



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

**“EFECTOS DE LAS LESIONES DEL BULBO OLFATORIO SOBRE
LA EXPRESIÓN DE LA RITMICIDAD CIRCADIANA A NIVEL
FISIOLÓGICO Y CONDUCTUAL EN CONEJOS EN DESARROLLO”**

**TESIS
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA**

**PRESENTA
JUAN ROBERTO ORTEGA BERNAL**

**ASESORA
Dra. Ivette Caldelas Sánchez**

México, D.F.

2016



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

“El trabajo que nunca se empieza es el que más tarda en terminarse”

J. R. R. Tolkien.

DEDICATORIA

A mis padres, **Juan y Lucero** que siempre me han aconsejado y guiado para ser una gran persona y profesionalista, a pesar de las diferencias y las vicisitudes por las cuales hemos atravesado, sin ustedes no podría haber logrado nada de esto.

A mi hermana **Mara**, sabes que puedes contar conmigo siempre, a pesar de nuestras diferencias y enojos. Espero que todo mi proceso para conseguir esta tesis te sirva de experiencia.

A mis amigos Erika, Gerardo, Ernesto, Guillermo, Apolinar y Luis, que a pesar de las dificultades, el trabajo, la distancia, la escasez de tiempo; hemos permanecido juntos en las buenas y en las malas. Por todas aquellas cosas que hemos vivido juntos y nos faltan por vivir.

A la memoria de mi abuelo Nacho, que me dejó grandes recuerdos, el amor por la lectura e historias llenas de grandes lecciones.

Por último, a ti Valeria por todo el amor, los consejos, las palabras de aliento y las constantes correcciones ortográficas;

“Que las estrellas brillen para ti hasta el final de tu camino” (Tolkien, 1954).

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Ivette Caldelas por haberme abierto las puertas del mundo de la investigación, por toda la confianza, por todas las horas en las que me apoyó corrigiendo, editando, analizando los cientos de datos para llevar a su conclusión este proyecto. Por enseñarme todo lo que hoy sé sobre la cronobiología, aunque sólo sea un pequeño esbozo de la inmensidad del tema. Por su dedicación, exigencia e intensa revisión para que fuera un proyecto perfecto.

A la M. en C. Erika Navarrete Monroy por su apoyo técnico para la realización de la parte experimental de esta tesis. Por apoyarme cuidando a mis animales experimentales.

A Lucero Trejo por estar dispuesta siempre a resolver esas pequeñas dudas que me surgieron a lo largo de este proyecto y por todas las correcciones para hacer de este un trabajo impecable.

A los cientos de animales que pusieron sus vidas en mis manos, sin los cuales la obtención del conocimiento sería imposible.

A todos aquellos que formaron parte de mi vida a lo largo de este proyecto y que hoy tomaron un camino diferente.

A la Dirección General de Asuntos del Personal Académico, Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (DEGAPA/PAPIT) Proyecto IN208513-3, por las becas otorgadas para la realización de esta tesis.

CONTENIDO

I. RESUMEN.....	1
II. INTRODUCCIÓN	2
II.1. Los ritmos biológicos.....	2
II.1.1. Características de los ritmos circadianos.....	4
II.2. El sistema circadiano.....	5
II.2.1. La generación de los ritmos circadianos.....	5
II.2.1.1. El núcleo supraquiasmático.....	7
II.2.1.2. El bulbo olfatorio.....	9
II.2.2. La sincronización de los ritmos circadianos.....	10
II.3. La ritmicidad circadiana en conejos en desarrollo.....	14
III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	20
IV. HIPÓTESIS.....	21
V. OBJETIVOS.....	22
V.1. Objetivo general.....	22
V.2. Objetivos específicos.....	22
VI. METODOLOGÍA.....	23
VI.1. Alojamiento.....	23

VI.2. Partos.....	24
VI.3. Grupos experimentales.....	24
VI.4. Cirugías.....	25
VI.4.1. Implantación del sensor de telemetría.....	25
VI.4.2. Bulbectomías.....	26
VI.5. Registro de la temperatura corporal y de la actividad locomotora.....	27
VI.6. Amamantamiento y alimentación enteral.....	28
VI.7. Análisis histológico.....	32
VI.8. Análisis de datos.....	32
VII. RESULTADOS.....	35
VII.1. Análisis histológico.....	35
VII.2. Peso corporal.....	37
VII.3. Ingesta de leche.....	39
VII.4. Temperatura corporal.....	40
VII.4.1. Temperatura corporal diaria.....	40
VII.4.2. Patrón de la temperatura corporal.....	42
VII.4.3. Análisis de frecuencias.....	45
VII.4.4. Control de fases.....	46
VII.4.5. Duración de la anticipación.....	49
VII.4.6. Intensidad de la anticipación.....	50

VII.5. Actividad Locomotora.....	53
VII.5.1. Actividad Locomotora diaria.....	53
VII.5.2. Patrón de la actividad locomotora.....	55
VII.5.3. Análisis de frecuencias.....	58
VII.5.4. Control de fases.....	59
VII.5.5. Duración de la anticipación.....	62
VII.5.6. Intensidad de la anticipación.....	63
VIII. DISCUSIÓN.....	66
IX. CONCLUSIÓN.....	74
X. ANEXO A.....	75
XI. BIBLIOGRAFÍA.....	76

FIGURAS

FIGURA 1.- Representación esquemática de los parámetros característicos de los ritmos circadianos.

FIGURA 2.- Representación esquemática de la maquinaria molecular presente en la generación de ritmicidad circadiana en mamíferos.

FIGURA 3.- Imagen representativa de la ritmicidad presente en la actividad locomotora y temperatura corporal de los gazapos los días postnatales P15-17.

FIGURA 4.- Curvas comparativas del patrón temporal de los genes reloj *Per1*, *Bmal1* y *Cry1* en el Núcleo supraquiasmático y el Bulbo olfatorio de gazapos de 7 días de nacidos y conejos de 45 días de edad.

FIGURA 5.- Esquema representativo del protocolo de alimentación enteral y amamantamiento.

FIGURA 6.- Imágenes representativas de los cerebros y de cortes longitudinales de los cerebros de los conejos neonatos de 16 días de edad del grupo control (INT), controles alimentados enteralmente (INT+ENT), con lesiones falsas (SHAM), con lesión unilateral del bulbo olfativo (OBx-UNI) y con lesión bilateral del BO (OBx-BI) teñidos con la tinción de Nissl.

FIGURA 7.- Promedio de peso corporal en los gazapos control (INT, INT+ENT), con lesiones falsas (SHAM) y de los animales con lesiones del bulbo olfatorio (OBX-UNI, OBX-BI), durante los 15 días que duró el experimento.

FIGURA 8.- Promedio diario de la temperatura corporal del día 4 al 15 de edad postnatal de los conejos pertenecientes a los grupos intacto (INT), intactos alimentados enteralmente (INT+ENT), con lesiones falsas (SHAM) y con lesión unilateral (OBx-UNI) y bilateral (OBx-BI) de bulbo olfatorio.

FIGURA 9.- Patrón diario de la temperatura corporal de los días 4-15 de edad postnatal de un conejo representativo, de los grupos intacto (INT), intactos alimentados enteralmente (INT+ENT), con lesiones falsas (SHAM) y con lesión unilateral (OBx-UNI) y bilateral (OBx-BI) de bulbo olfatorio.

FIGURA 10.- Promedio diario por grupo de la temperatura corporal basal (P8), ante el retraso de 6 horas en la fase en el horario del amamantamiento ($-\Delta\Phi$) y en ausencia de acceso a la hembra lactante (Sin ♀); de los conejos pertenecientes a los grupos intacto (INT), intactos alimentados enteralmente (INT+ENT), con lesiones falsas (SHAM) y con lesión unilateral (OBx-UNI) y bilateral (OBx-BI) de bulbo olfatorio.

FIGURA 11.- Promedio diario de la acrofase y nadir de la temperatura corporal de los días 4 a 15 de edad postnatal de los conejos pertenecientes a los grupos intacto (INT), intactos alimentados enteralmente (INT+ENT), con lesiones falsas

(SHAM) y con lesión unilateral (OBx-UNI) y bilateral (OBx-BI) de bulbo olfatorio.

FIGURA 12.- Gráfica del promedio de la duración del incremento anticipatorio de la temperatura corporal de los gazapos pertenecientes a los grupos intacto (INT), intactos alimentados enteralmente (INT+ENT), con lesiones falsas (SHAM) y con lesión unilateral (OBx-UNI) y bilateral (OBx-BI) de bulbo olfatorio.

FIGURA 13.- Gráfica del promedio de la intensidad de la anticipación de la temperatura corporal de los gazapos pertenecientes a los grupos intacto (INT), intactos alimentados enteralmente (INT+ENT), con lesiones falsas (SHAM) y con lesión unilateral (OBx-UNI) y bilateral (OBx-BI) de bulbo olfatorio.

FIGURA 14.- Promedio diario de la actividad locomotora de los conejos en los días 4 a 15 de edad postnatal pertenecientes a los grupos intacto (INT), intactos alimentados enteralmente (INT+ENT), con lesiones falsas (SHAM) y con lesión unilateral (OBx-UNI) y bilateral (OBx-BI) de bulbo olfatorio.

FIGURA 15.- Patrón diario de la actividad locomotora de los días 4-15 de edad postnatal de un conejo representativo de los grupos intacto (INT), intactos alimentados enteralmente (INT+ENT), con lesiones falsas (SHAM) y con lesión unilateral (OBx-UNI) y bilateral (OBx-BI) de bulbo olfatorio.

FIGURA 16.- Promedio diario por grupo de la actividad locomotora (P8), ante el retraso de 6 horas en la fase en el horario del amamantamiento ($-\Delta\Phi$) y en ausencia

de acceso a la hembra lactante (Sin ♀); de los conejos pertenecientes a los grupos intacto (INT), intactos alimentados enteralmente (INT+ENT), con lesiones falsas (SHAM) y con lesión unilateral (OBx-UNI) y bilateral (OBx-BI) de bulbo olfatorio.

FIGURA 17.- Promedio diario de la acrofase y nadir de la actividad locomotora de los días 4 a 15 de edad postnatal de los conejos pertenecientes a los grupos intacto (INT), intactos alimentados enteralmente (INT+ENT), con lesiones falsas (SHAM) y con lesión unilateral (OBx-UNI) y bilateral (OBx-BI) de bulbo olfatorio.

FIGURA 18.- Grafica del promedio de la duración de la anticipación de la actividad locomotora de los gazapos pertenecientes a los grupos intacto (INT), intactos alimentados enteralmente (INT+ENT), con lesiones falsas (SHAM) y con lesión unilateral (OBx-UNI) y bilateral (OBx-BI) de bulbo olfatorio.

FIGURA 19.- Grafica del promedio de la intensidad de la anticipación de la actividad locomotora de los gazapos pertenecientes a los grupos intacto (INT), intactos alimentados enteralmente (INT+ENT), con lesiones falsas (SHAM) y con lesión unilateral (OBx-UNI) y bilateral (OBx-BI) de bulbo olfatorio.

TABLA 1.- Cuadro de los principales hallazgos asociados a las lesiones del bulbo olfatorio en diferentes especies

I. RESUMEN

Es bien sabido que una característica importante en los organismos, es presentar oscilaciones rítmicas en diferentes procesos biológicos y conductuales con una frecuencia cercana a las 24 horas, estas variaciones reciben el nombre de ritmos circadianos. Estos ritmos, son generados de manera endógena por diferentes marcapasos y osciladores, los cuales ajustan su funcionamiento a los cambios rítmicos y predecibles en el medio ambiente, mediante un fenómeno conocido como sincronización. En los mamíferos el principal marcapasos circadiano se encuentra en el núcleo supraquiasmático (NSQ). Sin embargo, la evidencia científica ha demostrado que en los gazapos la eliminación completa del NSQ no tiene efectos sobre la ritmicidad circadiana en la temperatura corporal y la actividad locomotora, lo cual sugiere la participación de otra estructura. De manera paralela, diferentes estudios han demostrado que en el bulbo olfatorio (BO) la expresión de genes ocurre de manera endógena y autosostenida.

En el presente estudio se investigó el efecto de la lesión bilateral y unilateral del BO, en gazapos de 4 días de edad, sobre el patrón de temperatura corporal y actividad locomotora en condiciones de luz continua, durante el periodo de amamantamiento y en la ausencia de éste. Se demostró que la lesión bilateral del BO modifica la expresión rítmica de la temperatura corporal y la actividad locomotora, así como un efecto significativo en la duración e intensidad de la anticipación. Esto sugiere la participación del BO como posible marcapasos en las etapas tempranas del desarrollo.

II. INTRODUCCIÓN

II.1. Los ritmos biológicos

Los organismos vivos presentan fluctuaciones rítmicas en una amplia diversidad de procesos que comprenden desde cambios en la conducta, hasta variaciones moleculares. Estas oscilaciones se relacionan con los cambios que ocurren en el ambiente, tal como la sucesión día-noche, el cambio de estaciones, entre otras (revisado en: Caldelas, col., 2004). Estas variaciones son conocidas como **ritmos biológicos**, pueden presentar duraciones que van desde fracciones de segundo (**ritmos ultradianos**) como la actividad neuronal; hasta una vez al año (**ritmos circanuales**) como la conducta reproductiva en algunos animales; o como lo es el caso de los **ritmos infradianos** que presentan una duración que va de 28 horas hasta 6 días (revisado en: Granados-Fuentes, col., 1995).

Dentro del amplio espectro de ritmos, se encuentran los **ritmos circadianos** (proveniente del Latín *circa*: próximo a, *dies*: día), que son procesos biológicos con una frecuencia cercana a las 24 horas que se repiten periódicamente (Halberg, 1959). Éstos son evidentes en una gran variedad de procesos fisiológicos tales como: el ciclo sueño-vigilia, la liberación de hormonas como la adrenocorticotropina, la tirotrópina y la prolactina, la ingesta de alimento, entre otros (revisado en: Reinberg y Smolensky, 1983; Hernández-Campos, 2013).

Debido a que los ritmos circadianos influyen la ocurrencia de una variedad de funciones fisiológicas, le permiten al organismo adaptarse al medio donde habitan, proporcionando la capacidad de anticiparse a los cambios cíclicos que

ocurren en este, brindando una mayor probabilidad de supervivencia. Asimismo, esta capacidad es crucial en la orientación con respecto a la posición del sol en especies migratorias. Por lo que podemos decir que para un adecuado funcionamiento de los organismos, en ellos ha evolucionado la capacidad de sincronizar las funciones fisiológicas y conductuales con el medio (revisado en: Granados-Fuentes, col., 1995; Herzog, 2007).

Para poder estudiar los ritmos circadianos, es importante conocer los parámetros que se analizan con mayor frecuencia dentro de una señal rítmica (Fig. 1):

- **Periodo-** Intervalo de tiempo en el que se repite una característica o evento. Cuyo recíproco es la frecuencia.
- **Frecuencia-** Número de repeticiones de un fenómeno en un periodo establecido.
- **Amplitud-** Diferencia entre el valor máximo y el valor mínimo.
- **Fase-** Tiempo o momento en que ocurre un evento, dentro de una escala arbitraria.
- **Ángulo de fase-** La diferencia entre la fase de dos ritmos.
- **Mesor-** Valor promedio alrededor de la cual las variables oscilan; media ajustada del ritmo a estudiar.
- **Acrofase-** Valor máximo que se presenta en la oscilación.
- **Nadir-** Valor mínimo que se presenta en la oscilación. También llamada batifase.
- **Zeitgeber o sincronizador-** Del alemán *Zeit*- tiempo, *geber*- dar.

Estímulo que es capaz de producir cambios de periodo o fase en los ritmos de un individuo.

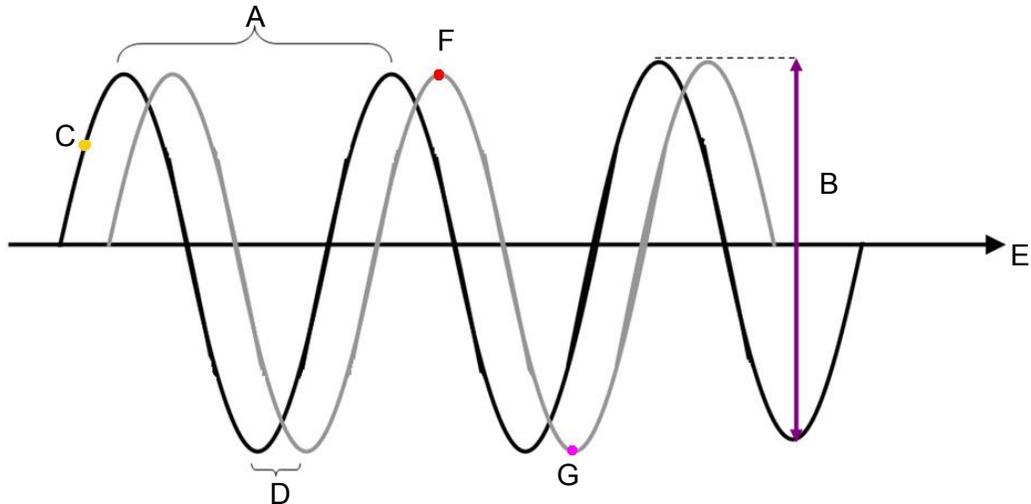


Figura 1. Representación esquemática de los parámetros característicos de los ritmos circadianos; A) periodo de oscilación; B) amplitud; C) fase del ritmo; D) ángulo de fase; E) mesor; F) acrofase; G) nadir. La línea negra indica la expresión de un ritmo endógeno, mientras que la línea gris muestra la expresión en presencia de una señal cíclica externa. Imagen modificada de Gruart, col. 2002.

II.1.1. Características de los ritmos circadianos

Dentro de las características más importantes de los ritmos circadianos encontramos que: 1) Son generados de manera endógena por marcapasos y osciladores cuyo periodo de oscilación es cercano a las 24 horas. Bajo condiciones de ausencia de estímulos ambientales, las fluctuaciones rítmicas siguen presentándose con un periodo diferente al que ocurre en presencia de los estímulos ambientales, fenómeno conocido como **oscilación espontánea** o **free running**. 2) Los marcapasos y osciladores que los generan son sensibles a determinadas señales ambientales, regulares y predecibles en el tiempo, las cuales mediante el proceso de **sincronización**, ajustan el funcionamiento de los

marcapasos y osciladores al entorno. 3) Poseen mecanismos de compensación de temperatura, ya que el funcionamiento de los marcapasos y osciladores no es sensible a los cambios de temperatura externos; es decir, la duración del periodo no se alarga o acorta como consecuencia de la fluctuación de temperatura del medio (revisado en: Gruart, col., 2002; Hernández-Campos, 2013).

II.2. El Sistema circadiano

El sistema circadiano es aquel encargado de proporcionar a los seres vivos los mecanismos necesarios para adecuar su funcionamiento con el del medio ambiente, manteniendo la organización temporal interna de los múltiples procesos que ocurren en el organismo de acuerdo con los cambios cíclicos diarios (Gruart, col., 2002).

Para poder llevar a cabo su función, el sistema circadiano se encuentra constituido por marcapasos y osciladores distribuidos tanto en el sistema nervioso central como en el resto del organismo, los cuales son capaces de sincronizar su funcionamiento a las señales cíclicas ambientales y de coordinar las diferentes estructuras que componen el sistema. Estos marcapasos y osciladores a través de hormonas y del sistema nervioso regulan la actividad de los diferentes órganos del cuerpo mediante el fenómeno conocido como **acoplamiento** (revisado en: Montúfar-Chaveznava, col., 2010; Hernández-Campos, 2013).

II.2.1. La generación de los ritmos circadianos

Se sabe que los ritmos circadianos son generados por estructuras conocidas como **marcapasos y osciladores**. Los **marcapasos circadianos** son

estructuras que presentan ritmicidad endógena, la cual se mantiene ya sea en condiciones *in vitro* o *in vivo*, aún cuando son aislados de señales cíclicas ambientales, así mismo, tienen la capacidad de influir en la ritmicidad de otras estructuras. Tal es el caso del **Núcleo Supraquiasmático (NSQ)** del hipotálamo, el cual se considera el principal marcapasos en mamíferos. En contraste, los **osciladores circadianos** son estructuras que presentan ritmicidad pero esta se ve influenciada por un marcapasos o por alguna señal externa, sin la cual pierden la ritmicidad; como es el caso del hígado, el riñón, las adrenales y la pituitaria, entre otros tejidos (Gruart, col., 2002; Caldelas, col., 2004, 2005; Montúfar-Chaveznava, col., 2010).

Actualmente se sabe que la ritmicidad circadiana depende del funcionamiento de una asa de transcripción-traducción autorregulada que se conoce como **reloj molecular**, la cual se empezó a estudiar en la *Drosophila melanogaster* y se describió el asa que involucra la participación de los genes reloj **Per y Tim** y sus productos proteicos, los cuales se autorregulan al inhibir la acción de los factores de transcripción **CLOCK y CyCLE**. En mamíferos se ha encontrado que la ritmicidad circadiana involucra una asa de retroalimentación negativa (Fig. 2) similar a la encontrada en *Drosophila melanogaster*; y que en ésta los genes **Per y Cry**, así como sus productos proteicos, inhiben su propia transcripción al suprimir la actividad del heterodímero **CLOCK-BMAL1**. Esta asa de transcripción-traducción se observa a nivel celular en el marcapasos central y en otros componentes del sistema circadiano como los osciladores periféricos (revisado en: Gruart, col., 2002; Sumová, col., 2008; Hernández-Campos, 2013).

