



UNIVERSIDAD DE CHILE
Facultad de Ciencias Sociales
Escuela de Postgrado
Doctorado en Psicología

**INFLUENCIA DE LA POLIESTIMULACIÓN
SENSORIO-MOTORA TEMPRANA COMO
FACTOR COMPENSADOR DE LA MAL
NUTRICIÓN INTRAUTERINA EN LA MEMORIA
VISUO-ESPACIAL DE RATAS**

Tesis para optar al grado de Doctor en Psicología

Candidato: HÉCTOR BURGOS GALLEGOS

Profesora Guía: Dra. ROXANA PEY TUMANOFF

Santiago, Julio de 2008

INFLUENCIA DE LA POLIESTIMULACIÓN SENSORIO-MOTORA TEMPRANA

e-mail: escpost@abello.dic.uchile.cl Fonos 6787704 / 6787703 Fax 6787706 Casilla 10.115 Correo Central
Avenida Capitán Ignacio Carrera Pinto 1045 * Ñuñoa * Cod. Postal 685 033 1 * Santiago * CHILE



COMO FACTOR COMPENSADOR DE LA MAL NUTRICIÓN INTRAUTERINA EN LA MEMORIA VISUO-ESPACIAL DE RATAS

RESUMEN

La desnutrición causa efectos deletéreos visibles y encubiertos en el sistema nervioso de los organismos. Veladamente, existen alteraciones del sistema noradrenérgico a nivel del sistema nervioso central específicamente en neocorteza e hipocampo. La sustitución de proteínas por carbohidratos y lípidos otorga el carácter oculto de este tipo de desnutrición, especialmente en el período de gestación, ya que las crías provenientes de madres malnutridas, presentan parámetros morfométricos similares a individuos provenientes de madres con dieta eutrófica. Por otra parte, existe evidencia de que poliestimulación sensorio-motora provoca cambios favorables en el sistema nervioso que inciden en aspectos cognitivos conductuales. Estos cambios se producen en la estructura de las neuronas, así como en su fisiología. La memoria es la expresión de cambios plásticos cerebrales y es consecuencia de o favorecida por cambios neuroanatómicos y fisiológicos como arborización dendrítica, potenciación a largo plazo y, probablemente, densidad de receptores y transportadores para neurotransmisores. Los resultados muestran evidencia conductual y electrofisiológica atribuida a memoria visuoespacial, del efecto compensador de poliestimulación en la malnutrición oculta. Estos resultados pueden ser de impacto para acciones a nivel educacional como psicológico, debido al aporte de evidencia empírica respecto a la influencia medioambiental en el desarrollo de los procesos cognitivos.

PROPÓSITO



Aportar al conocimiento de las bases neurobiológicas y conductuales de la importancia de poliestimulación sensorio-motora como factor compensador de déficit cognitivos causados por la malnutrición intrauterina.

HIPÓTESIS

Si se aplica poliestimulación sensorio-motora temprana a ratas provenientes de madres malnutridas durante su período de gestación, entonces mejorarán los indicadores de desempeño visuoespacial a nivel conductual como electrofisiológico.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto de la Poliestimulación sensorio-motora temprana en crías de ratas nacidas de madres sometidas a un modelo de malnutrición intrauterina.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Describir el aprendizaje visuo-espacial de ratas a través del desempeño conductual en el cumplimiento de tareas en el laberinto radial octogonal de Olton.

Describir los registros electrofisiológicos de potenciación a largo plazo cortical en ratas.

Comparar los registros conductuales y electrofisiológicos de ratas sometidas a modelos de malnutrición y poliestimulación sensorio motora temprana.

ANTECEDENTES



MALNUTRICIÓN

Existe abundante evidencia de que los mecanismos cognitivos pueden ser interferidos por efecto de la malnutrición prenatal que se presenta encubierta, denominada desnutrición oculta por Resnick et al. (1982), Morgane et al, (1978); Soto-Moyano et al., (1999). Esta situación es resultado de la deficiencia de proteínas en ratas gestantes, desde cinco semanas antes del cruzamiento y durante toda la preñez, compensada por el consumo de carbohidratos y grasas, por lo cual sus crías obtienen pesos corporales y cerebrales en el nacimiento, que no son significativamente diferentes a los organismos con dieta eutrófica (Resnick et al. 1982; Soto-Moyano et al. 1998; 1999). Es oculta porque estas camadas, a pesar de no mostrar cambios morfométricos significativos, en la edad adulta presentan alteraciones de los sistemas noradrenérgicos centrales (NA), tales como una disminución significativa de la liberación inducida de NA central y un aumento de la densidad de adrenoreceptores α_{2C} en la neocorteza (Soto-Moyano et al. 1998; Soto-Moyano et al, 2005).

Por otra parte, estudios electrofisiológicos son coherentes a lo anterior ya que muestran disminución de la tasa de descarga espontánea de las neuronas corticales, disminución de la excitabilidad cortical a impulsos callosales, aumento de la fatigabilidad de las respuestas transcallosas y disminución de la capacidad de las sinapsis calloso-corticales para realizar sumación temporal y potenciación de largo plazo (Stern et al. 1984; Soto-Moyano et al. 1998; Soto-Moyano et al., 2005).

En la neocorteza de ratas con malnutrición oculta prenatal, se ha encontrado aumento en la expresión de receptores adrenérgicos α_{2C} que disminuyen la presencia de NA en la hendidura sináptica, y disminución del subtipo β_2 que se relaciona a potenciales excitatorios postsinápticos, lo que implica una disminución del efecto de NA en los procesos cognitivos (Hernández et al. 2005; Sierralta et al. 2006). Además, a nivel conductual, se registra bajo rendimiento en tareas de discriminación simple (Stern et al. 1976) así como déficits de



memoria visuo-espacial (Soto-Moyano et al. 2005), señales que indican que la malnutrición proteica durante la vida fetal provoca efectos deletéreos en mecanismos cognitivos relacionados a memoria, probablemente por el rol crítico que juega el sistema noradrenérgico en este proceso durante todo el desarrollo del individuo. Si consideramos el hecho (complementamos los hallazgos de Hernández et al., (2005) al hecho) de que la potenciación a largo plazo (PLP) mejora las conexiones entre neuronas lo que provoca la consolidación de la memoria en distintas regiones del cerebro (Malleret et al., 2001), entonces podrían realizarse acciones compensatorias que mejoren los registros electrofisiológicos en animales con malnutrición oculta, y a su vez corroborarlos con los desempeños conductuales, de tal forma que reporten un probable mejoramiento de los procesos cognitivos.

Es conocido que la función mnésica está relacionada con varias áreas cerebrales que, a su vez son activadas por el hipocampo, al menos en los mecanismos a largo plazo (Henke et al., 1997). Por otra parte, la potenciación a largo plazo, junto a la depresión a largo plazo, están vinculadas al desarrollo de mecanismos de memoria, especialmente cuando existen protocolos de estimulación orientados hacia la corteza occipital (Usakov et al., 2005; Whitlock et al., 2006; Tsanov & Manahan-Vaughan, 2007). Por su parte, en corteza prefrontal existe evidencia de que la potenciación a largo plazo induce cambios significativos a nivel neuronal, en ratas (Riout-Pedotti et al., 2000) como en humanos (Ziemann et al., 2004), luego de la aplicación de protocolos que estimulan tareas de aprendizaje. Los cambios provocados por la potenciación a largo plazo podrían estar implicados en la generación de cascadas metabotrópicas mediadas por mensajeros que pueden activar expresión de proteínas como CREB que activan locus genéticos para la síntesis de proteínas involucradas en cambios neuronales claves en transmisiones sinápticas vinculadas a memoria (Alberini, 1999; Dineley et al., 2001).

Para los efectos de esta tesis, es menester mencionar el crítico rol de la corteza frontal en su relación a la memoria de trabajo y el involucramiento de la corteza parieto-



occipital en tareas visuo-espaciales del organismo, donde existen antecedentes de potenciación sináptica de largo plazo, mecanismo que está directamente relacionado con la consolidación de la memoria (Arnsten, 1998; Mc Gaugh, 2000; Vickery et al, 1997; Volgushev et al., 1999; Rioult-Pedotti et al, 1998; Rioult-Pedotti et al., 2000). Por lo cual se justificaría la aplicación o una influencia medioambiental compensadora, como poliestimulación sensorio motora temprana, que pudiera favorecer cambios positivos en cortezas dañadas por efecto de una malnutrición.

POLIESTIMULACIÓN

Algunos estudios muestran que el enriquecimiento ambiental aporta al proceso de recuperación de los déficits conductuales asociados a la mala nutrición de ratas infantiles y jóvenes, expresados en cambios neuroanatómicos, refiriendo un mejoramiento de la ramificación de las dendritas y el grosor de la corteza occipital (Carughi et al, 1989). El enriquecimiento medioambiental afecta positivamente la estructura neuronal aumentando el grosor de la corteza cerebral, la cantidad de dendritas y sus ramificaciones (Diamon et al., 1976; Davies y Katz, 1983; Green, Greenough y Schlumpf, 1983; Fernández et al., 1997). Igualmente, la estimulación sensorio motora que recibe la rata, después de su nacimiento hasta el destete, ha mostrado tener resultados favorables en la citodiferenciación neuronal en ratas (Pascual y Figueroa, 1996).

Si bien, este efecto ha sido más observado en ratas estimuladas tempranamente, no así en ratas adultas, autores reportan que, poliestimulación sensorio-motora ayuda al mejoramiento de la calidad de la exploración, tanto en ratas viejas como en jóvenes (Van Waas & Soffie, 1996). Otra versión complementaria acerca del tema, refiere que la estimulación táctil en ratas mayores a 21 días de edad, durante 60 días, mejora las funciones cognitivas en sujetos adultos medidas en el laberinto de agua de Morris o “Water Maze” (Pham, et al., 1999).



Parece evidente entonces que la poliestimulación sensorio-motora provoca cambios favorables en el sistema nervioso, ya que la exposición a condiciones medioambientales enriquecidas mejora el aprendizaje espacial y la habilidad para resolver problemas (Torasdotter et al, 1998), incluso después de haber experimentado algún evento cerebral traumático (Hamm et al., 1996). También existe evidencia que en situaciones de injuria cerebral previene la apoptosis producida por el ácido kaínico en neuronas del hipocampo (Young et al., 1999).

Por lo cual, a través de la poliestimulación sensorio-motora deben activarse fenómenos plásticos en el cerebro que aumentaría la tolerancia a agresiones cerebrales actuando como neuroprotector. Consecuentemente, no es extraño que haya evidencia de que poliestimulación sensorio-motora o enriquecimiento medioambiental afecte positivamente los niveles del factor de crecimiento nervioso (NGF) hipocampal, junto con reducir el déficit neuroquímico y las capacidades para resolver problemas en general de roedores, lo que está estrechamente relacionado al desarrollo neuronal y el mejoramiento cognitivo posterior de la rata adulta (Terasdotter et al., 1998; Pham et al., 1999).

No parece haber duda entonces que poliestimulación sensorio-motora contribuye a una mayor plasticidad cerebral. Estudios de Pascual, (1996), Fernández et al., (1998), Fernández, et al., (2003), ratifican el efecto de ésta en los períodos críticos del desarrollo de la rata, sobretodo en regiones de la corteza asociada a procesos cognitivos complejos y de supervivencia (Fernández et al., 2003). Contrariamente, la carencia de estimulación, también llamada privación, puede afectar negativamente el desarrollo sensoriomotor de roedores (Chamove, 1998).

Por otra parte, es necesario un correlato conductual de estos hallazgos neurobiológicos para esclarecer si los efectos en el sistema nervioso, realmente tienen impacto en la vida animal. Al respecto, la medición de la memoria ha sido ampliamente



estudiada a través de test visuoespaciales en los que destacan el laberinto radial octogonal de Olton (Olton & Samuelson, 1976; Hodges, 1996; Saavedra et al, 1999; Bustos et al., 2003; Dudchenko, 2004; Burgos et al., 2005).

MEDICIONES CONDUCTUALES

Los laberintos como herramientas de estudio de la conducta y sus procesos cognitivos relacionados presentan, desde principios del siglo XX, una amplia utilización ya que aprovecha el comportamiento natural de roedores (Small, 1901). Una ampliación del estudio en laberintos, incluye interpretaciones relacionadas a mapas cognitivos que están a la base de la conducta exploratoria de animales de experimentación, especialmente en las actividades de orientación visuo-espacial (Olton, 1979). Estos denominados “mapas cognitivos” se refieren a una relación neurológica entre el estímulo y las consecuencias, además del nivel de expectancia respecto del refuerzo que espera el organismo, mencionado por Tolman (1946) quien, a pesar de considerarse a sí mismo como un psicólogo en la tradición conductista, fue en realidad uno de los primeros en plantearse con una visión cognitiva de los procesos de aprendizaje (cambio de paradigma de E-R a E-O-R). Este tipo de explicación se enmarca en el paradigma del condicionamiento instrumental que involucra mecanismos conductuales de aprendizaje basados en la ley de las consecuencias que presenta una conducta en relación a la interacción con el medio ambiente (Skinner, 1950). Este tipo de mecanismo de aprendizaje ya había sido descrito por Thorndike, donde formula la “Ley del Efecto” como determinante en la obtención de este tipo de respuestas (Thorndike, 1911). Este enfoque, en que los estímulos externos inciden en el fortalecimiento o debilitamiento de la conducta del organismo, fueron denominados por el mismo Skinner como condicionamiento operante, completando el paradigma instrumental del aprendizaje (Skinner, 1950; 1953). Este enfoque está vigente en la actualidad, más aún con la incorporación de correlatos neurobiológicos que Gallistel et al., (2001) analiza



matemáticamente y Kesner y Olton (1990) incorporan los análisis neurobiológicos propiamente tales en extensas obras.

En esta visión del aprendizaje, Olton y Samuelson (1976) validaron el uso del laberinto radial octogonal para el estudio de la memoria en ratas a través de la orientación espacial de éstas, por señales intra y extra laberinto con las cuales se orienta y moviliza la rata. Los resultados obtenidos indican que las claves alocétricas son determinantes en la formación de estrategias de desempeño espacial (Olton, 1979). Estas estrategias estarían vinculadas a los mapas cognitivos que relacionarían los estímulos del medio y las consecuencias, además del nivel de expectancia que vislumbra el organismo en su conducta, como mencionara Tolman (1948). Posteriormente, sería reportado como un patrón natural de orientación, no sólo en mamíferos, sino que en otros vertebrados e invertebrados (Kesner y Olton, 1990; Gallistel et al., 2001).

