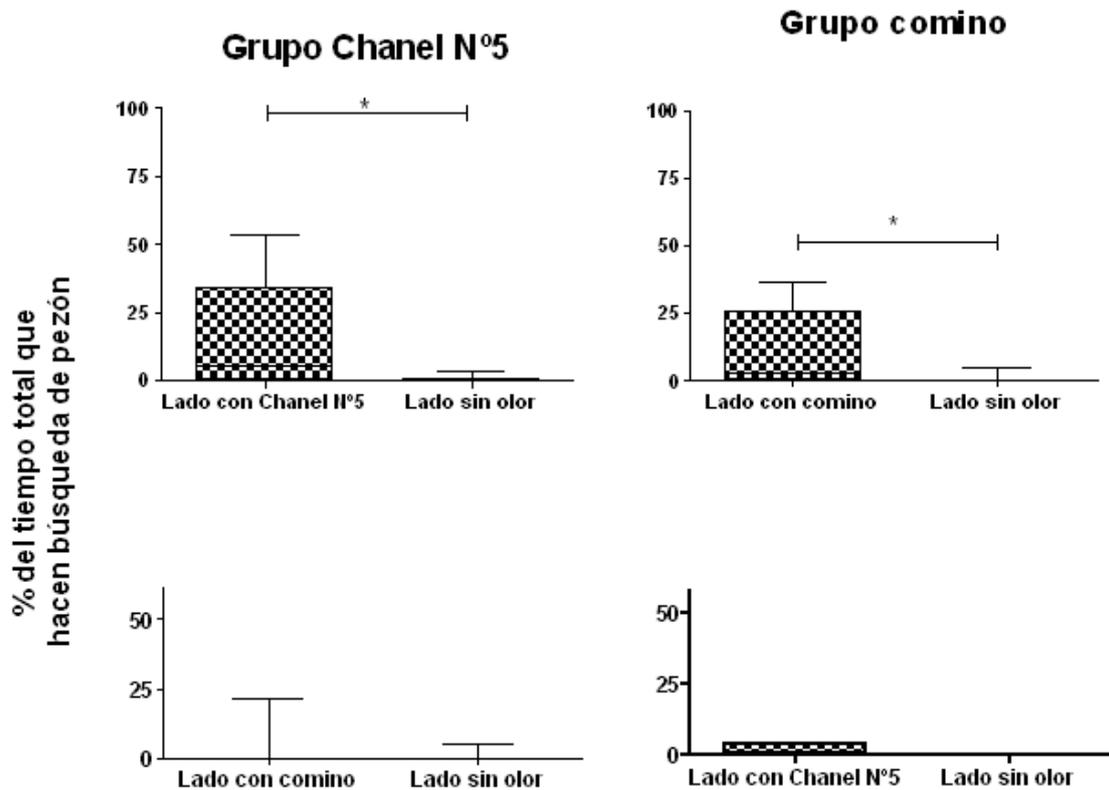


Fig.7.7. Se compara el tiempo que los gazapos condicionados hicieron la conducta de búsqueda de pezón tanto en el lado con el olor que aprendieron, como en el lado sin olor. Los datos sólo son los del primer minuto de la primera prueba. Las líneas horizontales dentro de las cajas son medianas, las cajas representan el rango de los intercuartiles y los bigotes muestran el rango total. Los asteriscos arriba de las cajas representan diferencias significativas ($p < 0.05$) reportadas por una prueba de Wilcoxon.

También se puede decir que el comino es una sustancia efectiva como estímulo condicionado, y debido a que los gazapos aprendieron el olor de éste de manera condicionada, no se puede descartar la posibilidad de que también lo aprendan de manera incidental. Sin embargo, no se observó ninguna conducta que indicara el aprendizaje incidental del comino, por lo que se puede decir que la arena final, no cuenta con las características necesarias para la expresión y observación de conductas relacionadas con este tipo de aprendizaje.

