

UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ

FACULTAD DE MEDICINA

TRABAJO FIN DE GRADO EN FISIOTERAPIA



Comportamiento Motor en Ratones Prenatales

AUTOR: PAGÁN ESTEVE, RUBÉN

Nº Expediente: 1933

TUTOR: Dr Francisco J. Martini

Departamento y Área: Fisiología

Curso académico 2019–2020

Convocatoria de Junio

ÍNDICE

RESUMEN Y PALABRAS CLAVE.....	1
ABSTRACT AND KEYWORDS.....	2
1. INTRODUCCIÓN.....	3
2. HIPÓTESIS.....	5
3. OBJETIVOS.....	5
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	5
5. RESULTADOS.....	7
6. DISCUSIÓN.....	9
7. CONCLUSIONES.....	11
8. ANEXO DE FIGURAS Y TABLAS.....	12
9. BIBLIOGRAFÍA.....	19

RESUMEN Y PALABRAS CLAVE

La evidencia acumulada en los últimos años sugiere que los síndromes neurológicos detectados a temprana edad, como el autismo o la parálisis cerebral, están relacionados con deficiencias en el desarrollo cerebral en estadios fetales. Sería de una importancia crucial que obstetras y pediatras dispongan de herramientas fiables para evaluar el desarrollo neurológico en estadios fetales y neonatales con el objetivo de adelantar el diagnóstico de desórdenes neurológicos infantiles. Si bien, las consideraciones éticas limitan la experimentación en humanos; los modelos animales emergen como una herramienta indispensable para el estudio del desarrollo del neurológico fetal. Una estrategia para evaluar la ontogenia del sistema nervioso es observar el comportamiento motor del embrión, feto, o neonato. Es de crucial importancia validar modelos animales como unidades experimentales para la investigación del desarrollo neurológico y, así, conseguir conocer mejor el desarrollo neurológico humano. En este sentido, los ratones son muy valiosos por la cantidad de herramientas experimentales disponibles. El objetivo de este estudio fue observar el comportamiento motor expuesto por ratones prematuros nacidos un día antes de término combinando métodos de evaluación desarrollados para humanos junto con otros criterios extraídos de estudios con animales. La cuantificación de los distintos comportamientos nos dio como resultado frecuencias altas de sobresaltos y duraciones elevadas de movimientos generales. Los movimientos de las extremidades anteriores ocurrieron con mayor frecuencia respecto a las posteriores. Este estudio indaga sobre la trayectoria de desarrollo del comportamiento motor en ratones para un mayor conocimiento de la ontogenia del cerebro pre-término y post-término.

Palabras clave: comportamiento motor, desarrollo del sistema nervioso, embrión, feto, ratón.

ABSTRACT AND KEYWORDS

The evidence in recent years suggests that neurological syndromes detected at toddlerhood, such as autism or cerebral palsy, are related to deficiencies in brain development at fetal stages. It would be of crucial importance that obstetricians and pediatricians have tools to assess neurological development in fetal and neonatal stages to have an earlier diagnosis of childhood neurological disorders. As ethical considerations limit research on humans, animal models emerge as an indispensable tool study of neurodevelopmental studies. One strategy to assess the ontogeny of the nervous system is to observe the motor behavior of embryos, fetuses, or neonates. It is of crucial importance to validate animal models as experimental units for the investigation of nervous system development and, thus, to gain a better understanding of human neurological development. In this sense, mice are a valued choice due to the numerous genetic, molecular, cellular and physiological toolkits available. The main objective of this study was to observe the motor behavior exhibited by premature mice born one day before term, combining evaluation methods developed for humans together with other criteria extracted from studies with different species of animals. The quantification of the different behaviors gave us very high frequencies of startles and high durations of general movements, and movements of the forelimbs occurred more frequently compared to the hindlimb. This study is first approach to animal behavioral trajectory to get insights into pre-term and post-term neurological development.

Keywords: motor behavior, development of the nervous system, embryo, fetus, mice.

1. INTRODUCCIÓN

La evidencia acumulada en los últimos años sugiere que los síndromes neurológicos detectados en los primeros años de vida, como el autismo o la parálisis cerebral, están relacionados con deficiencias en el desarrollo del sistema nervioso que ocurren con gran antelación, en estadios fetales¹⁻². Sería de una importancia crucial que obstetras y pediatras tengan herramientas para evaluar el desarrollo neurológico en estadios fetales y neonatales para adelantar el diagnóstico de desórdenes neurológicos infantiles. Sin embargo, los métodos adecuados para el diagnóstico prenatal de la disfunción cerebral siguen siendo escasos³. Un obstáculo importante para la evaluación neuroconductual prenatal es la inaccesibilidad del feto⁴.

La tecnología disponible para ver y monitorear el feto ha progresado rápidamente desde la introducción de la ecografía a la obstetricia en la década de 1980⁵. Durante muchos años, la ecografía o ultrasonografía bidimensional (E2D) ha sido la técnica de evaluación más accesible e inocua, a pesar de la limitada calidad de las imágenes⁶. En esta época, la actividad motora fetal se estudiaba principalmente mediante ecografía transabdominal⁷. El desarrollo de técnicas no invasivas no solo proporcionó una visualización directa de la actividad motora fetal, sino que también permitió hacer observaciones repetidas y prolongadas de manera sistemática a lo largo del embarazo. De esta manera, se pudo investigar longitudinalmente la aparición y diferenciación del repertorio de movimientos prenatales de un feto humano⁶. Actualmente, la técnica estándar es la ecografía 4D (E4D) transvaginal de alta resolución que permitió obtener una descripción más detallada de la motilidad fetal. El transductor transvaginal permite un acercamiento mayor al embrión y al feto abriendo nuevas posibilidades en el estudio del desarrollo de los movimientos fetales durante las primeras etapas del desarrollo motor⁷. Si bien la E4D no es auténticamente en tiempo real y no logra identificar movimientos fetales breves (de menos de dos segundos), por encima de este umbral, los detecta desde antes de la semana 20 de gestación⁸⁻⁹.

A partir de 1970, el grupo de investigación de Prechtl y sus colaboradores focalizaron su atención en clasificar los movimientos espontáneos del feto utilizando la ecografía transabdominal. En sus trabajos pioneros, observaron que los movimientos espontáneos pueden ser agrupados en categorías que se repiten de manera consistente. Prechtl organizó estas secuencias de movimientos y los definió como patrones motores¹⁰. Los patrones de movimiento embrionario, fetal y neonatal son generados endógenamente. Es decir, en ausencia de un estímulo sensorial específico, el sistema nervioso del feto o neonato genera una variedad de patrones motores como sobresaltos, movimientos generales (GM), movimientos respiratorios, estiramientos, bostezos, succiones, movimientos de la cabeza de lado a lado (enraizamiento) o movimientos oculares. Estos patrones de movimiento son generados por redes

neuronales específicas, denominados generadores de patrones centrales (GPC), que se encuentran en el tronco encefálico¹, y que activan fibras musculares inmaduras⁷. Algunos GPC funcionan continuamente (por ejemplo, los involucrados en el patrón respiratorio), mientras que otros se activan de manera puntual (por ejemplo, succión o locomoción). En definitiva, actualmente se considera que los patrones motores fetales no son un epifenómeno del desarrollo sino un proceso necesario para la ontogenia correcta del sistema nervioso y muscular.

