

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA



**MALNUTRICIÓN Y ENVEJECIMIENTO: UN ESTUDIO
CONDUCTUAL Y SUBCELULAR EN EL
HIPOCAMPO.**

**TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRA EN
CIENCIAS (NEUROBIOLOGÍA)**

Presenta

Lic. en Psicología Yvonne Martínez Chávez

DIRECTORA DE TESIS: DRA. SOFÍA YOLANDA DÍAZ MIRANDA

Campus Juriquilla, Querétaro Julio 2006



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA

Campus UNAM-UAQ Juriquilla

Los miembros del comité tutorial certificamos que la tesis elaborada por: Yvonne Martínez Chávez, cuyo título es: “Malnutrición y envejecimiento: un estudio conductual y subcelular en el hipocampo” se presenta como uno de los requisitos para obtener el grado de Maestría en Ciencias (Neurobiología) y cumple con los criterios de originalidad y calidad requeridos por la División de Estudios de Posgrado de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Jurado de examen

Presidente	Dr. Roberto A. Prado Alcalá	_____
Secretario (tutora)	Dra. Sofía Yolanda Díaz Miranda	_____
Vocal	Dr. Víctor Ramírez Amaya	_____
Suplente	Dra. María Isabel Miranda Saucedo	_____
Suplente	Dra. María Esther Olvera Cortés	_____

Aprobado por el Comité Académico

Dr. Raúl Paredes Guerrero
Coordinador del programa

**"Todo lo perecedero no es más que figura.
Aquí lo inaccesible se convierte en hecho;
Aquí se realiza lo infame."
Goethe**

Agradecimientos

En primer lugar quiero agradecer a la Dra. Sofí por todo su apoyo, comprensión y tolerancia, que tuvo para conmigo estos 2 años y medio. Porque en todo momento tuvo una palabra de aliento y otra de sabiduría y sabía reconocer cuál necesitaba escuchar.

A mi Comité Tutorial integrado por el Dr. Cárabez y el Dr. Prado, por sus aportaciones para este trabajo durante toda la maestría. En especial al Dr. Prado por sus incansables correcciones, su paciencia y sus ganas de que esta tesis saliera de la mejor manera.

A los miembros de mi laboratorio Azucena Aguilar y Tonantzin Martínez por todas sus enseñanzas y colaboración para la realización de esta tesis.

A mis compañeros y amigos del laboratorio Uriel y Vicente, sin los cuales no hubiera reído hasta el cansancio.

Muy especialmente quiero agradecer al Dr. Manuel Salas porque en todo momento me ha brindado su mano, desde que llegué al Instituto, por sus palabras de consuelo y su inapreciable contribución a este trabajo.

A Mirelta Regalado por su gran apoyo estadístico a esta tesis.

A mis compañeros bibliotecarios Pilar Galarza, Rafael Silva e Ignacio Caballero, por todo su apoyo.

A la Unidad de Microscopía Electrónica, en especial a Lourdes Palma por las horas enteras que pasó conmigo en el microscopio.

A Leonor Casanova por su disposición a resolver cualquier imprevisto.

Al bioterio del Instituto de Neurobiología dirigido por Martín García.

A los miembros de mi jurado, por sus aportaciones a esta tesis, en especial a la Dra. Esther Olvera y al Dr. Víctor Amaya por sus valiosas sugerencias.

Agradecimientos Institucionales

Al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA), UNAM. Proyectos IX203704, IN205206-17.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por la Beca –184988- otorgada para realizar los estudios de Maestría y por el financiamiento al proyecto 46754-Q (2005-2008).

Dedicatorias

En primer lugar a mis padres, por todo su apoyo en el sentido más extenso de la palabra. Porque siempre han respetado mis decisiones y me han ayudado a crecer hasta donde he querido. Han alimentado mis ganas de seguir volando con todo su amor y su dedicación hacia mí y hacia mis hermanos. Y porque siempre han estado tras de mí vigilantes para abrirme sus brazos y enseñarme el principio del camino que debo encontrar.

A mis hermanos, por todo su amor. Rafa, qué te puedo yo decir? La enseñanza que me has dado y el coraje que has tenido serán ejemplos que llevaré en mi alma durante todo el camino de sueños que nos falta por andar. Karencita, por toda tu ternura e inocencia con la que afrontas la vida, siempre le pones el granito de azúcar que nos hace estar de la mejor manera.

A mis sobrinos adoradísimos: Dany, eres de las personas más sabías que conozco, ojalá algún día me compartas más tu maravillosa forma de ver la vida. Liam, por todos tus abrazos y besos, toda tu ternura y tu inigualable sonrisa.

A mis tíos. En especial a mi tía chayotona quien siempre me ha abierto las puertas de su casa y de su corazón. A mis tíos Lalo y Toña, porque a pesar de la distancia su cariño esta presente y me llena de calor. A Maruquita y a Itzel, por todas las veces que me han escuchado y me han dado buenos consejos. A mis tíos Leobardo y Ruth, por abrirme las puertas de su hogar, y de especial forma a ti amiga, por las largas pláticas en tu cocina. A mi madrina Lety y mi tía Rosa, por su cariño y su constancia. A mis abuelitos, por su ejemplo a seguir.

A mis amigos de sueños de toda la vida: Friducha, a pesar de la distancia tu increíble congruencia ilumina mi vida, gracias! Tu has llenado todos mis espacios de magia, y de la mano hemos superado incontables miedos y obstáculos. Gunnary porque has estado ahí desde el principio de los principios de las historias que hemos compartido de infinitas risas e infinitos llantos. Abi adorado!!!! Por todo lo que hemos vivido juntos y por que me llena de orgullo ser tu amiga y haber estado desde el inicio de nuestros sueños, siempre bailaremos juntos. Diana, la risa constante me ha brindado tu amistad y pos arriba la actitud Frida Kahlo ja ja ja. Lizett, por toda la claridad que has sabido darme en nuestras intensas horas de plática en el ciberespacio. Fabián, sin palabras; contigo no hay manera, tu sabes de sobra lo que en mi corazón, en mi alma y en mi vida hay para ti. A mi prima Malú, por su amor y su total entrega.

A mis amigos de la maestría. Néstor, Jeans, Gina y Marina por las pijamadas de la ciencia. Marina, por toda la convivencia del día a día, por tu coraje y tu fuerza y sobre todo porque logramos vencer las diferencias. Yuritzia Ups! Ja ja ja, como bien dijiste no tuvimos el mejor inicio pero al final la pasamos de lo más lindo, gracias por tu amistad y por las cosas que juntas hemos descubierto y por estar a mi lado en todo momento. A Jaimito baby, por toda, toda tu paciencia y por los momentos maravillosos que hemos vivido. A la darling, quien llego al final, pero me lleno de luz.

Por que todo sueño puede cumplirse, todo es cosa de ser pacientes y aprender a encontrar respuestas en el lago del ombligo de la luna. Saber buscar no dónde vemos luz, si no donde hay más oscuridad. Compartir toda la magia del aire y de las flores, de los olores y de los seres. Tener la humildad de escuchar las señales y la suficiente creatividad para saber interpretarlas. Por todo lo que somos y lo que podemos ser, hasta la próxima estación: ESPERANZA!

**"Al menos una vez en la vida
conviene poner todo en discusión"
Descartes**

ÍNDICE GENERAL

AGRADECIMIENTOS	iv
AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES	v
DEDICATORIAS	vi
RESUMEN	ix
SUMMARY	x
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	4
2.1. Hipocampo	4
2.2. Anatomía	4
2.3. Citoarquitectura	5
2.3.1 Intracircuito	6
2.4. Funciones	7
2.5. Malnutrición y desarrollo del Sistema Nervioso Central (SNC)	8
2.5.1 Malnutrición e hipocampo	9
2.6. Envejecimiento celular	11
2.7. Envejecimiento e hipocampo	15
2.8. Aprendizaje	18
2.8.1. Aprendizaje y malnutrición	21
2.8.2. Aprendizaje y envejecimiento	22
2.9. Memoria	23
2.9.1. Memoria y malnutrición	26
2.9.2. Memoria y envejecimiento	27
3. JUSTIFICACIÓN	28
4. HIPÓTESIS	28
4.1 Conductuales	28
4.2 Subcelulares	29
5. OBJETIVOS	29
5.1 Objetivos generales	29
5.2 Objetivos particulares	29

6. MATERIAL Y MÉTODOS	31
6.1 Sujetos	31
6.2 Método de malnutrición	31
6.3 Tarea de evitación activa de una vía	33
6.3.1 Material	33
6.3.2 Sesión de adquisición	34
6.3.3. Sesión de retención	35
6.3.4. Sesión de extinción	35
6.4. Análisis estadístico conductual	35
6.4.1. Bloques	35
6.4.2. ANOVA	36
6.4.3. Análisis <i>post hoc</i>	36
6.5. Técnica de microscopia electrónica	36
6.5.1. Preparación del hipocampo en plano	37
6.6. Análisis morfométrico	38
6.6.1. Análisis estadístico subcelular	40
6.6.2. ANOVA	40
6.6.3. Análisis <i>post hoc</i>	40
7. RESULTADOS	41
7.1. Conductuales	41
7.2. Anatómicos	48
7.2.1. Pesos corporales	48
7.2.2. Pesos cerebrales	48
7.3. Subcelulares	49
7.3.1. Área del soma	49
7.3.2. Área del núcleo	50
7.3.3. Área del citoplasma	51
7.3.4. Aparato de Golgi	51
7.3.5. Lisosomas asociados a vesículas	52
7.3.6 Lisosomas	53
7.3.7. Mitocondrias	54

8. DISCUSIÓN	56
9. CONCLUSIONES	65
9.1. Conductuales	65
9.2. Subcelulares	66
9.2.1 Áreas	66
9.2.2 Organelos	66
10. REFERENCIAS	67
11. ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS	72

1. INTRODUCCIÓN

Al lóbulo temporal medial del encéfalo se le ha relacionado con diferentes procesos cognitivos. Parte del mismo es el hipocampo el cual ha sido punto focal de numerosos estudios experimentales donde se muestra su participación importante en la formación de la memoria declarativa, en particular la de tipo espacial. En los mamíferos, es una estructura altamente especializada que presenta fenómenos de plasticidad a lo largo de toda la vida del organismo. Así se ha observado que la exposición a diferentes estímulos estresantes durante periodos críticos del desarrollo puede alterar esta plasticidad neuronal, produciendo reducciones en el tamaño del soma, así como del número de ramificaciones y espinas dendríticas de las células granulares del Giro Dentado (GD). Un factor nocivo perinatal que se ha estudiado ampliamente por su relación con el desarrollo del hipocampo, es la malnutrición (deficiencia de uno o varios elementos en la composición de la dieta normal). Este paradigma de dieta deficiente en proteína, puede dársele a la madre durante el período prenatal y /o postnatal, alterándose así los procesos citogenéticos que ocurren en los fetos o en los recién nacidos provenientes de esas madres. Los modelos de malnutrición así generados se clasifican en: malnutrición crónica, cuando la dieta deficiente se administra a lo largo de toda la vida del individuo desde etapas tan tempranas como la gestación; malnutrición prenatal, solamente se malnutre a la madre durante la gestación; y la malnutrición postnatal, cuando se administra a partir del parto (este modelo es el más drástico debido a que afecta el desarrollo postnatal del sistema nervioso, y en particular del hipocampo).

En estos modelos de malnutrición se ha demostrado que se producen cambios en la arquitectura del hipocampo y a la vez hay deficiencias funcionales en tareas sensoriales y motoras que involucran procesos cognitivos dependientes de esta estructura. Por observaciones previas se sabe que el desarrollo general del sistema nervioso de los animales sometidos a la malnutrición, presenta alteraciones y retardos en los procesos de maduración, diferenciación y reconocimiento sináptico. Observaciones obtenidas en este laboratorio han apuntado a que los animales malnutridos presentan mayor longevidad y menores

rasgos de senilidad o de enfermedades asociadas al envejecimiento. Estas mismas observaciones fueron realizadas por otros investigadores quienes observaron que en animales con dieta restringida en proteínas se reduce el incremento de peso corporal debido a la edad, se incrementa la longevidad y se retarda el deterioro fisiológico debido a la vejez (Tacconi M T, Lligoña L, Saltona M, Nikolaos Pitsikas y Algeri S, 1991; Kirkwood y Shanley 2005). Dichas observaciones han conducido a la pregunta de si estos rasgos menores de senilidad en animales malnutridos o con dieta restringida en proteínas, se extrapolan a la conducta de éstos, y principalmente a una preservación de procesos cognitivos durante la senectud.

Con base en lo anterior en el presente trabajo se estudió por una parte, el efecto de la malnutrición postnatal en el desempeño de la tarea de evitación activa (con la cual se puede medir la adquisición, retención y extinción del aprendizaje) en ratas jóvenes y seniles malnutridas, así como el impacto de la edad *per se* en esta misma tarea. Por otra parte se observó el impacto de la malnutrición postnatal *per se*, así como de la edad en la estructura subcelular de las neuronas piramidales del Cuerno de Ammon (CA1), y la interacción del envejecimiento con la malnutrición en esta misma zona del hipocampo. Se hicieron mediciones del área del soma, del núcleo y del citoplasma porque se ha observado que estímulos nocivos como la malnutrición alteran la permeabilidad de la membrana celular, dando como resultado una mayor entrada de materiales tóxicos al interior de la célula aumentando su tamaño y su función (Martínez, Vargas & Arancibia, 2003). Por otro lado, se estudió el estado de los organelos, ya que se han caracterizado los cambios que estos sufren cuando la célula entra en un estado de necrosis o de apoptosis, producto del daño provocado por un estímulo nocivo.

Los resultados conductuales mostraron que la malnutrición no afecta el proceso de aprendizaje, de la retención ni de extinción de la tarea de evitación activa aprendida en animales seniles. Sin embargo, si afecta, la retención y la extinción de la tarea de prevención activa en animales jóvenes. Una vez realizada la prueba, los animales fueron pesados, encontrándose una disminución del 77% en el peso corporal de los animales malnutridos a la edad de 90 días y de un 20%

a la edad de 660 días. Después de la perfusión de los animales se pesó el cerebro de los mismos, observándose una disminución del 11.11% de peso cerebral en los malnutridos a los 90 días de edad, y una disminución del 18.33% en los animales malnutridos seniles. En el análisis morfométrico se observó que la malnutrición incrementa el área del soma, del núcleo y del citoplasma sin importar la edad de los animales, así como también aumenta el número de mitocondrias, lisosomas asociados a vesículas y lisosomas sin importar la edad de los animales. Por lo tanto, inferimos que, la malnutrición y el envejecimiento producen alteraciones subcelulares en las neuronas piramidales del CA1 del hipocampo, asociadas con la incapacidad de consolidar el aprendizaje en memoria de largo plazo únicamente en los animales jóvenes.

Estos hallazgos sugieren que la malnutrición instalada en el periodo postnatal y mantenida hasta la vejez, no afecta de manera sustantiva el desempeño de la tarea evitación activa, ya que los animales seniles no muestran deficiencias en la misma. Lo cual pone de manifiesto las capacidades plásticas de las neuronas hipocámpicas del CA1 a través de mecanismos intracelulares en estos animales. En contraste con las mayores deficiencias conductuales observadas en los animales jóvenes malnutridos que utilizan posiblemente mecanismos plásticos a nivel de las sinapsis neuronales y de la activación de circuitos neuronales.

RESUMEN

La formación hipocámpica ha sido profundamente estudiada por su clara participación en funciones cognitivas, como el aprendizaje y la memoria. El hipocampo, es una estructura altamente especializada y susceptible al envejecimiento y a diferentes estímulos estresantes como la malnutrición durante su desarrollo. La malnutrición produce alteraciones anatómicas de las células piramidales en el hipocampo y a los procesos cognitivos que dependen de éstas. Estudios anatómicos han mostrado que la malnutrición posnatal interfiere con el proceso celular de las ratas jóvenes; poco se sabe, sin embargo, acerca de los efectos de la malnutrición posnatal sobre el aprendizaje de ratas seniles. En este trabajo describimos la interacción entre la malnutrición postnatal y la edad sobre el aprendizaje y memoria y los cambios subcelular de las células del CA1 del hipocampo. Los resultados conductuales muestran que la adquisición (aprendizaje) y la retención (memoria) están altamente afectados en el grupo joven malnutrido. El análisis morfométrico postmortem reveló que las neuronas piramidales del CA1 de los animales malnutridos (jóvenes y seniles) mostraron áreas significativamente mayores del soma y del núcleo; así como un número mayor de mitocondrias y lisosomas asociados a vesículas y de lisosomas. Estos resultados mostraron que la malnutrición prolongada en ratas adultas produce alteraciones severas in estas células, como tumefacción y malformación de los organelos, acompañadas de alteraciones sustanciales de conductas que dependen del hipocampo como la memoria a largo plazo. Así, esto se puede interpretar como que el daño al hipocampo inducido por una dieta baja en proteína administrada por periodo prolongado, junto con edad; producen alteraciones subcelulares en las células piramidales del hipocampo que se asocian a la incapacidad para mantener la memoria a largo plazo en animales jóvenes malnutridos.

