

154
2ej.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

EFFECTOS DE LA DESNUTRICION CRONICA EN LAS CELULAS BIRRAMIFICADAS DE LA COR- TEZA VISUAL DE LA RATA

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

B I O L O G A

P R E S E N T A

BERTHA PEREZ LOPEZ

ASESORA DE TESIS

DRA. SOFIA YOLANDA DIAZ MIRANDA



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

INDICE

RESUMEN

..... **1**

INTRODUCCION

..... **1**

CARACTERISTICAS ANATOMICAS DE LAS CELULAS

PIRAMIDALES..... **3**

CARACTERISTICAS ANATOMICAS DE LAS CELULAS

BIPOLARES..... **5**

CARACTERISTICAS ANATOMICAS DE LAS CELULAS

NO PIRAMIDALES..... **7**

ORIGEN DE LAS CELULAS NO PIRAMIDALES EN LA

NEOCORTEZA DE LA RATA..... **10**

DESARROLLO NEURONAL Y DESNUTRICION..... **14**

OBJETIVOS

..... **21**

HIPOTESIS

..... **21**

MATERIAL Y METODOS

..... **22**

MANEJO HISTOLOGICO DE LOS CEREBROS..... **23**

a) FIJACION..... **23**

b) TECNICA DE GOLGI..... **24**

c) SELECCION DEL AREA DE ESTUDIO..... **25**

d) OBTENCION DE DATOS..... **26**

RESULTADOS	28
I. ASPECTOS CUALITATIVOS DE LAS CELULAS BIRRAMIFICADAS.....	28
II. ASPECTOS CUANTITATIVOS PRODUCIDOS POR LA DESNUTRICION DE 8% Y 6% DE CASEINA EN LAS CELULAS BIRRAMIFICADAS.....	30
III. ASPECTOS CUANTITATIVOS EN LAS CELULAS BIRRAMIFICADAS POR LA EDAD.....	31
DISCUSION	34
CONCLUSIONES	42
REFERENCIAS	44

R E S U M E N .

Las células no piramidales de la corteza cerebral, tienen un patrón de diferenciación y desarrollo posnatal. En el periodo de maduración pueden ser seriamente alteradas por la desnutrición, en sus patrones dendríticos y sinápticos, representados por las densidades de dendritas y espinas, lo que puede producir efectos a largo plazo en las funciones de esta región cerebral. En nuestro estudio se emplearon dos dietas isocalóricas e hipoproteínicas de 8% y 6% de caseína en los estados prenatal, posnatal y fueron mantenidas a lo largo de la vida del animal. Se estudiaron los efectos sobre un tipo de células no piramidales clasificadas como birramificadas, en la corteza visual de ratas macho, a los 30, 90 y 220 días de edad. Para el estudio fueron procesados 5 cerebros con la técnica de Golgi rápido y de éstos se estudiaron 20 neuronas en cada dieta y se compararon con las de los animales control nutridos con una dieta de 25% de caseína. El estudio morfométrico se realizó en: el tamaño del soma, en la extensión lineal de las ramas dendríticas y en el número de espinas en un segmento de 50 micras en cada célula. Los resultados revelaron que el eje mayor se redujo de manera significativa en los animales de 30 días alimentados con la dieta de 6% de caseína y a los 220 días con la dieta de 8%. La extensión lineal y el número de espinas se redujeron de manera similar a los 30 y 220 días en los animales con dieta de 6% al igual que el número de espinas a los 90 y 220 días.

Con relación a los cambios producidos por la edad, los animales control mostraron aumento significativo en el tamaño del soma de los 30 hasta los 220 días de edad y un aumento del número de espinas entre 30 y 90 días. Los animales nutridos con 8%, mostraron un aumento significativo en el número de espinas entre 30 y 90 días, las que disminuyeron entre 90 y 220 días. Los animales alimentados con la dieta 6%, aumentaron su tamaño celular y la extensión lineal dendrítica entre 30 y 90 días, y redujeron de manera significativa el eje menor entre los 90 y 220 días. Estos estudios ponen de manifiesto que las células no piramidales birramificadas, son afectadas morfológicamente por la desnutrición pre y postnatal, y que estas alteraciones probablemente se manifiesten a largo plazo en las funciones visuales y motoras integrativas de naturaleza conductual.

I N T R O D U C C I O N

El conocimiento actual de la organización anatómica de la corteza cerebral de los mamíferos se basa en parte, en los estudios pioneros de Francesco Gennari en 1776, (citado por Kulenbeck, 1970) quién identificó en la corteza visual primaria en el hombre, una línea de fibras que actualmente lleva su nombre. Después, Camilo Golgi, en 1886 (citado por Beritoff, 1965) describió el método para el estudio de la citoarquitectura cerebral, y Ramón y Cajal en 1911 analizó de una manera más fina las distintas poblaciones celulares que constituyen el Sistema Nervioso Central (SNC) del hombre y los vertebrados e hizo además, estudios anatómicos comparativos de la histogénesis celular. La escuela alemana representada por Brodmann (1909), Voght y Voght (1919) y Lorente de Nó (1938), se interesó en el plan de estratificación cortical. Fue Brodmann en 1909 quien propuso que el concepto morfológico está basado en el desarrollo embriológico del SNC, por lo que las distintas capas que forman a la corteza son heterogéneas. Voght (1919) denominó allocortex e isocortex al arquipallium y neopallium respectivamente y Lorente de Nó (1938) estudió al isocortex y lo dividió en lámina externa e interna. Krieg (1946) identificó en el cerebro de la rata (Fig. 1), a la corteza piriforme, que corresponde a la corteza visual primaria descrita por Campbell en 1905 y al área 17 según la nomenclatura propuesta por Brodmann en 1909 en el cerebro del

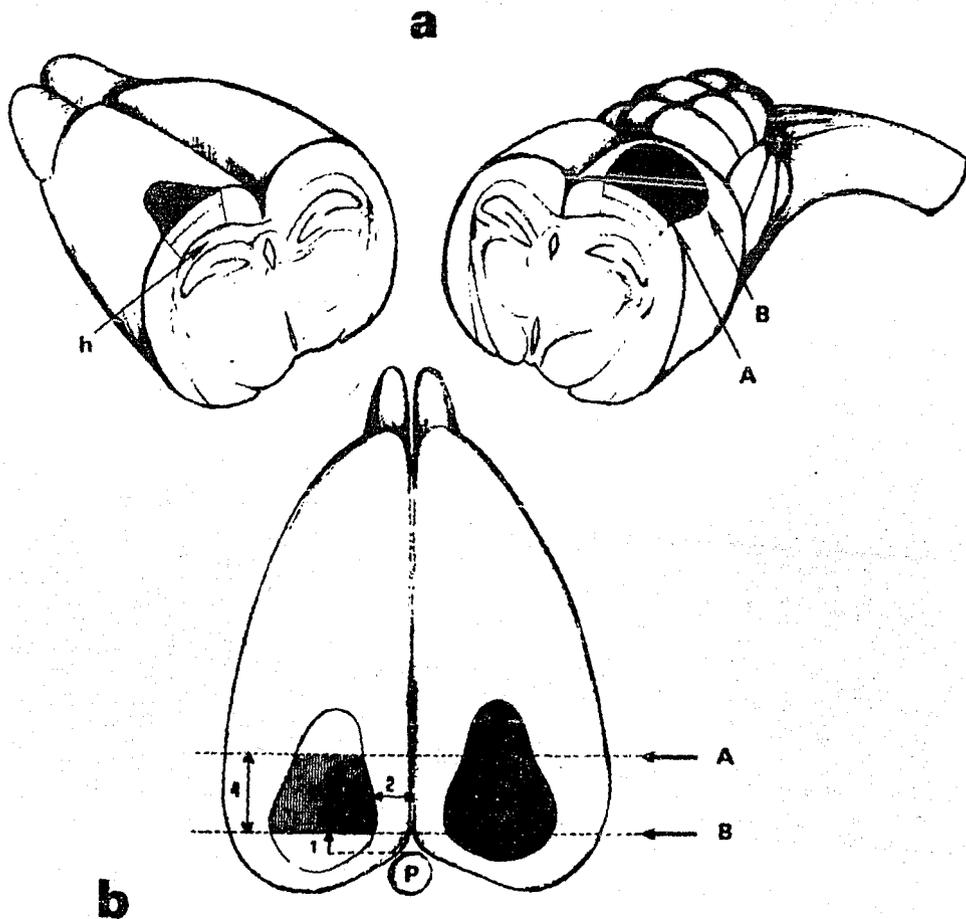


Fig. 1a, Corte frontal del cerebro de rata, indicando con el área sombreada, la corteza visual primaria (área 17), A y B son los límites del corte; 1b, indica el área del bloque de 0.064 cc, de la corteza piriforme tomada en sentido rostro caudal, a 1 mm del cuerpo pineal (P) a 2 mm de la línea sagital y 4 mm de profundidad por encima de la porción ventral del hipocampo (h).

hombre. Posteriormente, la metodología del estudio de la corteza pasó de cualitativa a cuantitativa, con los estudios morfométricos propuestos por Mitra (1955), Sholl (1956) y Bok (1956); quienes describieron la arquitectura de los elementos neuronales en cuanto a la organización de las dendritas (dendroarquitectura) y de las fibras (mieloarquitectura) en diferentes mamíferos (Szentágothai 1974) y en el hombre (Poliakov 1974).

A pesar de lo basto e importante de los estudios mencionados, el criterio para la clasificación celular ha sido discutido ampliamente, los estudios se basan desde la organización del axón y las dendritas, hasta el tipo de espinas y sinapsis que se establecen en cada neurona. Por ejemplo Sholl en 1922 (citado por Beritoff, 1965), propuso cerca de 40 tipos celulares diferentes en la corteza visual de la rata y en 1936 redujo su clasificación a sólo 5 tipos. Desde 1886 Golgi ya había distinguido 2 poblaciones celulares, con base en la organización del axón en células piramidales o de proyección, conocidas como Golgi tipo I (Figs. 2, 3f, g *) y otras que forman circuitos locales o Golgi tipo II (Figs. 3a, b, c, d, e, h); cuyos axones permanecen en la corteza. Esta nomenclatura, con algunas variantes, se ha adoptado en distintos estudios anatómicos. En el conejo, Globus y Scheibel (1967) localizaron dos clases de neuronas con base en sus patrones estructurales: la clase I incluye a las pirámides de cualquier tipo: grandes, pequeñas y medianas las

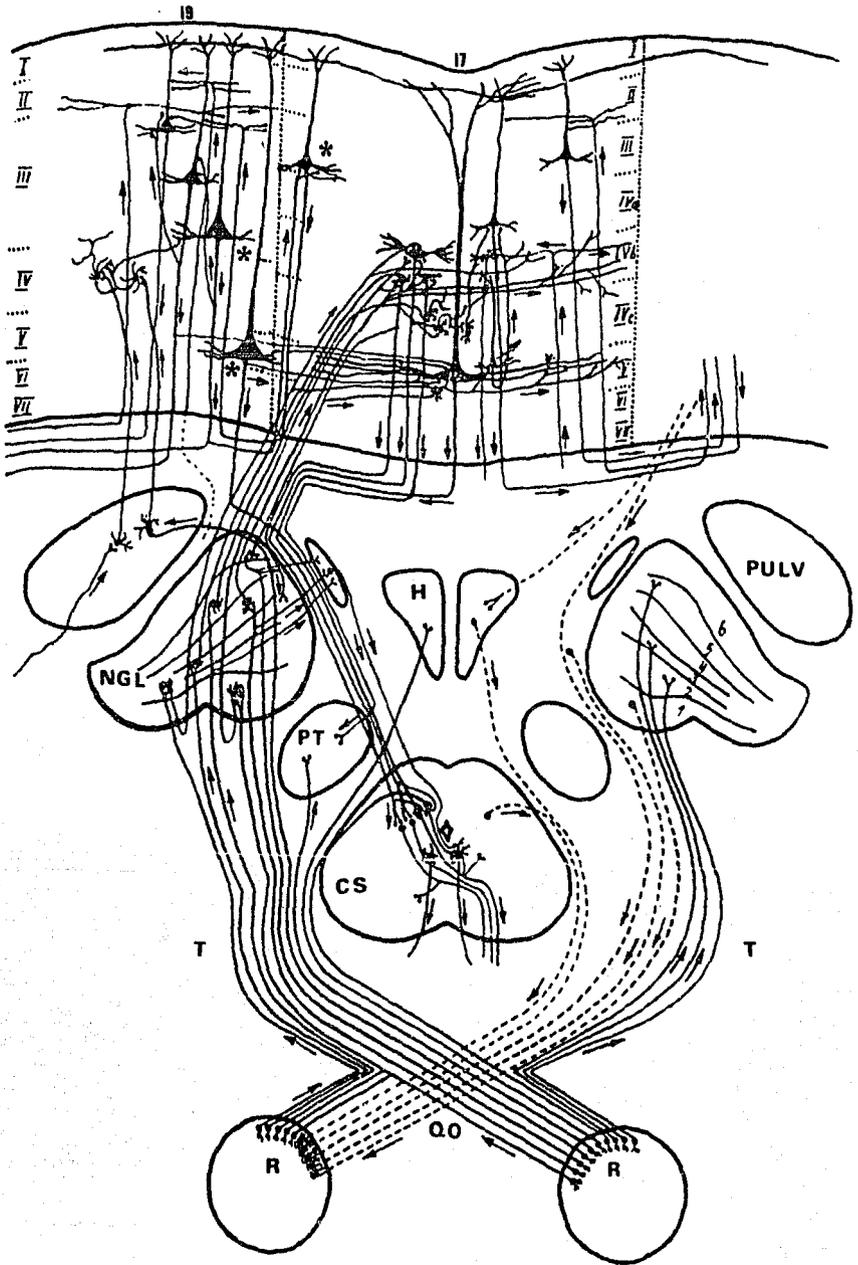


Fig. 2 Representación esquemática de las conexiones de la vía visual en el área 17 y en la de asociación (19). Los números romanos indican las capas y las líneas punteadas de la corteza los límites entre cada capa. En medio se muestran las estructuras subcorticales: núcleo geniculado lateral (NGL) y las capas que lo forman (1-6), núcleo pulvinar (PULV), hipotálamo (H), núcleo pretectal (PT), colículos superiores (CS), tracto óptico (T), quiasma óptico (QO) y retina (R). Las flechas indican las conexiones aferentes en las distintas capas corticales y las eferentes de las células piramidales de proyección, marcadas con un asterisco (esquema modificado de Beritoff, 1965).

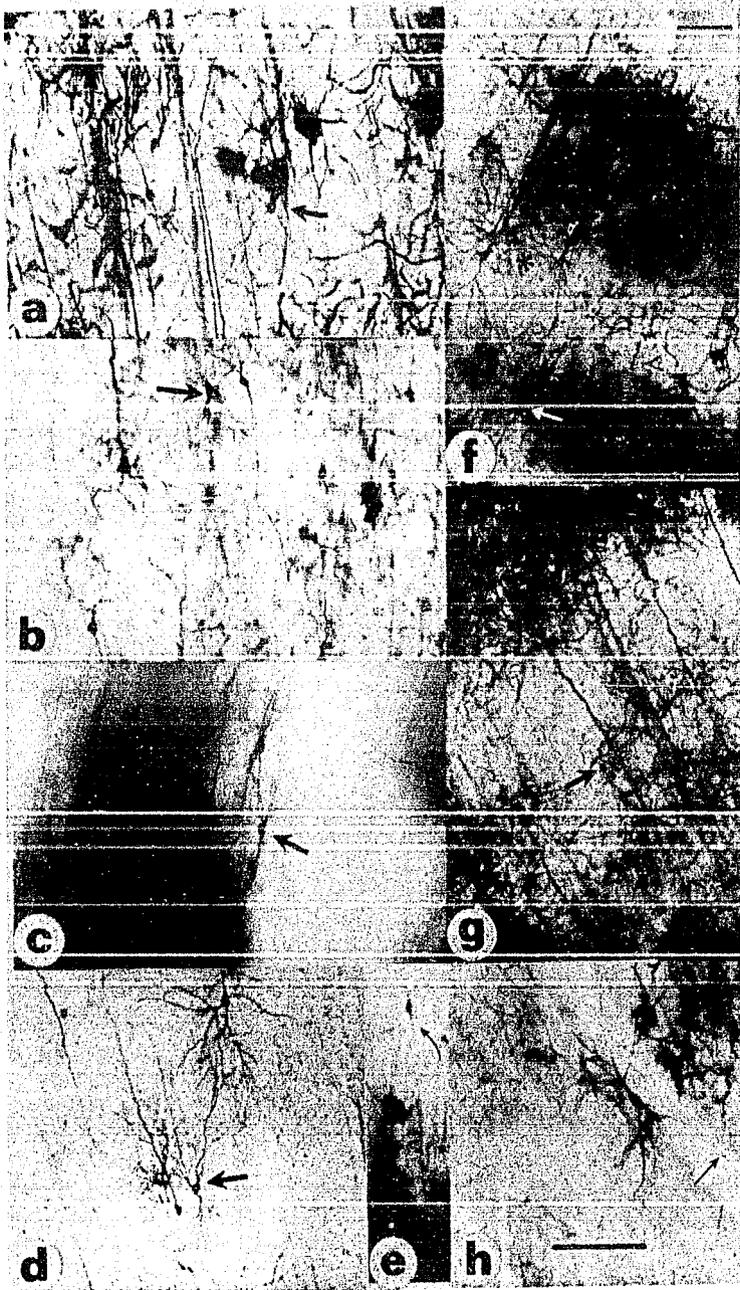


Fig. 3 Fotomontaje de las células birramificadas (BR) localizadas en la corteza visual de la rata, en material teñido con Golgi; 3a: se indica una célula en candelero y las ramificaciones del axón (flecha); 3b: una célula BR de la capa III; 3c: células no piramidales pequeñas en grupos de tres, la flecha indica una célula BR; 3d: son células no piramidales espinosas de la capa IV; 3e: indica el axón de una célula bipolar de la capa IV; 3f: área 17 con las distintas células piramidales (*) de la capa II/III y V, la flecha indica una célula BR de la VIa capa; 3g: células piramidales de la Va capa y la flecha indica una célula BR de la capa IV; 3h: célula BR adosada a un vaso sanguíneo, la flecha indica el axón. Las fotomicrografías de la derecha se tomaron a 128X, 3f, y 3h a 200X, la barra representa 100 μ m.

cuales pueden estar invertidas, con una dendrita apical, abundantes espinas y cuyo axón es largo; la clase II formada por células estrelladas, fusiformes y células atípicas con dendritas radiales, pocas espinas y cuyo axón permanece en la corteza. Poliakov en 1974 hizo énfasis en las características estructurales principales que hacen diferentes a las células piramidales de las estrelladas, tanto en la organización celular como del establecimiento de conexiones topográficas aferentes y eferentes, y en especial a la población celular que constituye la vía visual (Beritoff, 1965). Figura 2.