Desde el rico repertorio de distintos patrones de movimientos espontáneos que emergen durante el desarrollo, los llamados GM son los más frecuentes y complejos¹. Estos son una serie de movimientos que se producen en todo el cuerpo, en una secuencia variable, en el cuello, los brazos, el tronco y las piernas. Ocurren en el feto desde las 9 semanas de gestación en adelante y están presentes en el recién nacido prematuro y a término hasta un máximo de 20 semanas después del parto. La evaluación cualitativa de los GM es más importante para evaluar la integridad del sistema nervioso postnatal y joven que provocar reflejos^{3,11}. Las características más típicas de los GM normales son las siguientes: variación en la velocidad y amplitud del movimiento y complejidad del movimiento (variación en las partes del cuerpo participantes y la dirección del movimiento)⁷. La calidad de GM ha demostrado ser un predictor del normal desarrollo del sistema nervioso aún mejor que la ecografía cerebral neonatal³. En una revisión reciente, Bosanquet y colegas informaron estimaciones resumidas de sensibilidad y especificidad entre 98 y 91%, respectivamente, para la predicción de parálisis cerebral¹. Si se deteriora la integridad del sistema nervioso, los GM se vuelven monótonos, pierden su complejidad y fluidez o se vuelven breves y sincronizados^{3,11}. Durante los últimos 20 años de estudios infantiles, la atención se ha desplazado de probar exclusivamente los reflejos a evaluar adicionalmente los movimientos espontáneos¹. Así, el examen neurológico actual está constituido por dos tipos de signos: los relacionados con la movilidad espontánea, y los relacionados con las respuestas provocadas por estimulación externa.

Si bien, las consideraciones éticas limitan la experimentación con sujetos humanos en general. En contraste, los modelos animales comúnmente utilizados para estudiar el desarrollo del comportamiento neurológico fetal, como las ovejas y las ratas, no están obstaculizados por esta limitación⁴. Otra ventaja del estudio en roedores en especial es que permite experimentar en sujetos modificados genéticamente. Por lo tanto, los modelos animales han permitido llevar a cabo intervenciones no factibles en humanos debido a las consideraciones éticas mencionadas.

En 1996, Suzue y colaboradores compararon diferentes días de gestación en ratones (e11,5-e14,5) mediante un método de perfusión transplacentario *in vitro*. Los resultados demostraron, por primera vez, que los fetos de ratones a e12,5 generan movimientos organizados incluso fuera del útero. La naturaleza compleja pero ordenada de los movimientos, su sensibilidad a las drogas que afectan las funciones

neuronales y el efecto de la sección de la médula sugieren que el origen de los movimientos radica en el Sistema Nervioso Central (SNC)¹². A pesar de que la escala temporal del desarrollo cerebral es distinta entre roedores y humanos, la secuencia en la que se producen los eventos clave de maduración cerebral es muy consistente entre ambas especies, identificándose regiones de vulnerabilidad y consecuencias funcionales similares ante una lesión cerebral¹¹. Kleven y Ronca (2009) sugieren que el comportamiento del feto del ratón a e18 corresponde al desarrollo del humano en algún punto entre las 13 y 28 semanas de gestación. Las formas y patrones de movimiento, patrón cíclico, estados de comportamiento y respuestas evocadas y aprendidas son similares a las observadas en fetos humanos⁴. En el mismo sentido, Smotherman y colaboradores (1988) expusieron que los fetos de ratas y humanos exhiben ciclos de actividad de período corto con características similares, a pesar de las dramáticas diferencias en el tamaño corporal, la duración de la gestación y la madurez relativa al nacer entre las especies¹³.

2. HIPÓTESIS

La hipótesis es que el comportamiento motor embrionario o fetal sigue una trayectoria temporal en la que aparecen secuencialmente diferentes patrones de movimiento que permiten determinar hasta qué punto el desarrollo del sistema nervioso ocurre con normalidad.

3. OBJETIVOS

El objetivo principal de este estudio fue observar el comportamiento motor expuesto por ratones prematuros nacidos a e18 combinando el método de evaluación desarrollado por Prechtl, para humanos⁶, y por otros grupos para modelos animales⁴. Además, buscamos nuevos patrones relacionados con los movimientos de las extremidades y su correlación. De esta manera, pretendemos contribuir a validar modelos animales como unidades experimentales para la investigación del desarrollo neurológico y, así, conseguir conocer mejor el desarrollo neurológico humano.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

La presente investigación se desarrolló en el Laboratorio de la Dra López-Bendito del Instituto de Neurociencias bajo la supervisión del Dr Francisco J Martini. Es un estudio observacional en el que se grabó y analizó el comportamiento motor de 3 ratones e18 cuyos pesos fueron de 1,448, 1,413 y 1,339

gramos. Las crías fueron extraídas del útero un día antes de término y reanimadas hasta que respiraban con normalidad y presentaban un color rosado. A continuación, las crías se recuperaron durante una hora a 37°C. Para comenzar la grabación se colocó a las crías de a una por vez sobre una manta térmica a 37°C y se restringió el espacio de movimiento al campo visual de la cámara. La duración total de las grabaciones fue de 15 minutos para cada sujeto (Figura 1) y la adquisición se hizo a 5 fotogramas por segundo. La duración es similar a la utilizada en anteriores estudios, tanto en fetos humanos⁷, como en ratones⁴ y en ratas¹⁴, debido en parte a que la pausa más larga encontrada en el feto humano no habría superado los 13 minutos¹⁵.