ABSTRACT

The hippocampal formation, has been thoroughly studied for its clear participation in cognitive function, in particular learning and spatial memory. The hippocampus is highly specialized in its functions and very susceptible to the effects of the ageing and stressful factors, such as malnutrition during its development. Malnutrition produces anatomical alterations of pyramidal cells in the hippocampus and on behavior that depend on this structure. Anatomical studies have shown that postnatal malnutrition interferes with cellular processes in young rats; little is known, however, about the effects of postnatal malnutrition on cognition in senile rats. In the present work were described the interaction between postnatal malnutrition and ageing groups with to learning, memory and sub-cellular changes in the CA1 pyramidal cells. The behavioral results showed that acquisition (learning) and retention (memory) and extinction is significantly affected only in malnourished young animals. Postmortem morphological studies and analysis revealed that CA1 pyramidal cells in malnourished animals (young and senile) showed increases in somatic and nucleus areas, as well as in the number of mitochondria and lysosomes associated to vesicles and lysosomes. These results showed that prolonged malnutrition in adult rats produces severe alterations in these cells, like tumefaction and malformation of the organelles, accompanied by substantial impairments of hippocampal-dependent behaviors such as long term memory. Thus, it seems likely that the hippocampal damage induced by prolonged low-protein and aging produces sub cellular alterations in the CA1 pyramidal cells in hippocampus associated whit an incapacity to maintain long-term memory in young malnourished animals.

2. ANTECEDENTES

2.1. Hipocampo

Desde hace mucho tiempo el hipocampo ha sido una estructura de gran interés para estudiar procesos cognitivos tales como el aprendizaje y la memoria. La palabra hipocampo proviene del latín *hippocampus*, que significa "caballo de mar". Los antiguos anatomistas nombraron así a esta parte del cerebro cuya forma recuerda la de este pez. Los roedores pequeños como la rata poseen un hipocampo que se identifica fácilmente porque ocupa una parte considerable del cerebro (Figura 1).

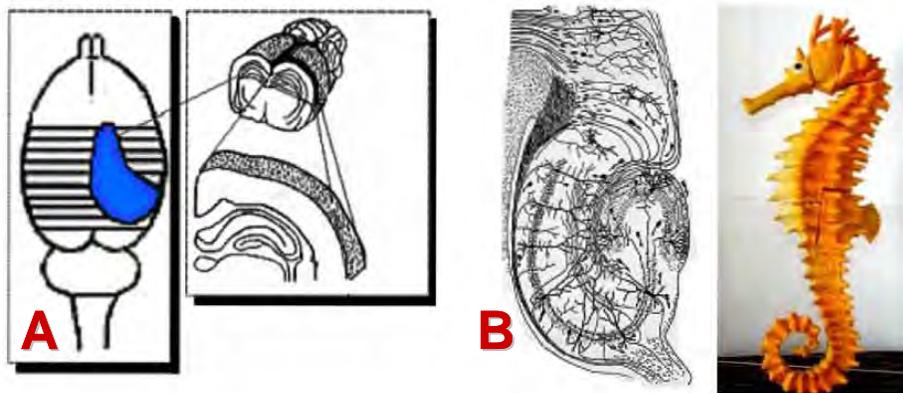


Figura 1. Se observa en A la ubicación del hipocampo en el cerebro del roedor y en B el dibujo de Santiago Ramón y Cajal del hipocampo y su analogía con el caballo de mar.

2.2. Anatomía

La formación hipocámpal comprende cuatro regiones corticales. Estas se dividen en el GD, hipocampo propio (el cual se divide en tres subcampos; CA3, CA2 y CA1), el complejo subicular (lo conforman el subiculum, presubiculum, y parasubiculum) y la corteza entorrinal. La capa de células granulares o capa principal está conformada por neuronas de proyección (Golgi tipo I). Además de estas células, existen numerosas interneuronas (Golgi tipo II) que interactúan con ellas. La gran mayoría de esas interneuronas en el GD y en el hipocampo, son GABAérgicas y se presentan en diversas variedades:

- **células piramidales en canasto.** Se ubican en el GD e inervan a los somas de las células granulares.

- **células musgosas.** Se ubican en la capa de las células polimórficas y aunque son consideradas como interneuronas excitadoras, en realidad se trata de neuronas de proyección (Amaral & Witter, 1989).

2.3. Citoarquitectura

El hipocampo está formado por conexiones laminares que son unidireccionales, las cuales tienen como origen la corteza adyacente entorrinal. El flujo de información en el hipocampo está claramente definido, lo cuál permite el estudio de las conexiones sinápticas entre sus diferentes grupos celulares. La organización laminar es en general parecida para todos los subcampos de esta estructura. La capa delgada relativamente libre de células, localizada debajo de la capa de células piramidales es llamada *stratum oriens* y por debajo de ésta se encuentra el alveus. En el campo CA3, (pero no el CA2 ni en el CA1); se localiza una zona delgada por encima de la capa piramidal, en la cual se encuentran los axones de las fibras musgosas (FM) originarias del GD; a esta zona se le conoce como el *stratum lucidum*. Superficial al *stratum lucidum* en el CA3, e inmediatamente por encima de la capa piramidal en el CA2 y CA1, se encuentra el *stratum radiatum*. La porción más superficial del hipocampo se conoce como *stratum lacunosum-moleculare* (Paxinos, 1995).

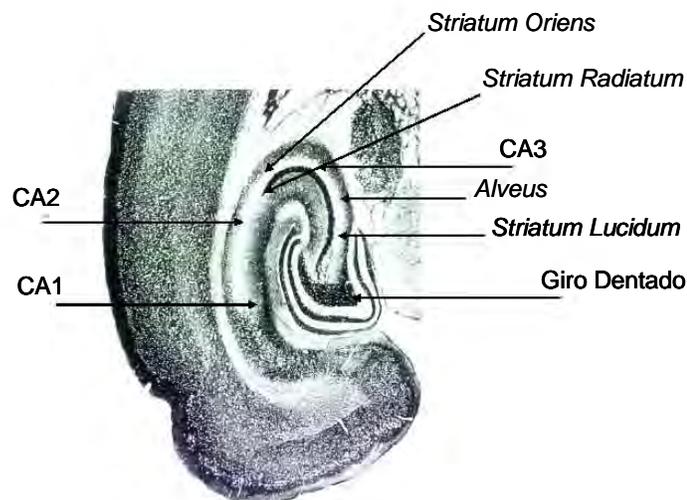


Figura 2. Corte horizontal de la formación hipocámpica, teñida con la técnica histológica de Timm's, la cuál marca el Zinc en el hipocampo permitiendo distinguir las distintas capas celulares. Figura modificada de Paxinos, 1995.

2.3.1. Intracircuito

Se inicia con la entrada de las fibras de la vía perforante provenientes de las células estrelladas y piramidales de las capas II y IV (respectivamente) de la corteza entorrinal medial y lateral, pasan a través del complejo subicular y de la fisura hipocámpica, entran a las capas moleculares del GD y del CA3, terminando en los dos tercios externos. En las células granulares, forman sinapsis excitatorias sobre las espinas dendríticas, constituyendo así el primer relevo sináptico (glutamatérgico) en la entrada de información al intracircuito hipocampal. Las células granulares del GD envían sus axones o FM a la región del hilus del GD¹, después alcanzan el *stratum lucidum* de la región CA3. En esta región las expansiones sinápticas de las FM terminan sobre las excrecencias torneadas localizadas en la parte proximal de las dendritas con las que forman sinapsis de paso, siendo este el segundo relevo sináptico del intracircuito hipocampal. Las neuronas piramidales de la región del CA3 envían sus axones por dos vías, una hacia afuera del hipocampo a través de la fimbria (fibras comisurales), y la otra que forma la colateral mielinizada (colaterales de Schaffer) hacia la región del CA1. En los *strata radiatum y oriens*, las colaterales de Schaffer (van del CA3 al CA1) forman sinapsis “en passant” sobre las dendritas apicales de las neuronas piramidales integrando en el campo del CA1 el tercer relevo del intracircuito hipocámpico (Figura 3). El CA1 también recibe fibras comisurales y del patrón perforante de la corteza entorrinal (capas III y V), los axones de estas neuronas piramidales del CA1 (*stratum oriens*) envían proyecciones a las neuronas piramidales del complejo subicular y a la parte profunda de la corteza entorrinal. Existe una proyección principal desde el subiculum hacia las capas profundas de la corteza entorrinal (V y VI), de ahí se proyectan a las capas superficiales de la corteza entorrinal (II y III) y estas últimas dan lugar a las fibras de la vía perforante (Figura 3). Así, la entrada de la vía perforante a las células granulares originadas en la corteza entorrinal, y la salida desde CA1 es en gran parte la misma área,

¹ En el hilus son abundantes dos tipos de células: las GABAérgicas (ácido gama-aminobutírico) y las glutamatérgicas, de tipo musgoso cuya función, no es del todo clara, en un principio se creía que solo su ramificación axonal salía a inervar al hipocampo contrario, ahora se propone que su función es la de regular la excitación de las células granulares.

tanto por vía directa como subicular. De esta forma, las conexiones de la región hipocámpica parecen estar organizadas en un circuito cerrado que permite el flujo unidireccional de información (Amaral & Witter, 1989).

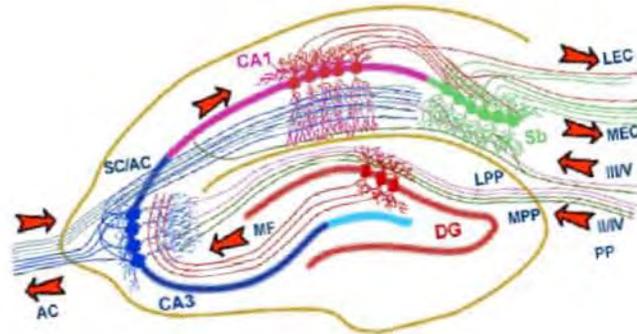


Figura 3. Circuito unidireccional del hipocampo del roedor. Entrada de las capas II/IV del patrón perforante de la corteza entorrinal hacia el DG y hacia las células piramidales del CA3, éstas reciben a las FM del patrón perforante provenientes de la corteza entorrinal pero de las capas II/V. Las células piramidales del CA3 envían dos tipos de axones al CA1, cuyos axones van hacia el subiculum y de ahí hacia la corteza entorrinal lateral y medial. Esquema modificado de Bortolotto y Collingridge, 1993.

2.4. Funciones

Se ha propuesto al hipocampo como el sustrato dentro del cerebro relacionado con el aprendizaje asociativo y que la integración de éste con las cortezas aledañas del lóbulo temporal medial es crítica para establecer la memoria declarativa (Thompson, 2005). El interés en el papel crucial que juega el hipocampo en la formación de la memoria proviene del estudio clásico del paciente HM (Scoville & Milner, 1957). Este paciente presentaba un cuadro de epilepsia del lóbulo temporal como consecuencia de una lesión que sufrió a los nueve años de edad. HM fue sometido a una intervención quirúrgica donde le extirparon la formación del hipocampo, el núcleo amigdalino y partes de la corteza temporal multimodal de asociación en ambos hemisferios. La extirpación de los lóbulos temporales mediales disminuyó las crisis convulsivas pero produjo deficiencias bastante específicas en la memoria. HM tenía memoria de corto plazo por segundos o minutos, además tenía una memoria de largo plazo bien conservada de los acontecimientos que habían sucedido antes de la intervención. La capacidad de transformar la memoria de corto a largo plazo era lo que le faltaba a HM (para revisión ver Kandel, 2001).

Las deficiencias en la memoria seguidas a una lesión hipocampal no son globales, sino específicas de la memoria declarativa (explícita o racional); los sujetos con esta lesión no pueden aprender tareas que involucren memoria declarativa (hechos y eventos) (Thompson & Jeansok, 1996). En la rata, el hipocampo entre muchas otras funciones, codifica la información espacial del ambiente donde se encuentra el animal creando un mapa cognitivo de éste, el cual provee al animal de información acerca de su actual localización en la organización espacial del ambiente. El hipocampo puede tener múltiples mapas independientes, que proveen información de los diferentes ambientes que han sido previamente registrados por el animal (Rosenzweig & Barnes, 2003).

Las funciones dependientes del hipocampo pueden verse afectadas por alteraciones o patologías; éste se ha caracterizado por ser una estructura sumamente lábil, puede sufrir cambios en su anatomía debido a la malnutrición y al proceso natural del envejecimiento (Granados-Rojas, Aguilar & Díaz- Cintra, 2004; Andrade y Barbosa, 1996). A continuación se consideran algunos de estos efectos.

2.5. Malnutrición y desarrollo del Sistema Nervioso Central (SNC)

El desarrollo del SNC de los mamíferos involucra una serie de cambios secuenciales altamente regulados, los cuales incluyen división celular (neurogénesis y gliogénesis), migración celular a las áreas blanco del cerebro, diferenciación celular (arborización dendrítica, extensiones axonales y formación de circuitos), angiogénesis, mielinización, sinaptogénesis, síntesis y liberación de neurotransmisores y muerte celular programada (apoptosis) durante todo el desarrollo. Estos procesos tienen distintos tiempos de manifestación durante el desarrollo (heterocronía), siendo diferentes para cada especie y estructura cerebral. La mayoría de estos procesos se inician en la etapa prenatal y se extienden más allá del nacimiento, aunque algunos comienzan durante el periodo postnatal, por lo que pueden ser alterados fácilmente por estímulos tanto exógenos (v.gr. la malnutrición, drogas o alcohol), como endógenos (v. gr. las hormonas y metabolitos). Esta vulnerabilidad neuronal temporal ha sido denominada periodo crítico del desarrollo (Kretchmer, 1989). Los factores

epigenéticos como la malnutrición, el estrés o el uso de drogas durante el desarrollo intrauterino o en periodos perinatales del hipocampo repercuten en trastornos de integración funcional a lo largo de la vida hasta la senectud (Díaz-Cintra, Granados-Rojas, Sánchez & Cintra, 2001).

Podemos definir la malnutrición como un cuadro clínico caracterizado por una alteración en la composición de nuestro cuerpo, ocasionado por un desequilibrio entre la ingesta de nutrimentos y las necesidades nutrimentales². En estudios de malnutrición prenatal utilizando una dieta baja en proteínas (6% de caseína), se ha reportado disminución de la talla, peso corporal y cerebral hasta alteraciones celulares en diferentes áreas cerebrales, comparando a animales malnutridos contra animales controles (Bush & Leathwood, 1974).

Se han diseñado diversos modelos de malnutrición experimental; en donde se conserva la estimulación sensorial y la materna, en este modelo sólo se reduce la proteína caseína. Esta dieta isocalórica contiene solo el 6% de caseína de una dieta normal (con 25% de caseína), (Morgane, et al., 1978). Para observar sus efectos sobre diversas etapas del desarrollo, este modelo se emplea durante los periodos críticos del desarrollo, tanto pre como postnatales observando el efecto que se produce sobre todo en los procesos de maduración del SNC y en el establecimiento de funciones cognitivas.

Observaciones realizadas por el grupo de Tacconi et al (1991), han señalado que los animales sometidos a una dieta restringida en proteína presentan retraso en las etapas del desarrollo neuronal en comparación con animales sometidos a una dieta normal. Asimismo, presentan menor ganancia de peso corporal con el incremento de la edad, un aumento en la longevidad y una aparición tardía de las deficiencias funcionales debidas al envejecimiento. Estas mismas observaciones fueron confirmadas por Kirkwood y Shanley (2005).

2.5.1. Malnutrición e hipocampo

Los estudios realizados en animales malnutridos posnatalmente en distintas edades, han mostrado deficiencias en el volumen del hipocampo (Granados-

² básica <http://salud.discovery.com/conditions/condition08.shtml>

Rojas, Aguilar & Díaz- Cintra, 2004), en la arborización dendrítica, en el número de espinas (Andrade & Barbosa, 1996; Díaz Cintra, García-Ruiz, Cordiki & Cintra, 1994; García-Ruiz, Díaz-Cintra, Cintra & Corkidi 1993), y en la sinaptogénesis de las fibras musgosas que llegan al *stratum lucidum* del CA3 (Granados-Rojas et al, 2002). Díaz-Cintra, Cintra, Galván, Aguilar, Kemper y Morgane, (1991), reportaron disminución del número de ramas dendríticas y de espinas en las neuronas granulares del hipocampo de animales malnutridos durante el periodo de la gestación (Figura 4). Por otra parte, García-Ruiz, et al., (1993) encontraron estos mismos efectos en las células piramidales del CA3, los cuales persistieron aún después de una rehabilitación nutricional iniciada al momento del nacimiento.

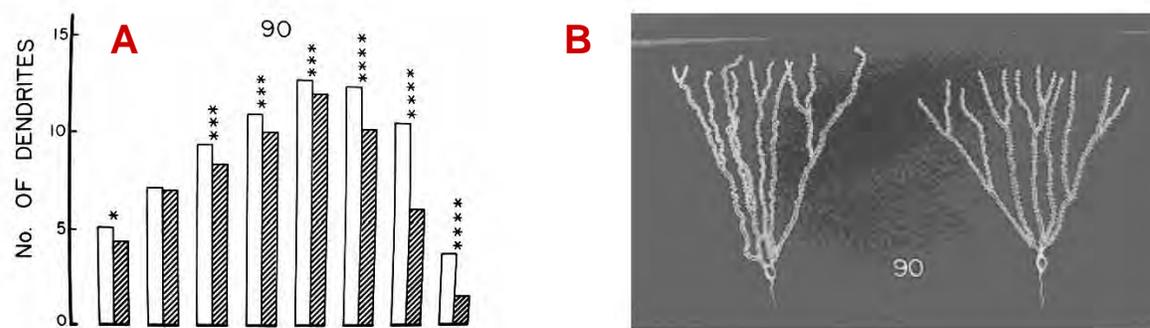


Figura 4. Se muestra en A, la disminución de las ramas dendríticas (medida en 8 círculos concéntricos) de los animales malnutridos de 90 días de edad (barras asuradas) en comparación con los controles (barras blancas). En B, a la derecha una célula granular con menor extensión del árbol dendrítico de los animales malnutridos. Figura modificada de Díaz-Cintra, Cintra, Galván, Aguilar, Kemper y Morgane, (1991).