Al contrario de los resultados obtenidos en los estudios con las dos arenas de prueba anteriores, los gazapos bajaron el nivel de actividad después del primer minuto de prueba, lo cual puede ser efecto de la piel real de conejo, así como del calentamiento de la base de la arena de prueba. Los resultados obtenidos en un estudio previo sobre termotaxia (Pacheco-Cobos *et al.* 2003) revelaron la preferente orientación de los gazapos por un estímulo táctil y en gradientes térmicos, pues se mantenían junto a las paredes de las arenas y la recorrían apoyándose en éstas. Sin embargo, en el presente estudio se observó que los gazapos no pasaron mayor tiempo en el perímetro de la arena, como era de esperarse. Dicho resultado puede deberse tanto a que el estímulo táctil de la piel de conejo estaba uniformemente disponible así como al calentamiento uniforme de la base de la arena, ya que al colocar la piel de conejo y al calentar la base de la arena se observó que los gazapos no mostraban conductas relacionadas con niveles altos de estrés, como lo es la conducta de escape.

8. DISCUSIÓN GENERAL

Los prototipos de prueba 1 y 2 resultaron ser ineficaces para el análisis comparativo de distintos tipos de aprendizaje de olores en los gazapos. En ambos casos, las predicciones no se cumplieron. Es decir, que en ninguno de los dos prototipos los gazapos condicionados permanecieron más tiempo en el lado de la arena con el olor experimental y que tampoco presentaron la conducta de búsqueda de pezón en presencia de éste. Esto también resultó cierto para el caso de los gazapos del tratamiento prenatal (aprendizaje incidental) estudiados en el prototipo 2, los cuales no mostraron una orientación preferente hacia el lado de la arena con el estímulo experimental.

Por su parte, los resultados obtenidos de las observaciones hechas en la arena final cumplieron parcialmente con el objetivo general del presente estudio. Por un lado, los gazapos condicionados, ya sea con Chanel N° 5 o con comino, sí presentaron la respuesta estereotipada de búsqueda de pezón ante el olor experimental y también pasaron significativamente más tiempo en el lado de la arena con este olor. Sin embargo, contrario a lo esperado, los gazapos del tratamiento prenatal no pasaron más tiempo dentro del área de la arena que tenía el odorante al que fueron expuestos prenatalmente.

Dichos resultados pueden ser discutidos en varios puntos. Primero, que al parecer el tamaño de la arena es un factor que determina la efectividad de la prueba en cuanto a la preferencia de los lados. Es decir, que si la arena de prueba es demasiado pequeña, es posible que el olor experimental se encuentre distribuido por toda el área experimental, lo cual haría que los gazapos no tuvieran preferencia hacia alguno de los dos lados de ésta. En los estudios previos en los que los gazapos sí se orientaron preferentemente hacia un solo lado de la arena, las arenas de prueba median por lo menos el doble que lo que median los prototipo 1 y 2 (Semke *et al.* 1995, Coureaud y Schaal *et al.* 2000, Garay 2004).

Segundo, que ya que se ha determinado que los gazapos presentan neofobia hacia un olor desconocido (Semke *et al.* 1995, Coureaud y Schaal *et al.* 2002) y debido a que los gazapos control no presentaron aversión a los olores

experimentales (pues pasaron el mismo tiempo en ambos lados de la arena), es posible que hayan entrado en contacto con éstos antes de hacer las pruebas conductuales por contaminación en el cuarto experimental.

Tercero, que durante las pruebas de los prototipos 1 y 2 los gazapos se mantuvieron muy activos, dando vueltas continuas dentro de la arena, trepando los muros y asomando la cabeza. Es posible que estas respuestas conductuales estén relacionadas con niveles altos de estrés y que compitan con la expresión de las respuestas del aprendizaje.