CARACTERISTICAS ANATOMICAS DE LAS CELULAS PIRAMIDALES.

Las células piramidales se localizan en la lámina interna y en la externa del isocortex en todas las capas celulares, a excepción de la primera, su soma es triangular de donde parten numerosas dendritas basales y una dendrita apical que se bifurca en su terminación hacia la superficie de la pia y presenta dendritas oblicuas, además, en toda la superficie de las dendritas, se localizan múltiples espinas que son los sitios de unión con los axones (sinapsis axoespinales o axodendríticas), las que son más abundantes en las células piramidales localizadas en las capas II/III de la corteza visual. Algunas células piramidales están orientadas en forma invertida, es decir, la dendrita apical se localiza en la lámina interna, mientras que el axón se curva para alcanzar la

substancia blanca, otras se orientan de manera tangencial en la lámina externa (Mitra 1955, Parnavelas y cols. 1977, Braak 1980). La distinta orientación quizá se debe a los factores tróficos que intervienen en el crecimiento de la dendrita y que son diferentes para cada parte de la neurona.

Funcionalmente a las neuronas piramidales se les ha identificado como los principales sitios de entrada talámicas específicas e inespecíficas que hacen contacto con las espinas de otras células piramidales. Las pirámides pequeñas de las capas I y II, han sido estudiadas con microscopía electrónica por Peters y Kaisermann-Abramof (1970), quienes han identificado en el soma un gran núcleo y poco citoplasma denso en donde la substancia de Nissl no está bien desarrollada, sin embargo se localiza una porción de la misma, en la base de la dendrita apical; las dendritas poseen microtúbulos bien desarrollados y las espinas son de 3 tipos, largas, cortas y en forma de hongo. Las espinas representan los sitios sinápticos de las vías tálamo corticales y se les encuentra tanto en las Golgi tipo I como en las Golgi tipo II. Lund (1973) en su estudio de la organización neuronal de la corteza visual (área 17) en el mono, ha demostrado que la proyección genículo cortical se efectúa también en las neuronas estrelladas con espinas localizadas en la capa IV.

El criterio de clasificación neuronal propuesto por Mitra (1955) incluye a tres tipos de células corticales en

donde las piramidales son las más abundantes seguidas de las estrelladas y las fusiformes. Esta clasificación se basa en la forma del soma y el origen y curso de las dendritas, sin considerar el origen y trayectoria de los axones.

CARACTERISTICAS ANATOMICAS DE LAS CELULAS BIPOLARES

Recientemente las células bipolares o fusiformes, se han estudiado con especial interés, por Feldman y Peters (1978) quienes las identificaron entre las capas II y V de la corteza visual de la rata y las describen con un soma alargado y orientado perpendicularmente a la superficie de la pia, son bipolares porque se origina una dendrita de cada lado del soma celular, las que a su vez se ramifican en dendritas ascendentes y descendentes formando un campo dendrítico muy elongado. Se ha discutido ampliamente el contenido de neurotransmisores que presentan, así, Fuxe y col., (1977); Morrison y col., (1984) y Connor y Peters (1984), han encontrado que entre el 85% y 90% de estas células son reactivas al polipéptido intestinal vasoactivo (PIV), además Peters y Harriman (1988) observaron 2 tipos de células cuyas sinapsis son simétricas y asimétricas; los axones de las primeras llegan a los somas de las células piramidales, y las que presentan sinapsis asimétricas tienen sus plexos axonales más extensos y cerca del soma. Este tipo de células bipolares se han encontrado también en la corteza visual del gato (Fairén y col., 1984) cuyos axones forman sinapsis

asimétricas, mientras que en la rata el tipo más común es el de las células que contienen PIV y cuyos axones son simétricos (Peters, 1984). Además, se han encontrado otros péptidos como la colicistocinina (CCK) (Emson y col., 1979, McDonald y col., 1982a, Peters y col., 1983), la somatostatina (McDonald y col., 1982a, Morrison y col., 1983), y el neuropéptido Y, (McDonald y col. 1982b), sin embargo, estos péptidos también se localizan en las células multipolares, en donde son característicos. Las células bipolares se encuentran repartidas a lo largo de la corteza (Fig. 4b, d), como las células piramidales y como éstas, forman penachos de dendritas, en la capa I. La longitud de los árboles dendríticos de las células piramidales permiten la entrada múltiple de aferencias talámicas (Peters y Kara, 1985). La excitación de las células bipolares es a través de las sinapsis asimétricas de sus axones que corren a lo largo de las dendritas apicales de pirámides, refortaleciendo la excitación a las mismas y sincronizando así, las descargas de las células piramidales. El papel de las células bipolares que presentan sinapsis simétricas puede ser opuesto al de los grupos inhibidores de neuronas no piramidales y piramidales. Así, las funciones de las células bipolares pueden ser las de producir una zona de excitación o inhibición en mosaico orientado verticalmente a través de la corteza cerebral (Peters y Harrimann 1988).



Fig. 4 Fotomontaje de las células birramificadas (BR) y bipolares (BP) de la corteza visual de la rata; 4a, 4c y 4e: células BR de la IVa capa con espinas espaciadas en sus dendritas; 4b: BP sin espinas; 4d: BP con espinas; 4f: BR en donde se muestra que la distribución de los penachos no son iguales. v: vasos sanguíneos; 4a a 4d 128X, 4e 200X y 4f 128X cada barra representa 100 μ m.

CARACTERISTICAS ANATOMICAS DE LAS CELULAS NO PIRAMIDALES.

Las células no piramidales se localizan en todas las capas de la corteza pero son más abundantes en la capa IV o capa granular (Fig. 4f), sus somas son esféricas, alargados o poligonales (Figs. 4a, c, e; 5 y 6), las dendritas se originan de toda la superficie del soma y se ramifican hacia la superficie pial y estratos inferiores (Fig. 4a, c, e, f) Peters y Kaiserman- Abramof 1970, Jones 1975, y Parnavelas y col., 1983, han descrito que son estructuras de reciente aparición filogenética; se considera que en especies de primates su número aumenta, aunque no su tamaño y en la rata ocurre el fenómeno contrario, es decir, son menos abundantes pero de mayor tamaño. Ontogenéticamente son células cuyo desarrollo y diferenciación puede prolongarse a los estadios posnatales. Por otra parte se ha encontrado un mayor número de células en los primeros días de vida en la rata y sus espinas dendríticas se desarrollan después del día 14 posparto. El conocimiento de la distribución laminar y de la organización espacial de sus árboles dendríticos ayudan a entender la organización intrínseca de la porción sensorial de la neocorteza incluyendo el área 17 (Müller y col., 1984). Anatómicamente se les incluye dentro de una población heteromorfa de neuronas cuyos campos dendríticos son estrellados, asimétricos, con dendritas radiales que pueden o no, presentar espinas y su axón se ramifica en la misma capa o en la siguiente (Figs. 3a, y 6d, e, f). Los estudios de

microscopía electrónica, de estas células en las capas III y IV de la corteza visual de los roedores, han mostrado que reciben axones terminales talamocorticales y sus axones forman sinapsis simétricas con los cuerpos neuronales y las dendritas de neuronas adyacentes Parnavelas y col. (1977), estudiando la morfología y funcionalidad de las células no piramidales en el área visual de la rata, mediante registros unitarios y siguiendo la técnica de la peroxidasa de rábano, reconocieron que el 27% del total de la población neuronal, en las capas corticales estudiadas, corresponde a las células no piramidales.

Se ha descrito también (Peters, 1971), que las células no piramidales poseen dendritas que en forma peculiar se proyectan a través de la corteza sin tener el carácter de las dendritas apicales (Fig. 3c, d). El resto de sus dendritas usualmente son delgadas y ultraestructuralmente contienen un mayor ordenamiento de microtúbulos. Estas células poseen pocas espinas en comparación con las células piramidales, y tienen pequeños penachos o conjuntos de dendritas horizontales (Figs. 4a, f; 5d, e, f y g). La microscopía electrónica, ha revelado que el soma presenta cisternas de superficie rugosa y en un arreglo paralelo a la envoltura nuclear. La superficie es irregular en el soma de las células estrelladas grandes no piramidales, sitio en el cual se llevan a cabo las uniones sinápticas simétricas con los axones aferentes.

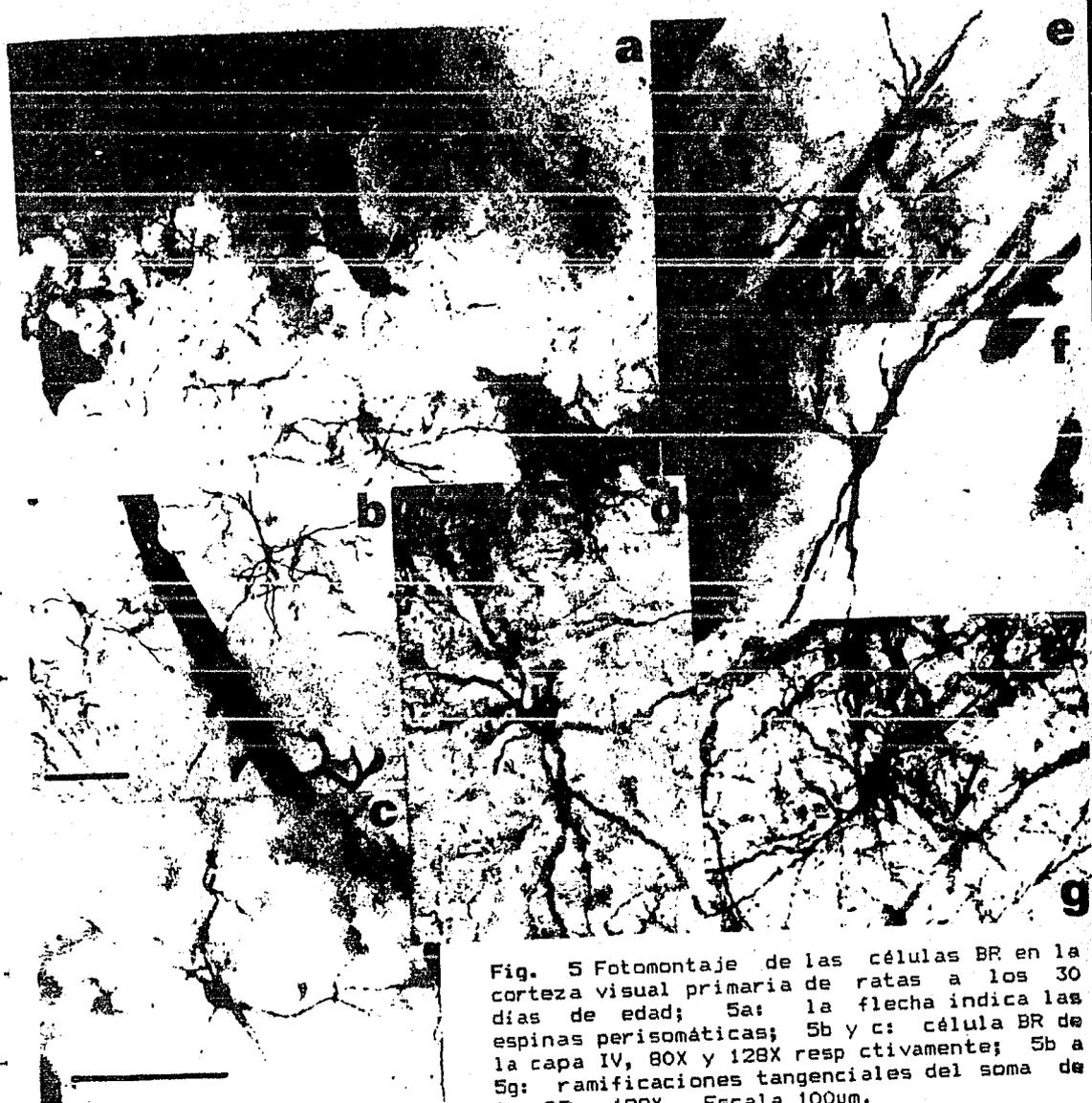


Fig. 5 Fotomontaje de las células BR en la corteza visual primaria de ratas a los 30 días de edad; 5a: la flecha indica las espinas perisomáticas; 5b y c: célula BR de la capa IV, 80X y 128X resp ctivamente; 5b a 5g: ramificaciones tangenciales del soma de las BR a 128X. Escala 100µm.

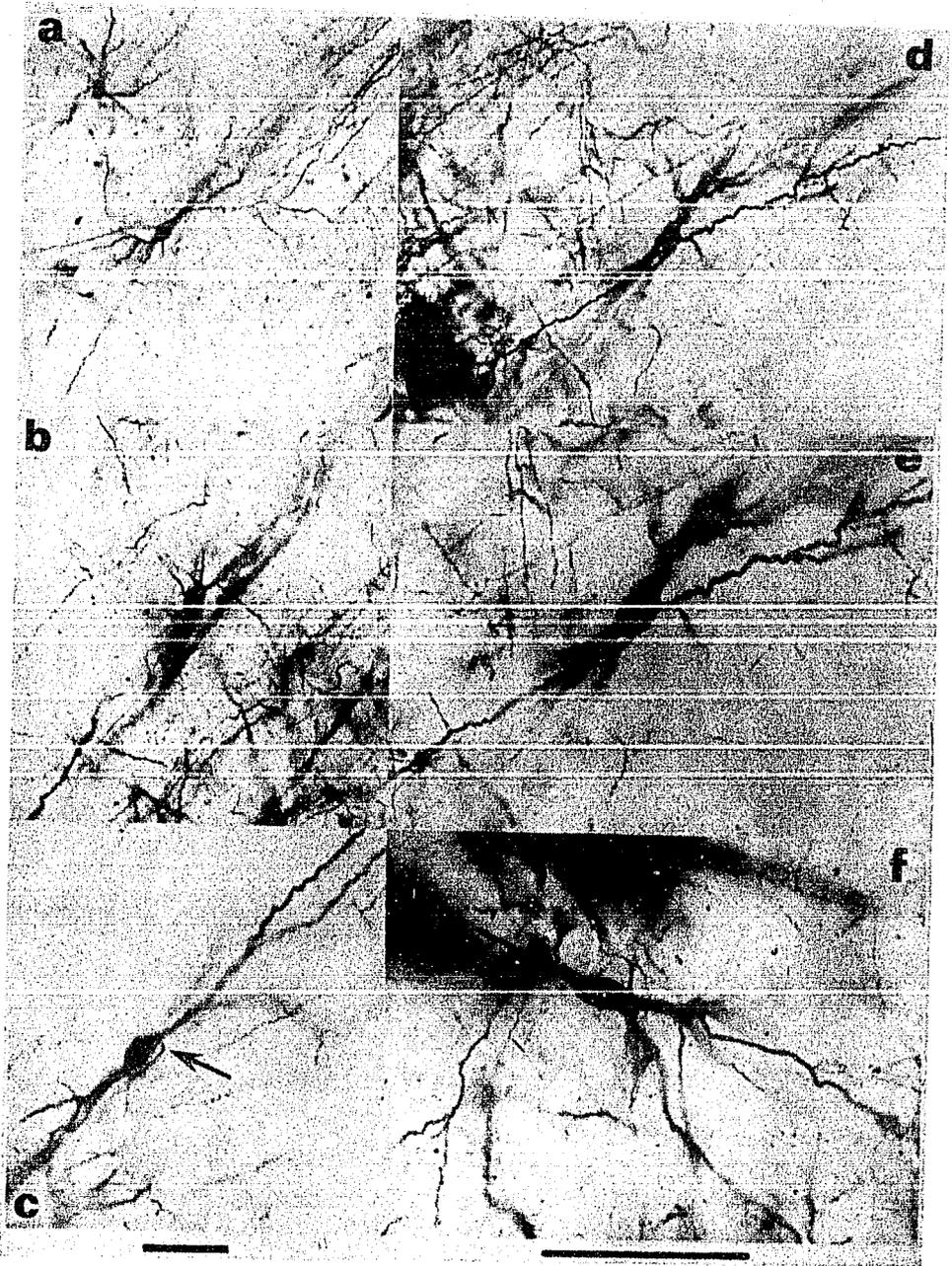


Fig. 6 Células no piramidales del area 17 de la rata; 6a: célula BR con espinas espaciadas; 6b: célula multipolar; 6c: célula bipolar sin espinas; 6d y e: BP con espinas espaciadas a 200X y 320X respectivamente y 6f: célula BR sin espinas a 320X, cada barra representa 100 μ m.