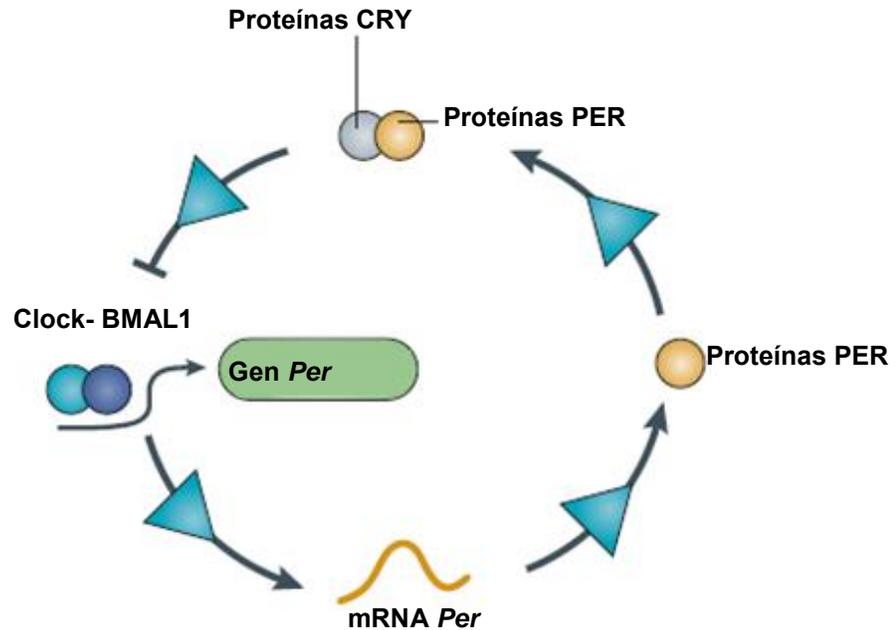


Figura 2. Representación esquemática de la maquinaria molecular presente en la generación de ritmicidad circadiana en mamíferos. El oscilador circadiano está conformado por un asa de retroalimentación negativa de los genes *Periodo* (*per*), cuyos productos proteicos *Periodo* (*PER*) al unirse al Criptocromo (*CRY*), inhiben su propia transcripción desplazando al heterodímero Clock-BMAL1. Imagen modificada de Herzog, 2007.

II.2.1.1. El núcleo supraquiasmático

Un número importante de evidencia científica, demuestra que el principal marcapasos circadiano en los mamíferos está localizado en el NSQ, ya que las lesiones bilaterales de esta estructura producen la supresión de la ritmicidad en los sujetos, principalmente la actividad locomotora y el ciclo sueño-vigilia. De igual forma en estudios *in vitro* se ha observado, en las células del NSQ, la persistencia de ritmicidad tanto en la actividad eléctrica como metabólica y en la expresión de los genes reloj (Granados-Fuentes, col., 1995, 2013; Herzog, 2007).

Durante el desarrollo, el marcapasos localizado en el NSQ de los mamíferos está presente y es funcional desde etapas prenatales, sin embargo, la capacidad de funcionamiento pleno como marcapasos no sólo depende de la presencia de los componentes moleculares, sino que requiere de la capacidad de las células individuales de sincronizarse y de jerarquizar las señales ambientales, por lo que, los diferentes ritmos biológicos se desarrollan en diferentes etapas de la vida (Weinert, 2005). Se sabe que el desarrollo del NSQ en ratas comienza en el día embrionario (E) 14 y continua hasta el día E18, y aproximadamente para el día E 19-21 empieza a presentar ritmicidad metabólica; alcanzando su madurez funcional hasta el día postnatal (P) 10, ya que hasta este día se establecen el número de sinapsis neuronales que presenta el NSQ adulto (Weiner, 2005; Sumová, col., 2008). Diferentes estudios demuestran que la actividad rítmica del NSQ fetal es independiente del de la madre, ya que en animales gestantes con lesión del NSQ, cada feto es capaz de expresar ritmos independientes con oscilación espontánea, e incluso esta ritmicidad persiste en cultivos celulares de NSQ (Hastings, col., 1998; Granados-Fuentes, col., 2004).

A pesar de que desde etapas tempranas de desarrollo el NSQ presenta ritmicidad, ésta sólo es detectable a nivel metabólico, ya que en esta edad no hay ritmicidad en la expresión de los genes reloj. Esto puede deberse a varias razones: 1) la amplitud de los ritmos es tan baja que no puede ser detectada; 2) la expresión de ritmicidad se da en escasas células del NSQ; 3) la ritmicidad individual de las células no está sincronizada debido a las pocas sinapsis presentes (Weinert, 2005; Sumová, col., 2008). Estudios recientes demostraron la presencia de ritmicidad de genes reloj en osciladores periféricos de los embriones,

en el hígado y corazón (Weinert, 2005; Sumová, col., 2008).

II.2.1.2. El bulbo olfatorio

En diferentes estudios realizados por Granados-Fuentes y colaboradores (2004a y b, 2006, 2013), se encontró que las neuronas del bulbo olfatorio (BO) de ratas exhiben ritmicidad en la expresión del gen *Per1* desde el día E19. Adicionalmente, en estudios *in vitro* encontraron que las neuronas del BO expresan patrones circadianos en la expresión de genes reloj y actividad eléctrica; en el mismo cultivo las neuronas expresan ritmicidad con diferente fase (Granados-Fuentes, col., 2004a). Asimismo, estas neuronas son capaces de sincronizarse a cambios en la temperatura (Granados-Fuentes, col., 2004a). En estudios *in vivo*, demostraron que las neuronas del BO de roedores puede sincronizarse por olores, ya que al exponer ratones a aceite de cedro se observó que la expresión de la proteína c-Fos en el BO, se sincronizaba a la presentación del estímulo (Granados-Fuentes, col., 2006). Se sabe que la ritmicidad generada en el BO de roedores adultos es independiente de la ritmicidad del NSQ, ya que en ratas arrítmicas por lesiones del NSQ o expuestas a luz continua, el BO continúa presentando ritmicidad hasta por un periodo de 3 semanas, no obstante, esta ritmicidad esta acoplada a la fase del NSQ (Granados-Fuentes, col., 2004b).

Adicionalmente, se ha reportado que las lesiones del BO afectan la expresión de ritmicidad, ya que en ratones mantenidos bajo condiciones de 12 horas luz y 12 horas de oscuridad (12:12 LD), los animales con lesión del BO exhibieron un retraso en el inicio de la actividad locomotora, en comparación con los animales control y cambios en el periodo de ritmo de tal actividad (Possidente,

col., 1990), lo cual es un indicador de la participación de este marcapasos en la generación del ritmo circadiano de actividad locomotora en los roedores.

Estas evidencias nos llevan a sugerir que en etapas embrionarias la ritmicidad del feto está conducida por la interacción de diferentes marcapasos u osciladores periféricos y las señales rítmicas provenientes de la madre.

II.2.2. La sincronización de los ritmos circadianos

La sincronización es el proceso mediante el cual los ritmos biológicos se ajustan de manera constante al medio ambiente. En general, las señales cíclicas del entorno desempeñan un papel importante como sincronizadores, ya que los osciladores internos son sensibles a estas, permitiéndole al organismo anticipar y responder a los cambios en el entorno en que se desarrolla, lo que confiere el carácter adaptativo a los ritmos circadianos (revisado en: Reinberg y Smolensky, 1983; Gruart col., 2002; Caldelas, col., 2004).

En el ambiente existe una gran cantidad de señales rítmicas, siendo las **fólicas** (como la alternancia entre el día y la noche o ciclo luz-oscuridad), las principales señales sincronizadoras de los marcapasos y osciladores internos. Sin embargo, existe un grupo de señales conocidas como **no-fólicas**, que también tienen la capacidad de influir en la expresión de los ritmos biológicos, tales como cambios en la temperatura, la presencia de alimento, la interacción social, entre otros (revisado: Reinberg y Smolensky, 1983; Gruart col., 2002; Caldelas, col., 2004).

Para considerar una señal como sincronizador, se deben cumplir las siguientes características: 1) debe ser regular y predecible en el tiempo; 2) los **marcapasos y osciladores** deben ser sensibles a la señal; 3) deben tener periodicidad cercana a la del oscilador, esto es, deben estar dentro del límite de sincronización de los osciladores, el cual es cercano a las 24 horas. En el caso de los marcapasos y osciladores, si la señal sincronizadora excede el límite de sincronización, éstos son incapaces de acoplar su funcionamiento a la señal (Gruart, col., 2002); 4) la periodicidad del oscilador debe igualarse a la periodicidad de la señal a la que es sensible (revisado en: Granados-Fuentes, col., 1995).

Dentro de las señales no-fólicas, la disponibilidad de alimento afecta de manera directa los ritmos circadianos de los animales, por lo que la restricción alimentaria funciona como una potente señal sincronizadora de los ritmos diarios de temperatura, actividad locomotora y secreción de hormonas en animales roedores adultos (Challet, col., 2003). Además, en condiciones de restricción alimentaria se presenta el fenómeno conocido como **anticipación a la alimentación**, el cual se caracteriza por un marcado incremento en la actividad locomotora y temperatura corporal de los animales horas previas al acceso al alimento (Caldelas, col., 2005). Es de notar que la anticipación al alimento no depende de la integridad del NSQ, ya que en roedores con lesión de esta estructura, persiste el fenómeno anticipatorio (Challet, col., 2003; Caldelas, col., 2005;), lo cual es un claro indicador de que este depende de otro oscilador o marcapasos.

En conejos adultos también se ha observado que en un programa de restricción alimentaria la disponibilidad de alimento es capaz de sincronizar la actividad locomotora, el consumo de agua, la excreción de orina y de heces (Jilge, 1995).

En la actualidad se sugiere la participación de cinco mecanismos diferentes los cuales no son excluyentes entre sí, y están involucrados en la generación de la anticipación a la alimentación: 1) La presencia de un *reloj de arena* o *temporizador metabólico*, el cual busca mantener la homeostasis de nutrientes en el organismo e induce una conducta de búsqueda de alimento; 2) Un proceso de memorización de *intervalos de tiempo*, en el cual el individuo aprende que la disponibilidad del alimento se da cada determinado intervalo, asociado a un evento mayor (Ej. El inicio del día o la noche); 3) La presencia de un proceso de *discriminación y memoria* para determinada fase del marcapasos, en el cual el organismo utiliza a los marcapasos para llevar un sentido del paso del tiempo; 4) Un proceso de *aprendizaje por asociación*, en el cual la asociación de determinada fase dentro del ciclo con la comida, provoca una respuesta condicionada a la presencia de la misma; 5) La presencia de un oscilador sincronizado por la comida, el cual involucra un marcapasos externo al NSQ (revisado en: Mistlberger, 2009).

Desde etapas fetales, todos los mamíferos estamos expuestos a un entorno rítmico dentro del útero, el cual es generado por la hembra gestante, que se vale de señales *no-fóticas*, tales como los niveles de las hormonas (prolactina, melatonina y corticosteroides), el paso de los nutrientes en el torrente sanguíneo,

la actividad propia de la madre, entre otras (revisado en: Caldelas, col., 2004; 2005). Se ha propuesto que la ritmicidad *in útero* del NSQ fetal pueda estar sincronizada principalmente por la melatonina durante la etapa de oscuridad, ya que el NSQ fetal presenta una gran cantidad de receptores de melatonina (Hastings, col., 1998; Weinert, 2005). Aunque, en estudios posteriores se ha descrito la presencia de ritmicidad en los fetos de hembras sometidas a pinealectomía, inclusive esta ritmicidad se sigue conservando en hembras a las cuales se les removieron las adrenales, paratiroides, tiroides y los ovarios (Reppert y Schwartz, 1986). Lo cual nos lleva a pensar que la ritmicidad y coordinación de los fetos está dada por múltiples señales provenientes de la hembra. Es importante recalcar el papel de los nutrientes en el desarrollo de la ritmicidad de los fetos, ya que en hembras con lesiones de NSQ y sometidas a un programa de restricción alimenticia, se encontró que los fetos desarrollan ciclos circadianos sincronizados con la ingesta de alimento de la madre (Reppert, col., 1989).

La sincronización de los fetos con la madre y con el ambiente es fundamental, ya que permite la coordinación de los partos en un momento del día. Evidencias científicas en roedores demuestran que la lesión del NSQ materno elimina la sincronización de los partos, causando que estos se distribuyan en una amplia ventana de tiempo. Esta sincronización madre-cría es más evidente en animales altriciales (como el conejo), ya que no sólo coordinan la hora del parto, sino que también influyen el momento en que las crías tienen que salir del nido para ser alimentadas. Por lo que la sincronización con el amamantamiento es

esencial para la supervivencia de los neonatos (Reppert, col., 1989).

II.3. La Ritmicidad circadiana en conejos en desarrollo

El conejo se considera un modelo experimental que provee grandes ventajas para el estudio de la ritmicidad circadiana en etapas tempranas del desarrollo, debido a su singular patrón de amamantamiento, el cual ocurre de forma circadiana. Este provee una oportunidad especial para estudiar el desarrollo de la ritmicidad durante las primeras etapas postnatales, sin alterar la relación madre-cría (Jilge, col., 2000; 2001; Jilge y Hudson, 2001).

Primeramente, hay que describir que los conejos en vida silvestre son animales nocturnos, esto quiere decir que inician su actividad al anochecer y regresan a sus madrigueras al amanecer. Este patrón nocturno se observa incluso en la conducta de amamantamiento, la cual se conserva aún en condiciones de cautiverio (Jilge y Hudson, 2001). De manera natural la hembra elabora un nido con pelo y forraje, apartado de la madriguera principal y que sólo visita al momento del parto. Los gazapos al nacimiento presentan los ojos y el canal auditivo cerrados. Para el día P7 de vida ya perciben estímulos auditivos y para los días P9-10 ya abren completamente los ojos. Cabe destacar que, desde el nacimiento hasta el destete, la hembra sólo visita una vez cada 24 horas a los gazapos para alimentarlos por un espacio de 3-5 minutos, durante este lapso, las crías ingieren en promedio cercano al 35% de su peso corporal. Un factor relevante es que los gazapos se preparan para la llegada de la hembra,

aumentando su actividad locomotora y colocándose sobre la cobertura de pelo y forraje, para evitar perderse el amamantamiento (Jilge, col., 2000; Jilge y Hudson, 2001). Es sobresaliente que desde los primeros días de nacidos, los gazapos presentan un patrón de 24 horas en la temperatura corporal y actividad locomotora, además de un componente anticipatorio, que consiste en el aumento gradual de la temperatura corporal y de la actividad locomotora por encima de la media de las horas previas al amamantamiento, mostrando su máximo valor durante éste; y una caída drástica en ambos parámetros posteriormente (Fig. 3 panel superior). A pesar de que este patrón diurno de temperatura es evidente desde el primer día de vida, el ritmo de 24 horas se consolida a partir del día P4 de edad, mientras que el patrón rítmico en la actividad locomotora es evidente hasta el 5º día de edad (Trejo-Muñoz, col., 2012).

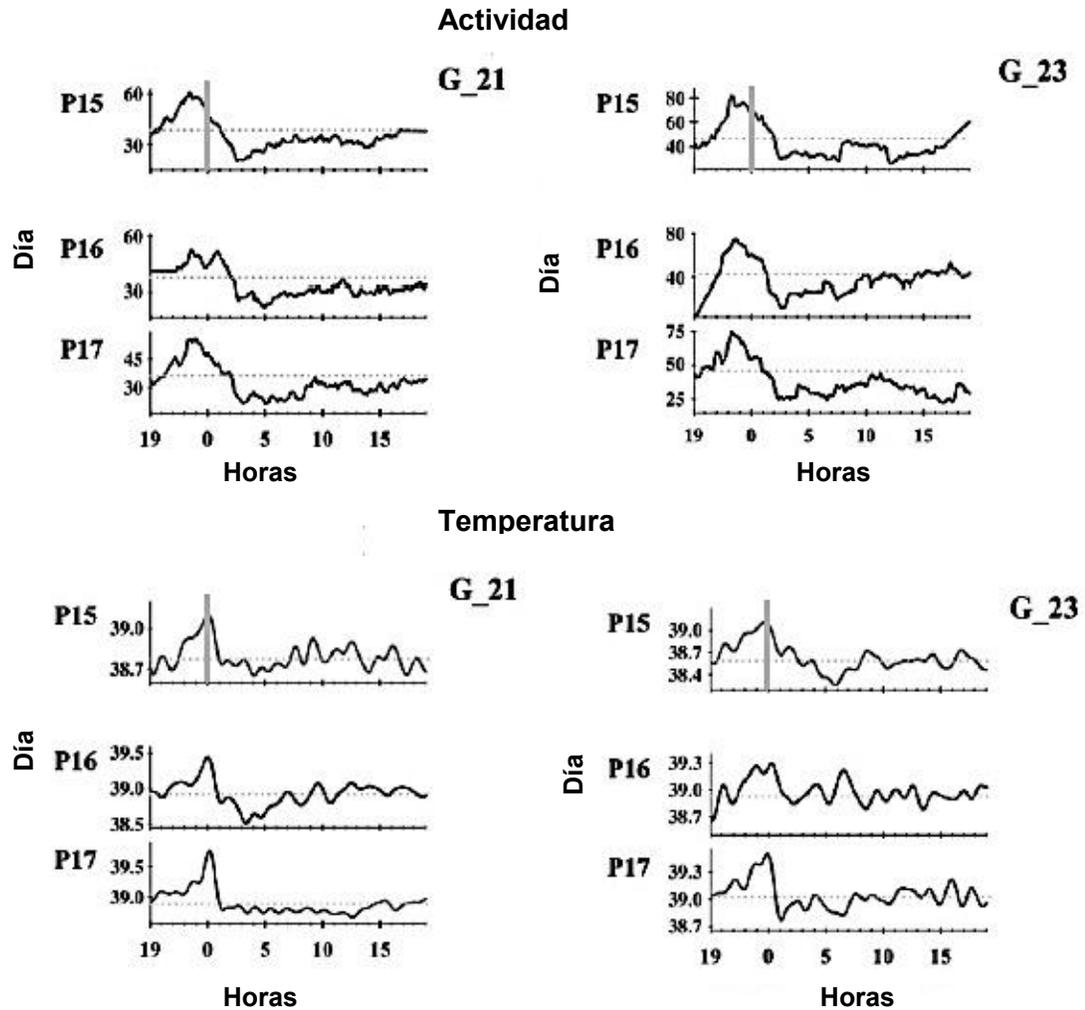


Figura 3. Imagen representativa de la ritmicidad presente en la actividad locomotora (panel superior) y temperatura corporal (panel inferior) de dos gazapos representativos durante los días postnatales P15-P17. La línea vertical (gris) del día P15 indica el momento del amamantamiento. Los días P16-17 los animales no tuvieron acceso a la hembra lactante. Imagen modificada de Trejo-Muñoz, col., 2012.

Es importante recalcar que este componente anticipatorio en los conejos neonatos, conserva su ritmicidad de 24 horas (Fig. 3), aún cuando las crías no tengan acceso a la hembra lactante y que su intensidad se incrementa de manera significativa conforme a la edad de los gazapos (Trejo-Muñoz, col., 2012). Asimismo, la evidencia científica demuestra que la presencia de este componente

anticipatorio no está regulado por el NSQ, ya que, gazapos neonatos con lesiones completas del NSQ continúan exhibiendo el componente anticipatorio sincronizado con el amamantamiento, así como un ajuste de fase ante el cambio del horario de amamantamiento e incluso persistencia de ritmicidad en ausencia de señales sincronizadoras (Hernández-Campos, 2013), lo cual es un claro indicador de la participación de otros marcapasos u osciladores en la organización temporal de los conejos en desarrollo.

En un estudio reciente realizado en conejos, se encontró que el funcionamiento de la maquinaria molecular del bulbo olfatorio madura de manera previa a la maquinaria del NSQ, ya que los genes reloj, expresados por ambos marcapasos (*Per1*, *Bmal1* y *Cry1*), exhiben ritmicidad circadiana consolidada en el BO desde el día 7 de edad; a diferencia de lo ocurrido en el NSQ donde, a esta misma edad únicamente presentan ritmicidad de 24 horas los genes *Per1* y *Bmal1* (Fig. 4). Estos datos sugieren que durante etapas pre-visuales, la ritmicidad circadiana puede estar controlada por marcapasos independientes del NSQ, y que en el caso del conejo, ésta se encuentre regulada por el BO (Montúfar-Chaveznava, col., 2012).