Cuarto, el hecho de que los gazapos condicionados sólo hayan mostrado la conducta de búsqueda de pezón en la arena final, se puede deber a que en esta arena el estímulo condicionado estaba acompañado tanto de un estímulo táctil (la piel real de conejo), como de un estímulo térmico. Dicho supuesto se apoya en los resultados de estudios previos que determinan que los gazapos dependen en gran medida de estímulos termotáctiles para orientarse en el medio (Pacheco-Cobos *et al.* 2003). Así mismo se apoya en la idea de que aunque el condicionamiento clásico se basa en la asociación de dos estímulos, es posible que en un contexto “natural” (no controlado) la asociación se forme entre varios estímulos, y que de hecho se asocie un estímulo con un contexto (Leahey y Harris 2001, Mazure 2006). Es de esta manera que Rescola (1988 citado en Leahey y Harris 2001) ha definido al condicionamiento clásico como un proceso adaptativo complejo mediante el cual los organismos captan y usan la información sobre las relaciones predictivas que existen entre estímulos y eventos para así, elegir respuestas que son biológicamente adaptativas. De modo que, es posible que durante el amamantamiento los gazapos asocien leche tanto con la feromona de búsqueda de pezón, como con el pelo o la piel de la hembra lactante, la temperatura corporal de ésta, así como con los pezones y finalmente con otros olores que están presentes en ese momento (Distel y Hudson 1985, Bilkó *et al.* 1994). Es probable, entonces, que si sólo se presenta uno de los estímulos que forma parte de un contexto complejo, no se presente la respuesta condicionada. Esto también es cierto para el aprendizaje de olores, ya que el contexto dentro del cual se aprende un olor

es especialmente importante (Schaal *et al.* 2000, Beauchamp y Bartoshuk 1997, Hudson y Distel 2002).

Finalmente, se puede decir que al término de éste estudio se determinó que las pruebas subsecuentes deberían ser de una duración de un minuto, pues es dentro de este tiempo que los gazapos se muestran más activos. Así mismo, se reconoció la efectividad de la forma ovalada de la arena, que al no tener esquinas, evita que los gazapos pasen mayor tiempo en éstas, como lo hacían en pruebas anteriores. Además, se hizo evidente la necesidad de hacer pruebas con un número mayor de sujetos experimentales, ya que la variabilidad, tanto en habilidad motora, estado de maduración, peso al nacer, como el desarrollo de los sistemas sensoriales, aún dentro de una misma camada es muy grande (Michel y Moore 1995).

En base a la discusión y de acuerdo con los resultados obtenidos se concluyeron dos puntos. En primer lugar, se concluyó que al estudiar el aprendizaje asociativo es necesario proveer los estímulos adicionales que se encontraban dentro del contexto en el que se dio el aprendizaje. En segundo lugar, que según la experiencia de este estudio, para que los gazapos desplieguen las conductas que denotan aprendizaje por medio del condicionamiento clásico es necesario que en la prueba conductual no haya “elementos” que puedan desencadenar conductas relacionadas con niveles altos de estrés; pero que al mismo tiempo cuente con los estímulos necesarios para recrear el contexto en el que se dio el condicionamiento. Asimismo, se cree que para estudiar el aprendizaje incidental de un estímulo específico en los gazapos es necesario que en la arena de prueba sólo se presente dicho estímulo sin incluir estímulos adicionales (termo táctiles, por ejemplo). Es decir, que los contextos dentro de los que se puede estudiar el condicionamiento clásico y el aprendizaje incidental de olores en los gazapos son fundamentalmente diferentes e inclusive mutuamente excluyentes, por lo que las respuestas conductuales de éstos no se pueden presentar bajo un mismo arreglo experimental.

9. REFERENCIAS

Agosta W (1992) Chemical communication: The language of pheromones
Scientific American Library, New York

Albäckér V, Hudson R, Bilkó Á (1995) Rabbit mother's diet influences pups' later food choice. *Ethology* 99: 107-116

Alcock J (1998) Animal behavior: An evolutionary approach. 6ª edición.
Sinauer Associates, Boston, pp 87-124

Allingham K, Brennan PA, Distel H, Hudson R (1999) Expression of c-Fos in the main olfactory bulb of the neonatal rabbit in response to garlic as a novel and conditioned odour. *Behav Brain Res* 783: 210-218