El Laberinto Radial Octogonal de Olton aprovecha el comportamiento exploratorio natural de la rata (Olton, 1979; Bustos, 2003; Hamm, et al., 1996; Pham, et al, 1999; Saavedra et al., 1999), reportando mejor información que otros instrumentos (Hodges, 1996), como el laberinto de Agua (Morris et al., 1979), ya que remeda condiciones naturales del roedor, cuales son sus conductas exploratorias propias en madrigueras (Small, 1901).

Paralelamente, en humanos se ha construido un sistema similar al laberinto radial octogonal de Olton para medir desempeño visuoespacial, utilizando técnicas de realidad virtual, donde hay evidencia de la participación del hipocampo derecho en esta función cognitiva, con descripción de mecanismos neurobiológicos en su base (Parslow et al., 2005). Una descripción de los circuitos involucrados con amplio detalle, había sido formulado por Kesner y Olton (1990), donde estructuras como el subículo, las cortezas parahipocampal, perirhinal, entorhinal, junto a zonas de la corteza, actúan estrechamente relacionadas en la función mnemónica, también ratificado por otros estudios (Dusek y Eichembaum, 1997; Hebert y Dash, 2002).



Los entrenamientos, utilizando brazos obstruidos del laberinto, con aplicación posterior completa del protocolo de Olton, mide memoria de referencia y memoria de trabajo (Bustos et al., 2003; Tanabe et al., 2004). También se ha medido este tipo de memoria, claramente definida como espacial, en otros laberintos como el de Morris ya que la rata debe orientarse con la observación de claves visuales externas (Fenton et al., 2004). Otros autores refieren estudios en ratas con hiperexcitación dopaminérgica, adecuado para el estudio de déficit atencional, un claro deterioro en la memoria de trabajo medida conductualmente en varios laberintos, además del Laberinto de Olton; la disminución de la expresión molecular de la dopamina mesocorticolímbica frontal correlaciona con los niveles de errores en el cumplimiento de la tarea del roedor en el instrumento (Viggiano et al., 2002), por lo cual existen correlatos conductuales relacionados a traumas en el sistema nervioso.

Paganelli et al. (2003) refiere estudios en animales isquémicos donde las estrategias que desarrollan las ratas son más extra que intralaberínticas con mecanismos que incluyen estrategias de largo plazo. Este hallazgo continúa la línea de Olton (1979) donde las claves aloécnicas son orientadoras del desempeño visuo-espacial de la rata. Más tarde, Saavedra et al. (1999) ratifican el uso de este laberinto como pertinente en este tipo de estudios, además de incluir el papel de las estrategias más eficientes de la rata en el cumplimiento de la tarea, como consecuencia del rol de la motivación que cumple la privación en el mejoramiento del desempeño de los animales de experimentación (Véase también en Bustos et al., 2003). Esta evidencia ratifica que la utilización del laberinto radial octogonal de Olton es adecuado para medir memoria espacial o de referencia.

Por tanto, la presente tesis pretende aportar evidencia conductual y electrofisiológica del posible efecto compensatorio de la poliestimulación sensoriomotora en los déficits cognitivos provocados por la malnutrición oculta en ratas, contribuyendo con un aporte empírico respecto del papel del enriquecimiento medioambiental en los procesos cognitivos



que están a la base del desarrollo de los organismos. A su vez, el conocimiento adquirido podrá ser complementado, a futuro, con otros estudios neurofisiológicos, neurohistoquímicos, entre otros, que contribuyan al esclarecimiento del papel del enriquecimiento ambiental en los procesos cognitivo-conductuales. En síntesis, se pretende comprobar la hipótesis de que Poliestimulación sensorio-motora ejerce un rol compensador en el desempeño visuoespacial de la rata malnutrida medido conductualmente en el laberinto radial octogonal de Olton y a través de registros electrofisiológicos corticales.

Estos resultados pueden ser de interés por el aporte a la neurobiología de los procesos cognitivos, además de proveer evidencia experimental de la influencia medioambiental a nivel neuronal y conductual que explican procesos psicológicos, relevantes en el ámbito de acción del psicólogo como otros profesionales de las Ciencias Sociales.

METODODOLOGÍA

Esta tesis es un tipo de estudio explicativo con diseño experimental en el área de la neurociencia de la conducta, donde se pretende establecer la influencia de dos variables independientes (Poliestimulación y Malnutrición) en la memoria visuoespacial (variable dependiente).



Sujetos Experimentales

Todas las ratas (32 animales para las mediciones conductuales y 64 animales para la evaluación electrofisiológica, 32 para corteza occipital y 32 para corteza frontal) son de la cepa Sprague-Dawley, adquiridas en el Bioterio de la Universidad Católica de Chile. Se dividen en 4 grupos de 8 miembros cada uno: dos grupos Eutróficos con y sin poliestimulación y dos grupos Malnutridos con y sin poliestimulación.

Nutrición y Malnutrición:

- a) Los Grupos Eutróficos (EU), corresponden a ratas nacidas de madres adecuadamente alimentadas desde antes del cruzamiento y durante la preñez con una dieta que contiene 25% de caseína y que provee 4.3 Kcal/g (Soto-Moyano, et al., 2005).
- b) El Grupo con Malnutrición prenatal proteica (MPP) corresponde a ratas nacidas de madres alimentadas desde 5 semanas antes del cruzamiento y durante la preñez con una dieta hipoproteica (8% caseína) compensada en calorías mediante la adición de carbohidratos para proveer 4.3 Kcal/g (Soto-Moyano et al., 1998).
- c) A partir del nacimiento todas las crías serán amamantadas por nodrizas eutróficas que dieron a luz ese mismo día. Todas las camadas serán ajustadas desde el nacimiento a 8 crías por nodriza. Todos los grupos serán criados en jaulas estándar del bioterio, excepto durante las sesiones de estimulación ambiental, en condiciones de luz y temperatura controladas (período de luz/oscuridad de 12/12 h, con ciclo invertido: las luces se encenderán a las 19:00 h y se apagarán a las 7:00 h; la temperatura se mantendrá a 21 ± 1.2 °C).
- d) El cuidado de los sujetos experimentales se rige según los acuerdos de la Guía del Instituto Nacional de Salud para el Cuidado y Utilización de Animales de Laboratorio del Consejo Nacional de Investigación, (NIH Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, National Research Council, 1985) aprobado por el Comité para el uso ético de animales de experimentación, INTA, Universidad del Chile.



Procedimiento de Poliestimulación o Enriquecimiento Ambiental

- **Cámara de Poli-Estimulación:** Corresponde a una jaula de 40 x 340 x 70 cm. cerrada con rejilla de 1cm cuadrado. En su interior se ubican juguetes de colores, lanas, móviles, pelotas y cubos plásticos, ramplas, ruedas, esencias con olores, juego de luces de colores. Esta caja presenta una puerta en uno de sus lados para introducir a las ratas que serán poliestimuladas (Fernández, et al., 2003). La muestra destinada a ser poliestimulada se someterá al modelo de poliestimulación que se describe a continuación, a través de una serie de sesiones experimentales, con una duración de 40 a 50 minutos cada una, durante 22 días, desde el día 2 hasta el 25, desde su nacimiento, 3 veces por día (9:00 – 10:00 hrs, 13 – 14:00 hrs y 17:00 – 18:00 hrs):
 - 1) Las sesiones cuentan con la aplicación de música ambiental clásica con autores barrocos, Mozart, Albinoni, Maleret, Haydn, Vivaldi.
 - 2) Se encienden luces intermitentes en el interior de la caja de poliestimulación (Véase Cámara en Anexo 1).
 - 3) Se acaricia con un pincel N° 10 (de pelo de camello) a cada rata, durante períodos de dos minutos en los 40 minutos de sesión, con dirección céfalo caudal, hasta que aparezca su pelaje. Después se acarician con las manos (handling).
 - 4) Se introducen en la cámara de estimulación (con la temperatura de 25° Celsius constante), por un tiempo de 30 minutos, permitiéndoles libertad en sus movimientos, con excepción del tiempo de estimulación con pincel o handling.
 - 5) Posteriormente, se les somete a un baño de agua a 37° Celsius, durante 15 segundos. Luego, son secados con toalla y secador.
 - 6) La madre será integrada al grupo con sus crías después de una hora de terminada la estimulación.

Experimentación en Laberinto radial Octogonal de Olton (Véase en Anexo 2).



Preparación previa a la experimentación conductual en el Laberinto Radial Octogonal de Olton

- Las ratas han sido sometidas a la inversión del ciclo circadiano por lo cual, fueron medidas entre las 9:00 y 13:00 hrs, durante toda su etapa experimental.
- El laboratorio de experimentación mantiene una temperatura permanente a 25° Celsius.
- Durante las 18 sesiones (un día = una sesión) no se altera el espacio visual, con lo que permanecen inalteradas las claves visuales identificables por las ratas y en el mismo sitio, durante todo el tiempo de la experimentación.
- Antes de comenzar cada medición, se impregna el laberinto de Olton con colonia para evitar que claves olfatorias ajenas al experimento interfiriesen en su tarea (Olton y Samuelson, 1976).
- Se ubica un refuerzo alimenticio al final de cada brazo (pellets, 0,2 grs.).

Registro de Mediciones conductuales en Laberinto de Olton

- La rata será depositada en el centro del laberinto o plataforma central, lugar de donde nacen sus ocho brazos, siempre con orientación hacia el brazo N° 1 (Véase esquema en anexo 2).
- Se mantiene a la rata hasta cumplir los 10 minutos en el laberinto o al cumplimiento de toda la tarea, cual es, llegar al final de cada brazo y consumir el refuerzo alimentario depositado en ese lugar (Saavedra et al, 1999; Bustos et al., 2003).
- El tiempo es cronometrado cuando la rata posa sus cuatro extremidades en el laberinto, hasta terminar el recorrido con éxito, esto es, habiendo consumido todo el refuerzo.
- Se constató el registro de sus desplazamientos, de la preferencia de los brazos que visitaba, del número de veces que visitó cada uno y del tiempo de permanencia en ellos, del éxito (comer el refuerzo, del fracaso (no comer el refuerzo), de la conducta que realizó (acicalamiento, micción, defecación, inmovilidad).
- Se mantuvo una grabación con video cinta en cada uno de los registros.
- Al terminar la medición, se vuelve a impregnar el laberinto con colonia.



Determinación de la Potenciación de Largo Plazo (LTP).

- Los animales para los estudios electrofisiológicos serán anestesiados con uretano i.p. (1.2 g/kg), traqueostomizadas, mantenidas bajo respiración artificial y ubicadas en un aparato estereotáxico.
- La temperatura corporal se mantendrá constante mediante dispositivo térmico, donde se posará la rata en el equipo estereotáxico y se monitoreará con un termómetro rectal.
- Las cortezas frontal y visual se aproximarán mediante craneostomías homólogas bilaterales en grupos diferentes de animales. En ambos casos se mantendrá indemne la duramadre, excepto por la penetración de los electrodos hacia las regiones profundas.
- Para la estimulación callosal de la neocorteza a nivel de corteza prefrontal y corteza visual primaria contralaterales, se utilizarán electrodos bipolares de acero inoxidable.
- Para la obtención de respuestas basales, la estimulación consistirá en pulsos simples de onda rectangular.
- La estimulación callosal (cuerpo calloso (CC)) se realizará con electrodos bipolares de tungsteno, con un diámetro de 50 μm . cada uno y con una separación de 0,5 mm. entre puntas, penetradas en relación al hemisferio derecho del cerebro.
- Las coordenadas estereotáxicas de Groot fueron determinadas tomando en consideración el atlas of Pellegrino and Cushman (1967) (en referencia a los conductos auditivos). Para CC a nivel de corteza frontal: A = 6.8 mm, L = 2.0 mm y V = 2,2 mm; Para CC a nivel de corteza visual: A = 0.0 mm, L = 3.5 mm y V = 2,5 mm.
- El registro en la superficie cortical, tanto en corteza occipital (CO) como en corteza frontal (CF) se realizará con un electrodo monopolar de bola de plata de 0,5 mm., ubicado equidistantemente respecto a la ubicación de los electrodos de estimulación. El electrodo de referencia será ubicado en el hueso frontal.
- Para la inducción de la potenciación a largo plazo de las sinapsis calloso-corticales se utilizará estimulación tetanizante (tren de 312 Hz), con duración de 0,1 ms, de acuerdo a los protocolos de estimulación tetánica propuestos por Abraham et al. (1993), Racine et al.



(1994), Soto-Moyano et al., (2005) y Mondaca et al., (2004). Los potenciales evocados de campo transcallosales serán monitoreados en un osciloscopio digital y almacenados para su posterior análisis en un computador provisto de una tarjeta conversora análogo-digital y software ad-hoc.

- La correcta ubicación de los electrodos, se verificará en una muestra significativa de animales mediante lesión electrolítica, pasando una corriente de 1 mA durante 20 seg. Posteriormente, la lesión se observará en cortes histológicos mediante un microscopio óptico.

Recolección de datos

Los datos se recolectarán mediante la observación directa y de la anotación de las conductas de los sujetos experimentales, registrando la información en una plantilla o pauta de registro (Véase Anexo 3), además del registro con cámara digital.

Análisis de datos

Se analizarán descriptivamente la conducta de las ratas, vale decir, desplazamientos, visitas a los brazos, número de visitas, tiempo de recorrido parcial y total, y comportamiento en general.

Posteriormente, se utilizará un procedimiento estadístico para analizar los datos cuantitativos observados a partir del desempeño de los sujetos experimentales en el laberinto y los registros electrofisiológicos, aplicando:

ANOVA de dos vías, puesto que fueron sometidas a dos procedimientos: poliestimulación y malnutrición. Posteriormente se aplica un test de comparaciones múltiples de Bonferroni, para precisar el grupo más diferente entre ellos (Véase Anexo 4).

El cronograma de ejecución de esta tesis se presenta en el Anexo 5.



RESULTADOS

Los resultados muestran que poliestimulación sensorio motora temprana causa un impacto favorable en ratas malnutridas. El grupo malnutrido expuesto al procedimiento de poliestimulación muestra un número de errores muy cercanos al grupo control ($p > 0,05$). Entre las sesiones experimentales, el grupo menos estable fue el poliestimulado eutrófico, quienes disminuyeron el número de errores de una forma más paulatina (Véase Fig.1).