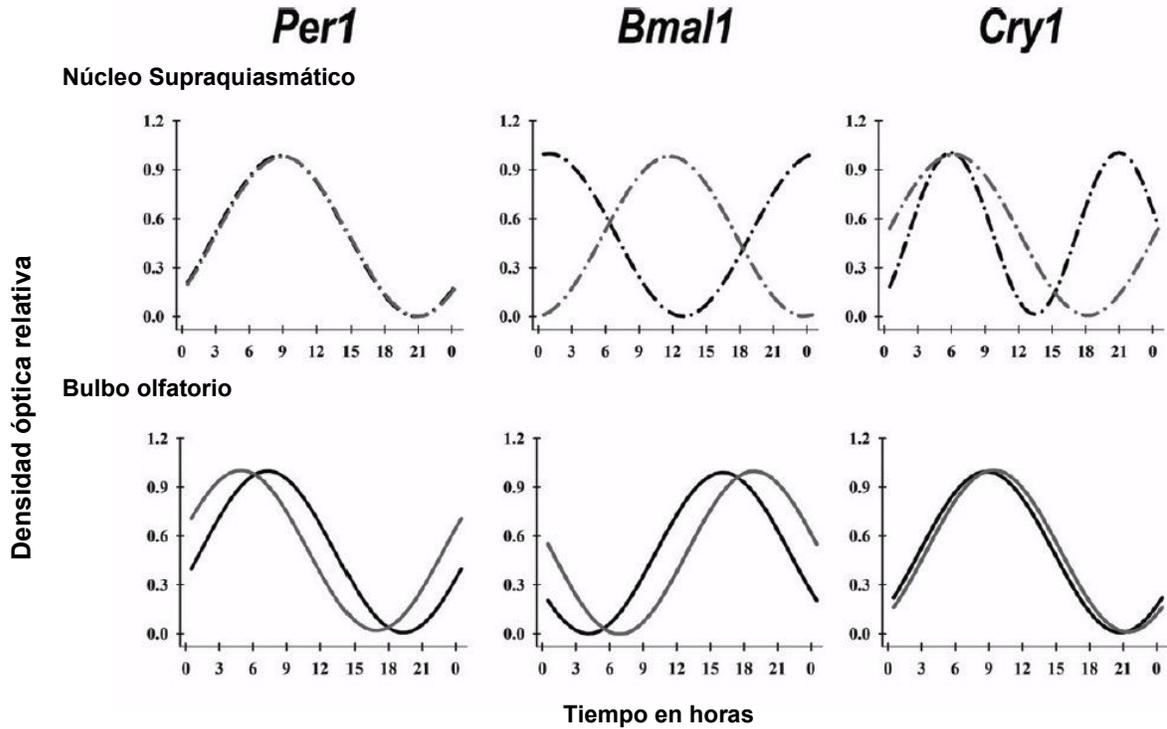


Figura 4. Curvas comparativas del patrón temporal de los genes reloj *Per1*, *Bmal1* y *Cry1* en el Núcleo Supraquiasmático (superior) y el Bulbo olfatorio (inferior) de gazapos de 7 días de edad (negro) y conejos de 45 días de edad (gris). Imagen modificada de Montúfar-Chaveznava, col., 2012.

Los conejos neonatos exhiben ritmicidad sincronizada con la madre por medio de diversas señales maternas no-fóticas. En etapas tempranas del desarrollo postnatal, la hembra sigue siendo un potente sincronizador; esta sincronización depende de la etapa de desarrollo de las crías, ya que a mayor edad se pierde este efecto debido a la maduración del sistema circadiano de las crías, sincronizado por la luz (Caldelas, col., 2004; Caldelas, col., 2005).

Adicionalmente, Montúfar-Chaveznava y colaboradores (2013) demostraron, en un estudio realizado en gazapos, que las señales olfativas maternas son las encargadas de modular el sistema circadiano de los neonatos.

Tal es el caso del compuesto volátil contenido en la leche de coneja llamado 2-metilbut-2-enal (2MB-2), que cumple con las características de una feromona ya que participa en el reconocimiento materno por parte del gazapo, y al cual están expuestos los neonatos de forma cíclica durante el amamantamiento. En un estudio reciente se encontró que la exposición diaria a la feromona 2MB-2 en los animales alimentados enteralmente, sincroniza la expresión de los ritmos de actividad locomotora y temperatura, habiéndose presentado en ambos el componente anticipatorio previo a la estimulación olfativa. En contraste, los animales que no fueron estimulados con la feromona, ni expuestos a la hembra, presentaron un patrón temporal atípico y la ausencia total del componente anticipatorio (Montúfar-Chaveznava, col., 2013). Es de suma importancia recalcar que el componente volátil 2MB-2 modula incluso la expresión de las proteínas reloj **PER1**, **CRY1** y **BMAL1**, así como de la proteína **c-FOS**, en el NSQ y en el BO de conejos neonatos. Esta evidencia sugiere que la exposición a la feromona materna funciona como un sincronizador no-fótico tanto para el NSQ, como para el BO en conejos en desarrollo (Trejo-Muñoz, col., 2014).

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Debido a la relevancia funcional del bulbo olfatorio (BO) en la supervivencia de los conejos neonatos, así como las características funcionales de esta estructura, como la consolidación temprana de la maquinaria molecular encargada de la generación de ritmicidad y la respuesta a señales olfativas maternas. Es posible que durante etapas pre-visuales del desarrollo, este órgano cumpla con un papel importante en la generación de los ritmos circadianos. Por lo que resulta fundamental esclarecer la participación del BO en la organización temporal circadiana de los conejos en desarrollo.

IV. HIPÓTESIS

El ***Bulbo olfatorio*** podría funcionar como un marcapaso circadiano independiente, por lo tanto la eliminación total de esta estructura tendrá efectos significativos en la expresión de los ritmos de temperatura corporal y actividad locomotora, el control de fase y el mantenimiento de la ritmicidad ausencia total de señales sincronizadoras.

V. OBJETIVOS

V.1. Objetivo general

Corroborar la participación del bulbo olfatorio como un oscilador circadiano, involucrado en la organización temporal de conejos en etapas pre-visuales.

V.2. Objetivos específicos

1. Evidenciar el efecto de las lesiones uni y bilaterales de bulbo olfatorio (BO), en la expresión de patrones temporales a nivel fisiológico y conductual bajo la influencia de señales diarias maternas.
2. Evidenciar el efecto de las lesiones uni y bilaterales de BO, sobre el control de fase en la expresión de patrones temporales a nivel fisiológico y conductual.
3. Evidenciar el efecto de las lesiones uni y bilaterales de BO, en la expresión de patrones temporales a nivel fisiológico y conductual, en ausencia de señales cíclicas ambientales.

VI. METODOLOGÍA

El manejo de los animales se realizó con base en la Guía para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio (National Research Council, 1996) y fue aprobado por el Comité Institucional para Cuidado y Uso de los Animales de Experimentación (CICUAE) de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, de la UNAM (**Protocolo #470**) y por la Comisión para el Cuidado y Uso de Animales, del Instituto de Investigaciones Biomédicas (**Protocolo #139**).

VI.1. Alojamiento

Para la realización del presente estudio se utilizaron conejos europeos domésticos (*Oryctolagus cuniculus*) de la raza Chinchilla, los cuales fueron obtenidos de la colonia alojada en el Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM. Las conejas reproductoras fueron alojadas en jaulas individuales (120 cm de largo x 60 cm de ancho x 45 cm de alto), bajo un foto periodo largo (16:8, con encendido de las luces a las 09:00 am, y apagado a las 01:00 am), con la temperatura y la humedad relativa controladas, de $20^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ y 50-60% respectivamente, y con acceso *ad libitum* a dieta estándar para conejos (Conejo Ganador® Malta Cleyton, México) y al agua.

Paralelamente, se utilizó una sala independiente para llevar a cabo el registro de telemetría, ubicada en el mismo Bioterio pero separada de la sala de alojamiento de las conejas reproductoras. Las condiciones ambientales de dicho

cuarto fueron similares al cuarto de las reproductoras, con excepción del fotoperiodo el cual fue de luz continua (L/L) durante todo el experimento y fue proporcionada por lámparas de luz blanca halógena (Philips® 32 Watts Alto USA, 860-2210 luxes).

VI.2. Partos

Los partos fueron programados con un mes de antelación, se utilizaron de 3-4 conejas gestantes por experimento. Tres días previos al parto se colocaron cajas nido (28 x 29.5 x 30 cm) de cloruro de polivinilo (PVC), con un área circular de 14 cm de diámetro, con material de cama y paja estéril. En los casos necesarios, los partos fueron inducidos con oxitocina (dosis de 0.2-3 UI/Kg por vía i.m.), con la finalidad de coordinar el nacimiento de las camadas en el mismo día.

VI.3. Grupos experimentales

Para la realización del experimento se emplearon un total 45 neonatos. El día de nacimiento fue considerado como el día postnatal 0 (P0), cada gazapo fue pesado y marcado en las orejas mediante muesqueo para su identificación durante todo el experimento. Las camadas fueron ajustadas a 8 crías cada una para el amamantamiento y posteriormente se asignaron a uno de los siguientes grupos experimentales:

- **Conejos intactos (*INT*),**
- **Conejos intactos con alimentación enteral (*INT+ENTERAL*),**

- **Conejos Sham o Lesiones Falsas (*SHAM*)** a los cuales se les realizó la manipulación de la cirugía, sin extirparles tejido alguno,
- **Conejos con lesiones unilaterales de bulbo olfatorio (*OBx-UNI*)** a los cuales les fue extirpado solamente un BO,
- **Conejos con lesiones bilaterales de bulbo olfatorio (*OBx-BI*)** a los cuales les fueron extirpados ambos BO.

Posteriormente a su asignación, los gazapos se colocaron en cajas de acrílico en grupos de 3-5 animales con peso similar y se mantuvieron en el cuarto de registro, destacando que únicamente un animal por caja fue sometido a los siguientes procedimientos quirúrgicos.

Se excluyeron del experimento los animales con lesiones incompletas, así como los que no culminaron los 16 días de experimentación.

VI.4. Cirugías

A los animales correspondientes a los grupos **INT** e **INT+ENTERAL** fueron sometidos únicamente a la cirugía para la implantación de un sensor de telemetría dentro de la cavidad abdominal en el día P3. Los individuos correspondientes a los demás grupos (***OBx-UNI***, ***OBx-BI*** y ***SHAM***) se les realizaron ambas cirugías; implantación de sensor y la lesión del bulbo olfatorio; en esta misma edad.

VI.4.1 Implantación del sensor de telemetría

La cirugía para la implantación del sensor de telemetría fue llevada a cabo bajo condiciones asépticas en el día P3, de manera previa a la lesión del bulbo

olfatorio. Los gazapos fueron colocados decúbito dorsal sobre un tapete térmico, se utilizó Isoflurano (Sofloran Vet®, Pisa Agropecuaria, México) mediante un aparato de anestesia inhalada (VetEquip®, Within US, USA). Se desinfectó el abdomen del neonato y posteriormente sobre el plano transversal lateral a la cicatriz umbilical se realizó una incisión de 1 cm aproximadamente. Fueron seccionados los planos de piel, muscular y peritoneo. Al interior de la cavidad abdominal fue colocado el transmisor de telemetría de 1.55 x 0.65 cm, con un peso de 1.1 g, (G2 E- Mitter®, VitalView System, MiniMetter Resironics Inc. USA). Posteriormente fueron suturados los planos muscular y cutáneo con material de seda (calibre 000).

VI.4.2. Bulbectomías

Posterior a la cirugía de implantación del sensor de telemetría, se lesionó de manera uni o bilateral el BO, bajo condiciones de asepsia. Los animales fueron colocados en decúbito ventral sobre el tapete térmico y se mantuvieron bajo anestesia con Isoflurano (Sofloran Vet®, Pisa Agropecuaria) mediante un aparato de anestesia inhalada (VetEquip®, Within US, USA). Se desinfectó la cabeza del gazapo y realizó una incisión sobre la piel de 1.5 cm aproximadamente sobre la línea media, con ayuda de un taladro de mano se realizó un trépano (0.5 x 0.5 cm) en la región rostral del cráneo en la convergencia de los senos venosos, para exponer los bulbos olfatorios. En los animales del grupo SHAM, en esta etapa se cerró el trépano con ayuda de esponja estéril (Gelfoam®, Baxter, USA) y la piel fue suturada con material de seda (Calibre 000). En el caso de los neonatos de los

grupos con lesiones OBx-UNI, OBx-BI, con ayuda de un microscopio estereoscópico (Zeiss®, Stemi 2000-C, Alemania) se incidieron los bordes del BO con el bisturí; posteriormente se extirpó uno o ambos bulbos olfatorios mediante aspiración, usando una pipeta fina (diámetro interno: 0.5 mm), la cual fue introducida hasta la fisura rinal, evitando dañar la región rostral de los lóbulos frontales y removiendo en su totalidad uno o ambos bulbos olfatorios. Al final del procedimiento, el trépano fue cerrado con ayuda de una esponja estéril (Gelfoam®, Baxter, USA) y la piel fue suturada con material de seda (Calibre 000). Finalmente, los conejos se medicaron con 2.2 mg/Kg de meglumina de flunixin (Napzin®, Pisa Agropecuaria, México) vía subcutánea y 5 mg/Kg de Enrofloxacin al 5% (Enroxil 5%®, Senosiain, México), dosis única.

Los animales sometidos a dichas manipulaciones se dejaron en recuperación durante 2 horas, posteriormente fueron regresados al cuarto de registro para iniciar con el monitoreo de la actividad locomotora y de la temperatura corporal.

VI.5. Registro de la temperatura corporal y de la actividad locomotora

Cada grupo fue colocado sobre un receptor de telemetría (ER-4000 Energizer Receiver®, MiniMitter Respironics Inc., USA), en cajas de acrílico con aproximadamente 3 cm de granulina (Argo®, México) como material de cama.

Para el registro de la actividad locomotora y de temperatura corporal, se utilizó el programa de telemetría VitalView (Respironics®, MiniMitter Inc., USA), el

cual almacenó a intervalos de 2 minutos el movimiento y los cambios de temperatura de cada transmisor implantado en los animales. Los datos obtenidos correspondientes al día P2 hasta P16, fueron guardados en un archivo que al final del protocolo fueron filtrados y analizados.

VI.6. Amamantamiento y alimentación enteral

En el día del parto (P0), los neonatos tuvieron acceso a la hembra lactante durante 6 horas. Posteriormente se colocó una barrera metálica para evitar el acceso de la hembra al nido. Los animales fueron alimentados en el siguiente horario (Fig. 5):

- Del día P1 y hasta P8, los gazapos fueron trasladados de la sala de registro al cuarto de las hembras lactantes para que fueran alimentados a las 11:00 h. Los conejos neonatos se colocaron en cajas nido en camadas de 8 animales cada una y se retiró la barrera metálica permitiendo el acceso de las hembras. Posteriormente los gazapos fueron retirados del nido y regresados al cuarto de registro.
- A partir del día P9 y hasta P13, los animales recibieron el mismo manejo, con excepción de la hora de amamantamiento, la cual se retrasó a las 17:00 h.
- Posterior a la alimentación del día P13, sólo se regresaron a las cajas el animal en estudio y un acompañante; después las cajas fueron tapadas con tela de gasa.

- Los animales en estudio y el acompañante fueron sometidos a ayuno, (no tuvieron acceso a la hembra lactante) durante los días P14 y P15. Durante este periodo se prohibió el acceso al cuarto, con la finalidad de corroborar la presencia de ritmicidad en ausencia total de estímulos ambientales.

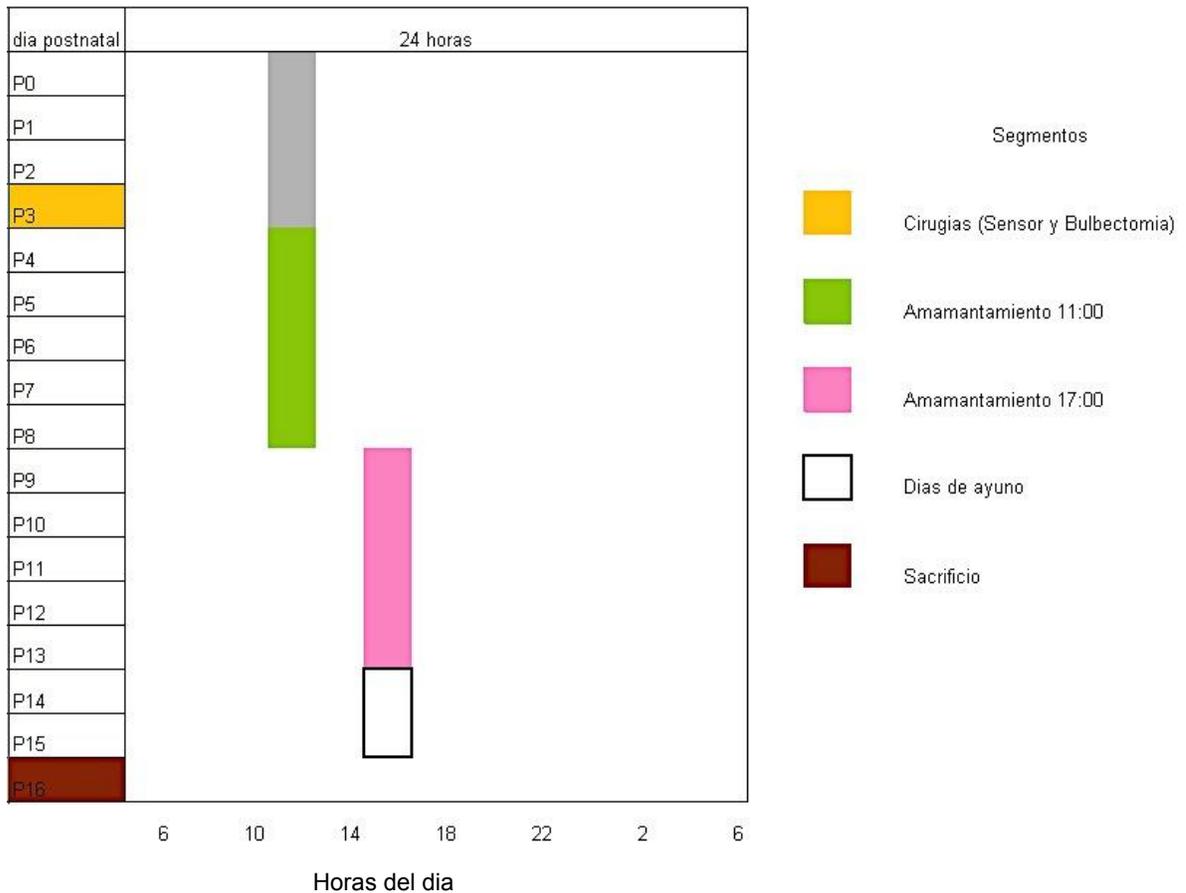


Figura 5. Esquema representativo del protocolo de alimentación y amamantamiento. Los números inferiores indican en horas el transcurso del día. La barra vertical indica la edad en días de los gazapos. Las barras internas coloreadas indican la hora de amamantamiento y el manejo que se les dio a los animales.

Cabe destacar que los animales con lesión bilateral del BO se colocaron en el nido con la hembra lactante de manera normal para que recibieran la estimulación materna, se retiraron del nido y fueron alimentados enteralmente con una cánula acoplada a una jeringa de 20 ml y a una aguja de 16G. Debido a que los animales con lesión bilateral del BO son incapaces de reconocer las señales químicas volátiles de la madre (2MB-2), por lo tanto son incapaces de orientarse hacia a la hembra lactante o asir el pezón y alimentarse adecuadamente. Esto se corroboró al pesarlos antes y después de sacarlos del nido y observar que no había un aumento de peso, con respecto al peso inicial.

Para llevar a cabo la alimentación enteral, los gazapos fueron inmovilizados de manera cuidadosa, manteniendo el cuerpo y la cabeza de manera vertical, les fue introducida la cánula a través del hocico hasta llegar al estómago, y la fórmula láctea fue administrada lentamente. Inicialmente, en P4, los animales fueron alimentados con 7-10 ml de fórmula, la cantidad fue incrementándose de forma gradual (aproximadamente 2 ml diario, tomando en cuenta la talla del animal y la distensión abdominal) hasta 24 ml en P13. Inmediatamente fueron regresados a sus cajas y trasladados al cuarto de registro.

La fórmula Láctea (Anexo A) con la que fueron alimentados los gazapos por vía enteral, se obtuvo a partir de reportes previos sobre la composición natural de la leche de coneja (Anexo B). Cabe destacar que dicho método de alimentación se ha empleado exitosamente en estudios previos en nuestro grupo de investigación (Montúfar-Chaveznava, col., 2013; Trejo-Muñoz, col., 2014).

Los animales del grupo **INT+ENTERAL**, a partir de P4 fueron colocados en una caja nido con una hembra no lactante durante 5 minutos, a la cual le fue impregnado el abdomen con 20 μ l de 2-metilbut-2-enal (2MB-2), posteriormente fueron alimentados por vía enteral con fórmula láctea usando el procedimiento descrito anteriormente. Al finalizar fueron regresados al cuarto de registro.

Todos los animales fueron pesados diario, antes y después de la alimentación enteral y amamantamiento; con la finalidad de eliminar el peso de la orina, para esto se hizo orinar a los gazapos estimulando la zona urogenital gentilmente con un hisopo húmedo.

VI.7. Análisis histológico

Este procedimiento se realizó para poder corroborar la totalidad de las lesiones realizadas. Para lo cual, los animales fueron sometidos a eutanasia en el día P16 con sobredosis de Pentobarbital (Pisabental®, Pisa Agropecuaria, México) por vía Intraperitoneal. Se extrajo el sensor de la cavidad abdominal, posteriormente se procedió a la decapitación de los animales y se extrajo el cerebro. Se colocó en solución de 2-Metilbutano (J. T. Baker®, USA) a una temperatura de -50° C para congelarlo, después se realizaron cortes sagitales de 50 μ m en un criostato, de manera individual cada hemisferio, tomando como referencia las secciones más mediales al cuerpo calloso. Los cortes obtenidos fueron montados individualmente en laminillas gelatinizadas, de tal manera que se formaron juegos de 5 laminillas para cada hemisferio cerebral. Posteriormente, las laminillas obtenidas fueron teñidas por medio de la tinción de Nissl. Finalmente, se

obtuvieron imágenes de la lesión a través de una cámara Réflex EOS Rebel T2i (Canon®, USA), montada en un microscopio estereoscópico Carls Zeiss Stemi 2000-C (Carl Zeiss®, Alemania).