Barinaga M (1999) Salmon follow watery odors home. *Science* 286: 705-706

Bautista A, Drummond H, Martínez-Gómez M, Hudson R (2003) Thermal benefit of sibling presence in the newborn rabbit. *Dev Psychobiol* 43: 208-215

Bautista A, Mendoza-Degante M, Coureaud G, Martínez-Gómez M, Hudson R (2005) Scramble competition in newborn domestic rabbits for an unusually restricted milk supply. *Anim Behav* 70: 1011-1021

Beauchamp G, Bartoshuk L (1997) Tasting and smelling. 2ª edición.
Academia Press, San Diego

Bilkó Á, Albäckér V, Hudson R (1994) Transmission of food preference in the rabbit: the means of information transfer. *Physiol Behav* 56: 907-912

Caldelas I, Chimal-Monroy J, Matínez-Gómez M, Hudson R (2005) Non-photic circadian entrainment in mammals: A brief review and proposal for study during development. *Biol Rhythm Res* 36: 23-37

Coureaud G, Schaal B (2000) Attraction of newborn rabbits to abdominal odors of adult conspecifics differing in sex and physiological state. *Dev Psychobiol* 36 : 271-281

Coureaud G, Schaal B, Coudert P, Rideaud P, Fortun-Lamothe L, Hudson R, Orgeur P (2000) Immediate postnatal sucking in the rabbit: Its influence on pup survival and growth. *Reprod Nutr Dev* 40: 19-32

Coureaud G, Schaal B, Hudson R, Orgeur P, Coudert P (2002) Transnatal olfactory continuity in the rabbit: Behavioral evidence and short-term consequence of its disruption. *Dev Psychobiol* 40: 372-390

Degel J, Köster E P (1999) Odors: Implicit memory and performance effects. *Chem Senses* 24: 317-325

Distel H, Hudson R (1985) The contribution of the olfactory and tactile modalities to the performance of nipple-search behaviour in newborn rabbits. *J Comp Physiol A* 157: 599-605

Drummond H, Vázquez E, Sánchez-Colón S, Martínez-Gómez M, Hudson R (2000) Competition for milk in the domestic rabbit: Survivors benefit from littermate deaths. *Ethology* 106: 511-526

Dudai Y (1990) *Neurobiology of memory: Concepts, findings, trends*. Oxford University Press, New York

Galef B (2003) "Tradicional" foraging behaviors of brown and black rats (*Rattus norvegicus* and *Rattus rattus*). En: Frigaszy D, Perry S (eds) *The*

biology of traditions. Models and evidence. Cambridge University Press, Edinburgh, pp 159-186

Garay E (2004) ¿Pueden gazapos del conejo europeo, *Oryctolagus cuniculus*, orientarse hacia el nido por el olor? Tesis de licenciatura. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México

González-Mariscal G (2001) Neuroendocrinology of maternal behaviour in the rabbit. *Horm Behav* 40: 125-132

Gottlieb G (1971) Ontogenesis of sensory function in birds and mammals. En: Tobach E, Aronson L, Shaw E (eds) *The biopsychology of development*. Academic Press, New York, pp 67-128

Heldman D, Lund D (1992) *Handbook of food engineering*. Food science and technology. Dekker, New York, p 576

Hem A, Sannes E, Nafstand I (1987) Normal development of behaviour in rabbits. *Z Versuchstierkunde* 29: 257-264

Hofer M, Shair M y Singh P (1976) Evidence that maternal ventral skin substances promote suckling in infant rats. *Physiol Behav* 17: 131-136

Hudson R (1985) Do newborn rabbits learn the odor stimuli releasing nipple-search behavior? *Dev Psychobiol* 18: 575-585

Hudson R (1993a) Olfactory imprinting. *Current Opinion Neurobiol* 3: 548-552

Hudson R (1993b) Rapid odor learning in newborn rabbits: Connecting sensory input to motor output. *German J Psychol* 17: 255-267

Hudson R (1999) From molecule to mind: The role of experience in shaping olfactory function. *J Comp Physiol A* 185: 297-304

