



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS DEL I.P.N**

**UNIDAD ZACATENCO**

**DEPARTAMENTO DE FISIOLOGÍA, BIOFÍSICA Y NEUROCIENCIAS**

**“Efecto de la relación madre-cría y el tamaño de la camada sobre las características histológicas y la propagación del potencial de acción compuesto del nervio sural de la rata macho.”**

**Presenta:**

**M. en C. Eduardo Vladimir Martínez Álvarez**

**Doctorado en Ciencias**

**En la Especialidad de:**

**Neurobiología Celular y Molecular**

**Director de Tesis:**

**Dr. Ismael Jiménez Estrada**

**Ciudad de México**

**Marzo 2023**

## **Agradecimientos:**

Al CONACYT por el otorgamiento de la beca (No.415154) para la realización de la presente tesis doctoral.

Al Departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias del CINVESTAV por haberme brindado todas las facilidades para la realización del presente trabajo, en especial al laboratorio 8 y 11 por toda la infraestructura de la cual tuve disposición para la realización de todos los experimentos.

A las Doctoras: Margarita González del Pliego, Elsa Aguirre y Mercedes Porras de la Facultad de Medicina de la UNAM por disposición y apoyo para la realización del análisis histológico.

A todos mis compañeros del laboratorio, toda su ayuda ha sido invaluable para el desarrollo de la presente tesis, en especial a José Carlos Guadarrama Olmos cuyo apoyo técnico fue imprescindible para la culminación de este proyecto.

A mi tutor el Dr. Ismael Jiménez Estrada haberme brindado la confianza, la motivación y la apertura para desarrollarme académica y profesionalmente, todos sus consejos han sido sumamente valiosos para mi formación.

Finalmente, quiero agradecer a mis sinodales: Dra. Robyn Hudson, Dra. María Eugenia Mendoza Garrido, Dr. Rodolfo Delgado Lezama y Dr. Angel I. Melo. Agradezco todos sus comentarios constructivos que aportaron invaluable mejoras al trabajo.

## **Dedicatoria**

Dedico este trabajo a toda mi familia en especial:

A mi hija **Sofía Martínez Arteaga**, eres mi motivación para mi superación. Sigue siendo siempre la luz de nuestras vidas.

A mi esposa **Idania Arteaga**, sin tu apoyo no hubiera podido conseguir este paso en mi vida. Quiero que sigamos caminando y superándonos juntos.

A mi madre **Silvia Álvarez**, estaré eternamente agradecido por el esfuerzo y sacrificio que has hecho para apoyarme, este logro también es tuyo.

A mis hermanos **Iván y Oliver**, sé que cuento con su apoyo incondicional

Finalmente, dedico este trabajo a la **Dra. Bertha Segura y al Dr. Ismael Jiménez**. Estaré siempre agradecido por su apoyo, pero sobre todo por la amistad que me han brindado a mí y a mi familia.

¡A todos Muchas Gracias!

## **Abreviaturas.**

BMP: Proteína Básica de la Mielina

CA: Crianza artificial

CS: Célula de Schwann

DG: Día Gestacional

DPN: Día Postnatal

MAG: Glucolípido Asociado a la Mielina

nSU: Nervio sural

OPC: Células progenitoras de Oligodendrocitos

PAC: Potencial de Acción Compuesto.

PDM: Potenciales del Dorso de la Médula

SNC: Sistema Nervioso Central

SNP: Sistema Nervioso Periférico

xU: Veces Umbral

# Índice

1	Introducción .....	10
2	Antecedentes.....	12
2.1.	Periodos críticos del desarrollo del Sistema Nervioso .....	12
2.1.1	Plasticidad de los periodos críticos .....	13
2.1.2.	Nutrición perinatal y periodos críticos del desarrollo.....	14
2.1.3	Plasticidad de la mielinización del SNC y SNP .....	16
2.2	El nervio sural (nSU) como modelo de estudio del SNP. ....	20
2.2.1	Alteraciones morfo-funcionales en los nervios sensoriales periféricos; efecto de la desmielinización.....	21
2.3	Efecto de la conducta social en el desarrollo postnatal de los mamíferos.....	23
2.2.1	Participación de los cuidados maternos en el desarrollo postnatal de la rata. ....	24
2.2.2	Efecto de la interacción entre compañeros de camada sobre el desarrollo postnatal de la rata. ....	26
3.	Justificación .....	31
4.	Hipótesis.....	33
6.	Objetivos.....	33
6.1	Objetivo General.....	33
6.2	Objetivos específicos.....	33
7.	Metodología.....	34
7.1	Procedimientos generales .....	34
7.2	Diseño experimental.....	34
7.3	Peso y consumo de leche.....	35
7.4	Evaluación de la conducta materna.....	36
7.5	Registros electrofisiológicos del nervio sural .....	36
7.6	Histología del nervio sural .....	38
7.7	Análisis de datos .....	39
a)	Peso corporal y consumo de leche .....	39
b)	Conducta materna .....	39
c)	Registros electrofisiológicos.....	39
d)	Análisis Histológico.....	40
8.	Resultados.....	42
8.1	Peso corporal, tasa de ganancia de peso (TGP) y consumo de leche.....	42
8.2	Conducta de lamido materno.....	47
8.3	Caracterización electrofisiológica del PAC registrado en el nSU. ....	48

8.54. Caracterización histológica de los axones del nSU.....	52
9. Discusión .....	57
10. Resumen de resultados .....	64
9. Conclusión general .....	64
10. Perspectivas .....	65
11. Referencias.....	66

## Índice de figuras

Figura 1. Periodos críticos en el desarrollo de la rata.....	13
Figura 2 Efecto de la desnutrición crónica en las características histológicas y electrofisiológicas del nSU de la rata. ....	15
Figura 3 Efecto del aislamiento social (IS) sobre la mielinización de la mPFC, comparado con los grupos de ambiente regular (RE) y ambiente enriquecido (EE). ...	19
Figura 4 Efecto de la desmielinización en la propagación del potencial en nervios sensitivos.....	22
Figura 5. Efectos intracamada en el desarrollo del equilibrio en el conejo. ....	30
Figura 6 Diseño experimental .....	35
Figura 7 Diseño experimental para el registro del Potencial de Acción Compuesto del nSU. ....	38
Figura 8 Ejemplo del análisis de pseudo-deconvolución para la distribución de la frecuencia porcentual del grosor de la mielina. ....	41
Figura 9 Graficas de dispersión del peso corporal y del consumo de leche de ratas criadas en los diferentes grupos de estudio. ....	43
Figura 10 Peso corporal de las ratas en los diferentes grupos de estudio.....	45
Figura 11 Gráficas de dispersión correspondientes a los valores del peso corporal de las crías naturales y adoptadas en las camadas con 6P, 9P y 12P obtenidas en las edades juveniles pre-destete DPN9 (A) y DPN21 (B) o post-destete DPN40 (C) y DPN60 (D). ....	46
Figura 12. Valores promedio (E.E) del lamido materno en los DPN8 y DPN9.....	47
Figura 13 Relación entre la intensidad del estímulo y la amplitud del PAC evocado en el nSU de ratas de diferente tamaño de camada. ....	50
Figura 14 Potenciales de acción compuesto (PAC's) del nSU de ratas de camadas de distinto tamaño. ....	51
Figura 15. Correlación entre el peso corporal y el área del PAC .....	52

Figura 16. Microfotografías representativas (100x) del nSU de ratas de 60 días de edad, criadas en camadas de distinto tamaño (análisis intra-camada).....	53
Figura 17. Microfotografías representativas del nSU que crecieron en las ratas pesadas (H) y ligeras (L) de los grupos (análisis intra-camada).....	54
Figura 18 Distribución de frecuencia del diámetro transversal y el grosor de mielina de los axones del nSU de ratas de los diferentes grupos de estudio. ....	55
Figura 19. Análisis del grosor de la mielina del nSU. ....	56
Figura 20 Curvas de aumento de peso de las camadas experimentales durante el periodo pre- y pos-destete .....	75
Tabla 1.....	50
Tabla 2 .....	83

## **I. Resumen**

En este estudio analizamos si las interacciones entre la madre-cría y entre compañeros de camada durante el periodo postnatal pre-destete tienen influencia sobre las características electrofisiológicas e histológicas del nervio sensorial sural (nSU) de la rata en el día postnatal 60. Para este propósito, formamos camadas de 1, 3, 6, 9 y 12 crías macho las cuales fueron rutinariamente pesadas hasta el día postnatal 60 (DPN60). En el DPN8 y 9 fue evaluada la conducta de lamido materno, y el consumo de leche fue medido en el DPN10. Los datos muestran que las camadas con 3 y 6 integrantes muestran un mayor consumo de leche y peso corporal en comparación con los grupos con una sola cría (1P) o los grupos de camadas grandes (9P) Y (12P). Adicionalmente, el análisis intra-camada mostró que las crías pesadas y ligeras de los grupos 9P y 12P mostraron diferencias significativas en el aumento corporal medido hasta la edad adulta (DPN60). El análisis del lamido materno mostró que las camadas numerosas (9P) y (12P) reciben significativamente menor número y duración de lamidos maternos en comparación con las camadas más pequeñas. En el DPN 60 la evaluación de las características electrofisiológicas e histológicas del nSU mostró que los grupos 6P y 9P tuvieron una mayor área del potencial de acción compuesto (PAC) así como una mayor proporción de axones con mayor grosor de mielina. En conjunto, en la presente tesis proponemos que la compleja interacción de factores sociales, sensoriales y nutricionales durante el periodo postnatal pre-destete tienen una influencia sobre el desarrollo de la mielinización y la capacidad de propagación de potenciales de acción en el nervio sensorial sural (nSU) de la rata macho, mostrando así una alta plasticidad en el desarrollo del SNP durante periodos críticos del desarrollo.



## II. Abstract

This study was aimed to analyze if mother and littermates relationships during the pre-weaning period modify morphological and functional characteristics of the rat's sural nerve (nSU) at the postnatal day 60 (PND60). In order to evaluate this effect, experimental groups composed of 1, 3, 6, 9, and 12 male pups were formed. Pups were routinely weighed during the pre-weaning and post-weaning postnatal period. At PND8 and 9, the maternal licking received by the pups was analyzed and in PND 10 milk intake was measured. Our results indicated that pups from litters with 3 or 6 pups (3P, 6P) showed greater milk consumption and body weight than pups without siblings or from 9P or 12P litters. In addition, heavy and light siblings raised in 9P or 12P litters showed statistically significant differences in body weight which were maintained until adulthood. On the other hand, pups from large litters receive less tactile stimulation through maternal licking (normalized for litter size) compared to small litters at PND 8 and 9. At PND60, nSU of rats from 6P and 9P litters showed greater compound action potential (CAP) area and amplitude and higher proportion of axons with large myelin thickness than nerves from rats of 1P, 3P, or 12P litters. nSU of heavy rats from 6P and 9P litters had greater CAP area and myelination than light rats from the same litters. Taken together, the data show that a complex interplay of sensory, social and nutritional factors derived from mother and littermate interactions during the pre-weaning period (critical window in develop of PNS) influence the myelination and propagation of action potentials in the nSU of rats lasting until adulthood.

## 1 Introducción

El desarrollo del Sistema Nervioso (SN) de especies altriciales se caracteriza por la presencia de períodos “sensibles o críticos” que ocurren en ventanas temporales, los cuales se presentan de manera secuencial durante el desarrollo pre- y postnatal de los animales. Tanto en los humanos como en la rata, se han caracterizado diversos períodos críticos de diversos procesos que ocurren en etapas tempranas del desarrollo del Sistema Nervioso Central (SNC), entre los que se encuentran: la macro- y micro-neurogénesis, gliogénesis, sinaptogénesis, así como la mielinización (ver más adelante; Rice y Barone 2000). Dichas ventanas de tiempo son altamente susceptibles a factores sociales y ambientales que son capaces de modificar el fenotipo morfológico, fisiológico y conductual de los individuos (Knudsen, 2004; Meredith, 2015).

Los principales factores que influyen en tales períodos críticos son los nutricionales, sensoriales y sociales, en los que la madre y los hermanos tienen una gran influencia (Fleming et al., 2002; Hudson et al., 2011; Lomanowska y Melo, 2016). La participación de la experiencia sensorial durante los periodos críticos ha sido ampliamente estudiada en el SNC (por ejemplo: en la caracterización de los periodos críticos de la maduración de la corteza visual; Hensh, 2005) pero hasta ahora ha sido menos explorado en el Sistema Nervioso Periférico (SNP).

La presencia de los períodos críticos en la propagación de la información sensorial cutánea ha sido relativamente poco explorada hasta ahora a pesar de su relevancia biológica, esto debido a que con la activación aferente se generan códigos de frecuencia de los potenciales de acción producidos en los receptores sensoriales los cuales son conducidos por los axones nerviosos contenidos en los nervios periféricos hacia el SNC lo que representa un paso determinante en el procesamiento de la experiencia sensorial, por lo tanto resulta de gran interés su abordaje para el estudio del desarrollo temprano del SNP.

Se ha mostrado que el contexto social y los estímulos sensoriales (táctiles) ejercen una gran influencia en el desarrollo del SNP de la rata. Interesantemente, la

supresión de los estímulos sociales en un modelo de crianza artificial, en el que las crías son aisladas de su madre y de sus compañeros de camada, induce una notoria reducción en la amplitud del Potencial de Acción Compuesto (PAC) y una disminución del grosor de la mielina de los axones del nervio sural (nSU). Estos cambios, empiezan a manifestarse en una ventana específica de tiempo (entre los DPN 7 y 14) del desarrollo postnatal de las crías y se mantienen hasta la adultez (Zempoalteca, et al, 2021, Segura, et al 2017). Lo anterior, genera consecuencias en la experiencia sensorial de los animales en desarrollo y en la edad adulta.

En la rata, el desarrollo temprano se caracteriza por estar dentro de un nicho complejo donde los factores sociales y los estímulos sensoriales (provenientes de la madre y de los compañeros de camada), aunados con factores nutricionales (cantidad y calidad de la leche materna) en conjunto modelan diversos fenotipos que se expresan a corto y largo plazo. En este sentido, la modificación del tamaño de la camada ha resultado un modelo simple, pero útil, para analizar la participación de los factores sociales y nutricionales, esto debido al distinto grado de competencia por recursos alimenticios (P.ej leche) y/o sitios térmicamente ventajosos (i.e durante el agrupamiento) que se presenta en camadas pequeñas (P. ej. 3 crías por camadas) y camadas grandes (P.ej. 12 crías por camada). Más aun, es posible evaluar el efecto de la privación postnatal de los estímulos provenientes de los compañeros de camada durante el desarrollo temprano (privación de hermanos). Sin embargo, hasta el momento no existen evidencias del efecto que tienen estas variables, en su conjunto, en el desarrollo del SNP de la rata

## **2 Antecedentes**

### **2.1. Periodos críticos del desarrollo del Sistema Nervioso**

Dentro de la etapa postnatal pre-destete de los mamíferos se presentan periodos críticos en el desarrollo del sistema nervioso, los cuales pueden ser modificados o alterados por factores genéticos, epigenéticos y/o ambientales. Un periodo crítico, se considera como el lapso durante el cual se expresa la máxima actividad de eventos específicos (P. ej., neurogénesis, gliogénesis, migración celular, diferenciación celular, etc.). Este concepto deriva de la observación de que los procesos organizacionales en los organismos pueden ser alterados con mayor facilidad durante los periodos de tiempo en los que la velocidad de desarrollo es mayor. En ese sentido, se puede considerar que el sistema nervioso tiende a desarrollarse en forma de “saltos y límites” más que por un proceso continuo y persistente, de tal manera que la presencia de condiciones específicas, internas o externas son necesarias para el desarrollo normal y, en ausencia de éstas, se presentan alteraciones irreversibles en el organismo (Morgane *et al.*, 1993; Erzurumlu y Gaspar., 2012).

El desarrollo del sistema nervioso de la rata se caracteriza por presentar diversos periodos críticos de desarrollo (Figura 1), los cuales se observan como ventanas de tiempo en los que ocurren de manera organizada y secuencial los procesos de neurogénesis, diferenciación, apoptosis y maduración, entre otros. En la rata durante el desarrollo embrionario, en donde se considera el día gestacional 0 DG0 como el día posterior a la cópula, se manifiestan una serie de eventos relacionados con la neurulación (formación del tubo neural) durante el periodo comprendido entre el (DG6 y el DG11, la cual se acompaña, en forma desfasada, de la gliogénesis temprana (DG8-DG14) y la microneurogénesis (DG14-DG20). Dado que los roedores mamíferos altriciales, el desarrollo está lejos de completarse al nacimiento, por ejemplo, la gliogénesis tardía (Tanto en el SNC como en el SNP) tiene su periodo crítico alrededor del día postnatal 2 (DPN2).

Cabe señalar que algunos periodos críticos del desarrollo del sistema nervioso se extienden varios días después del nacimiento, por ejemplo, la mielinización de los

axones del nervio ciático se inicia en el DG20 y su pico máximo ocurre alrededor del DPN14, mientras que en el cerebro termina en el DP21 (Rice y Barone., 2000; Morgane *et al.*, 1993; Erzurumlu y Gaspar., 2012).

Por otra parte, en el SNC la mielinización se extiende hasta largos periodos postnatales, por ejemplo, en el humano es conocido que la mielinización del cerebro (cuerpo calloso) tiene un pico máximo alrededor de los 3 años postnatales, mientras que en la rata la máxima expresión de la mielinización en el cerebro se da posterior al destete (DPN21) (Figura 1).

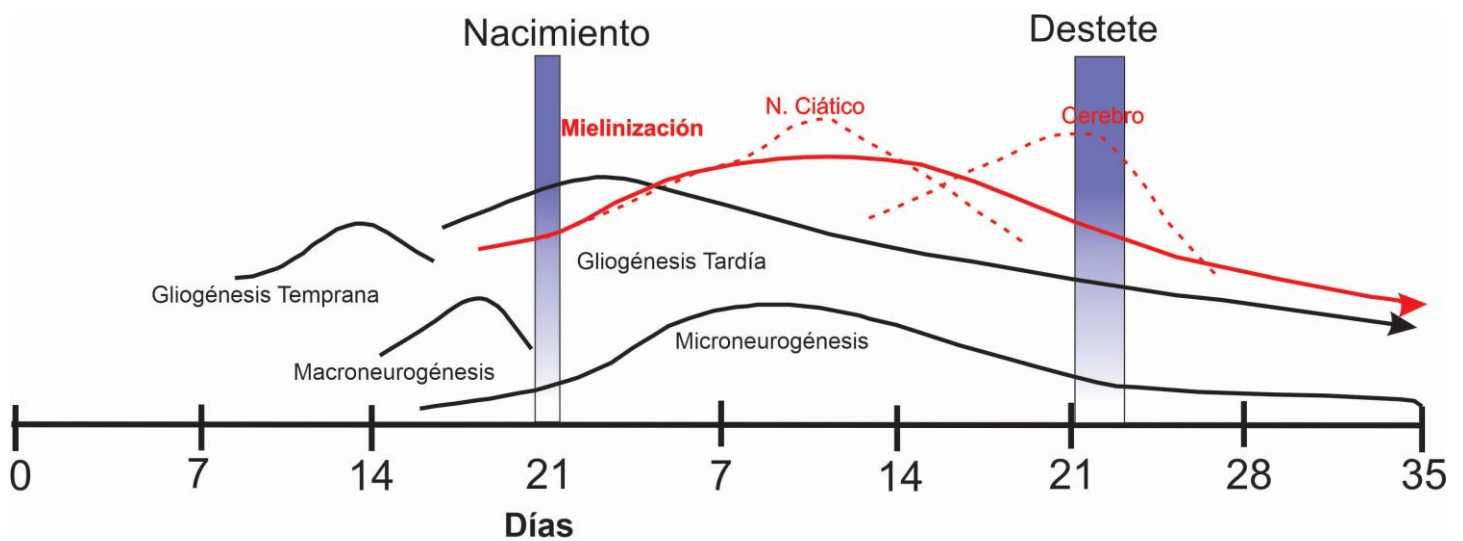


Figura 1. Periodos críticos en el desarrollo de la rata. Algunos ejemplos del proceso de desarrollo del sistema nervioso de la rata durante el periodo pre-natal (Gliogénesis temprana y macroneurogénesis) y postnatal (mielinización, gliogénesis tardía y microneurogénesis). Los mamíferos altriciales son caracterizados por presentar periodos críticos del desarrollo durante el periodo post-natal. (Modificado de Morgane *et al.*, 1993)

### 2.1.1 Plasticidad de los periodos críticos

En el contexto de los periodos críticos del desarrollo, resulta importante contemplar el término de plasticidad, el cual ha sido ampliamente utilizado para resaltar los cambios estructurales, funcionales y conductuales que ocurren en torno a la respuesta a una alteración o daño en los sistemas sensoriales durante el periodo postnatal temprano. Considerando que a menudo se muestran picos de máxima actividad poco después del nacimiento, los cuales declinan paulatinamente

con la edad, es factible suponer que existen diferentes etapas para inducir plasticidad de diversas experiencias sensoriales o sensori-motoras (Erzurumlu y Gaspar., 2012; Hübener y Bonhoeffer 2014). En este sentido, uno de los sistemas sensoriales más estudiados es el sistema visual en el cual se puede determinar el efecto que tiene la privación sensorial a través de la oclusión de un ojo (días o semanas, dependiendo de la expectativa de vida de cada especie) sobre la pérdida de la agudeza visual en el ojo ocluido (ambliopía). De manera interesante, el efecto de la experiencia sensorial ocurre solo durante los periodos críticos del desarrollo (Hensh., 2005).

Por otra parte, se conoce en el sistema somatosensorial de la rata que, al seccionar de manera unilateral las vibrisas mistaciales al nacimiento (pero no en la edad adulta) provoca una disminución significativa en la representación topográfica del área cortical motora contralateral de la vibrisa cortada, lo que a su vez genera patrones anormales de movimiento. Lo anterior evidencia como la relación anatomofuncional entre la corteza somatosensorial (S1) y la corteza motora en desarrollo (M1) está delimitada por la entrada sensorial durante ventanas temporales específicas (Huntley 1997).

### *2.1.2. Nutrición perinatal y periodos críticos del desarrollo*

La experiencia sensorial ha sido considerada como una importante fuente de estímulos que pueden influir en el modelado de una gran variedad de fenotipos neurofisiológicos y conductuales, poniendo en evidencia la plasticidad del sistema nervioso. Sin embargo, muchos otros factores externos también afectan el desarrollo temprano del SNC y SNP. Dentro de tales factores, la nutrición es considerado un factor relevante para la expresión de la plasticidad neuronal, dado que el neurodesarrollo es un proceso con alta demanda metabólica (el cerebro consume el 60% de la energía del recién nacido; Kuzawa, 2005). Por lo tanto, el desarrollo óptimo del SNC depende del adecuado aporte de nutrientes, tales como proteínas, carbohidratos, vitaminas y minerales con el fin de cumplir con las necesidades metabólicas y funcionales de los organismos. (Georgieff *et al.*, 2015).

En relación con lo anterior, se han caracterizado ampliamente los efectos de la desnutrición crónica o aguda sobre los animales en desarrollo (prenatal y/o postnatal). Durante tales períodos, se evidencian en mayor proporción los efectos del déficit alimenticio en una importante variedad de procesos ontogenéticos, en particular, en la mielinización de los axones de los nervios periféricos (Segura *et al.*, 2004; Quiroz *et al.*, 2011; Quiroz *et al.* 2013). Segura y colaboradores (2001) mostraron el efecto que ejerce la desnutrición y la malnutrición crónicas sobre los potenciales de acción compuesto (PAC) en el nSU de la rata en desarrollo (8,12, 16, 25, 30, 60 y 90 días postnatales) mostrando una reducción significativa en el componente A del PAC (Figura 2).

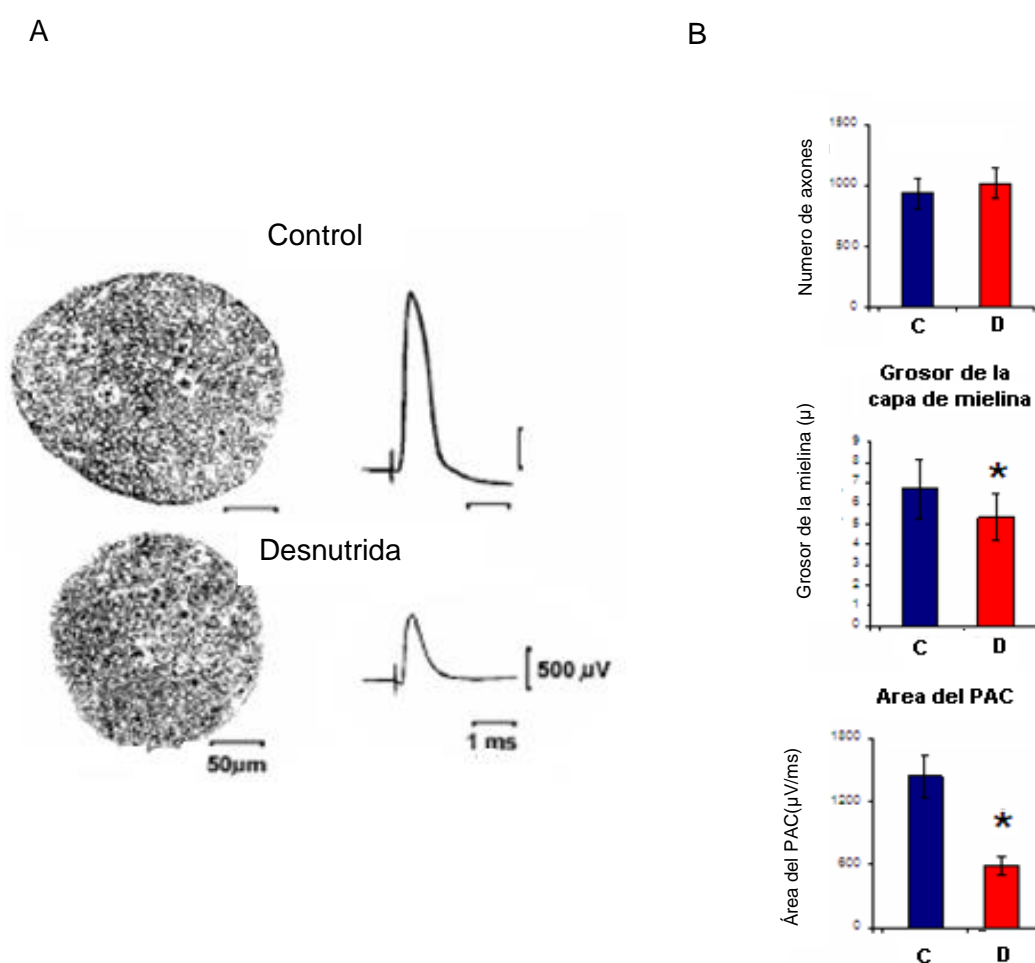


Figura 2 Efecto de la desnutrición crónica en las características histológicas y electrofisiológicas del nSU de la rata. A) microfotografías y trazos representativos del efecto de la desnutrición en las características histológicas y electrofisiológicas del nSU. B) Análisis cuantitativo del efecto de la desnutrición crónica sobre el grosor de la mielina y el área del PAC.