VI.8. Análisis de datos

Las series de tiempo obtenidas para la temperatura corporal y la actividad locomotora fueron divididas en 3 segmentos y analizadas individualmente. El primer segmento de tiempo se tomó a partir del día P4 al día P9, debido a que en días anteriores a P4 la ritmicidad en el periodo correspondiente a 24 horas no está consolidada (Caldelas et al., 2009). El segundo segmento que abarca del día P10 al día P13, correspondiente al cambio de fase. El tercer segmento corresponde a los días P14 a P15, en los cuales los animales no tuvieron acceso a la hembra lactante.

El análisis de la ritmicidad en la temperatura corporal se llevó a cabo de la siguiente manera:

1. Para eliminar la tendencia natural de incremento de la temperatura durante el desarrollo, los datos originales de las series de tiempo fueron ajustados a una línea recta ($y=mx+b$) a través del método de mínimos cuadrados, con lo cual se obtuvieron un nuevo conjunto de datos para cada segmento.
2. Para eliminar el ruido (componentes irregulares) de los nuevos datos de temperatura corporal, se aplicó el algoritmo de Wave-Shrink. El cual consiste en aplicar la transformada de Ascombe para trasladar los datos de una

distribución de Poisson a una distribución de Gaussian, con lo cual los datos adquieren una distribución estándar; después, se empleó la transformada de ondeletas Daubchies-8, el cual remueve los coeficientes relacionados al ruido. Finalmente, se le aplica la transformada de ondeletas inversa para obtener una nueva serie de datos libres de ruido, para cada segmento (Trejo-Muñoz, et al., 2012).

3. Asimismo, a los datos originales se les aplicó la Transformada rápida de Fourier (TRF) con lo cual se obtuvieron los componentes de 24 horas, la amplitud, la frecuencia y la fase de cada componente presente en la serie de datos de cada uno de los segmentos. Fueron seleccionados los primeros 30 componentes correspondientes a cada segmento que tuvieran un valor de energía alto (Trejo-Muñoz, et al., 2012).
4. Adicionalmente, fueron calculados los valores correspondientes a la **acrofase** y el **nadir** presentes en la secuencia. Para lo cual se construyó una secuencia con los datos positivos espaciados por 24 horas a partir de los datos máximos y una secuencia con los datos negativos, con las mismas características. Los valores máximos y mínimos correspondientes se obtuvieron a partir de la primer y segunda derivada. La secuencia de los pulsos fueron alineadas y desplazados en las series de datos para determinar los valores de la acrofase y el nadir, que correspondieron a la posición p , donde $p = |\sum_{i=1}^n x_i y_i|$, donde x_i es el dato y Y_i es el pulso en la secuencia (Trejo-Muñoz, et al., 2012).
5. Finalmente, la duración y la intensidad del componente anticipatorio fueron calculados. Para lo cual, se define a la anticipación como el incremento

constante de la temperatura por sobre la media a lo largo de un periodo de tiempo. Para su cálculo, se utilizaron los datos correspondientes a las 5 horas anteriores al evento del amamantamiento de cada secuencia de datos de 24 horas, para determinar en qué momento comenzó el incremento y el término (duración), así como la diferencia entre los valores máximo y mínimo de cada secuencia (amplitud). Se definieron cuatro casos diferentes de acuerdo al análisis de los datos en relación a la media: 1) El incremento cruza la media. 2) El incremento no cruza la media. 3) El incremento fue sobre la media. 4) No se presentó incremento. Únicamente los casos 1 y 3 se consideraron como anticipación.

Con la finalidad de analizar el ajuste de los animales al cambio de fase (retraso en el amamantamiento), se identificaron los días que tardaron en alcanzar un estado estable los ritmos de temperatura corporal y actividad locomotora.

El procesamiento de los datos de la actividad locomotora fue el mismo que para la temperatura corporal, pero el ajuste de los datos fue omitido ya que la actividad locomotora no exhibe la misma tendencia que la temperatura corporal durante el desarrollo. Adicionalmente, para la eliminación del ruido en la serie de datos, se utilizó el método de Savitzky-Golay, en lugar del método de Wave-Shrink, para preservar ciertos detalles en los datos, es decir, los picos máximos y mínimos (Trejo-Muñoz, col., 2012).

Los promedios y el error estándar se calcularon para los datos diarios de temperatura corporal y actividad locomotora, acrofase, intensidad y duración del

componente anticipatorio. Las diferencias asociadas con los segmentos fueron evaluados usando un ANOVA de dos vías, seguidas de una prueba de Bonferroni/Dunn.

VII. RESULTADOS

VII.1. Análisis histológico

Con la finalidad de corroborar la eficacia de la lesión, se realizó la inspección macroscópica de los cerebros para confirmar la ausencia de uno (**OBx-UNI**) o ambos bulbos olfatorios (**OBx-BI**; Fig. 6, panel superior), así como, verificar la integridad de las áreas del cerebro adyacentes a la zona de la lesión. Posteriormente se realizaron cortes histológicos, los cuales fueron expuestos con la tinción de Nissl, ya que esta permite observar los arreglos de neuronas en las diferentes capas de los bulbos olfatorios. Esto con la finalidad de ratificar a nivel microscópico la ausencia total de tejido o remanentes pertenecientes al BO (Fig. 6, panel inferior), ya que sólo los animales con lesiones completas fueron considerados dentro del grupo experimental. Del total de animales lesionados bilateralmente (OBx-BI n=10), únicamente dos resultaron con lesiones incompletas de BO y fueron excluidos del experimento. Mientras que en los animales pertenecientes al grupo unilateral todos tuvieron lesiones completas.

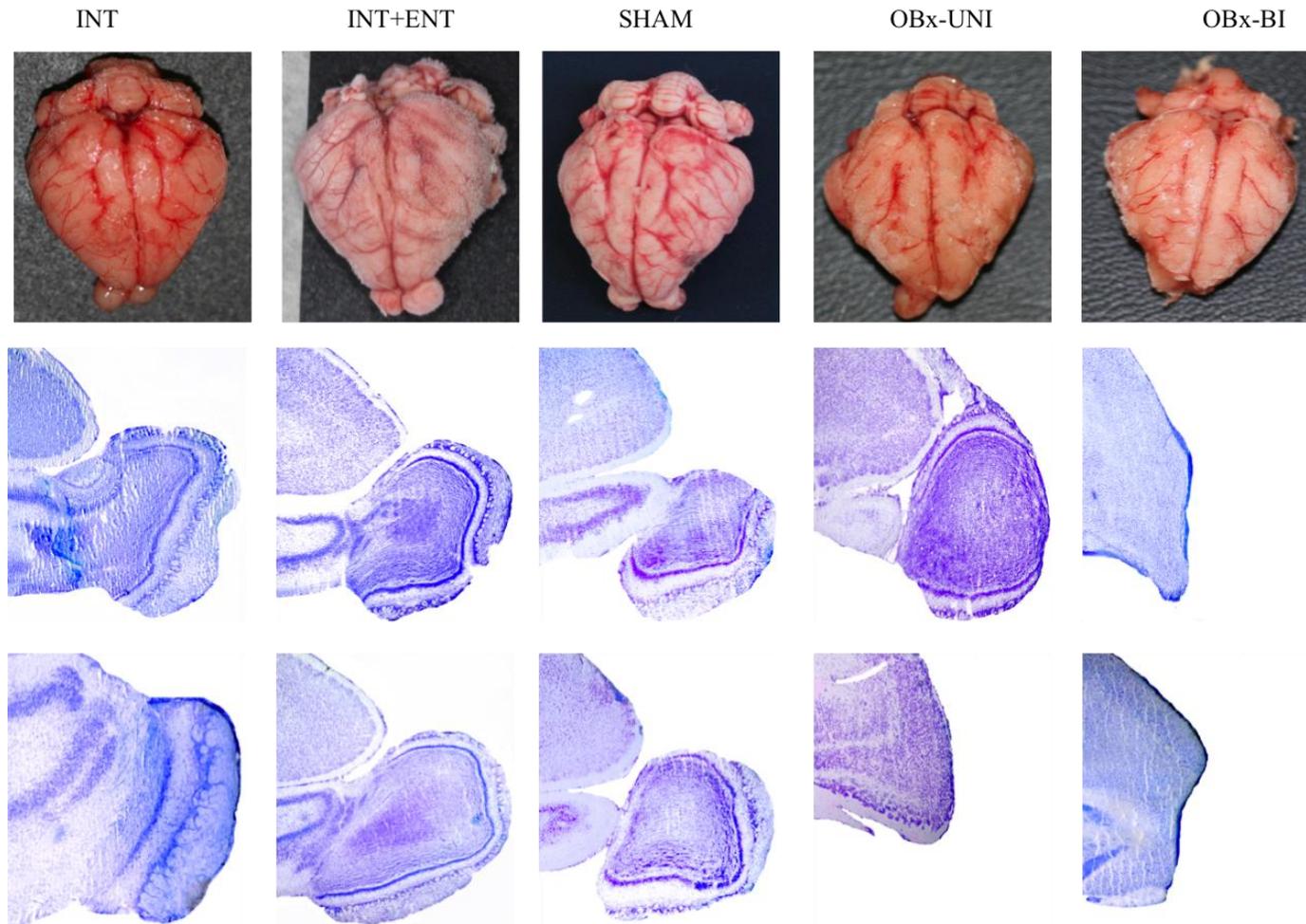


Figura 6. Imágenes representativas de los cerebros (panel superior) de los conejos neonatos de 16 días de edad del grupo control (INT), controles alimentados enteralmente (INT+ENT), con lesiones falsas (SHAM), con lesión unilateral del bulbo olfatorio (OBx-UNI) y con lesiones completas del bulbo olfatorio (OBx-BI). Cortes histológicos de los hemisferios derecho (panel medio) e izquierdo (panel inferior) de los cerebros teñidos con la tinción de Nissl correspondientes a cada grupo.

VII.2. Peso corporal

Con la finalidad de establecer el estado nutricional de los gazapos, durante el desarrollo del experimento, se registro diariamente el peso corporal de cada uno de los sujetos en los cinco grupos de estudio. El análisis de varianza reveló un efecto significativo asociado a la edad, al grupo y la interacción (Edad: $F_{(13,468)}=114.9$, $p < 0.0001$; Grupo: $F_{(4,468)}=30.5$, $p < 0.0001$; Interacción: $F_{(52,468)}=2.6$, $p < 0.0001$). En el día P4 los animales del grupo INT exhibieron un peso promedio de 71.9 ± 15.8 ; los pertenecientes al grupo INT+ENT 80.0 ± 13.4 ; los animales SHAM 66.2 ± 8.5 ; los gazapos OBx-UNI 69.4 ± 12.1 y 67.5 ± 18.3 para los gazapos OBx-BI; es importante destacar que a esta edad no se encontraron diferencias significativas entre los grupos. Se encontró un incremento significativo del peso de los animales de los diferentes grupos, conforme a la edad, de forma que para el día P13 los animales del grupo INT alcanzaron un peso de 185.1 ± 44.3 gramos, el grupo INT+ENT alcanzó un peso de 130 ± 20.7 gramos; el grupo SHAM 162.4 ± 10.3 ; los del grupo OBx-UNI 175.7 ± 24.4 ; mientras que el grupo OBx-BI alcanzó un peso de 117.1 ± 23.1 gramos (Fig. 7). El análisis post hoc reveló que los animales pertenecientes al grupo OBx-BI alcanzaron un peso significativamente inferior a los registrados por los animales INT, SHAM y OBx-UNI, durante los días P10-13. De manera similar los animales del grupo INT+ENT mostraron un menor peso en comparación con los animales INT, SHAM, OBx-UNI durante los días P11-13 (Fig. 7).

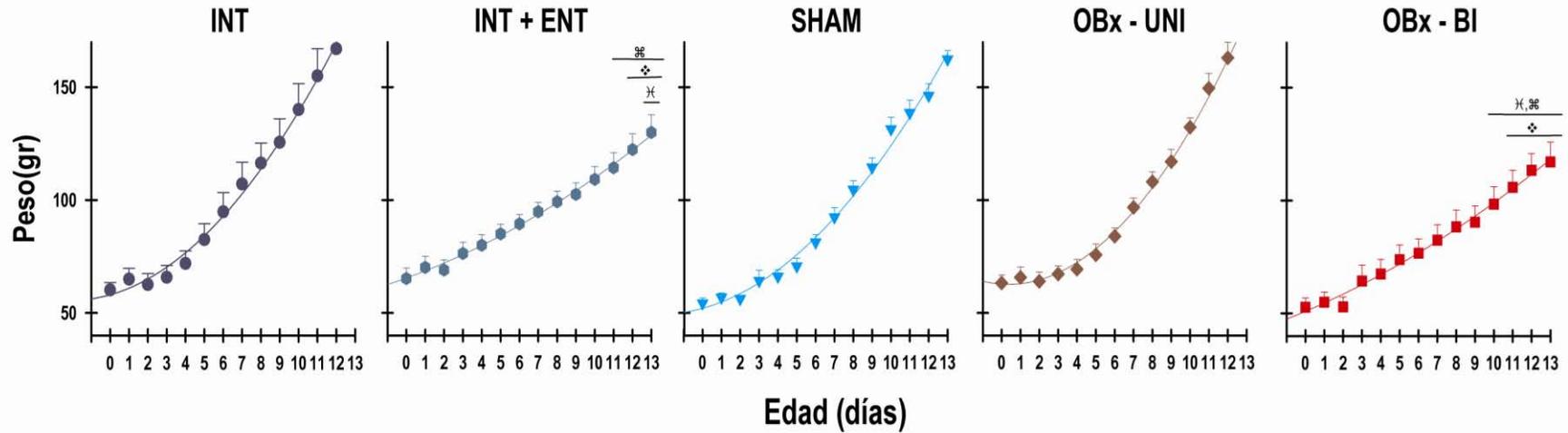


Figura 7. Peso corporal diario de los gazapos control (INT: círculos azules n=8; INT+ENT: círculos verdes n=8); con lesiones falsas (SHAM: triángulos azules n=8) y de los animales con lesiones del bulbo olfatorio (OBx-UNI: rombos cafés n=8; OBx-BI: cuadros rojos n=8), durante los días que duró el experimento. ❖ Indica diferencia significativa en comparación con el grupo INT. ⊗ Indica diferencia significativa con el grupo SHAM. ∞ Indica diferencia significativa en comparación con los animales OBx-UNI. Los valores se expresan como $\bar{x} \pm EE$.

VII.3. Ingesta de leche

Con la finalidad de analizar la ingesta correcta de los gazapos, se calculó el porcentaje del peso corporal correspondiente a la cantidad de alimento ingerida durante el desarrollo del experimento. El análisis de varianza mostró un efecto significativo, tanto entre los grupos, como por la edad de los animales (Edad: $F_{(11,404)} = 29.0$, $p < 0.0001$; Grupo: $F_{(4,404)} = 3.5$, $p = 0.008$; Interacción: $F_{(44,404)} = 0.8$, $p = \text{NS}$). En el caso de P4 la ingesta promedio de los animales INT fue del 20.7% en relación con su peso corporal; 13.9% para los animales INT+ENT; 14.4% para los pertenecientes al grupo SHAM; 18% para el grupo OBx-UNI y 18.4% para los animales OBx-BI. Conforme a la edad de los gazapos la ingesta de alimento se incrementó de manera significativa. En lo referente a la relación ingesta/peso para el día P13 de edad, es decir, en el día previo al ayuno la ingesta fue de 14.1% para los INT; 18.4% para los animales del grupo INT+ENT; 16.1% para los SHAM; 17% para los pertenecientes al grupo OBx-UNI y de 19.9% para los gazapos OBx-BI.

VII.4. Temperatura corporal

VII.4.1 Temperatura corporal diaria

En el promedio diario de la temperatura corporal registrado en los gazapos de los días P4 a P15, el análisis de varianza reveló un efecto significativo asociado al grupo y a la edad (Edad: $F_{(11,418)} = 21.5$, $p < 0.0001$; Grupo: $F_{(4,418)} = 10.6$, $p < 0.0001$; Interacción $F_{(44,418)} = 1.4$, $p = \text{NS}$). Observamos que la temperatura corporal de los animales de todos los grupos bajo estudio, se incrementa de forma significativa conforme avanzan en edad (Fig. 8). Es importante recalcar, que al inicio del experimento (Fig. 8), la temperatura corporal de los animales de los diferentes grupos fue similar (INT $37.7 \pm 0.4^\circ\text{C}$; INT+ENT $37.9 \pm 0.2^\circ\text{C}$; SHAM $37.6 \pm 0.5^\circ\text{C}$; OBx-UNI $37.9 \pm 0.3^\circ\text{C}$ y OBx-BI $37.6 \pm 0.5^\circ\text{C}$). Para el día correspondiente al cambio de fase (P9), la temperatura corporal de los animales pertenecientes a los grupos INT, INT+ENT, SHAM y OBx-UNI fue similar ($38.4 \pm 0.3^\circ\text{C}$, $38.2 \pm 0.2^\circ\text{C}$, $38.2 \pm 0.3^\circ\text{C}$, $38.3 \pm 0.1^\circ\text{C}$; respectivamente); mientras que los gazapos OBx-BI presentaron una ligera disminución alcanzando valores de $37.8 \pm 0.2^\circ\text{C}$. Al finalizar el experimento en P15, la temperatura corporal de los animales pertenecientes a los grupos INT, INT+ENT, SHAM y OBx-UNI fue semejante ($38.4 \pm 0.3^\circ\text{C}$, $37.9 \pm 0.5^\circ\text{C}$, $38.3 \pm 0.3^\circ\text{C}$, $38.4 \pm 0.2^\circ\text{C}$; respectivamente); mientras que para los animales del grupo OBx-BI los valores de temperatura fueron de $37.7 \pm 0.5^\circ\text{C}$; siendo esta una temperatura corporal significativamente menor a la registrada por los animales de los grupos INT y OBx-UNI, para esta misma edad.

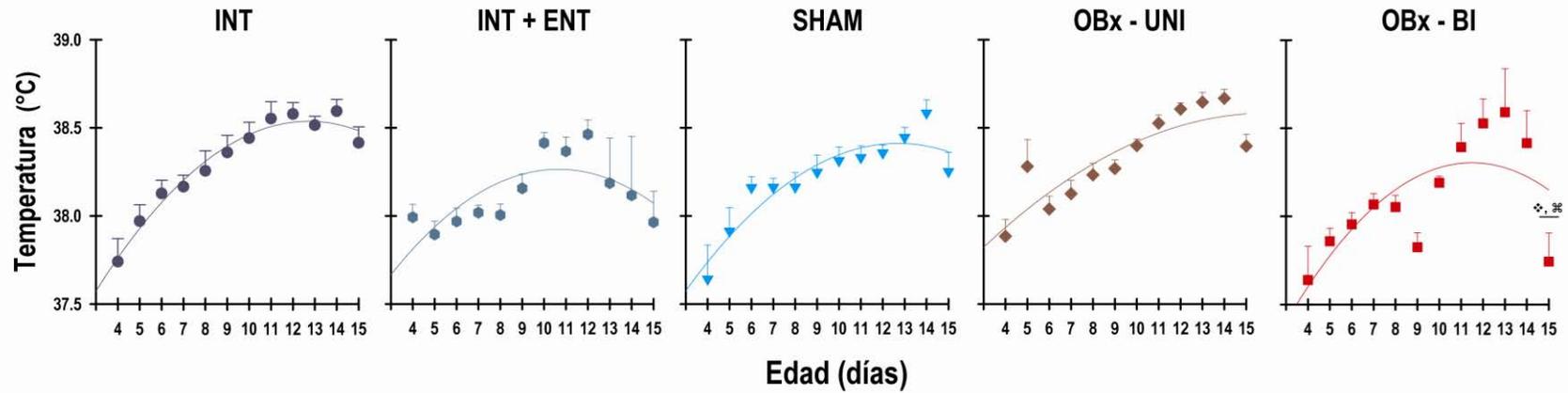


Figura 8. Promedio diario de la temperatura corporal del día 4 al 15 de edad postnatal de los conejos pertenecientes a los grupos Intacto (INT: círculos azules n=8); intactos alimentados enteralmente (INT+ENT: círculos verdes n=8); con lesiones falsas (SHAM: triángulos azules n=8) y con lesión unilateral (UNI: rombos cafés n=8) y bilateral (BI: cuadros rojos n=8) de bulbo OLFATORIO. ✦ Indica diferencia significativa en comparación con el grupo INT. ✨ Indica diferencia significativa en comparación con los animales OBx-UNI ($p < 0.0001$) los valores se expresan como $\bar{x} + EE$.