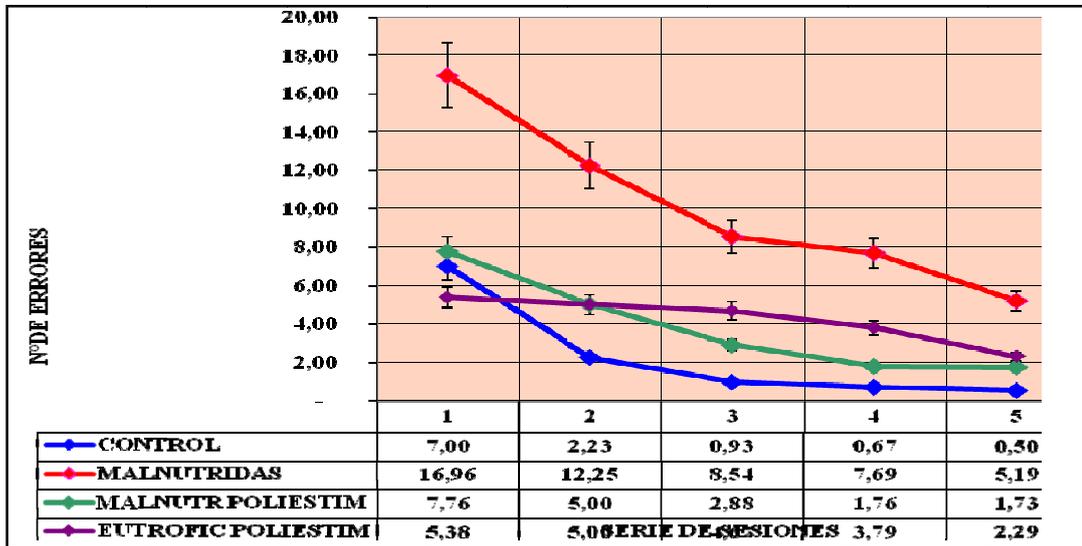


Fig.1: Gráfico que muestra el número de errores por serie de sesiones. Cada número representa 3 sesiones. Las curvas muestran el desempeño comparativo de los dos grupos malnutridos y dos eutróficos. Nótese la diferencia con los grupos poliestimulados respecto del grupo malnutrido.

Las curvas de las ratas poliestimuladas muestran similitud en sus valores, aunque no igualan al control, especialmente en el número total de errores. (Véase Fig. 2). No obstante, todos los grupos muestran una disminución del número de errores entre las primeras y las últimas sesiones con diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,0001$) (Véase Fig. 1 y Anexo 4 de Estadística).

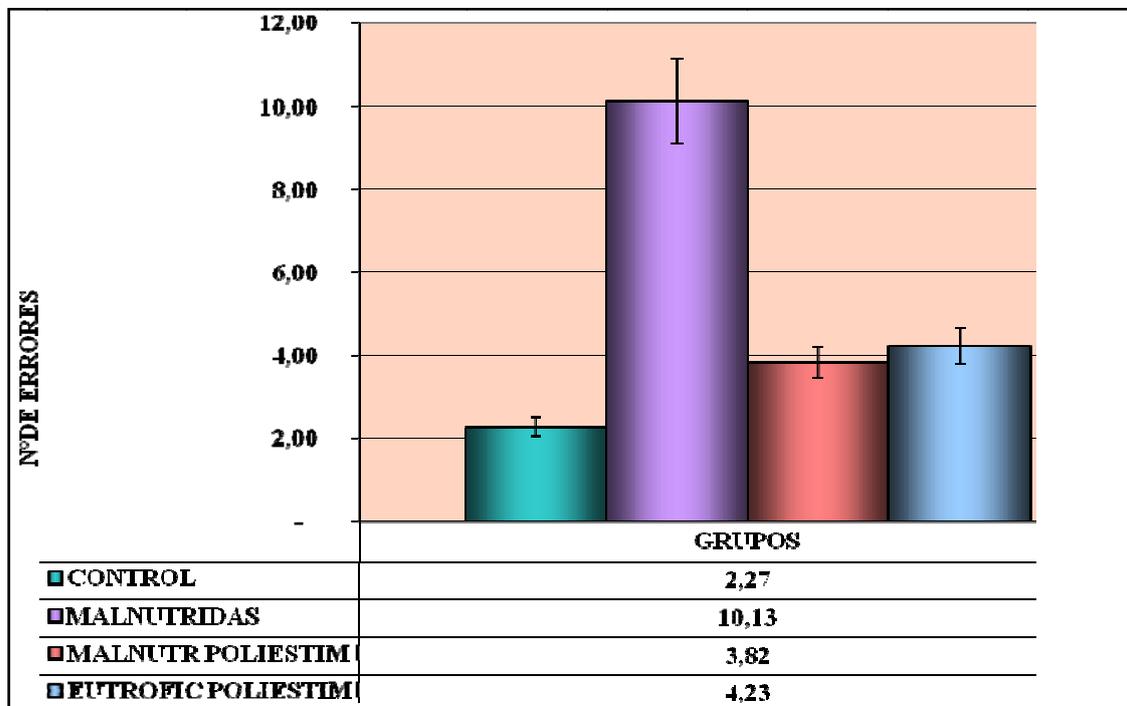


Fig.2: Gráfico que muestra el número total de errores promedio de cada uno de los grupos experimentales y el grupo control. Nótese la similitud de los grupos estimulados pero diferentes del grupo malnutrido y el control.

En todo caso, es notoria la diferencia entre las ratas malnutridas y los grupos que fueron sometidos a poliestimulación sensorio-motora temprana ($p < 0,0001$) (Véase fig.2 y Anexo 4 de Estadística).

En cuanto al tiempo de recorrido de los grupos experimentales, los resultados se muestran similares. Por una parte, todos los grupos experimentales y el grupo control presentan una disminución del tiempo para completar la tarea de consumir un refuerzo en cada brazo ($p < 0,0001$) (Véase fig.3 y Anexo 4 de Estadística). Igualmente, el grupo eutrófico poliestimulado se muestra con un tiempo de recorrido que sólo disminuye en las sesiones finales, presentando aumento en las sesiones iniciales. En cambio, el grupo malnutrido, en toda la serie, presenta una disminución del tiempo en completar la tarea.

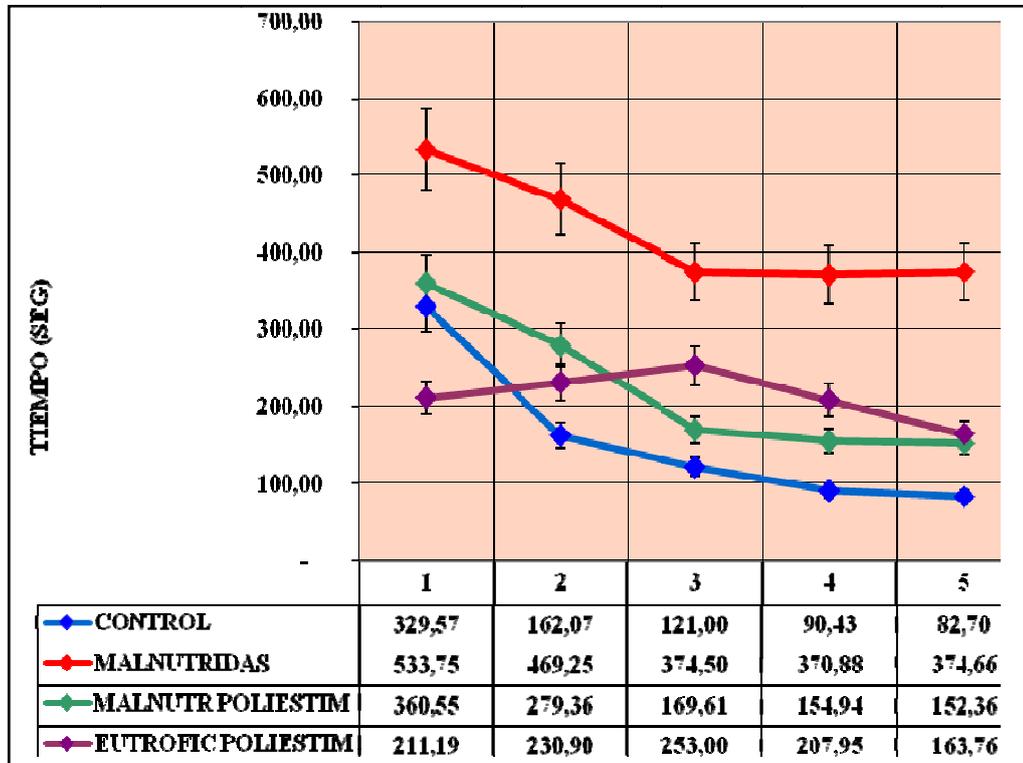


Fig.3: Gráfico que muestra el tiempo de recorrido por serie de sesiones de cada uno de los grupos experimentales y el grupo control. Cada número representa 3 sesiones. Nótese la tendencia similar del grupo malnutrido a la del grupo control, aunque no lo equipara.

Por otra parte, el tiempo de recorrido total promedio, presenta una gran similitud entre los grupos poliestimulados y una disminución clara del tiempo, por parte del grupo malnutrido, con respecto al grupo control (Véase Fig.4). Por lo cual, los malnutridos poliestimulados, al igual que el control, presentan una cierta tendencia a disminuir el tiempo para completar la tarea en el laberinto, situación que ocurre con algunas diferencias en el grupo eutrófico poliestimulado (Véase Fig.3). Este grupo aumenta el tiempo en una primera instancia ($p < 0,05$), para disminuir en las sesiones finales (0,0001), con distintos grados de significación estadística entre el principio y el final de las sesiones (Véase Anexo 4 Estadística).

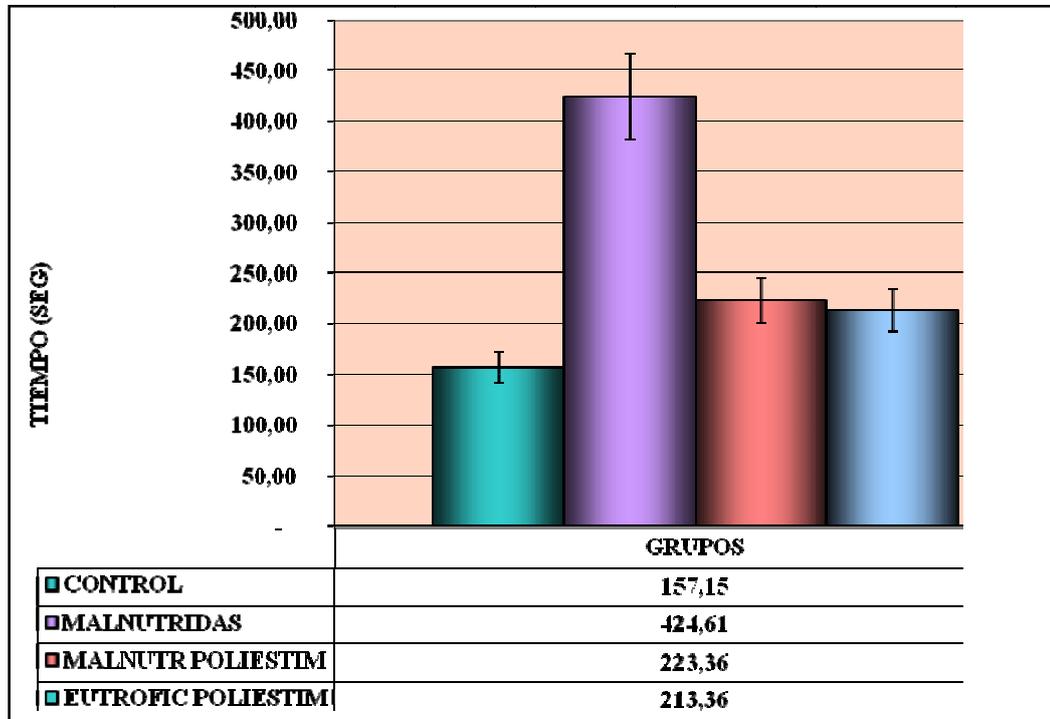


Fig.4: Gráfico que muestra el tiempo de recorrido total promedio de cada uno de los grupos experimentales y el grupo control. Nótese la clara diferencia entre el grupo malnutrido y los grupos poliestimulados, aunque no equiparan el grupo control.

Se aprecia, en síntesis, que existe una disminución de los errores y tiempo de recorrido en aquellos malnutridos con poliestimulación (Véanse Figs 1, 2, 3 y 4). El grupo eutrófico poliestimulado, no obstante, mantiene un desempeño muy similar al grupo malnutrido poliestimulado que, en todo caso, ninguno de ellos alcanza los resultados del grupo control, en estos parámetros de medición.

En el desempeño de cada uno de los grupos de ratas, se puede agregar que todos los grupos presentaron conductas ansiosas en los comienzos de las mediciones. No obstante, disminuyeron entre la tercera y cuarta sesión, especialmente en los grupos no poliestimulados, situaciones que se constataron en forma cualitativa.



Los resultados conductuales pueden contrastarse con los resultados electrofisiológicos que también muestran una tendencia similar. Se puede apreciar que, a nivel de la corteza occipital, el grupo malnutrido poliestimulado presenta una potenciación mayor que el grupo malnutrido mantenido en el transcurso de sesenta minutos ($p < 0,0001$) (Véase Fig.5 y Anexo 4 de Estadística).