Por su parte Feldman y Peters (1978), clasificaron a las células no piramidales en la corteza visual de la rata, con base en la disposición de sus dendritas en: multipolares, bipolares y birramificadas; y en cuanto a la presencia de espinas en: espinosas, espaciadas y sin espinas (Fig. 6).

Los estudios con la técnica de Golgi, se basan en la distribución de los patrones dendríticos de las espinas y de los axones, sin embargo la combinación con los estudios de microscopía electrónica han sido de gran ayuda para la correcta interpretación funcional de los mismos (Fairén y col., 1977). En 1985 Peters y Kara estudiaron las células no piramidales de la corteza visual de la rata entre las capas II y IV y localizaron diversos tipos celulares; bipolares, con cuerpos alargados y axones dirigidos en ángulos rectos hacia la pia (Fig. 3a), con somas entre 7 y 12 μm en su eje menor y de 18 a 25 μm de eje mayor, el origen del axón se observó en el segmento inicial de una dendrita primaria. Neuronas pequeñas de forma multipolar (Fig. 3d, y h) y birramificadas (Figs. 3b, c, 4f, 5 y 6) son frecuentes en las capas II, III y IV, cuyo diámetro es de 10 a 14 μm ; neuronas grandes multipolares y birramificadas entre 8 a 12 μm de eje menor y de 15 a 25 μm de eje mayor, con un mayor número de sinapsis axosomáticas (de 8 a 14). Células en candelero o en candil son de forma multipolar o birramificada cuyo único carácter distintivo es el de tener un plexo que termina en numerosos bastones orientados verticalmente (Somogyi, 1977, 1982; y

Peters y col., 1982). Desde el punto de vista ultraestructural no hay diferencias entre las células multipolares birramificadas y en candil. Sin embargo Peters y Regidor (1981) habían definido que las células en candil se refieren a las ramificaciones del axón y que son frecuentes en las capas II, III y IV cuyo árbol dendrítico es vertical y corresponde a las células birramificadas con espinas.

Parnavelas y col. (1977), en un estudio de la organización de la corteza visual (área 17) en la rata, encontraron cuatro tipos de células de acuerdo al origen del axón: 1) células con axones descendentes hasta la sustancia blanca continuando por las fibras de proyección (Golgi tipo I), 2) células con axón corto y ramificado (cerca del cuerpo celular), se localizan entre las capas III a VI (Golgi tipo II), 3) células cuyo axón asciende y se ramifica en una o distintas capas (células en candil) y 4) células con axones horizontales (células amacrinas).

ORIGEN DE LAS CELULAS NO PIRAMIDALES EN LA NEOCORTEZA DE LA RATA

Las células no piramidales muestran patrones de desarrollo y neurogénesis diferentes a los que presentan las pirámides. Así, se sabe que en la primitiva capa plexiforme de la placa cortical, su crecimiento puede continuarse hasta la vida adulta. Angevine y Sidman en 1961, encontraron que

las neuronas jóvenes marcadas in útero en el día 11 desde la zona ventricular germinal de la capa profunda de la corteza occipital, migran hacia los niveles superficiales de la corteza. Esta secuencia de "dentro hacia afuera" en la llegada de las neuronas al isocortex se ha observado en fetos de rata, cuya neuronas se generan en el día 16 intrauterino, migran a los niveles de la pia y se diferencian. Las neuronas formadas en los días 17 a 22, migran entre las células de las capas diferenciadas previamente, para formar las nuevas capas superficiales. Así, las células de las capas profundas del isocortex (capa IV) se originan en el día 16, y las de la capa II se originan más tarde, en el día 21 de gestación. Las neuronas jóvenes se generan continuamente por mitosis de las células germinales cerca del ventrículo y se mueven hacia afuera. Las neuronas que llegan a la corteza son desplazadas primero a las capas profundas, por las que llegan después, a excepción de las células de Cajal-Retzius en la capa I que son células cuya maduración ocurre primero en la corteza motora (Marín-Padilla, 1970). Parnavelas y col., (1983), han encontrado que durante la primera semana posnatal, las células de Cajal-Retzius cambian sus características morfológicas a células no piramidales. Las células piramidales en las capas IV y V pueden observarse en el quinto mes de gestación en el humano y son seguidas por las interneuronas de la capa IV cerca del séptimo mes de gestación, luego las pirámides de la capa III y finalmente las de la capa II a los 7.5 meses de gestación. Además, diversos tipos no piramidales o Golgi tipo

II, aparecen en todas las capas corticales en el desarrollo prenatal tardío.

Por otra parte, se han estudiado las características de maduración de las células piramidales de la neocorteza en las arborizaciones dendríticas basales de las pirámides de la corteza somatosensorial (Eayrs y Goodhead, 1957), y en la corteza visual de la rata (Juraska y Fifkova, 1979), donde han encontrado que las dendritas basales más arborizadas se localizan en la capa V. Además, el volumen del soma cambia entre los 30 y 40 días (Angulo-Colmenares y col., 1979), por lo que se demuestra que el desarrollo de las células piramidales de la capa II/III es diferente al de la capa V (Hicks y D'Amato, 1968; Juraska y Fifkova, 1979). Existen 3 días de diferencia en la maduración de las células piramidales de la capa II/III con respecto a la maduración de las células piramidales de la capa V (Miller, 1981). Las células no piramidales en la primera semana posnatal, tienen somas pequeños y dendritas indiferenciadas, que durante la siguiente semana de vida posnatal, adquieren la proporción del adulto. La estructura básica de los cuerpos dendríticos, se alcanza en la mitad de la tercera semana posnatal, el único evento que continúa después de esta etapa del desarrollo y hasta los 90 días, es la elongación de las dendritas terminales (Parnavelas y Uylings, 1980).

Por los estudios de West y Kemper (1976) y de Parnavelas y col., (1977, 1983), se sabe que es raro encontrar a las células no piramidales, al nacimiento y durante la primera semana posnatal en la corteza visual, ya que están distribuidas en las capas corticales profundas. El crecimiento neuronal en general es mayor entre la primera y segunda semanas posnatales, y al final de la tercera semana obtienen el mayor número de espinas. Felten y col., en 1982 sugirieron que el desarrollo posnatal de las células no piramidales corticales, en las capa IV y V obedece a un efecto neurotrófico de las terminales noradrenérgicas que provienen del tallo cerebral. En ciertas áreas de la corteza, los campos terminales monoaminérgicos están restringidos a capas específicas y éstas pueden terminar en un patrón laminar complementario, por ejemplo, se identifican dos proyecciones aminérgicas de la corteza: 1) noradrenalina y dopamina en la corteza anterior del cíngulo de la rata y 2) noradrenalina y serotonina en la corteza visual del mono (Morrison y Magistretti, 1983). Niveles altos de péptido intestinal vasoactivo (PIV) se han encontrado en la neocorteza y en la corteza occipital de la rata. Del total de estas neuronas, del 1 al 5% son neuronas PIV inmunoactivas, y de éstas el 80% de las neuronas corticales además del PIV contienen acetilcolina.

El desarrollo posnatal de las neuronas positivas al PIV, ocurre en el cuarto o quinto día gestacionales y su

distribución se establece durante la segunda semana posnatal. En el conejo adulto, la mayoría de las neuronas inmunoreactivas al PIV están localizadas en la capa II/III de la corteza visual. También, se les ha observado en dos o tres bandas paralelas de la capa VI y son menos abundantes en las capas IV, V y I de la corteza visual de la rata (Cajal-Agüeras y col., 1986).

DESARROLLO NEURONAL Y DESNUTRICION

El desarrollo adecuado de todos los organismos vivos depende en gran parte, de la interrelación de éste con su medio externo e interno. Así, el SNC durante su desarrollo, depende tanto de factores internos regulados por un patrón genético, como de factores externos entre los que se cuenta a la desnutrición, de la que se sabe afecta a las estructuras y por consiguiente a las funciones cerebrales.

Para la interpretación de diversos trastornos en el desarrollo intelectual del hombre, se emplean diferentes modelos de desnutrición en roedores, tratando de igualar las condiciones tan complejas de desnutrición a las cuales está sometida un gran porcentaje de la población humana. Dichos experimentos en ratas, han permitido la determinación de ciertas alteraciones en el desarrollo cerebral provocados por la desnutrición, sin embargo, la secuencia y el momento en que se suceden las fases del desarrollo cerebral, varían de una

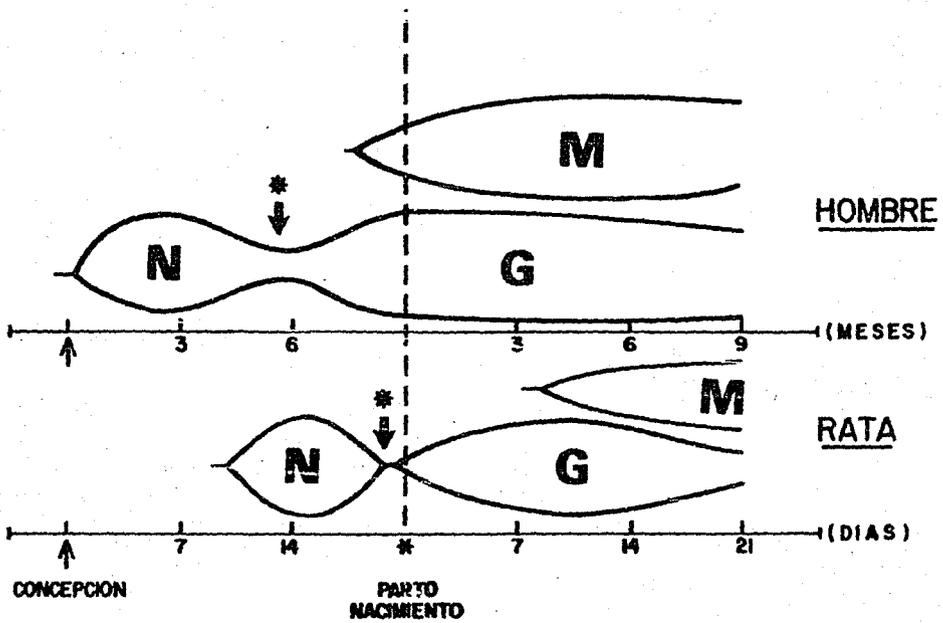
especie a otra y aún más, entre las distintas estructuras cerebrales. Por lo que el extrapolar los efectos provocados por la desnutrición sobre el SNC, entre distintas especies, será únicamente válido para animales atípicos cuyas etapas de desarrollo sean equivalentes (Shea, 1987).

Se sabe que en el desarrollo neuronal del SNC, existe una fase de rápido crecimiento, que en el hombre ocurre entre el final del segundo trimestre de la gestación y el segundo año de vida (Dobbing y Sands, 1973), en tanto que, en la rata se presenta posparto, durante las tres primeras semanas de vida, durante el cual el SNC es muy susceptible a las influencias ambientales, a este período se le ha llamado "período crítico" por Dobbing y col. (1971), y que el número total de células nerviosas se completa antes o durante este "período crítico" incluyendo los procesos de diferenciación y maduración neuronales (Dobbing, 1974).

Es evidente que la restricción nutricional impuesta durante la fase de "rápido crecimiento cerebral" puede afectar el establecimiento de las conexiones sinápticas, la multiplicación de las células gliales y la mielinización neuronal (Cuadro I).

Desde el trabajo clásico de Sugita (1918), muchos aspectos de los efectos de la desnutrición sobre el desarrollo de la corteza cerebral de los roedores se han estudiado,

CUADRO I



Abreviaturas: Neurogénesis (N); Gliogénesis (G); Mielinización (M) el asterisco indica el "período de rápido crecimiento cerebral".

utilizando diversos modelos de desnutrición en los que se incluye la desnutrición prenatal o posnatal o ambas, reduciendo el contenido de los componentes proteínicos y calóricos en la dieta de las crías. En todos estos estudios, de una manera general, se ha encontrado que la desnutrición reduce el volumen de la corteza cerebral, (Thomas y col., 1979), sin pérdida aparente del número de células (Leuba y Rabinowicz, 1979a, b), resultado de un mayor empaquetamiento celular (Callison y Spencer, 1968, Cragg, 1972, Siassi y Siassi, 1973, Cordero y col., 1976; Bedi y col., 1980, Warren y Bedi 1981, 1982). Por el contrario, el número total de las células gliales se reduce por la desnutrición (Leuba y Rabinowicz, 1979a). Los estudios de Golgi demuestran que virtualmente todos los parámetros de las células piramidales son afectados por la desnutrición neonatal así, la densidad de las espinas dendríticas se reduce (Salas y col., 1974, West y Kemper, 1976; Angulo-Colmenares y col., 1979), como también la red dendrítica (Shönheit, 1982), y la mielinización se retarda (Kriegman y Hogan, 1976).

En los estudios realizados en cada una de las estructuras cerebrales, se ha encontrado un efecto distinto de la desnutrición, por ejemplo, en el cerebelo se afectan las células cuya diferenciación y migración ocurren durante el período crítico, manifestándose como una reducción en el número de células de la capa granular germinal externa e interna (Barnes y Altman, 1973), que se relaciona con el

animales desnutridos. Por otra parte, Belmar y Lara (1985), en estudios fisiológicos encontraron una menor amplitud en los potenciales provocados, asociados a niveles elevados de noradrenalina.

Así pues, las distintas formas de desnutrición, al parecer, afectan de diferente manera los niveles de neurotransmisores cerebrales, y podrían estar involucrados diversos factores que regulan la transmisión sináptica (Belmar y Lara, 1985), por lo que se ha postulado, que el desarrollo de los neurotransmisores varía en las distintas áreas del cerebro, y por lo tanto, a la vez que ocurren cambios estructurales, bioquímicos y electrofisiológicos, se presentan también, cambios funcionales en las estructuras del SNC provocados por la desnutrición pre y posnatal (Morgane y cols., 1978; Ramanamurthy 1977).

Es impresionante el interés, suscitado recientemente, por el estudio en humanos, de las interacciones entre la desnutrición, los cambios ambientales y las respuestas conductuales del individuo. Sobre esto, Barnes (1976) publicó, que en los países subdesarrollados donde la pobreza se traduce en desnutrición, se observan individuos con bajo desarrollo intelectual. Por si fuera poco, el problema de la desnutrición no se presenta de manera aislada, sino junto con la falta de estímulos sociales, sensoriales y ambientales, que afectan al sujeto dejando secuelas, que se manifiestan hasta

retardo en el desarrollo de las enzimas observado en ratas desnutridas pre y posnatalmente (Sima y Persson, 1975). Clos y col. en 1977, y Bedi y col. en 1980, demostraron que por efecto de la desnutrición, se observa una reducción en la proporción numérica de células granulares, en cesta y células gliales con relación a las de Purkinje. Conradi y Muntzing (1985), encontraron también un retraso en el proceso de foliación cerebelar en los fetos de ratas desnutridas.

Desde el punto de vista bioquímico, los efectos de la desnutrición sobre la concentración de algunos neurotransmisores en las áreas cerebrales, se han descrito niveles bajos de noradrenalina (NA) y de dopamina (DOPA), (Shoemaker y Wutman, 1971). Sin embargo, Sobotka y col., (1974), encontraron una elevada concentración de 5-HT, y del ácido 5-hidroxi-indolacético (5-HIIA), en el tallo cerebral de ratas desnutridas pre y posnatalmente, no obstante, la actividad de la acetilcolinesterasa se encuentra disminuida, afectando así, las sinapsis del sistema colinérgico, lo que posiblemente sirva para explicar el estado de intensa emotividad observado en ratas desnutridas.

Morgane y col., (1978), estudiaron el efecto de una dieta baja en proteína (8% de caseína), instalada de manera pre y posnatalmente en la rata, sobre los niveles de 5-HT, 5-HIIA y NA en diversas áreas del cerebro, hasta la edad de 300 días, encontrando de todos ellos, niveles elevados en los

el estado adulto.