El primer paso en el análisis fue definir los patrones de movimiento que se iban a registrar en las grabaciones. Estos fueron los contemplados en el método de Evaluación Cualitativa del Movimiento General desarrollado por HFR Prechtl para el feto y el lactante humano⁶ y utilizado posteriormente en animales⁴. Los comportamientos contemplados por este método fueron los siguientes: Sobresalto, es un movimiento generalizado rápido, siempre iniciado en las extremidades y que a veces se extiende al cuello y al tronco; GM, ocurren cuando se mueven todas las partes del cuerpo a velocidades variables pero no se pueden reconocer patrones o secuencias distintivas de las partes del cuerpo; Hipo, consiste en una contracción desigual del diafragma muy rápida y a menudo es seguido por movimientos pasivos de extremidades y/o cabeza; Flexión de la cabeza, movimiento de la cabeza que lleva la mandíbula hacia el pecho, Rotación de la cabeza, la cabeza se mueve de un lado al otro; Apertura de la mandíbula, el maxilar inferior se separa del superior; Movimientos bucales, cualquier movimiento de succión o deglución que incluye lamer; Bostezo, apertura amplia y prolongada de la mandíbula seguida de un cierre rápido; Garra-pata, la pata consigue contactar con la cabeza; Estiramiento, es un patrón motor complejo, que se realiza a baja velocidad y consiste en la extensión del tronco, retroflexión de la cabeza y extensión de las extremidades; Movimiento aislado de las patas, puede ser cualquier movimiento rápido o lento de las extremidades sin movimientos en otras partes del cuerpo. Por otro lado, también se analizaron los movimientos de las extremidades mediante la aparición de movimientos de amplitud alta o baja. Para ello, se hizo una distinción en los movimientos de las extremidades, dividiendo en movimientos de amplitud alta, que ocurren durante períodos de bajo tono muscular y se piensa que indican sueño activo, y movimientos de amplitud baja, donde hay un tono elevado e indican vigilia⁴.

Las grabaciones de video de los tres sujetos fueron analizadas posteriormente mediante el programa “BORIS”, el cual nos permitió categorizar los movimientos y determinar la duración exacta de cada uno. Para ello fue necesario revisar cada video en múltiples ocasiones a velocidad normal y a velocidad reducida (0,4X) para delimitar con exactitud el inicio y final de cada comportamiento. No fue posible disminuir más la velocidad de visualización debido a una falta de fotogramas por segundo para ello. Todos los videos fueron revisados por dos observadores de forma independiente. Una vez realizado el

análisis, el programa BORIS permite extraer los datos más relevantes para el estudio: número de ocurrencias de los comportamientos, frecuencia, duración total, porcentajes de actividad e inactividad, entre otros.

El análisis estadístico, las correlaciones y los gráficos fueron realizados en Excel y en Matlab con rutinas escritas especialmente para este trabajo. Las comparaciones entre las frecuencias y duraciones de los distintos comportamientos (duración GM-sobresalto, frecuencia GM-sobresalto, actividad-inactividad, extremidades anteriores-posteriores y movimientos de las extremidades de gran amplitud-baja amplitud) se realizaron mediante un test no paramétrico (prueba de Wilcoxon) ya que el tamaño de la muestra es pequeño. Las comparaciones realizadas entre las frecuencias y duraciones de todos los comportamientos fueron mediante ANOVA de un factor, y más tarde, para hacer las múltiples comparaciones entre las medias de cada uno se utilizó “Tukey Contrasts”. El nivel de significación fue $\alpha = 0,05$.

5. RESULTADOS

Basándonos en la clasificación de los patrones de movimientos embrionarios descritos por HFR Prechtl⁶, hemos analizados la presencia y frecuencia de diferentes categorías de comportamiento motor en crías prematuras (1 día antes de término) de ratón. Los patrones se cuantificaron en grabaciones de 15 minutos realizadas sobre una manta térmica a 37 grados. Antes de las grabaciones, las crías se recuperaron de la cesárea durante una hora en un ambiente atemperado. En cada uno de los animales observados ($N = 3$), pudimos registrar todas las categorías motoras derivadas de la clasificación Prechtl exceptuando los movimientos de rotación de la cabeza y bostezo. En la Figura 2A representamos la frecuencia de aparición de todos los tipos de movimientos que se encontraron a lo largo del tiempo de observación para cada sujeto, sin especificar el tipo de comportamiento. A pesar de que las crías se mueven con frecuencia, los movimientos no se encadenaron de manera continua. Todos los sujetos exhibieron episodios de actividad espontánea que se alternaban con periodos de inactividad ($42,4 \pm 3,0$ % y $57,6 \pm 3,0$ % respectivamente, $p = 0,108$, prueba de Wilcoxon) (Figura 2B). Mientras que la duración promedio de un periodo de actividad fue de $380,9s \pm 27,6$ segundos, el periodo de inactividad promedio se extendió por $517,6 \pm 27,6$ segundos ($p = 0,108$, prueba de Wilcoxon; Figura 2C).

Las crías se mostraron activas con un promedio de $11,8 \pm 1,5$ movimientos por minuto. Los movimientos clasificados como sobresaltos aparecieron con mayor frecuencia ($p = 6,3 \times 10^{-9}$, 1-way-ANOVA), la mayoría de las demás categorías mostraron frecuencias intermedias con la excepción de garra-pata y estiramiento cuya frecuencia fue mínima. Específicamente, la frecuencia media de ocurrencia de los distintos comportamientos en las crías analizadas fue la siguiente (en

movimientos/min): GM igual a $0,76 \pm 0,12$; hipo igual a $1,02 \pm 0,19$; flexión de la cabeza igual a $0,33 \pm 0,038$; apertura de la mandíbula igual a $0,2 \pm 0,038$; movimientos bucales igual a $0,84 \pm 0,058$; garra-pata igual a $0,066 \pm 0,066$; estiramiento igual a $0,044 \pm 0,022$; y finalmente, sobresalto igual a $4,22 \pm 0,53$ (Figura 3). Los sobresaltos aparecen con más frecuencia que los demás tipos de movimiento, en especial, sobrepasan a los GM ($p < 0.01$, 1-way-ANOVA y Tukey Contrasts).

Los sobresaltos fueron el tipo de movimiento más frecuente; sin embargo, su duración fue la relativamente breve con respecto a la duración de los GM ($p < 0,001$, 1-way-ANOVA y Tukey Contrasts). Los GM fueron el caso contrario, frecuencia baja y duración larga ($p = 7,4 \times 10^{-10}$, 1-way-ANOVA). Entre ambos tipos de comportamiento componen el $72 \pm 7,9\%$ del total. La duración total en segundos de cada comportamiento fue la siguiente: para los GM $240,8 \pm 47,3$ (26,8%), hipo $7,4 \pm 2,5$ (0,8%), flexión de la cabeza $3,2 \pm 0,3$ (0,4%), apertura de la mandíbula $3,6 \pm 1,1$ (0,4%), movimientos bucales $17,5 \pm 4,7$ (1,9%), garra-pata $2,7 \pm 2,7$ (0,3%), estiramiento $1,3 \pm 0,7$ (0,14%), y sobresalto $33,3s \pm 2,1$ (3,7%) (Figura 4A). En la Figura 4B, mostramos el “raster plot” de una de las crías analizadas donde se grafica cada uno de los eventos separados por tipo de comportamiento. En este tipo de gráfica es posible observar con claridad la activación repetida de los sobresaltos a lo largo del tiempo de grabación y la duración prolongada de los GM cada vez que se detectó su aparición.