En etapas adultas, la malnutrición produce disminución del número de ramas dendríticas tanto en células granulares como en las piramidales, pero un aumento en el número de espinas en los segmentos terminales de las células granulares (Andrade, Castanheira-Vale, Paz- Dias, Madeira & Barbosa, 1996). Asimismo, alteración en los sistemas colinérgicos y GABAérgicos del hipocampo adulto (Andrade & Barbosa, 1996). También se ha observado un menor número de sinapsis entre las FM y el *stratum lucido* del CA3 en animales adultos que fueron malnutridos durante el periodo prenatal (Granados-Rojas et al., 2002). Todos estos cambios anatómicos en el hipocampo podrían estar asociados con

alteraciones cognitivas irreversibles en el largo plazo (Lukoyanov, Andrade, Madeira & Barbosa, 1999).

2.6. Envejecimiento celular

El envejecimiento es un proceso deletéreo, progresivo, intrínseco y universal que con el tiempo ocurre en todo ser vivo a consecuencia de la interacción de la genética del individuo con su medio ambiente. Podría también definirse como todas las alteraciones que se producen en un organismo con el paso del tiempo y que conducen a pérdidas funcionales y a la muerte³. Las manifestaciones celulares por la edad son más pronunciadas en células postmitóticas como las neuronas, cuyas alteraciones repercuten en las funciones esenciales del cerebro y contribuyen de manera importante en el proceso general del envejecimiento (Brunk & Terman, 2002).

Los cambios en el tejido nervioso vinculados con la edad resultan en muerte y atrofia neuronal, acumulación de lipofuscina⁴, hiperreactividad astrocitaria, aumento de la sustancia amiloide perivascular (β -amilode) y aparición de redes neurofibrilares en el citosol de la neurona. Se han caracterizado distintos procesos mediante los cuales, se trata de explicar cómo es que ocurren estos cambios; a continuación se enumeran los más importantes:

- **Apoptosis:** Es un proceso activo que culmina en muerte celular, en el cual no hay inflamación y se caracteriza por cambios morfológicos que inicialmente se manifiestan en el núcleo, como condensación de la cromatina en la periferia exterior de la membrana nuclear en agregados bien delimitados de diversas formas y tamaños, nucléolos remanentes, fragmentación del núcleo, vacuolas citoplasmáticas, mitocondrias electrodensas con cambios morfológicos⁵, ribosomas y polirribosomas desprendidos del retículo endoplásmico rugoso y fragmentación celular en

³ <http://med.unne.edu.ar/revista/revista100/envejecimiento.htm>

⁴ Sustancia intralisosomal polimérica, compuesta de residuos de proteínas entrecruzadas y eslabonadas. formada por el proceso oxidativo del hierro catalizado, no es degradable y no puede ser exocitada en las células posmitóticas.

⁵ Por la edad, sufren alargamientos y desorganización estructural (Brunk & Terman, 2002).

- cuerpos apoptóticos (Figura 5), que finalmente son fagocitados (Martínez, Vargas & Arancibia 2003).
- **Necrosis:** Es un fenómeno pasivo que se presenta como consecuencia de alguna agresión y que lleva a un exceso de flujo de calcio. Generalmente va acompañada de una respuesta inflamatoria aguda, involucra cambios metabólicos progresivos con una importante reducción de ATP, edema celular, ruptura de membranas, edema mitocondrial, dilatación de las cisternas en retículo endoplásmico (Figura 5), liberación de hidrolasas, ruptura lisosomal, condensación de la cromatina y fragmentación del DNA por endonucleasas (Martínez, Vargas & Arancibia 2003).



Figura 5. Esquema de los distintos estadios por los cuales atraviesa la célula tras recibir una lesión. Del lado izquierdo se indican los estadios de la necrosis y del lado derecho los de la apoptosis.

- **Autocanibalismo neuronal:** La colina es una sustancia fundamental para las neuronas que la usan para la síntesis de su neurotransmisor específico, la acetilcolina (acetilcolinérgicas), pero en todas las neuronas se usa para la síntesis del fosfolípido de membrana fosfatidilcolina. Debido al envejecimiento, el sistema de transporte bidireccional se reduce, por lo que

las neuronas colinérgicas centrales resultan ser las más vulnerables por la deficiencia de la colina como resultado de la reducción en la capacidad de transporte y por la mala alimentación del anciano. Así, por la demanda de su neurotransmisor acetilcolina, las neuronas recurren a la fosfatidilcolina de la membrana para suplir la falta de colina, autodañando la arquitectura y funcionalidad normal de las membranas, pudiendo así, conducir al daño neuronal definitivo.

- **Acumulación de pigmentos:** Algunas neuronas sintetizan pigmentos relacionados con el metabolismo del neurotransmisor que utilizan. Otras acumulan lipofuscina⁶ debido al envejecimiento. Su papel lesivo se debe al efecto de masa en el interior de la célula, provocando el deterioro neuronal. Además, los fragmentos proteásicos de la proteína β -amiloide generados mediante mecanismos desconocidos, se acumulan en el espacio extracelular precipitando en forma de ovillos neurofibrilares, que desencadenan reacciones inflamatorio-gliales que culminan en atrofia y muerte neuronal.
- **Excitotoxicidad:** Es el daño ocasionado por la sobreestimulación del glutamato, un neurotransmisor excitatorio que ejerce efectos específicos a través de los receptores NMDA, y que al acumularse en el espacio intersináptico por la anoxia tisular produce aumento del Ca^{2+} libre intracelular, por lo que se disparan los procesos energéticos ya que las mitocondrias tienden a tomarlo en lugar de producir trifosfato de adenosina (ATP) y se desencadena la activación de proteasas intracelulares, lipasas y endonucleasas, mediando un proceso autodestructivo.
- **Deficiencia del factor de crecimiento neuronal (NGF):** El NGF posee la capacidad para aumentar la supervivencia y la regeneración de las neuronas colinérgicas y por ello resulta importante considerar su deficiencia como un factor agregado al daño neuronal por envejecimiento o por procesos patológicos.

⁶ "pigmento de la edad", material auto fluorescente, polimérico y no degradable acumulado en los lisosomas.

- **Atrofia neuronal:** Se evidencia con una disminución del tamaño celular y del árbol dendrítico. Como esto ocurre en las enfermedades degenerativas (Alzheimer), se ha especulado que la atrofia o pérdida colinérgica central asociada a la edad, sería responsable de la declinación en las funciones intelectuales y cognitivas en el envejecimiento. Sin embargo, la atrofia puede confundir la interpretación histopatológica del tejido nervioso, ya que los núcleos y células pequeñas pueden pasar por células gliales y por ende sobrestimar la muerte neuronal. Asimismo, una neurona atrófica no necesariamente es disfuncional, sino que sus cambios pueden reflejar mecanismos adaptativos. De no mediar circunstancias patológicas agregadas, las neuronas restantes son capaces de suplir las que faltan. Por ello la “discapacidad intelectual debida a la edad” revierte en gran parte por acción del entrenamiento.⁷
- **Relación mitocondria-lisosoma como eje de la teoría del envejecimiento.** Según Brunk y Terman (2002), la autofagocitosis anormal de las mitocondrias es el mayor contribuyente de la formación de lipofuscina, debido por una parte, a la acumulación de mitocondrias dañadas por el envejecimiento, que no han sido autofagocitadas propiamente por los lisosomas y a la presencia aumentada de mitocondrias alargadas indicando alteraciones en su división y por ende en su renovación (Figura 6). Adicionalmente, los componentes macromoleculares de mitocondrias autofagocitadas y otras estructuras celulares sufren modificación oxidativa dentro de los lisosomas, resultando en la formación de material no degradable conocido como lipofuscina. En las neuronas produce decremento en la capacidad autofagocitaria, reduciendo progresivamente el reciclado mitocondrial. Consecuentemente, las alteraciones debidas al envejecimiento en las mitocondrias y los lisosomas se amplifican causando disfunción profunda y muerte neuronal.

⁷ (<http://zonamedica.com.ar/categorias/medicinailustrada/envejecimiento/>).

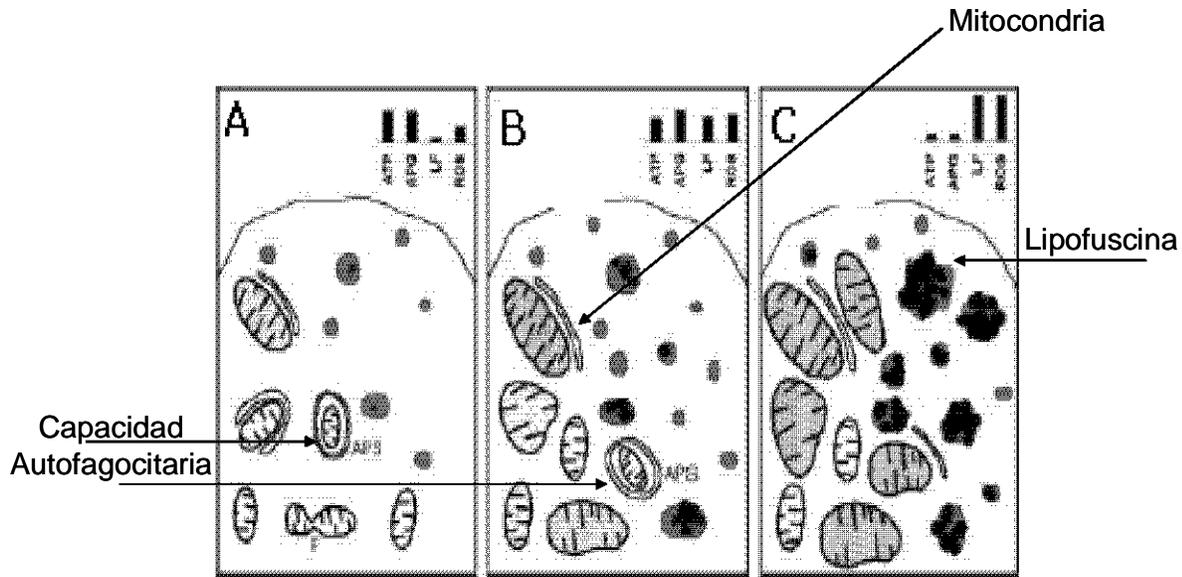


Figura 6. Acumulación progresiva de mitocondrias alteradas y de inclusiones de lipofuscina por el envejecimiento en células postmitóticas: A, joven, B, maduro y C, senil. Las barras indican: la intensidad de producción de ATP; la capacidad autofagocitaria (APS); el contenido de lipofuscina (LF) y la formación de especies de oxígeno reactivo (ROS). Esquema modificado de Brunk y Terman, 2002.

2.7. Envejecimiento e hipocampo

El hipocampo aparentemente es susceptible a sufrir cambios tempranos producidos por el envejecimiento en su estructura y su fisiología. Las deficiencias cognitivas que se observan con la edad, se atribuyen en parte a los cambios entre las conexiones de las células que conforman el intracircuito en el hipocampo senil. Se ha observado en ratas seniles con deficiencias en la memoria un menor número de sinapsis en el GD; así como menor expresión de sinaptoficina en el *stratum lacunosum moleculare* del CA3 (Foster, 1999). Estos resultados deben ser interpretados cuidadosamente ya que no se sabe con exactitud si estos marcadores sinápticos reflejan el número de sinapsis, la fuerza sináptica o ambas. A su vez se ha observado una pérdida de sinapsis funcionales entre las colaterales de Schaffer y el área del CA1. Esta pérdida de la funcionalidad sináptica en el CA1 resulta en una menor respuesta postsináptica a la estimulación producida por las colaterales de Schaffer (Foster, 1999). Experimentos electrofisiológicos muestran que la entrada de neuromoduladores

colinérgicos al hipocampo es deficiente. Este cambio del neuromodulador puede alterar el comportamiento del intracircuito hipocámpico (Foster, 1999). También se han observado alteraciones en la plasticidad sináptica ya que hay una disminución de la inducción y el mantenimiento de la potenciación a largo plazo (LTP), así como una disminución de los umbrales para la depresión a largo plazo (LTD), ambos son modelos fisiológicos propuestos como el substrato de la evocación (Rosenzweig & Barnes, 2003, Foster, 1999).

Las propiedades electrofisiológicas del hipocampo senil, han sido ampliamente estudiadas y hoy en día se cuenta con un amplio conocimiento en esta área. Sin embargo, existe un menor número de estudios en los cuales se valoren los cambios relacionados al envejecimiento que sufre la estructura subcelular de las neuronas del hipocampo. Los estudios realizados en este campo han mostrado que existe un claro desequilibrio en los organelos que conforman las neuronas. Así, Díaz-Cintra, Yong, Aguilar, Bi, Lynch y Ribak, (2004), en un estudio en rebanadas en cultivo de hipocampo provenientes de ratones con deficiencia de la proteína apoE, expuestas a inhibidores de las catepsinas B y L, encontraron que el núcleo de las células piramidales en rebanadas tratadas era más excéntrico (Figura 7) en comparación con rebanadas no tratadas con los inhibidores. Se observó un incremento en el número de vesículas asociadas con el aparato de Golgi y un menor número de microtúbulos en las dendritas proximales. Las células de rebanadas deficientes de la apolipo-proteína E (apoeE) muestran un incremento de lisosomas y cuerpos multivesiculados, así como una reducción de sinapsis alrededor del cuerpo neuronal.

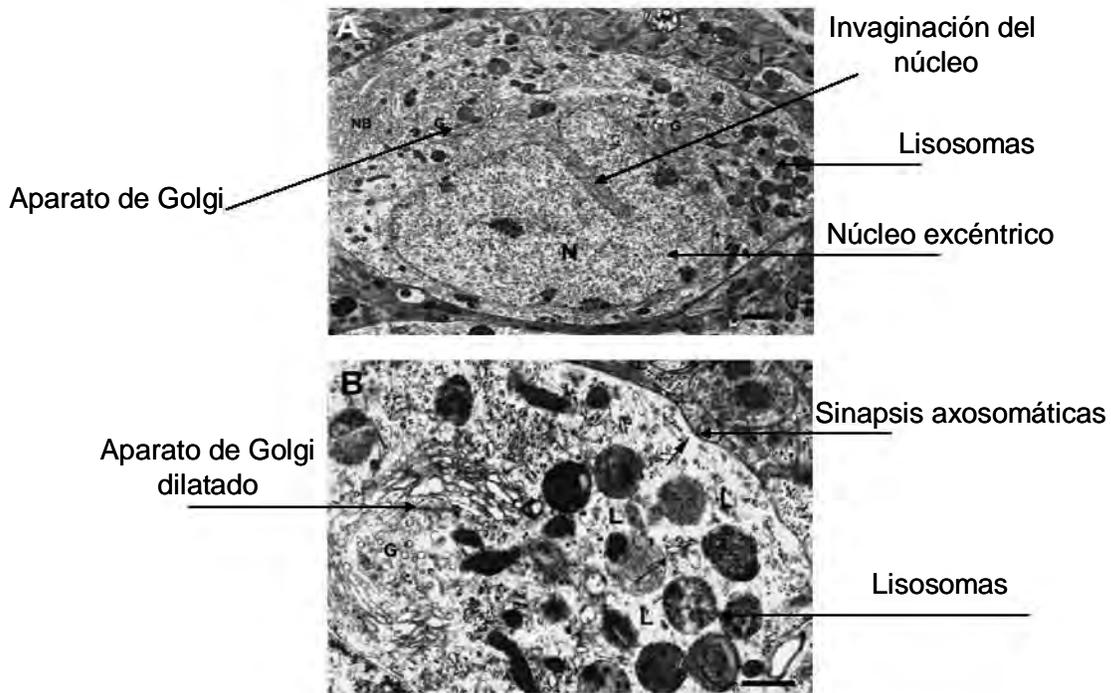


Figura 7. Fotomicrografías de microscopía electrónica modificadas de Díaz–Cintra, Yong, Aguilar, Bi, Lynch y Ribak, (2004). Se observa la invaginación del núcleo y los organelos celulares en A y en B la acumulación de lisosomas y dilatación del aparato de Golgi. La barra representa 1 micrometro.

Anatómicamente, las células del hipocampo senil muestran depósitos densos de proteína similares a las redes neurofibrilares y a las placas β -amiloides, que son las marcas distintivas de la enfermedad de Alzheimer. En las neuronas piramidales del CA1 se altera la dinámica enzimática celular, en la cual se pierde paulatinamente la regulación de las enzimas que mantienen un crecimiento racional de los lisosomas, provocando un incremento anormal en el citoplasma adyacente al segmento proximal del axón (“meganeurita”). Este se llena de lisosomas y provoca un rompimiento del mismo, desconectando a la neurona con sus relevos sinápticos (Yong, Bednarsk, Gall, Lynch & Ribak, 1999). Al mismo tiempo, cuando la neurona sufre daño (axotomía) se altera el patrón de la sustancia de Nissl, proceso conocido como “cromatólisis” (reportado por Nissl en 1892). La respuesta cromatolítica al daño axonal pudiera no ser considerada como un fenómeno degenerativo (degeneración retrograda o sustancia de Nissl en

degeneración) sino más bien como un proceso reestructurativo al estado original de la neurona (Peters, Sanford & Webster, 1991).