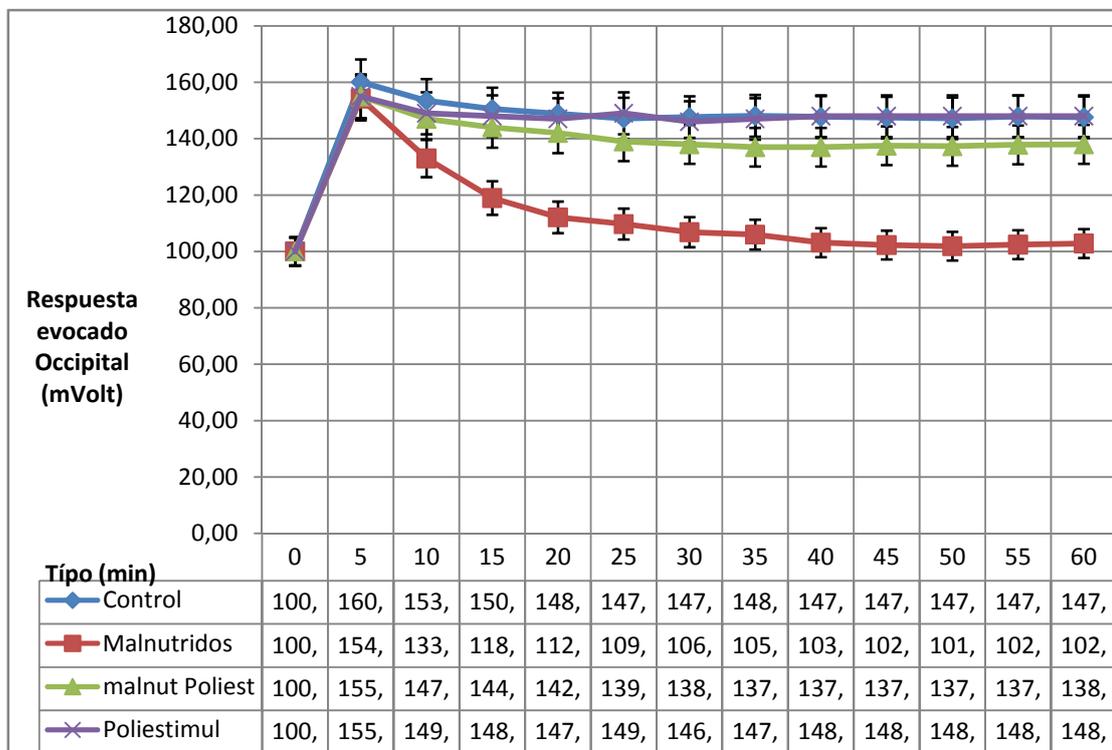


Fig.5: Gráfico que muestra la potenciación de largo plazo en la corteza occipital, mantenida durante 60 minutos. Los resultados corresponden a cada uno de los grupos experimentales y el grupo control. Nótese la clara diferencia entre el grupo malnutrido y los grupos poliestimulados.

Llama la atención la similaridad entre el grupo control y los poliestimulados eutróficos, con resultados casi idénticos (Véase Fig. 5). Por otra parte, el grupo de ratas malnutridas poliestimuladas muestran una cercanía con el grupo control que no presenta significación estadística ($P > 0,05$), pero clara diferencia frente al grupo malnutrido como se menciona más arriba (Véase Anexo 4 de Estadística).

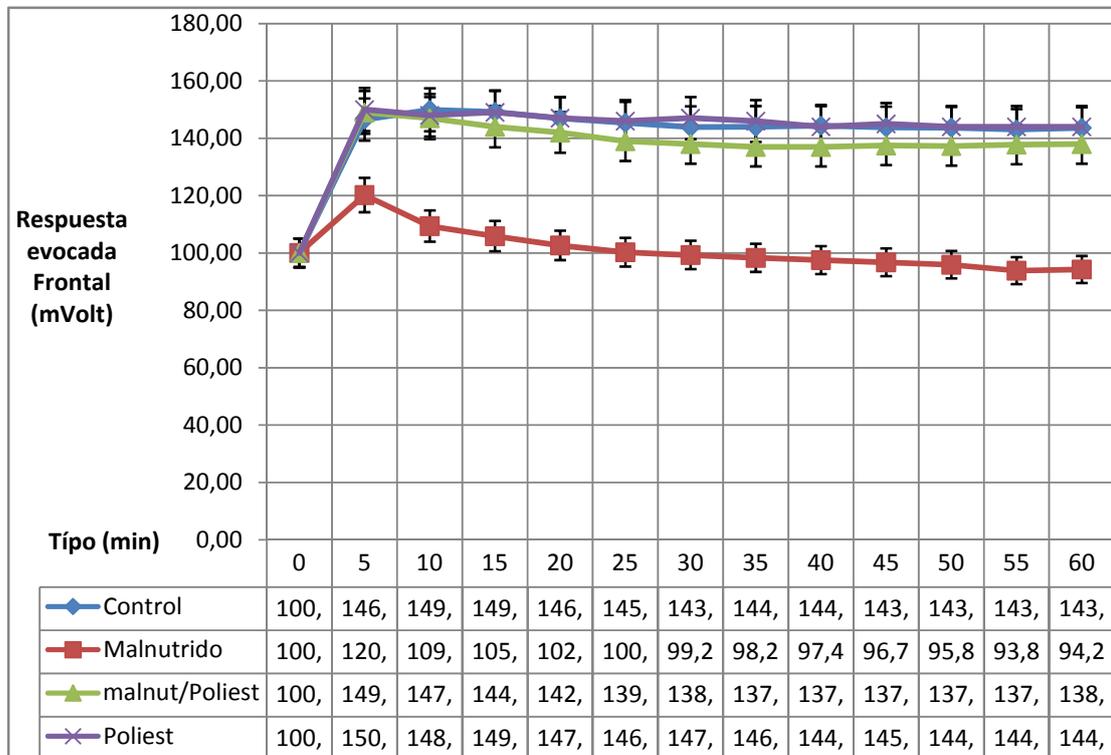


Fig.6: Gráfico que muestra la potenciación de largo plazo en la corteza frontal, mantenida durante 60 minutos. Los resultados corresponden a cada uno de los grupos experimentales y el grupo control. Nótese la clara diferencia entre el grupo malnutrido y los grupos poliestimulados.

A nivel de la corteza frontal, los registros electrofisiológicos de potenciación a largo plazo no difieren fundamentalmente de los obtenidos en la corteza occipital. Claramente, los grupos poliestimulados muestran un registro de mayor voltaje respecto del grupo de ratas malnutridas ($p < 0,0001$) (Véase Fig. 6 y Anexo 4 de Estadística). Llama la atención también, que los registros de ratas estimuladas respecto del grupo control son casi idénticos ($p > 0,05$) (Véase Anexo 4 de Estadística).



Análisis y Discusión

Al comparar los grupos de ratas malnutridas con las eutróficas, se aprecia que las ratas malnutridas poliestimuladas cometen menos errores y utilizan menos tiempo en recorrer el laberinto respecto del grupo malnutrido, probablemente debido al posible efecto del enriquecimiento medioambiental temprano aplicado. Estos resultados reflejan que, por efecto de la poliestimulación, estas ratas pueden desarrollar cambios neurobiológicos importantes en el sistema nervioso central, relacionados a memoria y aprendizaje, noción que es apoyada por los datos de potenciación a largo plazo obtenidos a nivel occipital y frontal, zonas claramente vinculadas al tipo de memoria visuoespacial y su consolidación (Arnsten, 1998; Mc Gaugh, 2000; Vickery et al, 1997; Volgushev et al., 1999; Rioult-Peddotti et al, 1998; Rioult-Peddotti et al., 2000). Este impacto epigenético pudo actuar en los receptores Beta adrenérgicos (β) favoreciendo los procesos relacionados a la memoria, en concordancia con lo señalado por Arnsten, (1998); Nowicky et al, (1992) y Kamatsu, (1996). Así mismo, otros estudios refieren la existencia de bases suficientes para precisar que, la estimulación de adrenoceptores β_2 y β_3 aumentan el aprendizaje y la memoria, evidenciada por la amplia distribución que presentan los receptores β_2 , en la corteza cerebral e hipocampo como señalan Gibbs y Summers, (2000).

También se sabe que la activación de los receptores β_2 activan la conducta exploratoria en una primera instancia, lo que explicaría el menor tiempo de recorrido de las ratas en la consecución de la tarea, en especial las ratas malnutridas poliestimuladas. Lo anterior, está de acuerdo con los hallazgos de Arnsten, (1998), Nowicky et al, (1992) y Kamatsu, (1996) que refieren que los sistemas noradrenérgicos pueden influenciar críticamente la memoria y el aprendizaje sobre la base de que, los niveles de NA central, modulan poderosamente el funcionamiento de la corteza frontal y la potenciación de largo plazo cortical. En este sentido, podrían explicarse los resultados electrofisiológicos que muestran una clara expresión en aquellas ratas malnutridas poliestimuladas tempranamente.



Al respecto, cabe preguntarse si la poliestimulación es capaz de influenciar positivamente a los sistemas noradrenérgicos centrales, y a través de éstos, el aprendizaje visuoespacial, la LTP neocortical, y otros procesos neuroplásticos. Evidencias recientes señalan que el enriquecimiento ambiental genera aumento de la concentración de noradrenalina en la neocorteza, cerebelo y troncoencéfalo del ratón (Naka et al. 2002) e incrementa duraderamente (por más de 17 meses) la acumulación de AMP cíclico inducida por estimulación de adrenoreceptores β (Escorihuela et al. 1995). A su vez, el antagonista β adrenérgico inespecífico propanolol fue capaz de inhibir el efecto beneficioso que induce la estimulación ambiental neonatal en el rendimiento en el test de “desesperanza aprendida” (Tejedor-Real et al. 1998), lo que sugiere que el efecto beneficioso de la estimulación ambiental fue mediado por noradrenalina endógena vía receptores β . Más recientemente se ha demostrado que tanto la activación β adrenérgica como la síntesis proteica son requerimientos esenciales para que la exploración de un ambiente novedoso se traduzca en incremento de PLP hipocampal (Straube et al. 2003). Por otra parte, se ha demostrado que el enriquecimiento ambiental aumenta la PLP hipocampal, efecto que es suprimido mediante un inhibidor de la Proteína quinasa A (PKA), lo que implica a esta kinasa específicamente en plasticidad experiencia-dependiente en el hipocampo (Duffy et al. 2001). Como el sistema de transducción de señales de los adrenoreceptores β_1 y β_2 está positivamente acoplado a PKA, y a su vez PKA ejerce efectos genómicos activando CREB y produciendo factores neurotróficos de desarrollo cerebral (BDNF), los datos revisados concuerdan en que la activación β , y río abajo de AMPc, PKA, CREB y BDNF, están implicados en los efectos funcionales del enriquecimiento ambiental, incluyendo remodelación de circuitos neuronales implicados en neuroplasticidad (PLP) y con un mejor rendimiento en tareas de aprendizaje. A la fecha no existe información respecto a si el enriquecimiento ambiental modifica la actividad de adrenoreceptores α (particularmente los subtipos de receptores α_2). Obtener esta información sería de gran relevancia ya tanto el subtipo α_{2A} como el α_{2C} están acoplados negativamente a la enzima adenilato ciclasa (Zhang et al. 1999), relacionada con la síntesis de segundos



mensajeros como el AMPc y, por lo tanto, su activación ejerce efectos contrarios a la activación β , con su consecuente deterioro en los procesos cognitivos mencionados.

Interesantemente, los adrenoreceptores α_{2C} están “up-regulados” en animales sometidos a malnutrición prenatal, mientras que los adrenoreceptores β_2 están “down-regulados” (Soto-Moyano et al. 2005; Hernández et al. 2005; Sierralta et al. 2006), y en consecuencia surge la interrogante si el ambiente enriquecido sería capaz de mejorar en los animales malnutridos el rendimiento en tareas de aprendizaje a través de la activación de adrenoreceptores β_2 y/o de la inhibición de adrenoreceptores α_{2C} o modificando la expresión de esos adrenoreceptores.

Como se ha señalado, se sabe que la activación e incremento de los adrenoreceptores α_{2C} en el cerebro por efecto de la malnutrición, trae como consecuencia un deterioro en la memoria (Soto-Moyano et al., 2005). Los adrenoreceptores α_2 son en su mayor parte presinápticos y, en general, ejercen un feed-back negativo sobre la liberación de noradrenalina, disminuyendo la disponibilidad del neurotransmisor en el espacio sináptico, con la consecuente disminución de la activación del sistema. En consecuencia, el aumento de los receptores α_{2C} sumado a la disminución de los receptores postsinápticos β_2 a nivel hipocampal y cortical, podrían explicar los efectos deletéreos en la memoria que podrían producirse por la menor actividad de los sistemas noradrenérgicos.

La malnutrición provocó, probablemente, un aumento de los receptores α_{2C} en hipocampo lo que explicaría el deficiente desempeño en cuanto a número de errores en este grupo experimental, y es consecuente con lo planteado por Stern et al., (1975) al señalar la fuerte disminución de noradrenalina en ratas adultas y las alteraciones neuroquímicas adrenérgicas señaladas por Chanez et al. (1981), Resnick, et al., (1984), Soto-Moyano et al., (1999) y Soto-Moyano et al., (2005) por efecto de la malnutrición. Estudios complementarios



podrían ratificar si efectivamente estos receptores u otros sistemas de neurotransmisión podrían estar implicados en estos procesos.

Respecto al eventual efecto compensador de la poliestimulación sensorio motora, los resultados mostraron que el grupo de ratas malnutridas sometidas a este procedimiento y durante la evaluación en el laberinto radial octogonal, mejoran su rendimiento acercándose a los registros del grupo control. No obstante, no se observa un impacto significativo en las ratas controles. Esto significa que, si bien la poliestimulación puede ser efectiva para mejorar el desempeño en tareas cognitivas en animales malnutridos, sus efectos en ratas normales no son significativos.

Existen numerosos estudios que señalan los efectos positivos de la poliestimulación precoz en ratas normales como en aquellas con privación nutricional (Fernández, 1997), efectos que están relacionados con un aumento de la arborización y conectividad neuronal en diversas regiones de la corteza cerebral e hipocampo inducidas por la poliestimulación. De esta manera, se podría explicar el mejor desempeño de las ratas estimuladas en el laberinto radial octogonal de Olton, sobretodo en su mejoramiento en cuanto al menor número de errores obtenido por dicho efecto (Pascual y Figueroa, 1996). Por otra parte, ya que la actividad de exploración de las ratas se orienta según las claves visuales tanto egocéntricas como aloecéntricas, implica que la rata debe memorizar y aprender a utilizar dichas claves para encontrar el refuerzo ubicado en cada brazo del laberinto (Burgos et al., 2005; Bustos et al., 2003; Olton y Samuelson, 1976; Saavedra et al., 1999). Requiere, por tanto, un desarrollo neuronal que aumente el campo de acción neuronal, una mayor arborización dendrítica, es decir mayor cantidad de conexiones sinápticas que ofrezcan distintos caminos de solución para la adecuada toma de decisiones de la rata, hecho que podría explicar los mejores registros logrados en ratas malnutridas poliestimuladas a nivel occipital y frontal en las potenciaciones de largo plazo, hecho asociado a mecanismos plásticos cerebrales relacionados a funciones de memoria y aprendizaje (Arnsten, 1998; Mc Gaugh, 2000; Vickery et al., 1997; Volgushev et al., 1999; Rioult-Pedotti et al., 1998; Rioult-Pedotti et al., 2000).