Así mismo, el análisis histológico de los nervios mostró una reducción significativa en el grosor de la vaina de mielina de los axones en animales desnutridos y malnutridos (Figura 2B), lo cual permitió a los autores explicar el déficit funcional del nSU como debida a una inadecuada mielinización de los axones durante el desarrollo postnatal de la rata desnutrida.

Además, Quiroz y colaboradores (2011, 2013) mostraron que la estimulación eléctrica del nSU de animales desnutridos de manera crónica, induce la activación de conglomerados de neuronas localizadas en el cuerno dorsal de la médula espinal, (que a su vez evocan potenciales del dorso de la médula espinal PDM) Sin embargo, estos potenciales fueron menores a los observados en animales bien alimentados. Quiroz y colaboradores también mostraron que la disminución de los PDM estaba directamente asociada con la reducción en la amplitud de la salva aferente, lo que a su vez coincide con la reducción del PAC observada por Segura y colaboradores (2001) en el nSU (ver párrafos previos) sugiriendo que se debe al déficit funcional del nSU ocasionado por la disminución en la mielinización.

En conjunto, se puede argumentar que los estímulos ambientales (nutricionales y sensoriales) durante los periodos críticos, son capaces de influir en la organización funcional del sistema nervioso en etapas tempranas de desarrollo (Hensch 2005). Es importante señalar que los períodos críticos de neurodesarrollo muestran un alto grado de versatilidad en el grado de expresión fenotípica. Asimismo, tales periodos tienen una implicación biológica, la cual es la oportunidad de favorecer la aparición de individuos con características fenotípicas diversas con un fondo genético común (Georgieff *et al.*, 2015)

### *2.1.3 Plasticidad de la mielinización del SNC y SNP*

Como se ha mencionado anteriormente, en la actualidad existen evidencias que muestran que el sistema nervioso es altamente “plástico” (versátil), siendo muy importantes los periodos críticos del desarrollo. De manera relativamente reciente, se ha descrito que el proceso de mielinización de los axones (Tanto en el SNC y en el SNP) es un proceso de gran plasticidad, que ocurre en diferentes etapas del desarrollo de los mamíferos. Lo anterior resulta relevante considerando que la mitad



del SNC es materia blanca, la cual está compuesta principalmente por fibras mielinizadas y que a su vez se relaciona con la funcionalidad de las vías nerviosas (p. ej: velocidad de conducción del impulso nervioso). Aunado a lo anterior, se conoce que la mielinización se lleva a cabo en diferentes lapsos de tiempo durante la vida de los mamíferos. Por ejemplo, la mielinización de los axones de la médula espinal, esenciales para la ejecución de funciones motoras, ocurre alrededor del nacimiento, mientras que los axones corticales (implicados en funciones ejecutivas) pueden ser mielinizados hasta en etapas adultas en humanos y en primates no humanos (Miller et al., 2012).

Estudios realizados mediante técnicas de imagenología, han mostrado el efecto que tiene el entrenamiento en el desarrollo de habilidades motoras y cognitivas así como en el aumento en la proporción de materia blanca dentro del SNC, lo cual se observa de manera sorprendente en lapsos de tiempo relativamente cortos. Por ejemplo, en el entrenamiento en la ejecución de malabares (una habilidad compleja visual y motora que involucra un trabajo bimanual) se conoce que después de 6 semanas de entrenamiento se observa un incremento en el volumen de la materia blanca cerebral, la cual puede mantenerse hasta 4 semanas después de haber terminado dicho entrenamiento (Scholz *et al.*, 2009). Resultados similares se han obtenido al estudiar otras tareas, tales como la habilidad lectora (Keller y Just, 2009) o en la adquisición del lenguaje (Schlegel et al., 2012). Por otra parte, se ha evaluado el efecto que tiene el aislamiento social temprano sobre los tractos mielinizados en el SNC de niños que fueron criados en orfanatos y posteriormente adoptados. En ese sentido, Eluvathingal y sus colaboradores (2006) mostraron mediante estudios de imagenología con resonancia magnética (mediante el método de tensor por difusión) que niños aislados socialmente (criados en un orfanato en Rumania durante 17-60 meses) presentan tractos del fascículo uncinado izquierdo más delgados y más desorganizados en comparación con niños que crecieron en un ambiente social normal.

Resulta pertinente considerar los fundamentos celulares que delimitan la plasticidad de la mielinización en los axones, en este sentido las evidencias apuntan a la participación de las células precursoras de oligodendrocitos (OPC –por sus siglas en inglés-), las cuales permanecen durante toda la vida y corresponden entre el 3-

10% del total de las células del SNC (Dawson et al., 2003). Las OPC son capaces de percibir la actividad neuronal a través de la expresión de receptores a una variedad amplia de neurotransmisores y a la formación de sinapsis funcionales entre sus procesos y axones desde etapas tempranas en el desarrollo hasta la edad adulta donde siguen respondiendo a la actividad neuronal. Por ejemplo, la estimulación eléctrica de alta frecuencia en neuronas corticospinales (333Hz) induce la proliferación y diferenciación de las OPC en la médula espinal de la rata adulta. (Almeida y Lyons, 2017; Li. et al., 2010). Un efecto similar fue observado en el SNP en donde la estimulación con alta frecuencia de los ganglios de la raíz dorsal provoca la proliferación de las células de Schwann a través de señales de  $Ca^{2+}$  (Stevens y Fields, 2000).

Mangin y colaboradores (2012) caracterizaron la regulación de las células NG2 (células que expresan el proteoglicano NG2 y que a menudo se consideran como sinónimo de OPC ver Nishiyama et al., 2009) en la corteza somatosensorial ante la ausencia de entradas sensoriales provocada mediante la privación de las vibrisas del ratón en desarrollo. Los autores encontraron que el desarrollo de la lámina IV de la corteza somatosensorial del ratón (un área altamente especializada en la percepción de los estímulos sensoriales procedentes de las vibrisas) comienza a establecerse estructuralmente a partir del DPN4. Así mismo, observaron un incremento significativo en el porcentaje (proliferación) de células NG2 en el área de la corteza del lado privado de vibrisas, en comparación con la del lado intacto, lo que les sugirió la importancia de la regulación dependiente de la experiencia sensorial en la acumulación de células NG2 como un mecanismo de control del número y posicionamiento de las fibras mielinizadas dentro de la corteza somatosensorial.

Por otra parte, Makinodan y colaboradores (2012) mostraron los efectos del estrés social por aislamiento post-destete sobre el desarrollo de la mielina en la corteza prefrontal (mPFC). Esos autores evidenciaron que ratones infantiles criados 4 semanas en aislamiento social tuvieron menor desempeño en las pruebas de interacción social y de memoria espacial que los animales criados en condiciones control o en ambientes enriquecidos. Además, los ratones aislados socialmente muestran una menor expresión del transcrito de la proteína básica de la mielina

(MBP) y la glucoproteína asociada a la mielina (MAG) (Figura 3 A-B). Asimismo, el análisis histológico de la mPFC indicó que los oligodendrocitos presentaban una morfología más sencilla (con procesos más cortos y menos ramificados) y un adelgazamiento de las vainas de mielina en los axones de la mPFC (Figura 3 D-F).

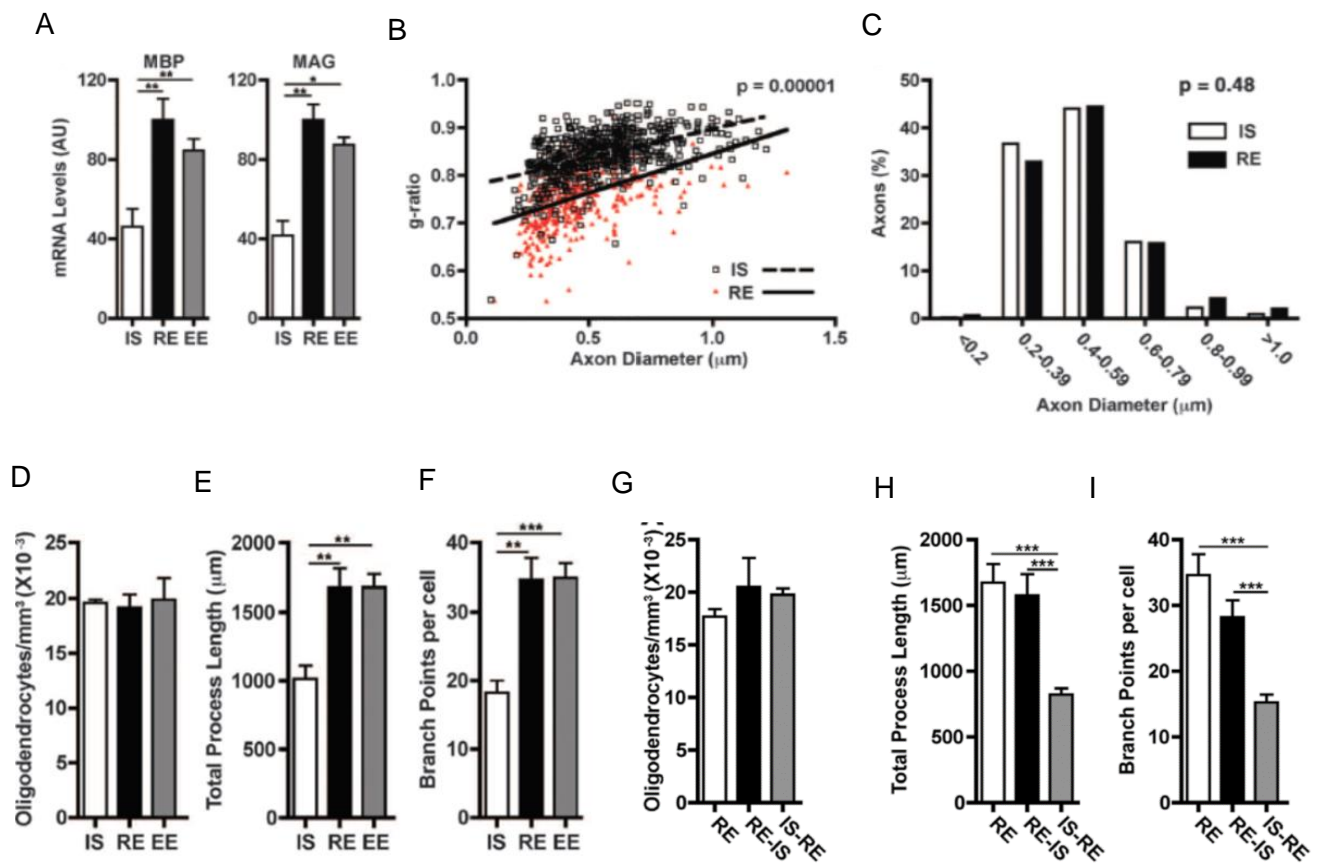


Figura 3 Efecto del aislamiento social (IS) sobre la mielinización de la mPFC, comparado con los grupos de ambiente regular (RE) y ambiente enriquecido (EE). A) efecto del aislamiento social sobre el nivel de expresión del mRNA de la proteína básica de la mielina (MBP) y el glucolípidio asociado a la mielina (MAG); B) Efecto del aislamiento social sobre el g-ratio en la mPFC (obsérvese que las crías aisladas tienen un mayor g-ratio lo que se interpreta como un menor grado de mielinización que el grupo ambiente regular; C) Distribución de frecuencia porcentual del diámetro axonal en los animales aislados socialmente; D-F) Densidad y características morfológicas de los oligodendrocitos en los grupos de estudio; G-I) Densidad y características morfológicas de los oligodendrocitos de animales aislados en una ventana de tiempo delimitada (IS-RE): aislados entre los 21-35DPN; Obsérvese que el efecto se da en una ventana de tiempo específica pero no si el aislamiento se da después del DPN35 (RE-IS). (Modificado de Makinodan et al., 2012)

Es conveniente señalar que los cambios observados en los ratones ocurrieron en un periodo crítico del desarrollo, ya que ratones que fueron aislados a partir del

DPN35 no presentaron anomalías en la mielina en, lo anterior sugiere que la mielinización en la mPFC es adaptativa a la experiencia social durante una ventana crítica de tiempo (Figura 3 G-I).

## **2.2 El nervio sural (nSU) como modelo de estudio del SNP.**

En el SNP el nSU es uno de los nervios periféricos especialmente usado en estudios clínicos y experimentales debido a su fácil accesibilidad. Además, la rama principal del nSU es prácticamente un nervio sensorial puro, que contiene aproximadamente 1000-1300 axones mielinizados (Segura et al., 2001), y pocos axones motores (aproximadamente 70 axones motores) (Liguori y Trojabodrg, 2004; Peyronnard y Charron 1982). En ratas, se encuentra inmediatamente debajo de la piel, viajando entre las dos cabezas del músculo gastrocnemio, corriendo en paralelo a la vena safena lateral. Estas fibras nerviosas sensoriales se unen en la región poplíteica para formar el nSU. En los humanos, la mayoría de los axones de este nervio ingresan a la médula espinal a través de la raíz dorsal S1, mientras que menos entran a través de las raíces dorsales S2 y L5. Axones que constituyen el nervio sural medial o el nervio sural lateral provienen de la fosa poplíteica. Finalmente, ambos nervios se unen y forman el propio nervio sural (Bilbao y Schmidt, 2015). Mientras que, en la rata las neuronas sensoriales se encuentran en el nivel L5 y en menor proporción en L4 y L6. Desde el punto de vista experimental, el nervio sural se ha empleado como modelo para el análisis de factores que inducen alteraciones estructurales y funcionales en los nervios periféricos (Peyronnard y Charron 1982).

En el nSU, al igual que en los demás nervios periféricos, las células de Schwann (CS) juegan un papel relevante en la estructura y función de los axones durante desarrollo y en la edad adulta. Por ejemplo, se ha destacado el papel de las mitocondrias de las CS durante la mielinización. En ese escenario, es conocido que esta interacción involucra la liberación de ATP de los axones, el flujo de  $Ca^{2+}$  de la mitocondria de la SC a través de la vía activada por los receptores purinérgicos (P2RY2) y el influjo de  $Ca^{2+}$  por el uniportador de calcio de la mitocondria juegan un papel importante en el desarrollo de la vaina de mielina (Iino et al., 2015). En humanos y ratas, se ha propuesto que el proceso de mielinización de los nervios,

incluido el nSU, difieren entre las regiones de los ganglios y los paranodos. Para ser eléctricamente excitable y generar potenciales de acción, la membrana del axón debe tener una cantidad adecuada de canales de Na<sup>+</sup> por unidad de área de membrana, distribuidos principalmente en los nodos de Ranvier (Nichols et al., 2012). Durante el periodo perinatal, los axones son delgados e inexcitables, con baja densidad de canales de Na<sup>+</sup>. Al final de las etapas gestacionales y predestete temprano, los axones se desarrollan y mielinizan y comienzan a generar y propagar potenciales de acción. La estructura discontinua de la vaina de mielina permite la propagación saltatoria de los potenciales de acción a lo largo de toda la longitud del axón y las uniones paranodal y axoglial participan en otras funciones, incluida: (1) la prevención de la dispersión de los canales de Na<sup>+</sup> nodales, además de la reducción de la capacitancia y aumento en la resistencia, (2) actuando como una barrera de difusión para las macromoléculas, y (3) siendo un sitio potencial para el intercambio de iones (Rosenbluth, 1987; Yamamoto *et al*, 1996).

Dado que la rama principal del nervio sural (como todos los nervios periféricos) contiene un número relativamente grande de axones (Segura et al., 2001), su activación produce una respuesta electrofisiológica conocida como potencial de acción compuesto (PAC), que corresponde a la suma no algebraica de todos los potenciales de acción individuales generados en la población de axones en los nervios (Waxman y Kocsis., 1995) Durante el desarrollo, los axones crecen aumentando su área transversal y se vuelven mielinizados y excitables, lo que da como resultado un aumento gradual en el tamaño del PAC hasta que alcanza la respuesta máxima alrededor del día postnatal 90 (Segura et al., 2001)

### *2.2.1 Alteraciones morfo-funcionales en los nervios sensoriales periféricos; efecto de la desmielinización.*

Estudios electrofisiológicos indican que la desmielinización periférica por neuropatías puede resultar en una disminución de la velocidad de conducción axonal, falta de transmisión de trenes de potenciales de acción de alta frecuencia o bloqueo de conducción (Mayer y Denny-Brown, 1964); tales alteraciones se limitan a la zona desmielinizada, mientras que, en las regiones proximal y distal del axón, la conducción es relativamente normal. Según el nivel de desmielinización, la propagación de los potenciales de acción puede sufrir varias perturbaciones,

incluyendo disminución de la velocidad de conducción, dispersión temporal (generando una pérdida de sincronía entre la actividad de los axones y los objetivos neuronales), bloqueo relacionado con la frecuencia (conducción confiable en trenes de baja frecuencia de potenciales de acción pero falla en trenes de alta frecuencia), propagación intermitente de potenciales de acción (transmisión probabilística de potenciales de acción), o bloqueo total de conducción (falta de conducción más allá de la zona desmielinizada) entre otros (Figura 3) (Waxman y Kocsis, 1995).

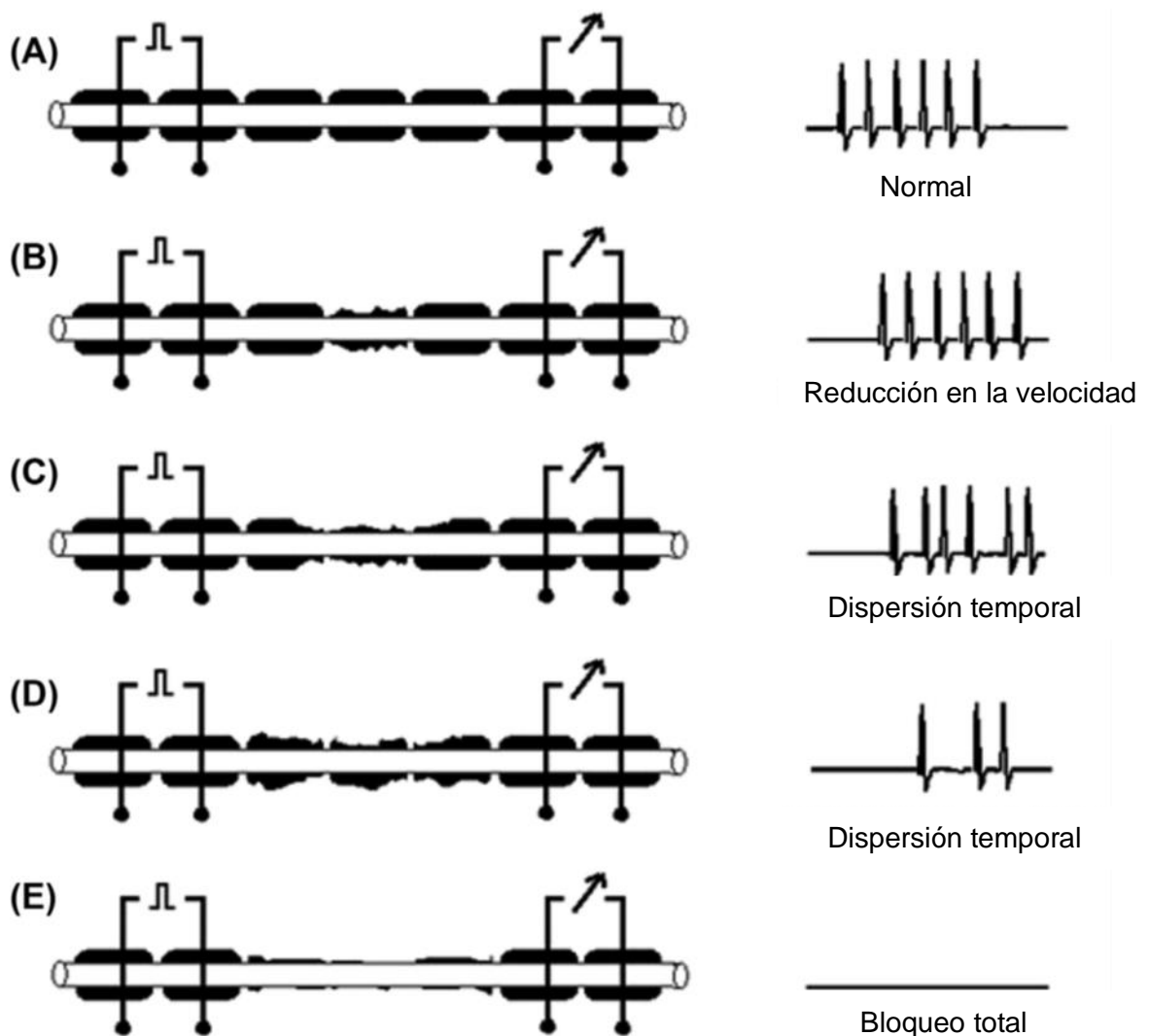


Figura 4 Efecto de la desmielinización en la propagación del potencial en nervios sensitivos. Representación esquemática de las alteraciones en la conducción axonal causadas por la desmielinización: En el lado izquierdo se representa el grado de desmielinización y la localización de los electrodos de registro y de estimulación; del lado derecho se representan las respuestas electrofisiológicas registradas en axones con diferente grado de mielinización. (Modificado de Melo et al., 2022)

Dado que el nSU contiene una población de axones sensoriales mielinizados, las perturbaciones en la propagación axonal de los potenciales de acción debidas a la relativa falta de mielina, sería un resultado esperado en consecuencia a neuropatías periféricas. Por lo tanto, cabría esperar que una proporción relativamente grande de axones en los nervios con neuropatía periférica presentaría bloqueo de conducción o propagación intermitente, lo que explicaría la disminución del área y aumento de la variabilidad del CAP observado en el nervio sural de animales desnutridos o diabéticos (Segura et al., 2004; Quiroz, et al., 2016).

Tales alteraciones en la propagación axonal de los potenciales de acción podrían, a su vez, interrumpir o desincronizar el sistema de códigos transmitidos desde los receptores sensoriales periféricos al SNC.

### **2.3 Efecto de la conducta social en el desarrollo postnatal de los mamíferos**

Previamente se ha descrito que la privación sensorial o social provoca efectos indeseados sobre el desarrollo neurobiológico de los vertebrados, particularmente en los periodos críticos del desarrollo y en la plasticidad de la mielinización (Figura 3). Sin embargo, una pregunta que surge a partir de tal propuesta es: ¿Qué tan flexible es la plasticidad de la mielinización de los axones? Y si esta ¿se puede reflejar en diferentes contextos de interacción social?

Con relación a lo anterior, se conoce que el periodo postnatal temprano pre-destete es crucial en la historia de la vida de los mamíferos, ya que en él se presenta una serie de procesos que influyen de manera preponderante en el desarrollo fisiológico de los mismos. Por ejemplo, el destete temprano (DPN14) en roedores aumenta la susceptibilidad al estrés y a las conductas tipo ansiosas evaluadas en el animal adulto. Kikusui y colaboradores (2007) mostraron que la expresión de cuatro isoformas de la proteína básica de mielina se encuentra disminuida en el cerebro de ratones macho adultos, destetados de manera prematura. Sin embargo, no encontraron efecto alguno en las hembras también destetadas prematuramente,

estas diferencias por el sexo de los animales pueden ser atribuidas al papel de las hormonas gonadales; por ejemplo, la respuesta neuroendócrina al estrés está parcialmente regulada por las hormonas sexuales de tal manera que la respuesta es diferente en hembras y en machos. Además, se conoce que ratones separados de su madre en edades tempranas muestran un incremento en la expresión de conductas tipo ansiosas y que el destete temprano altera el proceso de mielinización en la amígdala basolateral, la cual se encuentra involucrada con conductas tipo ansiosas en el ratón macho (Ono *et al.*, 2008).

Lo anterior permite sugerir que las experiencias sensoriales y el estrés social (p. ej., ausencia de la madre o de compañeros de camada) durante los periodos críticos de desarrollo temprano de la mayoría de los mamíferos, provocan alteraciones fisiológicas y conductuales en las crías, afectando particularmente al SNC y SNP, los que a su vez modelan a largo plazo los fenotipos conductuales y fisiológicos en gran parte de los mamíferos (Harlow *et al.*, 1965; Cavigelli *et al.*, 2010; Ragan *et al.*, 2012; Bautista *et al.*, 2009).