VII.4.2. Patrón temporal de la temperatura corporal

En lo que se refiere al patrón diario de la temperatura, los animales correspondientes a los grupos INT, INT+ENT, SHAM y OBx-UNI (Fig. 9 y 10), mostraron un patrón diurno típico a partir del día P4 de edad, con un claro componente anticipatorio previo a la hora del amamantamiento. Ante el retraso en el horario de acceso a la hembra lactante, pasados los ciclos transitorios, se observó el ajuste en la fase del ritmo de temperatura corporal de acuerdo con el nuevo horario de amamantamiento. Finalmente, en los días en el que no tuvieron acceso a la hembra lactante, el patrón diario de la temperatura corporal persistió sin atenuación (Fig. 9 y 10). En lo correspondiente a los animales pertenecientes al grupo OBx-BI se observaron cambios en el patrón temporal de la temperatura corporal, tanto en el componente anticipatorio, ante el retraso de fase en el horario de amamantamiento, así como bajo condiciones de ausencia total de la señal ambiental sincronizadora, como se detallará a continuación (Fig. 9 y 10).

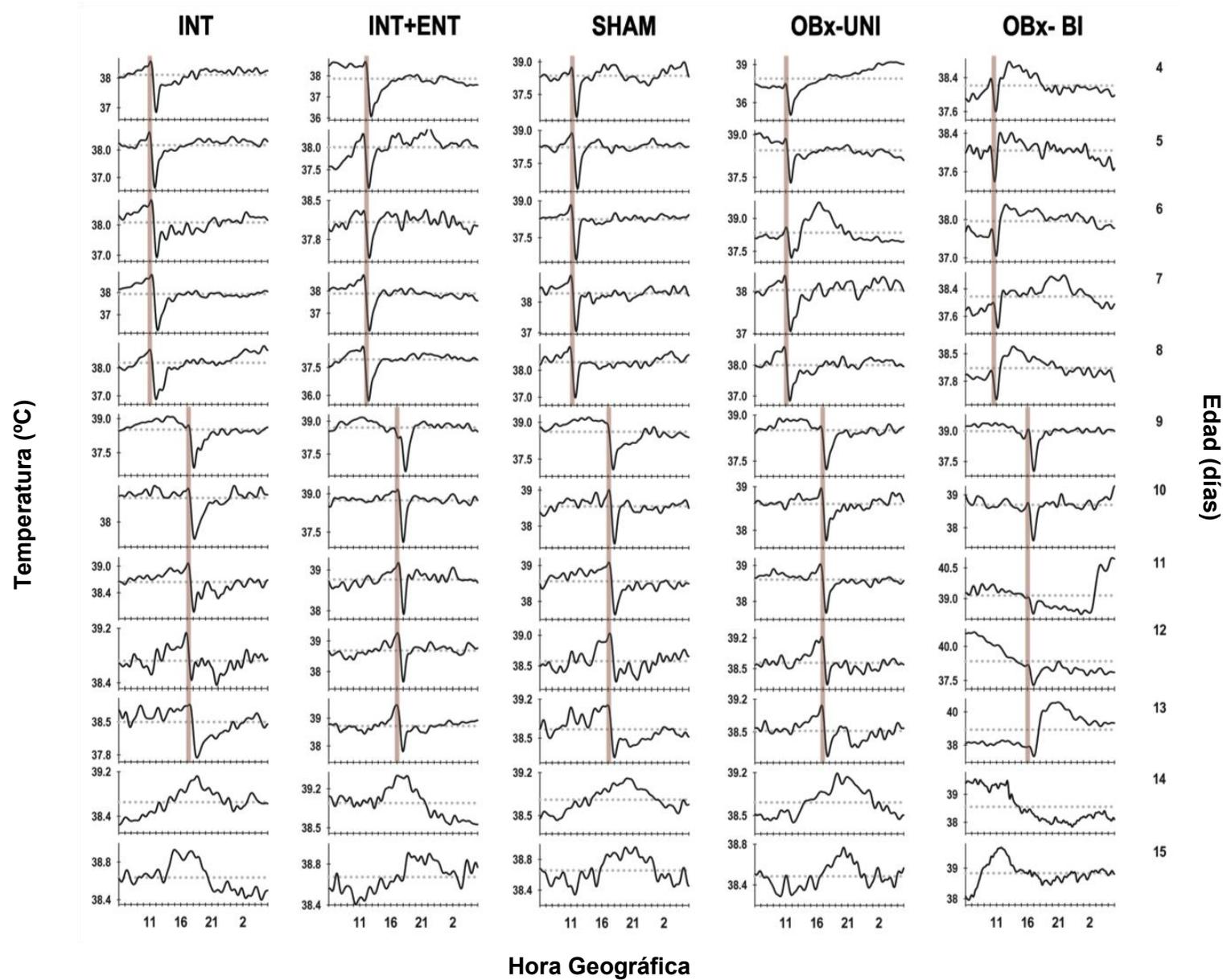


Figura 9. Patrón diario de la temperatura corporal de los días 4-15 de edad postnatal de un conejo representativo, de los grupos: Intacto (INT), Intactos alimentados enteralmente (INT+ENT), con lesiones falsas (SHAM), con lesión unilateral (UNI) y bilateral (BI) de bulbo olfatorio. La barra roja vertical indica la hora del amamantamiento.

Figura 10. Promedio diario por grupo de la temperatura corporal basal (P8), ante el retraso de 6 horas en la fase en el horario del amamantamiento ($-\Delta\Phi$) y en ausencia de acceso a la hembra lactante (Sin ♀); de los conejos pertenecientes a los grupos: Intacto (INT n=8), Intactos alimentados enteralmente (INT+ENT n=8), con lesiones falsas (SHAM n=8), con lesión unilateral (UNI n=8) y bilateral (BI n=8) de bulbo olfatorio. La barra roja vertical indica el momento en el que tuvo lugar la alimentación de los gazapos. Los valores se expresan como $\bar{x} \pm EE$.

VII.4.3. Análisis de frecuencias

En las series de tiempo obtenidas, al analizar el primer segmento (correspondiente a los días P4-8), se encontró que el 63-88% de los animales pertenecientes a los grupos INT, INT+ENT, SHAM y OBx-BI, la frecuencia de 24 horas, estuvo presente dentro de las tres primeras frecuencias con mayor presencia en la serie de tiempo. Mientras que para los animales del grupo OBx-UNI, la frecuencia de 24 horas solo estuvo presente en el 38% de los casos.

En el caso del segundo segmento (correspondiente al cambio de fase; P9-13), entre el 88-100% de los animales de los grupos INT, SHAM, OBx-UNI presentaron la frecuencia de 24 horas, dentro de las tres frecuencias de mayor presencia en la serie de tiempo. En el caso de los grupos INT+ENT y OBx-BI, solo el 63% de los casos presentaron la frecuencia de 24 horas.

En el caso del tercer segmento (correspondiente a los días de ayuno P14-15), los grupos INT, INT+ENT, OBx-UNI la frecuencia de 24 horas fue la de mayor presencia en la serie de tiempo en el 88-100% de los animales. Adicionalmente la frecuencia de 24 horas representó del 19-20% del total de las frecuencias que conformaron la serie; las frecuencias de 13-23 horas representaron el 6%, las frecuencias de 7-12 horas, representaron el 12-14%; y las frecuencias menores a 6 horas, representaron del 59-62% del total de frecuencias presentes en la señal. Mientras que en el grupo OBx-BI la frecuencia de 24 horas fue la de mayor presencia en la serie de tiempo en el 75% de los animales del grupo. Además esta frecuencia representó el 16% del total de las frecuencias que conforman la serie; las frecuencias de 13-23 horas representaron el 5%, las frecuencias de 7-12 horas representaron el 15%; y las frecuencias menores a 6 horas, representaron el 61%

del total de los casos, por lo que hubo un decremento de la frecuencia circadiana y un incremento en las frecuencias ultradianas.

VII.4.4. Control de fase

En lo que se refiere a la hora en la que se presentó la máxima y mínima temperatura corporal (Fig. 11). En el primer segmento (P4-8), encontramos que en los animales del grupo INT estas ocurrieron a las 14.1 ± 0.9 y 12.5 ± 0.5 horas respectivamente; en los animales del grupo INT+ENT a las 14.8 ± 0.8 y 13.2 ± 0.6 horas respectivamente; en los gazapos del grupo SHAM a las 13.8 ± 0.9 y 13.8 ± 0.9 horas; en el grupo OBx-UNI a las 15.8 ± 1.2 y 13 ± 0.6 horas respectivamente. Mientras que en los animales del grupo OBx-BI se presentaron a las 16.8 ± 0.9 y 12.2 ± 0.5 horas.

En relación al retraso en el horario del amamantamiento (P9-13), se observó que los animales pertenecientes a los grupos INT, INT+ENT, SHAM y OBx-UNI mostraron un retraso en la acrofase del ritmo de temperatura corporal, el cual coincidió con el nuevo horario del amamantamiento, para lo cual requirieron en promedio 1.6 días para ajustarse (Fig. 11). De manera general los animales a partir del día P11 alcanzaron un estado estable en la nueva fase del ritmo de temperatura corporal (Fig. 11). La acrofase y el nadir del ritmo de la temperatura corporal después del cambio en el horario, se presentaron en los siguientes momentos del ciclo: en los animales del grupo INT ocurrió 16.1 ± 0.7 y 19.3 ± 0.5 horas respectivamente; para los animales del grupo INT+ENT la acrofase y el nadir ocurrieron 17.6 ± 0.8 y 17.4 ± 0.3 horas respectivamente; para los animales del grupo SHAM ocurrieron 15.1 ± 3 y 18 ± 0.5 horas respectivamente; para los animales

del el grupo OBx-UNI ocurrieron a las 15.7 ± 0.6 y 17.8 ± 0.5 horas. En contraste, en los animales del grupo OBx-BI se observó una clara deficiencia en el control de fase, ya que, 6 de los gazapos requirieron 2.6 ciclos para que se ajustara el ritmo de temperatura al nuevo horario del amamantamiento. Además de que en 1 sujeto de este grupo, el ritmo de la temperatura corporal no se ajustó a la nueva fase de amamantamiento. En lo que se refiere a la acrofase y el nadir del ritmo de temperatura, posterior al cambio de horario, estos ocurrieron a las 19.2 ± 1.1 y 17.7 ± 0.3 (Fig.11).

En los días correspondientes al ayuno (P14-15) el acrofase y nadir de la temperatura (Fig. 11) ocurrieron: en el grupo INT a las 19.3 ± 0.9 y 11.3 ± 1.8 horas; para los animales del grupo INT+ENT ocurrieron 18.8 ± 1.2 y 12.7 ± 1.8 horas; para el grupo SHAM ocurrieron 17.5 ± 0.5 y 11.8 ± 1.8 horas respectivamente; para los gazapos del grupo OBx-UNI ocurrieron 19 ± 0.9 y 17.3 ± 2.4 horas respectivamente. Mientras que para los animales del grupo OBx-BI la acrofase y el nadir ocurrieron 16.2 ± 1.6 y 14.9 ± 2.5 horas (Fig. 11).

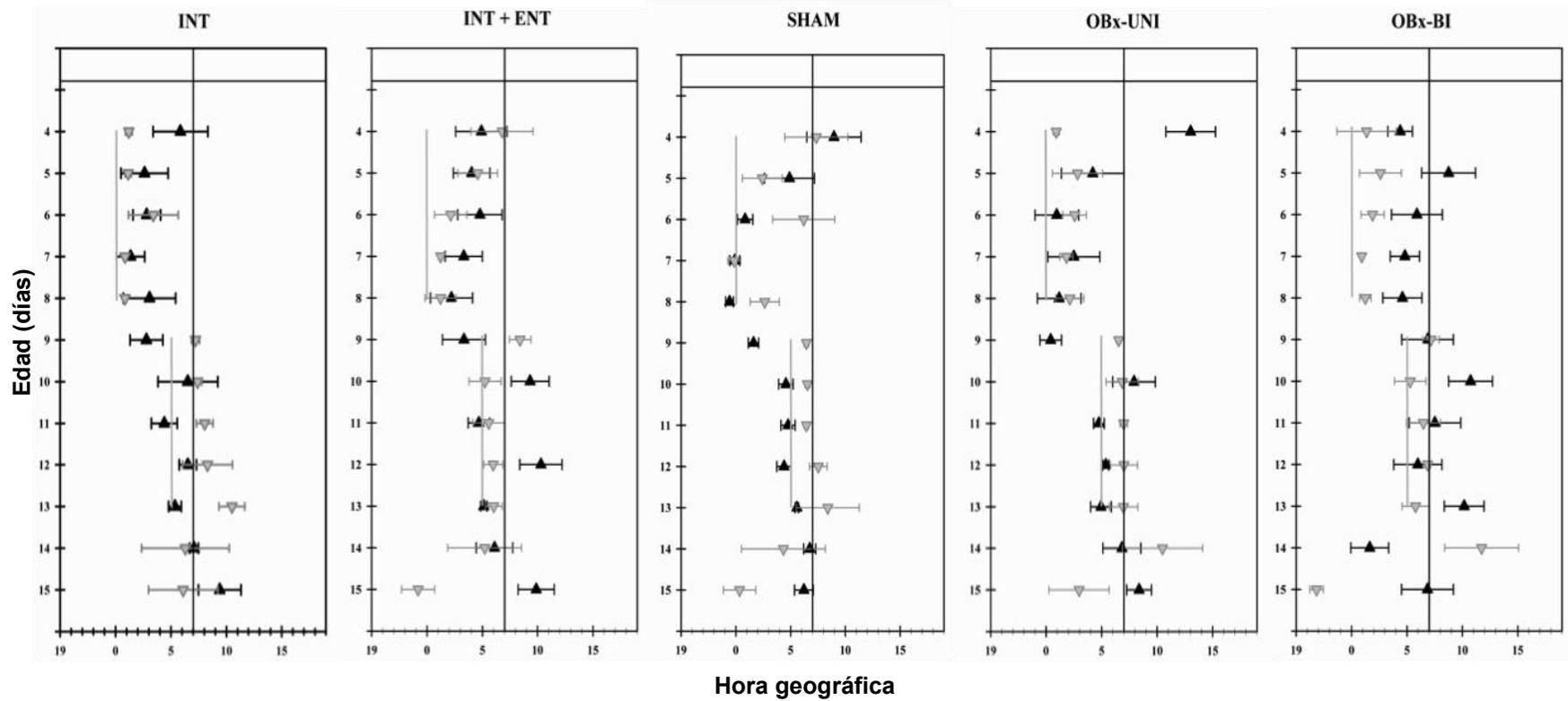


Figura 11. Promedio diario de la acrofase y nadir de la temperatura corporal de los días 4 a 15 de edad postnatal de los conejos pertenecientes a los grupos: Intacto (INT n=8), Intactos alimentados enteralmente (INT+ENT n=8), con lesiones falsas (SHAM n=8), con lesión unilateral (UNI n=8) y bilateral (BI n=8) de bulbo olfatorio. La barra vertical indica el momento de la alimentación. Los valores se expresan como $\bar{x} \pm EE$.

VII.4.5. Duración de la anticipación

En lo que se refiere a la duración del incremento anticipatorio de la temperatura corporal (Fig. 12), el análisis de varianza mostró un efecto significativo asociado al grupo y a la edad de los animales (Grupo: $F_{(4,415)} = 12.6$, $p < 0.0001$; Edad: $F_{(11,415)} = 13.1$, $p < 0.0001$; Interacción: $F_{(44,415)} = 1.3$, $p = \text{NS}$). En el primer segmento (P4-8 de edad) observamos que la duración de la anticipación tuvo valores similares en los grupos INT; INT+ENT; SHAM y OBxUNI (164.1±13, 142.7±12.1, 170.5±11.9, 140.6±13.9 minutos, respectivamente). En contraste los animales del grupo OBx-BI presentaron una duración de la anticipación significativamente menos alcanzando valores de 76.5±10.2 minutos (Fig. 12). Con respecto al cambio de la hora del amamantamiento (P9-13 de edad), la duración del incremento anticipatorio de la temperatura corporal fueron similares para los grupos INT, INT+ENT, SHAM y OBx-UNI (142.6±15.6, 148.3±14.2, 151.9±15.1, 151.4±12.6 minutos, respectivamente); mientras que para los animales OBx-BI la duración fue inferior, alcanzando valores de 102.4±14.5 minutos. En los días que los animales no tuvieron acceso a la hembra lactante (P14-15), la duración del incremento anticipatorio no mostró cambios significativos en los grupos INT, INT+ENT, SHAM y OBx-UNI (140±14.02, 117.3±18.4, 121.1±14.8, 136.5±14.6 minutos, respectivamente); en los gazapos del grupo OBx-BI la duración de la anticipación fue inferior a estos, mostrando valores de 99.8±19.2 minutos (Fig. 12).

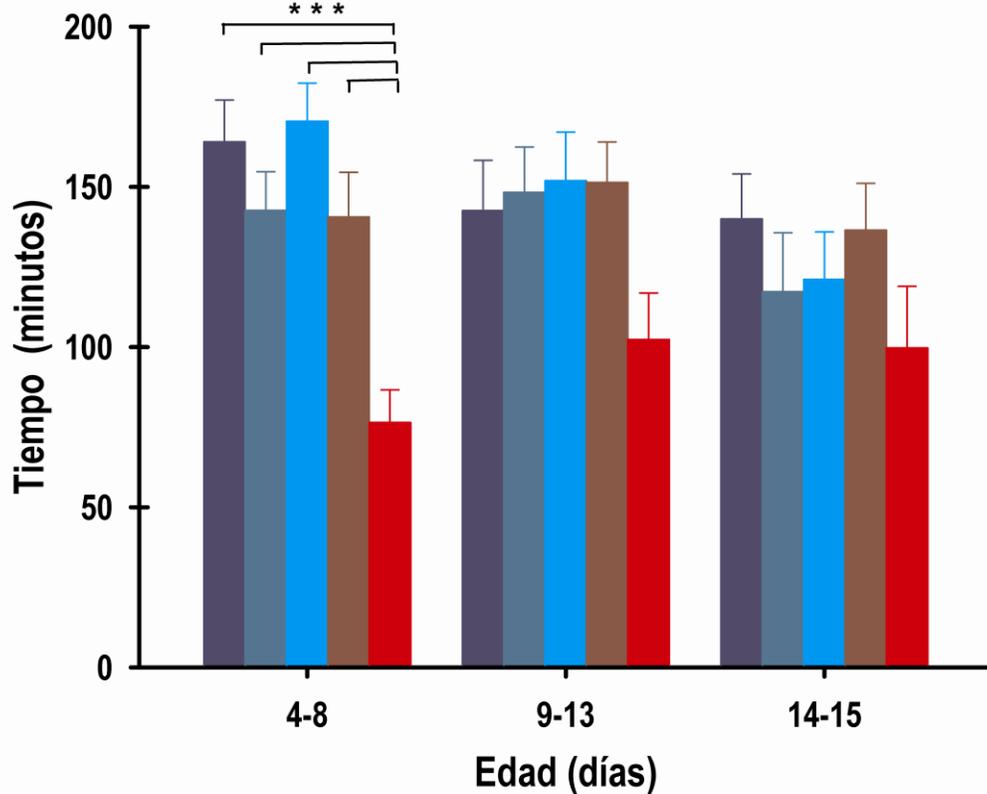


Figura 12. Gráfica del promedio de la duración del incremento anticipatorio de la temperatura corporal de los gazapos pertenecientes a los grupos Intacto (INT n=8); Intactos alimentados enteralmente (INT+ENT n=8); con lesiones falsas (SHAM n=8) y de los animales lesionados unilateral (UNI n=8) y bilateral (BI: n=8) de bulbo olfatorio. Los promedios fueron analizados por segmentos el primer segmento corresponde a los días P4-8, el segundo segmento P9-13 y el tercer segmento P14-15. Los valores se expresan como $\bar{x}+EE$. *** indica diferencia significativa entre OBx-BI y los grupos INT, INT+ENT, SHAM y OBx-UNI $p= <0.0001$.

VII.4.5. Intensidad de la anticipación

En lo referente a la intensidad del incremento anticipatorio en la temperatura corporal (Fig. 13), el análisis de varianza, mostró diferencias significativas relacionadas al grupo y a la edad (Grupo: $F_{(4,417)}= 12.6$, $p= <0.0001$; Edad: $F_{(11,417)}= 11.1$, $p= <0.0001$; Interacción: $F_{(44,417)}= 1.1$, $p= NS$). La intensidad en la anticipación mostró una ligera tendencia a disminuir con la edad,

exclusivamente en los animales de los grupos INT y OBx-UNI, mientras que en los demás grupos esta permaneció constante (Fig. 13). En el primer segmento (P4-8 de edad), observamos que el incremento anticipatorio de la temperatura corporal fue similar en los animales pertenecientes a los grupos INT, INT+ENT, SHAM, OBx-UNI ($0.38\pm 0.03^{\circ}\text{C}$, $0.36\pm 0.03^{\circ}\text{C}$, $0.4\pm 0.03^{\circ}\text{C}$, $0.35\pm 0.04^{\circ}\text{C}$, respectivamente). En contraste los gazapos pertenecientes al grupo OBx-BI presentaron una disminución significativa en la intensidad de la anticipación, mostrando valores de $0.19\pm 0.03^{\circ}\text{C}$ (Fig. 13). Con respecto al cambio en el horario de la alimentación (P9-13 de edad), el incremento anticipatorio en la temperatura corporal mostró valores similares a los observados en el primer segmento para los animales pertenecientes a los grupos INT, INT+ENT, SHAM, OBx-UNI ($0.3\pm 0.03^{\circ}\text{C}$, $0.37\pm 0.03^{\circ}\text{C}$, $0.33\pm 0.03^{\circ}\text{C}$, $0.33\pm 0.03^{\circ}\text{C}$, respectivamente). En contraste, los animales del grupo OBx-BI los valores de la intensidad de la anticipación fueron de $0.22\pm 0.03^{\circ}$ (Fig. 13). En los días en los que los animales no tuvieron acceso a la hembra lactante (P14-15 de edad), el incremento anticipatorio en la temperatura corporal no mostró cambios significativos en los grupos INT, INT+ENT, SHAM y OBx-UNI ($0.28\pm 0.03^{\circ}\text{C}$, $0.36\pm 0.04^{\circ}\text{C}$, $0.31\pm 0.04^{\circ}\text{C}$, $0.27\pm 0.2^{\circ}\text{C}$ respectivamente). No obstante los animales del grupo en los que se lesionó bilateralmente el bulbo olfatorio, el incremento anticipatorio de la temperatura corporal fue de $0.24\pm 0.04^{\circ}\text{C}$, por encima de la temperatura promedio (Fig. 13).