La poliestimulación sensorio-motora tiene muy buenos resultados cuando se ejerce en períodos críticos del desarrollo del animal, como se ha demostrado histológicamente y bioquímicamente (Pascual, et al., 1993; Fernández, et al., 1997; Fernández et al., 1998; Fernández et al., 2003); los resultados son consistentes respecto de la influencia de la poliestimulación en ratas cuando presentan estados nutricionales deficitarios. Por el contrario, las ratas eutróficas con poliestimulación tuvieron un número de errores y tiempo de recorrido similar, lo que sugiere que la poliestimulación no influye como un mecanismo activador aplicado a ratas normales, afirmación que concuerda con la evidencia aportada por Fernández et al., (1998). En este sentido, conviene observar en futuros experimentos, si hubo mantención de memoria de los eventos en un tiempo posterior y hacer las comparaciones histológicas y otras pruebas para precisar el nivel de impacto a largo plazo y si éste se mantiene en el tiempo en ratas normales, una vez cesada la poliestimulación, después del destete.

No obstante, una posible razón específica de por qué la poliestimulación sensorio motora precoz no tiene impactos de importancia en ratas normales, puede estar relacionada al hecho de que los mecanismos plásticos pueden mantenerse por un tiempo siempre que se continúe el efecto de la poliestimulación, en este caso, de manera constante. En el presente estudio, sólo se aplicó el procedimiento en las etapas tempranas del desarrollo, y luego de 40 días sin estimulación los animales se sometieron a medición conductual en laberinto. Igual procedimiento se realizó para la obtención del registro electrofisiológico, por lo cual se requiere de mayor evidencia experimental para poder pronunciarse al respecto, ya que se desconoce lo que ocurre con los organismos durante esa fase de no medición.

Se conoce, por otra parte, que los potenciales excitatorios post sinápticos (PEPS) en hipocampo generados por estimulación a nivel occipital y frontal, facilitarían los procesos mnésicos y de aprendizaje a través de la activación de mecanismos genómicos que inducen plasticidad cerebral. Estos mecanismos se sumarían a la elevación de los niveles de NA



central, modulando en forma compleja el funcionamiento de la corteza y potenciando la memoria a largo plazo (Soto-Moyano, et al. 1998).

Por lo tanto, es importante tener en cuenta que la mal nutrición (oculta) es un factor que incide en los procesos cognitivos por una probable disfunción en los adrenoreceptores β_2 o en el aumento de los receptores α_{2C} en la vida adulta de las ratas mal nutridas según lo mencionado por Soto-Moyano et al. (2005). Esta tesis permite atender el papel vital de la poliestimulación temprana en la facilitación y desarrollo de procesos mnésicos comprendiendo lo fundamental de una dieta equilibrada en sus nutrientes durante el período gestacional (in útero) para el desarrollo de las futuras capacidades cognitivas del feto.

La evidencia aportada por Gibbs (1991) y Seidler et al, (1990) nos señalan que la mal nutrición prenatal, conlleva la existencia de disfunciones en los adrenoreceptores en el hipocampo de ratas adultas desnutridas, hecho que se podría corroborar en esta tesis a través del desempeño mostrado por las ratas mal nutridas respecto al grupo control; no obstante, como se señaló más arriba, la poliestimulación sensorio motora aplicada produjo un mejoramiento del desempeño en ratas mal nutridas en el laberinto radial octogonal de Olton con su consecuente correlato electrofisiológico cortical, lo que puede explicarse por la probable activación de adrenoreceptores β_2 inducida por la poliestimulación. Se confirma entonces la hipótesis de esta tesis, en la cual se visualiza el papel beneficioso de la poliestimulación en los registros electrofisiológicos y conductuales. La explicación más probable tendría que ver con la activación de los adrenoreceptores β_2 por acción de este procedimiento, que favorecería los procesos de memoria por la puesta en marcha de mecanismos plásticos cerebrales que pueden apreciarse a través de los cambios favorables en la potenciación de largo plazo, que superan los efectos deletéreos de la mal nutrición, como señalara Seidler et al., (1990).



Al parecer, la poliestimulación sensorio-motora temprana no parece tener un impacto funcional en ratas eutróficas, según nuestros resultados conductuales y electrofisiológicos. Futuras estudios podrían correlacionar los presentes resultados con cambios neuroanatómicos a nivel de hipocampo y zonas de la corteza, utilizando este mismo diseño experimental. Igualmente, próximas hipótesis podrían ponerse a prueba para estudiar los efectos conductuales de fármacos agonistas o antagonistas de receptores noradrenérgicos vinculados a la memoria, observando impactos específicos en diversos indicadores de plasticidad (memoria, LTP). Por ejemplo, sería relevante investigar los efectos que provoca la activación de los receptores noradrenérgicos α_{2C} y β_2 en ratas con nutrición eutrófica (normal), como una forma de averiguar los efectos de estos fármacos en dichas ratas y cómo cambian en el tiempo, ya que la poliestimulación sensorio motora se aplicó sólo en las fases tempranas del desarrollo y luego fueron evaluadas en estado adulto. Lo que ocurre entre los días 22 y 60 de vida de la rata después de la poliestimulación (período que corresponde al intervalo entre destete y adultez) no se conoce, a pesar de sus eventuales aplicaciones a nivel educacional o en aspectos relacionados con terapias psicoeducativas.

A este respecto, hay evidencia de algunos estudios en humanos que aplican algunos de estos conceptos, sobretodo en las etapas entre la lactancia y la pubertad en humanos. Específicamente, la poliestimulación sensorio-motora estaría relacionada con otros mecanismos descritos en psicología que tienen que ver con el apego (Lecannelier, 2006). Al respecto, separaciones tempranas materno infantiles, así como el hecho de mantener un vínculo estable en la relación madre-hijo, provocan cambios en el sistema nervioso central que influyen en posteriores desarrollos cognitivos en el adulto y que se reflejan en mejores desempeños académicos y sociales (Hofer, 2003).

La presente tesis contribuye a aumentar la comprensión de los efectos de la mal nutrición prenatal oculta, no sólo en los aspectos neuroanatómicos y fisiológicos, sino que también en aspectos conductuales y cognitivos. Actualmente se desconoce el impacto de



la desnutrición oculta en las funciones cerebrales superiores, dado que los indicadores antropométricos actualmente utilizados para diagnosticar desnutrición intrauterina (peso y talla para la edad gestacional, circunferencia craneana) no detectan desnutrición oculta, debido a que ella no produce cambios morfométricos apreciables. Esto incide en que aún no se toma una plena conciencia sobre la prevalencia de la desnutrición prenatal oculta, inducida por una baja ingesta de proteínas compensada mediante carbohidratos. Es importante mencionar que este estudio pretende contribuir a poner énfasis en una adecuada nutrición antes y durante el embarazo debido a que en la malnutrición prenatal oculta, si bien no se altera el peso de la madre ni los pesos corporales y cerebrales de los neonatos durante el desarrollo, se generan cambios notables a corto y largo plazo en la estructura, metabolismo y función cerebral de las crías (Chanez et al. 1981; Resnick, et al. 1984; Soto- Moyano et al. 1999), lo que, obviamente trae como consecuencias detrimentos cognitivos, como los explicitados en esta tesis.

A la luz de nuestros resultados y de otros previos, proponemos que este tipo de investigaciones debiera ser difundida a la población humana, para prevenir posibles alteraciones que puede provocar una malnutrición oculta por su relación con efectos secundarios (déficit atencional, hiperactividad, hiperreflexia, desmotivación, entre otros) como señala Breslau, (2000) y Zubrick et al., (2000). Por otra parte, este tipo de estudios puede aportar a una mejor comprensión de la influencia de una buena nutrición en el desempeño y eficiencia de los procesos cognitivos y conductuales en las personas, utilizando como medio de información las escuelas, los consultorios y hospitales.

En la actualidad, la autoridad sanitaria de nuestro país está enfocada a disminuir la obesidad en la población joven haciendo énfasis en campañas educativas que señalan los riesgos cardio-vasculares (INTA, 2004). Así también es de relevancia considerar que la mal nutrición temprana provoca déficits en los procesos cognitivos, tales como el aprendizaje y la memoria según lo señalado por Seidler, et al. (1990), corroborado con nuestros resultados. En educación es básico que esta información se conozca a nivel gubernamental, profesores,



apoderados y alumnos; por una parte, como una voz de alarma por la relación a efectos secundarios de la malnutrición mencionados más arriba y, por otra parte, como un aporte a la mejor comprensión de la influencia de una buena nutrición en el desarrollo de los procesos cognoscitivos y conductuales en las personas.

En el campo de la psicología, además de las aplicaciones que se estudian en el apego, esta investigación es un aporte neuroanatómico, bioquímico, fisiológico y conductual que se relaciona a la conducta humana, por lo cual contribuye a una mejor comprensión de los fenómenos del comportamiento que inciden en distintos campos del quehacer del psicólogo. El rol de la corteza frontal está críticamente relacionada con la memoria de trabajo y la corteza parieto-occipital está involucrada en tareas visuo-espaciales donde se evidencian mecanismos directamente relacionados con la consolidación de la memoria (Arnsten, 1998; Mc Gaugh, 2000; Vickery et al, 1997; Volgushev et al., 1999; Rioult-Peddotti et al, 1998; Rioult-Peddotti et al., 2000) y por lo tanto traerá consecuencias probables en el desarrollo cognitivo conductual del individuo, como se ha demostrado en parte en esta tesis. Este hecho, sin ser visto, había sido adelantado por Freud en 1895, al referirse a las barreras contacto (sinapsis) y el funcionamiento de las neuronas en la psiquis que, mediante mecanismos bioquímicos adquieren una excitación que permite la activación del proceso mental (Freud, 1895/2005), atendiendo los adelantos de la época en el conocimiento histológico de Golgi y Ramon y Cajal (Centone et al., 2004). Posteriormente Hebb (1946/2002) también adelanta la explicación de estos procesos siendo uno de los primeros investigadores que acuña el término de “neuropsicología” dando énfasis al nacimiento de una visión neurocientífica de los procesos psicológicos (Hebb, 1949/2002). Actualmente, la memoria es descrita como un proceso que involucra aprendizaje y ambos presentan complejos procesos en las distintas zonas del cerebro donde zonas del sistema nervioso central, como hipocampo, las cortezas frontal y parieto-occipital, entre otras, juegan un rol fundamental a través de complejos mecanismos electrofisiológicos en estudio en la actualidad (Kandel et al. 2001).



Conclusión

Analizando lo anterior podemos concluir lo que a continuación se indica:



(1) La activación de la plasticidad cerebral mediante poliestimulación sensorio motora temprana en la memoria visuoespacial de ratas mal nutridas (in útero) mejora el desempeño y los registros electrofisiológicos corticales, probablemente por activación de circuitos hipocámpicos. Esto redundará en un mejoramiento en el desempeño en el laberinto radial octogonal de Olton y potenciación de largo plazo, por lo cual puede ser atribuido a un mejoramiento de los procesos cognitivos involucrados.

(2) La aplicación de poliestimulación sensoriomotora temprana puede causar importantes efectos en los receptores β_2 , favoreciendo el aprendizaje debido a la activación de dichos receptores que favorecen la excitación del sistema noradrenérgico, que es uno de los sistemas de neurotransmisores implicado en los procesos de memoria. Estos receptores, como se encuentran ampliamente distribuidos en hipocampo, corteza e hipotálamo facilitan los procesos de memoria por el mejoramiento de los circuitos y procesos neurofisiológicos implicados.

(3) En esta tesis se comprobó que la mal nutrición (oculta) provoca un déficit en el aprendizaje de las ratas, por disminución en el contenido proteico (de un 25% a un 8% de caseína) de la dieta materna durante el embarazo compensadas por la adición de carbohidratos y/o lípidos. En consecuencia la deficiencia alimentaria durante el período neonatal causa cambios en la estructura del cerebro, lo que redundará en déficits funcionales, cuyos efectos son más graves cuando más joven es el individuo, por lo tanto se pone en evidencia los riesgos del cambio de una dieta donde se sustituyen proteínas por calorías, en el desarrollo de las capacidades cognitivas desde etapas tempranas del desarrollo.

(4) Estos hallazgos contribuyen a una mejor comprensión de los efectos asociados a la mal nutrición y sus efectos deletéreos en los procesos cognitivos, relevante para los ámbitos de la educación, la psicología y la salud, que pueden aportar a las acciones preventivas en los hábitos alimentarios de nuestra población. Al mismo tiempo, la utilización de fármacos que



atenúan los déficits cognitivos por esta causa, podrían aportar al mejoramiento de la calidad de vida de quienes padecen de este síndrome.

(5) Las posibles aplicaciones de los resultados obtenidos en esta tesis pueden ser relevantes para complementar estudios que aporten a la base neurobiológica, que podría explicar más cabalmente los procesos cognitivos conductuales en los organismos. Asimismo, aquellos deterioros causados por una mala administración de factores epigenéticos desde niveles tempranos del desarrollo, quedan en evidencia con este tipo de estudios, situación que podría estar en conocimiento de profesionales de las áreas de las Ciencias Sociales, que podrían generar futuras intervenciones para paliar efectos deletéreos causados, especialmente por una insuficiente nutrición o poliestimulación sensorio-motora o afecto, involucrado en el desarrollo de los organismos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abraham WC, Denner J, Richardson C, Williams J, Mason SE, Tate WP, Dragunow M. (1993). Correlations between immediate early gene induction and the persistence of long-term potentiation. *Neuroscience* 56: 717–727.