Estudios conductuales realizados en animales desnutridos han demostrado una mayor respuesta con respecto a estímulos negativos, lo cual indica que la desnutrición instalada tempranamente, (durante el período crítico), provoca cambios en la conducta del animal, que se mantienen a lo largo de la vida de éste (Levitsky y Barnes, 1972). En otros estudios sobre los efectos conductuales provocados por la desnutrición experimentada en etapas tempranas de la vida, se vieron acentuados por el aislamiento ambiental en el adulto, por lo que resulta de gran interés, el estudio de los efectos de la estimulación sensorial temprana con el propósito de atenuar los efectos a largo plazo ocasionados por la desnutrición. Se sabe que una adecuada interacción entre la nutrición temprana y los estímulos sensoriales durante el desarrollo, favorecen el establecimiento de los circuitos neuronales necesarios para la expresión conductual normal de los individuos.

Estructuralmente, el retardo en la maduración de los sistemas sensoriales y en la mielinización neuronal en la rata por efecto de la desnutrición, provoca cambios en la percepción durante la fase temprana del desarrollo, por lo tanto, se encuentra fisiológicamente menos capacitada para integrar la información proveniente del ambiente circundante. Este retardo se observa en los mecanismos de adquisición de los patrones locomotores de los animales desnutridos, de la

conducta exploratoria y en consecuencia, hay una reducción de la exposición del individuo a los estímulos ambientales (Levitsky y Barnes 1972). En estudios de campo abierto en las crías de hembras desnutridas se ha encontrado que éstas presentan una mayor actividad que los controles (Smart y Bedi, 1982).

Con relación a los cambios ocurridos en las células de la neocorteza, Schönheit en 1984, hizo un estudio del crecimiento y maduración de las neuronas piramidales (Golgi tipo I) y las estrelladas (Golgi tipo II) en la corteza del cíngulo de ratas desnutridas posnatalmente; las observaciones cuantitativas las efectuó a distintas edades del desarrollo (11, 20, 35 y 60 días de edad). Los animales desnutridos mostraron retraso en la maduración de las neuronas piramidales de la capa V en fase temprana y para las estrelladas en la fase tardía, lo que revela una heterocronicidad en la maduración neuronal por efecto de la desnutrición, es decir, tiene mayor repercusión en las células cuyo patrón de maduración es tardío como las células estrelladas, en las que el número de espinas se reduce en una proporción del 40% a los 20 días de edad y en un 60% a los 60 días. Resultando así, una lesión a largo plazo del sustrato anatómico base de la funcionalidad neuronal.

OBJETIVOS

Como se ha descrito, la desnutrición instalada pre y posnatalmente en la rata puede ocasionar trastornos estructurales en el SNC, así como en la secuencia de los procesos de migración, de diferenciación y de maduración de los elementos neuronales como en las dendritas y las espinas. Por lo que, las neuronas cuyo desarrollo y diferenciación ocurren durante el término de la gestación y en la vida neonatal se verán más afectadas por la desnutrición, como es el caso de las células no piramidales y en particular de sus dendritas y espinas. El objetivo del presente estudio fue instalar la desnutrición isocalórica e hipoproteínica en madres gestantes y mantenida durante la lactancia y la vida del animal (30, 90 y 220 días), con el objeto de provocar cambios en las células no piramidales de la corteza visual primaria cuyo desarrollo es tardío y valorar estos cambios en términos de plasticidad neuronal como respuesta a la desnutrición.

HIPOTESIS

Si la desnutrición hipoproteínica crónica es capaz de producir deficiencias estructurales en las células cuyo desarrollo y diferenciación ocurre durante el período crítico, (posnatal en la rata), las células no piramidales y en particular las birramificadas, se verán afectadas por la desnutrición instalada pre y posnatalmente.

M A T E R I A L Y M E T O D O S

1.- Manejo de animales y dietas.

Para implementar el presente estudio se emplearon 15 ratas vírgenes de la variedad Sprague Dawley cuyo peso corporal fue entre 175-200 gramos y entre 60 y 70 días de edad y luego se dividieron en tres grupos de 5 ratas cada uno con el fin de obtener un grupo control y dos experimentales a los que durante 4 semanas se les suministraron antes del apareamiento, la gestación y la lactancia, dietas de 25% caseína (testigo) y de 8% y 6% caseína (desnutridos). Estas últimas dietas son hipoproteínicas e isocalóricas y contienen cada una 4.3 Kcal/gr y son complementadas con l-metionina para prevenir la deficiencia de este aminoácido esencial en ambas dietas. En la tabla I se muestra la composición de estas dietas.

Los machos empleados en el apareamiento pesaron entre 325-350 gramos, y fueron sometidos a sus respectivas dietas, sólo una semana antes. Una vez comprobada la preñez de las hembras, por medio de la presencia del tapón vaginal, se separaron éstas de los machos, los cuales fueron rehabilitados nutricionalmente para estudios posteriores. Al parto, las crías obtenidas en cada condición experimental y

TABLA I

COMPOSICION NUTRICIONAL DE LAS DIETAS

COMPONENTES	D I E T A S *		
	Normal	Hipoproteínicas	
	25% Caseína	8% Caseína	6% Caseína
PROTEINAS	21.8	7.0	5.3
GRASAS	15.4	15.1	15.0
CARBOHIDRATOS	50.9	67.9	68.9
SALES MINERALES**	4.7	4.7	4.0
VITAMINAS	1.0	1.0	1.0
AGUA	2.2	1.0	1.2
COMPONENTES NO NUTRITIVOS	4.2	4.2	4.2
Kca/g	4.3	4.3	4.3

* Las dietas se suplementaron con l-metionina (0.4%) debido a la ausencia de este aminoácido esencial en la caseína.

**Se les adicionó fosfato de calcio monobásico y zinc.

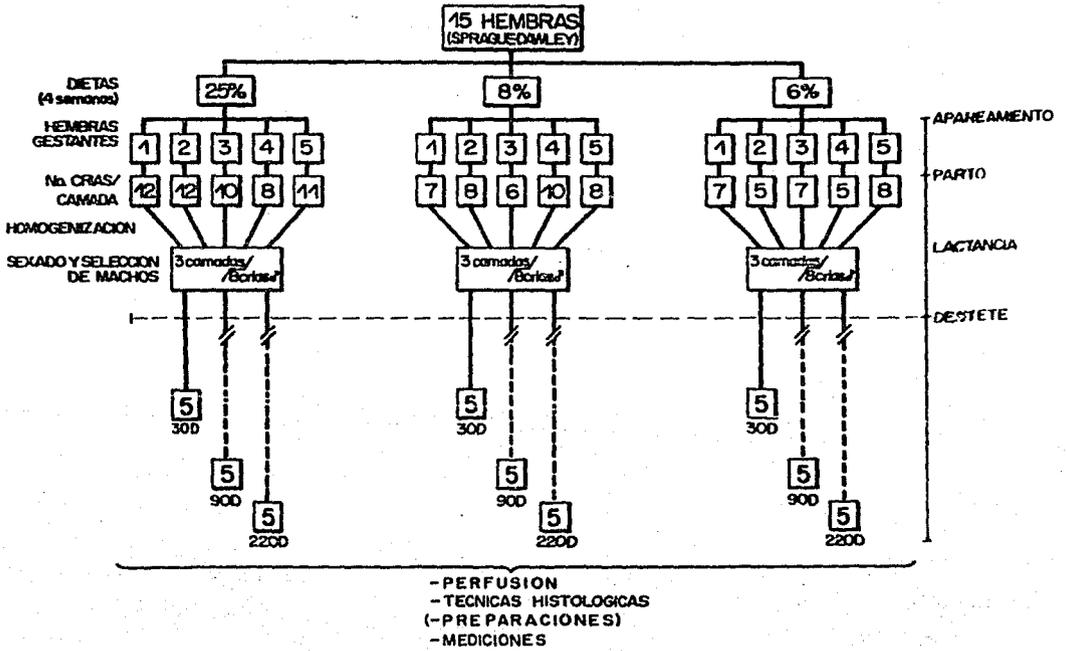
que nacieron el mismo día fueron sexadas y mezcladas al azar en cada uno de los grupos y redistribuidas en número de 8 crias por madre lactante con el objeto de reducir las variaciones individuales de cada camada e incrementar la homogeneidad genética de la población además, de igualar las condiciones nutricionales. Al término de 21 días del nacimiento, se procedió a destetar a las crias, a las que se les empezó a suministrar la misma dieta que a sus madres. Durante el crecimiento individual, se hicieron grupos de 5 sujetos machos cada uno, los que se sacrificaron al cumplir 30, 90 y 220 días de edad, (Cuadro II).

2. Manejo histológico de los cerebros.

a) Fijación.

La siguiente etapa de la metodología comprendió la parte histológica de preparación del tejido cerebral utilizado para el estudio morfométrico en el que se emplearon 45 ratas macho, 15 de los cuales pertenecieron al grupo testigo, y una cantidad igual para cada uno de los grupos desnutridos (8% y 6% de caseína). Una vez cumplida la edad, los animales fueron pesados y anestesiados con pentobarbital sódico 50 mg/kg de peso, 10 minutos antes de la perfusión, la que se realizó vía intracardiaca con formalina amortiguada al 10 % con sales de fosfato de sodio monobásico y dibásico (Mol. 0.02 aprox.). Con la solución se perfundió cada animal

CUADRO II



durante 3 a 8 minutos dependiendo del peso corporal de éste, hasta que los ojos, extremidades, orejas y nariz presentaron un color blanquecino (aproximadamente 200 ml de fijador). Posteriormente se dejaron en bolsas de plástico durante 24 horas para lograr una mayor fijación de los tejidos, al término de éstas se procedió a extraer los cerebros de los cráneos y a la localización del área 17, según el atlas estereotáxico para rata de Paxinos y Watson (1982).

b) Técnica de Golgi.

Todos los cerebros fueron procesados con la técnica de Golgi rápido, modificada por Díaz-Cintra y cols., (1981), la que se describe a continuación: Se tomó de cada cerebro un bloque de tejido de 0.064cc, que incluía a la corteza visual, a 1 mm anterior al cuerpo pineal y 4 mm de profundidad por arriba de la porción ventral del hipocampo, (Fig. 1b). Se colocó en una solución de dicromato de potasio al 4.5% con ácido ósmico al 1% en una proporción de 8:1 y se dejaron en esta solución de 7 a 11 días dependiendo de la edad del animal, posteriormente los bloques fueron diferenciados en una solución de nitrato de plata al 0.75% durante 24 horas, a continuación se procedió a la deshidratación del tejido en alcoholes graduales desde 50% hasta alcohol etílico absoluto y eter, (volumen:volumen) permaneciendo 30 minutos en cada uno de los cambios, luego se colocaron en nitrocelulosa de baja viscosidad la cual se preparó a diferentes

concentraciones, empezando con 2%, aumentando al 5%, 10%, 15% y 30% cada 24 horas. Finalmente los bloques se incluyeron en nitrocelulosa al 30% en moldes de plástico de 8mm x 8mm durante 12 horas en un desecador que contenía vapores de cloroformo, el cual se conectó al vacío. Ya endurecidos los bloques se fijaron en una platina de metal la que a su vez se colocó dentro del desecador por espacio de 15 min., luego el bloque se colocó en un microtomo de deslizamiento (Leitz Wetzlar 47160) y se obtuvieron secciones frontales de 120 micras de grosor, cada una de las cuales se deshidrató en alcoholes graduales y luego se aclaró en terpineol y dos cambios de xileno para luego ser montada en portaobjetos con resina sintética en una estricta seriación.

c) Selección del área de estudio.

Una vez que se secaron las preparaciones, se seleccionaron aquellas que contenían la corteza visual (el área de estudio se ubicó de acuerdo a las descripciones de Krieg, 1946 y de Feldman y Peters 1978). A los cortes seriados se les asignó un número al azar, de tal modo que el observador no conocía ni la edad ni condición experimental a la que pertenecían éstas, con el propósito de disminuir las probabilidades de predicción por el observador, para efectuar el estudio a ciegas.

d) Obtención de datos.

El estudio morfométrico se efectuó en un microscopio fotónico marca Zeiss con óptica planapocromática y objetivos de 10X, 16X y 40X, oculares de 10X, cámara lúcida y de fotografía automática con exposímetro integrado. Todas las mediciones se tomaron en micras con una retícula ocular previamente calibrada y con objetivo planapocromático 40X de aceite de inmersión cuya apertura numérica fué de 0.28 y poder de resolución de 0.25 μm .

A continuación se identificaron en la corteza visual las células birramificadas que se encontraron desde la capa II a la capa V, y a cada célula seleccionada se le midieron los siguientes parámetros: a) eje mayor y menor del soma; b) extensión lineal de una dendrita primaria y otra secundaria considerando como primaria aquella más larga originada del soma y como secundaria la primera ramificación de la primaria), con el método de triangulación descrito por Bok, (1959) tomando en cuenta la siguiente fórmula: $\sqrt{A^2 + B^2}$, en donde A corresponde a las micras lineales tomadas con la reglilla ocular y B a las μm de profundidad medidas en el tornillo micrométrico y c) el número de espinas de las dendritas primaria y secundaria en segmentos de 50 μm , (Fig. 7).

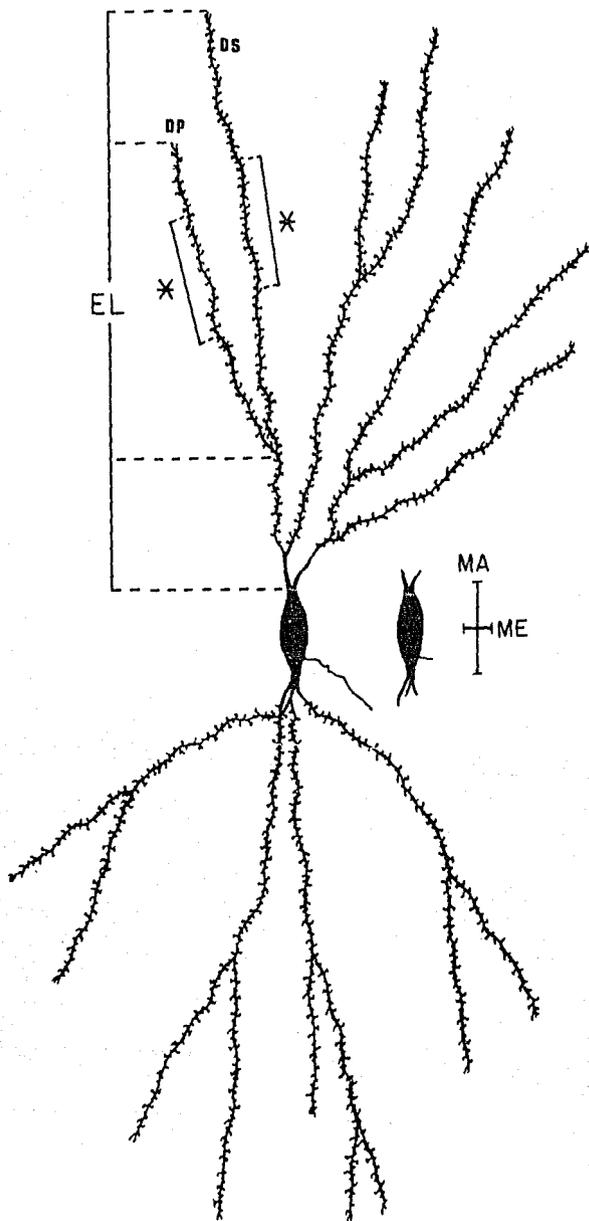


Fig. 7 Dibujo con la cámara lúcida a 400 aumentos mostrando el método de medición empleado en las células BR de la corteza visual. Extensión lineal (EL) de las dendritas primarias (DP) y de la secundaria (DS), (considerada como primaria las originadas del soma, y como secundarias las primeras ramificaciones de las primarias), el asterisco muestra el segmento de 50 micras en las cuales se contó el número de las espinas en ambas dendritas y el eje mayor (MA) y menor del soma (ME).

En total se seleccionaron 20 células en cada edad y condición experimental, haciendo un total de 180 células medidas en las tres edades.

Los datos obtenidos fueron procesados con pruebas estadísticas, la prueba de "t" de Student al eje mayor y menor del soma y a la extensión lineal de las dendritas primarias y secundarias y la prueba "U" de Mann Whitney a la cuantificación del número de espinas de las dendritas primaria y secundaria, en segmentos de 50 μ m. También se hicieron comparaciones en porcentajes de cambio (incremento y decremento) entre condiciones experimentales y entre las edades estudiadas (30 vs 90 y 90 vs 220 días).

Se hicieron de 2 a 3 dibujos utilizando la cámara lúcida de acercamientos del soma y de la distribución de las espinas y ramas dendríticas a 40X en cada edad y condición experimentales, con el objeto de apreciar mejor los cambios que se operan en las células. Por último se tomaron fotografías con el microscopio fotónico a 10X, 16X y 40X del área 17 y de las células birramificadas encontradas en las distintas capas de la corteza visual en cada una de las edades y condiciones experimentales. El tamaño real de las mismas se consideró tomando en cuenta los aumentos del ocular (10X) y de los objetivos (10X, 16X y 40X) así como la distancia del fototubo (1.25X), de esta forma las fotografías tomadas a 40X tuvieron un aumento real de 320X ($10X \cdot 40X / 1.25$).

R E S U L T A D O S

Los resultados del presente estudio morfométrico de las células birramificadas se dividieron en aspectos cualitativos y cuantitativos, éstos últimos divididos a su vez, en cambios producidos por la dieta y cambios ocurridos por la edad.