El movimiento de las extremidades es una de las características distintivas en estos estadios inmaduros. Cuantificar este tipo de movimiento es difícil porque los sujetos suelen estar de lado, ocultando un par de extremidades. Por lo tanto, seguramente los valores estén subestimados. La frecuencia media de activación de las extremidades fue la siguiente (en movimientos/min): extremidad anterior-derecha igual a $1,6 \pm 0,40$; extremidad anterior-izquierda igual a $0,98 \pm 0,16$; extremidad posterior-derecha igual a $0,96 \pm 0,39$; y extremidad posterior-izquierda igual a $0,78 \pm 0,39$ (Figura 5A). En las crías analizadas detectamos que los movimientos de las extremidades anteriores ocurren con mayor frecuencia respecto a las posteriores ($38,7 \pm 8,4$ y $25,9 \pm 11,7$ mov/15 min, respectivamente, $p = 0,108$, prueba de Wilcoxon) (Figura 5B). En 2 de las crías analizadas la diferencia fue más notoria aún (Figura 5D). Además, hemos discriminado como en trabajos previos entre movimientos de recorrido corto y de recorrido largo⁴. El número de movimientos de baja amplitud de las extremidades excedió en más del doble al de movimientos de alta amplitud ($44,9 \pm 9,8$ y $19,7 \pm 10,5$, respectivamente, $p = 0,108$, prueba de Wilcoxon) (Figura 5C). Estos resultados sugieren un estado de desarrollo más avanzado de las secciones superiores de la médula espinal y del tronco del encéfalo en concordancia con resultados previos de varios grupos de investigación.

A esta edad las crías de ratón todavía no utilizan las extremidades para la locomoción típica pero solo en unos días lograrán moverse como sus pares jóvenes o adultos. Sería interesante observar si los patrones de movimiento de las extremidades se asemejan a los descritos en estadios más maduros. En un primer acercamiento a este tema, hemos analizado el nivel de sincronía de los movimientos entre los

diferentes pares de extremidades. Para ello, hemos correlacionado los registros de movimiento de las extremidades a tiempo cero y con diferentes retrasos. Los resultados muestran, en primera instancia, que las extremidades correlacionan más en el plano horizontal (izquierda/derecha) antes que en el plano sagital (anterior/posterior) (Figura 6A). Y, además, en las gráficas se observa que una extremidad anterior se activa dentro de los 2 segundos de la activación de su par contralateral y no de su homólogo ipsilateral. Lo mismo ocurre con las extremidades posteriores (Figura 6B).

6. DISCUSIÓN

Los resultados de este trabajo muestran la presencia de distintas categorías de comportamiento motor y la cuantificación del movimiento de las extremidades en ratones nacidos el día 18 de gestación, un día antes de término. Estos datos significan el inicio de una investigación que pretende caracterizar e intervenir en el desarrollo de la actividad espontánea motora en embriones de ratón y en neonatos, pre-término y post-término.

Respecto al movimiento de las extremidades, los ratones alternaron entre fases de actividad y de reposo, aunque la tasa promedio de movimientos espontáneos de las extremidades dista de la reportada en estudios realizados en ratas en el día 20 de gestación (22,9 mov/min)¹⁴. Este hecho fue inesperado debido a la mayor tasa metabólica de los ratones¹⁶. Puede ser que la diferencia se deba a que en ratas se contabilizaron todos los movimientos de las extremidades (fuesen movimientos aislados o parte de otros movimientos), sin embargo, nosotros tuvimos en cuenta solo los movimientos aislados de las extremidades.

Otra observación que se desprende de nuestro estudio es que el movimiento de sobresalto tuvo una tasa promedio de ocurrencias muy superior al resto de comportamientos. Por otro lado, los GM fueron el tipo de movimiento de mayor duración. En publicaciones previas en ratones el mismo día, los GM fueron mucho más frecuentes observando frecuencias superiores a 100 mov/hora (1,67 por minuto) para todas las crías y en el caso de sobresalto junto con garra-pata y los movimientos bucales aparecieron en tasas de 1 a 8 por minuto⁴. En estudios con fetos humanos se encontraron que los GM ocurrían en tasas muy superiores y supusieron entre el 11,5% al 15,5% del total de ocurrencias entre la semana 10 y 19 de gestación. Sin embargo, en nuestro estudio se encontró entre el 5,8% y 7,2%. Por otra parte, el movimiento de sobresalto apareció con una incidencia media muy inferior, de 14 sucesos por hora (0,233 por minuto) entre la semana 14 y 19 de gestación¹⁵.

En cuanto a los movimientos bucales y garra-pata, en el presente estudio encontramos que fueron menos frecuentes que el sobresalto, siendo garra-pata un movimiento casi inexistente. Sin embargo, en

estudios realizados en fetos humanos el contacto de la mano a la cara (“*Hand-face contact*”) es bastante común, visible a partir de las 12 semanas en adelante, mientras que los movimientos bucales ocurren con poca frecuencia¹⁵, siendo su tasa de aparición inferior a la reportada en el presente estudio. También, es necesario aclarar que garra-pata fue un movimiento difícil de analizar debido a la posición de la cámara y la calidad de grabación, ya que no se percibía bien si realmente la pata había contactado con la cabeza o no. Este puede ser el motivo de que haya sido un movimiento muy poco frecuente a diferencia de lo reportado en los estudios comentados anteriormente.

Comportamientos como el hipo que aparecieron en frecuencias altas en este estudio, también tuvieron una incidencia notablemente alta en estudios en fetos humanos con valores medios de aproximadamente 100 ocurrencias por hora (1,67 por minuto) entre la semana 11 y 17 de gestación¹⁵ y en otro estudio fue el patrón de movimiento más frecuente a partir de la semana 9 de gestación⁹. Por otro lado, comportamientos que encontramos con poca frecuencia como estiramiento, bostezo, rotación de la cabeza y flexión de la cabeza en este estudio, también se encontraron con poca frecuencia en el feto humano^{9,15} y en estudios en ratones en el día e18⁴.

En estudios en ratones prenatales encontramos que la tasa de ocurrencias de las extremidades anteriores superaba casi en el doble a la observada en las extremidades posteriores⁴, muy similar a lo encontrado en el presente estudio. Este hecho, también se ha podido observar en fetos humanos entre las semanas 8 y 19 de gestación¹⁵ y en otro estudio, entre las semanas 7 y 14¹⁷. En cambio, en estos dos últimos estudios se reportó que la aparición de los movimientos de gran amplitud de las extremidades excedió a la de los movimientos de baja amplitud en ambos pares de extremidades, justamente lo contrario a lo observado en nuestro estudio. Nosotros hemos observado que los movimientos de baja amplitud superan en más del doble a los de alta amplitud. Por lo tanto, se necesita más investigación al respecto para determinar qué es lo que ocurre con certeza con la amplitud de los movimientos.