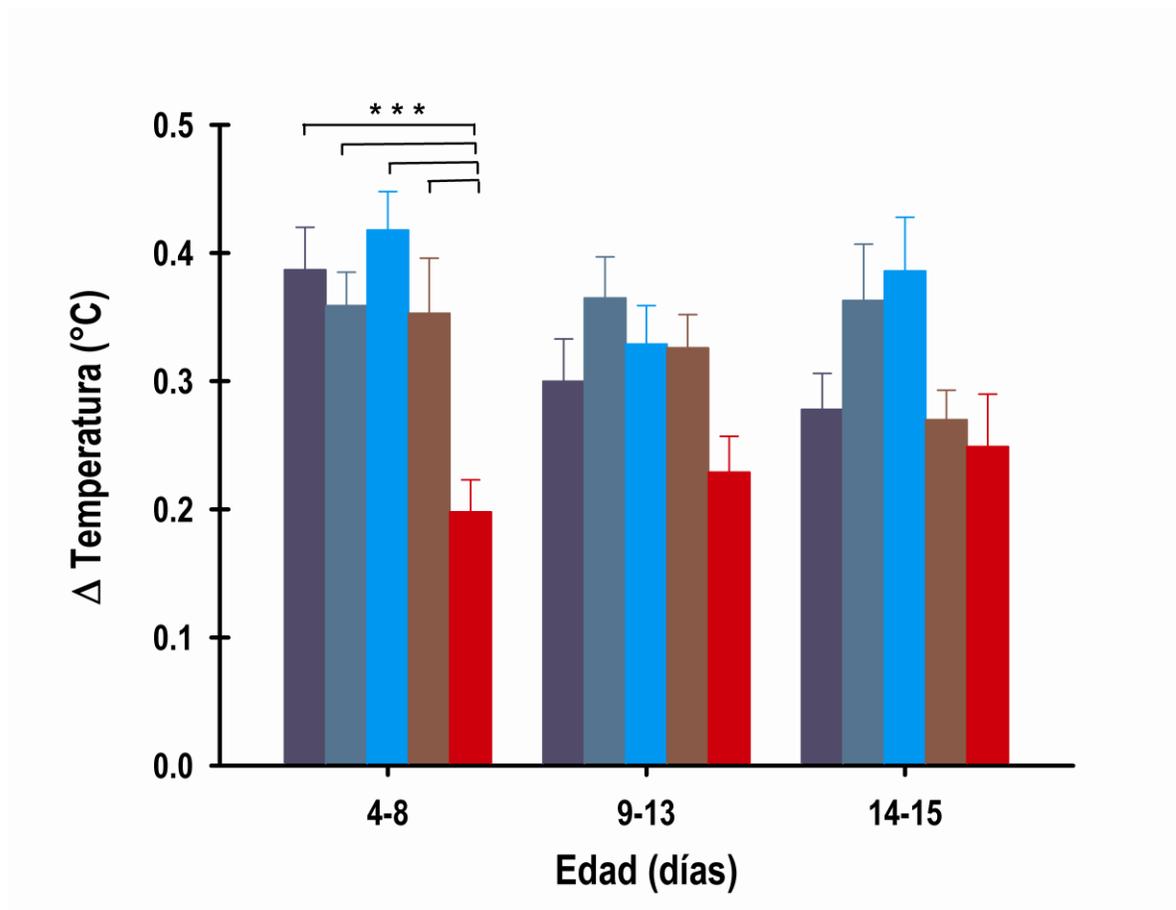


Figura 13. Gráfica del promedio de la intensidad de la anticipación de la temperatura corporal de los gazapos pertenecientes a los grupos Intacto (INT n=8); intactos alimentados enteralmente (INT+ENT n=8); con lesiones falsas (SHAM n=8) y de los animales lesionados unilateral (UNI n=8) y bilateral (BI: n=8) de bulbo olfatorio. Los promedios fueron analizados por segmentos el primer segmento corresponde a los días P4-8, el segundo segmento P9-13 y el tercer segmento P14-15. Los valores se expresan como $\bar{x} \pm EE$. *** indica diferencia significativa entre OBx-BI y los grupos INT ($p=0.0004$) SHAM ($p < 0.0001$) y OBx-UNI ($p=0.0006$)

VII.5. Actividad locomotora

VII.5.1 Actividad locomotora diaria

En el promedio diario de la actividad locomotora registrado de los días P4 a P15 en los gazapos, el análisis de varianza reveló un efecto significativo asociado al grupo y a la edad (Grupo: $F_{(4,411)} = 4.3$, $p = 0.001$; Edad: $F_{(11,411)} = 21.7$, $p < 0.0001$; Interacción $F_{(44,411)} = 0.6$, $p = \text{NS}$). Observamos una tendencia natural en la que la actividad locomotora disminuyó conforme avanza la edad de los animales (Fig. 17). Es importante mencionar que al inicio del experimento (P4) la actividad locomotora de los diferentes grupos fue similar (INT 19.6 ± 0.8 ; INT+ENT 16.8 ± 1.3 ; SHAM 19.1 ± 1.07 ; OBx-UNI 19.5 ± 1.1 y OBx-BI 18.3 ± 2.2 , movimientos/2 minutos). Para el día correspondiente al cambio de fase (P9) la actividad locomotora de los animales pertenecientes a los grupos INT, INT+ENT, SHAM y OBx-UNI fue similar (13.7 ± 0.6 , 14.2 ± 1.02 , 12.4 ± 0.7 , 14.6 ± 1.3 , movimientos/2 minutos); mientras que para los gazapos OBx-BI la actividad locomotora fue ligeramente inferior, mostrando valores de 11.9 ± 0.9 movimientos/2 minutos. Al finalizar el experimento (Fig. 17), todos los grupos obtuvieron valores de actividad similares (11.4 ± 1.1 , 10.2 ± 0.5 , 12.3 ± 1.2 , 12.5 ± 1.04 y 13.3 ± 0.9 movimientos/2 minutos).

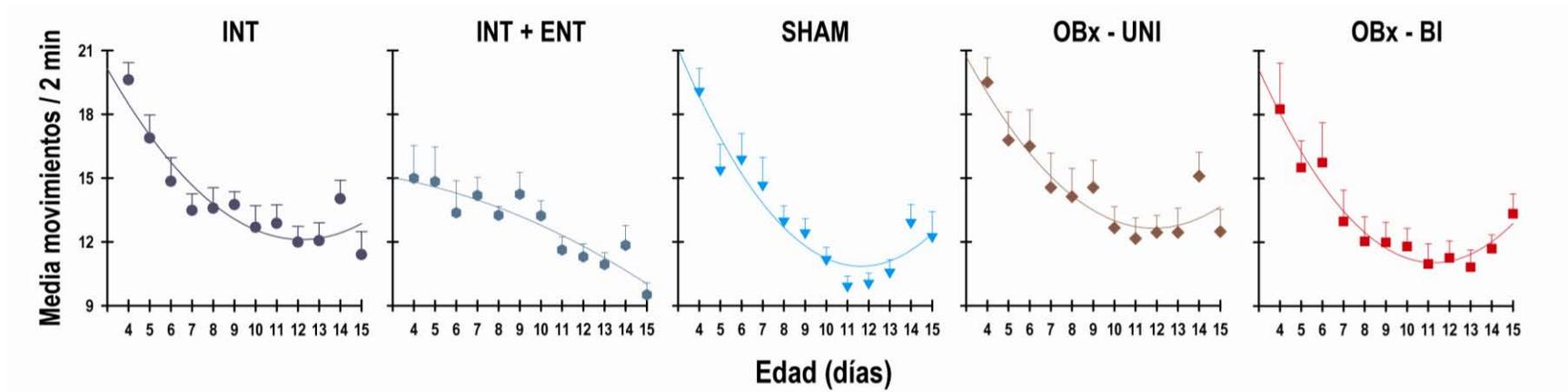


Figura 14. Promedio diario de la actividad locomotora de los conejos en los días 4 a 15 de edad postnatal pertenecientes a los grupos Intacto (INT: círculos azules n=8); intactos alimentados enteralmente (INT+ENT: círculos verdes n=8); con lesiones falsas (SHAM: triángulos azules n=8) y con lesión unilateral (UNI: rombos cafés n=8) y bilateral (BI: cuadros rojos n=8) de bulbo olfatorio. Los valores se expresan como $\bar{x} \pm EE$.

VII.5.2. Patrón temporal de la actividad locomotora

En lo que se refiere al patrón diario de la actividad locomotora, los animales correspondientes a los grupos INT, INT+ENT, SHAM y OBx-UNI (Fig. 15 y 16) mostraron patrones diurnos típicos evidentes a partir del día P4, con un claro componente anticipatorio previo a la hora del amamantamiento; ante el retraso de fase en el acceso de la hembra lactante, pasados los ciclos transitorios se observó un ajuste en la fase en el ritmo de la actividad locomotora de acuerdo con el nuevo horario de amamantamiento. Finalmente, en los días que no se tuvo acceso a la hembra lactante el patrón diario de la actividad locomotora se conservó sin alteraciones (Fig. 15 y 16). En lo correspondiente a los animales pertenecientes al grupo OBx-BI se observaron cambios en el patrón temporal de la actividad, tanto en el componente anticipatorio, el ajuste al cambio de fase y en ausencia total de señales sincronizadoras, como se detallará a continuación (Fig. 15 y 16).

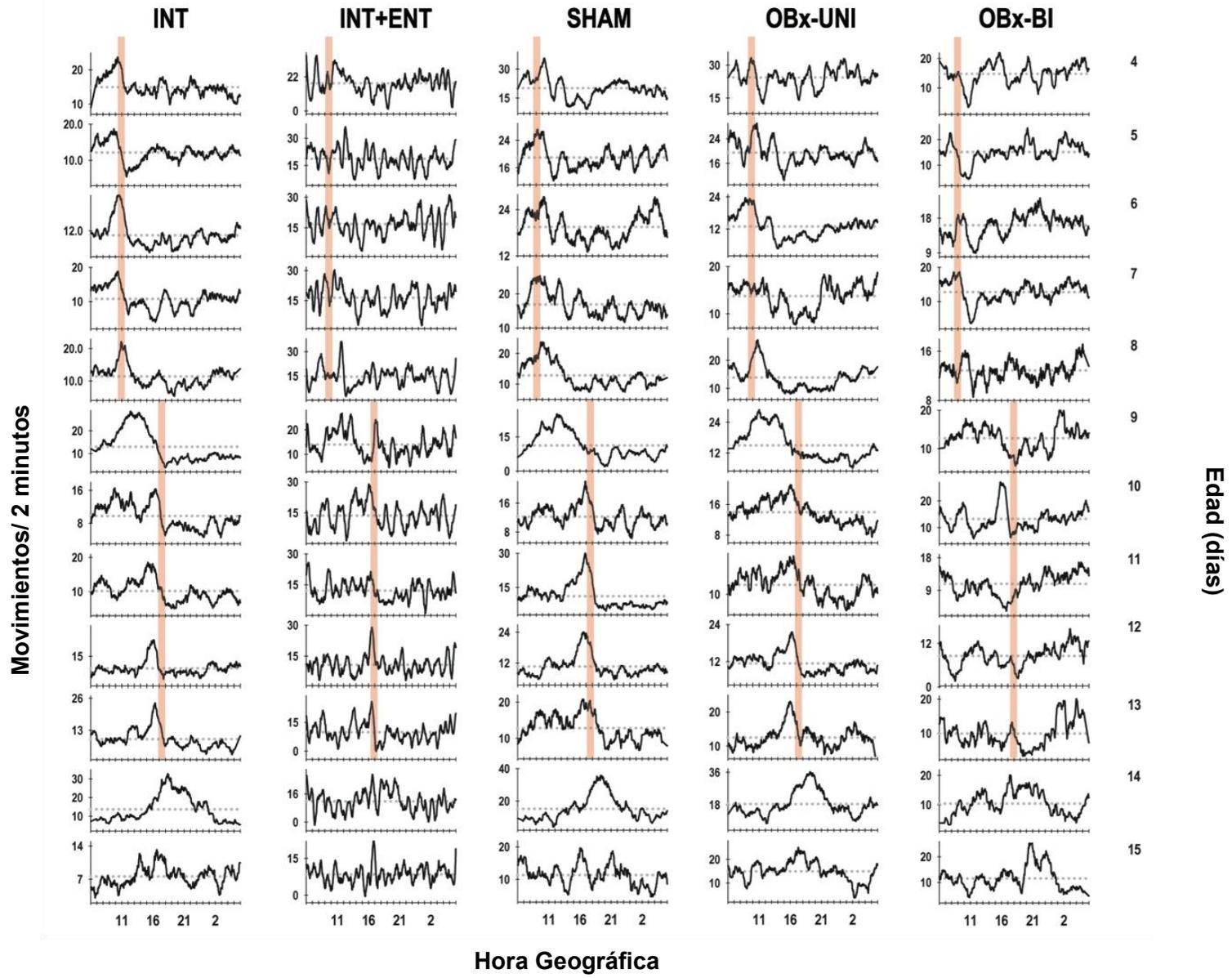
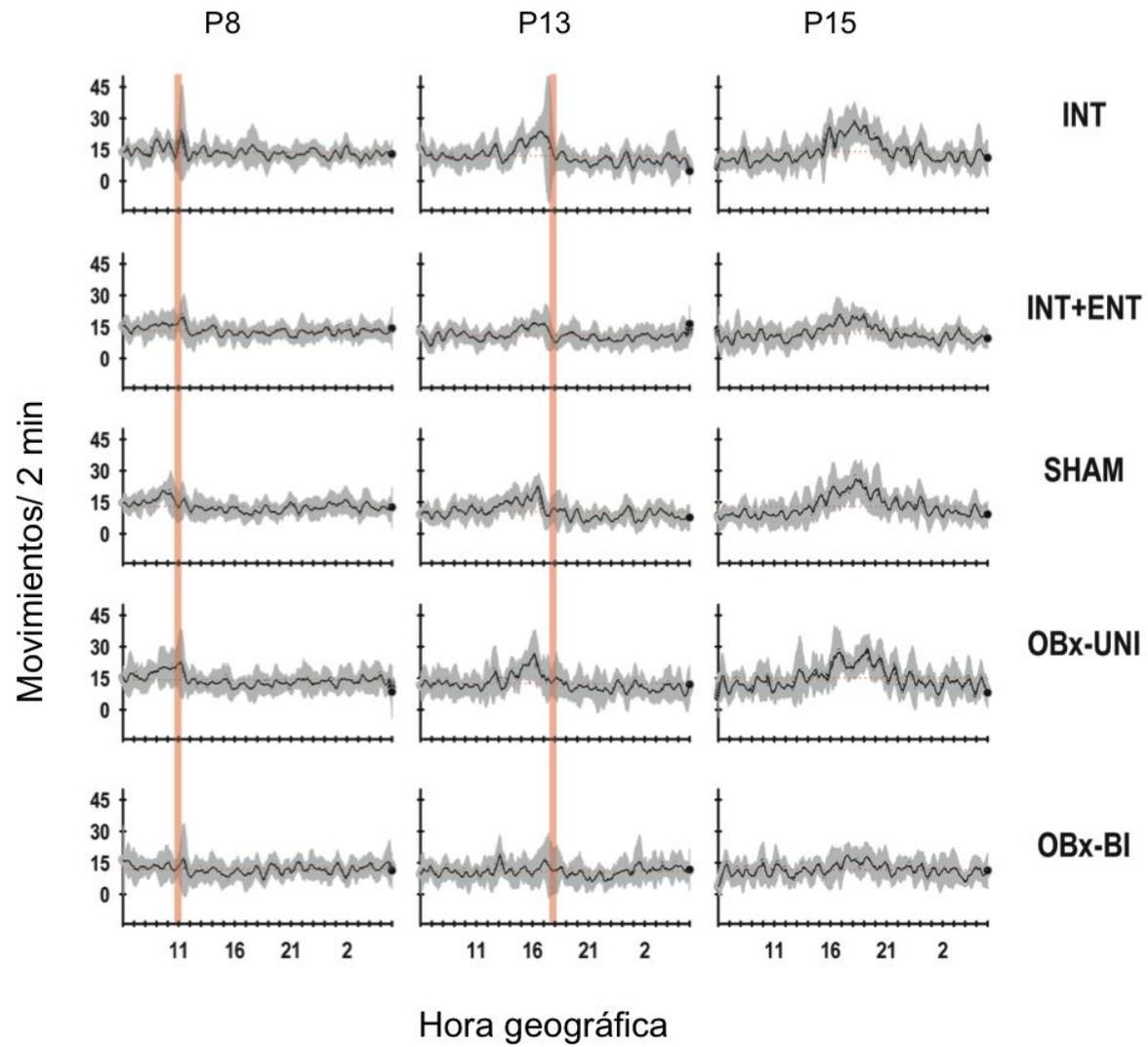


Figura 15. Patrón diario de la actividad locomotora de los días 4-15 de edad postnatal de un conejo representativo, de los grupos: Intacto (INT), Intactos alimentados enteralmente (INT+ENT), con lesiones falsas (SHAM), con lesión unilateral (UNI) y bilateral (BI) de bulbo olfatorio. La barra roja vertical indica la hora del amamantamiento.

Figura 16. Promedio diario por grupo de la actividad locomotora (P8), ante el retraso de 6 horas en la fase en el horario del amamantamiento ($-\Delta\Phi$) y en ausencia de acceso a la hembra lactante (Sin ♀); de los conejos pertenecientes a los grupos: Intacto (INT n=8), Intactos alimentados enteralmente (INT+ENT n=8), con lesiones falsas (SHAM n=8), con lesión unilateral (UNI n=8) y bilateral (BI n=8) de bulbo olfatorio. La barra roja vertical indica el momento en el que tuvo lugar la alimentación de los gazapos. Los valores se expresan como $\bar{x} \pm EE$.



VII.5.3. Análisis de frecuencias

En las series de tiempo obtenidas, al analizar el primer segmento (correspondiente a los días P4-8), se encontró que en el 50-88% de los animales pertenecientes a todos los grupos la frecuencia de 24 horas estuvo presente dentro de las tres primeras frecuencias con mayor presencia en la serie de tiempo.

En el caso del segundo segmento (correspondiente al cambio de fase; P9-13), entre el 88-100% de los animales de los grupos INT, INT+ENT, SHAM, OBx-UNI presentaron la frecuencia de 24 horas, dentro de las tres frecuencias de mayor presencia en la serie de tiempo. En el caso del grupo OBx-BI, el 50% de los casos presentaron la frecuencia de 24 horas, en un caso no se observó la frecuencia de 24 horas.

En el caso del tercer segmento (correspondiente a los días de ayuno P14-15), los grupos INT, INT+ENT, OBx-UNI la frecuencia de 24 horas fue la de mayor presencia en la serie de tiempo en el 88-100% de los animales. Adicionalmente, la frecuencia de 24 horas representó del 19-21% del total de las frecuencias que conformaron la serie; las frecuencias de 13-23 horas representaron el 6%, las frecuencias de 7-12 horas representaron el 13%, las frecuencias de 0-6 horas, representaron del 58-64% del total de frecuencias presentes en la señal. Mientras que en el grupo OBx-BI la frecuencia de 24 horas fue la de mayor presencia en la serie de tiempo en el 50% de los animales del grupo, en un caso no se observó la frecuencia de 24 horas. Además esta frecuencia representó el 16% del total de las frecuencias que conforman la serie; las frecuencias de 13-23 horas representaron el 5%, las frecuencias de 7-12 horas representaron el 15%, las frecuencias de 0-6

horas, representaron el 61% del total de los casos, por lo que en este grupo se encontró un decremento de la frecuencia circadiana.

VII.5.4. Control de fase

En lo que se refiere a la hora en la que se presentaron la acrofase y el nadir de actividad locomotora, en el primer segmento (P4-8), para los animales del grupo INT estas ocurrieron a las 7 ± 0.8 y 10.3 ± 0.8 horas respectivamente; para los animales del grupo INT+ENT ocurrieron a las 7.6 ± 1 y 10.8 ± 1.1 horas respectivamente; para los animales del grupo SHAM ocurrieron a las 9.2 ± 1.2 y 9.8 ± 0.9 horas respectivamente; para el grupo OBx-UNI la acrofase y el nadir ocurrieron 7.4 ± 0.9 y 10.1 ± 0.8 horas respectivamente; mientras que para los animales del grupo OBx-BI se presentaron a las 11.1 ± 1.3 y 9.3 ± 0.9 horas de haberse presentado el evento del amamantamiento y alimentación enteral.