Hudson R, Distel H (1982) The pattern of behaviour of rabbit pups in the nest. *Behaviour* 79: 255-271

Hudson R, Distel H (1983) Nipple location by the newborn rabbits: Evidence for pheromonal guidance. *Behaviour* 81: 260-275

Hudson R, Distel H (1984) Nipple-search pheromone in rabbits: Dependence on season and reproductive state. *J Comp Physiol A* 155: 123-129

Hudson R, Distel H (1986) Olfactory guidance of nipple-search behaviour in the newborn rabbit. En: Breipohl W (ed) *Ontogeny of olfaction: Principles of olfactory maturation in vertebrates*. Springer-Verlag New York, pp 243-254

Hudson R, Distel H (1987) Regional autonomy in the peripheral processing of odor signals in newborn rabbits. *Brain Res* 421: 85-94

Hudson R, Distel H, Zippel HP (1990) Perceptual performance in peripherally reduced olfactory systems. En: Schild D (ed) *Chemosensory information processing*. Springer, Berlin Heidelberg New York, pp 259-269

Hudson R, Bilkó Á, Altbäcker V (1996) Nursing, weaning and the development of independent feeding in the rabbit (*Oryctolagus cuniculus*). *Z Säugetierkunde* 61: 39-48

Hudson R, Bachevalier J, Doupe AJ, Fanselow MS, Kuhl PK, Menzel R, Morris RGM, Rudy JW, Squire LR (1998) Group report: What does behaviour tell us about the relationship between development and learning? En: Carew TJ, Menzel R, Shatz C (eds) *Mechanistic relationships between development and learning*. John Wiley, Chichester, pp 74-92

Hudson R, Distel H (1998) The female rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) as a model for the study of mammalian reproductive processes. En: Martínez-Gómez M, Velásquez J (Coords). Bases Neurobiológicas y ecológicas de la conducta. Eds. UAT, UAM, UV, UNAM. México, pp1-14

Hudson R, Distel H (1999) The flavor of life: Perinatal development of odor and taste preferences. Schweiz Med Wochenschr 129: 176-181

Hudson R, Labra-Cardero D, Mendoza-Soylovna A (2002) Sucking, not milk, is important for the rapid learning of nipple-search odors in the newborn rabbit. Dev Psychobiol 41: 226-235

Hudson R, Distel H (2002) The individuality of odor perception En: Rouby C, Schaal B, Dubois D, Gervais R, Holley A (eds) Olfaction, taste and cognition. Cambridge University Press, Cambridge, pp 408-420

Issanchou S, Valentin D, Sulmont C, Degel J, Köster E P (2002) Testing odor memory: incidental versus intentional learning, implicit versus explicit memory En: Rouby C, Schaal B, Dubois D, Gervais R, Holley A (eds) Olfaction, taste and cognition. Cambridge University Press, Cambridge, pp 212-230

Jilge B (1993) The ontogeny of the circadian rhythms in the rabbit. J Biol Rhythms 8: 247-260

Kandel E, Schwartz J, Jessell T (2001) Principios de neurociencias. 4ª edición. McGraw-Hill, Madrid, pp 625-636, 1227-1246

Keil W, Stralendorff F v, Hudson R (1990) A behavioral bioassay for analysis of rabbit nipple-search pheromone. Physiol Behav 47: 525-529

Kindermann U, Gervais, R Hudson (1991) Rapid odor conditioning in newborn rabbits: Amnesic effects of hypothermia. *Physiol Behav* 50: 457-460

Kindermann U, Hudson R, Distel H (1994) Learning of suckling odors by newborn rabbits declines with age and suckling experience. *Dev Psychobiol* 27: 11-122

Leahey T, Harris R (2001) *Learning and cognition*. 3ª edición. Prentice Hall, New Jersey, pp 65-134

Lieberman D (2004) *Learning and memory*. Thomson Wadsworth, Belmont CA, pp 32-42

Malakoff D (1999) Following the scent of avian olfaction. *Science* 286: 704-705

Mazure J (2006) *Learning and behavior*. 6ª edición. Prentice Hall, New Jersey, pp 200-223