Los distintos comportamientos encontrados en la observación de los ratones plantean la pregunta de a qué estadio de la gestación humana correspondería su aparición. Observando los periodos de aparición en el feto humano de los comportamientos que aparecen más tarde como movimientos bucales y estiramiento se podría hacer una aproximación del momento a partir del cual estaría incluido el día e18 del ratón. Según de Vries y colaboradores, en 2008, estimaron su aparición en la semana 11 y 12-13, respectivamente⁷. En 2014, Cabanyes Truffino situó en la semana 12,5-14,5 y 10,5-15,5, respectivamente⁸. Por otro lado, otros estudios en ratones prenatales situaron el día e18 entre las semanas 13 y 28 de gestación⁴.

Una alternativa para definir patrones de comportamiento motor que no descansa en el criterio subjetivo del investigador sería utilizar métodos computacionales de aprendizaje automático. Hemos probado un programa libre (DeepLabCut) que permite etiquetar diferentes regiones del cuerpo en distintos cuadros de la grabación (Figura 7). Luego, los algoritmos se encargan de seguir el

desplazamiento de los puntos a lo largo del tiempo y, de esta manera, aprender los movimientos del sujeto animal o humano. Con los datos guardados de la posición en el espacio a cada tiempo de las diferentes partes del cuerpo, se pueden aplicar otros algoritmos diseñados para identificar patrones. Esta sería una estrategia más objetiva para definir qué es y qué no es un patrón motor consistente y sería una probable línea de investigación futura.

Es posible que el tamaño reducido de nuestra muestra haya sido el causante de las diferencias encontradas con estudios previos. Si bien teníamos planeados más experimentos, los hemos suspendido a causa del Estado de Alarma generado por el COVID-19.

7. CONCLUSIONES

Aunque el tamaño reducido de la muestra y la evaluación de una sola etapa del desarrollo podrían ser factores que debilitan los resultados obtenidos, este estudio nos ha permitido observar el comportamiento motor expuesto por ratones prematuros nacidos a e18 y a partir de estos comportamientos, poder corroborar la validez del método propuesto por Prechtl, al menos para ratones de esta edad. De este modo, para futuras investigaciones sería ideal realizar un estudio similar contando, no solo con una muestra más grande, sino también haciendo un seguimiento durante un periodo de observación mayor para capturar la evolución de los patrones a lo largo del desarrollo embrionario y neonatal. Sin embargo, este estudio es un primer acercamiento hacia el estudio del desarrollo neurológico animal para llegar a conocer con mayor profundidad la ontogenia del sistema nervioso.

8. ANEXO DE FIGURAS Y TABLAS

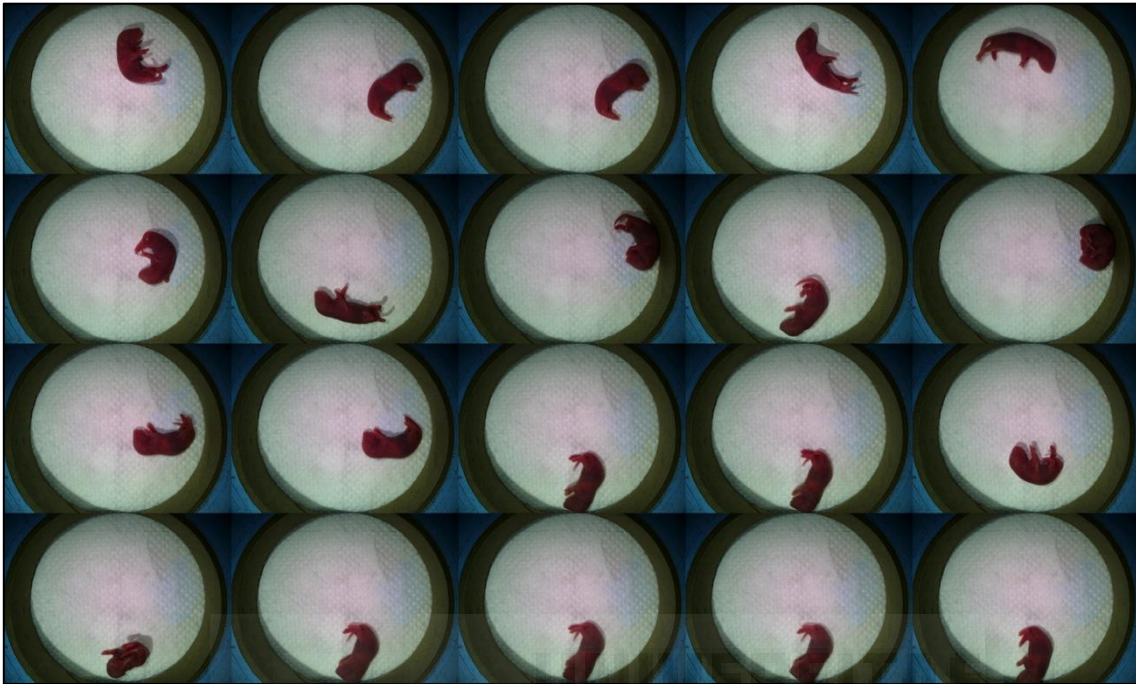


Figura 1. Veinte fotogramas en orden cronológico, pero no consecutivos, de una de las grabaciones. El tiempo discurre de izquierda a derecha y de arriba hacia abajo.

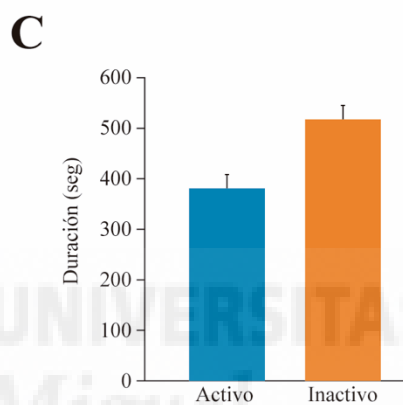
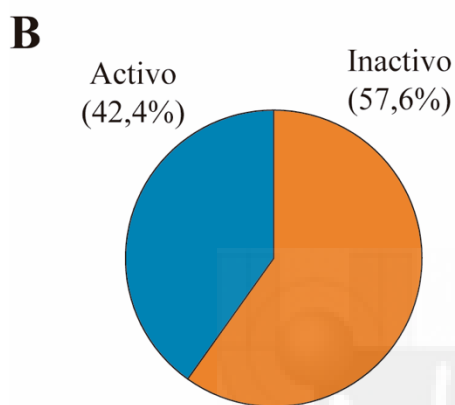
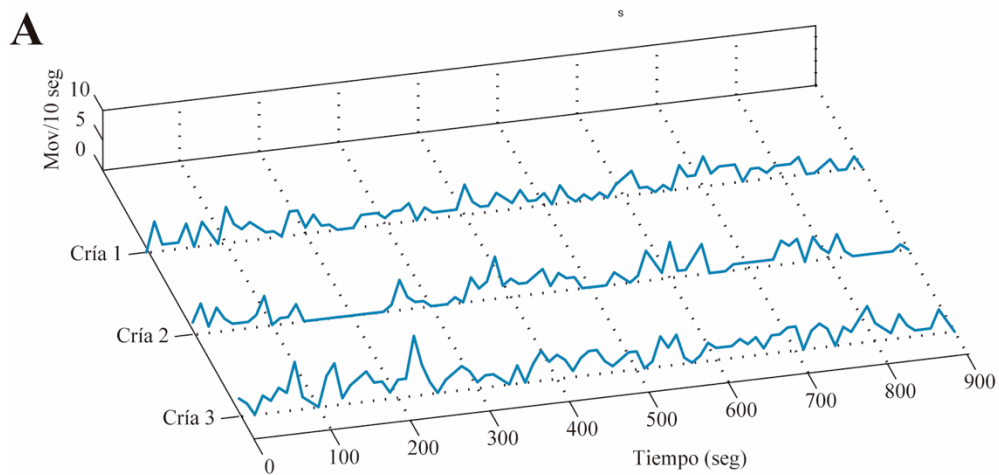