I. ASPECTOS CUALITATIVOS DE LAS CELULAS BIRRAMIFICADAS.

Las células no piramidales de la variedad birramificadas, se localizaron en los cerebros de ratas macho, a los 30, 90 y 220 días de edad, en el área 17 de la corteza visual primaria, siguiendo el criterio de clasificación de Feldman y Peters, (1978). Las células birramificadas se estudiaron en las capas II-III y IV, y anatómicamente se les identificó como aquellas células cuyo cuerpo celular se orientó en un plano perpendicular a la superficie de la pia (Fig. 3f y g). Se identificaron células no piramidales pequeñas en grupos de tres (Fig. 3c). En el estudio morfométrico se observó que el tamaño del eje mayor de las células birramificadas estudiadas en las tres edades de los animales control, en promedio se encontró de $20.64 \mu\text{m}$ (± 3.07) y el eje menor de $12.66 \mu\text{m}$ (± 2.19). Las dendritas se originaron de ambas regiones polares del soma en promedio de 3 (± 1.21) y también se distribuyeron en un plano vertical; en ocasiones se localizaron de 1 a 2 dendritas saliendo del soma en un plano tangencial, lo que fué frecuente a la edad de 30 días (Figs.

Ba, 9a, d y g). El axón se originó del soma o de una dendrita principal siguiendo una organización hacia la capa inmediata superior (Fig. 9a, i). El campo dendrítico se orientó siguiendo el mismo plano vertical y se distribuyó de manera similar en ambos polos de la célula, sin embargo el campo dendrítico no se observó simétrico, siendo un penacho más ramificado que el otro, característica observada más frecuentemente a las edades de 90 y 220 días en los animales control (Figs. 8 y 9e, h, i) La extensión lineal de las dendritas se midió en una dendrita primaria y una secundaria, considerada como primaria, aquella más larga originada del soma y cuya extensión lineal en promedio se encontró de 284.01 μm (± 74) y una dendrita secundaria, definida como la primera ramificación de la primaria, y cuya extensión lineal total se encontró de 194.58 μm (± 67.32). En las figuras 8 y 9, se pueden apreciar los cambios en el tamaño del soma, en el campo dendrítico y en el número de espinas de las células birramificadas de los animales control, comparadas con las células de los desnutridos en las 3 edades del presente estudio. En el dibujo efectuado con la cámara lúcida de las células birramificadas se observó en general, que las ramas y las espinas dendríticas se encontraron reducidas en las células de los animales alimentados con la dieta 6% de caseína, sin embargo los que consumieron dieta con 8% de caseína, mostraron aumentos del número de espinas en todas sus ramas y en las tres edades estudiadas. Por otra parte la edad muestra que las dendritas se incrementan en ramificaciones y

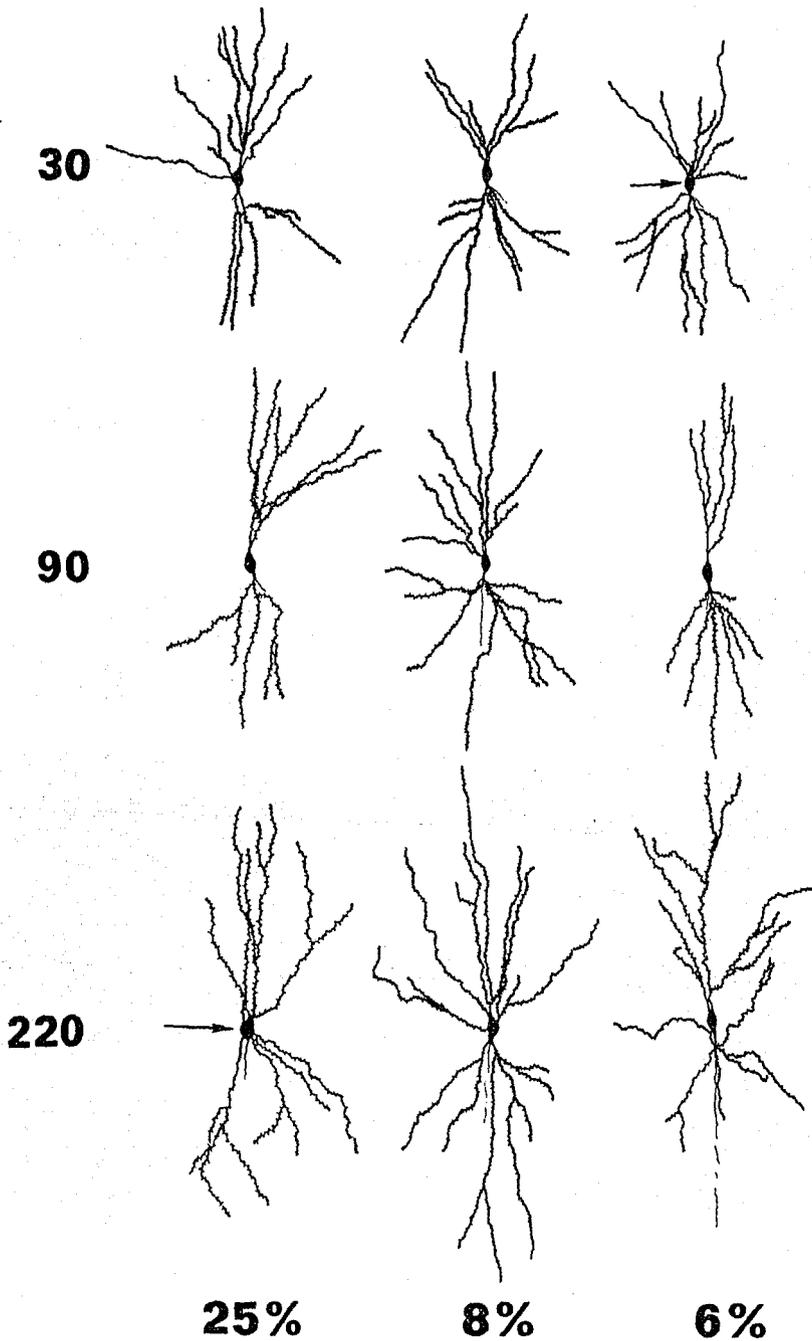


Fig. 8 Dibujos de las células BR localizadas en la corteza visual de la rata a las edades de 30, 90 y 220 días, en las tres condiciones experimentales. Nótese la ramificación dendrítica y la longitud de las ramas en los animales de 8% y 6% de caseína, así como el efecto de la edad. La flecha, indica el soma redondo, por efecto de la dieta a los 30 días y por la edad a los 220 días.

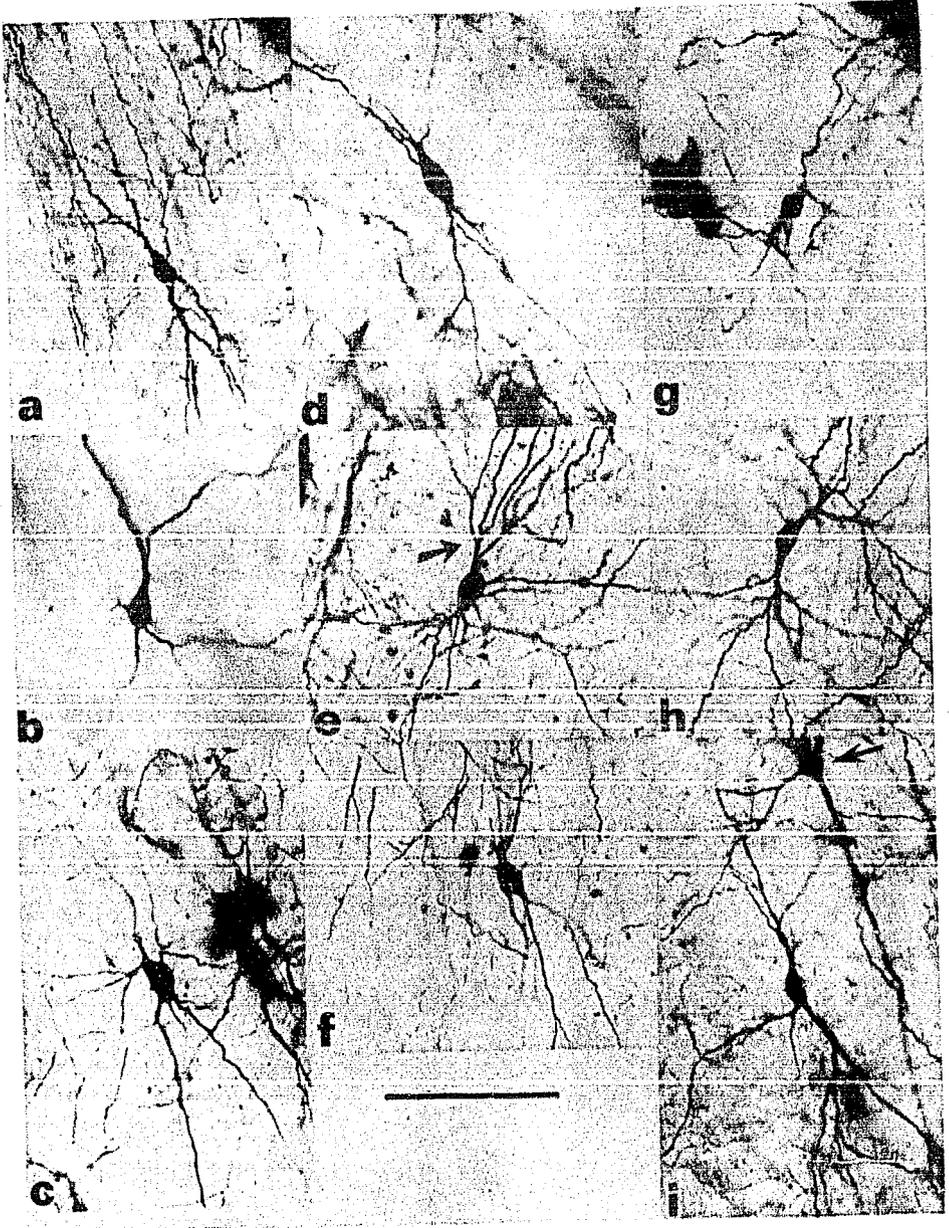


Fig. 9 Fotomontaje de las células BR en las tres dietas y en las tres condiciones experimentales, en donde se observa la reducción en el eje menor en las células de los animales alimentados con 6% de caseína a las edades de 90 y 220 días y el aumento de las ramas y espinas en los animales con dieta de 8% de caseína (9e) y la reducción de las espinas en los nutridos con 6% de caseína a los 220 días de edad (9i). Aumentos 320X, la barra representa 100 μ m.

longitud a los 220 días de edad, pero el soma se ve reducido en su eje mayor, por lo que las células adquieren una forma redonda en las tres condiciones experimentales (Fig. 9).

II. ASPECTOS CUANTITATIVOS PRODUCIDOS POR LA DESNUTRICION DE 8% Y 6% DE CASEINA EN LAS CELULAS BIRRAMIFICADAS.

En la figura 10, se indican las medias y desviaciones estandar (\pm DE), de los efectos de la dieta normal (25%) e hipoproteínicas (8% y 6% de caseína) en el tamaño del eje mayor y menor del cuerpo celular en un total de 180 neuronas birramificadas, medidas en 3 edades (30, 90 y 220 días). A la edad de 30 días se observó un decremento del eje mayor que fue significativo ($p < 0.02$) en los animales alimentados con la dieta 6% de caseína y a los 220 días el decremento se presentó con una $p < 0.05$ en los animales alimentados con dieta 8% de caseína. Mientras que en el eje menor se observó un aumento significativo de $p < 0.05$ en los alimentados con la de 8%, a los 30 días, en tanto que a los 90 días hubo un decremento significativo de $p < 0.05$.

La figura 11, muestra los efectos de la dieta normal (25%) y las dietas bajas en proteína (8% y 6% caseína), en la extensión lineal total medida en micras (μm) de las dendritas primarias (DP) y secundarias (DS) en un total de 180 neuronas. Las DP en los animales alimentados con la de 6% de caseína presentaron 2 reducciones significativas de $p < 0.001$ a los 30

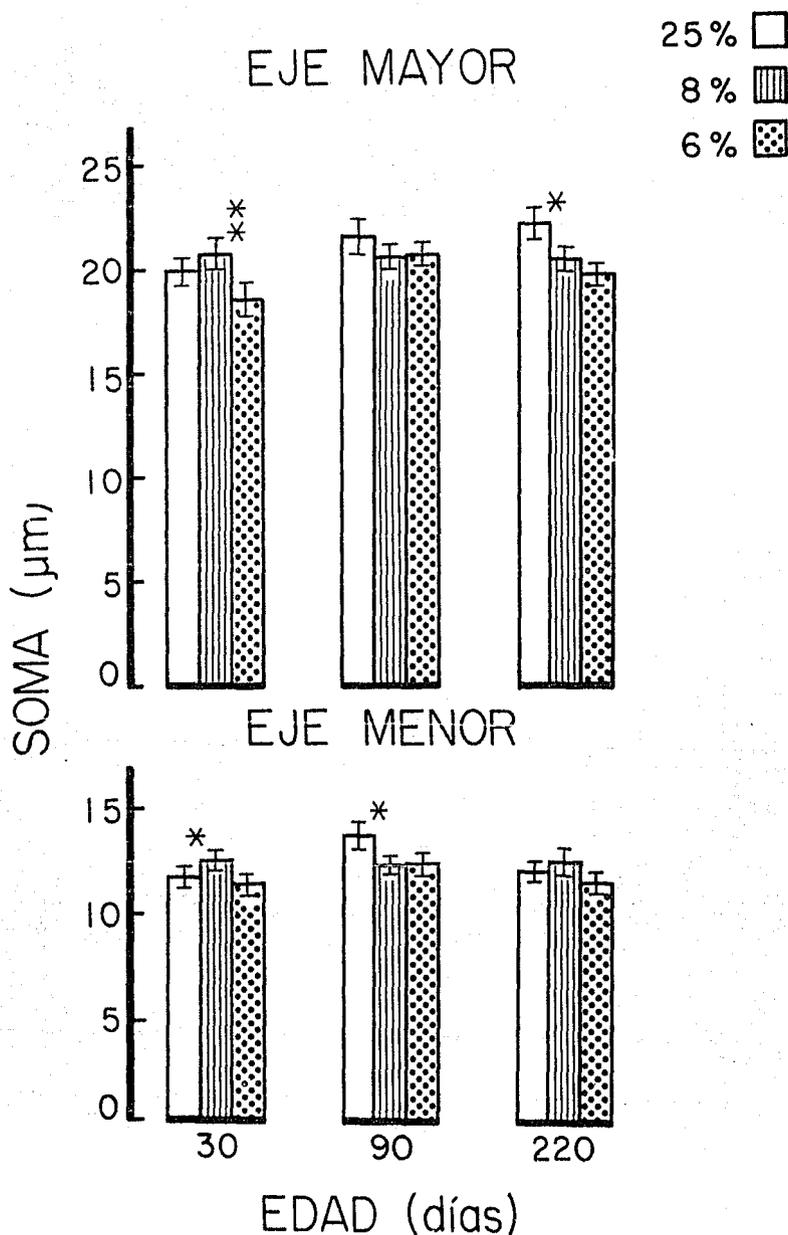


Fig. 10 Gráficas que muestran los cambios producidos por la desnutrición en el eje mayor (MA) y menor (ME) del soma, a las edades de 30, 90 y 220 días. Obsérvese el decremento significativo en el eje mayor a los 30 días de edad en los animales de 6% de caseína y a los 220 días en los de 8% de caseína. En el ME, se observó un incremento significativo en los animales de 30 días con 8% de caseína, pero un decremento a los 90 días en esta misma condición. * $p < 0.05$, ** $p < 0.02$.