### *2.2.1 Participación de los cuidados maternos en el desarrollo postnatal de la rata.*

La influencia de la madre durante el periodo fetal es crítica, dado que cambios en esa etapa (tales como el estrés prenatal o la malnutrición) ejercen efectos fisiológicos a largo plazo. Durante el periodo postnatal pre-destete, específicamente durante las primeras 2 semanas de la etapa de lactancia en la rata, las crías dependen completamente de los cuidados proporcionados por la madre para su desarrollo y supervivencia (periodo de vida de mayor susceptibilidad de los periodos críticos). Lo que conlleva a la madre el proveer a las crías de una gran parte de los estímulos sociales y sensoriales, tales como: estímulos visuales, auditivos, olfativos y táctiles (P. ej.: a través del acicalamiento) y nutricionales, a través de la leche (Melo., 2015). Eventualmente, durante la segunda mitad del periodo postnatal pre-destete y a medida que las crías adquieren y desarrollan las habilidades motoras que les permiten desplazarse y tener mayor acceso al alimento sólido, la madre dedica menos tiempo en el cuidado de las crías, las que a su vez presentan un incremento en su independencia a la madre (Rosenblatt 1967; Rosenblatt *et al.* 1985).



Durante el periodo de mayor dependencia de las crías, la madre además de participar en la sobrevivencia de las mismas también participa modelando el fenotipo de su descendencia. De tal manera que aquellas madres que aportan estímulos apropiados a las crías (P. ej. lamido corporal) generan individuos con mayor capacidad de enfrentar adversidades ambientales y con menores alteraciones emocionales en el estadio adulto. En cambio, una madre proveedora de estímulos inadecuados tendrá una descendencia con menor desempeño cognitivo, con incapacidad de conductas afectivas y un aumento de conductas agonistas (P. ej. agresión) (González-Mariscal y Melo., 2017)

De acuerdo a lo anterior, existen aproximaciones experimentales para el estudio de la influencia del cuidado materno en el desarrollo de las crías: 1) Madres que, por variaciones naturales, exhiben un aumento (desempeño alto) o un decremento (desempeño bajo) de las conductas maternas de acicalamiento (LG-ABN- por sus siglas en inglés-) y 2) La modificación o eliminación completa de la estimulación materna a través de la crianza artificial (CA). Así, ratas adultas que fueron criadas por madres que sobre-expresan o sub-expresan las conductas maternas presentan diferencias en la morfología del giro dentado del hipocampo, en donde la complejidad dendrítica es menor. Así mismo, ratas criadas por madres con poca expresión de conducta materna presentan menor potenciación a largo plazo (LTP) en el hipocampo que ratas criadas normalmente. Cabe señalar que, en el caso de las crías que tuvieron poca estimulación materna, se manifiesta un incremento en la potenciación a largo plazo por la administración de corticosterona (100nM) o isoproterol (1 $\mu$ M), lo que sugiere un probable mejoramiento de la plasticidad hipocámpal durante periodos de estrés. En conjunto, lo anteriormente mencionado, indica que el cuidado materno influye en la expresión de la plasticidad neuronal del SNC (Bagot *et al.*, 2009)

Por otra parte, Segura y colaboradores (2014) describieron los efectos que provoca de la crianza artificial (CA) sobre el PAC y la estructura histológica de los axones contenidos en el nSU (predominantemente sensitivo), en comparación con nervios de ratas que crecieron con cuidados maternos y con hermanos (CM) o que crecieron sin cuidados maternos, pero en compañía de congéneres (CA-H). Los

resultados reportados por los autores muestran que los nSU de ratas CA presentan un PAC de menor área y sus axones presentan menor diámetro transversal y menor grosor de la capa de mielina que los nervios de los animales CM. También reportan que un grupo adicional de animales que crecieron sin la madre, pero en compañía de un congénere, no presentan diferencias significativas en el PAC ni en la mielina de los axones del nSU, con respecto a los animales con cuidados maternos y con hermanos. A partir de sus observaciones, los autores concluyen que la interacción social con congéneres (mediante la estimulación táctil) es un factor relevante para el adecuado desarrollo postnatal de las características electrofisiológicas y estructurales de los axones que conforman a los nervios sensoriales periféricos. Resulta importante mencionar que tales efectos inician en una ventana limitada de desarrollo, entre los DPN7 y DPN14 y se mantienen a todo lo largo de la vida de las ratas con CA (Segura et al., 2014; Zempoalteca *et al.*, 2017). De manera conjunta, los estudios de aislamiento social y mielinización llevan a la idea de que la actividad neuronal, asociada a estímulos sensoriales y sociales, modula el proceso de mielinización de los axones periféricos, lo que a la larga podría provocar alteraciones en la conectividad de las fibras aferentes con las neuronas espinales y posiblemente con circuitos neuronales cerebrales, lo cual apoya la idea de considerar a la mielinización como una forma de plasticidad funcional.

### *2.2.2 Efecto de la interacción entre compañeros de camada sobre el desarrollo postnatal de la rata.*

En párrafos previos, se describió la importancia de los estímulos sensoriales y sociales durante la vida temprana (específicamente de los cuidados maternos) de las crías de la rata. Considerando que la interacción con los hermanos provee una importante fuente de estimulación sensorial y social durante el desarrollo de las crías, resulta importante el considerarla como un factor que, junto con el de la madre, podría desempeñar una influencia relevante en las características neurobiológicas que determinan la conducta de los mamíferos, particularmente de la rata. Sin embargo y en comparación con los efectos de los cuidados maternos, aún se cuenta con escasa evidencia acerca de este aspecto. Por lo tanto, es importante establecer modelos que permitan dilucidar el papel que tienen los

hermanos o compañeros de camada en los fenotipos fisiológicos y conductuales de los mamíferos.

En ese sentido, Li y colaboradores (2007) analizaron el efecto que provoca la privación postnatal de hermanos (PPH), pero no la de la madre, en el DPN1 o en el DPN7 sobre el aprendizaje espacial y la memoria de ratas adultas, con respecto a ratas que crecieron en condiciones normales (con hermanos y con la madre). Los resultados muestran que a pesar de no existir diferencias en el peso corporal ni en el desarrollo físico de las crías, bajo las dos condiciones señaladas, se presentaron diferencias en el desempeño de los animales en tareas de aprendizaje espacial (evaluado con el laberinto acuático de Morris). Las ratas hembra adultas, con PPH desde el DPN1, presentaron buen desempeño en las pruebas de aprendizaje espacial, mientras que, las ratas con PPH a partir del DPN7 presentaron un deterioro en el desempeño de aprendizaje. Sin embargo, la privación postnatal de hermanos no tuvo efecto alguno en las ratas macho adultas. Lo anterior permite indicar que los efectos de la interacción entre hermanos son dependientes de la edad de la separación con los hermanos y del sexo de las crías.

Actualmente, existe una serie de evidencias que ilustran el papel de la relación entre hermanos sobre el desarrollo de las propiedades neurobiológicas que definen la individualidad de los mamíferos (rata, ratón, conejo y gato doméstico). De esta manera, en condiciones controladas o semi-naturales la relación entre hermanos (por ej.: el acceso a la leche materna o a posiciones térmicamente ventajosas) contribuye en la adquisición de rasgos individuales que definen los patrones conductuales a corto y largo plazo (Rödel *et al.*, 2008; Hudson *et al.*, 2011; Reyes-Meza *et al.*, 2011).

Con relación a lo anterior, diversos estudios han evidenciado la influencia de los compañeros de camada en el desarrollo de diferencias morfométricas, fisiológicas y conductuales, ya sea entre los individuos que conforman una camada (diferencias intra-camada) o bien entre camadas (diferencias inter-camadas). Por ejemplo, Carvalho y colaboradores (2016) muestran los efectos que produce la manipulación del tamaño de la camada en conducta de juego social de la rata adolescente. Estos autores observan que la disminución del tamaño de la camada (3 crías por camada)

afecta no solo la tasa de aumento de peso durante el periodo pre-destete sino también a algunos parámetros del desarrollo físico y neurobiológico. Señalan además que la reducción del tamaño de la camada aumenta la estimulación materna recibida por las crías, pero induce una reducción en las conductas de juego desplegadas.

Por otra parte, Viana y cols. (2013) mostraron el efecto de la edad y del tamaño de la camada sobre los cambios morfológicos de la microglía en el giro dentado de la rata. Estos autores observan un incremento en la cantidad de microglía (Células con actividad inmunitaria dentro del SNC) en el giro dentado de ratas criadas en camadas grandes (12 crías) de 23 meses de edad en comparación con ratas jóvenes (4 meses) y con camadas pequeñas (6 crías). Aunado a lo anterior, las ratas de camadas grandes mostraron diferencias morfológicas en la microglía (ensanchamiento del diámetro de la base de la ramificación y alargamiento del soma) lo que se puede asociar a perfiles inflamatorios en el SNC. Desde el punto de vista conductual, las ratas jóvenes de camadas pequeñas mostraron mejor desempeño en la prueba de memoria de reconocimiento de objetos que todos los demás grupos. Esto último, podría indicar que las condiciones sociales postnatales (número de compañeros de camada) influye en la expresión de las características neurobiológicas (morfología de la microglía) y conductuales de la rata adulta.

Desde el punto de vista endocrinológico, existen evidencias que muestran que en dos edades postnatales; pre-destete (DPN 17) y post-destete (DPN 33), los niveles de corticosterona en las crías están relacionados con el tamaño de la camada y con el peso corporal. En la edad pre-destete (DPN17), los animales de camadas grandes (14 crías) presentan menor cantidad de corticosterona en comparación con animales que crecieron en camadas menos numerosas (3 crías). Ello probablemente debido a un retardeo en la maduración del eje Hipófisis-Pituitaria-Glándulas Adrenales (HPA) en los animales de camadas grandes, mientras que en la edad pos-destete (DPN33) las crías presentaron mayor concentración de corticosterona en el suero, esto puede ser explicado debido a que el aumento en la competencia por la leche y los recursos maternos en conjunto con un pobre estado nutricional durante el periodo postnatal pre-destete puede representar un ambiente estresante en el desarrollo comparado con las crías que crecen en

camadas pequeñas. Lo anterior indica que el contexto social (número de individuos en las camadas) ejerce un rol importante para el desarrollo endocrino de las crías de la rata (Rödel et al., 2010).

Considerando las diferencias morfométricas que se presentan entre individuos, se ha señalado que durante el periodo pre-destete las crías de mayor peso al nacimiento (con peso corporal mayor a una desviación estándar del peso promedio de la camada) son aquellos que consumen más leche, tienen mayor porcentaje de conversión de leche en biomasa, mayor temperatura corporal y menor comportamiento proactivo que sus compañeros de camada más ligeros (Rödel et al., 2008; Bautista et al., 2009).

Resulta importante mencionar que el peso corporal y la posición dentro del apiñamiento de individuos en la camada, se han considerado como predictores a largo plazo del desarrollo de las crías. Por ejemplo, Reyes-Meza y colaboradores (2011) estudiaron en gazapos la relación existente entre la posición dentro de la camada (en la competencia por los sitios térmicamente ventajosos), la concentración de corticosterona y las conductas proactivas o reactivas en respuesta a estímulos estresantes (depredadores) evaluadas a largo plazo. Los autores muestran que, durante el apiñamiento, los gazapos que se localizan en las posiciones periféricas (de menor temperatura) adquieren menor peso, tienen menor conversión de leche en biomasa y manifiestan en la edad adulta menor conducta proactiva ante la presencia de estímulos aversivos.

También existen ejemplos del efecto de las diferencias intra-camada sobre el peso corporal con relación a la maduración de patrones locomotores. Muciño y colaboradores en 2009, al estudiar el desarrollo postnatal del equilibrio corporal en crías pesadas y ligeras del conejo, mostraron que las crías de mayor peso al nacer también poseen mayor capacidad de mantener el equilibrio corporal. La capacidad de las crías para mantener el equilibrio fue determinada por los investigadores al colocar a cada una de ellas en una rampa inclinada ( $30^{\circ}$ ) durante dos minutos, cada día durante una semana. En esta prueba se observó que las crías mostraron día a día una mejoría en su capacidad para mantener el equilibrio a medida que adquirían

mayor edad, siendo las crías más pesadas las que podían mantener el equilibrio en edades más tempranas que sus compañeros más ligeros (Figura 5).

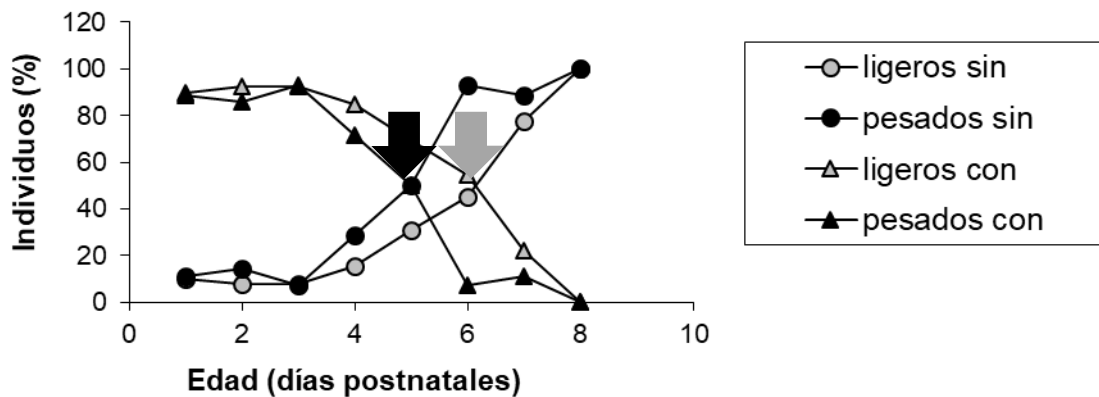


Figura 5. Efectos intracamada en el desarrollo del equilibrio en el conejo. La grafica muestra el porcentaje de crías que son capaces de mantener el equilibrio sobre una rampa inclinada, la prueba evalúa el número de rodadas de los animales (obsérvese que en el día donde se entrecruza el porcentaje de crías con y sin rodadas es considerada como el día en que adquieren la capacidad de mantener el equilibrio) Las crías pesadas (flecha negra) adquieren el equilibrio un día antes en comparación con las crías ligeras (flecha gris)

Tal habilidad de las crías pesadas fue interpretada por los autores, como una manifestación de que los mecanismos de control del equilibrio se organizan más tempranamente en las crías más pesadas que en las crías ligeras.

En la rata de laboratorio, existen evidencias que muestran diferencias individuales con relación al desarrollo intra-camada y entre-camadas. Considerando las diferencias en el peso corporal durante el desarrollo de las ratas, diversos estudios han mostrado, de manera consistente, una relación negativa entre el tamaño de la camada y el peso corporal que adquieren los animales durante el desarrollo. Aunado a lo anterior y con respecto a la conducta de las crías en el agrupamiento, en comparación con las crías más pesadas, los animales más ligeros tienen mayor porcentaje de actividad y mayor comportamiento dirigido hacia los sitios térmicamente ventajosos, pero mantienen una posición periférica durante el agrupamiento de la camada y consecuentemente, menor temperatura corporal (Bautista et al., 2009).

### 3. Justificación

Dentro del desarrollo neurobiológico de los mamíferos existen periodos de especial vulnerabilidad hacia factores ambientales, tales como la nutrición o la experiencia sensorial. Se ha mostrado que las experiencias sensoriales dentro de los periodos críticos del desarrollo participan refinando circuitos neuronales, por lo que se considera que el sistema nervioso es un sistema “plástico” que se moldea a partir de la experiencia (sobre todo en el periodo perinatal). En adición a lo anterior, se acepta en la actualidad el papel que tiene la mielinización en la plasticidad funcional del sistema nervioso. Así, por ejemplo, en el SNP se sabe que la desnutrición crónica disminuye e incrementa la variabilidad de la amplitud del componente A del PAC en el nSU de la rata en desarrollo, y que dichas alteraciones funcionales se encuentran asociadas a cambios en el grosor de la vaina de mielina de los axones (Segura *et al.*, 2001). Cabe señalar que el nSU es un nervio periférico que lleva información predominantemente sensitiva (originada en receptores cutáneos de la extremidad posterior de los animales) hacia la médula espinal, donde es integrada y enviada de manera ascendente al tálamo y posteriormente a la corteza somatosensorial).

En mamíferos altriciales como la rata el grado de inmadurez al nacimiento condiciona que hace que la relación madre-cría y entre los compañeros de camada sea indispensable para la sobrevivencia, proveyendo a su vez una buena fuente de estimulación sensorial en periodos críticos del desarrollo. Existe una extensa cantidad de evidencias que muestran los efectos conductuales, fisiológicos y neuroanatómicos de la relación madre-cría. Sin embargo, la mayoría de los estudios se enfocan al análisis de los efectos de la relación madre-cría sobre diversas estructuras del encéfalo (González- Mariscal y Melo, 2017) y en considerable menor medida sobre la médula espinal y el sistema nervioso periférico (Segura *et al.*, 2014; Zempoalteca *et al.*, 2018). Por otro lado, los compañeros de camada son una importante fuente de estimulación sensorial y de competencia intra-camada por los recursos (P. ej.: la leche o los sitios térmicamente ventajosos), los cuales moldean las características morfológicas, fisiológicas y conductuales que permanecen a largo plazo, contribuyendo a la generación de las características

individuales de las crías. Hasta ahora pocos estudios consideran a la influencia de los compañeros de camada como una importante fuente de variación individual y, virtualmente, no existen estudios que lo relacionen con las características electrofisiológicas e histológicas del sistema nervioso periférico.

Estudios recientes han mostrado que la ausencia de contacto físico entre los congéneres de las camadas y con las madres en un modelo de crianza artificial induce alteraciones de importancia en la mielinización y propagación del PAC en el nSU y que tales cambios pueden ser parcialmente revertidos por el contacto con un congénere o por la estimulación mecánica de la piel de la cría aislada. Sin embargo, en esos estudios no se establece el posible papel de la estimulación sensorial proporcionada por la madre sobre las alteraciones observadas. Así mismo, no existen evidencias experimentales que muestren como la interacción entre el número de hermanos en la camada o la ausencia de éstos, pero con la presencia de la madre, influye en la mielinización y la respuesta electrofisiológica de nervios cutáneos periféricos de las crías de camadas con distinto número de hermanos, pero con la presencia de la madre.



## **4. Hipótesis**

La interacción madre-cría y entre compañeros de camada, a través de estímulos sociales y sensoriales, influye en las características morfométricas corporales (ganancia de peso y talla corporal) y en las propiedades estructurales y electrofisiológicas del nervio sural de la rata macho joven (DPN 60).

## **6. Objetivos**

### **6.1 Objetivo General**

Determinar las características histológicas y electrofisiológicas del nervio sural de crías de la rata macho provenientes de camadas de distinto tamaño, o sin hermanos, en presencia de la madre.

### **6.2 Objetivos específicos**

- Determinar los parámetros morfométricos corporales (peso y tasa de ganancia de peso) en crías macho de camadas de 1, 3, 6, 9 y 12 miembros (análisis entre-camada) e identificar a los miembros por su peso, más pesados y ligeros, dentro de las camadas de 6,9 y 12 miembros (análisis intra-camada)
- Evaluar el efecto de la conformación artificial (crías naturales y adoptadas de una madre con parto síncrono) de las camadas experimentales con 6, 9 y 12 crías.
- Determinar el consumo de leche de las crías en las distintas camadas y entre camadas en el DPN10.
- Evaluar el cuidado materno (lamido corporal) recibido por las crías de las camadas experimentales.
- Registrar y evaluar el potencial de acción compuesto (amplitud, duración y área) del nSU a los 60 días de edad postnatal en las crías de las distintas camadas.
- Determinar el diámetro de los axones y grosor de la mielina en el nSU de las crías en las distintas camadas.
- Establecer la relación de la interacción social entre la madre y los hermanos sobre la propagación del PAC y la mielinización del nSU de la rata.

## 7. Metodología.

### 7.1 Procedimientos generales

Ratas de la cepa *Wistar* criadas en el bioterio del CINVESTAV, IPN (UPEAL) fueron usadas para todos los experimentos realizados. Todos los animales fueron alojados en cajas acrílicas (50 x 30 x 20 cm) y fueron provistos por alimento comercial (Formulab 5008; LabDiet, Framingham, MA, USA) y agua *ad libitum*. Fueron mantenidos en un cuarto con temperatura y humedad constante ( $22 \pm 2$  °C y  $40 \pm 1\%$ , respectivamente) y con un ciclo de luz/oscuridad de 12h con las luces encendidas a las 8:00h.

Todos los procedimientos fueron realizados siguiendo la norma oficial mexicana (NOM-062-ZOO-1999) y la guía para el uso de cuidado y uso de animales de laboratorio (NIH-1996). Todos los protocolos fueron aprobados por el comité de bioética para el cuidado y manejo de animales de laboratorio del CINVESTAV (UPEAL protocolo 013-02)

### 7.2 Diseño experimental

Para la formación de las camadas experimentales se cruzaron ratas *Wistar* hembras primíparas en la fase de proestro tardío con machos sexualmente expertos, quince días después del apareamiento cada hembra fue alojada en una caja de acrílico individual (43 x 53 x 20 cm) hasta el día del parto (DPN0). En el DPN1, las crías fueron pesadas individualmente, sexadas y en el DPN2 fueron marcadas con un tatuaje (realizado mediante la aplicación subcutánea de tinta no toxica) para su identificación (durante las primeras 2 semanas postnatales y posteriormente con marcas de plumón indeleble en la cola). Una vez identificados los animales, se conformaron los siguientes grupos: 1) *Privación de hermanos* (1P;  $n= 9$  camadas): En el DPN1 las crías fueron pesadas y ajustadas a 9 crías para evitar la elevada mortalidad de las crías únicas, posteriormente, en el DPN5 fueron retirados los hermanos dejando solo a la cría macho más pesada al nacimiento (mayor de una desviación estándar con respecto a sus compañeros) (Figura 6). 2) *Camadas con hermanos* (3P, 6P, 9P y 12P): Camadas ajustadas a 3, 6, 9 y 12 machos ( $n= 5$  camadas por grupo) a partir del DPN2 (Figura 6). Las camadas

correspondientes a los grupos 6P, 9P y 12P fueron formadas a partir de nacimientos sincronizados de 2 o 3 hembras gestantes (“*cross-fostering*”) intercalando el macho más pesado y el más ligero de cada camada. Para distinguir a las crías adoptadas de las naturales, a las crías adoptadas se les colocó una marca tatuada en la piel de la pata derecha. Para el análisis intra-camada, la determinación de los animales más pesados y ligeros se tomaron en cuenta aquellas crías cuyo peso fuese por arriba de una desviación estándar o por debajo del peso promedio de las camadas durante el periodo postnatal pre-destete, respectivamente.

Cabe mencionar que durante el periodo pre-destete las crías muestran el mayor grado de interacción por lo tanto las crías de todos los grupos fueron destetadas en el DPN28 y posteriormente fueron alojadas en grupos de 3 animales, pertenecientes a la misma camada y mantenidos bajo similares condiciones ambientales, descritas previamente, en el mismo cuarto del bioterio hasta el DPN60 cuando fueron sacrificadas para la extracción del nSU y la realización de los registros electrofisiológicos y la preparación de los nervios para su examinación histológica (Figura 6). Los animales que no se emplearon en este estudio se asignaron a otros protocolos experimentales de nuestro laboratorio.

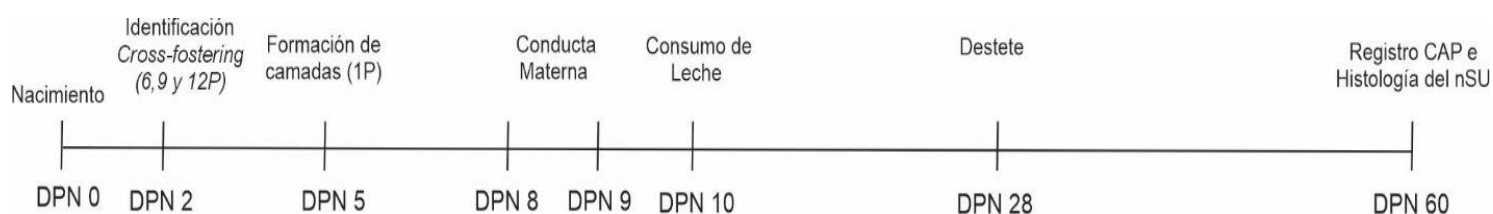


Figura 6 Diseño experimental

### 7.3 Peso y consumo de leche

Las crías de las distintas camadas fueron pesadas con una balanza digital cada tercer día durante el periodo pre-destete (DPN1, DPN3, DPN6, DPN9, DPN12, DPN15, DPN18, DPN21 y semanalmente a partir del DPN30 hasta el DPN60). En

el DPN10 se determinó el consumo de leche por cría, para lo cual se separaron a las crías de la madre durante tres horas, se les provocó la micción mediante el cepillado del área perigenital con un pincel delgado y posteriormente se pesaron a cada una de las crías. Subsecuentemente, las crías fueron regresadas con la madre y una vez finalizada la lactancia, fueron nuevamente retiradas de la madre para pesarlas con lo cual se determinó la diferencia de pesos, antes y después de la lactancia. Tal diferencia fue considerada como el consumo de leche de las crías.