Figura 2. Cuantificación del movimiento total de las crías nacidas a e18 y los periodos de reposo. A) Registro individual de cada cría en función del tiempo. Los movimientos están cuantificados en segmentos de 10 segundos. B) Porcentajes promedio del tiempo que pasan las crías en periodos de actividad e inactividad durante el total de la grabación. C) Duración media de los periodos de actividad e inactividad (Media \pm SEM).

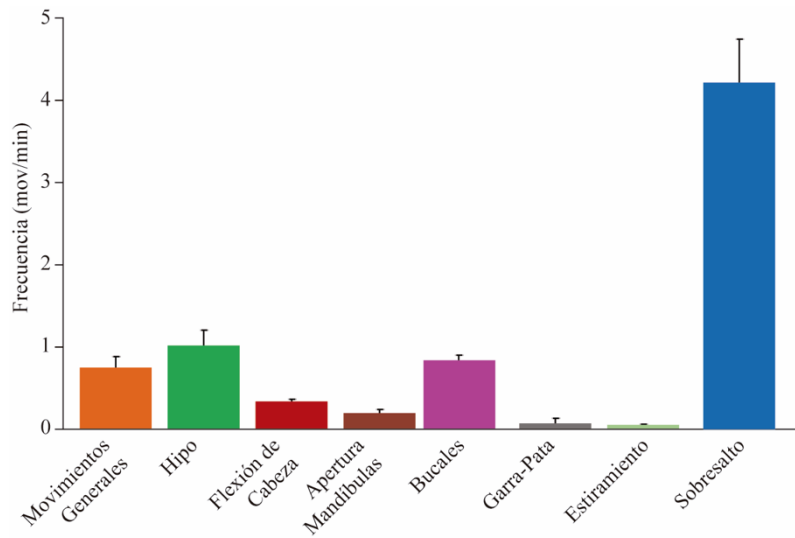


Figura 3. Frecuencia de aparición promedio, medida en movimientos por minuto, de los diferentes tipos de comportamiento motor en crías de ratón nacidas 1 día antes de término (Media \pm SEM).



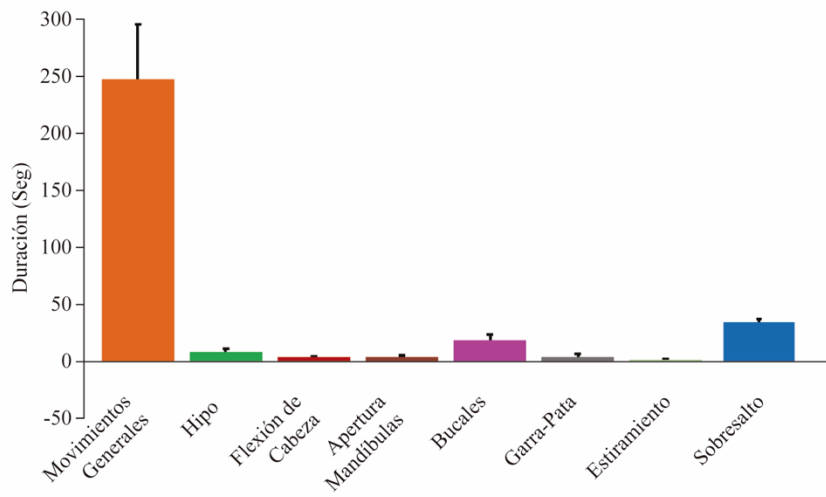
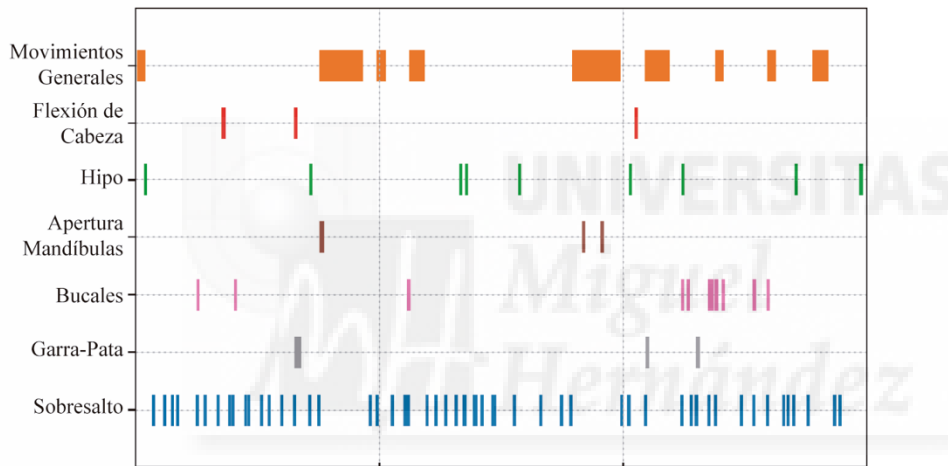
A**B**

Figura 4. A) Duración promedio de cada uno de los diferentes tipos de comportamiento motor en crías de ratón nacidas 1 día antes de término (Media \pm SEM). B) “Raster plot” de los tipos de comportamiento motor graficados en A.