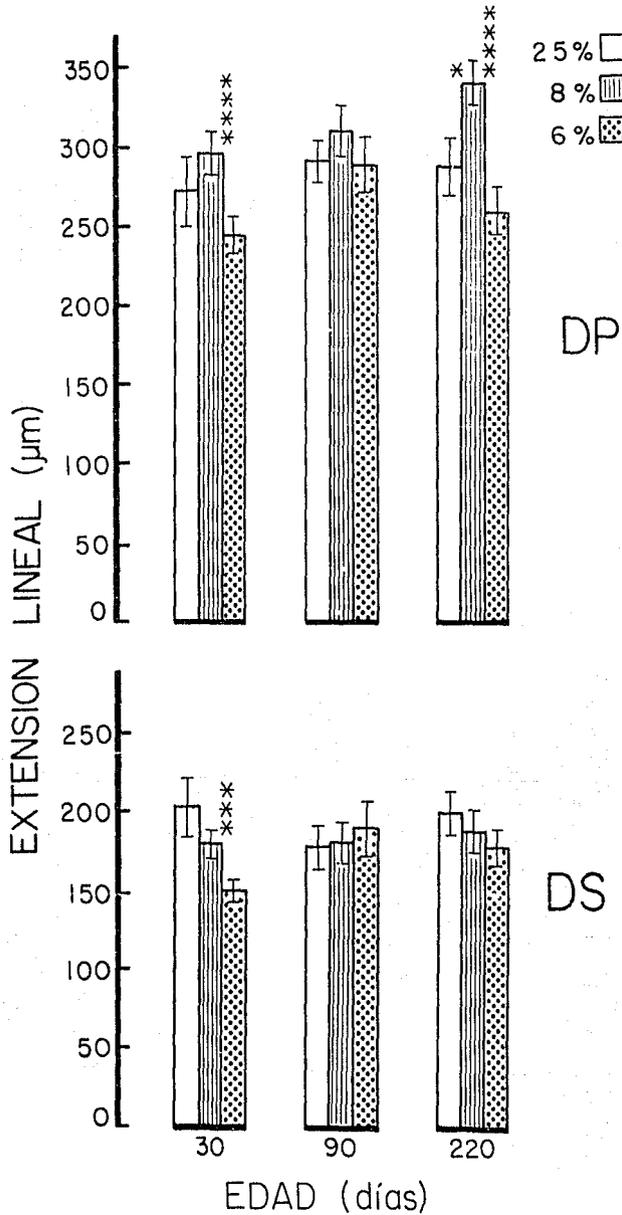


Fig. 11 Extensión lineal de las dendritas primarias (DP) y secundarias (DS), en los animales control (25%) y desnutridos (8% y 6% de caseína), en las edades de 30, 90 y 220 días de edad. Nótese los decrementos significativos en la extensión lineal en la DP. Los animales con dieta de 6% de caseína a los 30 y 220 días, mostraron una reducción notable en la extensión lineal de las DP, del mismo modo las DS de los animales de 30 días en esta misma condición. *p < 0.05, ***p < 0.01. ****p < 0.001.

y a los 220 días respectivamente, en tanto que los animales alimentados con la de 8%, incrementaron significativamente la extensión de sus DP en la edad de 220 días ($p < 0.05$). Las DS mostraron sólo una reducción significativa de $p < 0.01$ a la edad de 30 días en los animales alimentados con 6% de caseína.

En la figura 12, se observan los efectos de la dieta normal (25%) y las dietas bajas en caseína (8% y 6%) en el número de espinas medidas en un segmento de 50 micras en las DP y en las DS. En ambas se observa una tendencia de aumentar el número de espinas en los animales nutridos con 8% de caseína, la cual fue significativa a los 30 días en las DP y a los 90 días en las DS, ambos de $p < 0.05$. Por el contrario los animales que consumieron dieta 6%, mostraron disminuciones una de $p < 0.001$ a la edad de 90 días en sus DP, y 2 reducciones en las DS con una $p < 0.01$ a la edad de 90 días y otra de $p < 0.05$ a la edad de 220 días.

III. CAMBIOS CUANTITATIVOS EN LAS CELULAS BIRRAMIFICADAS POR LA EDAD.

Los cambios de los parámetros del eje mayor y menor del soma, extensión lineal y número de espinas ocasionados por el factor edad, se muestran en las figuras 13 a la 15, en donde se graficaron los porcentajes de cambio entre los 30 y los 90 días y entre los 90 y los 220 días. En la figura 13, se indican los cambios entre los 30 y 90 días en el eje mayor del

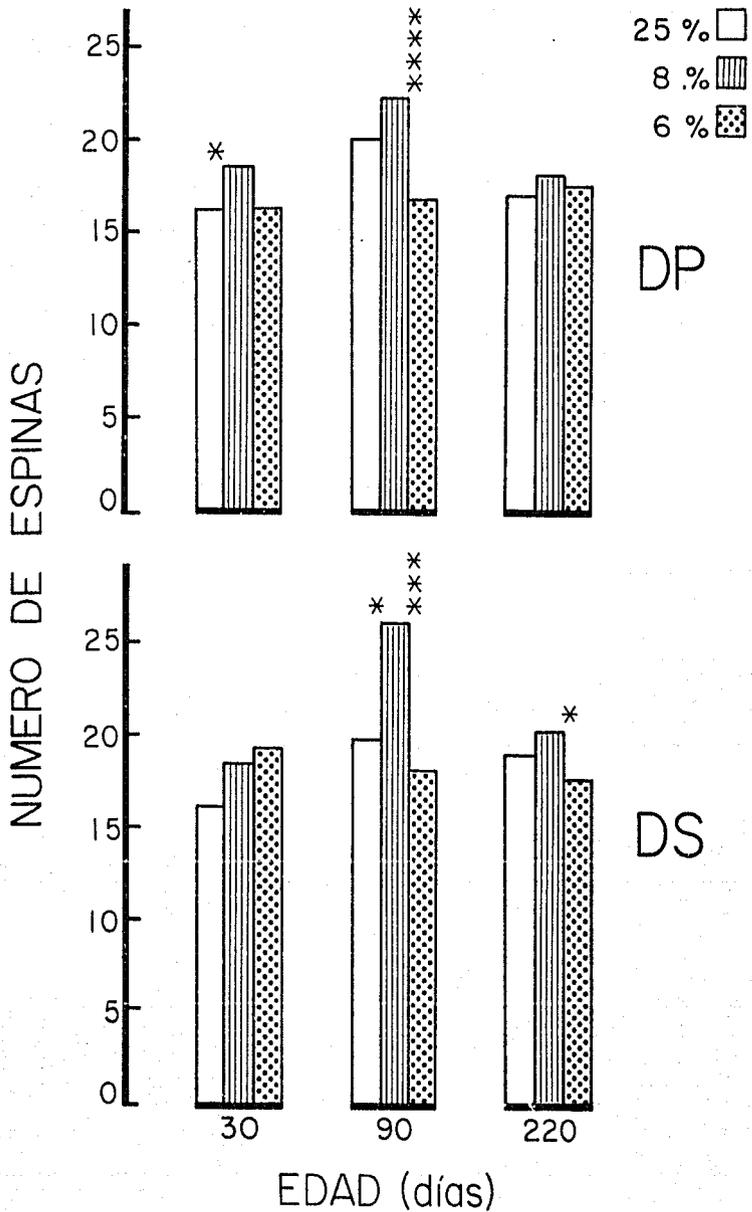


Fig. 12 Cambios en el número de espinas, producidos por la desnutrición en 3 edades estudiadas. A los 30 y 90 días se observan aumentos en el número de espinas en las DP de animales con dieta de 8%, y en las DS, se observan disminuciones en el número de espinas a los 90 y 220 días en animales con dieta de 6% de caseína. *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001.

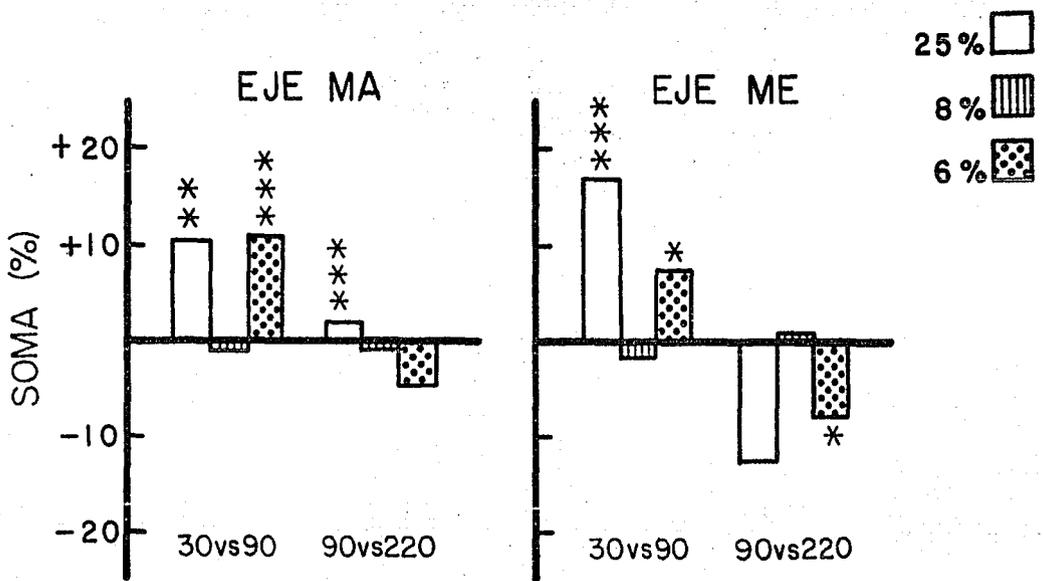


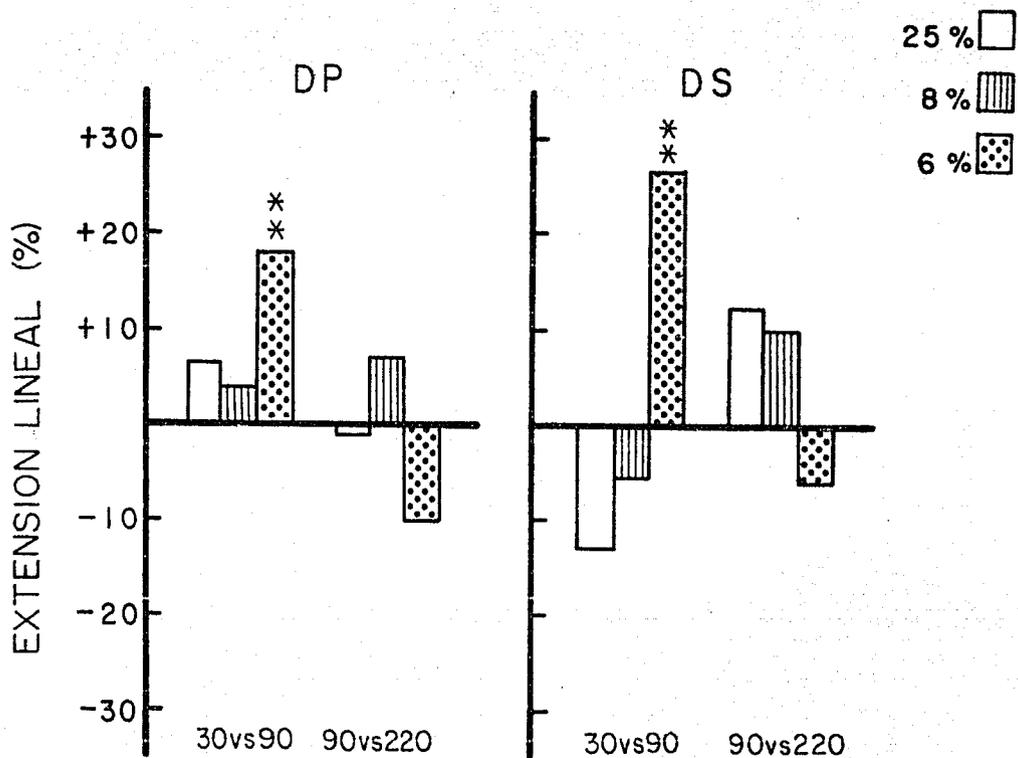
Fig. 13 Porcentajes de cambio producidos por la edad, en el eje mayor y menor del soma. Obsérvese el aumento significativo entre los 30 y 90 días de edad de los animales control y de los alimentados con dieta 6% de caseína en el eje mayor y entre los 90 y 220 días sólo en los controles. Los únicos en mostrar reducción significativa entre los 90 y 220 días de edad en el eje menor, fueron los animales con dieta 6% caseína. * $p < 0.05$, ** $p < 0.02$, *** $p < 0.01$.

soma, el que mostró 2 aumentos significativos uno de $p < 0.02$ en los animales control y otro de $p < 0.01$ en los nutridos con 6% de caseína. Entre los 90 y 220 días se encontró un aumento significativo de $p < 0.01$ en los animales de 25 % de caseína. El eje menor mostró entre los 30 y los 90 días, 2 incrementos significativos, uno de $p < 0.01$ y otro de $p < 0.05$ en los de 25% y 6% de caseína respectivamente; los animales nutridos con 6% de caseína fueron los únicos en mostrar una reducción significativa de $p < 0.05$ entre las edades de 90 y 220 días.

En la figura 14 se muestran los porcentajes de cambio en la extensión lineal de las DP y DS en las 3 condiciones experimentales. Se encontraron 2 aumentos significativos de $p < 0.02$ entre 30 y 90 días de edad en los animales mantenidos con dieta 6% de caseína en sus DP y DS respectivamente

Por último en la figura 15 se graficaron los porcentajes de aumentos o disminuciones entre las tres edades (30, 90 y 220 días) en el número de espinas medido en un segmento de 50 micras. Entre las edades de 30 y 90 días se observaron 2 aumentos significativos de las DP, uno en los animales control ($p < 0.01$) y otro con $p < 0.02$, en los animales nutridos con 8% de caseína. Entre 90 y 220 días se encontró una disminución significativa de $p < 0.01$ en las dendritas primarias de los animales alimentados con 8% de caseína. Las ramas secundarias de los animales alimentados con la de 8%, mostraron un aumento del número espinas entre 30 y 90 días y

estos mismos animales mostraron una reducción significativa de $p < 0.05$ en su número de espinas, de las ramas secundarias entre los 90 y 220 días de edad.



* Fig. 14 Porcentajes de cambio producidos por la edad en la extensión lineal de las dendritas primarias (DP) y secundarias (DS), en donde se observa que los animales alimentados con dieta 6% de caseína, aumentaron significativamente su extensión lineal entre los 30 y 90 días en las dos tipos de ramas. **p < 0.01.

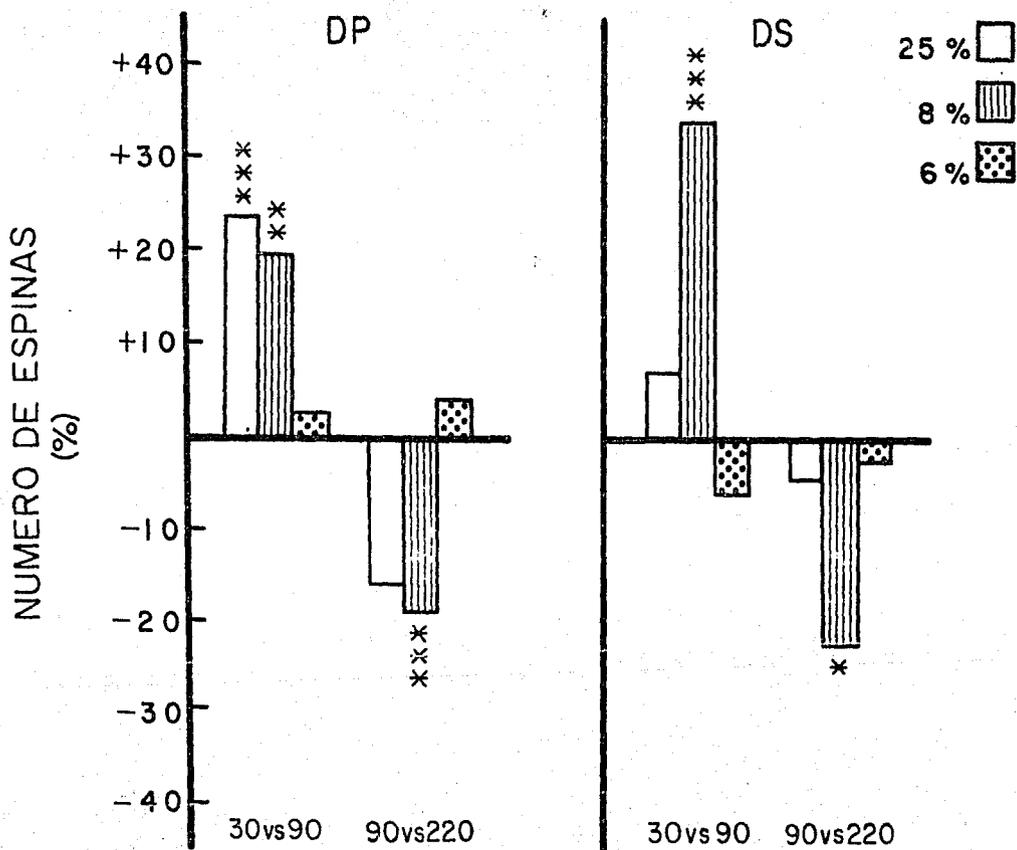


Fig. 15 Porcentajes de cambio registrados en la densidad de espinas de las dendritas primarias (DP) y secundarias (DS), producidos por la edad. Nótese que los animales control aumentan el número de sus espinas entre los 30 y 90 días en las DP, y los animales alimentados con dieta de 8%, muestran alteraciones en el número de espinas dendríticas entre los 30 y 90 días de edad y luego reducciones entre los 90 y 220 días en ambos tipos de dendritas. *p < 0.05, **p < 0.02, ***p < 0.01.

D I S C U S I O N .

Nuestros resultados de la localización y distribución de las células birramificadas, de la corteza visual de la rata están de acuerdo con las descripciones previas de estas células por Feldman y Peters, (1978) y de Fairén y Valverde, (1980) y por los estudios de Marín-Padilla (1987) en la corteza visual humana, en donde las células birramificadas, presentan una estructura, localización, distribución, organización espacial y tamaño celular, típicas de células no piramidales clasificadas como células en candil por su ramificación axonal que es de tipo idioaxonal, es decir, el axón se distribuye en la capa inmediata superior y se divide en ángulos rectos, lo que le da el aspecto de candelero; y a la distribución del campo dendrítico se le clasifica como idiodendrítico, que le da un aspecto birramificado en ambos polos de la célula, además el territorio funcional de las células en candil es pequeño, se distribuye, verticalmente a la superficie pial y en forma tridimensional en la corteza visual (Fig. 3a).