Históricamente la muerte neuronal se ha considerado la causa mayor de las deficiencias cognitivas en la vejez, sin embargo, trabajos recientes han mostrado que el número de células piramidales en los campos del CA1, CA2 y CA3 del hipocampo, así como en las células granulares del GD se preservan durante el envejecimiento normal (Rapp & Gallagher, 1996). Los roedores seniles muestran incremento en la excitabilidad de las neuronas excitatorias principales, esto significa una disminución en el número o en la función de la actividad inhibitoria de las interneuronas (GABA). Esto también se ha mostrado por la ausencia de células “silenciadoras” o inhibitorias en el hipocampo senil en cualquier ambiente en el que la rata se encuentre, ya sea un ambiente novedoso o familiar, sugiriendo que la edad daña de manera considerable el proceso de inhibición en los circuitos hipocampales (Dirk & Shetty, 2004).

2.8. Aprendizaje

Muchas conductas importantes son aprendidas. Desde luego, somos lo que somos en gran parte por lo que aprendemos y recordamos. Aprendemos las capacidades motoras que nos permiten dominar nuestro medio, y aprendemos lenguajes que nos permiten comunicar lo que hemos aprendido, y de esta manera transmitir culturas que se pueden mantener durante generaciones (Kandel, Schawrtz & Jessel, 2001). Aprender es un cambio perdurable de la conducta o en la capacidad de conducirse de manera dada como resultado de la práctica o de otras formas de experiencia (Shuell, 1986).

Un criterio para definir el aprendizaje es el proceso por el cual ocurren cambios duraderos en el potencial conductual como resultado de la experiencia (Anderson, 2001). Aprender requiere el desarrollo de nuevas acciones o la modificación de las presentes. Se le llama proceso porque se produce un cambio relativamente permanente que no incluye a los transitorios, y debido a que el conductual (o la capacidad de cambio) perdura; es decir, no se consideran como aprendizaje los cambios conductuales temporales (v.g.r. el

habla pastosa por el uso de alcohol, drogas o fatiga); son temporales porque cuando suspendemos la causa, el comportamiento vuelve al estado previo de la incidencia del factor. El aspecto del cambio en el potencial de la conducta se refiere a que no todo lo que aprendemos tiene un impacto en nuestro comportamiento. Un individuo puede aprender la ruta de cómo llegar a un determinado lugar con la ayuda de un mapa y nunca poner este aprendizaje en práctica (Anderson, 2001). El tercer criterio es que el aprendizaje ocurre por *práctica* u *otras formas de experiencia* (como al observar a los demás). Excluye los cambios conductuales que parecen determinados por la constitución genética; por ejemplo el desarrollo motor de los niños (gatear, pararse) (Schunk, 1997).

El aprendizaje se divide básicamente en dos categorías: no asociativo y asociativo. Los ejemplos más conocidos del aprendizaje no asociativo son la habituación y la sensibilización. En cuanto al aprendizaje asociativo tenemos el condicionamiento clásico y el operante o instrumental (Figura 8).

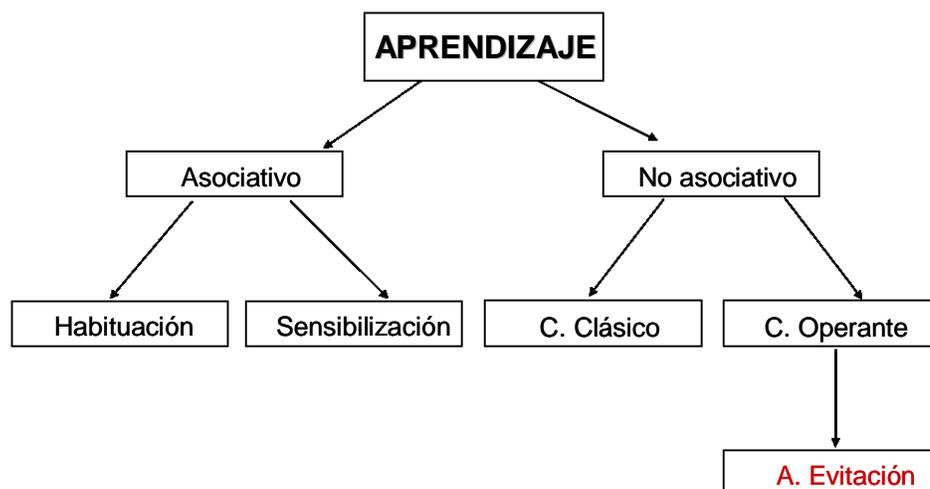


Figura 8. Esquema de los distintos tipos de aprendizaje; asociativo (habitación y sensibilización) y el no asociativo o condicionamiento (C) clásico y operante dentro del cual se encuentra el modelo de aprendizaje de evitación (usado en el presente trabajo).

Estos dos se diferencian en que en el condicionamiento clásico se presentan respuestas reflejas y específicas de la especie y el condicionamiento instrumental permite que un organismo ajuste sus conductas de acuerdo a las consecuencias de las mismas. Es decir, cuando una conducta tiene consecuencias favorables, esta tiende a ocurrir con mayor frecuencia; por el contrario, cuando tiene consecuencias desfavorables, tiende a ocurrir con menos frecuencia (Carlson, 1996). Dicho de otra forma en el condicionamiento clásico aprenden que un estímulo predice de otro, y responden en anticipación de ese hecho. En el condicionamiento instrumental se aprende que un estímulo señala que una determinada clase de respuestas conducirá a algún resultado, y se responde de acuerdo a si ese resultado es reforzante o no (Anderson, 2001). En el presente trabajo se entrenó a los animales en una tarea de evitación activa (ver metodología), la cual se basa en un condicionamiento operante de evitación, donde se utiliza un reforzador negativo para evitar la emisión de un castigo el cual en este caso es un choque eléctrico de 1 mA.

Condicionamiento operante: Los organismos pueden estar emitiendo, espontáneamente, un número indeterminado de respuestas que forman parte de su repertorio conductual. Si alguna de esas respuestas es seguida por algún estímulo favorable para el organismo, entonces esa conducta tenderá a repetirse (Prado- Alcalá, 1995).

Aprendizaje por evitación: En la forma usual de entrenamiento de evitación, el sujeto, al responder a una señal, evita la aparición de un estímulo nocivo. El experimento de referencia clásico lo efectuó Bechterev en 1913 y fue semejante a los de Pavlov, pero utilizando un estímulo aversivo para el organismo (una descarga eléctrica en una pata). Los resultados fueron análogos a los de Pavlov: el organismo aprendía a retirar (contraer) la pata ante la sola presencia del sonido. La mayor parte de los estudios de entrenamiento por evitación han utilizado procedimientos de ensayo por ensayo. En el presente trabajo se entrena a los animales en la tarea de evitación activa de una vía, la cual consiste en un entrenamiento de evitación en donde la rata aprende a evadir un choque eléctrico

cruzando rápidamente (antes de 10s) del compartimiento de castigo al compartimiento seguro.

Se ha observado que el hipocampo participa de manera importante en el aprendizaje, ya sea del tipo condicionamiento clásico u operante (Ausma & Haddad, 1969). Estudios electrofisiológicos de la actividad de las neuronas hipocampales durante el condicionamiento palpebral en conejos, han mostrado que los registros de la neuronas piramidales del hipocampo aumentan su frecuencia de disparo durante el entrenamiento y esta plasticidad celular se mantiene a pesar de que la conducta ya esté condicionada. Este experimento sustenta la participación del hipocampo en el aprendizaje (Berger, Rinaldi, Weisz & Thompson, 1983).

El papel del hipocampo durante la ejecución de una tarea de condicionamiento operante en animales ha sido estudiado experimentalmente mediante ablaciones hipocampales. Se ha demostrado en ratas sin hipocampo una reducción estadísticamente significativa en reacciones de evitación, observando que este efecto es más evidente en situaciones que involucran algún tipo de estrés (Ausma & Haddad, 1969). El proceso de aprendizaje y la optimización de respuestas correctas condicionadas a comida se ven claramente afectadas en ratas con ablación bilateral del hipocampo (Ausma & Haddad, 1969). Este tipo de lesión en gatos, en los cuales se estudia la conducta de alimentación reforzada en el laberinto de 8 brazos, produce mayores latencias de respuesta y mayor número de errores (Gambarian, Gekht, Sarisov, Koval & Kazarian, 1979). Ya desde 1969 Ausma y Haddad hicieron referencia a que las ratas con lesiones en el hipocampo anterior y posterior mostraban dificultades para desempeñar tareas de evitación.

2.8.1. Aprendizaje y malnutrición

Como ya se mencionó anteriormente, el hipocampo participa de manera importante en tareas de aprendizaje por evitación; debido a la susceptibilidad de esta estructura se ha estudiado cómo afectan diversos factores las conductas dependientes de esta región del cerebro. Un factor ampliamente estudiado es la

malnutrición; en un trabajo realizado por Leathwood, Bush, Berent y Mauron (1973) se observó que animales alimentados en camadas de 20 crías por madre, los cuales fueron entrenados después del destete en la tarea de evitación activa a los 2 meses de edad, los animales malnutridos aprendieron significativamente más lento que los animales controles. En un segundo experimento se les administró un tratamiento de rehabilitación nutrimental a los 2, 4 y 6 meses de edad y no se encontró mejoría en el desempeño de esta prueba en animales malnutridos y rehabilitados. En 1974, Bush y Leathwood observaron que los animales malnutridos postnatalmente mostraban un desempeño significativamente peor en comparación con animales controles en una tarea de evitación activa. Por su parte estudios realizados por Castro, Tracy y Rudy (1989), demostraron que la malnutrición instaurada en etapas tempranas produce deficiencias en el desarrollo de habilidades para resolver tareas de discriminación espacial condicionada. Bedi (1992) estudió el efecto de la malnutrición durante etapas tempranas del desarrollo en el aprendizaje espacial en el laberinto acuático de Morris a diferentes edades (35, 65, 170 y 200 días). Bajo estas condiciones encontró que los animales de 35 días de edad tuvieron alteraciones en el aprendizaje espacial en comparación con los controles. En las otras edades no encontró diferencias significativas, debido a que después de un corto periodo de rehabilitación nutrimental se eliminaron las diferencias entre los controles y los grupos previamente malnutridos sin importar la edad ni el grado de malnutrición. Fukuda, Francolín-Silva y Almeida (2002), encontraron que la malnutrición postnatal, aumenta las latencias para encontrar la plataforma oculta en el laberinto acuático de Morris en animales malnutridos, a pesar de recibir un tratamiento de rehabilitación nutrimental.

2.8.2 Aprendizaje y envejecimiento

Se ha observado que los animales seniles muestran deficiencias cognitivas, sobre todo en los procesos de aprendizaje y memoria. Fuchs, Martin, Bender y Karting, en 1986, hicieron un estudio comparativo entre tres grupos de ratas macho en diferentes edades (6, 19 y 33 meses) entrenándolos en la tarea de evitación activa de una y de dos vías utilizando como estímulo condicionado un

tono de 14 Khz. Los animales seniles (33 meses) en comparación con los animales adultos (19 meses) y los animales jóvenes (6 meses), tuvieron un pobre desempeño de la prueba. En 1993, Flood y Morley reportaron deficiencias en los procesos de adquisición y retención de una tarea de evitación utilizando un choque eléctrico en las patas como estímulo aversivo.

Las ratas seniles también muestran deficiencias en varias pruebas que involucran el aprendizaje espacial. Cuando son entrenadas en la plataforma circular de Barnes, las ratas seniles son incapaces de aprender y de recordar la localización del túnel de escape escondido; así como de aprender una nueva localización del túnel (Barnes, 1979; Barnes et al., 1980; citado en Rosenzweig & Barnes, 2003). Cuando son entrenadas en el laberinto en T, la pérdida de las funciones del hipocampo asociadas con la edad produce deficiencias selectivas para utilizar estrategias espaciales que les permitan resolver esta tarea (Rapp et al., 1997, citado en Rosenzweig & Barnes, 2003). En el laberinto radial de 8 brazos, las ratas seniles requieren de un mayor número de ensayos para aprender en comparación con ratas adultas. Sin embargo son capaces de aprender pruebas difíciles que no involucran el procesamiento de información espacial, ya que este tipo de aprendizaje resulta ser muy pobre en estos animales. En una prueba análoga al laberinto radial de 8 brazos, Rapp & Gallagher, (1997) probaron la memoria de trabajo espacial de monos adultos y viejos. Los monos viejos no eran capaces de recordar la localización espacial del lugar de recompensa que ya habían visitado. En el laberinto acuático de Morris las ratas seniles muestran un pobre desempeño para aprender la localización de la plataforma de escape, sin embargo cuando la plataforma es visible su rendimiento es mejor (Rosenzweig & Barnes, 2003).

2.9. Memoria

La memoria es un proceso fundamental por medio del cual el individuo es capaz de relacionar su pasado con su necesidad presente de planear el futuro, se define como el registro de la experiencia que subyace en el aprendizaje (Anderson, 2001). Sin la memoria, la historia individual y colectiva se iniciaría cada día de nuestras vidas, ya que en cada nuevo día tendríamos que reaprender todas

las conductas que, fuera de la reflejas y las innatas, permiten que nos adaptemos a las condiciones cambiantes del medio que nos rodea (Prado-Alcalá, et al., 2004). El proceso de memorización es indisociable del proceso de aprendizaje, el cual permite recabar información del entorno interno y externo para dar lugar a la formación de esquemas de referencia durante el proceso de interacción con aquel. Como resultado de lo anterior, ambos procesos interactúan de tal manera que se favorece la adaptación del sujeto a su entorno biológico y social, con la capacidad adicional de poder transformar este último, en el caso del ser humano.

A lo largo del tiempo la memoria ha sido clasificada de diferentes maneras por diferentes autores. En el presente trabajo haremos alusión a la clasificación propuesta por Thompson y Jeansok en 1996, (Figura 9), la cual hace la diferenciación entre la memoria declarativa y la memoria no declarativa; la primera se refiere a la capacidad de recordar conscientemente hechos y eventos que el sujeto ha vivido a lo largo de su vida, esta memoria es susceptible de amnesia y depende de estructuras situadas en el lóbulo temporal medial y en el diencefalo medial. La memoria declarativa permite recordar información que puede ser comparada y contrastada, es el soporte para la codificación de la relación entre múltiples hechos y eventos y se divide a su vez en: memoria semántica (hechos referentes al mundo) y memoria episódica (capacidad de revivir un evento en el contexto en el que originalmente ocurrió).

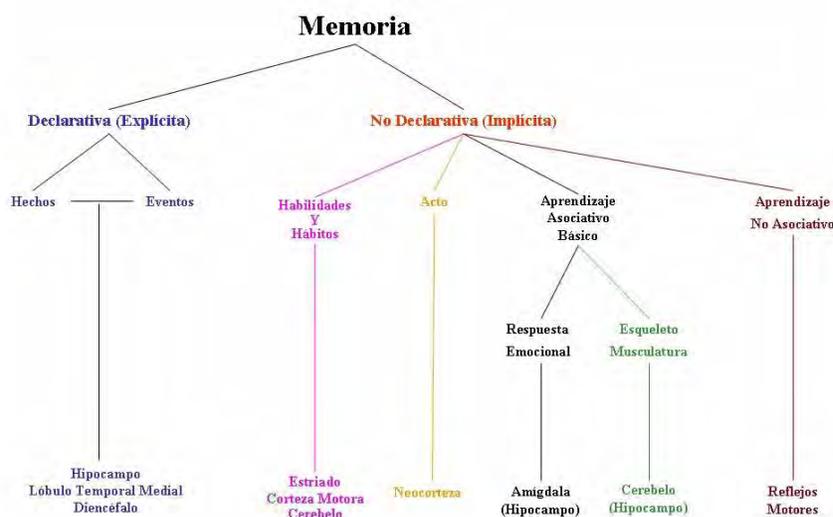


Figura 9 Esquema modificado de Thompson y Jeansok, 1996.

La memoria no declarativa se expresa de manera operante en lugar de evocar recuerdos, ocurre dentro de modificaciones de habilidades dentro de sistemas de ejecución, los recuerdos son revelados a través de reacciones de sistemas dentro de los cuales el aprendizaje ocurrió originalmente. Se ha propuesto que el hipocampo participa de manera importante en la memoria implícita. En función del tiempo, la memoria ha sido clasificada en: memoria de corto plazo, memoria de trabajo y memoria de largo plazo. La primera se refiere a la retención de información o eventos durante segundos, es de capacidad limitada y consta de tres características: 1.- Su capacidad de almacenamiento es limitada, de modo que solo puede mantener una pequeña cantidad de información; 2.- Los recuerdos almacenados son lábiles, es decir, pueden ser alterados fácilmente por nuevas experiencias; 3.- Posee la habilidad de recordar de 5 a 9 caracteres por ejemplo un número telefónico (Robertson, 2001). Una hipótesis relativamente antigua, pero que se ha mantenido vigente acerca del establecimiento de la memoria de corto plazo asevera que este tipo de memoria depende de actividad reverberante en circuitos neuronales, inducida por la experiencia de aprendizaje (Hebb, 1949). Cuando la información es utilizada, para resolver alguna prueba, esta información es procesada por la memoria de trabajo la cual involucra redes de información útiles para resolver una tarea en particular y puede durar minutos u horas (Robertson, 2001) .