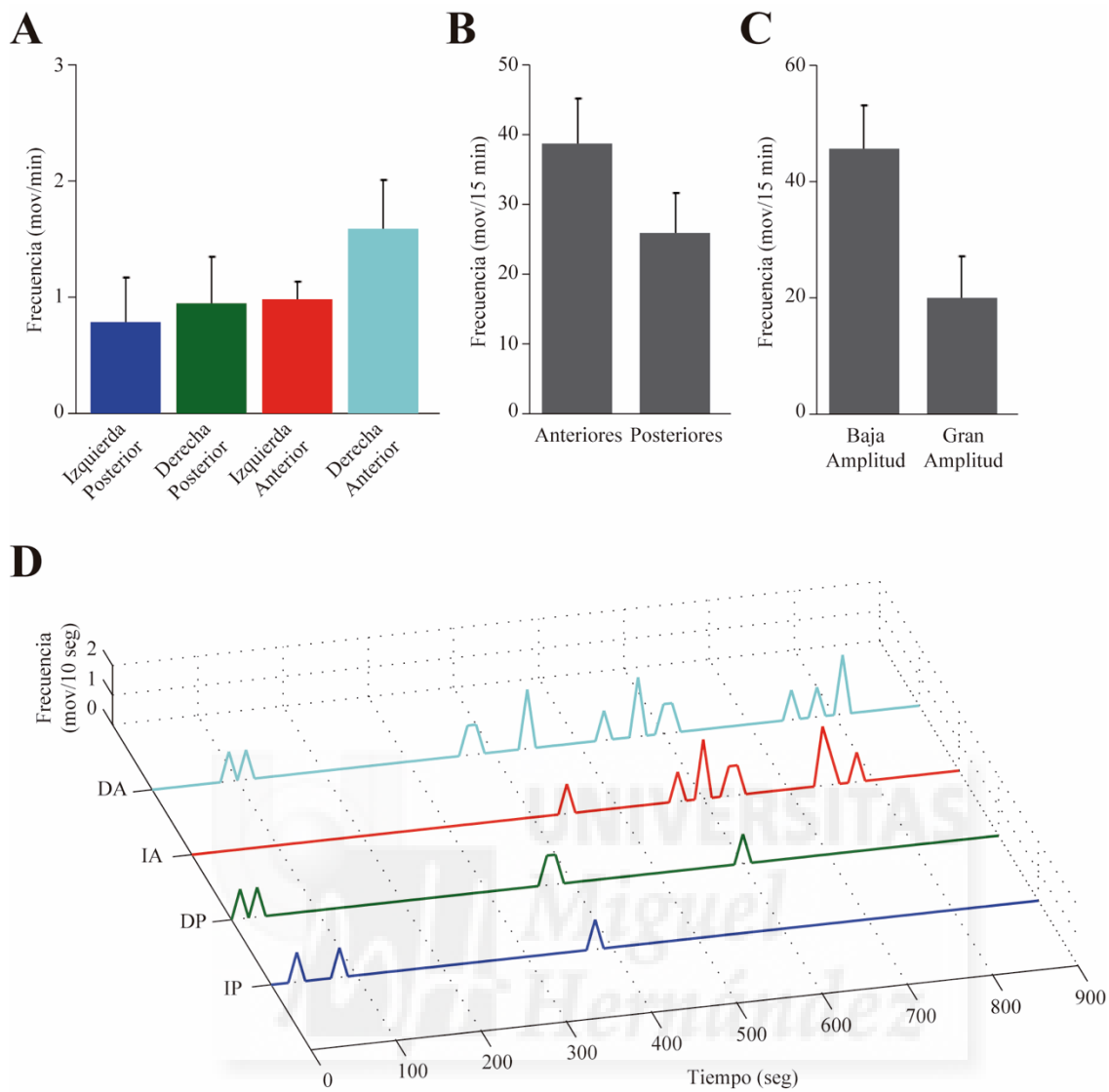


Figura 5. Cuantificación del movimiento de las extremidades. Los movimientos están cuantificados en segmentos de 10 segundos. A) Frecuencia promedio de movimiento de las extremidades, medida en movimientos por minuto, de los diferentes tipos de comportamiento motor en crías de ratón nacidas 1 día antes de término (Media \pm SEM). B) La frecuencia de movimiento de las extremidades agrupadas en anteriores y posteriores (Media \pm SEM). C) La frecuencia de movimiento de las extremidades agrupadas movimientos de baja y alta amplitud (Media \pm SEM). D) Registro individual del movimiento de cada extremidad en función del tiempo. DA: derecha-anterior; IA: izquierda-anterior; DP: derecha-posterior; IP: izquierda-posterior.

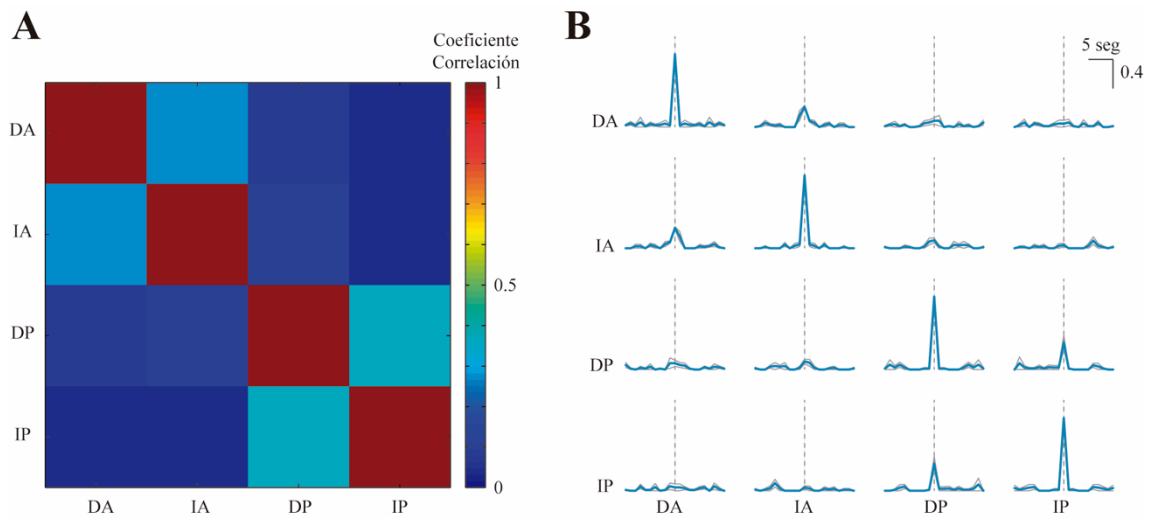


Figura 6. Análisis del grado de correlación en el movimiento de las extremidades de las crías de ratón prematuras (1 día). Los datos de movimientos fueron agrupados en períodos de tiempo de 1 segundo. DA: derecha anterior; IA: izquierda anterior; DP: derecha posterior; IP: izquierda posterior. A) Coeficientes de correlación de Pearson entre pares de extremidades (media \pm SEM). DA-IA: 0.28 ± 0.02 ; DA-DP: 0.085 ± 0.043 ; DA-IP: 0.046 ± 0.056 ; DP-IP: 0.37 ± 0.098 ; DP-IA: 0.11 ± 0.031 ; IP-IA: 0.044 ± 0.024 . B) Correlaciones cruzadas con auto-correlaciones a tiempo 0 (línea de puntos) normalizadas a 1 (media, línea azul continua; SEM, línea gris continua).