- Arnsten AFT. (1998). Catecholamine modulation of prefrontal cortical cognitive function. **Trends Cogn Sci.** 2: 436-447.
- Breslau N, Chilcoat HD, Johnson EO, Andreski P, Lucia VC. (2000). Neurologic soft signs and low Birthweight: their association and Neuropsychiatric implications. **Biol Psych.** 47: 71-79.
- Burgos H. Mardones L. Campos M. Hernández A. Fernández V. Castillo A. (2005). Chronic Treatment with Clomipramine and Desipramine induces deficits in Long-term visuo-spatial Memory of rats measured in a Eighth-arm Radial Maze; **Int J Neurosci.** 115:445-457.
- Bustos G, Basoalto E, Pinto-Hamuy T. (2003). Spatial memory in Long Evans and Rattus Norvegicus rats. **Biol Res.** 36(2):193-9.
- Carughi A, Carpenter KJ, Diamond MC (1989). Effect of environmental enrichment during nutritional rehabilitation on body growth, blood parameters and cerebral cortical development of Rats. **J Nutr.** 119(12):2005-16.
- Centonze D, Siracusano A, Calabresi P, Bernardi G. (2004). The Project for a Scientific Psychology (1895): a Freudian anticipation of LTP-memory connection theory. **B Res Rev.** 46:310– 314.
- Chamove, A.S. (1998). Environmental Enrichment: a Review. **An Technol.** 40(3): 155-178.
- Chanez C, Flexor MA, Hamon M. (1985). Long lasting effects of intrauterine growth retardation on basal and NA/KATPase in the brain of developing rats. **Neurochem Internat.** 7: 319-329.
- Davies CA, Katz HB (1983).The comparative effects of early-life undernutrition and subsequent differential environment on the dendritic branching of pyramidal cells in rat visual cortex. **J Comp Neurol.** 218(3): 345-50.
- Diamond M.C., Ingham C.A., Johnson R.E., Bennett E.L., Rosenzweig M.R. (1976). Effects of environment on morphology of rat cerebral cortex and Hippocampus. **J Neurobiol.** 7(1): 75-85.



- Dineley KT, Weeber EJ, Atkins C, Adams JP, Anderson AE, & Sweatt JD., (2001). Leitmotifs in the biochemistry of LTP induction: amplification, integration and coordination. **J Neurochem.** 77:961 – 71.
- Dudchenko PA. (2004). An overview of the tasks used to test working memory in rodents. **Neurosci Biobehav Rev.** 28(7):699-709.
- Duffy SN, Craddock KJ, Abel T, Nguyen PV. Environmental enrichment modifies the PKA-dependence of hippocampal LTP and improves hippocampus-dependent memory. **Learn Mem.** 8:26-34, 2001.
- Dusek Ja., Eichenbaum H. (1997). The Hippocampus And Memory For Orderly Stimulus Relations. **Proc Natl Acad Sci. USA** Vol. 94, Pp. 7109–7114.
- Escorihuela RM, Fernandez-Teruel A, Tobena A, Vivas NM, Marmol F, Badia A, Dierssen M. Early environmental stimulation produces long-lasting changes on beta-adrenoceptor transduction system. **Neurobiol Learn Mem.** 64:49-57, 1995.
- Fenton Aa., Wesierska M., Kaminsky Y. And Bures J. (2004). Both here and there: Simultaneous expression of autonomous spatial memories in rats, **Proc Natl Acad Sci. USA** Vol. 95, pp. 11493–11498.
- Fernández V, Fernández B, Adaro L. (2003). Early polysensorial enrichment: specific experience-induced structural changes in the Parieto-occipital Cortex of the Rat. **Growth Dev Aging.** 67:3-10.
- Fernández V., Adaro L., Sanhueza-Tsutsumi M., Inzunza O. y Bravo H. (1997). Early-Life Polysensorial Stimulation and Nutrition: Topographic Levels of Susceptibility in The Rats Visual Cortex. **Biol Neonate** 71: 265-276.
- Freud, S. (1895/2005). Proyecto de Psicología para Neurólogos. *En Obras Completas. Ira. Edición, Ira Reimpresión de Ed El Ateneo, B. Aires, Argentina.* N°1, pp. 209.
- Gallistel CR, Mark TA, King A, Latham PE (2001) The rat approximates an ideal detector of changes in rates of reward: implications for the law of effect. **J Exp Psych: Anim Behav Proc.** 27:354–372.



- Green EJ, Greenough WT, Schlumpf BE (1983). Effects of complex or isolated environment on cortical dendrites of middle aged rats. **Brain Res.** 264(2): 233-40.
- Gibbs ME. (1991). Behavioral and Pharmacological unravelling of Memory formation. **Neurochem Res.** 16: 715- 726, 1991.
- Hamm RJ, Temple MD, O'Dell DM, Pike BR, Lyeth BG. (1999). Exposure to Environment Complexity Promotes Recovery of Cognitive Function after Traumatic Brain Injury. **J Neurotrauma** 13(1):41-7.
- Hebb, D. O. (1949/2002). The Organization of Behavior; a Neuropsychological Theory. (Wiley, New York, 1949) (Reimpreso por **Lawrence Erlbaum Associates**, 2002).
- Hebert AE and Dash PK. (2002). Extracellular Signal-Regulated Kinase Activity in the Entorhinal Cortex Is Necessary for Long-Term Spatial Memory, **Learn Mem.** 9: 156-166.
- Henke K, Buck A, Weber B, Wieser HG. (1997). Human Hippocampus establishes associations in Memory. **Hippocampus** 7(3):249-56.
- Hernández A, Valladares L, Sierralta W, Perez H, Mondaca M, Soto-Moyano R. (2005). Prenatal protein restriction decreases 2-adrenoceptor density and impairs long-term potentiation in the rat neocortex. **25th Meeting Society for Neuroscience**. Washington DC, USA, Noviembre.
- Hodges H. (1996). Maze procedures: the Radial-arm and Water maze compared. **Brain Res Cogn.** 3(3-4):167-81.
- Hofer MA. (2003). The Emerging Neurobiology of Attachment and Separation. How Parents shape their Infant's Brain and Behavior. En S.W. Rosenthal CJL & Schechter Ed. Trauma and Human Bond. **The Analytic Press**.
- Kamatsu Y. (1996) GABAB Receptors, monoamine receptors and Postsynaptic inositol Trisphosphate-induced Ca²⁺ release are involved in the induction of Long-term Potentiation at Visual Cortical inhibitory Synapses. **J Neurosci.** (16) 6342–6352.
- Kandel, E., Schwartz, J. & Jessell, T. (1999). *Neurociencia y Conducta*. (2a.reimp.). Madrid España, **Prentice Hall**.



- Kesner RP. & Olton DS (1990). *Neurobiology of Comparative Cognition*. **London Erlbaum Associates Publishers**, London England.
- Lecannelier F. (2006). *Apego e Intersubjetividad; Influencia de los Vínculos tempranos en el Desarrollo Humano y la Salud Mental*. **Ediciones LOM, Serie Universitaria**, Santiago de Chile.
- Malleret G, Haditsch U, Genoux D, Jones MW, Bliss TV, Vanhose AM, Weitlauf C, Kandel ER, Winder DG, Mansuy IM. (2001). Inducible and reversible enhancement of learning, memory, and long-term potentiation by genetic inhibition of calcineurin. **Cell** 104(5):675-86.
- McGaugh JL. (2000). Memory-a century of consolidation. **Science** 287: 248-251.
- Mondaca M, Hernández A, Pérez H, Valladares L, Sierralta W, Fernández V, Soto-Moyano R. (2004). α 2-adrenoceptor modulation of long-term potentiation elicited in vivo in rat occipital cortex. **Brain Res.** 1021: 292-296.
- Naka F, Shiga T, Yaguchi M, Okado N. An enriched environment increases noradrenaline concentration in the mouse brain. **Brain Res.** 924:124-126, 2002.
- Nowicky A. V., Christofi G. and Bindman L. T. (1992) Investigation of b-adrenergic modulation of synaptic transmission and post synaptic induction of associative LTP in layer V neurones in slices of rat sensorimotor cortex. **Neurosci Lett.** 137, 270-273.
- Olton DS, and Samuelson RJ. (1976). Remembrance of Places Passed: Spatial Memory in Rats. **J Exp Psychol: Animal Behav Proc.** (12) nro.2.
- Olton DS. (1979). Maze, Maps and Memory. **Am Psychol.** 34(7): 583- 96.
- Paganelli RA., Benetolli A., Miltus Lima KC., Cestari-Junior LA., Luiz António Favero Filho LA. y Milani H. (2004). A novel version of the 8-arm radial maze: effects of cerebral ischemia on learning and memory, **J Neurosci Meth.** 132: 9-18
- Parslow DM, Morris RG, Fleminger S, Rahman Q, Abrahams S, Recce M. (2005). Visuoespacial Allocentric Spatial Memory in Humans with Hippocampal Lesions. **Acta Psychol.** 118(1-2):123-47.



- Pascual R, Fernández V, Ruiz S. & Kuljis RO. (1993). Environmental Deprivation delays maturation of Motor Pyramids during the Early Postnatal Period. **E. Human Develop.** 33: 145-155.
- Pascual R, Figueroa H. (1996). Effects of preweaning sensorimotor stimulation on behavioral and neuronal development in motor and visual cortex of the rat. **Biol Neonate** 69(6):399-404.
- Pellegrino L J & Cushman A J (1967). A Stereotaxic Atlas of the Rat Brain. (Elliott R M, Lindzey G. and MacCorquodale K., Ed.) **Appleton-Century-Crofts**, New York.
- Pham TM, Soderstrom S, Winblad B, Mohammed AH. (1999). Effects of enviromental enrichment on cognitive function and hippocampal NGF in the non-handled Rats. **Behav Brain Res.** 103(1), 63-70.
- Racine RJ, Wilson D., Teskey GC, Milgram NW. (1994). Post-activation potentiation in the neocortex: I. Acute preparations. **Brain Res.** 637:73-82.
- Resnick O, Morgane PJ, Hasson R, Miller M. Overt and hidden forms of chronic malnutrition in the rat and their relevance to man. **Neurosci Biobehav Rev.** 1982 6: 55-76.
- Rioult-Pedotti MS, Friedman D, Donoghue JP (2000). Learning-induced LTP in Neocortex. **Science** 290:533–536.
- Rioult-Pedotti MS, Friedman D, Hess G, Donoghue JP. (1998). Strengthening of horizontal cortical connections following skin learning. **Nat Neurosci.** 1: 230-234.
- Saavedra MA., Pinto Hamuy, T., Marchant, F., Urzúa C. (1999). Motivación: su efecto sobre la estrategia de solución del Laberinto Octogonal. **Rev Psicol. Universidad de Chile** Vol. VIII-Nº1.
- Seidler FJ, Bell JM, and Slotkin TA. (1990). Undernutrition and overnutrition in the neonatal rat: long-term effects on noradrenergic pathways in brain regions. **Pediatr Res.** 27, 191–197.



- Sierralta W, Hernández A, Valladares L, Pérez H, Mondaca M, Soto-Moyano R. (2006). Mild prenatal protein malnutrition increases $\alpha 2C$ -adrenoceptor expression in the rat cerebral cortex during postnatal life. **Brain Res Bull.** 69:580-586.
- Skinner, B. F. (1950). Are theories of learning necessary?. **Psychol Rev.** 57, 193-216.
- Skinner, B. F. (1953). Science and human behavior. **Macmillan Edit.** USA.
- Small WS. (1901). Experimental study of the mental processes of the rat II. **Am J Psychol.** 12: 206-239.
- Soto-Moyano R, Alarcón S, Belmar J, Kusch C, Pérez H, Ruiz S, Hernández A. (1998). Prenatal protein restriction alters synaptic mechanisms of callosal connections in the rat visual cortex. **Int J Devl Neurosci.** 16: 75-84.
- Soto-Moyano R, Fernández V, Sanhueza M, Belmar J, Kusch C, Pérez H, Ruiz S, Hernández A. (1999). Effects of mild protein prenatal malnutrition and subsequent postnatal nutritional rehabilitation on noradrenaline release and neuronal density in the rat occipital cortex. **Dev Brain Res.** 116: 51-58.
- Soto-Moyano R, Valladares L, Sierralta W, Perez H, Mondaca M, Fernandez V, Burgos H, Hernandez A. (2005). Mild prenatal protein malnutrition increases $\alpha 2C$ -adrenoceptor density in the cerebral cortex during postnatal life and impairs neocortical long-term potentiation and visuo-spatial performance in rats. **J Neurochem.** 93:1099-1109.
- Stern WC, Pugh WW, Resnick O, Morgane PJ. (1984). Developmental protein malnutrition in the rat. Effect on single-unit activity in the frontal cortex. **Brain Res.** 306: 227-234.
- Stern WC, Resnick O, Morgane PJ. (1976). Developmental malnutrition in rats: Acquisition and long-term retention of a single alternation discrimination. **Nutr Rep Internat.** 14: 475-483.
- Straube T, Korz V, Balschun D, Frey JU. Requirement of beta-adrenergic receptor activation and protein synthesis for LTP-reinforcement by novelty in rat dentate gyrus. **J Physiol.** 552(Pt 3): 953-960, 2003.



- Tejedor-Real P, Costela C, Gibert-Rahola J. Neonatal handling reduces emotional reactivity and susceptibility to learned helplessness. Involvement of catecholaminergic systems. **Life Sci.** 62: 37-50, 1998.
- Thorndike EL. (1911). Animal Intelligence: Experimental studies. **Macmillan Ed.**
- Tolman EC. (1948). Cognitive Maps in Rats and Men. **Psychol Rev.** 55:189-208.
- Torasdotter M, Metsis M, Henriksson BG, Winblad B, Mohammed AH. (1998). Environmental enrichment results in higher levels of nerve growth factor mRNA in the rat visual cortex and hippocampus. **Behav Brain Res.** 93(1-2):83-90.
- Tsanov M. & Manahan-Vaughan D., (2007). The Adult Visual Cortex expresses Dynamic Synaptic Plasticity that is Driven by the Light/Dark Cycle. **J Neurosci.** 27(31): 8414 – 21.
- Usakov S, Frey JU & Korz V., (2005). Reinforcement of rta hippocampal LTP by holeboard Training. **Learn Mem.** 12: 165-71.
- Van Waas M, Soffie M. (1996). Differential environmental modulations on locomotor activity, exploration and Spatial Behaviour in young and old Rats. **Physiol Behav.** 59(2):265-71.
- Vickery RM, Morris SH, Bindman LJ. (1997). Metabotropic glutamate receptors are involved in long-term potentiation in isolated slices of rat medial frontal cortex. **J Neurophysiol.** 78: 3039-3046.
- Viggiano D, Vallone D, Welzl H, Sadile AG. (2002). The Naples High- and Low-Excitability rats: selective breeding, behavioral profile, morphometry, and molecular biology of the mesocortical dopamine system. **Behav Genet.** 32(5):315-33.
- Volgushev M, Mittmann T, Chistiakova M, Balaban P, Eysel UT. (1999). Interaction between intracellular tetanization and pairing-induced long-term synaptic plasticity in the rat visual cortex. **Neuroscience** 93: 1227-1232.
- Whitlock JR, Heynen AJ, Shuler MG, Bear MF., (2006). Learning induces long-term potentiation in the Hippocampus. **Science** 313: 1093-97.