La memoria de largo plazo, conocida también, como memoria de referencia es permanente y tiene una capacidad mucho mayor que la de corto plazo ya que no requiere de repetición continua. Sirve para conservar la información durante minutos, horas, semanas o incluso años. Esta clasificación la propuso por primera vez W. James en 1890. La memoria de largo plazo implica la producción de cambios plásticos relativamente duraderos: incremento en la densidad de botones sinápticos, en la longitud y ramificaciones axónicas, así como en el número de espinas dendríticas, entre otros (Barondes, 1970). Para que estas modificaciones morfológicas se lleven a cabo, es necesario que se incremente la síntesis de proteínas; por el contrario, la inhibición de la síntesis proteínica impide la formación de la memoria de largo plazo (Barondes, 1970).

La conversión de la memoria de corto a largo plazo depende de un proceso denominado consolidación; parece ser que esta conversión está supeditada a cuando menos dos factores dependientes de la experiencia: la importancia relativa que la información tiene para el organismo y la frecuencia con la que la información es captada por el sistema nervioso (Prado-Alcalá, et al., 2004). A su vez la memoria de largo plazo se divide en declarativa y de procedimiento; la primera se refiere a la información relativa al conocimiento sobre el mundo y las experiencias vividas por cada persona. La memoria de procedimiento se refiere a un sistema de ejecución motora, implicado en el aprendizaje de distintos tipos de habilidades que no están representadas como información explícita sobre el mundo. La región medial del lóbulo temporal del encéfalo se ha propuesto como una estructura fundamental para el almacenamiento de la memoria declarativa. Dentro de esta región se ha propuesto a la formación hipocampal (compuesta por el hipocampo, el GD, el complejo subicular y la corteza entorrinal), así como a las cortezas perirrinal y parahipocampal como estructuras involucradas en la adquisición de información declarativa (Fernández & López, 2001). El establecimiento de la memoria depende de la activación de estructuras cerebrales, que muy probablemente interactúan formando circuitos funcionales. Esta idea se ve apoyada por el hecho de que la interferencia con la actividad neuronal de cualquiera de estas estructuras cerebrales, produce deficiencias en la consolidación y evocación de la memoria (Prado-Alcalá, 1995).

2.9.1. Memoria y malnutrición

La malnutrición establecida en etapas tempranas del desarrollo cerebral produce alteraciones en la estructura, neuroquímica y funcionamiento del SNC, dando como resultado deficiencias conductuales y cognitivas durante la adultez de animales malnutridos. Al respecto, Valadares y Almeida (2005) investigaron los efectos de la malnutrición establecida durante la lactancia. Midió la adquisición y la retención de estos animales en pruebas de aprendizaje realizadas en el laberinto acuático de Morris utilizando diferentes intervalos de tiempo entre ensayo y ensayo (ensayos espaciados y ensayos sin intervalo de tiempo). Los resultados mostraron que la malnutrición causa deficiencias en el aprendizaje espacial y en la

memoria de ensayos espaciados. Después del entrenamiento (28 días) se observó un incremento en la latencia para encontrar la plataforma del dispositivo sólo en los animales malnutridos que fueron entrenados con un solo ensayo por día. Una conclusión dada por estos autores fue que la malnutrición produce deficiencias en la consolidación de la memoria, solamente cuando se entrena al animal con ensayos separados por un intervalo largo de tiempo. Jordan (1981), probó animales de 19 días malnutridos prenatalmente y durante la lactancia en un laberinto radial de 8 y 16 brazos; encontrando diferencias significativas entre el grupo control y el malnutrido, especialmente en el laberinto radial de 16 brazos. Este autor observó que la conducta exploratoria de los animales malnutridos se ve afectada ya que estos permanecían demasiado tiempo en un solo lugar del laberinto.

2.9.2. Memoria y envejecimiento

Es claro que los daños en la memoria en edades avanzadas son deficiencias selectivas más que un declive generalizado de todas las funciones cognitivas.

Se ha llegado a la conclusión de que los animales seniles poseen los mecanismos necesarios para formar nuevos recuerdos, ya que el rápido olvido de la información aprendida es el resultado de cambios muy sutiles en el proceso de almacenamiento de la información y de su mantenimiento (Foster, 1999).

La capacidad de recordar que depende de la función del hipocampo parece ser particularmente vulnerable al envejecimiento, por ejemplo la memoria de información espacial novedosa es extremadamente susceptible a este proceso. En comparación con los animales jóvenes, los animales seniles muestran un proceso de aprendizaje más lento y retienen por menos tiempo la información. En la actualidad los marcadores electrofisiológicos (Long Term Potentiation y Long Term Depontiation), que miden las alteraciones en la función sináptica hipocampal, proveen uno de los primeros modelos para observar las deficiencias de la memoria debidas a la edad (Rosenzweig & Barnes, 2003).

El incremento de la posibilidad de olvidar cierta información parece normal en sujetos seniles sin daño en el hipocampo cuando el periodo del intervalo de

retención es mayor o igual a 24h, en comparación con sujetos que presentan algún daño en el hipocampo o que presentan la enfermedad de Alzheimer, ya que estos sujetos olvidan en cuestión de minutos (Rosenzweig & Barnes, 2003). Esos cambios se relacionan con varias alteraciones que incluyen a la pérdida del número de sinapsis axoespinosas en el GD; disminución de la fuerza sináptica entre las colaterales de Schaffer y el CA1, decremento en la respuesta mediada por los receptores NMDA en las sinapsis del patrón perforante hacia las células granulares del GD y a alteración en la regulación del Ca^{2+} en el área del CA1 hipocámpico (Rosenzweig & Barnes, 2003).

3. JUSTIFICACIÓN

A pesar de que el cerebro en general es susceptible y vulnerable a los efectos de la malnutrición y el envejecimiento; en el presente trabajo nos enfocamos en observar si una dieta baja en proteína afecta al hipocampo y a los procesos cognitivos que dependen de éste, con base en los hallazgos que muestran que los animales malnutridos o con restricción calórica presentan menores rasgos de senilidad (deficiencias en procesos cognitivos en especial el aprendizaje y la memoria). Por lo tanto, consideramos de suma importancia explorar si los retardos en el desarrollo observados en animales malnutridos se pueden extrapolar a su conducta, en especial a su desempeño en tareas que involucren la adquisición y la retención de nuevas conductas. Es por esto que en el presente trabajo se estudió cómo es el desempeño en pruebas de aprendizaje de animales seniles y además malnutridos en comparación con animales seniles con una dieta balanceada de laboratorio. Así como también se estudió la ultra estructura de las células piramidales del CA1, para observar qué efecto tiene la malnutrición y la edad sobre éstas.

4. HIPÓTESIS

4.1 Conductuales:

- Los animales jóvenes aprenderán mejor la tarea evitación activa en comparación con los animales seniles.

- Los animales jóvenes presentaran una mejor retención a corto y a largo plazo de la tarea evitación activa en comparación con animales seniles.
- La malnutrición no producirá deficiencias en el aprendizaje de la tarea de evitación activa en animales jóvenes y seniles.
- La malnutrición no producirá deficiencias en la retención a corto y a largo plazo de la tarea evitación activa en animales jóvenes y seniles.
- Los animales jóvenes presentarán una mejor extinción de la tarea de evitación activa en comparación con animales seniles.
- La malnutrición no afectará la extinción de la tarea de evitación activa en animales jóvenes y seniles.

4.2 Subcelulares:

- Los animales seniles controles presentarán indicativos de atrofia celular asociados a la edad en las neuronas de proyección (piramidales) del CA1 del hipocampo.
- Las células de proyección (piramidales) del CA1 de los animales jóvenes malnutridos no presentarán alteraciones subcelulares en comparación con animales controles.
- Las células de proyección (piramidales) del CA1 de los animales seniles malnutridos presentarán menos indicativos de atrofia celular asociados a la edad en comparación con animales seniles controles.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivos generales:

- En ratas Sprague-Dawley de 90 y 660 días de edad control y malnutridas postnatalmente, explorar el proceso de adquisición y de retención de la tarea de evitación activa.
- Observar las características de la organización subcelular de las células piramidales del CA1 en los cuatro grupos que conforman este estudio.

5.2 Objetivos particulares:

- Explorar el aprendizaje de la tarea evitación activa en los grupos:
 - Jóvenes (90 días) controles.
 - Seniles (660 días) controles.
- Determinar, si la malnutrición interfiere en el aprendizaje de la tarea evitación activa en los grupos:
 - Jóvenes (90 días) malnutridos.
 - Seniles (660 días) malnutridos.
- Explorar la memoria de largo plazo de la tarea evitación activa en los grupos:
 - Jóvenes (90 días) controles.
 - Seniles (660 días) controles.
- Determinar si la malnutrición interfiere en la memoria de la largo plazo de la tarea evitación activa en los grupos:
 - Jóvenes (90 días) malnutridos.
 - Seniles (660 días) malnutridos.
- Determinar si la edad interfiere con la extinción de la tarea evitación activa en los grupos:
 - Jóvenes (90 días) controles.
 - Seniles (660 días) controles.
- Determinar si la malnutrición interfiere con la extinción de la tarea evitación activa en los grupos:
 - Jóvenes (90 días) malnutridos.
 - Seniles (660 días) malnutridos.
- Determinar las características de la ultraestructura de células piramidales del CA1 en los grupos:
 - Control joven.
 - Control senil.
 - Malnutrido joven.
 - Malnutrido senil.

- Establecer las diferencias y analogías de la ultraestructura de las células piramidales del CA1 entre los grupos control joven y control senil.
- Establecer las diferencias y analogías de la ultraestructura en las células piramidales del CA1 entre los grupos malnutrido joven y malnutrido senil.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1. Sujetos

El protocolo y las maniobras que se utilizaron en el estudio, fueron aprobados por el Comité de Bioética del Instituto de Neurobiología de la UNAM. Asimismo, están acordes con las normas internacionales establecidas para el manejo y uso de animales de experimentación (NIH y la National Academy of Science, 2003)⁸.

Se trabajó con un total de 38 ratas macho de la cepa Sprague-Dawley, provenientes del bioterio del Instituto de Neurobiología, donde se encontraban en un ciclo de luz/oscuridad de 12 h y con libre acceso a agua y alimento. Se les administró diferente dieta: una que incluía el 25% de caseína (control); y otra que incluía solamente el 6% de caseína (malnutridos). Se formaron dos grupos de ratas jóvenes (90 días), grupo malnutrido y grupo control y dos grupos de ratas seniles (660 días), grupo malnutrido y grupo control.

Grupos de Estudio

Sujetos	Controles	Malnutridos
Jóvenes	n=10	n=9
Seniles	n=10	n=9

Tabla 1. Número de sujetos y condiciones de nutrición que fueron considerados para este estudio.

6. 2 Método de Malnutrición

La malnutrición se produjo en una rata gestante primípara al reducir la cantidad de proteína (caseína) al 6%⁹ en la dieta desde 5 semanas antes del

⁸ National Institutes of Health (NIH). www.nih.gov.

⁹ Dieta hipoproteínica isocalórica. *Tekland diet 170915*. Componentes g/k: Proteína (6% de Caseína), 60.0; L-metionina, 3.7; sucrosa 511.74, fécula de maíz 53.52; aceite de maíz 151.80; celulosa (fibra) 67.16; Sales Minerales 35.0; fosfato de calcio dibásico 6.02; carbonato de calcio 0.73; mezcla de vitaminas 10.00. K cal/g 4.30; color azul 0.33.

apareamiento, con la finalidad de que su metabolismo corporal se estabilice. La dieta se mantiene durante el apareamiento y se realizan frotis vaginales para determinar el día 1 de gestación. Después del parto, las crías se separan por sexo, se pesan y se dejan sólo 4 hembras y 4 machos con la madre. Las crías de las madres control se pasan a una madre nodriza malnutrida para producir malnutrición postnatal (Figura 10). Todas las crías se destetan en el día 21 y se colocan 3 animales en cada caja con la misma dieta. El grupo control se mantiene con la dieta normal de laboratorio (25% de caseína) durante los periodos pre y postnatal. Este diseño permite valorar el daño que produce la malnutrición postnatal por carencia de la proteína principal de la leche materna (caseína) durante los periodos críticos del desarrollo, sobre todo en los procesos de maduración del SNC y en el establecimiento de sus funciones (Morgane, Mockler & Galler, 2002).

Método de Malnutrición

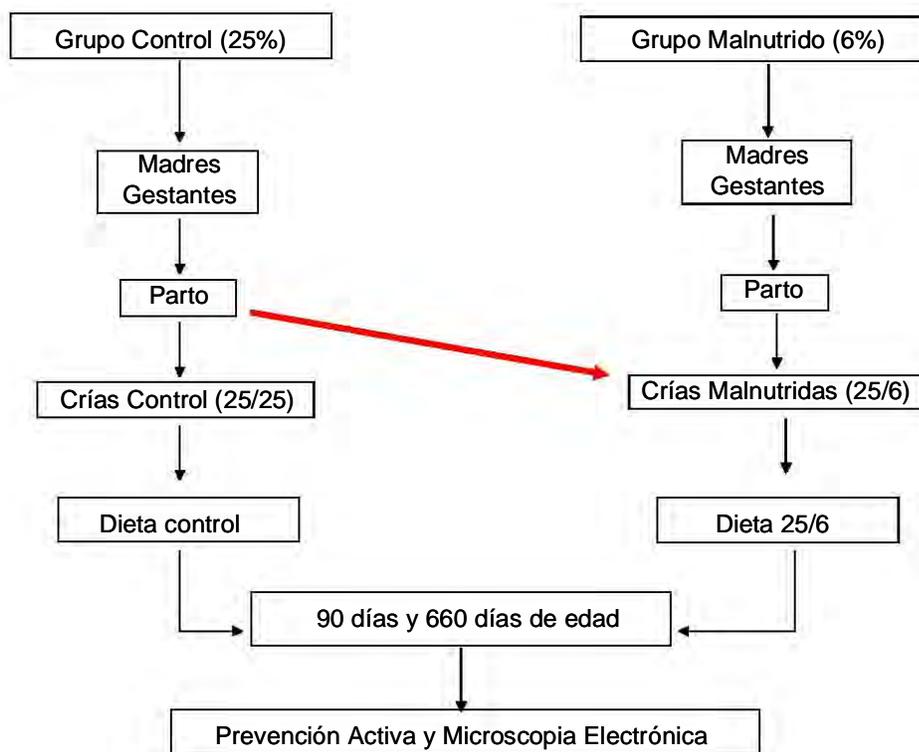


Figura 10. Método de malnutrición postnatal.

6.3. Tarea de evitación activa de una vía

Todos los animales se entrenaron en la tarea de evitación activa de una vía. Para dicho entrenamiento fueron habituados a las condiciones del laboratorio; la prueba se llevó a cabo en dos sesiones: la primera sesión fue de entrenamiento (20 ensayos); la segunda 24 h después fue para medir la retención (20 ensayos). Se entrenó primero a los animales seniles y un mes después se entrenó a los animales jóvenes.

En esta tarea el sujeto adquiere una nueva conducta, la mantiene en la memoria de corto plazo y posteriormente la consolida en la memoria de largo plazo; en la sesión de retención, 24 h después, evoca la información aprendida en el entrenamiento.

6.3.1 Material

El entrenamiento de evitación activa y la prueba de retención se realizaron en una caja (plástico) de condicionamiento constituida por dos compartimientos de las mismas dimensiones (30 x 30 x 30 cm) separados por una puerta tipo guillotina (Figura 11). El piso del compartimiento de seguridad (A), hecho con barras de acero inoxidable de 6 mm de diámetro separadas por 1.5 cm entre sí. Las paredes del compartimiento de castigo (B) están compuestas de dos placas de acero inoxidable las cuales se encuentran separadas en la mitad del piso por una ranura de 1 cm, dando una forma de V, lo cual permite que los sujetos hagan contacto con ellas todo el tiempo y reciban un choque eléctrico. El compartimiento de castigo puede electrificarse utilizando un estimulador de pulsos cuadrados (Grass Instruments Co., modelo S48) conectado en serie con una unidad de corriente constante (Grass- Instruments Co., modelo CCU-1A). La cámara de condicionamiento está ubicada en un cuarto sono amortiguado (2.44 x 1.95 x 2.50 m) y con baja iluminación provista de un enmascarador de ruido (BRS/LVE, modelo AU-902).