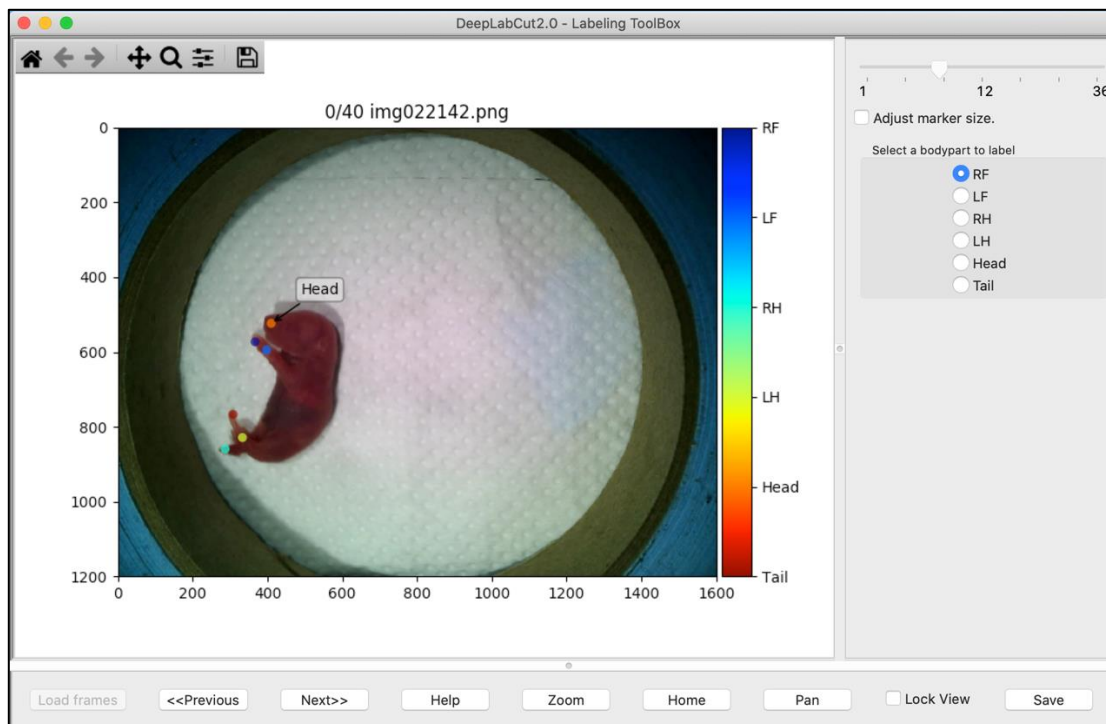


Figura 7. Captura de pantalla del procedimiento para el etiquetado de las diferentes partes del cuerpo en un fotograma de la grabación utilizando el programa DeepLabCut. RF: extremidad anterior derecha; LF: extremidad anterior izquierda; RH: extremidad posterior derecha; LH: extremidad posterior izquierda; Head: cabeza; Tail: cola.

Miguel
Hernández

9. BIBLIOGRAFÍA

1. Marschik PB, Pokorny FB, Peharz R, Zhang D, O'Muircheartaigh J, Roeyers H et al. A Novel Way to Measure and Predict Development: A Heuristic Approach to Facilitate the Early Detection of Neurodevelopmental Disorders. *Curr Neurol Neurosci Rep.* 2017;17(5):43.
2. Courchesne E, Gazestani V, Lewis N. Prenatal Origins of ASD: The When, What, and How of ASD Development. 2020;43(5):326-342.
3. Prechtl HF, Einspieler C. Is neurological assessment of the fetus possible? *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 1997; 75(1):81-4.
4. Kleven GA, Ronca AE. Prenatal behavior of the C57BL/6J mouse: a promising model for human fetal movement during early to mid-gestation. *Dev Psychobiol.* 2009;51(1):84-94.
5. DiPietro JA. Neurobehavioral assessment before birth. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev.* 2005;11(1):4-13.
6. de Vries JI, Visser GH, Prechtl HF. The emergence of fetal behaviour. I. Qualitative aspects. *Early Hum Dev.* 1982;7(4):301-22.
7. Lüchinger AB, Hadders-Algra M, van Kan CM, de Vries JI. Fetal onset of general movements. *Pediatr Res.* 2008;63(2):191-5.
8. Cabanyes Truffino J. El comportamiento fetal: una ventana al neurodesarrollo y al diagnóstico temprano. *Rev Pediatr Aten Primaria.* 2014;16:251.e101-e110.
9. Andonotopo W, Medic M, Salihagic-Kadic A, Milenkovic D, Maiz N, Scazzocchio E. The assessment of fetal behavior in early pregnancy: comparison between 2D and 4D sonographic scanning. *J Perinat Med.* 2005;33(5):406-14.
10. Basso G. Neurodesarrollo en Neonatología: intervención ultratemprana en la Unidad de Cuidados Intensivos Neonatales. 1ª ed. Buenos Aires: Médica Panamericana; 2016.
11. Macias L, Fagoaga J. Fisioterapia en Pediatría. 2ª ed. Madrid: Médica Panamericana; 2018.
12. Suzue T. Movements of mouse fetuses in early stages of neural development studied in vitro. *Neurosci Lett.* 1996;218(2):131-4.

13. Smotherman WP, Robinson SR, Robertson SS. Cyclic motor activity in the fetal rat (*Rattus norvegicus*). *J Comp Psychol*. 1988;102(1):78-82.
14. Ronca AE, Kamm K, Thelen E, Alberts JR. Proximal control of fetal rat behavior. *Dev Psychobiol*. 1994;27(1):23-38.
15. de Vries JI, Visser GH, Prechtl HF. The emergence of fetal behaviour. II. Quantitative aspects. *Early Hum Dev*. 1985;12(2):99-120.
16. Kleiber M. Body size and metabolic rate. *Physiological Reviews*. 1947; 27(4):511–541.
17. Kurjak A, Andonotopo W, Hafner T, Salihagic Kadic A, Stanojevic M, Azumendi G, et al. Normal Standards for Fetal Neurobehavioral Developments--Longitudinal Quantification by Four-Dimensional Sonography. *J Perinat Med*. 2006;34(1):56-65.
18. Marschik PB, Einspieler C. Of pioneers and advancements related to general movement assessment. *Eur J Paediatr Neurol*. 2018;22(4):584-585.
19. Roberto ME, Brumley MR. Prematurely delivered rats show improved motor coordination during sensory-evoked motor responses compared to age matched controls. *Physiol Behav*. 2014;130:75-84.
20. Einspieler C, Prechtl HF. Prechtl's assessment of general movements: a diagnostic tool for the functional assessment of the young nervous system. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev*. 2005;11(1):61-7.
21. Legido A, Valencia I, Smith JD. Evaluación neurológica del feto. *Rev Neurol*. 2004;39(5):454-64.
22. Nijhuis JG. Behavioural states: concomitants, clinical implications and the assessment of the condition of the nervous system. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 1986;21(5-6):301-8.