Michel G, Moore C (1995) *Developmental psychobiology. An interdisciplinary science*. The MIT Press, Boston, pp 289-440

Mykytowycz R (1968) Territorial marking by rabbits. *Sci Amer* 218: 116-126

Mykytowycz R, Goodrich B, Hesterman E (1984) Methodology employed in studies of odour signals in wild rabbits *Oryctolagus cuniculus*. *Acta Zool Fennica* 171: 71-75

Pacheco-Cobos L, Rosetti M, Distel H, Hudson R (2003) To stay or not to stay: the contribution of tactile and thermal cues to coming to rest in newborn rabbits. *J Comp Physiol A* 189: 383-389

Rehn B, Breipohl W, Mendoza AS, Apfelbach R (1986) Changes in granule cells of the ferret olfactory bulb associated with imprinting on prey odours. *Brain Res* 373: 114-25

Shaal B, Marlier L, Soussignan (1995) Responsiveness to the odour of amniotic fluid in the human neonate. *Biol Neonate* 67: 397-406

Schaal B, Soussignan R, Marlier L (2002) Olfaction and cognition at the start of life: The perinatal shaping of selective odor responsiveness. En: Rouby C, Schaal B, Dubois D, Gervais R, Holley A (eds) *Olfaction, taste and cognition*. Cambridge University Press, Cambridge, pp 421-440

Schaal C, Coureaud G, Langlois D, Ginies C, Sémon E, Perrier G (2003) Chemical and behavioural characterization of the rabbit mammary pheromone. *Nature* 424: 68-72

Semke E, Distel H, Hudson R (1995) Specific enhancement of olfactory receptor sensitivity associated with fetal learning of food odors in the rabbit. *Naturwissenschaften* 82: 148-149

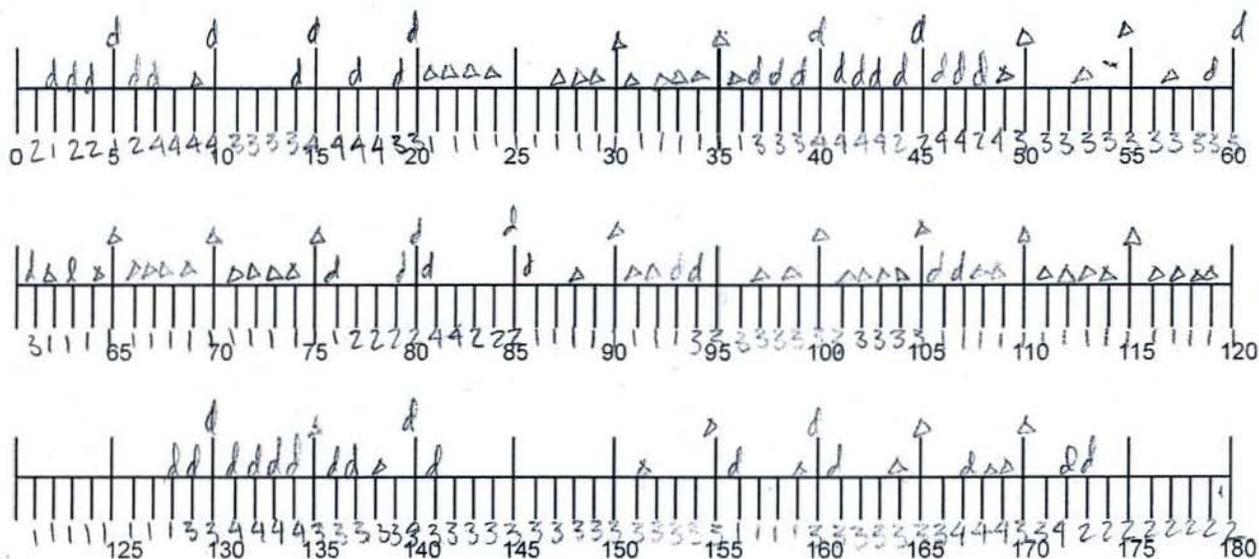
Tarpy R (2000) *Aprendizaje: Teoría e investigación contemporáneas*. McGraw-Hill, Madrid, pp 354-399