Las células birramificadas fueron abundantes en los límites de las capas II-III y IV de la corteza visual de la rata, como las describió en su estudio Somogyi (1977), lo que supone una asociación funcional de las células BR con las fibras callosas (Peters, 1984), debido a que es en este límite a donde llegan las fibras de asociación.

En nuestro estudio el tamaño de las células se observó entre 13 y 21 μm , sin embargo, en el estudio de Feldman y Peters (1978) encontraron un tamaño que varió entre 19 y 20 μm , a pesar de que ambos estudios se realizaron en ratas Sprague Dawley y de 1 a 3 meses de edad. Esta diferencia se puede deber en primer lugar a que en el estudio de Feldman y Peters no se separaron a los animales por edad y además el promedio del tamaño celular fué de toda la población encontrada en las capas II-III, IV y V.

Por otra parte, en las descripciones del tamaño y la distribución del campo dendrítico de estas células en distintas especies de mamíferos, la mayoría de los estudios las ubican como células birramificadas con dendritas que se extienden y ramifican en ambos polos de la célula. En este trabajo las células birramificadas presentaron este mismo patrón de desarrollo dendrítico, en todas las edades estudiadas y en las dos condiciones experimentales. Sin embargo, los cambios sólo son perceptibles a nivel de las mediciones realizadas de la extensión lineal y por el número de las espinas dendríticas, medidas en segmentos de 50 μm .

La extensión lineal total de las ramas dendríticas se ha descrito entre 100 y 300 μm , en las células birramificadas de la corteza visual humana por Marin-Padilla, (1987), de 200 a 600 μm en la corteza del mono (Lund, 1981; Valverde, 1983), y en el presente estudio en la rata, la extensión lineal total

se encontró entre las 180 y 300 μm . Como se puede ver el tamaño de las ramas dendríticas es inverso con relación al espesor de la corteza del humano, debido a que el territorio funcional de estas células se ve afectado por el aumento de la corteza cerebral en el curso de la filogenia (Blinkov y Glezer, 1968). Este efecto está claramente estudiado por Valverde (1983), quien al comparar en la misma escala las células en candil del puerco espín, del ratón, del conejo, del gato y del mono, encontró que es más grande el territorio funcional de las células del puerco espín. Esta reducción progresiva, deberá ser objeto de futuras investigaciones sobre todo con relación a las células piramidales cuyo desarrollo está en proporción directa a la filogenia. Para una mejor relación entre estos aspectos, la variante en este estudio, fue la de dividir las ramas dendríticas en primarias y secundarias, lo que resultó más adecuado, ya que al comparar la extensión lineal total entre las tres edades estudiadas, se puso de manifiesto que el tamaño total de las dendritas se alcanza entre los 30 y 90 días de edad como lo muestra la figura 11, además de que los animales desnutridos siguieron este mismo patrón de desarrollo, encontrado también en trabajos de Parnavelas y Uylings (1980), quienes observaron que el último evento del desarrollo neural es la elongación de las dendritas.

Por otra parte, el estudio morfométrico de la densidad de las espinas dendríticas reveló que se alcanza un máximo a los

90 días en ambos tipos de dendritas tanto en los animales control como en los desnutridos (Fig. 12). El promedio del número de las espinas en segmentos de 50 μm fue de 18 a 20. Cuando se hace la relación del número de espinas por micra de la dendrita (número de espinas / 50 μm) se obtienen de 0.36 a 0.4 espinas por micra, esta proporción nos permite clasificarlas como birramificadas espinosas, las que con pocas variaciones estructurales se han descrito por Marin-Padilla (1987) en la corteza visual humana, Jones, (1975) y Lund, (1981), en la corteza somato sensorial del mono, Somogy, (1977), Fairén y Valverde (1980) y Lund (1981), en la corteza visual del gato, Tömböl (1978), en el conejo y por Peters (1984) en la corteza visual de la rata, sin embargo, en ninguno de estos estudios se había realizado el conteo por segmentos dendríticos, como el realizado en la presente tesis.

Al mismo tiempo, se les podría relacionar con el número de espinas encontradas en estudios previos (Ortega 1987). Así, en la dendrita apical de las células piramidales de la Va capa cortical ha sido de 17 a 20 espinas en 50 micras es decir de 0.34 a 0.4 espinas por micra, esta relación nos permite suponer que estas células no piramidales birramificadas tienen un papel importante en la integración de la información a la corteza visual primaria modulando las respuestas de las células piramidales tanto de las capas II/III como los de las células piramidales de la capa V.

El modelo de desnutrición empleado en el presente estudio, nos ha permitido saber que cuando ésta se instala en los periodos pre y posnatal, durante el desarrollo del SNC, los efectos son valorados en cambios morfológicos a largo plazo en las células cuyos procesos de maduración y diferenciación ocurren tardíamente como son estas células birramificadas en la corteza visual de la rata. Nuestras mediciones del eje mayor y menor del soma muestran reducciones significativas en los animales de 6% de caseína a la edad de 30 días en tanto que a largo plazo son los animales de 8% los que se afectan más por la desnutrición, como lo muestran las reducciones de los ejes mayor a los 220 días y del menor a los 90 días.

Por lo que respecta al tamaño de las ramas primarias y el número de espinas, ambas muestran una tendencia a aumentar en los animales alimentados con dieta 8%, en tanto que las dendritas secundarias tienden a disminuir y sólo a los 90 días hay un aumento del número de espinas, este encuentro se relaciona con los trabajos de Warren y Bedi (1982) y Bedi (1987) en el sentido de que los animales desnutridos durante el periodo crítico del desarrollo y luego rehabilitados nutricionalmente después de los 100 días de edad, presentan un aumento del número de sinapsis. En nuestro modelo la desnutrición con 8% de caseína pudiera ocasionar este aumento pero sólo en las dendritas de más reciente diferenciación como son las de los animales de 30 y 90 días de edad. Sin embargo,

la dieta del 6% provocó efectos de reducción tanto de la extensión de las dendritas como del número de espinas en las dendritas primarias, estos efectos se presentaron a los 30 y a los 220 días de edad y el número de espinas se redujo importantemente a los 90 días. Por el contrario en las dendritas secundarias, el efecto de la dieta del 6% se presentó a los 30 días y el número de espinas se redujo en los 90 y 220 días de edad, persistiendo a largo plazo la reducción en aquellas estructuras de más reciente diferenciación como son las ramas primarias. Estos resultados explican de una manera interesante, lo propuesto por Resnick y col., (1985) en el sentido de que estas dietas producen efectos ocultos (8%) y evidentes (6%) en las células del SNC. En este estudio se evidencian estos efectos en las células no piramidales cuyos patrones de desarrollo son posnatales, particularmente en los parámetros de densidad sináptica representada por el campo dendrítico y el número de espinas.

Los efectos producidos por la edad muestran que el tamaño del soma se incrementa con la edad en ambos ejes entre 30 y 90 días, sin embargo el eje mayor aumenta poco entre 90 y 220 días y luego el eje menor tiende a disminuir por efecto de la edad, aunque este cambio no fue significativo en los animales control. Los animales desnutridos siguen este mismo patrón el cual fue significativo entre 30 y 90 días y entre 90 y 220 días en ambos ejes (Fig. 14). En cambio la extensión lineal se incrementó solo en los animales desnutridos entre 30

y 90 días, indicando un retraso en el patrón de crecimiento de las dendritas primarias y secundarias y luego un incremento entre 90 y 220 días, en ambos casos el incremento fue significativo con $p < 0.01$. Estas observaciones ponen en evidencia la capacidad plástica de aumentos y disminuciones del crecimiento dendrítico en animales desnutridos crónicamente. El número de las espinas se aumentó entre las edades de 30 y 90 días en los animales control en las dendritas primarias y luego se disminuyó entre los 90 y 220 días, aunque no fue estadísticamente significativo. Las dendritas secundarias mostraron esta misma tendencia sin llegar a ser significativos. Este efecto de aumento y disminución en el número de las espinas, ha sido encontrado también en las células del núcleo rafe dorsal en estas mismas edades por Díaz-Cintra y col., (1981) lo que pudiera explicar de alguna manera el papel neuromodulador de estas células en la corteza visual de la rata.

Los animales alimentados con 8% mostraron un patrón similar al de los controles, es decir, entre 30 y 90 días, hubo un aumento de espinas y entre 90 y 220 días, un decremento significativo en ambas dendritas, demostrando una vez más los efectos producidos por una dieta no tan drástica como el 6%, es decir, de algún modo la dieta 8%, provoca el aumento de espinas entre 30 y 90 días, que representa una ganancia en la entrada sináptica, como lo demostraron Bedi y col., (1980), en la corteza frontal y cerebelar de ratas

desnutridas a los 30 días y el efecto de reducción a largo plazo, pondría en peligro la capacidad competitiva de los animales alimentados con la dieta de 8%. Por el contrario los animales que consumieron la dieta del 6% no mostraron cambios por la edad en este parámetro.

Por lo que respecta a las diferencias entre las dietas, prácticamente no se observaron cambios en tamaño celular en ninguno de los grupos, en cambio la extensión lineal de las dendritas primarias se vió reducida con ambas dietas (8% y 6% de caseína) y del mismo modo el número de espinas se vió reducido importantemente a los 90 y 220 días en las dendritas secundarias, debido por una parte a la edad en los animales alimentados con 8% y por otra parte a la dieta del 6%.

CONCLUSIONES.

1. La desnutrición crónica instalada pre y posnatalmente en la rata, por medio de dietas isocalóricas e hipoproteínicas (8% y 6% de caseína) afecta de manera estructural a las células birramificadas de la corteza visual primaria (Área 17), en cuanto al tamaño celular, el cual se redujo en su eje menor, provocando que los somas, adquirieran una forma ovoide.
2. Los animales alimentados con la dieta del 8% mostraron una tendencia a aumentar la extensión lineal tanto de sus dendritas primarias como secundarias, mismas que se redujeron de manera significativa en los animales alimentados con la dieta de 6% de caseína, por lo que resulta evidente que esta dieta produce efectos más drásticos en las células birramificadas.
3. Del mismo modo, el número de espinas se vió aumentado en ambos tipos de dendritas en los animales alimentados con la dieta de 8%. Estos aumentos, tanto en la extensión lineal como en el número de espinas revelan fenómenos de plasticidad adaptativos provocados por esta dieta, en las células estudiadas.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

4. La dieta del 6% de caseína instalada pre y posnatalmente en la rata, produjo efectos más severos en la extensión lineal, en el tamaño celular y en el número de las espinas dendríticas, mismos que pueden traducirse en alteraciones funcionales de naturaleza inhibitoria para las células piramidales o de proyección de la corteza visual, importantes en la integración de las respuestas conductuales, visuales y motoras.
5. La edad produce aumento en el crecimiento de las dendritas de las células birramificadas, entre las edades de 30 y 90 días. En tanto que los animales desnutridos, siguen este crecimiento, pero en mayor proporción.
6. El número de espinas se aumenta entre las edades de 30 y 90 días en los animales control y alimentados con 8% y luego se reducen entre las edades de 90 y 220 días, como se ha encontrado en otro tipo de células no piramidales localizadas en ciertos núcleos aminérgicos, como el núcleo rafe dorsal del tallo cerebral.
7. Los efectos selectivos de la desnutrición (8% y 6% caseína) en las células birramificadas, explican de manera indirecta, el retardo de los patrones de maduración y diferenciación neuronales característicos de las células no piramidales del SNC.

R E F E R E N C I A S

- 1 Angevine, J. V. y Sidman, R. L., Autoradiographic study of cell migration during histogenesis of cerebral cortex in the mouse, *Nature*, 192 (1961) pp. 766-768.
- 2 Angulo-Colmenares, A. G., Vaughan, D. W. y Hinds, J. W., Rehabilitation following early malnutrition in the rat: body weight, brain size, and cerebral cortex development., *Brain Res.*, 169 (1979) pp. 121-138.
- 3 Beritoff, J. S., Structure of the cerebral cortex as related of behavior: Morphologic and functional characteristics, In: *Neuronal Mechanisms of Higher Vertebrate Behavior*, Little Broen and Co. Publishers, Boston, (1965) pp. 235-292.
- 4 Barnes, R. H., Dual role of enviromental deprivation and malnutrition in relating intellecte development. *Am. Clin. Nutr.*, 29 (1976) pp. 912-919.
- 5 Barnes, D. y Altman, J., Effects of different schedules of early undernutrition on the preweaning growth of the rat cerebellum, *Exp. Neurol.*, 38 (1973) pp. 406-419.
- 6 Bedi, K. S., Lasting neuroanatomical changes following undernutrition during early life. In J. Dobbing (ed.), *Early Nutrition and Later Achievement*, Academic Press, London, (1987) pp. 1-49.
- 7 Bedi, K.S., Hall, R., Davies, C.A. y Dobbing, J., A stereological analysis of the cerebellar granule and purkinje cells of 30-day-old and adult rats undernourished during early postnatal life, *J. Comp. Neurol.*, 193 (1980) pp. 863-870.
- 8 Bedi, K. S., Thomas, Y. M., Davies, C. A. y Dobbing, J., Synapse-to-neuron ratios of the frontal and cerebellar cortex of 30-day-old and adult rats undernourished during early postnatal life, *J. Comp. Neurol.*, 193 (1980) pp. 49-56.
- 9 Belmar, J. y Lara, H., Efectos de la desnutrición sobre los neurotransmisores cerebrales, *Rev. Chil. Nut.*, 13 (1985) pp. 83-85.
- 10 Blinkov, S. M. y Glezer, I. I., *The Human Brain in Figures and Tables* Plenum Press, New York, (1968) pp. 35-52.
- 11 Bok, S. T., Quantitative relations between perikaryon and nucleus. In (ed.), *Histonomy of the cerebral cortex*, Elsevier, Amsterdam, (1956) pp. 60-98.

- 12 Bok, S. T., *Histonomy of the cerebral cortex*. Elsevier, Amsterdam, (1959).
- 13 Braak, H., *Architectonics of the human telencephalic cortex*, Berlin, Heidelberg, New York, (1980) pp. 89-106.
- 14 Brodmann, K., *Vergleichende Lokalisationslehre der Grosshirnrinde*. Barth, Leipzig, (1909).
- 15 Cajal-Agüeras, S. R., Contamina, P., Parra, P., y Martínez-Millan, L., The distribution of VIP-immoreactive neurons in the visual cortex of adults rabbits and during postnatal development, *Brain Res.*, 370 (1986) pp 333-337.
- 16 Callison, D. A. y Spencer, J.W., Effect of chronic undernutrition and/or visual deprivation upon the visual evoked potential from the developing rat brain, *Develop. Psychobiol.*, (1968) pp. 196-204.
- 17 Campbell, A.W., *Histological Studies on the Localization of Cerebral Function*, Univ. Press, New York, Cambridge, (1905).
- 18 Clos, J., Favre, C., Selme-Matrat, M. y Legrand, J., Effects of undernutrition on cell formation in the rat brain and specially on cellular composition of the cerebellum, *Brain. Res.*, 123 (1977) pp. 13-26.
- 19 Connor, J.R. y Peters, A., Vasoactive intestinal polypeptide immunoreactive neurons in rat visual cortex, *Neurosci.*, 12 (1984) pp. 1027-1044.
- 20 Conradi, N. G. y Muntzing, K., Cerebellar foliation in rats. Effects of maternal malnutrition on the formation of fissures in foetal rats, *Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand.*, 93 (1985) pp. 391-395.
- 21 Cordero, M. E., Díaz, G. y Araya, J., Neocortex development during severe malnutrition in the rat, *Am. J. Clin. Nutr.*, 29 (1976) pp. 358-365.
- 22 Cragg, B. G., The development of cortical synapses during starvation in the rat, *Brain*, 95 (1972) pp. 143-150.
- 23 Díaz-Cintra, S., Cintra, L., Kemper, T., Morgane, P. J. y Resnick, O., The effects of protein deprivation on the nucleus raphe dorsalis: A morphometric Golgi study in rats of three age groups, *Brain Res.*, 221 (1981) pp. 243-255.
- 24 Dobbing, J., *Prenatal nutrition and neurological development*. Symposia of the Swedish Nutrition Foundation. Edited by: Cravioto, J. Almgvist and Wiksell, Uppsala, (1974) pp. 96-110.