#### **7.4 Evaluación de la conducta materna.**

La conducta de lamido materno ("*Licking*") es la principal fuente de estimulación sensorial de las madres hacia sus crías, debido a ello se decidió realizar el análisis del lamido recibido por las crías de cada una de las camadas los días 8 y 9 postnatales, en 3 sesiones de 20 min, con un horario de 9:00h, 13:00h y 17:00h. Diez minutos antes de iniciar la sesión, las crías fueron separadas de su madre y colocadas en una caja de acrílico a una distancia de 200 cm, para posteriormente ser regresadas al nido materno, en donde se realizaron las observaciones de la conducta materna. La frecuencia y duración del lamido fue registrado mediante el software Solomon Coder (Péter 2017).

#### **7.5 Registros electrofisiológicos del nervio sural**

Debido al gran número de animales experimentales pertenecientes a las camadas con 6P, 9P y 12P, en el DPN60 se seleccionaron solo a los animales pesados y ligeros para el registro electrofisiológico del PAC (el resto de las crías se emplearon en otros proyectos experimentales del laboratorio), así como a las crías de los grupos 1P y 3P. Para esto, las crías fueron anestesiadas con Ketamina (100 mg/kg) y Xilasina (8 mg/kg) por vía intraperitoneal. Posteriormente, se les disecó y extrajo un segmento (~1.5 cm) de la rama principal del nSU de la pata derecha de los animales, el cual fue dividido en dos secciones, una (~1 cm) para el registro electrofisiológico del PAC y la otra (~0.5 cm) para el análisis histológico (ver más adelante). La sección del nervio para el registro del PAC se colocó en una cámara de registro llena de solución de Krebs (NaCl 128 mM, KCl 3 mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.5

mM, MgSO<sub>4</sub> 1 mM, NaHCO<sub>3</sub> 21 mM, glucose 30 mM diluido en agua desionizada), mantenida a temperatura ambiente (23-25°C). Se seleccionó al nSU para el registro electrofisiológico debido a su accesibilidad para localizarlo (se localiza por debajo de la piel y por encima del músculo gastrocnemio de las extremidades posteriores de los animales), así como por la facilidad para diseccionarlo y manipularlo. El nSU es uno de los nervios periféricos más utilizado en estudios, tanto clínicos como experimentales, para estudiar diversas patologías del SNP (por ejemplo: neuropatías diabéticas) (Melo, et al 2022). Una vez extraído, se introdujo el extremo posterior del nervio a un electrodo de succión (con un alambre de plata clorurado en su interior), el cual se encontraba enrollado en su exterior por un alambre de plata cubierto con una capa de aislante (excepto en la punta). Ambos alambres fueron conectados a un estimulador (Digitimer Devices, DS2A) y este a un generador de pulsos (Digitimer Devices 3290). Las respuestas eléctricas del nSU fueron provocadas mediante la aplicación de pulsos cuadrados de corriente (0.5 ms de duración, a diferentes intensidades de estimulación, 1Hz). La magnitud de la corriente eléctrica del estímulo se determinó a partir de la caída de voltaje a través de una resistencia de 1000Ω situada en el camino de retorno a tierra. Por otra parte, la respuesta eléctrica del nSU fue registrada en el extremo opuesto del nervio, por medio de otro de electrodo de succión, teniendo como electrodo de referencia a un alambre de plata colocado en el baño de la preparación. Ambos electrodos fueron conectados a un amplificador de bajo ruido y alta ganancia (Grass instruments Mod. P11) y este a un osciloscopio y a una computadora personal para el análisis posterior de los registros electrofisiológicos (Figura 7) La resistencia del sello generado en la interfaz nervio/electrodo fue establecida en un rango de 8-10 mΩ (Stys et al., 1991). En caso de que la resistencia del sello fuese menor al rango establecido, el registro fue descartado. Por lo anterior, el número de registros exitosos fue de 9 nervios para las camadas 1P y 3P y 11 nervios para las camadas con 6P, 9P y 12P.

Los parámetros que se determinaron del PAC generado en el nSU fueron los siguientes: 1) umbral eléctrico (U), 2) amplitud al pico, 3) área, 4) anchura media, 5) latencia inicial (Li), 6) latencia al pico (Lp) y 7) longitud de los nervios (D). Subsecuentemente se determinó la velocidad de conducción de las fibras aferentes rápidas ( $V_m = Li/D$ ) y el promedio de la velocidad de conducción ( $L_p = Lp/D$ ).

Adicionalmente, se estableció la tasa de incremento de la amplitud del PAC debida al reclutamiento de potenciales individuales (determinada de la relación entre el área del potencial con respecto a la intensidad del estímulo, de 1 a 2 xU).

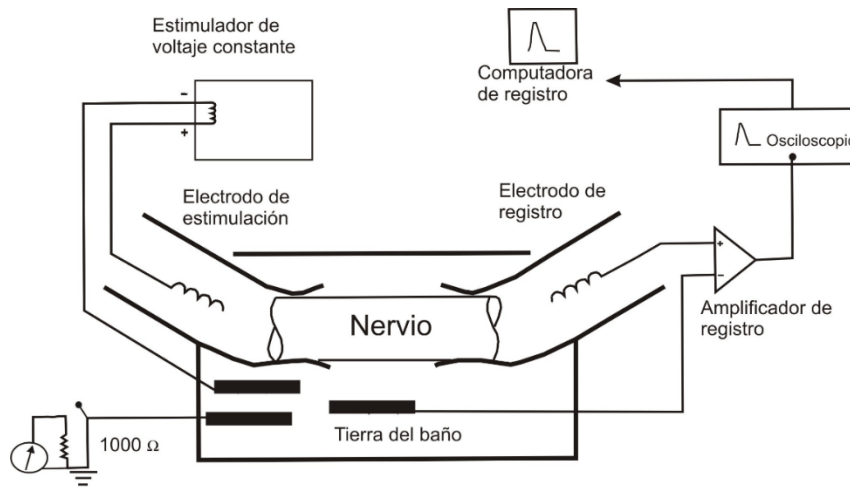


Figura 7 Diseño experimental para el registro del Potencial de Acción Compuesto del nSU.

## 7.6 Histología del nervio sural

Inmediatamente después de la disección, la sección remanente del nSU fue fijada por inmersión en solución de Karnosky (glutaldehído 1.25% / formaldehído 1.25% / ácido pícrico 0.03% / amortiguador de cacodilato 0.15 M, pH 7.4) por 2 h a 4°C. Posteriormente los tejidos fueron lavados con el mismo amortiguador y fijados con tetroxido de osmio 1% en amortiguador de cacodilato por 1.5 h a 4°C. Posteriormente ser deshidratados en una serie de soluciones de etanol al 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%,90%, 10 min cada uno, tres veces a 100% por 10 min y dos veces en oxido de propileno por 10 min. Cada muestra fue pre-incubada en resina de óxido de propileno/epoxi 1:1 por 24 h, resina de óxido de propileno / epoxi 1:2 por 24 h y finalmente incubada en resina epoxi Epon 812 a 60°C. Se realizaron secciones transversales de 0.5 $\mu$  de las muestras mediante el uso de un ultramicrotomo (Ultracut Reichert-Jung, 65 11 01) y teñidas con azul de toluidina y cubiertas con resina Entellan para su observación en microscopio de luz. Una sección fue elegida aleatoriamente y fotografiada mediante una cámara digital montada en un microscopio invertido (AxioCam MRc, Zeiss). Posteriormente, se midió el diámetro del nervio, así como el diámetro y área de los axones y el grosor

de la vaina de mielina de una muestra de 200 axones contenidos en cada uno de los nervios mediante el software Sigma Scan Pro (version 4.01, Systat Software).

## **7.7 Análisis de datos**

### *a) Peso corporal y consumo de leche*

Se calculó el promedio y el error estándar de la media ( $\pm$ EEM) del peso corporal de las crías provenientes de todos los grupos de animales. El incremento en la ganancia de peso corporal de cada una de las crías durante el periodo postnatal pre-destete y pos-destete hasta el DPN60 fue determinada y la pendiente promedio de las curvas del peso corporal de las crías fue considerada como la tasa de ganancia de peso (TGP). Las diferencias en el peso corporal, consumo de leche y la TGP fueron determinadas mediante una prueba ANOVA de una vía seguida de una prueba *post hoc* Bonferroni para comparaciones múltiples. Para establecer las diferencias intra-camada y entre las crías pesadas (P) y ligeras (L) de cada grupo de estudio se emplearon pruebas t de Student.

### *b) Conducta materna*

Para determinar las diferencias en la frecuencia y duración del lamido materno entre los grupos de camadas se utilizó la prueba de Kruskal-Wallis seguida de una prueba *post hoc* de Dunn para múltiples comparaciones. Adicionalmente y con la finalidad de establecer el grado de estimulación sensorial materna que recibió cada una de las crías por camada, se dividieron los valores promedio de la frecuencia y duración del lamido materno con respecto al número de crías de la camada.

### *c) Registros electrofisiológicos*

Se obtuvieron los valores promedio  $\pm$  EEM y las diferencias entre los valores de la amplitud y área del PAC registrado en el nSU de las crías de cada una de las camadas fueron establecidas con una prueba ANOVA de una vía seguida de una prueba *post hoc* Bonferroni para comparaciones múltiples. Se utilizaron pruebas ANOVA de dos vías, usando como factores el tamaño de la camada y el incremento gradual en el estímulo de activación de los axones más excitables. Debido a que

las ratas que crecieron en el grupo 6P mostraron una mayor amplitud en las curvas amplitud-intensidad, todas las pruebas *post hoc* para comparaciones múltiples se realizaron con respecto a ese grupo. En adición, se utilizaron pruebas t-Student no pareadas para determinar las diferencias entre los parámetros del PAC registrados en nSU de las crías pesadas y ligeras, en el análisis intra-camada

#### d) Análisis Histológico

Se obtuvieron los valores promedio  $\pm$  E.E del grosor de la mielina, así como del diámetro y área transversal de los axones de los nSU de las crías de las distintas camadas. Así mismo, para cada axón se calculó su valor de *tasa g* (“*g-ratio*”), el cual es la relación entre el diámetro axonal interno y el diámetro total externo (cabe señalar que los axones desmielinizados tienen un valor cercano a 1) y se calculó el valor promedio ( $\pm$  E.E) por camada. Las diferencias entre las distintas camadas se establecieron mediante la prueba de Kruskal-Wallis. La frecuencia porcentual del diámetro interno y el grosor de la mielina de todos los axones medidos fueron graficados y las diferencias intra-camada fueron establecidas por medio de pruebas de t de Student entre los pesados y los ligeros de cada grupo experimental.

Debido a que las distribuciones del grosor de la mielina de los diversos grupos no seguían una distribución binomial simple, sino una distribución bimodal (con dos picos; Figura 8A), decidimos emplear un análisis de pseudo-deconvolución bajo las siguientes premisas: en primera instancia, asumimos que la presencia de dos picos en la distribución de frecuencia porcentual del grosor de la mielina es una indicación de la probable presencia de dos subpoblaciones de axones, cada una de ellas siguiendo una distribución binomial, pero con diferente grosor de mielina (Subp A: axones con pequeño grosor de mielina y Subp B: axones con relativamente mayor grosor de mielina). En segunda instancia, consideramos que la distribución binomial de la Subp B se encuentra superpuesta sobre la fase de descenso de la distribución de la Sub A. Para el análisis de pseudo-deconvolución, se llevaron a cabo los siguientes supuestos, en primer lugar, asumimos que la fase de ascenso de la distribución de la Subp A es un reflejo especular de la fase de descenso, por lo que sería posible “construir” la fase de descenso al repetir los valores de la fase de ascenso del primer pico en la distribución total, pero en orden inverso, de tal modo que se obtuviese la probable distribución porcentual binomial de la primera



subpoblación de axones (Figura 8B). Ahora bien, el otro supuesto fue que la suma de los valores de la frecuencia porcentual en la distribución de la Subp A corresponde al porcentaje de axones con un grosor relativamente menor de mielina, mientras que el porcentaje de axones con un valor relativamente mayor en el grosor de la mielina (Subp B) se calculó restando el valor porcentual de la Subp A de la distribución de frecuencia porcentual total (Figura 8B).

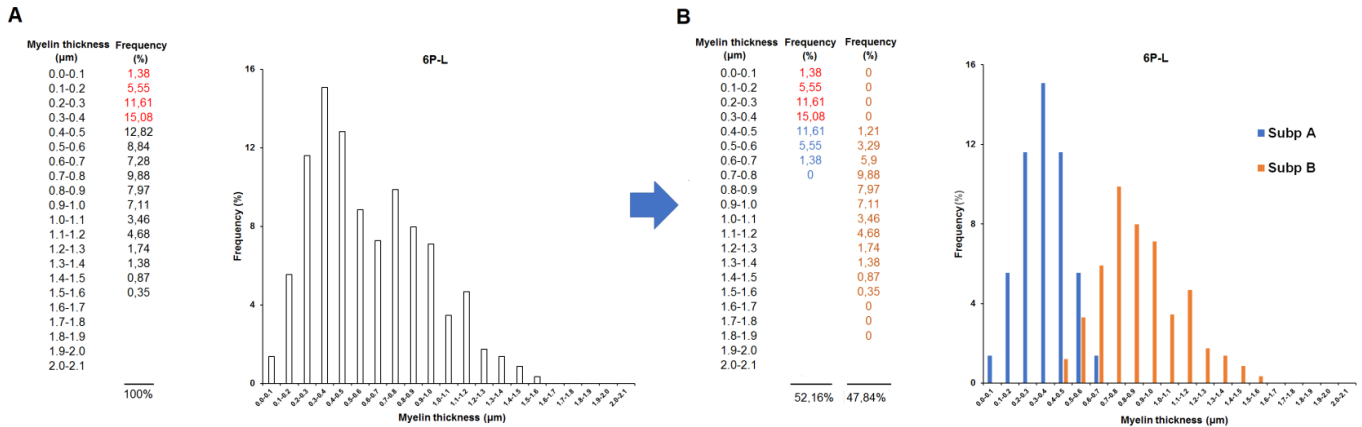


Figura 8 Ejemplo del análisis de pseudo-deconvolución para la distribución de la frecuencia porcentual del grosor de la mielina. A) Distribución cruda de los datos obtenidos por la medición directa del grosor de la mielina; B) Distribución de las Subp A y Subp B obtenidas después del análisis de deconvolución (ver texto)

## 8. Resultados

### 8.1 Peso corporal, tasa de ganancia de peso (TGP) y consumo de leche.

Durante el periodo pre-destete, todas las crías de los grupos experimentales mostraron una ganancia de peso que seguía una curva de forma sigmoidea (Figura 20 ANEXO 1). En el día postnatal 9, el análisis entre-camadas mostró que las crías que fueron criadas sin hermanos presentaron el menor peso de todas las camadas (Figura 9A), mientras que las crías naturales (símbolos blancos, Figura 8A) o adoptadas (símbolos negros, Figura 9) de las camadas con 3 y 6 miembros presentaron mayor peso corporal que aquellas de las camadas 9P o 12P (ANOVA de una vía;  $F(4, 52) = 187.3$ ,  $p < 0.001$ ). No se encontraron diferencias entre las crías naturales y las adoptadas en ningún grupo experimental.

El análisis entre-camadas mostró que el peso promedio de las distintas camadas, considerando de mayor a menor peso corporal fue:  $3p=6P>9P>12P>1P$ . Por otra parte, el análisis intra-camada muestra que las camadas de 9P y 12P contenían crías pesadas y ligeras (naturales y ligeras, Figura 9B), las cuales mantenían diferencias de peso significativas entre sí (9P:  $t = 2.793$ ,  $p = 0.022$  y 12P:  $t = 4.62$ ,  $p = 0.001$ ) y las camadas con 6P, las crías no presentaban diferencias de peso entre sí ( $t = 1.015$ ,  $p = 0.3399$ ) (Figura 9B)

Para establecer la posible relación entre el peso corporal y el consumo de leche de las crías de las distintas camadas bajo estudio, en el DPN 10 se midió el consumo de leche de cada cría. Los valores obtenidos entre-camadas mostraron que las crías de los grupos 3P y 6P ingirieron más leche por camada que las crías pertenecientes a los demás grupos (Figura 9C). De manera particular, el consumo de leche por parte de las crías sin hermanos fue considerablemente menor que el determinado para las crías de las otras camadas bajo estudio (Figura 9C), lo cual coincide con lo que se observa con el peso corporal de tales crías (ver párrafo previo).

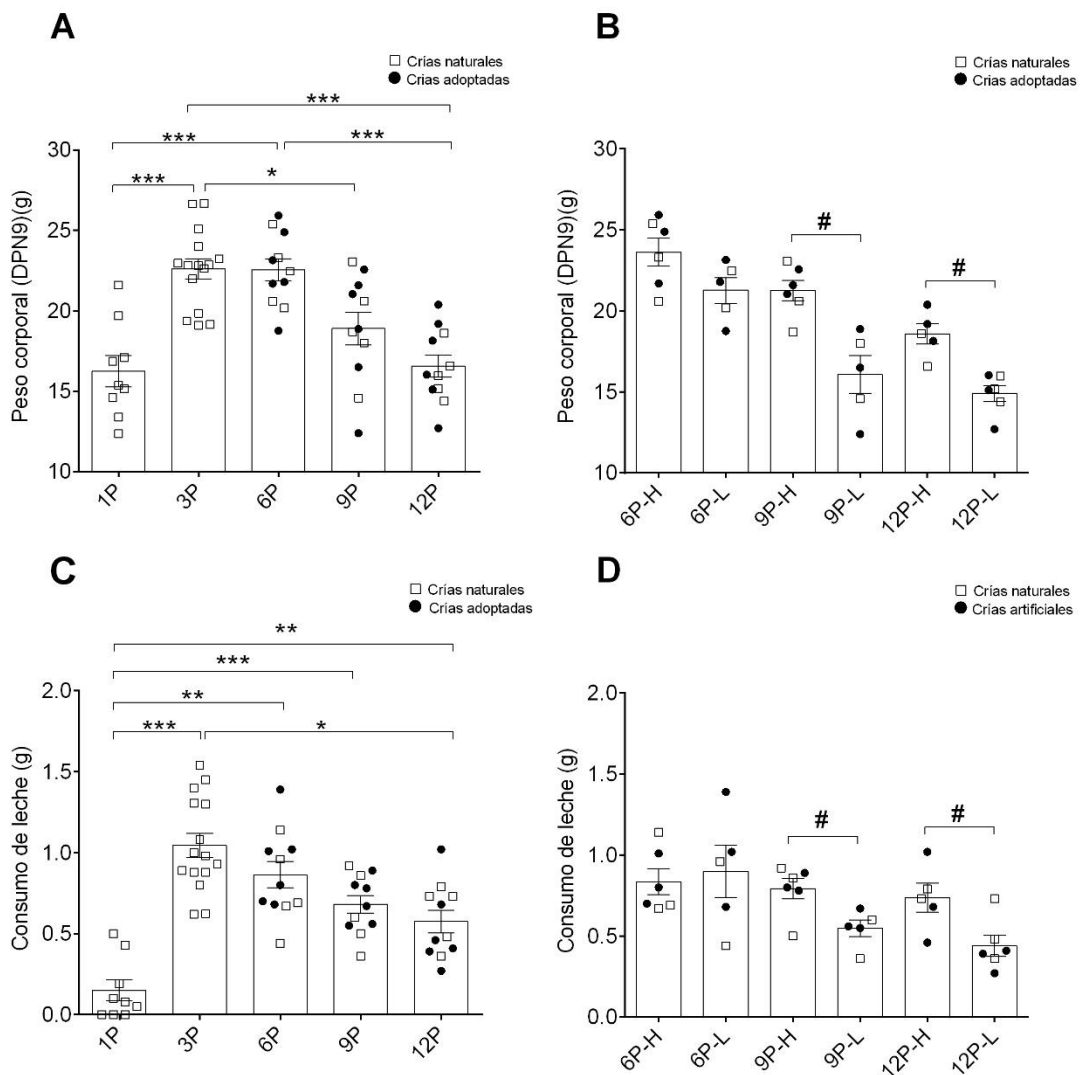


Figura 9 Graficas de dispersión del peso corporal y del consumo de leche de ratas criadas en los diferentes grupos de estudio. A) Valores entre-camada del peso corporal de las crías en el DPN9. B) Análisis intra-camada de las crías pesadas (H) y ligeras (L) de las camadas 6P, 9P y 12P en el DPN9. C) Consumo de leche entre-camadas en el DPN10. D) Consumo de leche intra-camada en el DPN10. Las barras indican el valor promedio  $\pm$  E.E, las crías naturales y adoptadas en los grupos 6P, 9P y 12P están indicadas con símbolos blancos y rellenos respectivamente. Las diferencias significativas fueron determinadas por ANOVA de una vía seguida la prueba post hoc Bonferroni (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ ). Las diferencias intra-camada fueron establecidas por medio de una t de Student no pareada (#,  $p < 0.01$ ). numero de crías por camada: Intra-camada: 1P,  $n=9$ ; 3P,  $n=15$ ; 6P,  $n=11$ ; 9P,  $n=11$ ; 12P,  $n=11$ ; Intra-camada: 6P-H,  $n=6$ ; 6P-L,  $n=5$ ; 9P-H,  $n=6$ ; 9P-L,  $n=5$ ; 12P-H,  $n=5$ ; 12P-L,  $n=6$ ).

Así mismo, el consumo de leche de las crías de las camadas 3P fue significativamente mayor que el de las camadas 1P, 6P, 9P y 12P (ANOVA de una vía (4, 52) = 21.22,  $p < 0.001$ ) (Figura 9C), lo que coincide con el comportamiento observado en el peso corporal. El análisis inter-camada muestra diferencias

significativas en la ingesta de leche determinada para las crías pesadas y ligeras (naturales y adoptadas) de las camadas 9P (t de student no pareada  $t = 3.017$ ,  $p = 0.014$ ) y 12P (t de student no pareada  $t = 2.670$ ,  $p = 0.029$ ) pero no en las camadas con 6 compañeros de camada (6P) (t de student no pareada  $t = 0.035$ ,  $p = 0.738$ ) (Figura 9D).

Por otra parte, el peso corporal promedio que presentaron las ratas de las distintas camadas a los DPN 21, 40 y 60 se ilustran en las gráficas de la Figura 9A-F. De manera similar a lo determinado en el DPN9, en los días DPN21 y DPN60, las ratas pertenecientes a las camadas con 3 y 6 compañeros presentaron mayor peso corporal que las ratas de los grupos 1P, 9P y 12P (ANOVA de una vía  $F(4, 52) = 17.81$ ,  $p < 0.0001$ ) (Figura 10A), mientras que en el DPN40 solo las ratas del grupo 3P tuvieron mayor peso corporal que el de las demás camadas (ANOVA una vía:  $F(4, 52) = 20.81$ ,  $p = 0.0001$ ) (Figura 10C).

El análisis del peso corporal entre-camadas mostró que el peso promedio de las crías, en los distintos días postnatales analizados, siguieron las secuencias de mayor a menor peso, que se indican en la Tabla 1.

Tabla 1. Secuencias de las camadas de crías de mayor a menor peso corporal promedio

DPN9:	3P ~ 6P > 9P > 12P > 1P
DPN21:	3P > 6P > 9P > 12P > 1P
DPN40:	3P > 6P > 9P > 1P > 12P
DPN60:	3P > 6P > 9P > 1P > 12P

Como se puede observar en la Tabla 1, las secuencias del peso corporal promedio de los miembros de las distintas camadas son semejantes entre los distintos días pre-destete y pos-destete, particularmente entre las camadas de mayor peso (3P, 6P y 9P). Por lo anterior se podría proponer que el peso corporal que adquieren las ratas de las distintas camadas durante los estadios pre-destete se mantiene hasta los estadios pos-destete juveniles.