Teicher M, Blass E (1977) First suckling response of the newborn albino rat: The roles of olfaction and amniotic fluid. *Science* 198: 635-636

10. ANEXOS

Anexo 1 Hoja de registro de respuestas a un estímulo olfativo

Proyecto: Prototipo 1	Camada: 320
Fecha: 15/ julio / 2004	Hembra: 193
Hora: 12:427	Evaluador: María
Condición: Con Chanel	Nº de video: 3 10' 15''
Sujeto: M M	Otros datos: D3 1º dcha
Peso al nacer: 57.4 gr	Peso el día de prueba: 87.7 gr



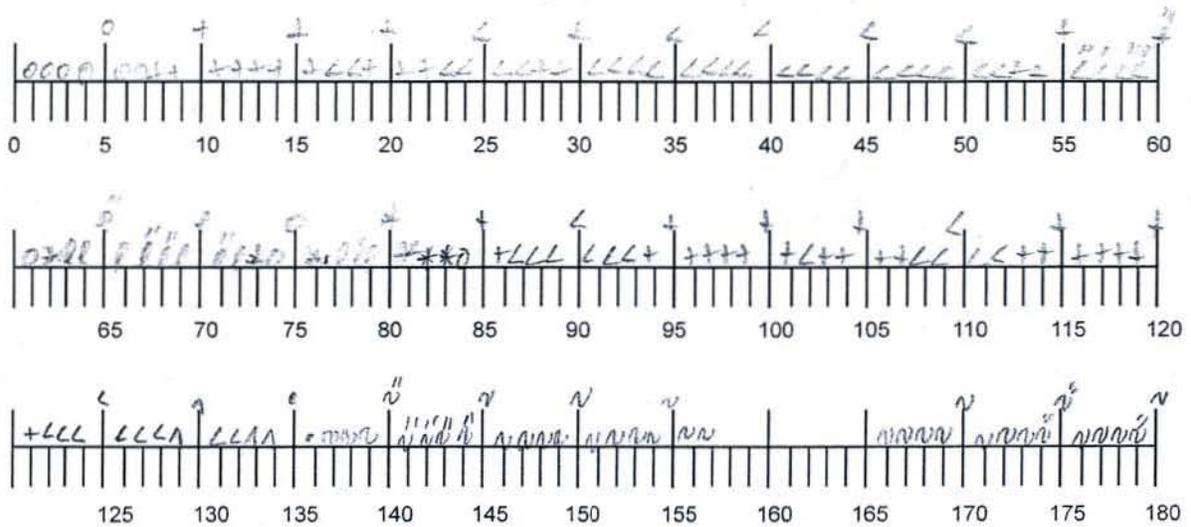
Clave de registro conductual

- | | |
|-----------------------------|----------------------------|
| C1= Cuadrante 1 (1) | C3P= Cuadrante 3 (3) |
| C2= Cuadrante 2 (2) | C4P= Cuadrante 4 (4) |
| Cco= Contacto con olor (ll) | Cso= Contacto sin olor (φ) |
| Bp=Búsqueda de pezón (b) | R= Rascar (Δ) |
| E= Escapar () | D=Desplazamiento (d) |
| Q= Quieto () | |

Anexo 2

Hoja de registro de respuestas a un estímulo olfativo

Proyecto: Prototipo 2	Camada: 330
Fecha: 15/ agosto / 2004	Hembra: 93
Hora: 12:15	Evaluable: María
Condición: Con Chanel	Nº de video: 5 47' 18''
Sujeto: N N	Otros datos: D3 1º dcha
Peso al nacer: 62.89 gr	Peso el día de prueba: 76.63 gr