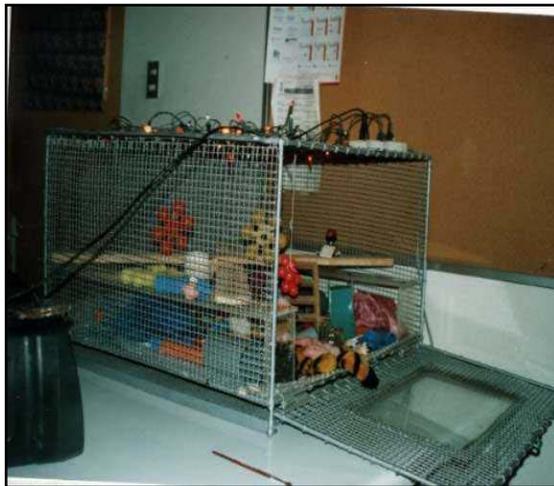
- Young D, Lawlor PA, Leone P, Dragunow M, During MJ. (1999). Environmental enrichment inhibits spontaneous apoptosis, prevents seizures and is Neuroprotective. **Nat Med.** 5(4):448-53.
- Zhang W, Klimek V, Farley JT, Zhu MY, Ordway GA. α_{2C} adrenoceptors inhibit adenylyl cyclase in mouse striatum: potential activation by dopamine. **J Pharmacol Exp Ther.** 289:1286-1292, 1999.
- Ziemann U, Iliac' TV, Pauli C, Meintzschel F. & Ruge D. (2004). Learning Modifies Subsequent Induction of Long-Term Potentiation-Like and Long-Term Depression-Like Plasticity in Human Motor Cortex. **J Neurosci.** 24(7): 1966 – 72.
- Zubrick SR, Kurinczuk JJ, McDermott BM, McKelvey RS, Silburn SR, Davies LC. (2000). Fetal growth and subsequent Mental Health problems in Children aged 4 to 13 years. **Dev Med Child Neurol.** 42: 14- 20, 2000.

A N E X O S



ANEXO N°1

PROCEDIMIENTO DE POLIESTIMULACIÓN SENSORIO MOTORA



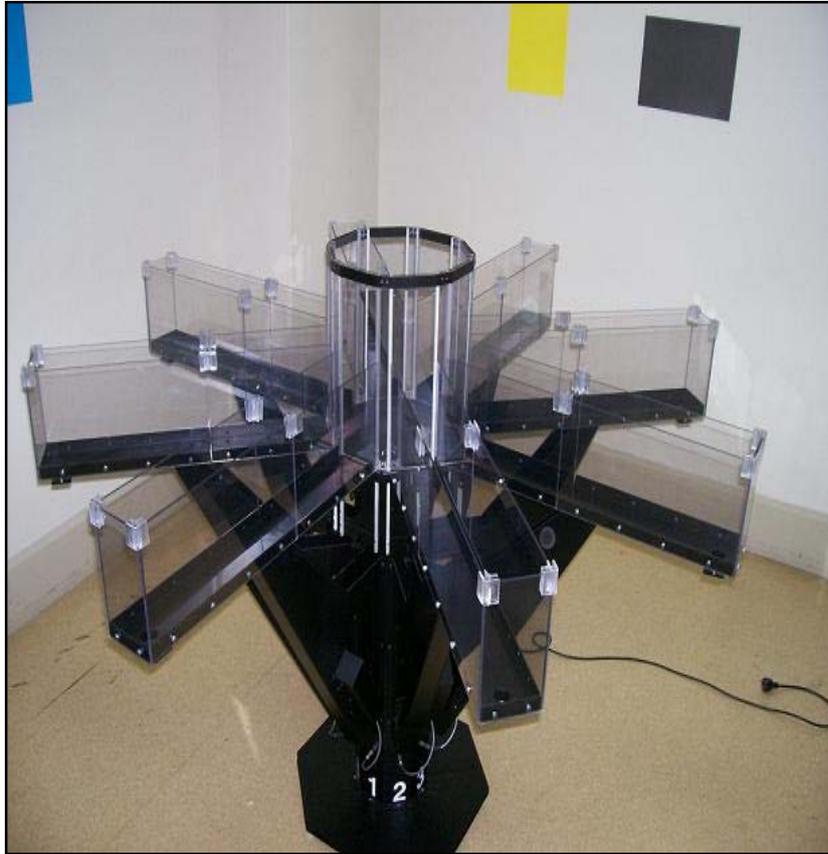
AMBIENTE ENRIQUECIDO, NATACIÓN Y HANDLING



ANEXO N°2

LABERINTO RADIAL OCTOGONAL DE OLTON

Levantado a 92 cm., con ocho brazos, en cuyo extremo se ubica un refuerzo. Nótese las claves visuales en la sala de experimentación. La rata inicia su recorrido en la plataforma central (Véase texto).



ANEXO N°3

PAUTA DE REGISTRO MANUAL DE VISITAS EN BRAZOS DE LABERINTO, INDICANDO EL TIEMPO DE ACCESO Y CONSUMO DE REFUERZO DE LA RATA.

ESCUELA DE PSICOLOGÍA
LABORATORIO DE CONDUCTA
PSICOBIOLOGÍA

LABERINTO:		MARCA:																Exp. / fecha
SESIÓN I	MASA (g)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	
prefer																		
seg																		
SESIÓN II	MASA (g)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	
prefer																		
seg																		
SESIÓN III	MASA (g)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	
prefer																		
seg																		
SESIÓN IV	MASA (g)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	
prefer																		
seg																		
SESIÓN V	MASA (g)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	
prefer																		
seg																		
SESIÓN VI	MASA (g)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	
prefer																		
seg																		



ANÁLISIS ANOVA Y BONFERRONI ERRORES MALNUTRIDOS V/S CONTROL		
--	--	--

VARIACIÓN	% VARIACIÓN	VALOR P
NRO DE ERRORES	56,72	P<0.0001
SESIONES	38,17	P<0.0001



VARIACIÓN	GR LIB	SUMA DE CUADRAD	MED CUAD	F
INTERACCIÓN	4	79,57	19,89	43,78
ENTRE GRUPOS	1	1236	1236	2720
ENTRE SESIONES	4	831,6	207,9	457,6
Residual	70	31,80	0,4543	
Bonferroni posttests				
SESIONES	CONTROL	MALNUTRIDOS	DIF	95% CI DIFER
1	7000	16,96	9960	9.068 to 10.85
2	2230	12,25	10,02	9.128 to 10.91
3	0,9300	8540	7610	6.718 to 8.502
4	0,6700	7690	7020	6.128 to 7.912
5	0,5000	5190	4690	3.798 to 5.582
SESIONES	DIFER	t	VALOR P	RESUMEN
1	9960	29,55	P<0.001	***
2	10,02	29,73	P<0.001	***
3	7610	22,58	P<0.001	***
4	7020	20,83	P<0.001	***
5	4690	13,92	P<0.001	***

ANEXO N°4

ANÁLISIS ANOVA Y BONFERRONI ERRORES MALNUTRIDOS POLIESTIMULADOS V/S CONTROL		
VARIACIÓN	% VARIACIÓN	VALOR P



NRO DE ERRORES SESIONES	9,39 84,85	P<0.0001 P<0.0001		
VARIACIÓN	GR LIB	SUMA DE CUADRAD	MED CUAD	F
INTERACCIÓN	4	10,34	2.586	9.285
ENTRE GRUPOS	1	48,67	48,67	174,8
ENTRE SESIONES	4	439,8	110,0	394,8
Residual	70	19,50	0,2785	
Bonferroni posttests				
SESIONES	CONTROL	MALNUT POLIEST	DIF	95% CI DIFER
1	7.000	7.760	0,7600	0.06128 to 1.459
2	2.230	5.000	2.770	2.071 to 3.469
3	0,9300	2.880	1.950	1.251 to 2.649
4	0,6700	1.760	1.090	0.3913 to 1.789
5	0,5000	1.730	1.230	0.5313 to 1.929
SESIONES	DIFER	t	VALOR P	RESUMEN
1	0,7600	2.880	P<0.05	*
2	2.770	10,50	P<0.001	***
3	1.950	7.390	P<0.001	***
4	1.090	4.131	P<0.001	***
5	1.230	4.661	P<0.001	***

ANÁLISIS ANOVA Y BONFERRONI ERRORES EUTRÓFICOS POLIESTIMULADOS V/S CONTROL

VARIACIÓN NRO DE ERRORES SESIONES	% VARIACIÓN 12,39 34,74	VALOR P P<0.0001 P<0.0001
---	-------------------------------	---------------------------------



VARIACIÓN	GR LIB	SUMA DE CUADRAD	MED CUAD	F
INTERACCIÓN	4	72,06	18,02	4.933
ENTRE GRUPOS	1	76,83	76,83	21,04
ENTRE SESIONES	4	215,4	53,84	14,74
Residual	70	255,7	3.652	
Bonferroni posttests				
SESIONES	CONTROL	EUTROF POLIEST	DIF	95% CI DIFER
1	7.000	5.380	1.620	-4.150 to 0.9102
2	2.230	5.000	2.770	0.2398 to 5.300
3	0,9300	4.670	3.740	1.210 to 6.270
4	0,6700	3.790	3.120	0.5898 to 5.650
5	0,5000	2.290	1.790	-0.7402 to 4.320
SESIONES	DIFER	t	VALOR P	RESUMEN
1	1.620	1.695	P>0.05	ns
2	2.770	2.899	P<0.05	*
3	3.740	3.914	P<0.01	**
4	3.120	3.265	P<0.01	**
5	1.790	1.873	P>0.05	ns

ANÁLISIS ANOVA Y BONFERRONI TPO. DE RECORRIDO MALNUTRIDOS V/S CONTROL

VARIACIÓN	% VARIACIÓN	VALOR P		
NRO DE ERRORES	73,54	P<0.0001		
SESIONES	24,50	P<0.0001		
VARIACIÓN	GR LIB	SUMA DE CUADRAD	MED CUAD	F



INTERACCIÓN	4	26180	6546	38,08
ENTRE GRUPOS	1	1431000	1431000	8323
ENTRE SESIONES	4	476600	119200	693,2
Residual	70	12030	171,9	
Bonferroni posttests				
SESIONES	CONTROL	MALNUTRIDOS	DIF	95% CI DIFER
1	329,6	533,8	204,2	186.8 to 221.5
2	162,1	469,3	307,2	289.8 to 324.5
3	121,0	374,5	253,5	236.1 to 270.9
4	90,43	370,9	280,5	263.1 to 297.8
5	82,70	374,7	292,0	274.6 to 309.3
SESIONES	DIFER	t	VALOR P	RESUMEN
1	204,2	31,15	P<0.001	***
2	307,2	46,86	P<0.001	***
3	253,5	38,67	P<0.001	***
4	280,5	42,78	P<0.001	***
5	292,0	44,54	P<0.001	***

ANÁLISIS ANOVA Y BONFERRONI TPO. DE RECORRIDO MALNUTRIDOS POLIESTIMULADOS V/S CONTROL

VARIACIÓN	% VARIACIÓN	VALOR P
NRO DE ERRORES	12,18	P<0.0001
SESIONES	81,73	P<0.0001



VARIACIÓN	GR LIB	SUMA DE CUADRAD	MED CUAD	F
INTERACCIÓN	4	16700	4175	10,78
ENTRE GRUPOS	1	87680	87680	226,3
ENTRE SESIONES	4	588300	147100	379,6
Residual	70	27120	387,4	
Bonferroni posttests				
SESIONES	CONTROL	MALNUT POLIEST	DIF	95% CI DIFER
1	329,6	360,6	30,98	4.920 to 57.04
2	162,1	279,4	117,3	91.23 to 143.4
3	121,0	169,6	48,61	22.55 to 74.67
4	90,43	154,9	64,51	38.45 to 90.57
5	82,70	152,4	69,66	43.60 to 95.72
SESIONES	DIFER	t	VALOR P	RESUMEN
1	30,98	3.148	P<0.05	*
2	117,3	11,92	P<0.001	***
3	48,61	4.939	P<0.001	***
4	64,51	6.555	P<0.001	***
5	69,66	7.078	P<0.001	***

ANÁLISIS ANOVA Y BONFERRONI TPO. DE RECORRIDO EUTRÓFICOS POLIESTIMULADOS V/S CONTROL



VARIACIÓN NRO DE ERRORES SESIONES	% VARIACIÓN 13,67 43,34	VALOR P P<0.0001 P<0.0001		
VARIACIÓN	GR LIB	SUMA DE CUADRAD	MED CUAD	F
INTERACCIÓN	4	163000	40760	79,98
ENTRE GRUPOS	1	63180	63180	124,0
ENTRE SESIONES	4	200400	50090	98,29
Residual	70	35670	509,6	
Bonferroni posttests				
SESIONES	CONTROL	EUTROF POLIEST	DIF	95% CI DIFER
1	329,6	211,2	118,4	-148.3 to -88.49
2	162,1	230,9	68,83	38.94 to 98.72
3	121,0	253,0	132,0	102.1 to 161.9
4	90,43	208,0	117,5	87.63 to 147.4
5	82,70	163,8	81,06	51.17 to 110.9
SESIONES	DIFER	t	VALOR P	RESUMEN
1	118,4	10,49	P<0.001	***
2	68,83	6.098	P<0.001	***
3	132,0	11,69	P<0.001	***
4	117,5	10,41	P<0.001	***
5	81,06	7.181	P<0.001	***

ANÁLISIS ANOVA Y BONFERRONI LTP OCCIPITAL MALNUTRIDOS V/S CONTROL

VARIACIÓN NRO DE ERRORES SESIONES	% VARIACIÓN 40,94 21,47	VALOR P P<0.0001 P<0.0001
---	-------------------------------	---------------------------------