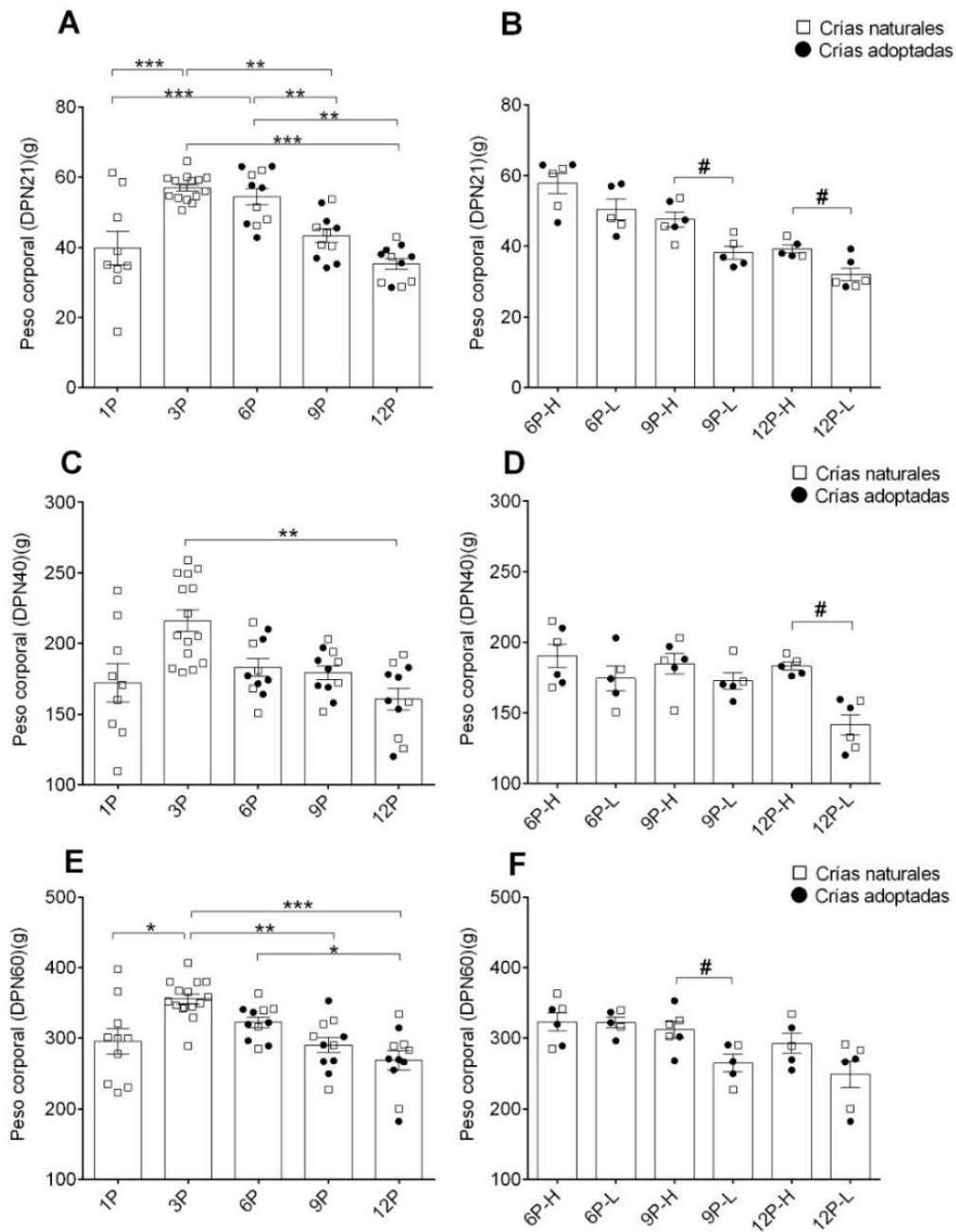


Figura 10 Peso corporal de las ratas en los diferentes grupos de estudio. A, C y D) Diferencias entre-camada en el peso corporal en el DPN21, DPN40 y DPN60, respectivamente. B, D y F) Diferencias intra-camada de las crías pesadas y ligeras en los DPN21, DPN40 y DPN60 respectivamente. Las barras indican el promedio ( $\pm$  EEM) los valores del peso corporal de los compañeros de camada naturales y adoptados son ilustrados con símbolos abiertos o cerrados, respectivamente. Las diferencias entre-camadas se obtuvieron con pruebas ANOVAs de una vía seguida de la prueba post hoc Bonferroni, \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ ) y diferencias intracamada fueron establecidas con pruebas t de student no pareada #  $p < 0.01$ . El número de crías por grupo es el reportado en la Figura 9

El análisis intra-camada muestra la existencia de diferencias significativas entre las crías más pesadas y ligeras de las camadas 12P (t de student no pareada  $t= 5.364$ ,  $p= 0.001$ ) pero no en las de los demás grupos de animales (Figura 10D). Finalmente, en el DPN60, el día en el que se realizó el registro electrofisiológico, las ratas que se desarrollaron en los grupos 3P y 6P tuvieron mayor peso en comparación con las que se criaron en las camadas 1P, 9P y 12P (ANOVA de una vía:  $F(4, 52) = 20.54$ ,  $p < 0.001$ ) (Figura 10E). En el análisis intra-camada también se observan diferencias significativas en el peso corporal de las crías pesadas y ligeras del grupo 9P (t de student no pareada:  $t=2.798$ ,  $p=0.021$ )

Por otra parte, la prueba de ANOVA no mostró la presencia de diferencias significativas entre los pesos corporales de las crías naturales y las adoptadas (símbolos blancos y negros, respectivamente; Figura 11) de las camadas 6P, 9P y 12P, en los días postnatales DPN9 ( $F(2, 129)=0.424$ ,  $p=0.654$ ), DPN21 ( $F(2, 129)=0.586$ ,  $p=0.558$ ), DPN40 ( $F(2, 129)=0.081$ ,  $p=0.981$ ) y DPN60 ( $F(2, 129)=0.114$ ,  $p=0.891$ ).

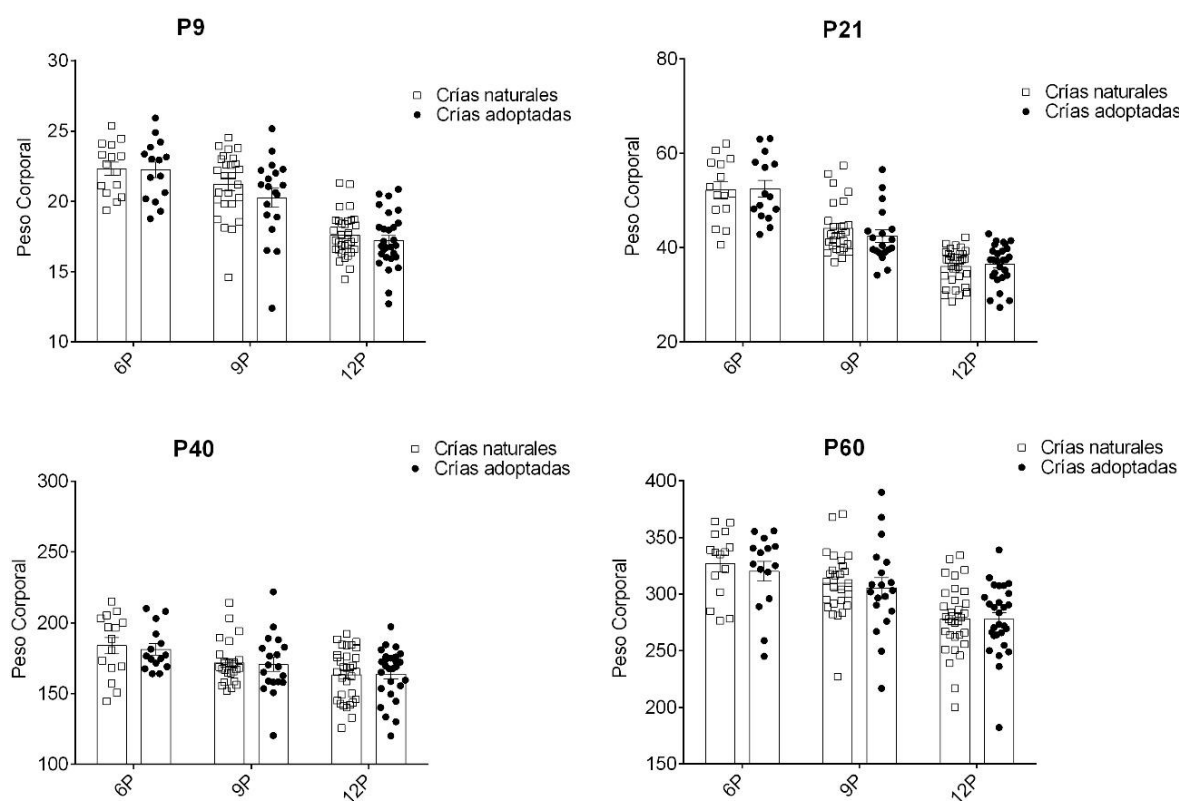


Figura 11 Gráficas de dispersión correspondientes a los valores del peso corporal de las crías naturales y adoptadas en las camadas con 6P, 9P y 12P obtenidas en las edades juveniles pre-destete DPN9 (A) y DPN21 (B) o post-destete DPN40 (C) y DPN60 (D).

## 8.2 Conducta de lamido materno.

Los valores promedio de la frecuencia y duración promedio de la conducta de lamido de las ratas madre por camada en el DPN8 y DPN9, se muestran en las gráficas A y B de la Figura 12, respectivamente. De acuerdo con el análisis de comparaciones múltiples de la prueba de Kruskal Wallis ( $H= 10.01$ ,  $p = 0.54$ ) no se presentan diferencias significativas en la frecuencia del lamido que dan las ratas madre a las crías de las camadas de distinto tamaño (Figura. 12A), aunque el tiempo que pasan las madres del grupo 6P lamiendo sus crías fue significativamente mayor que el de las madres de las otras camadas con menor (1P y 3P) o mayor (9P y 12P) número de crías ( $H= 21.47$ ,  $p < 0.001$ ), tal y como se puede ver en la Figura 12B.

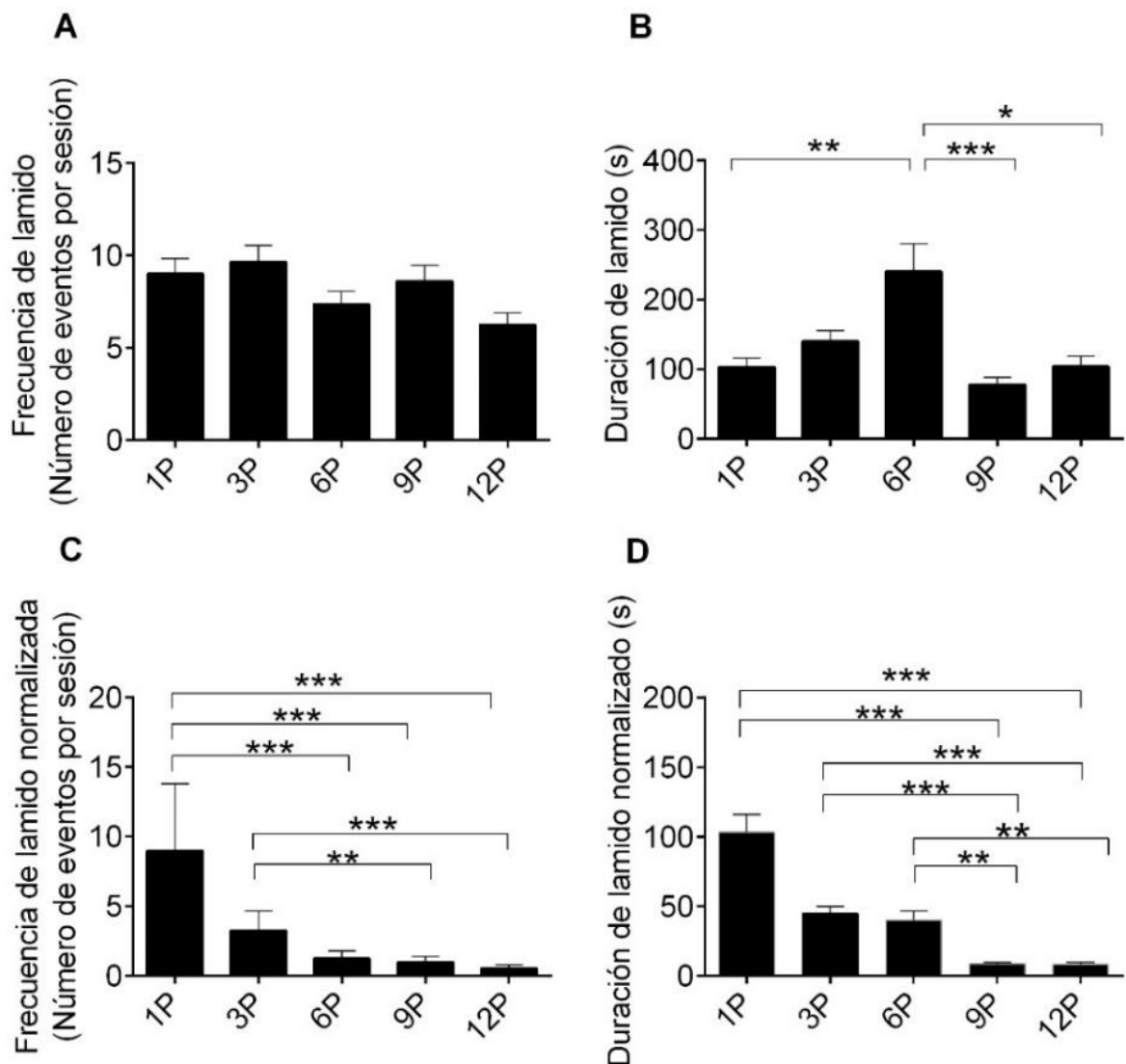


Figura 12. Valores promedio (E.E) del lamido materno en los DPN8 y DPN9. A) Frecuencia de lamido materno (número de lamidos por sesión: 20 minutos por sesión, tres veces al día

por dos días); B) Duración del lamido; C) Frecuencia normalizada del lamido (número de lamidos/número de crías por camada); D) Duración normalizada del lamido materno (duración del lamido/número de crías por camada) (Kruskal-Wallis con prueba de comparaciones de Dunn, \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ ).

Así mismo, para estimar la frecuencia y la duración que las ratas madres dan a cada cría se determinó el valor promedio normalizado de tales parámetros al dividir los valores promedio de la frecuencia y duración del lamido materno por camada con respecto al número de crías de la misma. Los valores obtenidos muestran que las crías de las camadas numerosas (6,9 y 12 crías) recibieron proporcionalmente menos lamidos ( $H = 95.91$ ,  $p < 0.001$ ) y de menor duración ( $H = 64.94$ ,  $p < 0.001$ ) que las crías de camadas de menor tamaño de camada.

### **8.3 Caracterización electrofisiológica del PAC registrado en el nSU.**

En la Figura 13A se ilustran registros representativos del Potencial de Acción Compuesto (PAC) generados por la estimulación (2xU) del nSU de la extremidad posterior derecha de las ratas de las distintas camadas experimentales. La intensidad umbral para la generación del PAC no presentó diferencias significativas entre los nSU de los animales de los distintos grupos de animales (Tabla 2 ANEXO 1). De igual manera, las velocidades de conducción promedio (al píco) de los PAC registrados en el nSU de las ratas de las distintas camadas bajo estudio, no presentaron diferencias significativas entre sí.

Por otra parte, la estimulación creciente y gradual del nSU provocó incrementos progresivos en la amplitud del PAC, los cuales siguieron una curva de tipo sigmoideal (Figura 13). Como se puede observar en esta gráfica, los incrementos de amplitud del PAC generado en los nSU de ratas sin compañeros de camada (1P) y en los grupos 3P y 12P (Figura 13A; símbolos abiertos) fueron de menor magnitud que los registrados en los nervios de los grupos 6P y 9P (Figura 13A, símbolos cerrados), manifestándose diferencias significativas entre tales grupos de animales (ANOVA de dos vías,  $F(36, 460) = 8.44$ ,  $p < 0.001$ ).

Así mismo, los incrementos en amplitud del PAC generados por estímulos de intensidad creciente, aplicados a los nSU de los compañeros pesados de las camadas 6P, 9P y 12P (Figura 14B; símbolos llenos) fueron de mayor magnitud que los generados en los nSU de los compañeros ligeros (de menor peso corporal)



de las mismas camadas (Figura 13B; símbolos abiertos) (ANOVA de dos vías: 6P:  $F(9, 90) = 18.20, p < .0001$ ; 9P:  $F(9, 90) = 25.41, p < 0.0001$ ; 12P:  $F(9, 90) = 1.85, p = 0.077$ ). Conviene señalar que los valores del área del PAC de los nSU provenientes de las crías adoptadas (círculos negros en las gráficas de la figura 8.6 A y B) se encuentran entremezclados con aquellos correspondientes a los de las crías naturales (círculos abiertos).

De acuerdo con el análisis entre-camadas, el PAC registrado en los nervios de las ratas de las camadas 6P y 9P presentaron mayor área con respecto a los registrados en los grupos 1P, 3P y 12P (ANOVA de una vía:  $F(4, 46) = 9.27, p < 0.001$ ) (Figura 14B). Mientras que el análisis intra-camada indica que los CAPs de los nervios de las crías ligeras en las camadas 9P y 12P tuvieron de manera significativa menor área que los registrados en los nSU de las ratas pesadas en las mismas camadas. (9P: *t* de student no pareada:  $t=3.198, p = 0.01$  y 12P: *t* de student no pareada:  $t=4.71, p = 0.008$ ) (Figura 14C). Mientras que el PAC del nSU de ratas ligeras de las camadas 6P, fue de menor área que el de las ratas pesadas, este no mostró diferencias significativas entre los grupos.

Al comparar los valores del área promedio del PAC de las distintas camadas, se obtiene la siguiente secuencia:  $6P > 9P > 3P > 12P > 1P$ . La cual difiere de la secuencia del peso corporal obtenida el mismo día de las observaciones experimentales (DPN60; Figura 9), la cual es:  $3P > 6P > 9P > 1P > 12P$ .

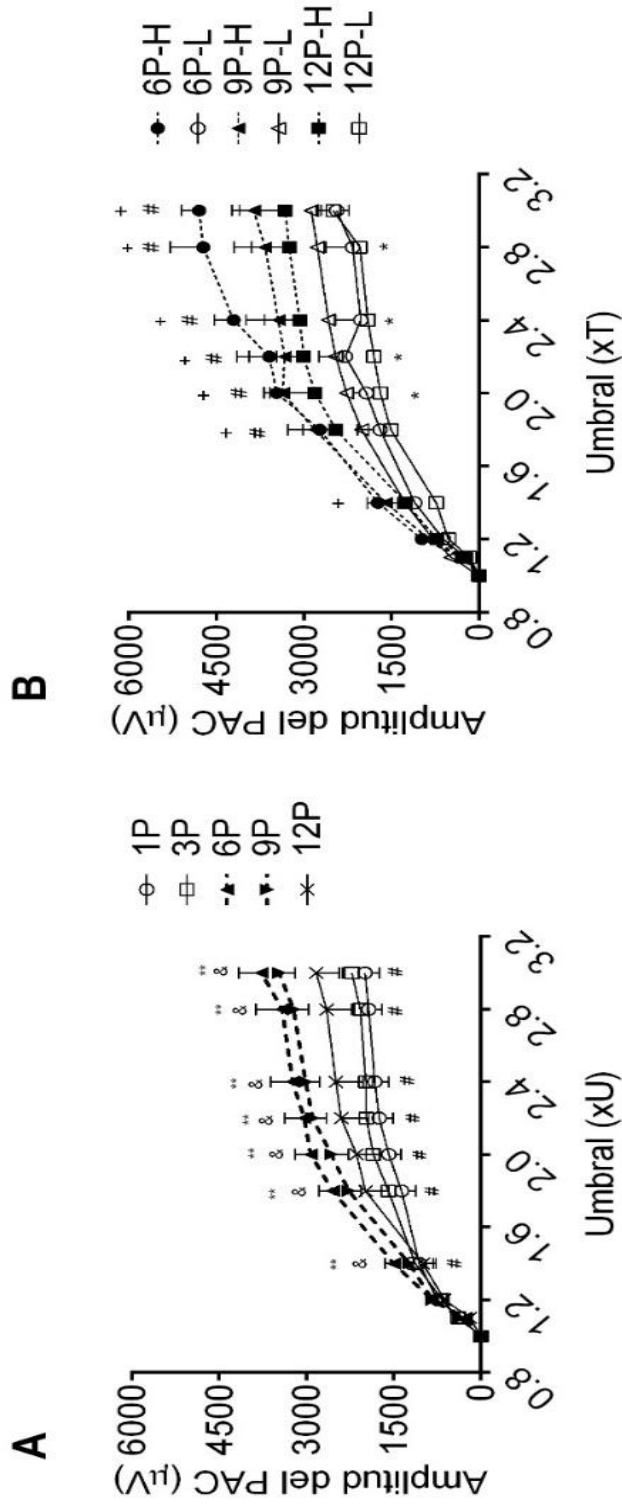


Figura 13 Relación entre la intensidad del estímulo y la amplitud del PAC evocado en el nSU de ratas de diferente tamaño de camada. A) análisis entre-camada de la relación entre la intensidad del estímulo y la amplitud promedio de PAC; B) Análisis intra-camada en la relación de la intensidad del estímulo y la amplitud promedio del PAC del nSU de los compañeros de camada pesados y ligeros. Los valores ilustrados representan el promedio  $\pm$  E.E. Se realizaron ANOVA's de dos vías con pruebas *post hoc* de Dunnett. Los símbolos indican diferencias significativas entre los grupos (Análisis entre-camada: \*\*, 6P vs 1P; &, 6P vs 3P; #, 6P vs 12P; Análisis intra-camada: #, 6P-H vs 6P-L; +, 9P-H vs 9P-L; \*, 12P-H vs 12P-L).

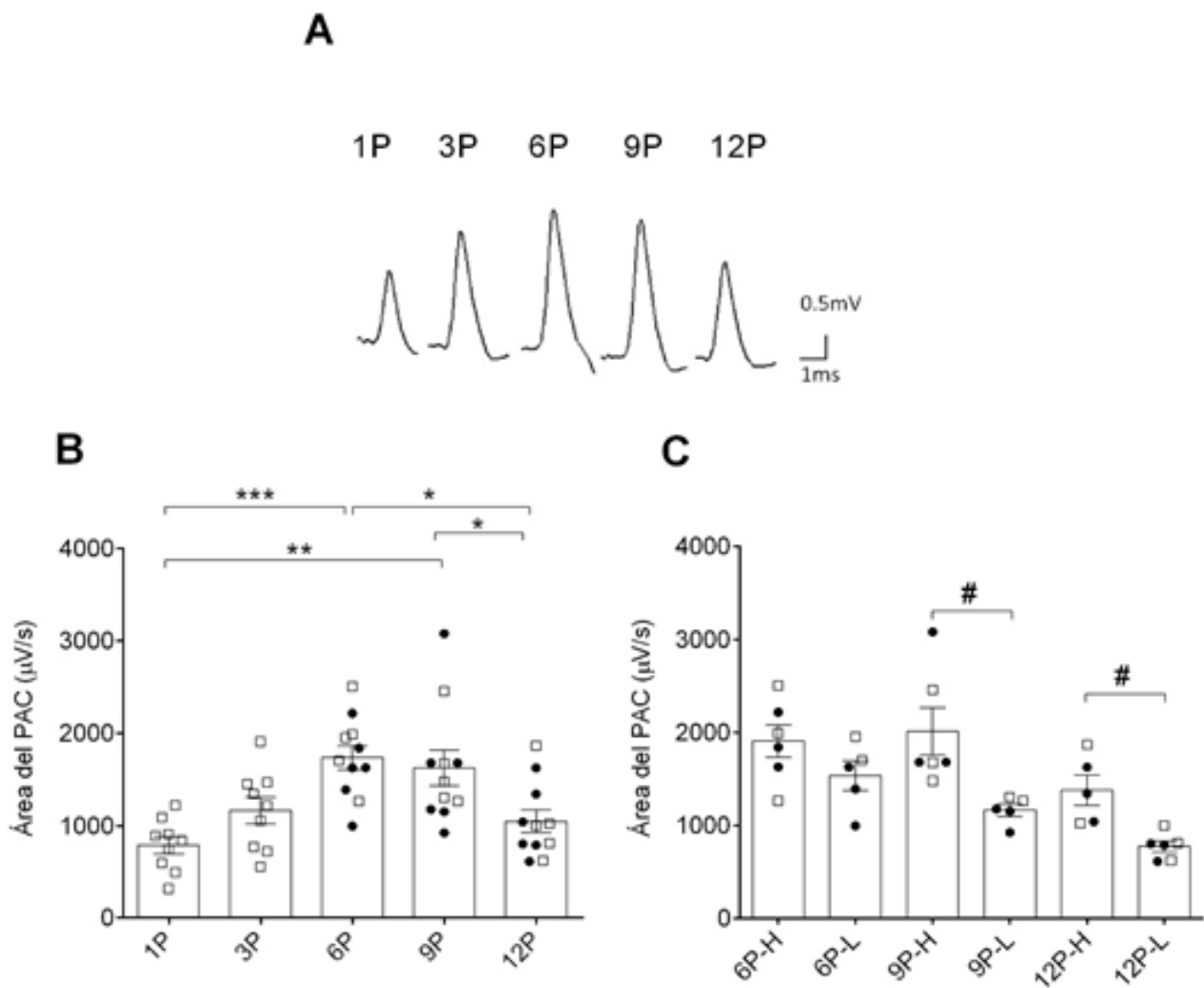


Figura 14 Potenciales de acción compuesto (PAC's) del nSU de ratas de camadas de distinto tamaño. A) Registros promediados de PAC's generados por estímulos eléctricos (2xU) aplicados al nSU de ratas criadas en ausencia de hermanos (1P) o con diferentes tamaños de camada (3P,6P,9P o 12P). B) Análisis intra-camada del promedio del área del PAC evocado en el nSU. C) Análisis intra-camada del promedio del PAC evocado en el nSU de las ratas pesadas (H) y ligeras (L) de los grupos (6P, 9P y 12P). Las barras indican el valor promedio ( $\pm$  EEM). Las diferencias en los valores en el análisis entre-camadas fue establecida mediante un ANOVA de una vía con una prueba post hoc Bonferroni, ( $*p < 0.05$ ,  $**p < 0.01$ ) y las diferencias intra-camada fueron establecidas mediante T de student no pareada (#  $p < 0.01$ .) El número de crías por camada es el representado en el pie de figura de la figura 8

Las diferencias entre las secuencias de peso corporal y del área del PAC registrado en nervios nSU de las ratas que conforman las camadas de distinto tamaño, permite

sugerir que no existe relación alguna entre estos parámetros. Sin embargo, para ahondar en esta cuestión, decidimos analizar la posible relación existente entre el peso corporal de cada una de las ratas obtenido en el DPN60 y el área del PAC registrado en el nSU de la misma rata y registrado en el mismo día. La gráfica de la Figura 15 muestra que los valores obtenidos muestran una notable dispersión, con un coeficiente de correlación de Pearson muy pequeño ( $r=0.07$ ), lo que confirma la escasa relación existente entre el peso corporal y el área del PAC.