Clave de registro conductual

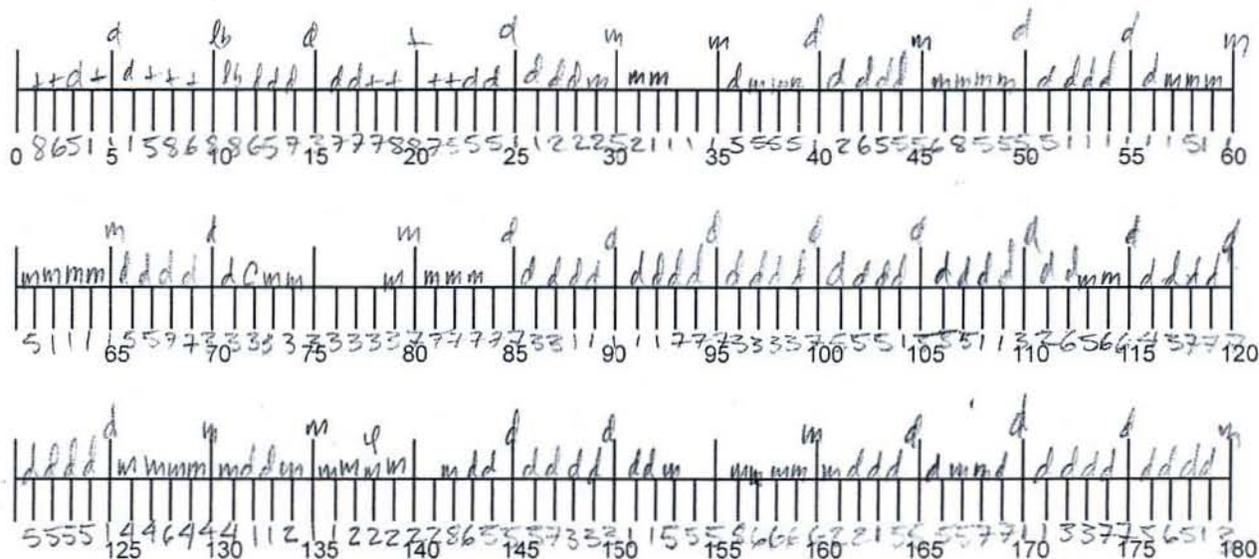
Q= Quieto ()
 Aco= Atrás con olor (++)
 Eco= Enfrente con olor (^^)
 Bco= Brazo con olor (***)
 Cco= Contacto con olor (ll)
 R= Rascar (////)

M= moviendose (____)
 Aso= Atrás sin olor (<<)
 Eso= Enfrente sin olor (^ ^)
 Bso= Brazo sin olor (" ")
 Cso= Contacto sin olor (≈)
 E= Escapar (| |)

Anexo 3

Hoja de registro de respuestas a un estímulo olfativo

Proyecto: Arena Final	Camada: 397
Fecha: 17/ junio / 2005	Hembra: 147
Hora: 11:45	Evaluador: María
Condición: Con Chanel	Nº de video: 15 10' 15''
Sujeto: M M	Otros datos: D3 1º dcha
Peso al nacer: 65.6 gr	Peso el día de prueba: 98.3 gr



Clave de registro conductual

- | | |
|-----------------------------|------------------------------|
| C1P= Cuadrante 1.1 (1) | C3P= Cuadrante 3.1 (5) |
| C1C= Cuadrante 1.2 (2) | C3C= Cuadrante 3.2 (6) |
| C2P= Cuadrante 2.1 (3) | C4P= Cuadrante 4.1 (7) |
| C2C= Cuadrante 2.2 (4) | C4C= Cuadrante 4.2 (8) |
| Cco= Contacto con olor (ll) | Cso= Contacto sin olor (φ) |
| R= Rascar (Δ) | Re= Rascar enérgicamente (r) |
| Bp= Búsqueda de pezón (b) | Ac= Asomar la cabeza (c) |
| B= Búsqueda en general (+) | S= Succión (s) |
| Q= Quieto () | E= Escapar () |
| D= Desplazamiento (d) | C= Convulsiones (/) |
| M= Movimientos (m) | |