VARIACIÓN	GR LIB	SUMA DE CUADRAD	MED CUAD	F
-----------	--------	-----------------	----------	---



INTERACCIÓN	12	11530	960,6	4.035
ENTRE GRUPOS	1	59730	59730	250,9
ENTRE SESIONES	12	31320	2610	10,96
Residual	182	43330	238,1	

Bonferroni posttests				
TIEMPO	CONTROL	MALNUTRIDOS	DIF	95% CI DIFER
0,0000	100,0	100,0	0,0000	-22.59 to 22.59
5.000	160,1	154,2	5.880	-28.47 to 16.71
10,00	153,5	133,0	20,48	-43.07 to 2.110
15,00	150,6	119,0	31,64	-54.23 to -9.050
20,00	148,9	112,1	36,79	-59.38 to -14.20
25,00	147,2	109,7	37,44	-60.03 to -14.85
30,00	147,7	106,9	40,83	-63.42 to -18.24
35,00	148,1	106,0	42,13	-64.72 to -19.54
40,00	147,7	103,1	44,61	-67.20 to -22.02
45,00	147,5	102,3	45,20	-67.79 to -22.61
50,00	147,2	101,9	45,35	-67.94 to -22.76
55,00	147,9	102,4	45,44	-68.03 to -22.85
60,00	147,6	102,8	44,80	-67.39 to -22.21
TIEMPO	DIFER	t	VALOR P	RESUMEN
0,0000	0,0000	0,0000	P>0.05	ns
5.000	5.880	0,7622	P>0.05	ns
10,00	20,48	2.655	P>0.05	ns
15,00	31,64	4.101	P<0.001	***
20,00	36,79	4.769	P<0.001	***
25,00	37,44	4.853	P<0.001	***
30,00	40,83	5.292	P<0.001	***
35,00	42,13	5.461	P<0.001	***
40,00	44,61	5.782	P<0.001	***
45,00	45,20	5.859	P<0.001	***
50,00	45,35	5.878	P<0.001	***
55,00	45,44	5.890	P<0.001	***
60,00	44,80	5.807	P<0.001	***

ANÁLISIS ANOVA Y BONFERRONI LTP OCCIPITAL MALNUTRIDOS V/S MALNUTRIDOS POLIESTIMULADOS

VARIACIÓN	% VARIACIÓN	VALOR P
NRO DE ERRORES	28,71	P<0.0001
SESIONES	25,31	P<0.0001



VARIACIÓN	GR LIB	SUMA DE CUADRAD	MED CUAD	F
INTERACCIÓN	12	7770	647,5	2.459
ENTRE GRUPOS	1	34780	34780	132,1
ENTRE SESIONES	12	30660	2555	9.701
Residual	182	47930	263,4	

Bonferroni posttests				
TIEMPO	MALNUTRIDOS	MALNUT POLIEST	DIF	95% CI DIFER
0,0000	100,0	100,0	0,0000	-23.76 to 23.76
5.000	154,2	155,0	0,7800	-22.98 to 24.54
10,00	133,0	147,0	13,99	-9.769 to 37.75
15,00	119,0	144,0	25,05	1.291 to 48.81
20,00	112,1	142,0	29,90	6.141 to 53.66
25,00	109,7	139,0	29,28	5.521 to 53.04
30,00	106,9	138,0	31,15	7.391 to 54.91
35,00	106,0	137,0	31,01	7.251 to 54.77
40,00	103,1	137,0	33,87	10.11 to 57.63
45,00	102,3	137,5	35,22	11.46 to 58.98
50,00	101,9	137,3	35,42	11.66 to 59.18
55,00	102,4	137,8	35,37	11.61 to 59.13
60,00	102,8	138,0	35,19	11.43 to 58.95
TIEMPO	DIFER	t	VALOR P	RESUMEN
0,0000	0,0000	0,0000	P>0.05	ns
5.000	0,7800	0,09613	P>0.05	ns
10,00	13,99	1.724	P>0.05	ns
15,00	25,05	3.087	P<0.05	*
20,00	29,90	3.685	P<0.01	**
25,00	29,28	3.609	P<0.01	**
30,00	31,15	3.839	P<0.01	**
35,00	31,01	3.822	P<0.01	**
40,00	33,87	4.174	P<0.001	***
45,00	35,22	4.341	P<0.001	***
50,00	35,42	4.365	P<0.001	***
55,00	35,37	4.359	P<0.001	***
60,00	35,19	4.337	P<0.001	***

ANÁLISIS ANOVA Y BONFERRONI LTP OCCIPITAL MALNUTRIDOS POLIESTIMULADOS V/S CONTROL

VARIACIÓN	% VARIACIÓN	VALOR P
NRO DE ERRORES	4,08	0,0003
SESIONES	41,18	P<0.0001



VARIACIÓN	GR LIB	SUMA DE CUADRAD	MED CUAD	F
INTERACCIÓN	12	450,1	37,50	0,1532
ENTRE GRUPOS	1	3351	3351	13,69
ENTRE SESIONES	12	33860	2822	11,52
Residual	182	44560	244,9	
Bonferroni posttests				
TIEMPO	CONTROL	MALNUT POLIEST	DIF	95% CI DIFER
0,0000	100,0	100,0	0,0000	-22.91 to 22.91
5.000	160,1	155,0	5.100	-28.01 to 17.81
10,00	153,5	147,0	6.490	-29.40 to 16.42
15,00	150,6	144,0	6.590	-29.50 to 16.32
20,00	148,9	142,0	6.890	-29.80 to 16.02
25,00	147,2	139,0	8.160	-31.07 to 14.75
30,00	147,7	138,0	9.680	-32.59 to 13.23
35,00	148,1	137,0	11,12	-34.03 to 11.79
40,00	147,7	137,0	10,74	-33.65 to 12.17
45,00	147,5	137,5	9.980	-32.89 to 12.93
50,00	147,2	137,3	9.930	-32.84 to 12.98
55,00	147,9	137,8	10,07	-32.98 to 12.84
60,00	147,6	138,0	9.610	-32.52 to 13.30
TIEMPO	DIFER	t	VALOR P	RESUMEN
0,0000	0,0000	0,0000	P>0.05	ns
5.000	5.100	0,6518	P>0.05	ns
10,00	6.490	0,8295	P>0.05	ns
15,00	6.590	0,8423	P>0.05	ns
20,00	6.890	0,8806	P>0.05	ns
25,00	8.160	1.043	P>0.05	ns
30,00	9.680	1.237	P>0.05	ns
35,00	11,12	1.421	P>0.05	ns
40,00	10,74	1.373	P>0.05	ns
45,00	9.980	1.276	P>0.05	ns
50,00	9.930	1.269	P>0.05	ns
55,00	10,07	1.287	P>0.05	ns
60,00	9.610	1.228	P>0.05	ns

ANÁLISIS ANOVA Y BONFERRONI LTP FRONTAL MALNUTRIDOS V/S CONTROL

VARIACIÓN	% VARIACIÓN	VALOR P
NRO DE ERRORES	53,47	P<0.0001
SESIONES	7,30	0,0003



VARIACIÓN	GR LIB	SUMA DE CUADRAD	MED CUAD	F
INTERACCIÓN	12	8888	740,6	2.468
ENTRE GRUPOS	1	86560	86560	288,4
ENTRE SESIONES	12	11810	984,2	3.279
Residual	182	54620	300,1	

Bonferroni posttests				
TIEMPO	CONTROL	MALNUTRIDOS	DIF	95% CI DIFER
0,0000	100,0	100,0	0,01000	-25.35 to 25.37
5.000	146,5	120,2	26,32	-51.68 to -0.9572
10,00	149,9	109,4	40,54	-65.90 to -15.18
15,00	149,2	105,9	43,35	-68.71 to -17.99
20,00	146,9	102,6	44,30	-69.66 to -18.94
25,00	145,4	100,2	45,16	-70.52 to -19.80
30,00	143,9	99,29	44,61	-69.97 to -19.25
35,00	144,0	98,26	45,74	-71.10 to -20.38
40,00	144,4	97,49	46,91	-72.27 to -21.55
45,00	143,8	96,72	47,08	-72.44 to -21.72
50,00	143,7	95,88	47,82	-73.18 to -22.46
55,00	143,0	93,81	49,19	-74.55 to -23.83
60,00	143,6	94,22	49,38	-74.74 to -24.02
TIEMPO	DIFER	t	VALOR P	RESUMEN
0,0000	0,01000	0,001155	P>0.05	ns
5.000	26,32	3.039	P<0.05	*
10,00	40,54	4.680	P<0.001	***
15,00	43,35	5.005	P<0.001	***
20,00	44,30	5.114	P<0.001	***
25,00	45,16	5.214	P<0.001	***
30,00	44,61	5.150	P<0.001	***
35,00	45,74	5.281	P<0.001	***
40,00	46,91	5.416	P<0.001	***
45,00	47,08	5.435	P<0.001	***
50,00	47,82	5.521	P<0.001	***
55,00	49,19	5.679	P<0.001	***
60,00	49,38	5.701	P<0.001	***

ANÁLISIS ANOVA Y BONFERRONI LTP FRONTAL MALNUTRIDOS V/S MALNUTRIDOS POLIESTIMULADOS

VARIACIÓN NRO DE ERRORES	% VARIACIÓN 47,98	VALOR P P<0.0001
-----------------------------	----------------------	---------------------



SESIONES		8,68	0,0002	
VARIACIÓN	GR LIB	SUMA DE CUADRAD	MED CUAD	F
INTERACCIÓN	12	6313	526,1	1.741
ENTRE GRUPOS	1	67880	67880	224,6
ENTRE SESIONES	12	12280	1023	3.385
Residual	182	55010	302,3	
Bonferroni posttests				
TIEMPO	MALNUTRIDOS	MALNUT POLIEST	DIF	95% CI DIFER
0,0000	100,0	100,0	0,01000	-25.46 to 25.44
5.000	120,2	149,0	28,82	3.366 to 54.27
10,00	109,4	147,0	37,64	12.19 to 63.09
15,00	105,9	144,0	38,15	12.70 to 63.60
20,00	102,6	142,0	39,40	13.95 to 64.85
25,00	100,2	139,0	38,76	13.31 to 64.21
30,00	99,29	138,0	38,71	13.26 to 64.16
35,00	98,26	137,0	38,74	13.29 to 64.19
40,00	97,49	137,0	39,51	14.06 to 64.96
45,00	96,72	137,5	40,78	15.33 to 66.23
50,00	95,88	137,3	41,42	15.97 to 66.87
55,00	93,81	137,8	43,99	18.54 to 69.44
60,00	94,22	138,0	43,78	18.33 to 69.23
TIEMPO	DIFER	t	VALOR P	RESUMEN
0,0000	0,01000	0,001151	P>0.05	ns
5.000	28,82	3.315	P<0.05	*
10,00	37,64	4.330	P<0.001	***
15,00	38,15	4.389	P<0.001	***
20,00	39,40	4.533	P<0.001	***
25,00	38,76	4.459	P<0.001	***
30,00	38,71	4.453	P<0.001	***
35,00	38,74	4.457	P<0.001	***
40,00	39,51	4.545	P<0.001	***
45,00	40,78	4.691	P<0.001	***
50,00	41,42	4.765	P<0.001	***
55,00	43,99	5.061	P<0.001	***
60,00	43,78	5.036	P<0.001	***

ANÁLISIS ANOVA Y BONFERRONI LTP FRONTALL MALNUTRIDOS POLIESTIMULADOS V/S CONTROL

VARIACIÓN	% VARIACIÓN	VALOR P
NRO DE ERRORES	1,14	0,0857



SESIONES	28,96	P<0.0001		
VARIACIÓN	GR LIB	SUMA DE CUADRAD	MED CUAD	F
INTERACCIÓN	12	403,5	33,62	0,08853
ENTRE GRUPOS	1	1134	1134	2.985
ENTRE SESIONES	12	28800	2400	6.319
Residual	182	69120	379,8	
Bonferroni posttests				
TIEMPO	CONTROL	MALNUT POLIEST	DIF	95% CI DIFER
0,0000	100,0	100,0	0,0000	-28.53 to 28.53
5.000	146,5	149,0	2.500	-26.03 to 31.03
10,00	149,9	147,0	2.900	-31.43 to 25.63
15,00	149,2	144,0	5.200	-33.73 to 23.33
20,00	146,9	142,0	4.900	-33.43 to 23.63
25,00	145,4	139,0	6.400	-34.93 to 22.13
30,00	143,9	138,0	5.900	-34.43 to 22.63
35,00	144,0	137,0	7.000	-35.53 to 21.53
40,00	144,4	137,0	7.400	-35.93 to 21.13
45,00	143,8	137,5	6.300	-34.83 to 22.23
50,00	143,7	137,3	6.400	-34.93 to 22.13
55,00	143,0	137,8	5.200	-33.73 to 23.33
60,00	143,6	138,0	5.600	-34.13 to 22.93
TIEMPO	DIFER	t	VALOR P	RESUMEN
0,0000	0,0000	0,0000	P>0.05	ns
5.000	2.500	0,2566	P>0.05	ns
10,00	2.900	0,2976	P>0.05	ns
15,00	5.200	0,5337	P>0.05	ns
20,00	4.900	0,5029	P>0.05	ns
25,00	6.400	0,6568	P>0.05	ns
30,00	5.900	0,6055	P>0.05	ns
35,00	7.000	0,7184	P>0.05	ns
40,00	7.400	0,7594	P>0.05	ns
45,00	6.300	0,6465	P>0.05	ns
50,00	6.400	0,6568	P>0.05	ns
55,00	5.200	0,5337	P>0.05	ns
60,00	5.600	0,5747	P>0.05	ns

ANEXO N°5



CRONOGRAMA

Actividades	Jun.	Jul.	Ago.	Sep.	Oct.	Nov.	Dic.	Ene.	Feb.	Mar.	Abr.	May.	Jun.	Jul.
Presentación de Proyecto	X													
Aprobación de Proyecto		X												
Preparación camadas	X	X	X		X	X	X							
Gestación		X	X	X	X	X	X	X						
Mediciones en laberinto			X	X			X	X	X					
Aplicación de poliestimulación					X	X		X	X					
Registro y Tabulación Laberinto					X	X			X	X				
Electrofisiología					X	X	X		X	X	X			
Análisis de resultados											X	X		
Entrega de Informes	X							X						X
Ponencias en Congresos						X	X							X
Elaboración de paper publicables														X