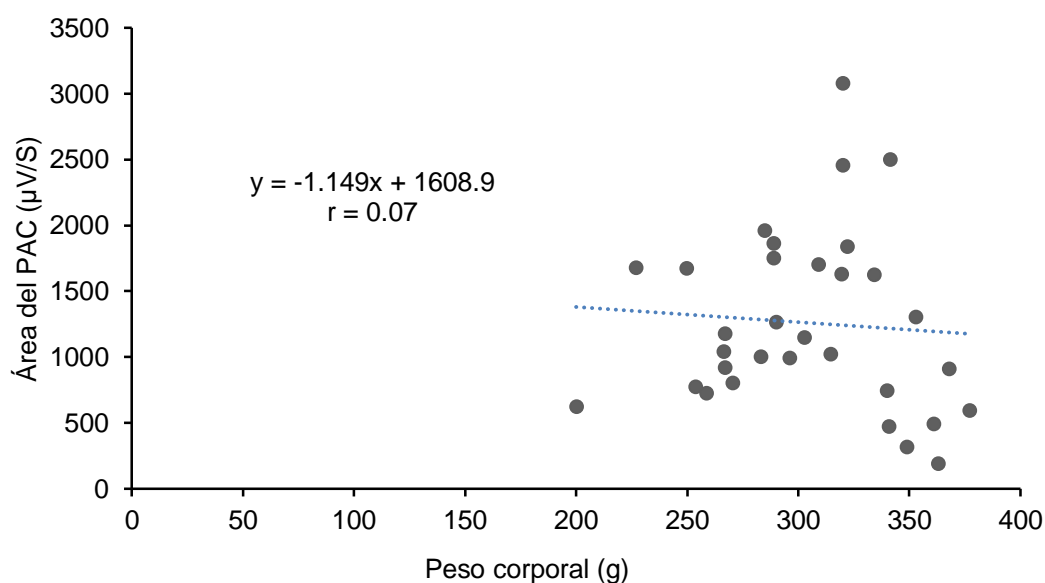


Figura 15. Correlación entre el peso corporal y el área del PAC

#### 8.54. Caracterización histológica de los axones del nSU

En las Figuras 16 y 17, se muestran cortes histológicos de nSU de las ratas criadas en las distintas camadas bajo estudio. El diámetro interno transversal de los axones obtenidos y medidos de secciones histológicas del nSU de ratas pertenecientes a los diferentes grupos de estudio (ver con microfotografías representativas) mostraron una frecuencia de distribución binomial con un solo pico (Figura 18A y B). No se encontraron diferencias significativas entre los grupos (ANOVA de una vía:  $F(4, 46) = 0.444$ ,  $p = 0.776$ ), ni tampoco en el área transversal total del axón ( $F(4,46) = 0.418$ ,  $p = 0.794$ )

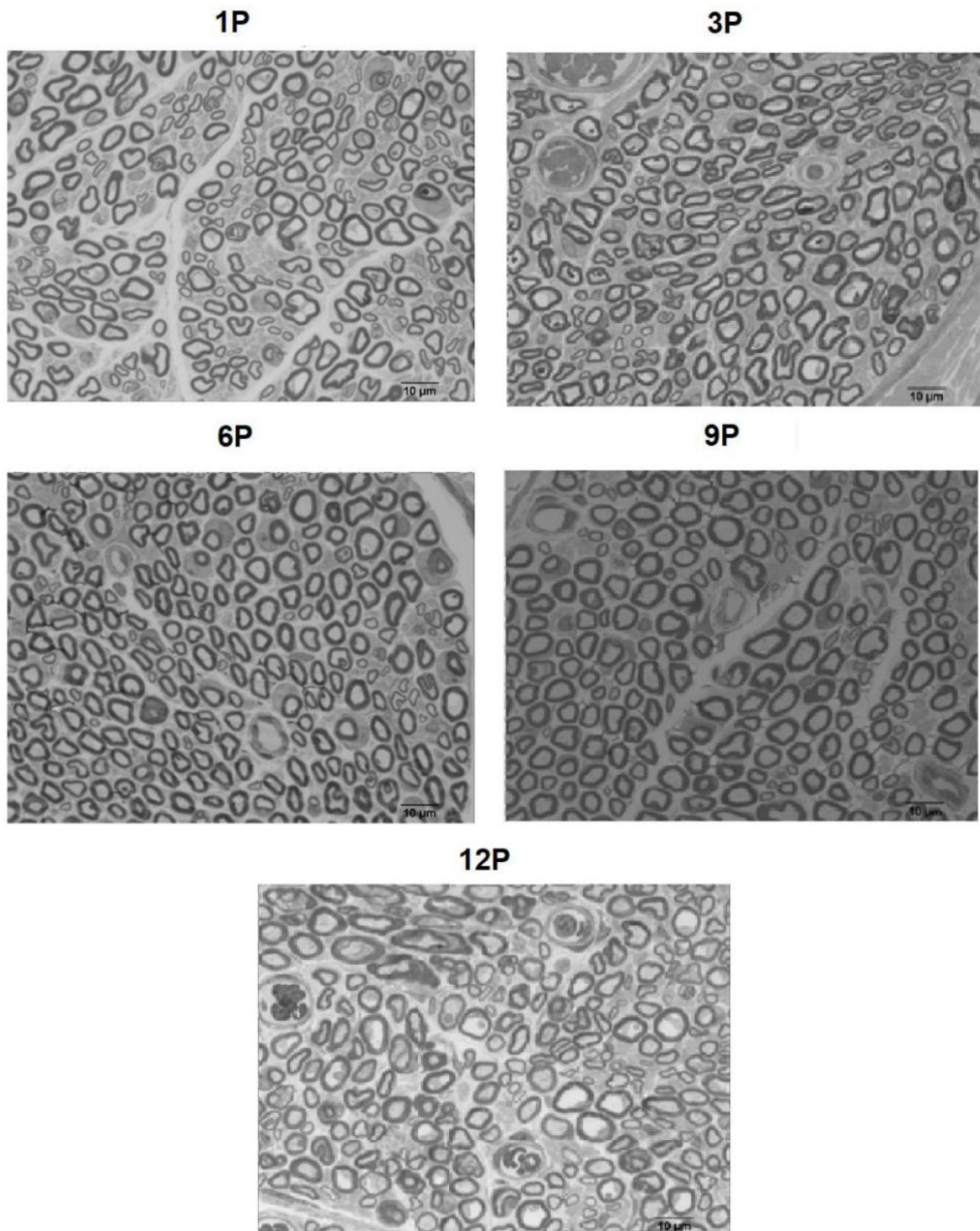
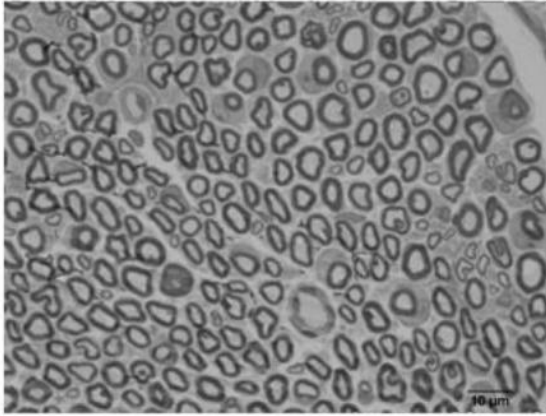
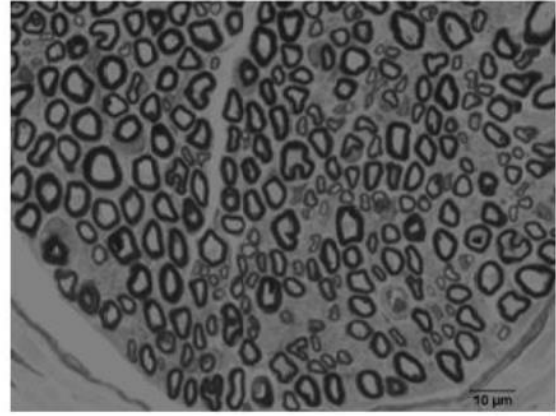


Figura 16. Microfotografías representativas (100x) del nSU de ratas de 60 días de edad, criadas en camadas de distinto tamaño (análisis intra-camada).

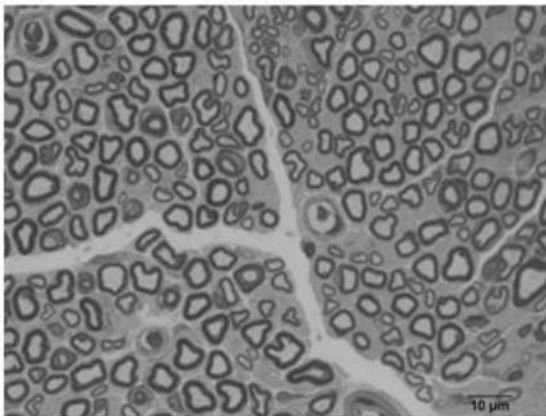
**6P-L**



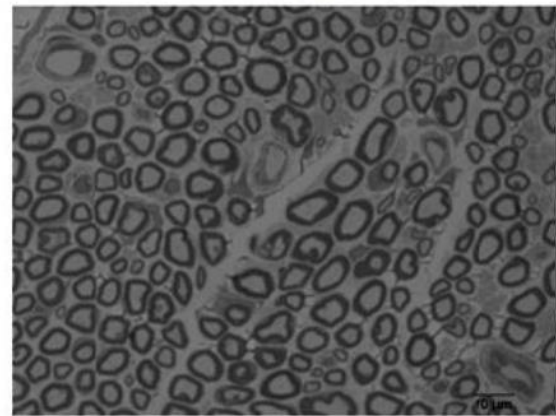
**6P-H**



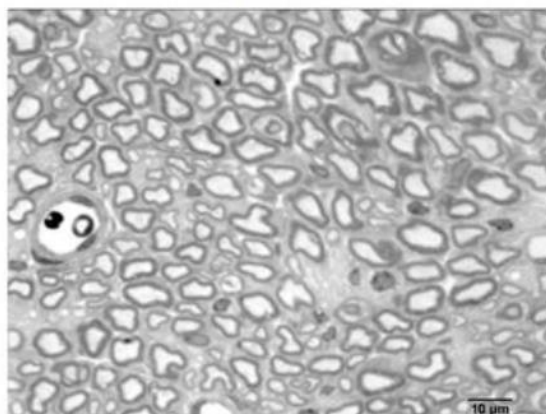
**9P-L**



**9P-H**



**12P-L**



**12P-H**

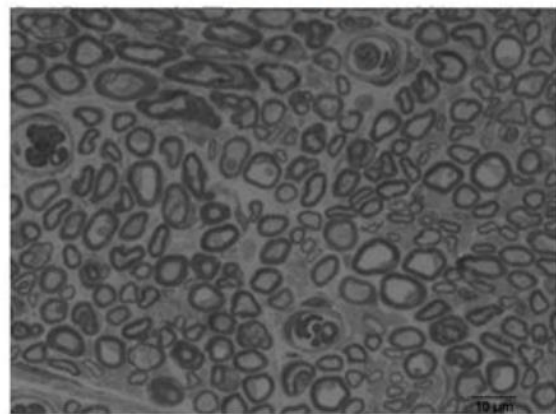


Figura 17. Microfotografías representativas del nSU que crecieron en las ratas pesadas (H) y ligeras (L) de los grupos (análisis intra-camada).

La frecuencia de distribución porcentual del grosor de mielina (tanto en el análisis entre- e intra-camada) no mostraron una distribución binomial sino una distribución bimodal (Figura 18C y D respectivamente), indicando la probable presencia de dos subpoblaciones de axones con diferentes grosores de mielina, uno con intervalo entre 0 a 0.5  $\mu\text{m}$  (Subp A) y otro con un intervalo entre 0.5 a 1.5  $\mu\text{m}$  (Subp B). En el análisis entre-camada, la distribución del grosor de mielina de los axones en el nSU de ratas de los grupos 6P y 9P mostraron dos picos (símbolos rellenos en la Figura 18C) con similares valores porcentuales (6P: pico-1, 10.3% y pico-2, 10.4% y 9P: pico-1, 9.3% y pico-2, 10.5%).

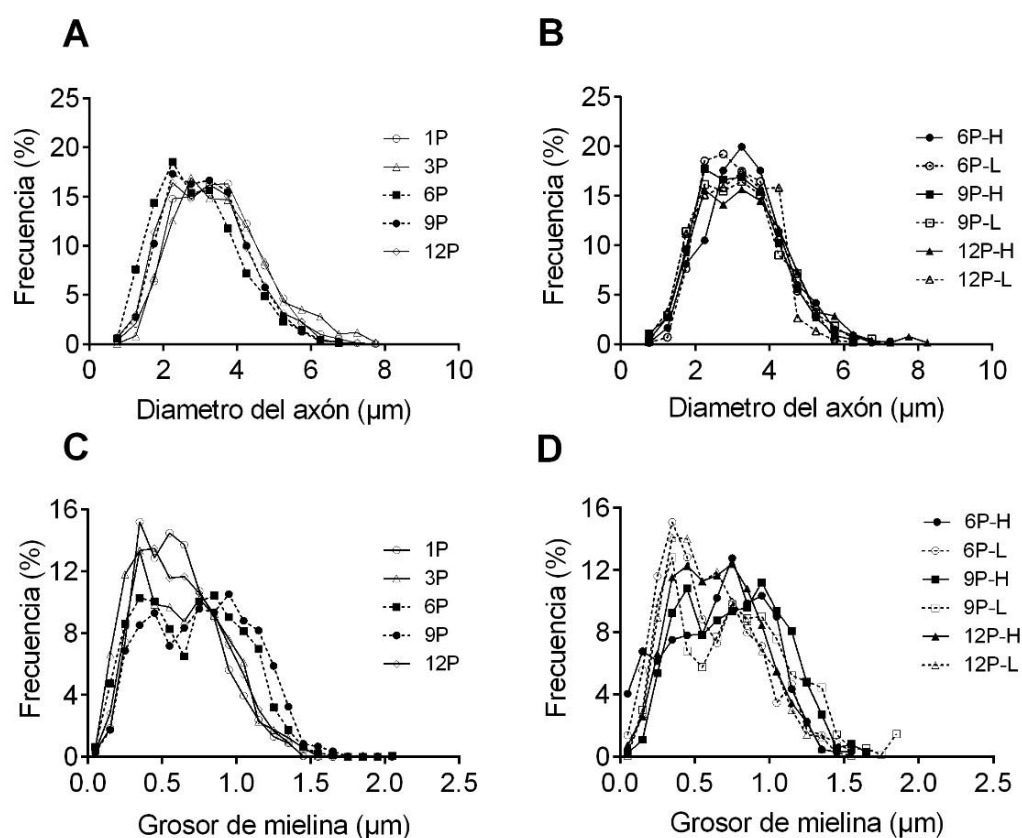


Figura 18 Distribución de frecuencia del diámetro transversal y el grosor de mielina de los axones del nSU de ratas de los diferentes grupos de estudio. A) y B) Distribución de frecuencia porcentual del diámetro de los axones en nervios de ratas provenientes de diferentes tamaños de camada (análisis entre-camada) y las pesadas y ligeras de los grupos 6P, 9P y 12P (análisis intra-camada) respectivamente. C) y D) Distribución de frecuencia porcentual del grosor de la mielina en axones del nSU de ratas provenientes de diferentes tamaños de camada (análisis entre-camada) y las pesadas y ligeras de los grupos 6P, 9P y 12P (análisis intra-camada) respectivamente. El número de ratas por grupo es el reportado en la gráfica 9

De acuerdo con el análisis tipo deconvolución usado en este estudio (Ver sección de métodos) en la Subp A, se observa que los nervios de los grupos 6P y 9P contienen relativamente menor porcentaje de axones con poco grosor de mielina mientras que en la Subp B, tienen un mayor porcentaje de axones (Figura 19). Consistente con lo anterior, el valor de *g-ratio* de los nervios de las ratas procedente de los grupos 6P y 9P fue alrededor de 0.7 (Figura 19 C), lo cual es cercano al valor óptimo de mielinización en los axones del nSU de la rata (Chomiak y Hu, 2009). In contraste, la distribución porcentual del grosor de la mielina en los nervios de los grupos 1P, 3P y 12P mostraron un solo pico en el intervalo de 0.4 – 0.5  $\mu\text{m}$  (Figura 19A). Adicionalmente, el valor de *g-ratio* (ver sección de métodos) de estos grupos está cercano al valor de 0.8, lo cual indica un valor de mielinización relativamente menor (Kruskal Wallis test:  $H= 16.35$ ,  $p = 0.002$ ) (Figura 19C)

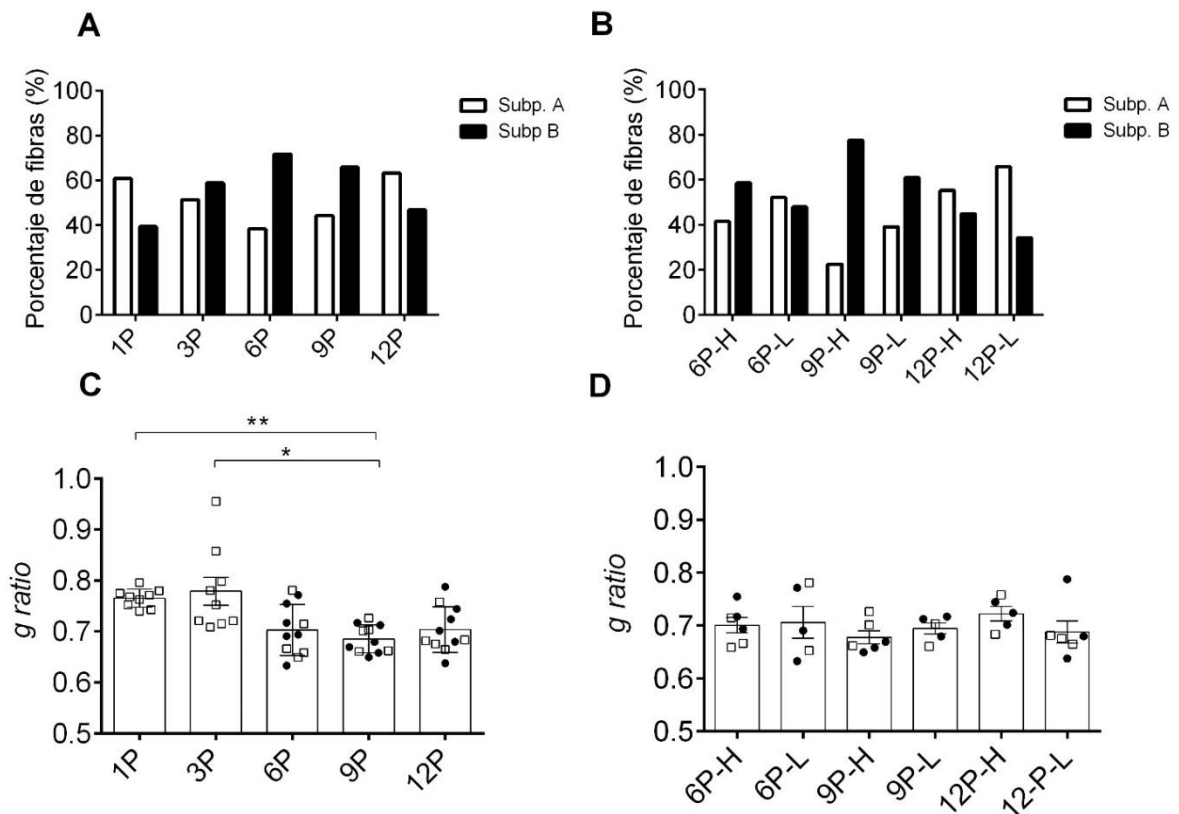


Figura 19. Análisis del grosor de la mielina del nSU. A) porcentaje de axones con mayor o menor grosor de mielina determinada por un análisis semi-cuantitativo (tipo-deconvolución) del nSU de ratas criadas en distintos tamaños de camada (Análisis entre-camada). B) porcentaje de axones con mayor o menor grosor de mielina de ratas pesadas y ligeras (Análisis intra-camada). C y D) promedio ( $\pm$  E.E.) del *g-ratio* de axones en nervios de ratas provenientes de distintos tamaños de camada (Análisis entre-camada. Kruskal-Wallis con post hoc Dunn's; \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ ) Los símbolos claros y oscuros simbolizan los valores



de g-ratio del nSU de ratas naturales y adoptadas respectivamente. El número de crías en cada grupo está representado en la figura 9

El análisis intra-camada mostró que la distribución porcentual del grosor de la mielina en todos los grupos mostró dos picos (Figura 18 D y F). Los nervios de las ratas pesadas de los grupos 6P, 9P y 12P, así como las ratas ligeras del grupo de 9P mostraron un mayor porcentaje de axones con mayor grosor en la vaina de mielina que las ratas ligeras de los grupos 6P y 12P (Figura 19 B)

## 9. Discusión

La evidencia experimental obtenida en este estudio sugiere que, aunado a las interacciones madre-cría, las interacciones sociales con los congéneres integrantes de la camada (hermanos o adoptados) es de gran relevancia para la adecuada formación del grosor de la vaina de mielina en los axones que conforman el nSU y consecuentemente de la adecuada propagación del PAC en la rata adulta.

Los resultados indican que en el DPN9 las ratas provenientes de diferente tamaño de camada (1,3,6,9 y12 crías por camada) mostraron diferencias en el peso corporal ( $3P > 6P > 9P > 12P > 1P$ ) y este orden fue mantenido hasta la edad adulta (Figura 9 y 10). Nuestros resultados también indican la presencia de diferencias significativas entre los individuos más pesados y ligeros en las camadas más numerosas (9P y 12P). En congruencia con tales resultados los datos indican que las crías pesadas de los grupos 9P y 12P ingirieron más leche y tienen mayor peso en comparación que sus compañeros más ligeros.

Diversos estudios han descrito los efectos del tamaño de la camada en el desarrollo postnatal (Conejo: Drummond et al., 2000; roedores: Prager et al., 2010; Tanaka, 1998; Wurtman y Miller, 1976). El tamaño de la camada afecta la cantidad y composición de leche materna disponible para las crías (Knight et al., 1986, ver revisión en Mendi, 1988), resultando en un incremento en la competencia por la leche entre los compañeros de camada (en camadas numerosas), lo cual conlleva a una reducción en el consumo de leche y el peso corporal de las crías durante el periodo post-natal temprano (Celedon et al., 1979; Kappeler et al., 2009; también ver Drummond et al. 2000; Rödel et al., 2008a, b en conejos). Consecuentemente,

las camadas numerosas (>12 crías) ha sido usado como un modelo de desnutrición en roedores (rata: Celedon et al., 1979; ratón: Nagy et al., 1977).

Es conocido que las interacciones sociales entre los compañeros de camada es una fuente importante de estímulos sensoriales a través de la conducta de agrupamiento (*huddling*) además la competencia entre congéneres para acceder a la leche materna y las posiciones térmicamente ventajosas dentro del nido afectan el estado nutricional y metabólico de las crías (golden hamster: Vieira y Otta, 1998; ratón: Zepeda et al., 2018; rata: Bautista et al., 2010; Prager et al., 2010; Rödel et al., 2010; conejo: Bautista et al., 2008; Bautista et al., 2013; García-Torres et al., 2015; Rödel et al., 2008a, b). Consecuentemente, se puede asumir que el grado de interacción social entre los compañeros de camada depende del tamaño de la camada, de tal manera que conforme incrementa el número de compañeros de camada, las crías reciben más estimulación sensorial a través del juego o el *huddling*, pero su vez compiten por un acceso reducido a la leche y al cuidado materno (Drummond et al., 2000; Rödel et al., 2008a, b, en conejos de laboratorio y salvajes, y ratas de laboratorio respectivamente). En congruencia a nuestra hipótesis en la que los estímulos sensoriales y/o sociales de los compañeros de camada es importante en el desarrollo de los nervios periféricos sensoriales, evidencias de nuestro grupo sugieren que los efectos negativos observados en el nSU de ratas macho adultas que fueron separadas de su madre y compañeros de camada en la vida post-natal temprana a través de la crianza artificial fueron prevenidos cuando las crías fueron expuestas a crías de otras camadas durante el aislamiento (Segura et al., 2014).

No obstante, debe notarse que las crías únicas (crecieron con sus madres, pero en ausencia de compañeros de camada) mostraron un menor consumo de leche a pesar de recibir cuidados maternos normalizados con respecto al tamaño de la camada (i.e lamido materno), lo cual posiblemente se debe a que las crías se encuentran menos estimuladas o motivadas para succionar el pezón, lo anterior relacionado con carencia de competencia por la leche. (Li et al., 2008; Nicolás et al., 2011) y por otro lado por una reducción en la eyección de leche y lactación de la madre debido a una estimulación sensorial débil que provee una sola cría, lo que conlleva a una disminución en el reflejo neuroendocrino de eyección de leche y la lactogénesis (Lincoln y Paisley, 1982) y un menor volumen de la mima. Además,

las madres los mantuvieron mayor tiempo bajo estimulación y por lo tanto menor tiempo de succión durante las dos primeras semanas de vida postnatal.

La posición que las crías ocupan dentro del agrupamiento en el nido, determinada por el peso corporal durante el periodo postnatal pre-destete es relacionada con el crecimiento y el desarrollo a corto y largo plazo (Bautista et al., 2010; Hudson et al., 2011; Reyes-Meza et al., 2011; Zepeda et al., 2018). De acuerdo con las diferencias encontradas entre los compañeros de camada pesados y ligeros en el DPN9 en el peso corporal y la tasa de crecimiento corporal (Figura 8), se asume que la presencia de las crías pesadas y ligeras durante el periodo postnatal pre-destete es debido a la competencia por el consumo de leche y es de notar que esas diferencias se exacerban entre mayor sea el incremento de crías por camada dada la mayor competencia por la leche y, durante la tercera semana del periodo postnatal pre-destete, por el alimento sólido.