- 25 Dobbing, J., Hopewell, J. W., and Lynch, A., Vulnerability of developing brain: VII. Permanent deficit of neurons in cerebral and cerebellar cortex following early mild undernutrition, *Exp. Neurol.*, 32 (1971) pp. 439-447.
- 26 Dobbing, J., and Sands, J., Quantitative growth and development of human brain, *Arch. Dis. Child.*, 48 (1973) pp. 757-767.
- 27 Eayrs, J. T. y Goodhead, B., Postnatal development of the cerebral cortex of the rat, *J. Anat.*, 98 (1957) pp. 385-402.
- 28 Emson, P. C., Gilbert, R. F. R., Loren, I., Fahrenkug, J., Sundler, F. y Shaffalitzky, de Muckadell O.B., Development of vasoactive intestinal polypeptide (VIP) countaining neurones in rat brain, *Brain Res.*, 177 (1979) pp. 437-444.
- 29 Fairén, A., DeFelipe, J. y Regidor, J., Nonpyramidal neurons. General Account. In A. Peters y E.G. Jones (eds.), *Cerebral Cortex*, Plenum Press, New York, (1984) pp. 224-228.
- 30 Fairén, A., Peters, A. y Saldanha, J., A new procedure for examining Golgi-impregnated neurons of light and electron microscopy, *J. Neurocytol.*, 6 (1977) pp. 311-337.
- 31 Fairén, A. y Valverde, F., A special type of neuron in the visual cortex of the cat: A Golgi and electron microscopic study of chandelier cells, *J. Comp. Neurol.*, 194 (1980) pp. 761-779.
- 32 Feldman, M. L. y Peter, A., The forms of non-pyramidal neurons in the visual cortex of the rat, *J. Comp. Neurol.*, 179 (1978) pp. 761-794.
- 33 Felten, D. L., Hallman, H. y Jonson, G., Evidence for a neurotrophic role of noradrenaline neurons in the postnatal development of rat cerebral cortex, *J. Neurocytol.*, 11 (1982) pp. 119-135.
- 34 Fuxe, R., Höfelft, T., Said, S. Z. y Mutt, V., VIP and the nervous system: immunichemical evidence for localization in central and peripheral neurons, particularly intracortical neurons of cerebral cortex, *Neurosci. Lett.*, 5 (1977) pp. 241-246.
- 35 Globus, A. Scheibel, A. B., Synaptic loci on visual cortical neurons of the rabbit: the specific afferent radiation, *Exp. Neurol.*, 18 (1967) pp. 116-131.

- 36 Golgi, C., Sulla fina Anatomia degli organi centrali del sistema nervosa, Pavia, (1886) pp. 14-23.
- 37 Hicks, S. P. y D'Amato, C. J., Cell migrations to the isocortex in the rat, *Anat. Rec.*, 160 (1968) pp. 619-634.
- 38 Jones, E. G., Varieties and distribution of non-pyramidal cells in the somatic sensory cortex of the squirrel monkey, *J. Comp. Neurol.*, 160 (1975) pp. 205-268.
- 39 Juraska, J. M. y Fifkova, E., A Golgi study of the early postnatal development of the visual cortex of the hooded rats, *J. Comp. Neurol.*, 183 (1979) pp. 247-256.
- 40 Krieg, W. J. S., Connections of the cerebral cortex 1. albino rat. A topography of the cortical areas, B: Structure of the cortical areas, *J. Comp. Neurol.*, 84 (1946) pp. 221-276; 277-324.
- 41 Kriegman, M. R. y Hogan, E. D., Undernutrition in the developing rat: effect upon myelination, *Brain Res.*, 107 (1976) pp. 239-255.
- 42 Kulenbeck, H., The Central Nervous System of Vertebrates Academic Press, New York, (1970).
- 43 Leuba, G. y Rabinowicz, T., Long-term effects of postnatal undernutrition and maternal malnutrition on mouse cerebral cortex I. cellular densities, cortical volume and total number of cells, *Exp. Brain Res.*, 37 (1979) pp. 283-298.
- 44 Leuba, G. y Rabinowicz, T., Long-term effects of postnatal undernutrition and maternal malnutrition on mouse cerebral cortex. II. Evolution of dendritic branching and spines in the visual region, *Exp. Brain Res.*, 37 (1979) pp. 299-308.
- 45 Levitsky, D. A. y Barnes, R. H., Nutritional and environmental interactions in the behavioral development of the rat: Long-term effects, *Science*, 176 (1972) pp. 68-71.
- 46 Lorente de Nó, R., Architectonics and structure of the cerebral cortex. In (ed.), *Physiology of the nervous system.*, J. F. Fulton Oxford University Press, London., (1938) pp. 291-330.
- 47 Lund, J. S., Organization of neurons in the visual cortex, area 17, of the monkey (*Macaca mulatta*), *J. Comp. Neurol.*, 147 (1973) pp. 455-496.

- 48 Lund, J. S., Intrinsic organization of the primate visual cortex, area 17 as seen in Golgi preparations. In F.O. Schmidt, F.G. Worden, G. Adelman y S. G. Dennis (eds.), *Organization of the Cerebral Cortex*, MA:MIT Press, Cambridge, (1981) pp. 105-124.
- 49 Marín-Padilla, M. Prenatal and early postnatal ontogenesis of the human motor cortex: a Golgi study. I. The sequential development of the cortical layers, *Brain Res.*, 23 (1970) pp. 167-183.
- 50 Marín-Padilla, M. The chandelier cell of the human visual cortex: A Golgi study, *J. Comp. Neurol.*, 256 (1987) pp. 61-70.
- 51 McDonald, J. K., Parnavelas, J. G., Karamandilis, A. N., Brecha, N. y Koenig, J.L., The morphology and distribution of peptide-containing neurons in the adult developing visual cortex of the rat. I. Somatostatin, *J. Neurocytol.*, 11 (1982a) pp. 809-824.
- 52 McDonald, J. K., Parnavelas, J. G., Karamanlidis, A. N. y Brecha, N., The morphology and distribution of peptide-containing neurons in the adult and developing visual cortex of the rat. II. Vasoactive intestinal polypeptide, *J. Neurocytol.*, 11 (1982b) pp. 825-837.
- 53 Millor, M. y Peters, A., Maturation of rat visual cortex. II. A combined Golgi-electron microscope study of pyramidal neurons, *J. Comp. Neurol.*, 203 (1981) pp. 555-573.
- 54 Mitra, N. L., Quantitative analysis of the cell types in mammalian neocortex, *J. Anat.*, 89 (1955) pp. 467-483.
- 55 Morgane, P. J., Miller, M., Kemper, T., Stern, W. C., Forbes, W. M., Hall, R., Bronzino, J. D., Kissane, J., Hawrylewicz, J. y Resnick, O., The effects of protein malnutrition on the developing central nervous system in the rat, *Neurosci. Biobehav. Rev.*, 2 (1978) pp. 137-230.
- 56 Morrison, J. H. y Magistretti, P. J., Monoamines and peptides in cerebral cortex, *Trends Neurosci.*, 6 (1983) pp. 1-6.
- 57 Morrison, J. H., Magistretti, P. J., Benoti, R. y Bloom, E.E. The distribution and morphological characteristics of the intracortical VIP positive cell: An immunohistochemical analysis, *Brain Res.*, 292 (1984) pp. 269-282.
- 58 Müller, L. J., Verwer, R.W.H., Nuñez-Cardozo, B. y Vrensen, G., Synaptic characteristics of identical

- 48 Lund, J. S., Intrinsic organization of the primate visual cortex, area 17 as seen in Golgi preparations. In F.O. Schmidt, F.G. Worden, G. Adelman y S. G. Dennis (eds.), *Organization of the Cerebral Cortex*, MA:MIT Press, Cambridge, (1981) pp. 105-124.
- 49 Marin-Padilla, M. Prenatal and early postnatal ontogenesis of the human motor cortex: a Golgi study. I. The sequential development of the cortical layers, *Brain Res.*, 23 (1970) pp. 167-183.
- 50 Marin-Padilla, M. The chandelier cell of the human visual cortex: A Gogi study, *J. Comp. Neurol.*, 256 (1987) pp. 61-70.
- 51 McDonald, J. K., Parnavelas., J. G, Karamandilis, A. N., Brecha, N. y Koenig, J.L., The morphology and distribution of peptide-countaining neurons in the adult developing visual cortex of the rat. I. Somatostatin, *J. Neurocytol.*, 11 (1982a) pp. 809-824.
- 52 McDonald, J. K., Parnavelas, J. G., Karamanlidis, A. N. y Brecha, N., The morphology and distribution of peptide-countaining neurons in the adult and developing visual cortex of the rat. II. Vasoactive intestinal polypeptide, *J. Neurocytol.*, 11 (1982b) pp. 825-837.
- 53 Miller, M. y Peters, A., Maturation of rat visual cortex. II. A combined Golgi-electron microscope study of pyramidal neurons, *J. Comp. Neurol.*, 203 (1981) pp. 555-573.
- 54 Mitra, N. L., Quantitative analysis of the cell types in mammalian neocortex, *J. Anat.*, 89 (1955) pp. 467-483.
- 55 Morgane, P. J., Miller, M., Kemper, T., Stern, W. C., Forbes, W. M., Hall, R., Bronzino, J. D., Kissane, J., Hawrylewicz, J. y Resnick, O., The effects of protein malnutrition on the developing central nervous system in the rat, *Neurosci. Biobehav. Rev.*, 2 (1978) pp. 137-230.
- 56 Morrison, J. H. y Magistretti, P. J., Monoamines and peptides in cerebral cortex, *Trends Neurosci.*, 6 (1983) pp. 1-6.
- 57 Morrison, J. H., Magistretti, P. J., Benoti, R. y Bloom, E.E. The distribution and morphological characteristics of the intracortical VIP positive cell: An immunohistochemical analysis, *Brain Res.*, 292 (1984) pp. 269-282.

- 58 Müller, L. J., Verwer, R.W.H., Nuñez-Cardozo, B. y Vrensen, G., Synaptic characteristics of identical pyramidal and multipolar non-pyramidal neurons in visual cortex of young and adult rannots. A quantitative Golgi electron microscope study, *Neurosci.*, 12 (1984) pp. 1071-1087.
- 59 Ortega, A., Efectos de la Desnutrición crónica pre y posnatal en las células piramidales de la corteza visual de la rata: Un estudio morfométrico comparativo *Fac. Ciencias, UNAM, México, D. F.*, (1987).
- 60 Parnavelas, J. G., Burne, R. A. y Lin, C. S., Distribution and morphology of functionally identified neurons in the visual cortex of the rat, *Brain Res.*, 261 (1983) pp. 21-29.
- 61 Parnavelas, J. G., Lieberman, A. R. y Webster, K. E., Organization of neurons in the visual cortex, area 17, of the rat, *J. Anat.*, 124 (1977) pp. 305-322.
- 62 Parnavelas, J. G. y Uylings, H. B. M., The growth of non-pyramidal neurons in the visual cortex of the rat: A morphometric study, *Brain Res.*, 193 (1980) pp 373-382.
- 63 Paxinos, G. y Watson, C., *The rat in stereotaxic coordinates*, Academic Press, Sydney, (1982).
- 64 Peters, A., Stellate cells of the rat parietal cortex, *J. Comp. Neurol.*, 141 (1971) pp. 345-374.
- 65 Peters, A., Chandelier cells. In A. Peters y E.G. Jones (eds.), *Cerebral Cortex*, Plenum Press, New York, (1984) pp. 361-380.
- 66 Peters, A. y Harriman, K. M., The enigmatic bipolar cell of rat visual cortex, *J. Comp. Neurol.*, 267 (1988) pp. 409-432.
- 67 Peters, A. y Kaiserman-Abramof, R., The small pyramidal neuron of the rat cerebral cortex. The perikaryon, dendrites and spines, *Am. J. Anat.*, 127 (1970) pp. 321-356.
- 68 Peters, A. y Kara, D. A., The neuronal composition of area 17 of rat visual cortex. I. The pyramidal cells, *J. Comp. Neurol.*, 234 (1985) pp. 218-241.
- 69 Peters, A., Miller, M. y Kimerer, L. M., Cholecystokinin-like immunoreactive neurons in rat cerebral cortex, *Neurosci.* 8 (1983) pp. 431-448.

- 70 Peters, A., Proskaner, C. C. y Ribak, C. E., Chandelier cells in the visual cortex, *J. Com. Neurol.*, 206 (1982) pp. 397-416.
- 71 Peters, A. y Regidor, J., A reassessment of the forms of nonpyramidal neurons in area 17 of cat visual cortex, *J. Comp. Neurol.*, 203 (1981) pp. 685- 716.
- 72 Poliakov, G. I., Relations between some structural parameters of types and forms of neurons effecting different kinds of switches in the neocortex, *J. Hirnforsch*, 15 (1974) pp. 249-268.
- 73 Ramanamurthy, P. S. V., Maternal and early posnatal malnutrition and transmitter amines in the rat brain, *J. Neurochem.*, 28 (1977) pp. 253-254.
- 74 Ramón y Cajal, S., *Histologie du systeme nerveaux de l' homme et des vertebres* Maloine, Paris, (1911).
- 75 Resnick, D., Morgane, P. J., Hasson, R. y Miller, M., Overt and Hidden forms of chronic malnutrition in the rat and their relevance to man, *Neurosci. Biobehav. Rev.*, 6 (1985) pp. 55-75.
- 76 Salas, M., Díaz, S. y Nieto, A., Effects of neonatal food deprivation on cortical and dendritic development of the rat, *Brain Res.*, 73 (1974) pp. 139- 144.
- 77 Schönheit, B., Über den einflub einer fruhen postnatalen mangelerlernahrung auf die reifung kortikaler neurone bei der ratte, *J. Hirnforsch*, 23 (1982) pp. 681-692.
- 78 Schönheit, B. y Haensel, P., Der Einflub einer unspezifischen mangelerlernahrung auf die spinemorphologie von lamina V-pyramidenzellen der regio cingularis juveniler and erwachsener ratten, *J. Hirnfotsch*, 5 (1984) pp. 617-634.
- 79 Shea, B. T., Reproductive strategies, body size, and encephalization in primate evolution, *Int. J. Primatol*, 8 (2), (1987) pp. 139-156.
- 80 Shoemaker, W. J. y Wutman, R. J., Perinatal undernutrition: Acumulation of chatecolamines in rat brain, *Science*, 171 (1971) pp. 1071-1019.
- 81 Sholl, D. A., *The organization of the cerebral cortex*, Metnuen, London, (1956).
- 82 Sholl, D. A., Dendritic organization in the neurons of the visual and motor cortices of the cat, *J. Anat.*, 87 (1953) pp. 387-406.

- 83 Siassi, F. y Siassi, B., Differential effects of protein-calorie restriction and subsequent repletion on neuronal and nonneuronal components of cerebral cortex in newborn rats, *J. Nutr.*, 102 (1973) pp. 1625-1633.
- 84 Sima, A. y Persson, L., The effect of pre and posnatal undernutrition on the development of the rat cerebellar cortex, *Neurobiol.*, 5 (1975) pp. 23-34.
- 85 Smart, J. L. y Bedi, K. S., Early life undernutrition in rats, *Br. J. Nutr.*, 47 (1982) pp. 439-444.
- 86 Sobotka, T. J., Cook, M. P. y Brodie, R. E., Neonatal malnutrition: neurochemical, hormonal and behavioral manifestation, *Brain Res.*, 65 (1974) pp. 443-457.
- 87 Somogyi, P., A specific axo-axonal interneuron in the visual cortex of the rat, *Brain Res.*, 186 (1977) pp. 345-350.
- 88 Somogyi, P., Freund, T. F. y Cowey, A., The axo-axonic interneuron in the cerebral cortex of the rat, cat and monkey, *Neurosci.*, 7 (1982) pp 2577-2607.
- 89 Sugita, N., Comparative studies on the growth of the cerebral cortex, *J. Comp. Neurol.*, 29 (1918) pp. 177-240.
- 90 Szentágothai, J. y Arbib, M., Conceptual models of neural organization, *Neurosci.*, 12 (1974) pp. 307-510.
- 91 Thomas, Y. M., Bedi, K. S. Davies, C. A. y Dobbing, J., A stereological analysis of the neuronal and synaptic content of the frontal and cerebellar cortex of weaning rats undernourished from birth, *Early Hum. Dev.*, 3 (1979) pp. 109-126.
- 92 Tömböl, T., Some Golgi data on visual cortex of the rhesus monkey, *Acta Morphol. Acad. Sci. Hung.*, 26 (1978) pp. 115-138.
- 93 Valverde, F., A comparative approach to neocortical organization based on the study of the brain of the hedgehog (*Erinaceus europaeus*). In S. Grisolia, C. Guerri, F. Samson y S. Norton (eds.), *Ramon y Cajal contributions to the Neurosciences*, Elsevier, Amsterdam, (1983) pp. 149-170.
- 94 Vogt, C. y Vogt, O., Allgemeine Ergebnisse unserer Hirnforschung. Vierte Mitteilung: Die physiologische Bedeutung der architektonischen Rindenreizungen. *J. Physiol. Neurol.* 25 (1919) pp 279-452.

- 95 Warren, M. A. y Bedi, K. S., A quantitative assessment of the development of synapses and neurons in the visual cortex of control and undernourished rats, *J. Comp. Neurol.*, 227 (1981) pp. 104-108.
- 96 Warren, M. A. y Bedi, K. S., Synapse-to-neuron ratios in the visual cortex of adult rats undernourished from about birth until 100 days of age, *J. Comp. Neurol.*, 210 (1982) pp. 59-64.
- 97 West, Ch. D. y Kemper, T. L., The effect of a low protein diet on the anatomical development of the rat brain, *Brain Research.*, 107 (1976) pp. 221- 237.