En relación al retraso en el horario del amamantamiento, se observó que los animales pertenecientes a los grupos INT, INT+ENT, SHAM y OBx-UNI mostraron un retraso en la acrofase del ritmo de actividad locomotora, el cual coincidió con el nuevo horario del amamantamiento, requiriendo en promedio 1.8 días para ajustarse. De manera general los animales a partir del día P12 alcanzaron un estado estable en la nueva fase del ritmo de actividad locomotora (Fig. 15). Después del cambio de fase (P9-13), la acrofase y el nadir del ritmo de la actividad locomotora, en los animales pertenecientes al grupo INT ocurrieron a las 10.1 ± 0.8 y 14.1 ± 0.9 horas respectivamente; para los animales del grupo INT+ENT ocurrieron a las 9 ± 0.7 y 13.5 ± 1.1 horas respectivamente; para los animales del grupo SHAM ocurrieron a las 9 ± 0.7 y 14.2 ± 0.7 horas

respectivamente; para el grupo OBx-UNI la acrofase y el nadir ocurrieron 8.9 ± 0.5 y 15.3 ± 0.9 horas respectivamente. En contraste, los animales del grupo OBx-BI se observó una clara deficiencia en el control de fase, ya que, 6 de los gazapos requirieron 2.6 ciclos para que se ajustara el ritmo de actividad locomotora al nuevo horario del amamantamiento. Además de que en dos sujetos de este grupo, el ritmo de la actividad locomotora no se ajustó a la nueva fase de amamantamiento (Fig. 17). En lo que se refiere a la acrofase y el nadir del ritmo de actividad locomotora, posterior al cambio de horario, estos ocurrieron a las 10.7 ± 1.1 y 12.9 ± 0.7 horas.

En los días correspondientes al ayuno (P14-15) el máximo y mínimo de la actividad locomotora, en los animales del grupo INT presentaron a las 12.3 ± 0.9 y 12 ± 2.1 horas respectivamente; para los animales del grupo INT+ENT ocurrieron a las 16.1 ± 1.5 y 7.3 ± 1.8 horas respectivamente; para el grupo SHAM ocurrieron a las 13.4 ± 1.2 y 10.4 ± 2.1 horas respectivamente; para los gazapos del grupo OBx-UNI estas ocurrieron a 11.4 ± 1 y 10.8 ± 2.1 horas respectivamente; mientras que para los animales del grupo OBx-BI ocurrieron a las 12.2 ± 1.4 y 6.9 ± 1.7 horas (Fig. 17).

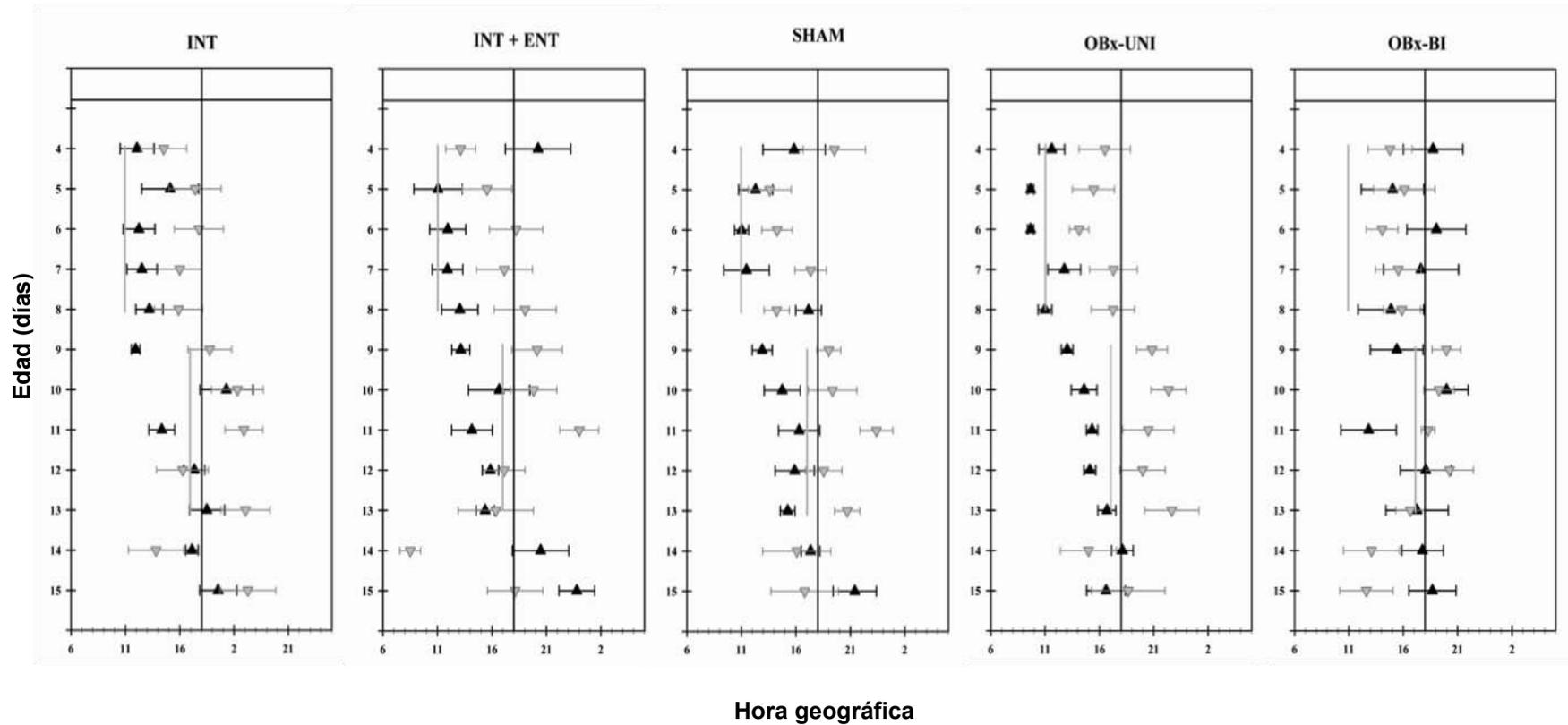


Figura 17. Promedio diario de la acrofase y nadir de la actividad locomotora de los días 4 a 15 de edad postnatal de los conejos pertenecientes a los grupos: Intacto (INT n=8), Intactos alimentados enteralmente (INT+ENT n=8), con lesiones falsas (SHAM n=8), con lesión unilateral (UNI n=8) y bilateral (BI n=8) de bulbo olfatorio. Los valores se expresan como $\bar{x} \pm EE$.

VII.5.5. Duración de la anticipación

En lo que se refiere a la duración de la anticipación de la actividad locomotora, el análisis mostró que hay un efecto significativo asociado al grupo, a la edad y a la interacción entre ambas (Grupo: $F_{(4,417)} = 4.6$, $p = .001$; Edad: $F_{(11,417)} = 3.2$, $p = 0.0004$; Interacción: $F_{(44,417)} = 1.44$, $p = 0.04$). En el primer segmento (P4-8 de edad) observamos que la duración de la anticipación obtuvo valores similares para los animales de los grupos INT, INT+ENT, OBx-UNI y OBx-BI (76.4±9.7, 65.5±8.1, 66.8±6.8 y 62.9±8.3 minutos, respectivamente). En el caso del grupo SHAM la duración del componente anticipatorio fue de 92.9±9.3 minutos (Fig. 18). Con respecto al cambio en el horario de la alimentación (P9-13), los valores de duración de la anticipación presentaron una ligera tendencia a aumentar en comparación con el segmento anterior. Esta variable mostró valores similares en los animales de los grupos: INT, INT+ENT, SHAM y OBx-UNI (109.6±10.6; 97.7±10.2 87.2±9.3; 85.9±10.3 minutos, respectivamente). En contraste, los animales OBx-BI, mostraron un decremento significativo en la duración de la anticipación en relación con los demás grupos bajo estudio, alcanzando valores de 51.4±6.4 minutos (Fig. 18). Cuando los animales fueron sometidos a ayuno (P14-15), los valores obtenidos para la duración de la anticipación no mostró diferencias en los diferentes grupos INT, INT+ENT, SHAM, OBx-UNI y OBx-BI (62.6±11.2; 83.3±13.9; 77.8±12.1; 78±13.6 y 70.1±13.9 minutos, respectivamente) (Fig. 18).

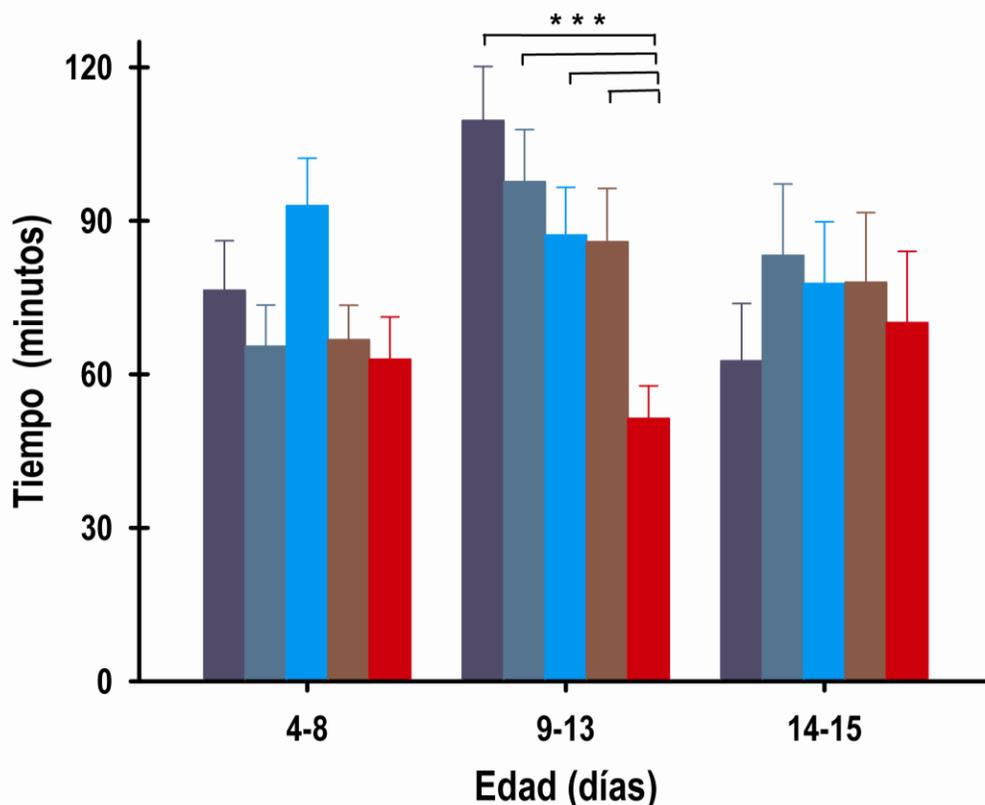


Figura 18. Gráfica del promedio de la duración de la anticipación de la actividad locomotora de los gazapos pertenecientes a los grupos Intacto (INT n=8); Intactos alimentados enteralmente (INT+ENT n=8); con lesiones falsas (SHAM n=8) y de los animales lesionados unilateral (UNI n=8) y bilateral (BI: n=8) de bulbo olfatorio. Los promedios fueron analizados por segmentos el primer segmento corresponde a los días P4-8, el segundo segmento P9-13 y el tercer segmento P14-15. Los valores se expresan como $\bar{x} \pm EE$. *** indica diferencia significativa entre OBx-BI y los grupos INT ($p = .0003$) INT+ENT ($p = .0046$) y SHAM ($p = .0003$).

VII.5.6. Intensidad de la anticipación

En lo referente a la intensidad de la anticipación en la actividad locomotora, el análisis de varianza mostró diferencias significativas relacionadas al grupo y la edad de los gazapos (Grupo: $F_{(4,458)} = 1.7$, $p = NS$; Edad: $F_{(2,458)} = 1.1$, $p = NS$; Interacción: $F_{(8,458)} = 0.9$, $p = NS$). Los valores de intensidad en la anticipación presentan una tendencia a mantenerse constantes conforme avanza la edad. En el primer segmento (P4-8 de edad) observamos que los animales de los grupos

INT, INT+ENT, SHAM, OBx-UNI y OBx-BI mostraron valores semejantes en el incremento anticipatorio de la actividad locomotora (11.9 ± 1.2 , 12.4 ± 1.1 , 14 ± 1.1 , 13.8 ± 1.2 y 13.3 ± 1.3 movimientos, respectivamente) (Fig. 19). Con respecto al cambio en el horario de la alimentación (P9-13 de edad), la intensidad de la anticipación exhibieron valores similares en los animales pertenecientes a los grupos INT, INT+ENT, SHAM, OBx-UNI y OBx-BI (15.5 ± 1.1 , 13.3 ± 0.9 , 13.3 ± 0.8 , 15.6 ± 1.4 y 12.5 ± 1.2 movimientos, respectivamente) (Fig. 19). En los días en los que los animales no tuvieron acceso a la hembra lactante (P14-15 de edad), pudimos ver que en los diferentes grupos bajo estudio; INT INT+ENT, SHAM, OBx-UNI y OBx-BI el incremento anticipatorio de la actividad locomotora fue similar (15.9 ± 1.8 , 13.4 ± 6.5 , 13.5 ± 5.9 , 16.3 ± 2.6 y 11.6 ± 4.9 movimientos, respectivamente). (Fig. 19).

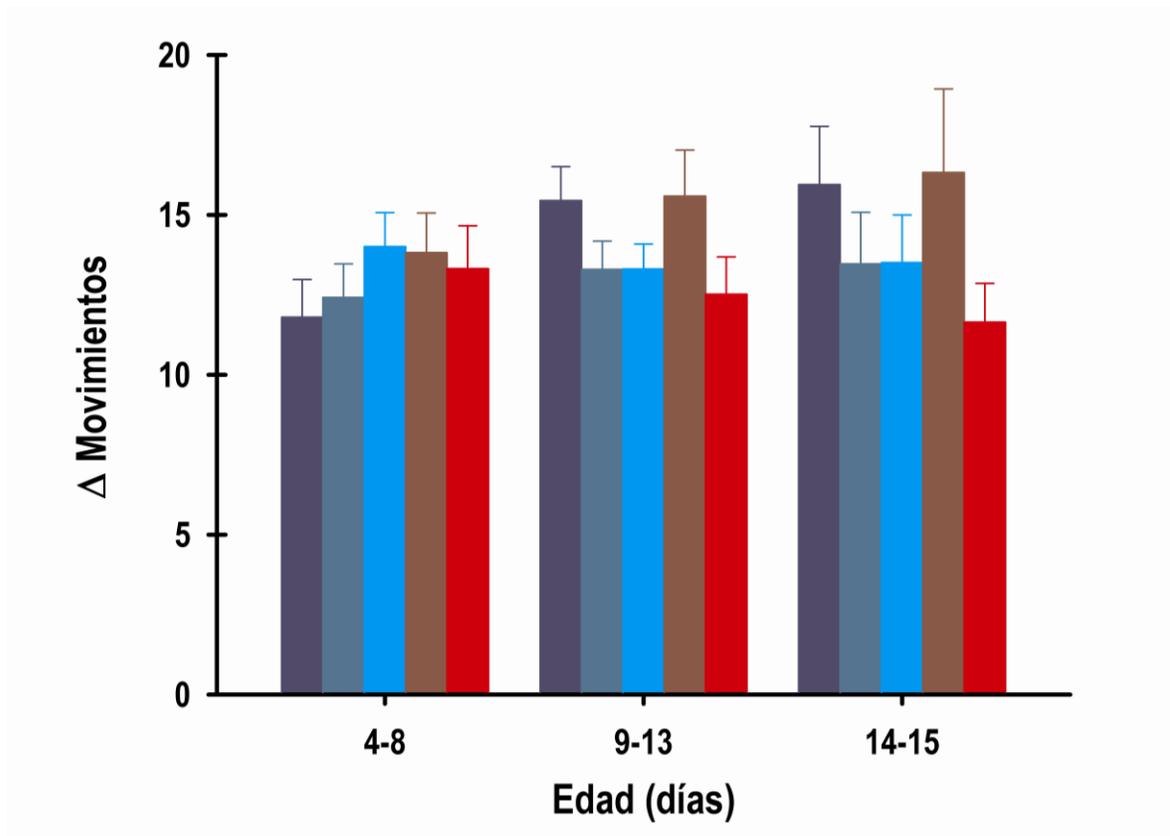


Figura 19. Gráfica del promedio de la intensidad de la anticipación de la actividad corporal de los gazapos pertenecientes a los grupos Intacto (INT n=8); intactos alimentados enteralmente (INT+ENT n=8); con lesiones falsas (SHAM n=8) y de los animales lesionados unilateral (UNI n=8) y bilateral (BI: n=8) de bulbo olfatorio. Los promedios fueron analizados por segmentos el primer segmento corresponde a los días P4-8, el segundo segmento P9-13 y el tercer segmento P14-15. Los valores se expresan como $\bar{x} \pm EE$.

VIII. DISCUSIÓN

En el presente estudio, se observó que las lesiones bilaterales de bulbo olfatorio en conejos neonatos, tienen un efecto significativo en diferentes aspectos del desarrollo, así como en el patrón diurno y circadiano tanto de la actividad locomotora, como de la temperatura corporal.

En lo que se refiere a la ganancia de peso corporal, se encontró diferencias significativas en los pesos de los grupos INT+ENT y OBx-BI, con respecto a los animales de los grupos INT, SHAM y OBx-UNI; esta diferencia se debe predominantemente a la alimentación enteral con la fórmula láctea (Anexo A), la cual no alcanza a cubrir por completo los requerimientos necesarios para el óptimo desarrollo de los gazapos, más que a un efecto directo de la cirugía. Estudios previos en esta misma especie arrojaron efectos similares, en donde los gazapos alimentados con fórmula láctea presentaban una menor ganancia de peso con respecto a los neonatos alimentados de manera natural (Schley P. 1976; Schley P. 1980; Hudson R. 1985; Montúfar-Chaveznava, 2013).

Al igual que en reportes previos realizados en conejos, se observó que el promedio diario de la temperatura corporal y de la actividad locomotora sufrieron cambios durante el desarrollo; en donde la temperatura corporal de los gazapos, tiende a ir aumentando conforme avanza la edad de los animales y alcanzan la madurez tanto en su sistema nervioso central, como en la regulación metabólica; y al desarrollarse por completo su capacidad de termorregulación con el crecimiento de pelo. La baja temperatura corporal que mostraron los animales al inicio del

experimento se debe a la escasa capacidad que tienen los gazapos para termorregular, ya que estos se caracterizan por ser animales altriciales (Jilge, col. 2000; Trejo-Muñoz, col., 2013). De manera paralela, la actividad locomotora al inicio del desarrollo les permite a los animales generar calor y cambiar de posición dentro del nido de las zonas menos cálidas a las más cálidas, por lo que, conforme madura su capacidad de termorregulación, esta tiende a disminuir (Jilge, col. 2000; Trejo-Muñoz, col. 2012; Hernández-Campos, 2013; Montúfar-Chaveznava, col. 2013).

Es de notar que los animales pertenecientes al grupo OBx-BI presentaron una temperatura corporal inferior con respecto a los animales INT, esto puede deberse a la falta de estimulación olfativa por parte de la madre, a través de la feromona 2MB2 u otros componentes presentes en la leche materna. En un estudio previo de nuestro grupo de investigación, se encontró que los animales que no recibieron estimulación materna (feromona 2MB2), presentaron una temperatura corporal inferior, con respecto a los animales alimentados de manera natural y que recibieron la estimulación olfativa materna (Montúfar-Chaveznava, col. 2013). Asimismo, existen reportes en la literatura que sugieren que el bulbo olfatorio puede tener influencia directa sobre el funcionamiento del sistema nervioso autónomo. Tanida y colaboradores (2005, 2008) encontraron en roedores adultos, que la estimulación con aceite de toronja causaba un aumento en la temperatura corporal y la disminución de la presión arterial; mientras que el aceite de lavanda causaba una disminución en la temperatura corporal (Tanida M, col. 2005; 2008). Por lo que los cambios observados en la temperatura corporal de los

animales pertenecientes al grupo OBx-BI, pueden deberse a la ausencia total de estimulación olfativa.

En lo referente al patrón temporal de la temperatura corporal y de actividad locomotora los animales de los grupos INT, INT+ENT, SHAM, OBx-UNI mostraron una estrecha similitud entre sí, así como con los patrones previamente reportados en gazapos (Jilge B, 1995; Jilge, col. 2000; Jilge, col. 2001; Caldelas, col. 2008; Trejo-Muñoz, col. 2012). Este patrón temporal se caracteriza por un marcado incremento de la temperatura corporal y de la actividad locomotora horas previas al momento del amamantamiento (componente anticipatorio), un máximo que coincide con el momento del amamantamiento, seguido de disminución de las mismas (postprandio), para finalmente en horas posteriores regresar a la temperatura corporal y actividad locomotora basales (Jilge B, 1995; Jilge, col. 2000; Jilge, col. 2001; Caldelas, col. 2008; Trejo-Muñoz, col. 2012).