Adicionalmente, proponemos que las diferencias en el peso corporal entre los compañeros de camada representan un nivel de competencia e interacción social entre los hermanos. En este escenario, se debe resaltar que las diferencias en el peso corporal entre las ratas pesadas y ligeras persiste hasta la edad adulta (DPN60) (FIG 10), lo que indica que los efectos nutricionales durante el periodo pre-destete derivados de las interacciones madre-cría y con los compañeros de camada permanecen hasta la edad adulta.

El cuidado materno incluye una serie de conductas que representan una de las fuentes más importantes de entradas táctiles y sociales para el desarrollo postnatal del SNC de la rata (Fleming et al., 2002; Lomanowska y Melo, 2016). En el presente estudio, se consideró al lamido materno como la mayor fuente de estimulación sensorial provista por la madre. Nuestros resultados indican que la cantidad de lamidos maternos que reciben las crías dependen del tamaño de la camada. De tal manera que las crías pertenecientes a las camadas numerosas reciben menos lamidos por cría que aquellos pertenecientes a camadas pequeñas, por lo que la menor estimulación sensorial provista por la madre puede traer consecuencias el desarrollo de las características morfo-funcionales de nervios periféricos.

Siguiendo las evidencias arrojadas en esta tesis surgen las siguientes preguntas: ¿Qué factores influyen en la mielinización y la propagación del PAC en el nSU?;

¿Los estímulos sensoriales y sociales de la madre o de los hermanos?; ¿los factores nutricionales en la vida temprana?; ¿Una combinación de todos esos factores?

Los hallazgos en los registros electrofisiológicos y en la histología indican que el nSU de los grupos 6P y 9P mostraron una mayor área y amplitud del PAC y un mayor porcentaje de axones con relativamente mayor grosor de mielina que el nSU de los grupos 1P,3P y 12P, en este sentido, se sugiere que la estimulación sensorial provista por las interacciones entre los compañeros de camada durante el periodo postnatal pre-destete, por lo menos en los grupos 6P y 9P, parece jugar un papel relevante en la mielinización y en la propagación del PAC en el SNP incluso probablemente más que la interacción con la madre. De hecho, evidencias obtenidas en nuestro laboratorio muestran que la depleción en el área y amplitud del PAC y en el grosor de la mielina de los axones del nSU de ratas aisladas (mediante la crianza artificial) es prevenida (al menos parcialmente) cuando son añadidos dos compañeros en el protocolo de aislamiento (Segura et al., 2014). El mecanismo involucrado en este proceso es desconocido, pero se propone que la estimulación táctil induce la activación neural y promueve la mielinización a través de la liberación de factores neurotróficos en el SNC (Stevens et al., 2002) y en el SNP (Stevens y Fields, 2000; Wan et al., 2010). En concordancia con los resultados es probable que la estimulación táctil por el agrupamiento (*huddling*) antes del DPN10 (Alberts, 1978) y el acicalamiento entre congéneres (*allogrooming*) después del DPN14 (Pellis y Pellis, 1997) en los grupos 6P y 9P se promueve la liberación de factores neurotróficos que favorecen la mielinización de los axones en el nSU. Adicionalmente, ha sido reportado que la estimulación táctil revierte la disrupción de la proteína S-100 $\beta$  (un marcador astrocítico), BDNF (*brain derived neurotrophic factor*), N-CAM (*Cell-adhesion molecule*) y GAP-43 (proteína de elongación axonal) en diferentes regiones del cerebro de ratas socialmente aisladas (Chatterjee et al., 2007) además se incrementa la expresión de BDNF en el hipocampo (Antoniazzi et al., 2017) e IGF-1 en la corteza cerebral de crías que crecen con congéneres (entre los DPN 8-14) (Guzzetta et al., 2009). En conjunto los resultados obtenidos en la presente tesis concuerdan con las evidencias obtenidas en diversos estudios que muestran la contribución de los estímulos sociales (madre-cría) durante la vida temprana contribuyen al desarrollo morfológico (Fleming et al., 2002; Lomanowska

y Melo, 2016) y la mielinización del SNC (Chatterjee et al., 2007; Kikusui et al., 2007; Miki et al., 2014; Ono et al., 2008 en rata y ratón), efectos que permanecen hasta la vida adulta.

Por otro lado, la depleción en los valores electrofisiológicos e histológicos del nSU de las ratas que crecieron en los grupos de camadas pequeñas (1P y 3P) y grandes (12P) sugiere que, aunque reciben mayor acicalamiento por la madre (*Licking*) y, en el caso de la camada de 3 crías tuvieron una mayor ganancia de peso, otros factores se encuentran involucrados para explicar estos efectos. Por ejemplo, aunque las ratas del grupo 12P tienen mayor estimulación proveniente de los compañeros de camada también tienen algunas influencias negativas: a) reciben menos cantidad de estimulación materna (*Licking*) entre los DPN8 y 9 (también observado por Enes-Marquez y Giusti-Paiva, 2018), b) las crías estuvieron más expuestas a la competencia por la leche y en consecuencia c) tuvieron menos ganancia de peso, efecto que se conservó hasta la vida adulta.

Debe resaltarse que la reducción en la mielina observada en los tamaños de camada extremos (1P, 3P y 12P) puede ser asociado con diversas perturbaciones que alteran la propagación de potenciales de acción (Kimura y Itami, 2009; Waxman et al., 1995). Debido a que el nSU es principalmente compuesto por axones sensoriales mielinizados, las deficiencias en la propagación de los potenciales de acción debido a la falta de axones sensoriales mielinizados puede generar disfunción periférica (Melo et al., 2022). Consecuentemente, puede ser esperado que un relativo aumento en la proporción de axones con neuropatía periférica puede presentar un bloqueo en la conducción o una propagación intermitente que puede asociarse con una reducción en el área del PAC observado en el nSU de las ratas de los grupos 1P, 3P y 12P. Dichas alteraciones en la propagación del potencial de acción puede interrumpir o desincronizar la codificación sensorial transmitida desde los receptores sensoriales periféricos hacia el SNC. Así, las alteraciones en la función nerviosa sensorial en los animales que no recibieron una adecuada estimulación sensorial durante periodos críticos del desarrollo, ya sea por la privación social de la madre y los compañeros de camada (Segura et al., 2014; Zempoalteca et al., 2018) o debido a que fueron criadas en camadas con tamaños extremos (pequeñas 1P y 3P o grandes 12P) pueden explicar cierta disfunción en la propagación de impulsos a través de nervios periféricos o incluso

alteraciones en interacciones sociales debido a que las señales sociales/sensoriales no son adecuadamente llevadas al SNC y por lo tanto la interpretación y la respuesta a dichas señales puede ser inadecuada.

Con base en los resultados obtenidos en la presente tesis, se propone que la mielinización y la propagación del potencial de acción en los nervios periféricos de las ratas adultas criados en camadas de diferente tamaño en presencia de la madre está asociada con una compleja interrelación de factores sensoriales/sociales y factores nutricionales durante el periodo postnatal pre-destete. En concordancia, se propone que las crías pertenecientes al grupo 3P tienen una menor interacción social (menos estimulación sensorial y reducción en la competencia entre los compañeros de camada) pero a su vez tienen relativamente mayor incremento en el *Licking* materno y la disposición de leche materna lo que les genera un incremento significativo en el peso corporal y alteraciones en la regulación endócrina del , el nSU en las ratas adultas contienen a la mayoría de los axones con menor grosor de mielina lo que resulta en PAC's con menor área. En este caso, se propone que la menor estimulación sensorial (relativa con los otros grupos) y la menor competencia durante el periodo pre-destete influye negativamente en la mielinización y en la propagación del potencial de acción en el adulto comparativamente con la posible influencia positiva que da el buen estado nutricional, mientras que las ratas criadas en las camadas grandes (12P) con altos niveles de interacción social pero una disminución significativa en el consumo de leche y un pobre estado nutricional debido al alto grado competencia con sus compañeros de camada tienen nSU con menor mielinización de los axones y menor área del PAC en la edad adulta. Por otro lado, las ratas que crecieron en tamaños de camada intermedio (6P y 9P) mostraron una combinación balanceada de factores sensoriales y nutricionales que resultaron en un apropiado peso corporal y tasa de aumento de peso, así como en una adecuada mielinización y propagación del potencial de acción en los axones de la rata adulta. En contraste, las crías que fueron criadas con su madre, pero en ausencia de sus compañeros de camada (1P) representan una situación inadecuada en donde, aunque reciben mayor cuidado materno (lamido), ingieren menos leche y ganan menos peso corporal resultando en un pobre estado nutricional aunado a eso tienen la ausencia de hermanos

parecen afectar de manera negativa la mielinización del nSU y la propagación PAC en la edad adulta.

Una explicación alternativa a nuestros resultados puede ser atribuida el procedimiento de *cross-fostering* al introducir factores genéticos o intrauterinos responsables en el peso corporal y en las características del nSU encontradas en las camadas grandes en este estudio. Sin embargo, nuestros resultados indican que las crías adoptadas y naturales no presentan diferencias significativas en el peso corporal en las camadas numerosas (ver Figura 10). De la misma manera los datos indican que el área del PAC y en el *g-ratio* de los axones de las crías pesadas y ligeras están entremezclados entre las crías naturales y adoptadas de los grupos 6P, 9P y 12P. En conjunto, estos datos indican que las crías adoptadas parecen no afectar el peso corporal y las características electrofisiológica e histológicas de los axones en los nervios de los compañeros de camada en las camadas grandes. Esto parece excluir la posibilidad de que otros factores biológicos como los genéticos y/o intrauterinos asociados con la adopción de crías no están involucrados en las variables mediada en este estudio, los datos indican que éstas se ven influenciadas por la influencia conductual y fisiológica asociada al tamaño de la camada.

En conjunto los resultados, en conjunto con un gran y un creciente número de evidencias resaltan la importancia de las interacciones entre los compañeros de la camada y la madre modelan el fenotipo en las ratas adultas, en el presente estudio se evidencia dicho efecto a nivel neurofisiológico en el SNP de la rata adulta.

## **10. Resumen de resultados**

- Las crías de camadas pequeñas (3P y 6P) presentan mayor peso corporal que las crías de camadas grandes (12P) o con ausencia de hermanos.
- Estas diferencias permanecen hasta la edad juvenil adulta (DPN60).
- Las camadas grandes (9P y 12P) contienen crías pesadas y ligeras que se asocia a la presencia de competencia entre congéneres por el alimento.
- El consumo de leche de las crías provenientes de camadas grandes y sin hermanos es significativamente menor que aquella de camadas pequeñas. Así mismo, las crías pesadas de camadas numerosas consumen más leche que las ligeras.
- Las crías de camadas grandes (9P y 12P) reciben menor lamido materno que las de camadas pequeñas (3P y 6P) y sin hermanos (1P).
- Los potenciales de acción compuesto evocados en nSU de crías de camadas de 6 y 9 hermanos es de mayor amplitud y área que los provocados en camadas grandes y sin hermanos. Así mismo, las crías pesadas muestran PACs de mayor área en comparación con el de las crías ligeras.
- Los axones del nSU de crías de camadas de 6 y 9 crías presentan mayor grosor de la vaina de mielina que aquellos de nervios de crías de camadas grandes y sin hermanos sin presentar cambios en el diámetro de los axones.
- No se presentan diferencias significativas en los distintos parámetros analizados entre las crías naturales y adoptadas en las camadas de 6P, 9P y 12P

## **9. Conclusión general**

En conjunto los resultados muestran que la presencia de compañeros de camada afecta el crecimiento de las crías (tasa de aumento de peso y consumo de leche) durante el periodo postnatal pre-destete. Lo anterior, a su vez se ve reflejado en las características histológicas (grosor de la mielina) del N. sural. así como en las propiedades electrofisiológicas



## **10. Perspectivas**

- Analizar la calidad de la leche de ratas madre en diferentes tamaños de camada.
- Cuantificar el contenido de proteína básica de mielina (MBP) y otros marcadores moleculares de mielinización.
- Evaluar el efecto de la condición social sobre la mielinización axonal y conducción de potenciales de acción en el SNC (médula espinal).
- Establecer los periodos críticos del desarrollo de la mielinización en ratas que crecen con distinto tamaño de camada (condiciones semi-naturales)
- Analizar el componente fractal en las series de tiempo registradas en el PAC evocado en el nSU.

## 11. Referencias

- Alberts, J. R. (1978). Huddling by rat pups: Multisensory control of contact behavior. *J. Comp. Physiol.* 92, 220–226.
- Almeida RG y Lyons DA (2017) On myelinated axon plasticity and neuronal circuit formation and function. *J. Neurosci.* 42:10023-10034.
- Antoniazzi, C. T., Metz, V. G., Roversi, K., Freitas, D. L., Vey, L. T., Días, V. T., Segat, H. J., Duarte, M. M y Burger, M. E. (2017). Tactile stimulation during different developmental periods modifies hippocampal BDNF and GR, affecting memory and behavior in adult rats. *Hipp.*, 27, 210–220.
- Bagot RC, van Hasselt FN, Champagne DL, Meaney MJ, Krugers HJ y Joëls M (2009) Maternal care determines rapid effects of stress mediators on synaptic plasticity in adult rat hippocampal dentate gyrus. *Neurobiol. Learn. Mem.* 92: 292–300.
- Bautista, A., García-Torres, E., Martínez-Gómez, M., y Hudson, R. (2008). Do newborn domestic rabbits *Oryctolagus cuniculus* compete for thermally advantageous positions in the litter huddle? *Behav. Ecol. and Sociobiol.*, 62, 331–339.
- Bautista A, García-Torres E, Prager G, Hudson R y Rödel HG (2009). Development of behavior in the litter huddle in rat pups: Within- and between-litter differences. *Dev. Psychobiol* 52:35–43.
- Bautista, A., Castelán, F., Pérez-Roldán, H., Martínez-Gómez, M., y Hudson, R. (2013). Competition in newborn rabbits for thermally advantageous positions in the litter huddle is associated with individual differences in brown fat metabolism. *Physiol y Behav.* 118, 189–194.
- Bilbao, J. M., y Schmidt, R. E. (2015). Biopsy diagnosis of peripheral neuropathy (1st ed.). Switzeland: Springer International Publishing (Chapter 2).
- Carvalho ALO, Ferri BG, de Sousa FAL, Vilela FC y Giusti-Paiva A (2016) Early life overnutrition induced by litter size manipulation decreases social play behavior in adolescent male rats. *Int J. of Deve Neurosci.* 53: 75–82.
- Cavigelli SA, Ragan CM, Barrett CE y Michael KC (2010) Within-litter variance in rat maternal behavior. *Behav. Process.* 84: 696–704.

- Chatterjee, D., Chatterjee-Chakraborty, M., Rees, S., Cauchi, J., y Fleming, A. (2007). Maternal isolation alters the expression of neural proteins during development: 'Stroking' stimulation reverses these effects. *Brain Res.*, 1158, 11–27
- Celedon, J. M., Santander, M., y Colombo, M. (1979). Long-term effects of early undernutrition and environmental stimulation on learning performance of adult rats. *The J. of Nut.*, 109(11), 1880–1886.
- Dawson MR, Polito A, Levine JM y Reynolds R. (2003) NG2-expressing glial progenitor cells: an abundant and widespread population of cycling cells in the adult rat CNS. *Mol. Cell Neurosci.* 24: 476-488.
- Drummond, H., Vázquez, E., Sánchez-Colón, S., Martínez-Gómez, M., y Hudson, R. (2000). Competition for milk in the domestic rabbit: Survivors benefit from littermate deaths. *Ethol*, 106, 511–526.
- Eluvathingal, T. J., Chugani, H. T., Behen, M. E., Juhász, C., Muzik, O., Maqbool, M., Chugani, D. C., y Makki, M. (2006). Abnormal brain connectivity in children after early severe socioemotional deprivation: a diffusion tensor imaging study. *Pediatrics*, 117(6), 2093–2100.
- Enes-Marques, S., y Giusti-Paiva, A. (2018). Litter size reduction accentuates maternal care and alters behavioral and physiological phenotypes in rat adult offspring. *The J. of Physiol. Sci*, 68(6), 789–798.
- Erzurumlu RS y Gaspar P. (2012) Development and critical period plasticity of the barrel cortex. *Eur. J. Neurosci.* 35: 1540–1553.
- Fleming, A. S., Kraemer, G. W., Gonzalez, A., Lovic, V., Rees, S., y Melo, A. (2002). Mothering begets mothering: The transmission of behavior and its neurobiology across generations. *Pharma, Biochem and Behav*, 73(1), 61–75.
- Georgieff MK, Brunette KE y Tran PV. (2015) Early life nutrition and neural plasticity. *Dev. Psychopathol.* 27: 411-423.
- García-Torres, E., Hudson, R., Castelán, F., Martínez-Gómez, M., y Bautista, A. (2015). Differential metabolism of brown adipose tissue in newborn rabbits in relation to position in the litter huddle. *J of Therm Biol*, 51, 33–41.
- González-Mariscal G y Melo AI. (2017) Bidirectional effects of mother-young contact on the maternal and neonatal brains. En: "The Plastic Brain", Advances in Experimental Medicine and Biology, Springer International Publishing. 97-116.

- Guzzetta, A., Baldini, S., Bancalè, A., Baroncelli, L., Ciucci, F., Ghirri, P., Putignano, E., Sale, A., Viegi, A., Berardi, N., Boldrini, A., Cioni, G., y Maffei, L. (2009). Massage accelerates brain development and the maturation of visual function. *J. of Neurosci*, 29, 6042–6051
- Harlow HF, Dodsworth RO y Harlow MK. (1965) Total social isolation in monkeys. *PNAS*. 54(1), 90–97. <https://doi.org/10.1073/pnas.54.1.90>
- Hensch TK. (2005) Critical period plasticity in local cortical circuits. *Nat. Rev. Neurosci*. 6: 877–888.
- Hübener M y Bonhoeffer T. (2014) Neuronal plasticity: Beyond the critical period. *Cell*. 159: 727-737.
- Hudson R, Bautista A, Reyes-Meza V, Morales J y Rödel H. (2011). The effect of siblings on early development: a potential contributor to personality differences in mammals *Dev. Psychobiol*. 53: 564–574.
- Huntley GW. (1997) Differential effects of abnormal tactile experience on shaping representation patterns in developing and adult motor cortex. *J. of Neur*. 23: 9220–9232.
- Ino, D., Sagara, H., Suzuki, J., Kanemaru, K., Okubo, Y., y Lino, M. (2015). Neuronal regulation of Schwann cell mitochondrial Ca<sup>2+</sup> signaling during myelination. *Cell Reports*, 12, 1951e1959.
- Kappeler, L., De Magalhaes Filho, C., Leneuve, P., Xu, J., Brunel, N., Chatziantoniou, C., Le Bouc, Y., y Holzenberger, M. (2009). Early postnatal nutrition determines somatotrophic function in mice. *Endocrinol*, 150(1), 314–323.
- Keller TA y Just MA. (2009) Altering cortical connectivity: remediation-induced changes in the white matter of poor readers. *Neuron*. 64: 624-631.
- Kikusui T, Kiyokawa Y y Mori Y. (2007) Deprivation of mother-pup interaction by early weaning alters myelin formation in male, but not female, ICR mice. *Brain Res*. 1133: 115–122.
- Kimura, F., e Itami, C. (2009). Myelination and isochronicity in neural networks. *Front. in Neuroanat*, 3, 12.
- Knudsen, E. I. (2004). Sensitive periods in the development of the brain and behavior. *J. of Cogn. Neurosci*, 16(8), 1412–1425.

- Kuzawa C. W. (2005). Fetal origins of developmental plasticity: are fetal cues reliable predictors of future nutritional environments?. *Ame. J. of human biol.*, 17(1), 5–21.
- Knight, C. H., Maltz, E., y Docherty, A. H. (1986). Milk yield and composition in mice: Effects of litter size and lactation number. *Compa. Biochem. and Physiol. A, Comparative Physiology*, 84(1), 127–133.
- Levelt CN y Hübener M. (2012) Critical-period plasticity in the visual cortex. *Annu. Rev Neurosci.* 35: 309-330.
- Li Q, Brus-Ramer M, Martin JH y McDonald JW. (2010) Electrical stimulation of the medullary pyramid promotes proliferation and differentiation of oligodendrocyte progenitor cells in the corticospinal tract of the adult rat. *Neurosci Lett.* 479: 128-133.
- Li YQ, Wang XY, Zhai HF, Zhang XY, Kosten T y Lu L. (2007) Sex and age-dependent effects of early postnatal sibling deprivation on spatial learning and memory in adult rats. *Behav Brain Res.* 186:138–142.
- Li YQ, Wang XY, Zhai HF, Zheng YQ, Zhang XY, Kosten T y Lu L. (2008) Effects of early postnatal sibling deprivation on anxiety and vulnerability to cocaine in offspring rats. *Psychopharmacol.* 199: 245–253.
- Liguori, R., y Trojabodrg, W. (2004). Are there motor fibers in the sural nerve? *Muscl. and Nerve*, 13, 12–15.
- Lincoln, D.W., y Paisley, A. C. (1982). Neuroendocrine control of milk ejection. *J. of Repr. and Fertility*, 65(2), 571–586.
- Lomanowska, A. M., y Melo, A. I. (2016). Deconstructing the function of maternal stimulation in offspring development: Insights from the artificial rearing model in rats. *Horm. and Behav*, 77, 224–236.
- Makinodan M, Rosen KM, Ito S y Corfas G. (2012) A critical period for social experience-dependent oligodendrocyte maturation and myelination. *Science* 337: 1357–1360.
- Mayer, R. F., y Denny-Brown, D. (1964). Conduction velocity in peripheral nerve during experimental demyelination in the cat. *Neurology*, 14, 714e726.
- Mangin JM, Li P, Scafidi J y Gallo V. (2012) Experience-dependent regulation of NG2 progenitors in the developing barrel cortex. *Nat Neurosci.* 15: 1192–1194.

- Melo AI. (2015) Role of sensory, social, and hormonal signals from the mother on the development of offspring En: Perinatal programming of neurodevelopment. Springer 219-248.
- Melo, A. I., Zempoalteca, R., Martínez-Álvarez, V., Hoffman, K. L., y Ismael Jiménez-Estrada, I. (2022): Postnatal development, electrophysiology and sensory sural nerves. In: Factors Affecting Neurodevelopment Genetics, Neurology, Behavior, and Diet. Edited by Martin, C.R., Preedy, V.R. and Rajendram R. Academic Press Chap. 25. Pp. 287–298.
- Mendi, M. (1988). The effects of litter size variation on mother-offspring relationships and behavioral and physical development in several mammalian species (principally rodents). *J. of Zool*, 215, 15–34.
- Miller DJ, Duka T, Stimpson CD, Schapiro SJ, Baze WB, McArthur MJ, Fobbs AJ, Sousa AM, Sestan N, Wildman DE, Lipovich L, Kuzawa CW, Hof PR y Sherwood CC. (2012) Prolonged myelination in human neocortical evolution. *PNAS* 109: 16480-16485.
- Miki, T., Yokoyama, T., Kusaka, T., Suzuki, S., Ohta, K., Warita, K., Wang, Z. Y., Ueki, M., Sumitani, K., Bellinger, F. P., Tamai, M., Liu, J. Q., Yakura, T y Takeuchi, Y. (2014). Early postnatal repeated maternal deprivation causes a transient increase in OMpg and BDNF in rat cerebellum suggesting precocious myelination. *J. of the Neurol Sci*, 336(1-2), 62–67.
- Morgane PJ, Austin-LaFrance RJ, Bronzino J, Tonkiss J, Diaz-Cintra S, Cintra L, Kemper, T y Galler JR. (1993) Prenatal malnutrition and development of the brain. *Neurosci Biobehav Rev*. 17: 91-128.
- Meredith, R. M. (2015). Sensitive and critical periods during neurotypical and aberrant neurodevelopment: A framework for neurodevelopmental disorders. *Neurosci Biobehav Rev*, 50, 180–188.
- Muciño E, Bautista A, Jiménez I, Martínez-Gómez M y Hudson R. (2009) Differential development of body equilibrium among littermates in the newborn rabbit. *Dev. Psychobiol*. 51: 24–33.
- Nagy, Z.M., Porada, K. J., y Anderson, J. A. (1977). Undernutrition by rearing in large litters delays the development of reflexive, locomotor, and memory processes in mice. *J of Comp and Physiol. Psycho*, 91(3), 682–696.