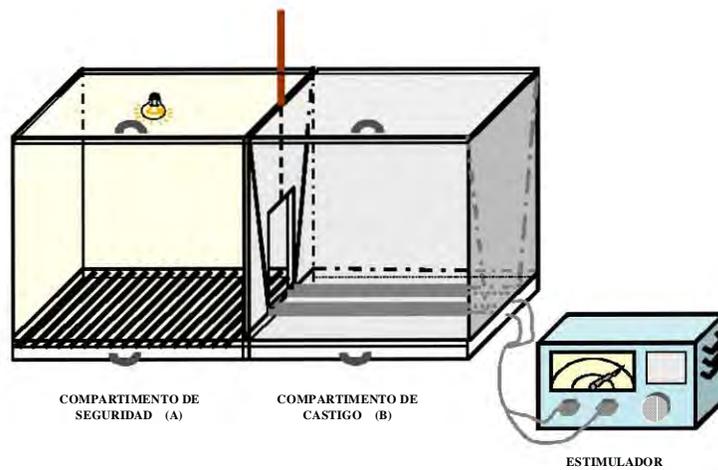


Figura 11. Cámara de evitación activa

6.3.2. Sesión de adquisición

Consiste en introducir al animal en el compartimiento B de la cámara de condicionamiento por 10 seg, con la puerta abierta. Enseguida se le administra un choque, que permanece durante 10 seg. adicionales, tiempo durante el cual el animal podía escapar al compartimiento A porque la puerta se mantiene abierta durante el tiempo que el animal reciba el choque eléctrico. En el momento en el que el animal escapa al compartimiento opuesto se cierra la puerta y el animal se mantiene dentro de este compartimiento por 30 seg. En este momento se termina el primer ensayo. Desde el compartimiento A, el animal es llevado manualmente al compartimiento B para la realización de un nuevo ensayo, y así hasta concluir 20 ensayos consecutivos, después de los cuales el animal se retira a su caja habitación y se termina la sesión. Puesto que cada animal realiza 20 ensayos en una sesión, sólo puede ejecutar un máximo de 20 aciertos ó 20 errores. Se calificó con acierto o respuesta de evitación, si el animal cruza del compartimiento B al compartimiento A antes de recibir un choque eléctrico en las patas. Cuando el animal permanece en el compartimiento B más de 10 seg y recibe un choque eléctrico (1mA) en las patas antes de cruzar al compartimiento de seguridad se califica como error o escape en ese ensayo. Si el animal recibe un choque, y no escapa al compartimiento contiguo al término de los 10 s que dure el choque se cierra la puerta y se comienza con un nuevo ensayo (Martínez, Quirarte, Díaz-Cintra, Quiroz & Prado-Alcalá, 2002).

6.3.3. Ensayo de retención

Para medir la retención de la tarea, se tomó en cuenta únicamente el primer ensayo de la sesión de extinción.

6.3.4. Sesión de extinción

Se entiende por extinción al proceso mediante el cual una respuesta condicionada tiende a disminuir cuando se omite la presentación del estímulo reforzante o incondicionado, al que inicialmente se asoció dicha respuesta.

La sesión de extinción (que también llamaremos sesión de retención) se realizó siguiendo el mismo procedimiento que en la sesión de entrenamiento, pero sin la aplicación de choques eléctricos, para lo cual se mantuvo apagado el estimulador de corriente eléctrica. En esta sesión se calificó cada ensayo como acierto si el animal dio una respuesta de evitación, es decir, si cruzó al compartimiento A dentro de los primeros 10 seg, o se calificó como un error, si el animal no cruzaba al compartimiento B, antes de 10 seg, si el animal cruza después de los 10 seg se sigue considerando como error.

6.4. Análisis estadístico conductual

De acuerdo a los puntajes experimentales obtenidos en cada una de las mediciones de los grupos utilizados, se procedió a usar los siguientes modelos estadísticos:

6.4.1. Ensayo por ensayo: Se analizaron las medias y errores estándar para cada grupo ensayo por ensayo, para observar el curso temporal de la curva de aprendizaje a lo largo de toda la sesión de adquisición, y se realizó el mismo análisis para la sesión de extinción.

6.4.2. Bloques: - Se obtuvieron los datos crudos provenientes de las dos sesiones que conformaron la evitación activa, éstos se refieren a 20 ensayos por animal para la adquisición y otros 20 ensayos para la extinción. Posteriormente, se agruparon los 20 ensayos sacando el promedio de 5 ensayos para formar un bloque, por lo tanto se trabajó con los valores provenientes de 4 bloques por animal en cada sesión (adquisición y extinción) de 5 ensayos cada uno.

6.4.3. ANOVA: Se realizó un análisis multifactorial general de tres factores en el cual se analizó el efecto de la edad y el efecto de la dieta en la sesión de adquisición y en el ensayo de retención y de extinción. Se compararon los valores por bloques y por sesión para los cuatro grupos, es decir para el primer análisis se trabajó con los valores obtenidos del bloque uno, de la sesión de adquisición de los cuatro grupos y se procedió a hacer las comparaciones estadísticas.

6.4.4. Análisis *post hoc*: Se aplicó una prueba *post hoc* de Fischer's PLSD para observar las diferencias significativas entre los grupos, las sesiones y los bloques que las conforman.

Las comparaciones realizadas fueron hechas por sesión, por edad y por dieta, así para la sesión de adquisición se hicieron comparaciones de todos los grupos contra todos, tomando en cuenta los valores obtenidos de los bloques de ensayos. Para la sesión de retención se hicieron las mismas comparaciones.

6.5. Técnica de microscopía electrónica

Una semana posterior al entrenamiento, se perfundió a los animales por vía intracardíaca (previa anestesia con pentobarbital sódico), utilizando como fijador paraformaldehído al 4% en solución salina, luego se extrajo el encéfalo y se continuó su fijación por 2 horas en una solución de 0.1 M de buffer de fosfato con un pH 7.4, y paraformaldehído y glutaraldehído al 1.5% (c/u). Transcurrido el tiempo, esta solución fijadora se aspiró y se lavó 3 veces con solución salina de buffer de fosfato (0.1 M, 0.9% NaCl, pH 7.3). Se obtuvo el hipocampo a la altura de -3.3 de Bregma y se realizaron cortes de 200 micras en un vibratomo; se utilizaron los hipocampos dorsales izquierdos y fueron divididos en GD, CA1 y CA3. Los cortes referentes al área del CA1 fueron procesados con la técnica de microscopía electrónica y fueron incluidos en plano. Las observaciones bajo el microscopio se realizaron de los cortes finos de esta zona a aumentos de 5,000x con la finalidad de observar la neurona completa. Asimismo, se escogieron aquellas en las que se observaba la dendrita apical y se aumentaron a 8,000x con la finalidad de observar más de cerca la neurona y la dendrita. Para poder medir las áreas del soma, del núcleo y del citoplasma se realizó la reconstrucción de

cada célula, ensamblando cada una de las impresiones en papel para visualizar a la neurona, completa. Cada parte fue tomada a 20,000x (Figura 12), (Cárabez, Sandoval & Palma, 1998). Se tomaron en cuenta estos parámetros de medición con base en estudios previos realizados por Díaz–Cintra, Yong, Aguilar, Bi, Lynch y Ribak, (2004), los cuales mostraron que los principales cambios celulares debidos al envejecimiento se reflejaban en el tamaño del soma y en el núcleo de la célula.

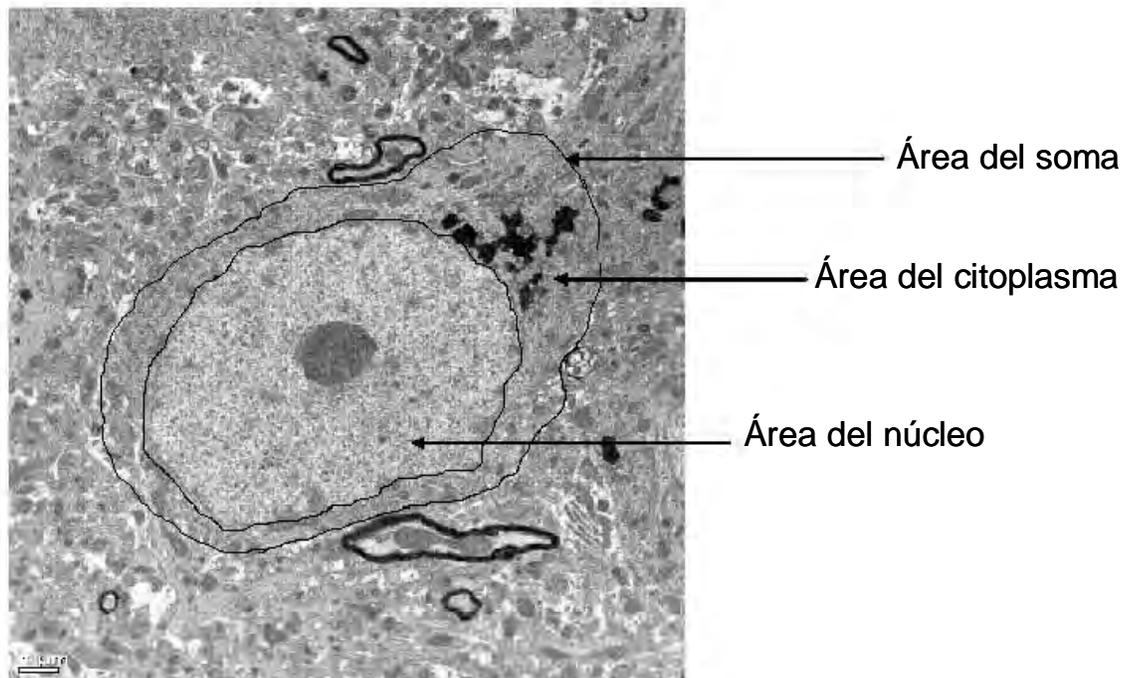


Figura 12. Fotomicrografía a 8,000x de una neurona piramidal del CA1 de un animal senil control. Las flechas indican las diferentes áreas que se midieron en cada neurona, para obtener el área del citoplasma se hizo la substracción del área del núcleo al área del soma.

6.5.1. Preparación del hipocampo en plano

Para mantener al tejido lo más plano posible y que se conserve la orientación de las células del CA1, durante la deshidratación e impregnación se coloca cada una de las zonas entre dos papeles filtro y dos cubreobjetos de plástico perforados asegurados con un clip. La deshidratación se efectuó en

alcohol de concentraciones graduales desde 50% hasta absoluto. Luego, se incluyeron en resina epóxica (Eponate Polybed-812) por 3 días. La polimerización de los cortes se efectuó en dos pasos, primero los bloques individuales se mantuvieron “planos”, posteriormente se colocaron entre dos portaobjetos de plástico (12 h), al término del tiempo se separaron en pequeñas lentejuelas para ser re-incluidas por polimerización a un molde de resina epóxica, procurando colocarlas en el centro. Después se obtiene la “pirámide” de la zona de estudio (Figura 13), se hacen cortes semifinos de 5 micrómetros en un ultramicrotomo Reichert Um03 para obtener cortes finos del área del CA1. Éstos se tiñen con 0.1% de azul de toluidina sobre una placa caliente, se lavan y se observan al microcopio. Una vez ubicada la zona del CA1, se procede a obtener cortes finos de esta zona con una navaja de diamante, los cuales son colectados en porta muestras, se tiñen con acetato de uranilo y citrato de plomo. Las muestras se observan en el microscopio electrónico de transmisión (Jeol-100 B) operando a 80 kV. Se localizan las neuronas del CA1 cuyas dendritas apicales se localicen claramente. En cada célula, deben distinguirse además del núcleo los organelos celulares (aparato de Golgi, mitocondrias, lisosomas asociados a vesículas (gránulos de lipofusina) y lisosomas (Figura 14). Luego se procede a su captura y digitalización en una computadora Macintosh (Díaz-Cintra, Yong, Aguilar, Bi, Lynch & Ribak, 2004).

6.6. Análisis morfométrico

Se efectuó en 6 neuronas piramidales del CA1 provenientes de 3 animales por grupo escogidos al azar. Cada célula se digitalizó por partes por medio de fotomicrografías de 20,000x, y con las impresiones se reconstruyó la neurona completa en papel. La captura de cada célula, también se hizo por digitalización de imágenes directo del microcopio electrónico y con el programa de IpLab. En cada célula, se midió el perímetro y área del soma, del núcleo y área del citoplasma, así como el número de mitocondrias, lisosomas, aparatos de Golgi y lisosomas asociados a vesículas.

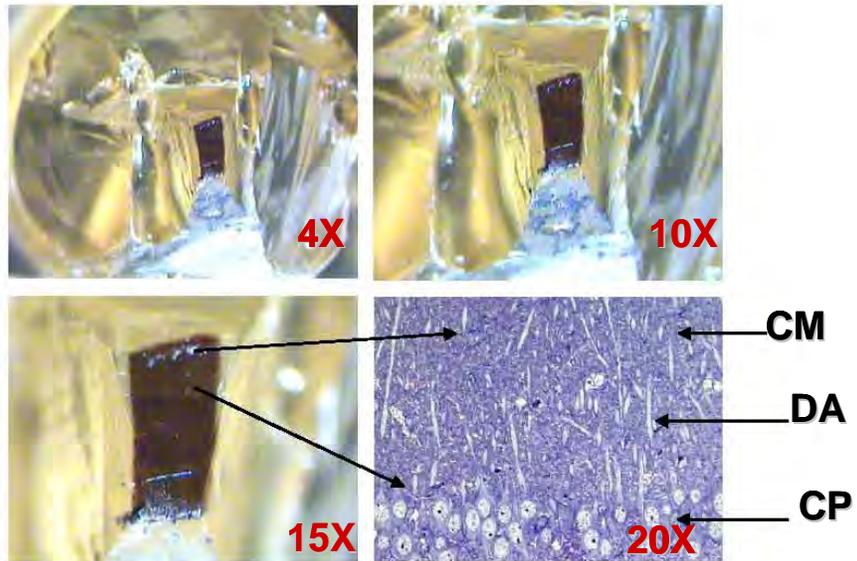


Figura 13. Fotografías de cortes incluidos en resina, donde se puede observar cómo se le va dando a la preparación forma de pirámide para proceder a realizar los cortes semifinos (teñidos con azul de toluidina). Se observa la capa de células piramidales (CP), la capa molecular (CM) con las dendritas apicales (DA) del CA1.

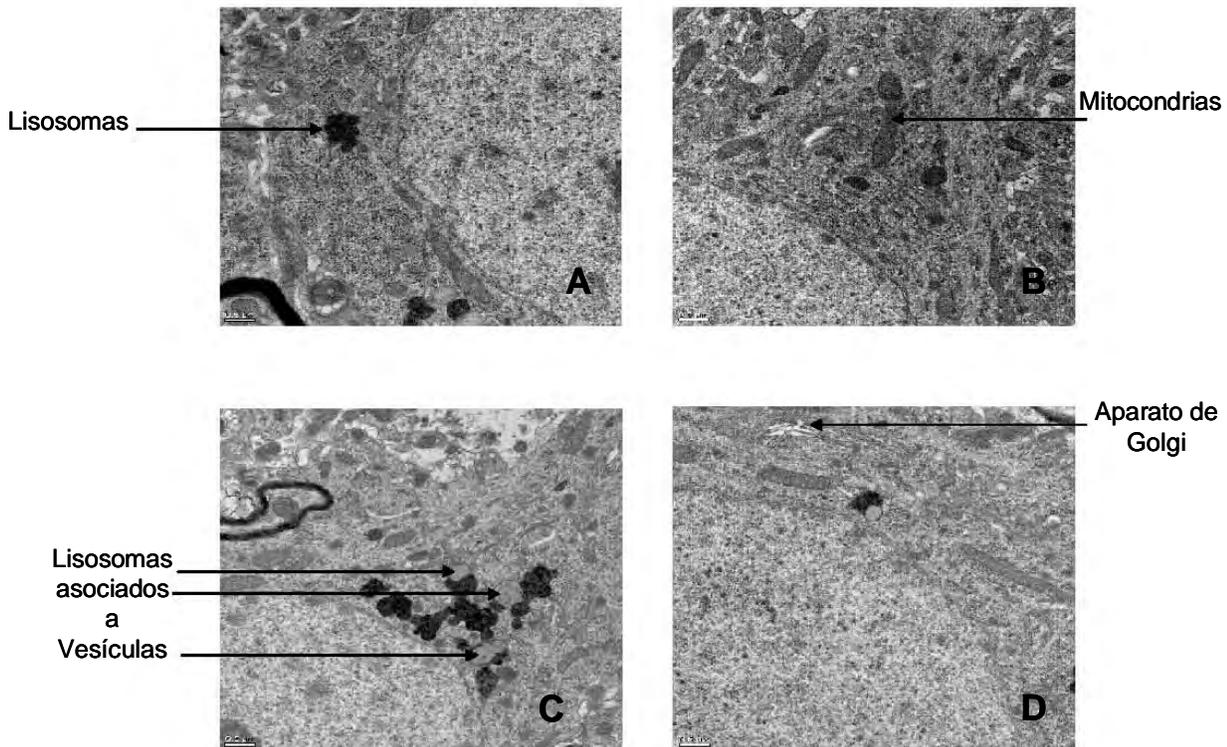


Figura 14. Fotomicrografías de cortes finos a 20,000x de neuronas piramidales del CA1, se observan los organelos considerados para este estudio: lisosomas (A), mitocondrias (B), lisosomas asociados a vesículas (C) y aparato de Golgi (D).

6.6.1. Análisis estadístico subcelular

Posterior al entrenamiento de la evitación activa se realizó la perfusión de los animales para obtener el hipocampo dorsal izquierdo y procesarlos con la técnica de microscopía electrónica. El análisis subcelular de las neuronas piramidales del CA1, se realizó tomando 3 animales al azar y de éstos se estudiaron 6 neuronas piramidales (por animal) en las cuales se pudiera observar la dendrita apical y el nucléolo. Se tomaron fotomicrografías directas del microscopio y fueron analizadas. Con el programa Iplab se midió el área y el perímetro del soma y del núcleo; a su vez se calculó el área del citoplasma restando el área del núcleo al área del soma. En las fotomicrografías impresas (20,000x) se contaron el número de mitocondrias, de lisosomas y de lisosomas aunados a vesículas.