En un estudio realizado en gazapos, se demostró que la capacidad olfativa no depende de la integridad del bulbo olfatorio, ya que los neonatos responden a las señales olfativas maternas, aún después de haber sido lesionado el 81% de este órgano (Hudson y Distel, 1987); lo cual explica porque los animales del grupo OBx-UNI fueron capaces de guiarse hacia el vientre materno y amamantarse de forma eficiente. Asimismo, el hecho de que los animales OBx-UNI siguieron presentando un patrón circadiano de temperatura y actividad locomotora normal a pesar de la lesión, puede deberse a que el BO remanente, presenta características similares al de otros marcapasos, como ocurre en el caso del NSQ, en el que se ha encontrado que lesiones incompletas del NSQ en roedores no afectan los ritmos de actividad locomotora, incluso cuando solo permanece un

remanente del 20% del núcleo hipotalámico (Weaver, 1998); posiblemente este mismo fenómeno ocurre en los animales del grupo OBx-UNI, donde el bulbo remanente fue suficiente para mantener su función de marcapasos. Es importante recalcar que este patrón temporal estuvo ausente en los animales pertenecientes al grupo OBx-BI los cuales presentaron un patrón atípico de la temperatura corporal el cual carece por completo del aumento anticipatorio, presentando únicamente la disminución posterior al momento del amamantamiento (postprandio), este patrón atípico es consistente con los resultados obtenidos en un estudio previo en el que los gazapos fueron aislados de señales maternas, estimulados con agua y alimentados de manera enteral (Montúfar-Chaveznavá, col. 2013). Con respecto a la anticipación, estos animales presentaron una menor magnitud, la cual está relacionada directamente con el proceso de la alimentación.

En lo referente al efecto del cambio en el horario de amamantamiento, los animales pertenecientes a los grupos INT, INT+ENT, SHAM y OBx-UNI respondieron de manera similar y de forma esperada, en donde tras el cambio de fase, el componente anticipatorio fue ajustándose de manera paulatina hasta coincidir con el nuevo horario de amamantamiento. En el caso de los animales OBx-BI este ajuste de fase estuvo ausente, a pesar de que el postprandio ocurrió posterior al momento de la alimentación, esto obedece exclusivamente a la administración de la fórmula láctea, y carece de efectos sobre el funcionamiento del sistema circadiano, a este fenómeno se le denomina **enmascaramiento** (Moore-Ede, col. 1982), en el cual una señal ambiental aparentemente es capaz de sincronizar un ritmo, pero al momento de quitar esta (amamantamiento), no

persiste el componente circadiano, es decir, no persiste el componente del postprandio.

Es de suma importancia resaltar el papel que tiene el sistema olfatorio durante las primeras semanas de vida en los animales altriciales, como es el caso de los conejos y los roedores; los cuales se caracterizan por nacer con los párpados y el canal auditivo cerrados (Jilge, 1995; Jilge y Hudson, 2001; Jilge, col. 2001; Trejo-Muñoz, col. 2012); incluso la evidencia científica supone que en los conejos este sistema es completamente funcional días previos al parto (Hudson, 1985).

En este estudio, se comprobó por medio de pruebas conductuales, que los animales pertenecientes al grupo OBx-BI carecen completamente de la conducta típica de búsqueda del pezón (Hudson, 1985; Schaal, col., 2003 Montúfar-Chaveznava, col. 2013) y fueron completamente incapaces de alimentarse directamente del vientre de la madre. Estudios previos, han demostrado que la lesión de los bulbos olfatorios y la lesión del epitelio respiratorio provoca una pérdida de la capacidad de orientación de los neonatos hacia los pezones de la hembra lactante, por lo que son incapaces de alimentarse, esta incapacidad se mantiene a lo largo de los días causando inanición en los animales (Hudson y Distel, 1983; Hudson, 1985). En el caso de las lesiones del epitelio respiratorio, estas son completamente reversibles; asimismo, en un estudio realizado en nuestro grupo de investigación, hemos encontrado que las lesiones del epitelio olfatorio no causan una pérdida de la ritmicidad circadiana en la temperatura corporal y la actividad locomotora (datos sin publicar). Asimismo, es notable el hecho de que este comportamiento natural de los gazapos está ligado por

completo al bulbo olfatorio. Un estudio de Hudson y Distel, demuestra que las lesiones completas del órgano vomeronasal no alteran este patrón en los neonatos (Hudson y Distel, 1986).

Estudios realizados por Granados-Fuentes (2004a y b; 2006) en roedores adultos, demuestran que el bulbo olfatorio funciona como un marcapasos circadiano independiente al NSQ, ya que en ratas adultas arrítmicas por lesiones del NSQ o expuestas a un patrón de luz continuo, el bulbo olfatorio sigue presentando ritmicidad hasta por un periodo de 3 semanas (Granados-Fuentes, col., 2004b). Asimismo, en cultivos celulares, las neuronas del bulbo olfatorio son capaces de expresar patrones circadianos tanto en la expresión de genes, como en la actividad eléctrica; y estas son capaces de sincronizarse a los cambios en la temperatura (Granados-Fuentes, col., 2004a). Por otro lado, en estudios *in vivo*, las neuronas del BO son capaces de sincronizarse a estímulos olfatorios, ya que al exponer ratones adultos al olor del aceite de cedro se observó que la expresión de la proteína C-FOS en el BO, se sincronizaba al estímulo (Granados-Fuentes, col., 2006). Adicionalmente, diferentes estudios realizados en roedores adultos y primates nocturnos (Tabla 1), demuestran que las lesiones del bulbo olfatorio producen cambios importantes en diversos parámetros asociados a la ritmicidad circadiana que van desde cambios en el periodo del ritmo, alteraciones en el control de la fase de la actividad locomotora, aumento en el número de días transitorios tras un cambio de fase en el horario de la alimentación y cambios asociados a ciclos estacionales e hibernación, etc. (Miro, col., 1980; Pieper, col., 1991; Vagell, col., 1991; Meguid, col., 1993; Possident, col., 1996; Marcilhac, col., 1997; Goel, col., 1998; Perret, col., 2003; Vinkers, col., 2009). Estudios que

evidencian la participación del bulbo olfatorio en la generación y mantenimiento de la ritmicidad circadiana en animales adultos.

ARTÍCULO			Hallazgos
Autor	Año	Especie	
MIRO JL	1980	hámster europeo	Aumento en la ingesta de alimento No hibernan
PIEPEL DR	1991	hámster dorado	Aumento de la gonadotropina Previene la regresión testicular en periodos de días cortos Aumento en el periodo de actividad locomotora
VAGELL ME	1991	ratas	Aumento del cAMP en el NSQ
MEGUID MM	1993	ratas	Aumento en el número de veces que el animal come Disminución del tamaño de la ingesta de alimento por ocasión Ligero aumento en el número de olfateos durante la comida
POSSIDENT B	1996	ratón	Aumento en la actividad locomotora Aumento en el periodo en oscilación espontánea Retraso en el ritmo de actividad
MARCILHAC A	1997	rata	Aumento en la corticosterona Aumento en la actividad locomotora
GOEL N	1998	roedor nocturno	Aumento en días transitorios en actividad locomotora Aumento en peso de los testículos
PERRET M	2003	primates nocturnos	Reducción en el periodo de temperatura y actividad locomotora Retraso en la resincronización Aumento de periodos de actividad durante el periodo de reposo
VINKERS CH	2009	rata	Aumento en la actividad locomotora durante la noche Ligero aumento de la temperatura corporal

Tabla 1. Cuadro de los principales hallazgos asociados a las lesiones de bulbo olfatorio en diferentes especies.

Es importante mencionar que existen datos controversiales sobre los efectos de las lesiones de bulbo olfatorio, ya que en ratas adultas las lesiones de esta estructura no afectan la actividad anticipatoria a la alimentación (Davidson, col., 2001). En este modelo experimental, encontramos efectos importantes asociados a las lesiones bilaterales del bulbo olfatorio, donde la anticipación al amamantamiento no persistió en condiciones de ausencia total de esta señal. Estas diferencias pueden deberse, a las especies bajo estudio, ya que en el caso del trabajo de Davidson y col. (2001), el estudio fue realizado en ratas, y el nuestro

en conejos. Asimismo, puede estar asociado el nivel de madurez del sistema circadiano, ya que en el trabajo de Davidson y col. (2001) se utilizaron animales adultos, y el presente estudio se realizó en las etapas tempranas del desarrollo.

Cabe resaltar que existen diferencias importantes en lo que se refiere a la maduración de los componentes moleculares del reloj circadiano, a nivel sistema nervioso central, pues en conejos la maquinaria molecular del bulbo olfatorio madura de manera previa a la maquinaria del NSQ, ya que los genes reloj (***Per1***, ***Bmal1*** y ***Cry1***) exhiben ritmicidad circadiana consolidada en el BO desde el día 7 de edad; a diferencia del NSQ donde únicamente presentan ritmicidad de 24 horas los genes ***Per1*** y ***Bmal1*** a esta misma edad (Montúfar-Chaveznava, col., 2012). Por lo que en los animales neonatos el sistema circadiano, controlado por el NSQ y los cambios diarios de iluminación, todavía no alcanzan su madurez (Montúfar-Chaveznava, col., 2012). En su conjunto esta evidencia nos indica que el bulbo olfatorio en los gazapos puede estar funcionando como un marcapasos circadiano durante las primeras semanas de vida.

IX. CONCLUSIÓN

El presente estudio demuestra la importancia del bulbo olfatorio como marcapasos, ya que la lesión completa de este órgano, es capaz de modificar el patrón circadiano de la temperatura corporal y la actividad locomotora de los gazapos, causando un retraso en el ajuste de fase ante el cambio en el horario de la alimentación, tanto en la actividad locomotora como en la temperatura corporal y disminuir la intensidad y duración del componente anticipatorio. También se demuestra que la presencia de un solo bulbo olfatorio es capaz de mantener el patrón circadiano en la temperatura corporal y la actividad locomotora de los gazapos.

X. ANEXO A

Fórmula de leche, modificado de Schley (1976, 1980) para preparar un litro de leche

Proteínas:

- Leche en polvo baja en lactosa (100 g)
- Proteína de leche (60g)
- Levadura en polvo (10g)

Grasas:*

- Ácido caprílico (90g)
- Ácido caprínico (90g)
- Aceite de girasol (18g)

Vitaminas y minerales:

- Mezcla comercial de complejo multivitamínico y minerales equivalentes a 20 UI vitamina A/ml leche
- Complejo vitamina B (1g)
- CaHPO_4 (2g)
- CaCO_3 (2g)
- Fe^{+2} (20 mg)

Agua (750 ml)

* El porcentaje de cada elemento que corresponde a las grasas se disminuyó en un 20% tras realizarse varias pruebas con diversos porcentajes, siendo este el que permite al neonato digerir la fórmula de forma óptima.

XI. BIBLIOGRAFÍA

CALDELAS I, TEJADILLA D, HUDSON R. Mecanismos de sincronización del marcapasos circadiano a señales cíclicas ambientales. *Temas Selectos de Neurociencias III*, UAM. 2004; 213-222.

CALDELAS I, CHIMAL-MONROY J, MARTINEZ-GOMEZ M, HUDSON R. Non-photic circadian entrainment in mammals: A brief review and proposal for study during development. 2005; 36: 23-37.

CALDELAS I, GONZÁLES BELÉN, MONTÚFAR-CHAVEZNAVA R, HUDSON R. Endogenous clock gene expresión in the Suprachiasmatic Nuclei of previsual newborn rabbits is entrained by nursing. *Developmental Neurobiology*. 2008: 47-59.

CHALLET E, CALDELAS I, GRAFF C, PÉVET P. Synchronization of the molecular clockwork by light- and food-related cues in mammals. *Biol. Chem*. 2003; 384:711-719.

DAVIDSON AJ, ARAGONA BJ, WERNER RM, SCRHOEDER E, SMITH JC, STEPHAN FK. *Physiology & Behavior*. 2001; 72: 231-235.

GOEL N, LEE TM, PIEPER DR. Removal of the olfactory bulbs delays photic reentrainment of circadian activity rhythms and modifies the reproductive axis in male *Octodon degus*. *Brain Research*. 1998; 792: 229-236.

GRANADOS-FUENTES D, SALAZAR A, VERGARA P, ESCANDÓN J, VEGA A, AGUILAR R. Los ritmos circádicos en mamíferos: conceptos, implicaciones y bases biológicas. *Temas Selectos de Neurociencias*, UAM. 1995; 433-458.

GRANADOS-FUENTES D, SAXENA MT., PROLO LM, ATON SJ, HERZOG ED.

Olfactory bulb neurons express functional, entrainable circadian rhythms. *European Journal of Neuroscience*. 2004 (a); Vol. 19: 898-906.

GRANADOS-FUENTES D, PROLO LM, ABRAHAM U, HERZOG ED. The Suprachiasmatic Nucleus entrains, but does not sustain, circadian rhythmicity in the Olfactory Bulb. *Journal of Neuroscience*. 2004 (b); 24(3): 615-619.

GRANADOS-FUENTES D, TSENG A, HERZOG ED. A circadian clock in the olfactory bulb controls olfactory responsivity. *Journal of Neuroscience*. 2006; 26(47): 12219-12225.

GRANADOS-FUENTES D, HERZOG ED. The clock shop: Coupled circadian oscillators. *Experimental Neurology*. 2013; 243: 21-27.

GRUART A, DELGADO JM, ESCOBAR C, AGUILAR R. Los relojes que gobiernan la vida. *Fondo de Cultura Económica*. México. 2002; 30-69, 125-176.

HALBERG F, PETERSON RE, SILBER RH. Phase relations of 24-hour periodicities in blood corticosterone, mitoses in cortical adrenal parenchyma, and total body activity. *Endocrinology*. 1959; 64(2):222-300.

HASTINGS MH, DUFFIELD GE, SMITH EJD, MAYWOOD ES, EBLING FJP. Entrainment of the circadian system of mammals by nonphotic cues. *Chronobiology International*. 1998; 15(5): 425-445.

HERNANDEZ-CAMPOS O. Efectos de las lesiones del núcleo supraquiasmático en la expresión de los ritmos de la Temperatura corporal y actividad locomotora de conejos. *En desarrollo*. 2013. Tesis de Maestría.

HERZOG ED. Neurons and networks in daily rhythms. *Nat Rev Neurosci*. 2007; 8:790-802.

HUDSON R. Do newborn rabbits learn the odor stimuli releasing nipple-search behavior?. *Developmental Psychobiology*. 1985; 18(6):575-585.

HUDSON R, DISTEL H. Nipple location by newborn rabbits: behavioral evidence for pheromonal guidance. *Behavior*. 1983, 83: 260-275.

HUDSON R, DISTEL H. Pheromonal release of suckling in rabbits does not depend on the vomeronasal organ. *Physiology & Behavior*. 1986; 37:123-128.

HUDSON R, DISTEL H. Regional autonomy in the peripheral processing of odor signals in newborn rabbits. *Brain Research*. 1987; 421: 85-94.

JILGE B. Ontogeny of the rabbit's circadian rhythms without an external zeitgeber. *Physiology & Behavior*. 1995; vol 58: 131-140.

JILGE B, KUHNT B, LANDERER W, REST S. Circadian thermoregulation in Suckling rabbit pups *J. Biol. Rhythms*. 2000; 15(4): 329-335.

JILGE B, KUHNT B, LANDERER W, REST S. Circadian temperature rhythms in rabbit pups and in their does. *Laboratory animals*. 2001; 35: 364-373.

JILGE B, HUDSON R. Diversity and development of the circadian rhythms in the European rabbit. *Chronobiology International*. 2001; 18(1): 1-26.

MARCILHAC A, MAUREL D, ANGLADE G, IXART G, MEKAOUCHE M, HERY F, SIAUD P. Effects of bilateral olfactory bulbectomy on circadian rhythms of ACTH, corticosterone, motor activity and body temperature in male rats. *Physiology and Biochemistry*. 1997; 105: 552-559.

MEGUID MM, GLEASON JR, YANG ZJ. Olfactory bulbectomy in rats modulates feeding pattern but not total food intake. *Physiology & Behavior*. 1993; 54: 471-

475.

MIRO JL, CANGUILHEM B, SCHMITT P. Effects of tbulbectomy on hibernation, food intake and body weight in the european hamster *Cicetus cricetus*. *Physiology & Behavior*. 1980; vol 24: 859-862.

MISTLBERGER RE. Food-anticipatory circadian rhythms: concepts and methods. *European Journal of Neuroscience*. 2009; Vol. 30: 1718-1729.

MONTÚFAR-CHAVEZNAVA R, TREJO-MUÑOZ LA, CHEVEZ-MARTIN DE CAMPO EJ, JUAREZ-CRUZ A, CALDELAS I. Cronobiología: Cuando debemos, pero no podemos despertarnos. *Hypnos Investigación básica y clínica del sueño*. Universidad Anahuac Mayab. México. 2010; 193-216.

MONTÚFAR-CHAVEZNAVA R, HERNÁNDEZ-CAMPOS O, HUDSON R, CALDELAS I. Differential maturation of the molecular clockwork in the Olfactory Bulb and Suprachiasmatic Nucleus of the Rabbit. *Neuroscience*. 2012; 207: 198-207.

MONTÚFAR-CHAVEZNAVA R, TREJO-MUÑOZ L, HERNÁNDEZ-CAMPOS O, NAVARRETE E, CALDELAS I. Maternal Olfactory cues synchronize the circadian system of artificially raised newborn rabbits. *PLOS-One*. 2013; 8(9):e74048.

MOORE-EDE MC, SULZMAN FM, FULLER CA. The clocks that time us, *Physiology of the circadian timing system*. Harvard University Press. A Commonwealth Fund Book. United States of America. 1982; 55-57.

PERRET M, AUJARD F, SÉGUY M, SCHILLING A. Olfactory bulbectomy modifies photic entrainment and circadian rhythms of body temperature and locomotor activity in a nocturnal primate. *Journal of Biological Rhythms*. 2003; 18: 392-401.

PIEPER DR, LOBOCKI CA. Olfactory bulbectomy lengthens circadian period of locomotor activity in golden hamsters. *Am. J. Physiol.* 1991; 261: 973-978.

POSSIDENTE B, LUMIA AR, McGINNIS MY, TEICHER MH, deLEMONS E, STERNER L, DEROS L. Olfactory bulb control of circadian activity rhythm in mice. *Brian Research.* 1990; 513: 325-328.

POSSIDENT B, LUMIA AR, McGINNIS MY, RAPP M, McELDOWNEY S. Effects of fluoxetine and olfactory bulbectomy on mouse circadian activity rhythms. *Brain Research.* 1996; 713: 108-113.

REINBERG A, SMOLENSKY MH. Introduction to chronobiology. *Biological Rhythms and Medicine.* 1983; 1-17.

REPPERT SM, SCHWARTZ WJ. Maternal endocrine extirpations do not abolish maternal coordination of the fetal circadian clock. *Endocrinology.* 1986; 119: 1763-1767.

REPPERT SM, WEAVER DR, RIVKEES SA. Prenatal function and entrainment of a circadian clock. *Research in perinatal medicine.* 1989; vol IX, 25-42.

SCHLEY P. The artificial rearing of rabbits using medium-chain triglycerides (MCT): first results. *Berliner und Münchener tierärztliche Wochenschrift.* 1976. 89(2); 32-5.

SCHLEY P. Die mutterlose Aufzucht von Kaninchen. In *Das Blaue Kaninchen-Jahrbuch.* Deutscher Kleintierzüchter. 1980.

SUMOVÁ A, BENDO VÁ Z, SLADEK M, EL-HENNAMY R, MATEJU K, POLIDAROVÁ L, SOSNIYENKO S, ILLNEROVÁ H. Circadian molecular clocks tick along ontogenesis. *Physiological Research.* 2008; 57 (suppl. 3): S139-S148.

TANIDA M, NIIJIMA A, SHEN J, NAKAMURA T, NAGAI K. Olfactory stimulation with scent of Essentials oil of grapefruit affects autonomic neurotransmission and blood pressure. *Brain Research*. 2005; 1058: 44-55.

TANIDA M, SHEN J, NAKAMURA T, NIIJIMA A, NAGAI K. Day-night difference in the thermoregulatory responses to olfactory stimulation. *Neuroscience Letters*. 2008; 439: 192-197.

TREJO-MUÑOZ L, NAVARRETE E, MONTÚFAR-CHAVEZNAVA R, CALDELAS I. Determining the period, phase and anticipatory component of activity and temperature patterns in newborn rabbits that were maintained under a daily nursing schedule and fasting conditions. *Physiology & Behavior*. 2012; 106: 587-596.

TREJO-MUÑOZ L, NAVARRETE E, MONTÚFAR-CHAVEZNAVA R, CALDELAS I. Temporal modulation of the canonical clockwork in the suprachiasmatic nucleus and olfactory bulb by the mammary pheromone 2MB2 in pre-visual rabbits. *Neuroscience*. 2014; 275C: 170-183.

VAGELL ME, MCGINNIS MY, POSSIDENT BP, NARASIMHAN VN, LUMIA AR. Olfactory bulbectomy increases basal suprachiasmatic cyclic AMP levels in male rats. *Brain Research*. 1991; 27: 839-842.

VINKERS CH, BREUER ME, WESTPHAL KGC, KORTE SM, OOSTING RS, OLIVIER B, GROENINK L. Olfactory bulbectomy induces rapid and stable changes in basal and stress-induced locomotor activity, heart rate and body temperature responses in the home cage. *Neuroscience*. 2009; 159: 39-46.

WEAVER DR. The suprachiasmatic nucleus: a 25-year retrospective. *Journal of Biological Rhythms*. 1998; 13,2: 100-112.

WEINERT D. Ontogenetics development of the mammalian circadian system.
Chronobiology International. 2005; 22(2): 179-205.