- Nichols, J. G., Martin, A. R., Fuchs, P. A., Brown, D. A., Diamond, M. E., y Weisblat, D. A. (2012). *From neuron to brain* (5th ed., pp. 114e129). USA: Sinauer.
- Nishiyama, A., Komitova, M., Suzuki, R., y Zhu, X. (2009). Polydendrocytes (NG2 cells): multifunctional cells with lineage plasticity. *Nat. Rev. Neurosci*, 10(1), 9–22.
- Ono M, Kikusui T, Sasaki N, Ichikawa M, Mori Y y Murakami-Murofushi K. (2008). Early weaning induces anxiety and precocious myelination in the anterior part of the basolateral amygdala of male Balb/c mice. *Neurosci*. 156: 1103–1110.
- Péter, A. (2017). Solomon Coder: A simple and free solution for behavior coding. <http://solomoncoder.com.2017>
- Pellis, S. M., y Pellis, V. C. (1997). The prejuvenile onset of play fighting in laboratory rats (*Rattus norvegicus*). *Dev. Psychobiol.*, 31(3), 193–205.
- Prager, G., Stefanski, V., Hudson, R., y Rödel, H. G. (2010). Family matters: Maternal and litter-size effects on immune parameters in young laboratory rats. *Brain, behav, and immun*, 24(8), 1371–1378.
- Quiroz González S, Segura-Alegría B, Guadarrama-Olmos JC y Jiménez-Estrada I. (2011). Effect of chronic undernourishment on the cord dorsum potentials and the primary afferent depolarization evoked by cutaneous nerves in the rat spinal cord. *Brain. Res. Bull.* 85: 68-74.
- Quiroz-González S, Escartín-Pérez RE, Faz-Bermudez F, Segura-Alegría B, Reyes-Legorreta C, Guadarrama-Olmos J.C, Florán-Garduño B y Jiménez-Estrada I. (2013) Endogenous Content and Release of [3H]-GABA and [3H]-Glutamate in the Spinal Cord of Chronically Undernourished Rat. *Neurochem. Res.* 38: 23-31.
- Ragan CM, Loken E, Stifter CA y Cavigelli SA. (2012) Within-litter variance in early rat pup–mother interactions and adult offspring responses to novelty. *Dev Psychobiol.* 54: 199–206.
- Reyes-Meza V, Hudson R, Martínez-Gómez M, Nicolás L, Rödel HG y Bautista A. (2011). Possible contribution of position in the litter huddle to long-term differences in behavioral style in the domestic rabbit. *Physiol y Behav.* 104: 778–785.
- Rice D, Barone S. (2000) Critical Periods of Vulnerability for the Developing Nervous System: Evidence from Humans and Animal Models. *Env. Health. Persp.* 108: 511-533

- Rödel, H. G., Bautista, A., García-Torres, E., Martínez-Gómez, M., y Hudson, R. (2008a). Why do heavy littermates grow better than lighter ones? A study in wild and domestic European rabbits. *Physiol and Behav*, 95(3), 441–448.
- Rödel, H. G., Prager, G., Stefanski, V., von Holst, D., y Hudson, R. (2008b). Separating maternal and litter-size effects on early postnatal growth in two species of altricial small mammals. *Physiol. and Behav.*, 93(4–5), 826–834.
- Rödel HG, Meyer S, Prager G, Stefanski y Hudson, R. (2010) Litter size is negatively correlated with corticosterone levels in weanling and juvenile laboratory rats. *Physiol and Behav* 99: 644-650
- Rosenblatt JS (1967) Non-hormonal basis of maternal behavior in the rat. *Science* 156:1512–1514
- Rosenblatt JS, Mayer AD y Siegel HI. (1985) Maternal behavior among the nonprimate mammals. En: Handbook of behavioral neurobiology, vol 7. Plenum Press, 229–298
- Rosenbluth, J. (1987). Abnormal axoglial junctions in the myelin-deficient rat mutant. *J. of Neurocytol*, 16, 497e509.
- Schlegel AA, Rudelson JJ y Tse PU. (2012) White matter structure changes as adults learn a second language. *J. Cogn Neurosci* 24: 1664-1670
- Scholz J, Klein MC, Behrens TE y Johansen-Berg H. (2009) Training induces changes in white-matter architecture. *Nat. Neurosci.* 12: 1370-1371
- Segura B, Guadarrama JC, Gutiérrez AL, Merchant H, Cintra L y Jiménez I. (2001). Effect of perinatal food deficiencies on the compound action potential evoked in sensory nerves of developing rats. *Nutr. Neurosci.* 4: 475–488.
- Segura B, Guadarrama JC, Pratz G, Mercado V, Merchant H, Cintra L y Jiménez I. (2004). Conduction failure of action potentials in sensory sural nerves of undernourished rats. *Neurosci. Lett.* 354: 181–184.
- Segura B, Melo AI, Fleming AS, Mendoza-Garrido ME, González del Pliego M, Aguirre-Benítez EL, Hernández-Falcón J y Jiménez Estrada I. (2014). Early Social Isolation Provokes Electrophysiological and Structural Changes in Cutaneous Sensory Nerves of Adult Male Rats. *Dev. Neurobiol.* 74: 1184–1193.
- Stevens B y Fields RD. (2000) Response of Schwann cells to action potentials in development. *Science.* 287: 2267-2271.



- Stevens, B., Porta, S., Haak, L. L., Gallo, V., y Fields, R. D. (2002). Adenosine: A neuron-glia transmitter promoting myelination in the CNS in response to action potentials. *Neuron*, 36, 855–868.
- Tanaka, T. (1998). Effects of litter size on behavioral development in mice *Repr. Toxicol*, 12(6), 613–617.
- Viana LC, Lima CM, Oliveira MA, Borges RP, Cardoso TT, Almeida IN, Diniz DG, Bento-Torres J, Pereira A, Batista-de-Oliveira M, Lopes AA, Silva RF, Abadie-Guedes R, Santos AAD, Lima DS, Vasconcelos PF, Cunningham C, Guedes RC y Picanço-Diniz CW. (2013) Litter size, age-related memory impairments, and microglial changes in rat dentate gyrus: stereological analysis and three dimensional morphometry. *Neurosci*. 238: 280–296
- Vieira, M. L., y Otta, E. (1998). Play fighting in juvenile golden hamsters (*Mesocricetus auratus*): Effects of litter size and analysis of social interaction among males. *Behav. Process*, 43(3), 265–273.
- Wan, L. D., Xia, R., y Ding, W. L. (2010). Electrical stimulation enhanced remyelination of injured sciatic nerves by increasing neurotrophins. *Neurosci*, 169(3), 1029–1038.
- Waxman, S. G., y Kocsis, J. D. (1995). Pathophysiology of demyelinated axons. In S. G. Waxman, J. D. Kocsis, y P. K. Stys (Eds.), *The axon* (pp. 438e461). New York: Oxford University Press.
- Wurtman, J. J., y Miller, S. A. (1976). Effect of litter size on weight gain in rats. *The J. of Nutrit*, 106(5), 697–701.
- Yamamoto, K., Merry, A. C., y Sima, A. F. (1996). An orderly development of paranodal axoglia junctions and bracelets of Nageotte in the rat sural nerve. *Dev. Brain Research*, 96, 36e45.
- Zempoalteca R, Porrás MG, Moreno-Pérez S, Ramírez-Funéz G, Aguirre-Benítez EL, González Del Pliego M, Mariscal-Tovar S, Mendoza-Garrido ME, Hoffman KL, Jiménez-Estrada I y Melo AI. (2018): Early postnatal development of electrophysiological and histological properties of sensory sural nerves in male rats that were maternally deprived and artificially reared: Role of tactile stimulation. *Develop. Neurobiol*. 78: 351–362.
- Zepeda, J. A., Bautista, A., Rangassamy, M., Monclús, R., Bocquet, C., Martínez-Gómez, M., Gouat, P., Féron, C., Hudson, R., y Rödel, H. G. (2018). Individual

differences in early body mass affect thermogenic performance and sibling interactions in litter huddles of the house mouse. *Dev. Psychobiol.* 60(7), 825–835.

## ANEXO 1 (Datos complementarios)

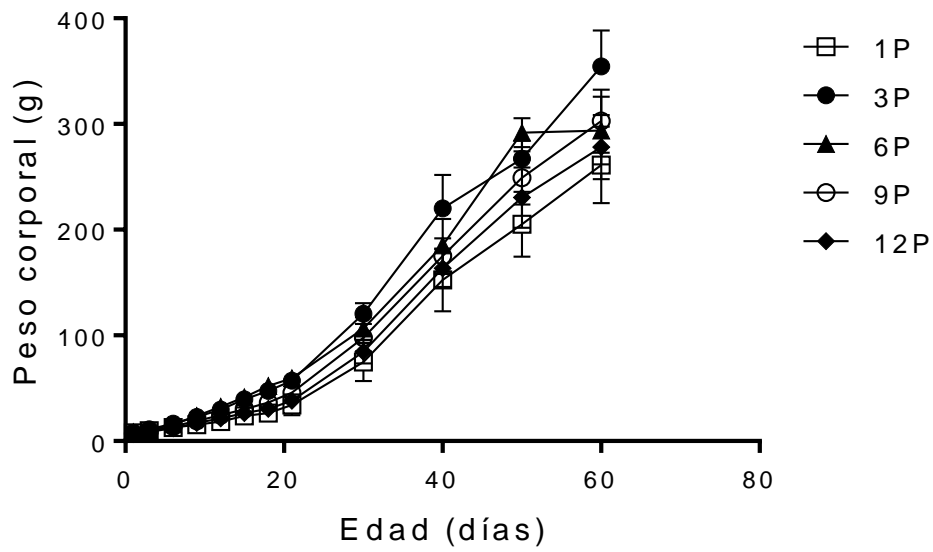


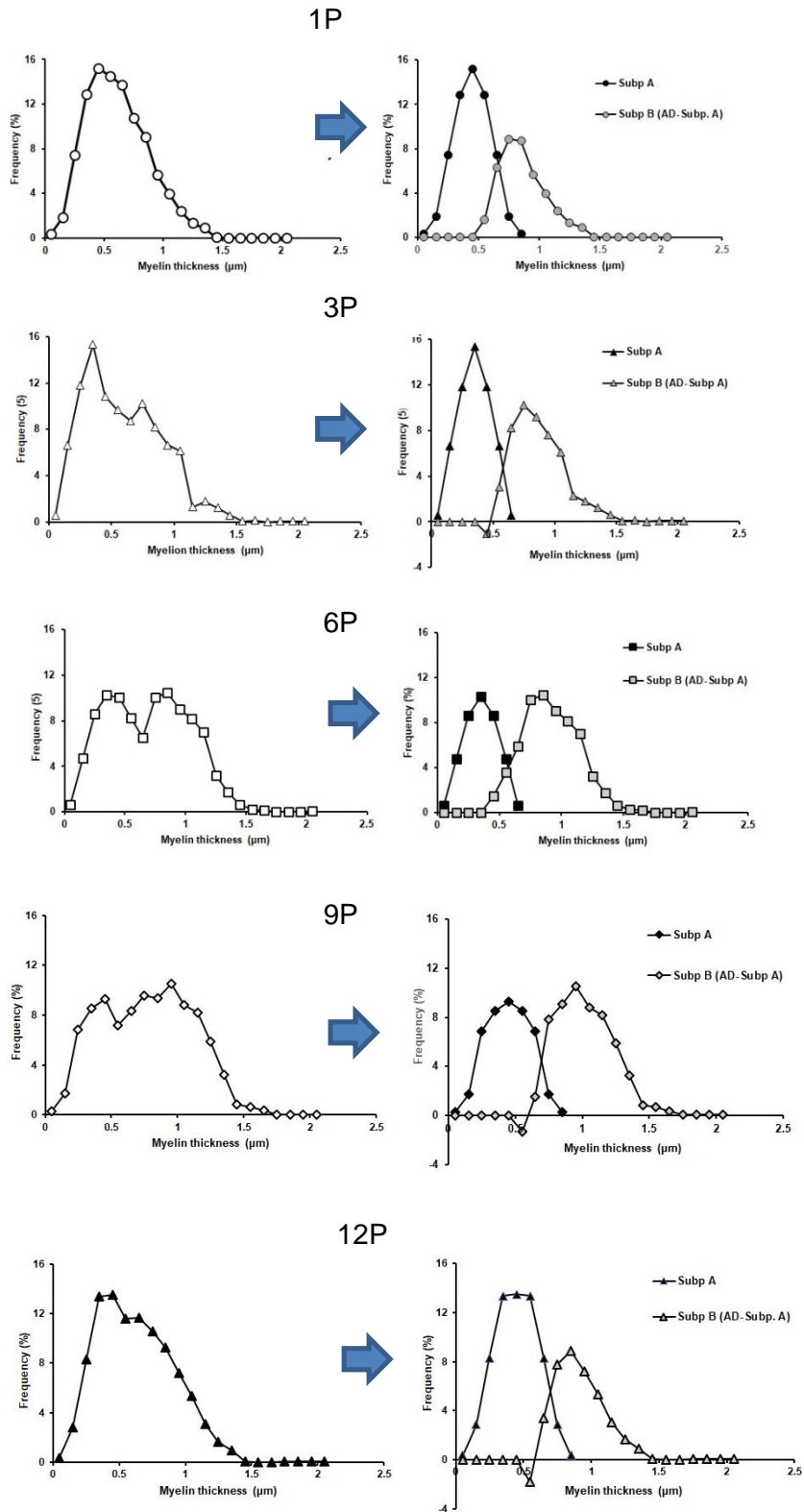
Figura 20 Curvas de aumento de peso de las camadas experimentales durante el periodo pre- y pos-destete

Tabla 2. Umbral de activación y velocidad de conducción en los grupos de estudio

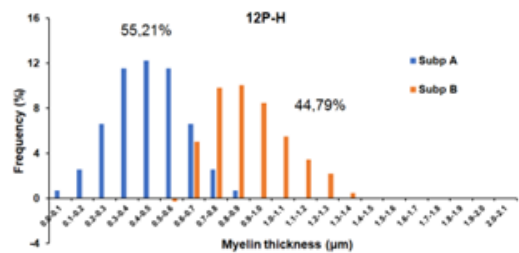
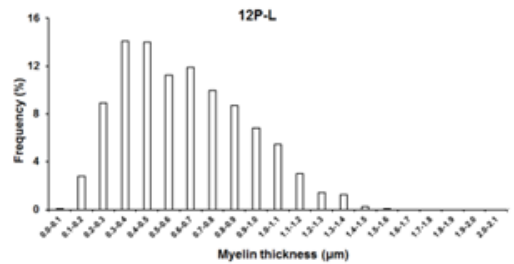
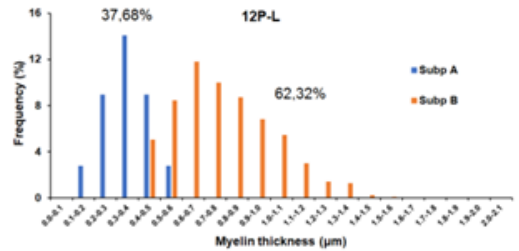
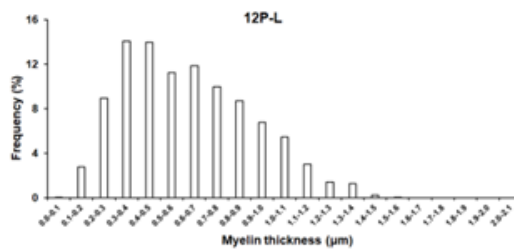
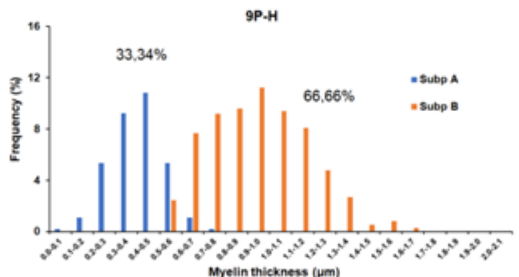
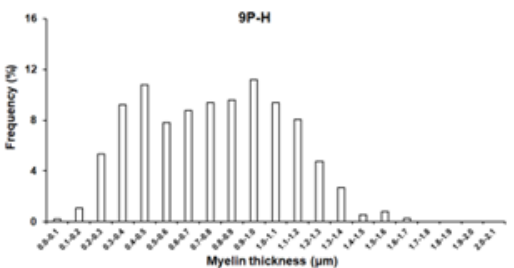
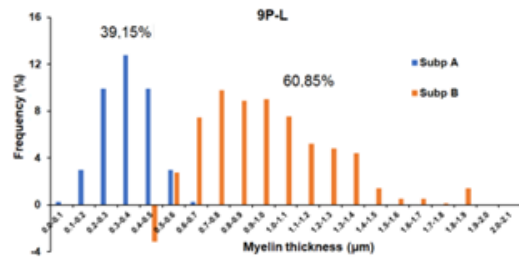
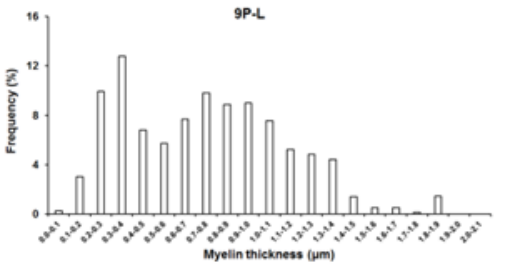
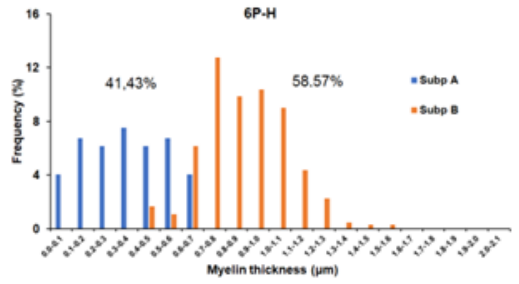
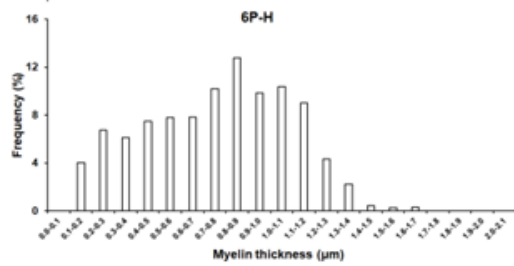
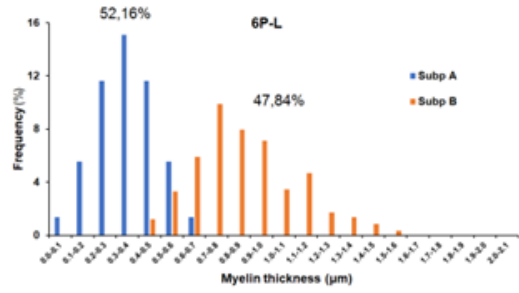
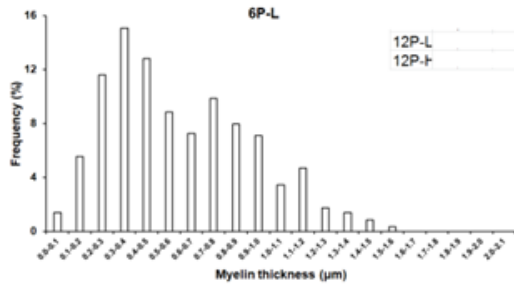
<b>ENTRE-CAMADA</b>						
	1P	3P	6P	9P	12P	
<b>Umbral del PAC (<math>\mu</math>A)</b>	68,5 $\pm$ 5,5	78,8 $\pm$ 11,6	75,0 $\pm$ 5,6	76,10 $\pm$ 6,10	70,5 $\pm$ 6,1	
<b>Velocidad de conducción(m/s)</b>	31,11 $\pm$ 7,89	36,24 $\pm$ 4,5	29,17 $\pm$ 6,69	37,47 $\pm$ 11,52	30,61 $\pm$ 5,2	
<b>INTRA-CAMADA</b>						
	6P-H	6P-L	9P-H	9P-L	12P-H	12P-L
<b>Umbral del PAC (<math>\mu</math>A)</b>	79,6 $\pm$ 6,0	70,0 $\pm$ 8,5	69,0 $\pm$ 2,9	79,8 $\pm$ 17,9	76,2 $\pm$ 8,9	67,5 $\pm$ 9,9
<b>Velocidad de conducción(m/s)</b>	31,31 $\pm$ 7,89	27.39 $\pm$ 5,59	59,61 $\pm$ 12,01	34,27 $\pm$ 11,62	34,27 $\pm$ 11,62	34,07 $\pm$ 6,30

## ANEXO 2 (Análisis de pseudodeconvolución)

### a) Entre-camadas



## b) Intra-camada



## ANEXO 3 (Publicaciones)









Received: 12 April 2022 | Revised: 18 July 2022 | Accepted: 23 July 2022

DOI: 10.1002/dev.22316

Developmental Psychobiology WILEY

RESEARCH ARTICLE

# Mother and sibling interactions during the preweaning period influence myelination and impulse propagation of the sensory sural nerve in the adult rat

Vladimir Martínez-Álvarez<sup>1,2</sup>  | Bertha Segura-Alegría<sup>2</sup>  |  
Erika Elizabeth Rodríguez-Torres<sup>3</sup>  | Mercedes Graciela Porras<sup>4</sup> |  
Elsa Aguirre-Benítez<sup>4</sup>  | Margarita González del Pliego<sup>4</sup> | Robyn Hudson<sup>5</sup>  |  
Salvador Quiroz-González<sup>6</sup>  | Angel I. Melo<sup>7</sup>  | Ismael Jiménez-Estrada<sup>1</sup> 

<sup>1</sup>Depto. Fisiología, Biofísica y Neurociencias, CINVESTAV, IPN, Mexico City, Mexico

<sup>2</sup>Depto. Biología, FES-Iztacala, UNAM, Mexico City, Mexico

<sup>3</sup>Centro de Investigación en Matemáticas, UAEH, Mexico City, Mexico

<sup>4</sup>Depto. Embriología, Facultad de Medicina, UNAM, Mexico City, Mexico

<sup>5</sup>Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, Mexico City, Mexico

<sup>6</sup>Universidad Estatal de Ecatepec, Estado de México, Mexico City, Mexico

<sup>7</sup>Centro de Investigación en Reproducción Animal, CINVESTAV- Laboratorio Tlaxcala, Universidad Autónoma de Tlaxcala, Tlaxcala, Mexico City, Mexico

### Correspondence

Ismael Jiménez Estrada, Depto. Fisiología, Biofísica y Neurociencias, CINVESTAV, IPN, Avenida Instituto Politécnico Nacional 2508, Col. San Pedro Zacatenco, Ciudad de México, Mexico.

Email: [ijimenez@fisio.cinvestav.mx](mailto:ijimenez@fisio.cinvestav.mx)

### Abstract

To investigate whether mother and sibling interactions during the preweaning period influence the histological and electrophysiological characteristics of the sensory sural nerve (SUN) in the adult rat, litters composed of 1, 3, 6, 9, and 12 male pups (P) were formed and the pups routinely weighed until postnatal day 60 (PND60). At PND9, 3P and 6P litters showed greater body weight than pups without siblings or from 9P or 12P litters, and such differences in weight were maintained until adulthood. Analysis of maternal licking at PND8 and 9 showed that pups from large litters received fewer licks than pups from small size litters. At PND60, SUN of rats from 6P and 9P litters had greater compound action potential (CAP) amplitude and a higher proportion of axons with large myelin thickness than nerves from rats of 1P, 3P, or 12P litters. SUN of heaviest rats from 9P and 12P litters had greater CAP area and myelination than the lightest rats from the same litters. We propose that a complex interplay of sensory, social, and nutritional factors arising from mother and littermate interactions during the preweaning period influence myelination and the propagation of action potentials in the SUN of adult rats.

### KEYWORDS

compound action potential, cutaneous nerve, electrophysiology, litter size, myelin, postnatal social experience, siblings

## 1 | INTRODUCTION

The development of the nervous system in altricial species is characterized by the occurrence of “sensitive periods” that appear in organized and sequential time windows across prenatal and postnatal development. Such periods are strongly susceptible to social and other environmental factors, which can modify the morphological, physiological, and behavioral phenotype of the organism (Knudsen, 2004; Meredith, 2015). In altricial mammals, the development of the

central and peripheral nervous system (CNS and PNS) is far from complete at birth. By example, myelination is a complex and plastic process that occurs during critical periods of development (prenatal and/or postnatal periods) and it is fundamental for the rapid and efficient transmission of action potentials through the axons. Myelination occurs by a symbiosis between axonal and glial cells, oligodendrocytes in the CNS and Schwann cells in the PNS. In the rat, myelination of the brain start around the middle of the lactancy period (around postnatal day [PND]16), peaks nearly to weaning and decline during the

## Chapter 25

# Postnatal development, electrophysiology, and sensory sural nerves

Angel I. Melo<sup>1</sup>, René Zempoalteca<sup>2</sup>, Vladimir Martínez-Álvarez<sup>3</sup>, Kurt L. Hoffman<sup>1</sup> and Ismael Jiménez-Estrada<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Centro de Investigación en Reproducción Animal, CINVESTAV Laboratorio Tlaxcala, Universidad Autónoma de Tlaxcala, Tlaxcala, México;

<sup>2</sup>Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta, Universidad Autónoma de Tlaxcala, Tlaxcala, México; <sup>3</sup>Laboratorio de Fisiología del Desarrollo, Departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias del CINVESTAV, IPN, Ciudad de México, México

### List of abbreviations

**AR** Artificial reared  
**BDNF** Brain-derived neurotrophic factor  
**cAMP** Cyclic adenosine monophosphate  
**CAP** Compound action potential  
**CNS** Central nervous system  
**GDNF** Glial cell line–derived neurotrophic factor  
**GFAP** Glial fibrillary acidic protein  
**GGF** Glial growth factor  
**IGF-1** Insulin growth factor 1  
**MAG** Myelin-associated glycoprotein  
**MR** Mother reared  
**Nrg1** Neuregulin 1  
**NT3** Neurotrophin-3  
**P0** Protein 0  
**PMP22** Peripheral myelin protein 22  
**PND** Postnatal days  
**PNS** Peripheral nervous system  
**SCs** Schwann cells

### Mini-dictionary of terms

**Artificial rearing** A experimental methodology by which an animal is reared artificially in isolation, without the mother and littermates.

**CAP** Electrophysiological response of a nerve.

**Development** A sequential series of processes and mechanisms that induce the growth and organization of organs and tissues.

**Hypomyelination** Decreased myelination.

**Maternal deprivation** Deprivation of mother–infant interactions.

**Myelination** A complex process that involves the interaction between glial cells and axons and is essential for the rapid transmission of action potentials.

**Neurotrophic factors** Peptides or small proteins that participate in the growth, survival, and differentiation of developing and mature neurons.

**Perinatal undernutrition** Severe food restriction during gestation and lactancy.

**Remyelination** Recovery of axonal myelination.

**Sensory fibers** Axons that originate from sensory receptors in the skin or muscles.