6.6.2. ANOVA: Se realizó un análisis multifactorial para observar el efecto del envejecimiento y la dieta sobre la organización subcelular de las neuronas piramidales del CA1. Comparando todos los grupos contra todos para cada variable; es decir, se compararon los resultados obtenidos de la medición del área del núcleo y se compararon los valores de todos los grupos contra estos mismos valores.

6.6.3. Análisis *post hoc*: Se aplicó una prueba *post hoc* de Fisher LSD para observar las diferencias significativas entre los grupos y las variables subcelulares tomadas en cuenta para este estudio. Las comparaciones realizadas fueron hechas por edad, por dieta y por variable.

7.- RESULTADOS

Para verificar a las hipótesis planteadas en el estudio se analizaron los siguientes resultados.

7.1. Conductuales

Se realizó un análisis multifactorial general para observar la interacción entre los diferentes factores contemplados en este estudio. A continuación se muestran dichos resultados para ambas sesiones (adquisición y extinción). En la Tabla 2 se muestra el ANOVA de medidas repetidas para la sesión de adquisición. En la cual se observa que para existe diferencia significativa entre grupos y entre los ensayos con una $p < 0.01$. En la interacción se observa una $p = 0.0526$ considerada como valor limítrofe.

ANOVA de medidas repetidas para la sesión de Adquisición

Factor	GL	F	p<
Grupos	F(3, 34)	7.123	0.01
Ensayos	F (19,57)	8.205	0.01
Interacción	F (57,646)	1.342	0.0526

Tabla 2: ANOVA de medidas repetidas para la sesión de adquisición, los valores en rojo indican diferencias significativas con una $p < 0.05$.

Para una mejor comprensión de estos resultados observar la Figura 15 en la cual se muestra el ANOVA del desarrollo de los animales, así como las medias y errores estándar a lo largo de toda la sesión ensayo por ensayo. Esta gráfica muestra que el grupo joven malnutrido (azul) obtiene valores de latencia de escape mayores en comparación a todos los grupos, observándose diferencias significativas con respecto al grupo joven control en los ensayos 3, 7, 11, 13, 15, 16 19. Los grupos control joven, senil control y senil malnutrido muestran un desempeño similar a lo largo de toda la sesión. La Figura 16 muestra el análisis *post hoc* de esta sesión agrupando los 20 ensayos en 4 bloques de 5 ensayos.

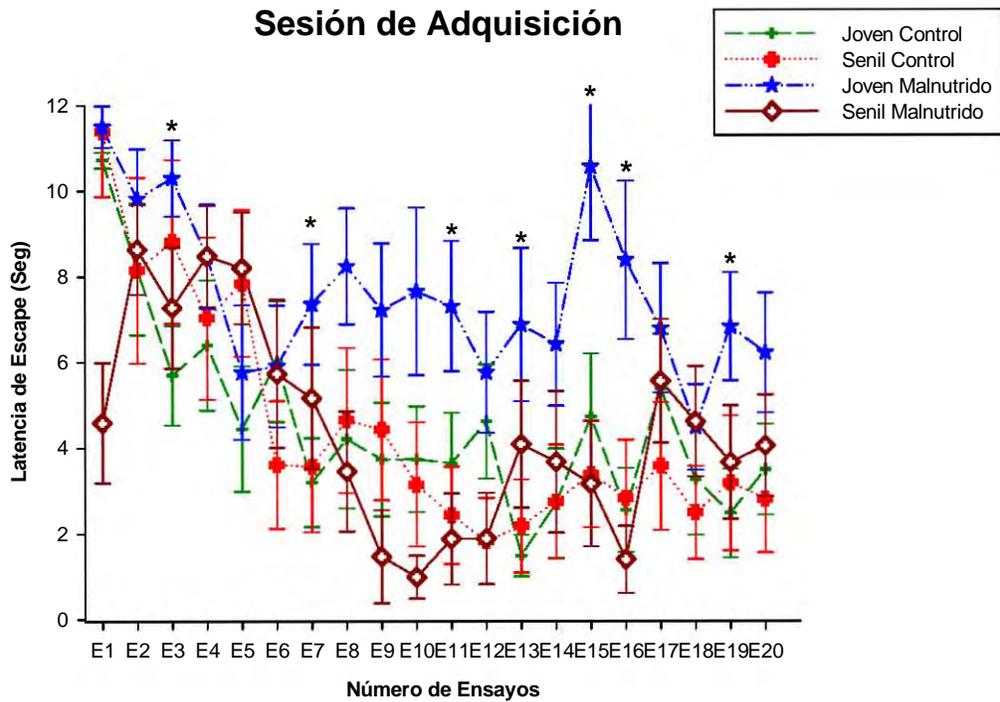


Figura 15: Medias y errores estándar de la latencia de escape ensayo por ensayo para la sesión de adquisición, nótese que el grupo joven malnutrido muestra valores más altos de latencia de escape en toda la sesión. Los grupos joven control, senil control y senil malnutrido muestran un desempeño similar a lo largo de toda la sesión. * = $p < 0.05$

Para una mejor comprensión de estos resultados se realizó el análisis *post hoc* para el cual los datos se agruparon en 4 bloques de 5 ensayos. Se utilizó la prueba Fischer's PLSD para cada bloque. Los resultados se muestran en la Figura 16. Observamos que el grupo joven malnutrido (azul) tiene valores de latencia de escape significativamente más altos en todos los bloques en comparación con los otros grupos, sin embargo, se mantiene por debajo de los 10s, lo cual indica que si aprende la tarea. En el bloque uno muestra valores de latencia de escape significativamente mayores en comparación con el grupo joven control con una $p < 0.01$. En el bloque 2 observamos que el grupo joven malnutrido muestra valores de latencia de escape significativamente mayores en comparación con el grupo joven control con una $p < 0.01$; en comparación con el grupo senil control con una $p < 0.01$ y con el grupo malnutrido senil con una $p < 0.001$. En el bloque 3

observamos que el grupo joven malnutrido muestra valores de latencia significativamente más elevados en comparación con el grupo joven control con una $p < 0.001$; en comparación con el grupo senil control con una $p < 0.001$; finalmente, en comparación con el grupo senil malnutrido con una $p < 0.001$. Para el bloque 4 observamos en las comparaciones valores significativamente mayores para el grupo joven malnutrido en comparación con el grupo joven control con una $p < 0.001$; para el grupo joven malnutrido en comparación con el grupo senil control con una $p < 0.001$ y para el grupo joven malnutrido en comparación con el senil malnutrido con una $p < 0.001$.

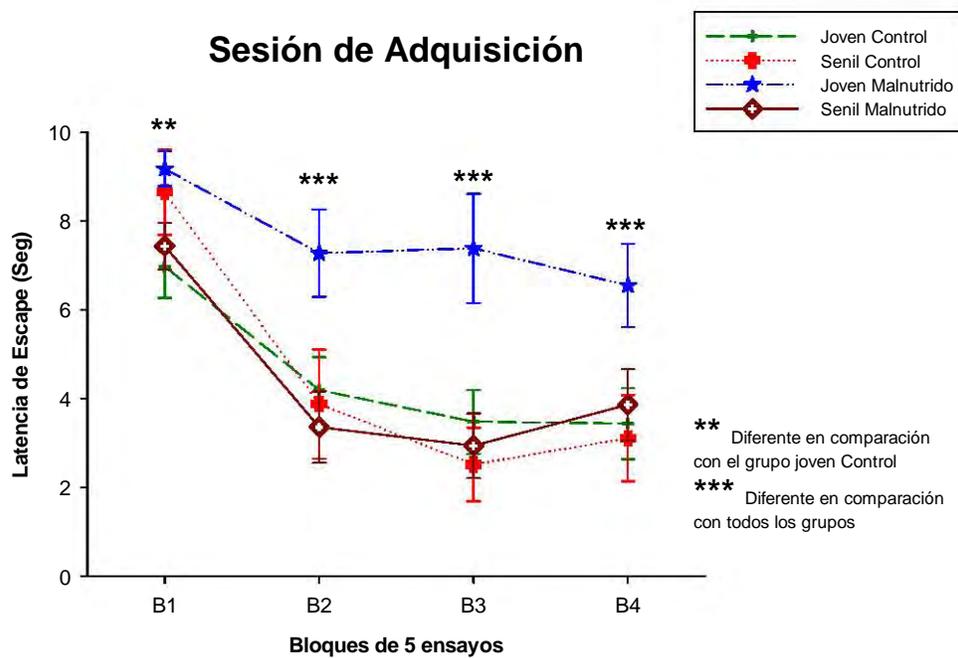


Figura 16: Análisis *post hoc* para la sesión de adquisición. Se observa que en todos los bloques el grupo joven malnutrido muestra valores de latencia de escape significativamente mayores en comparación con los otros grupos, entre los cuales no se encuentran diferencias significativas. Cada punto muestra la media \pm el error estándar. **= $p < 0.01$; ***= $p < 0.001$.

La Tabla 3 muestra el ANOVA de medidas repetidas para la sesión de extinción, se observan diferencias significativas entre grupos y entre ensayos con una $p < 0.05$. En esta sesión se observó interacción con una $p > 0.05$.

ANOVA de medidas repetidas para la sesión de Extinción

Factor	GL	F	p<
Grupos	F (3,34)	10.933	0.01
Ensayos	F(19,57)	12.013	0.01
Interacción	F(57,646)	1.948	0.01

Tabla 3. ANOVA de medidas repetidas para la sesión de extinción, los valores en rojo indican diferencias significativas con una $p < 0.05$.

La Figura 17 muestra los resultados de el ANOVA de medidas repetidas, así como las medias \pm el error estándar ensayo por ensayo para la sesión de extinción. Se observa que el grupo senil malnutrido, presenta una curva de extinción muy clara al obtener valores de latencia de escape muy por encima en comparación con los demás grupos desde los primeros ensayos. En el grupo joven malnutrido la extinción puede observarse durante los primeros ensayos; sin embargo en el ensayo 5 presenta recuperación espontánea de la conducta adquirida en la sesión de entrenamiento, después de este ensayo vuelve a extinguirse esta conducta. El grupo senil control presenta extinción de la respuesta hasta el ensayo 6; y finalmente el grupo joven control no muestra extinción durante los primeros 13 ensayos; en el ensayo 14 muestra valores de latencia de escape superiores a los 10s, pero para los ensayos subsecuentes vuelve a mantener valores de latencia de escape inferiores a los 10s.

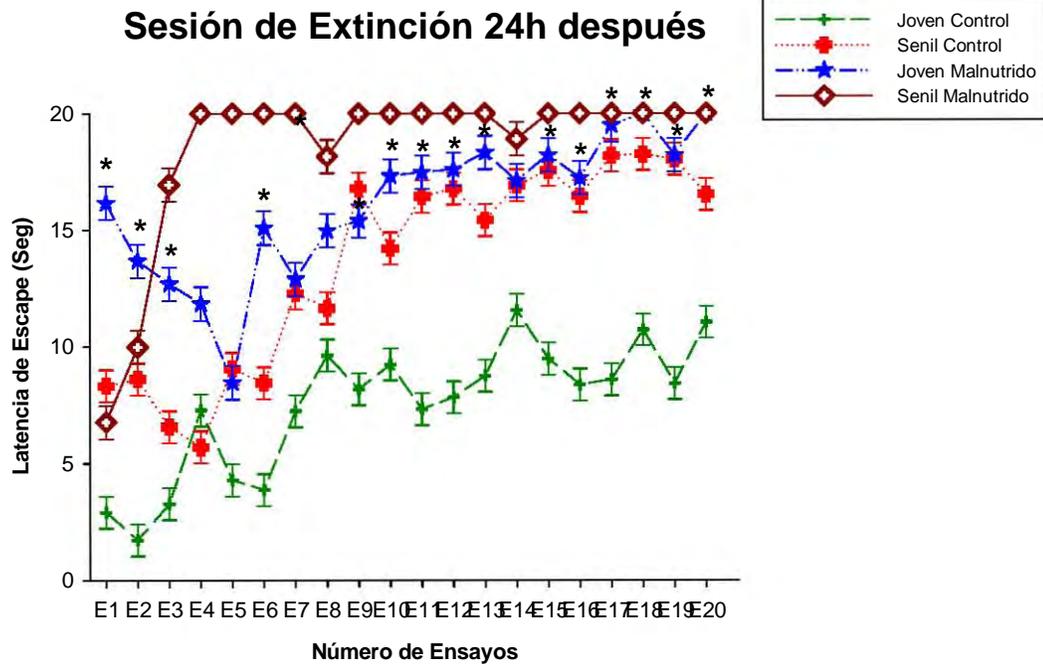


Figura 17. ANOVA de medidas repetidas para la sesión de extinción. Se observan diferencias significativas entre el grupo joven control y el grupo joven malnutrido en todos los ensayos excepto en los ensayos 4, 5, 7, 8 y 14. Cada punto indica las medias \pm errores estándar de la latencia de escape ensayo por ensayo. Nótese que el grupo malnutrido senil muestra valores más altos de latencia de escape en toda la sesión, seguido del grupo joven malnutrido aunque este presenta una recuperación espontánea en el ensayo 5. El grupo control senil presenta extinción de la conducta a partir del ensayo 6. El grupo joven control mantiene valores de latencia de escape inferiores a los 10s en todos los ensayos con excepción del ensayo 14. * $p < 0.05$.

Para una mejor comprensión de estos resultados se realizó el análisis *post hoc* para el cual los datos se agruparon en 4 bloques de 5 ensayos. Se utilizó la prueba Fischer's PLSD para cada bloque. Los resultados obtenidos se observan en la Figura 18. En el bloque 1, el grupo joven control muestra diferencias significativas en comparación con el grupo senil control con una $p < 0.01$, en comparación con el grupo joven y senil malnutrido muestra diferencias significativas con una $p < 0.001$. En el bloque 2 se observa que el grupo joven control muestra diferencias significativas en comparación con el grupo senil control con una $p < 0.01$ y diferencias significativas en comparación con los grupos joven y senil malnutrido con una $p < 0.001$. Para el bloque 3 se observa que el grupo joven control muestra diferencias significativas en comparación con los grupos senil control; joven malnutrido y senil malnutrido con una $p < 0.001$. En el bloque 4

observamos que el grupo joven control muestra diferencias significativas en comparación con los grupos senil control; joven malnutrido y senil malnutrido con una $p < 0.001$.

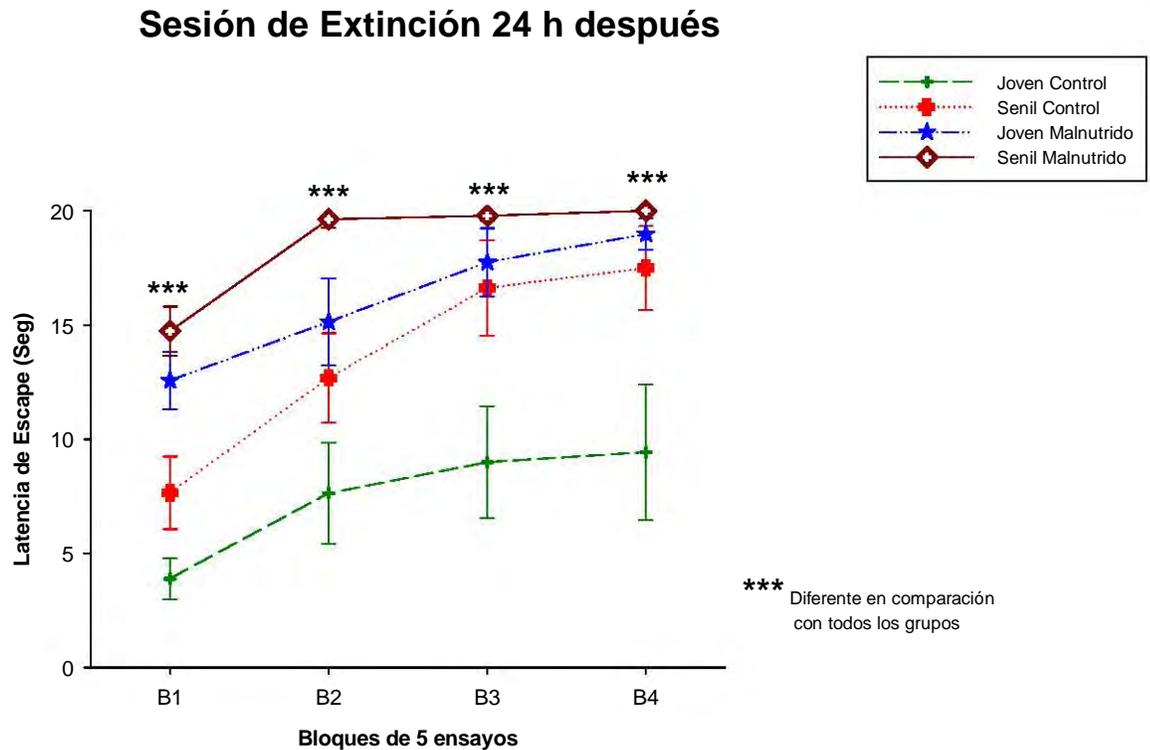


Figura 18. Análisis *post hoc* para la sesión de extinción, se observa que en todos los bloques el grupo senil malnutrido muestra valores de latencia de escape significativamente mayores en comparación con los otros grupos. El grupo control joven mantiene valores de latencia de escape por debajo de 10s en los 4 bloques. Cada barra muestra la media \pm el error estándar. **= $p < 0.01$; ***= $p < 0.001$.

Para observar si los 4 grupos de trabajo retuvieron la tarea de evitación activa, se tomó el ensayo 1 de la sesión de extinción como prueba de retención, los resultados obtenidos en este ensayo se muestran en la Figura 19, en donde observamos que 24h después del entrenamiento los grupos control joven, control senil y senil malnutrido recuerdan la tarea; no así el grupo malnutrido joven, el cual muestra latencias de escape superiores a los 10s en este ensayo.

Retención 24 h después Ensayo 1

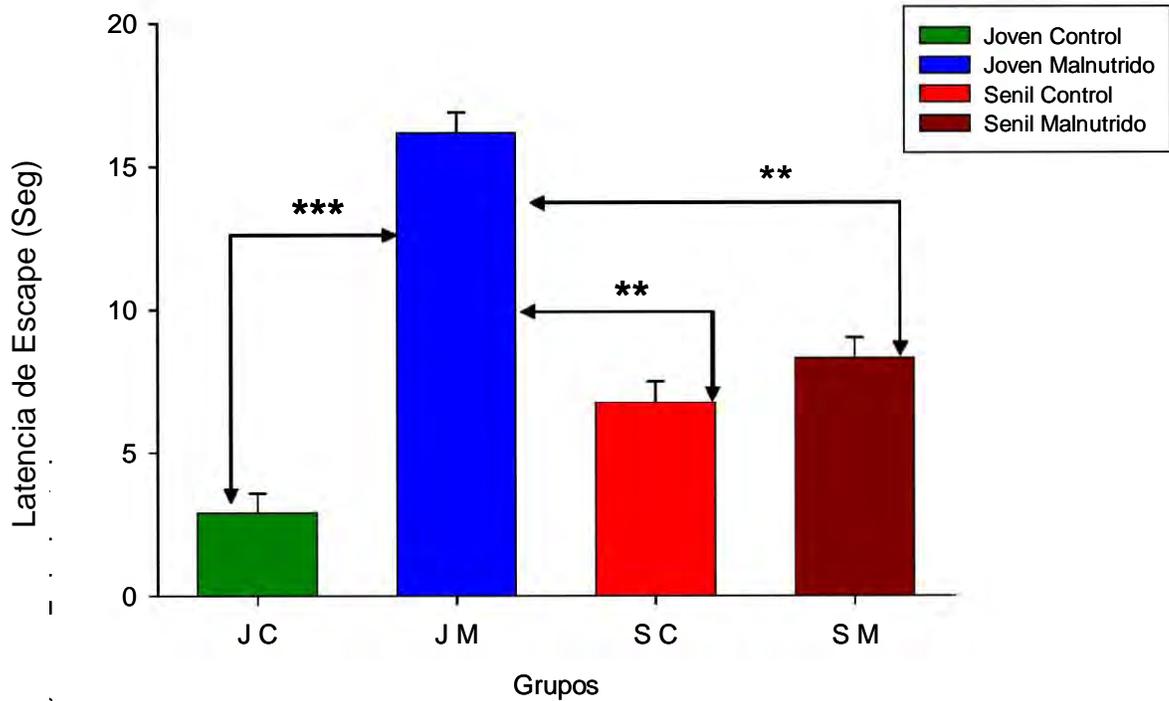


Figura 19. Análisis factorial para el ensayo 1, el cual se tomó como ensayo de retención. Se observa que el grupo joven malnutrido es diferente significativamente en comparación con los otros 3 grupos de trabajo. **= $p < 0.01$; ***= $p < 0.001$.

7.2. Anatómicos

7.2.1. Pesos corporales

Se analizaron los pesos corporales a lo largo del desarrollo de los animales utilizados en este estudio para observar el efecto de la malnutrición en el peso corporal en diferentes edades.

Tabla de Pesos Corporales

EDAD	CONTROLES	MALNUTRIDOS
Nacimiento	6.3± 4.2	5.2± 0.94
Destete	44.3 ± 3.13	25.0 ± 6.39
90 días	383.91 ± 14.65	87.9 ± 11.00
660 días	489.02 ± 76.91	386.47 ± 58.82

Tabla 4: Muestra las medias ± las desviaciones estándar de los pesos corporales de animales controles y malnutridos al momento del nacimiento, del destete, a los 90 días y a los 660 días de edad.

Se calculó la disminución del peso corporal en porcentaje de acuerdo a la edad y se observó que el grupo joven malnutrido muestra una reducción de peso corporal del 77% en comparación con el grupo control joven; y el grupo senil malnutrido muestra una reducción de peso corporal del 20% en comparación con el grupo senil control.

7.2.2. Pesos Cerebrales

Se analizaron los pesos cerebrales previos a la perfusión para observar el efecto de la malnutrición y de la edad en este parámetro del desarrollo.

Tabla de Pesos Cerebrales

EDAD	CONTROLES	MALNUTRIDOS
90 días	1.53 ± 0.12	1.36 ± 0.05
660 días	1.8 ± 0.15	1.47 ± 0.15

Tabla 5: Muestra las medias ± las desviaciones estándar de los pesos cerebrales de animales controles y malnutridos a los 90 días y a los 660 días de edad.

Se analizó la disminución del peso cerebral en porcentaje de los grupos controles jóvenes y seniles en comparación con los grupos malnutridos de las mismas edades y se observó que el grupo joven malnutrido muestra una disminución del peso cerebral del 11.11% en comparación con el grupo joven control. El grupo senil malnutrido muestra una disminución del 18.33% del peso cerebral en comparación con el grupo senil control.

7.3. Subcelulares

El análisis de los resultados correspondientes a los parámetros obtenidos de estructuras subcelulares se realizó mediante una ANOVA de una vía para cada variable: área del soma, del núcleo y del citoplasma, así como; número de aparatos de Golgi, lisosomas asociados a vesículas, lisosomas y mitocondrias para los cuatro grupos: jóvenes controles y malnutridos; y seniles controles y malnutridos. En total se analizaron 72 células provenientes de 12 animales.

7.3.1. Área del Soma

Los resultados obtenidos para esta variable se muestran en la Figura 20, observamos que el área del soma de el grupo control joven es significativamente menor en comparación con el grupo malnutrido senil con una $p < 0.01$, así como el grupo control senil tiene un tamaño significativamente menor en comparación con el malnutrido senil con una $p < 0.01$.

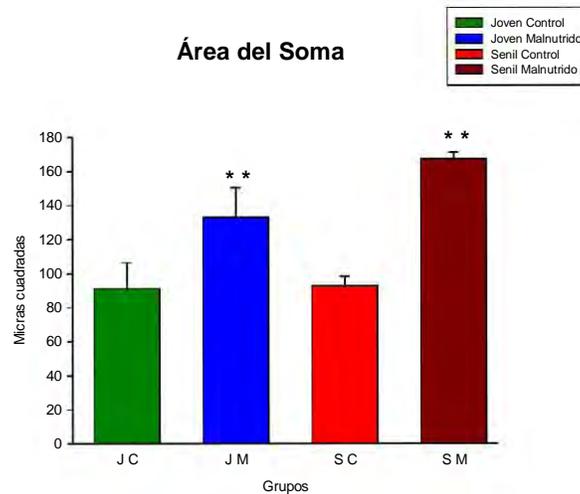


Figura 20. Análisis multifactorial para la variable área del soma, el grupo joven control tiene un área del soma significativamente menor en comparación con el grupo senil malnutrido con una $p < 0.01$; el grupo senil control tiene un área significativamente menor en comparación con el grupo senil malnutrido con una $p < 0.01$. Cada barra indica la media \pm el error estándar.

7.3.2. Área del Núcleo

Para esta variable observamos que el grupo control senil tiene un tamaño del área del núcleo significativamente menor en comparación con el grupo malnutrido senil con una $p < 0.05$ (Figura 21). Entre los grupos control joven y malnutrido joven no se observan diferencias significativas.

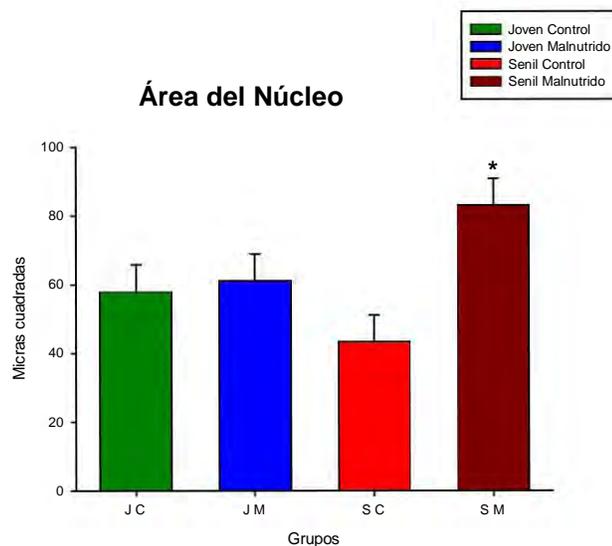


Figura 21. Análisis multifactorial para el área del núcleo, observamos que el grupo senil control tiene un tamaño del área significativamente menor en comparación con el grupo senil malnutrido. Cada punto indica la media \pm el error estándar.

7.3.3. Área del Citoplasma

Los resultados obtenidos del análisis para esta variable se muestran en la Figura 22, observamos que el grupo control joven tiene un área del citoplasma significativamente menor en comparación con el grupo malnutrido joven y con el grupo malnutrido senil con una $p < 0.05$. El grupo control senil tiene un área del citoplasma significativamente menor en comparación con el grupo malnutrido joven y malnutrido senil con una $p < 0.05$.

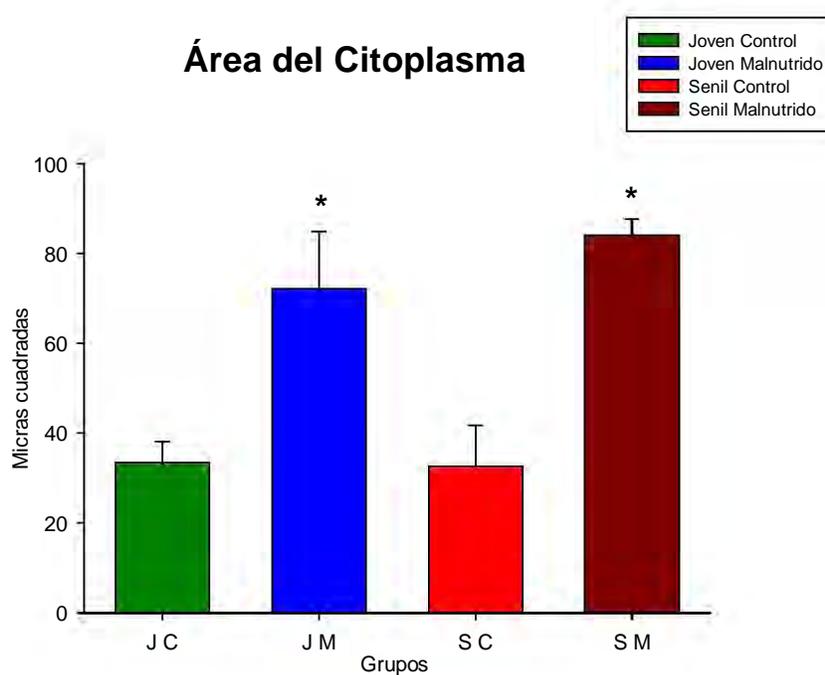


Figura 22: Análisis multifactorial para el área del citoplasma, observamos que los grupos controles jóvenes y seniles tienen un área del citoplasma significativamente menor en comparación con los grupos malnutridos jóvenes y seniles con una $p < 0.05$. Cada barra indica la media \pm el error estándar.

7.3.4. Aparato de Golgi

Después de analizar los resultados obtenidos para esta variable se observó que no existen diferencias significativas entre ninguna comparación en el número de aparatos de Golgi observados en las neuronas de estudio. Los datos se muestran en la Figura 23.

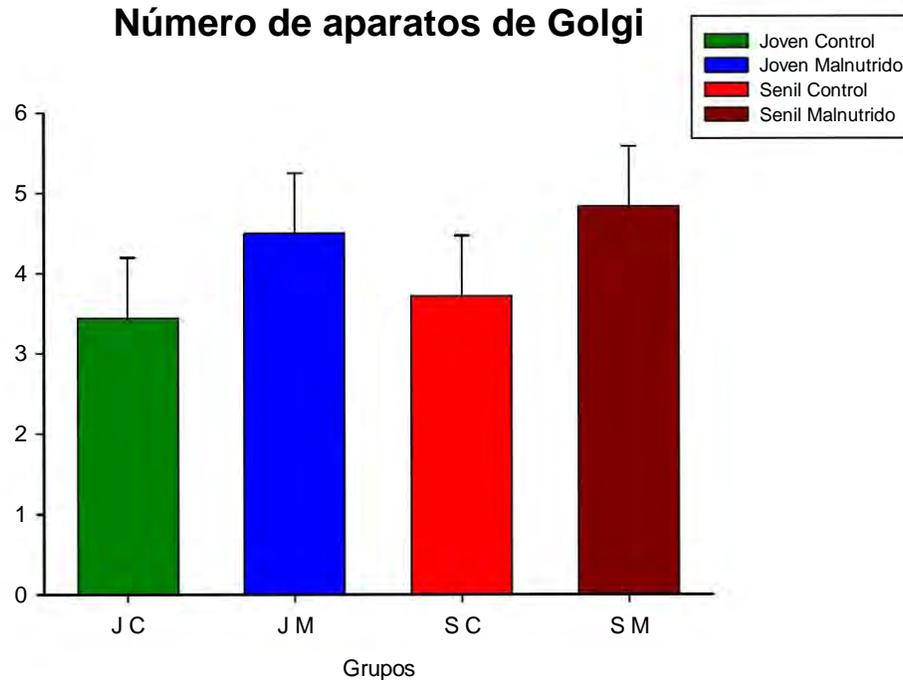


Figura 23: Cada barra muestra las medias \pm errores estándar para esta variable. No se observan diferencias significativas entre los grupos.

7.3.5. Lisosomas asociados a vesículas

Los resultados obtenidos del análisis para esta variable se muestran en la Figura 24. Observamos que el grupo control joven tiene un número significativamente menor de lisosomas asociados a vesículas en comparación con el grupo malnutrido senil con una $p < 0.01$. El grupo malnutrido joven tiene un número significativamente menor de lisosomas asociados a vesículas en comparación con el grupo malnutrido senil con una $p < 0.01$. Por último el grupo control senil, tiene un número significativamente menor de éste organelo en comparación con el grupo malnutrido senil con una $p < 0.05$.

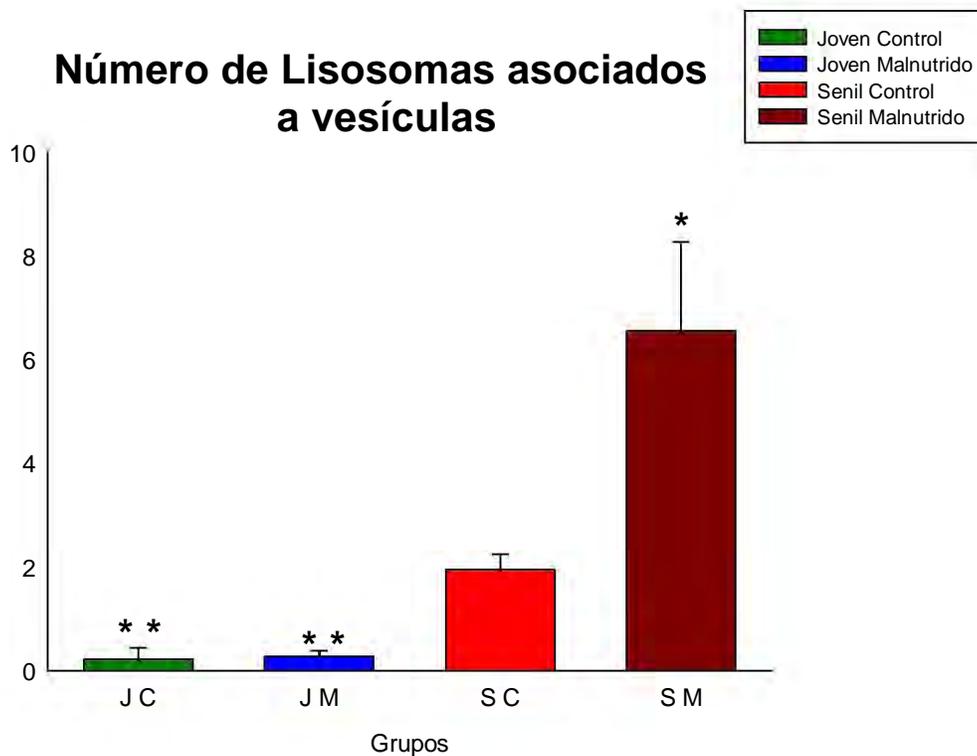


Figura 24: Análisis multifactorial para la variable lisosomas asociados a vesículas. Se observa que el grupo senil malnutrido tiene un número de este organelo significativamente mayor en comparación con los otros tres grupos. * = $p < 0.05$, ** = $p < 0.01$. Cada barra indica la media \pm el error estándar.

7.3.6. Lisosomas

Los resultados obtenidos del análisis multifactorial para esta variable se muestran en la Figura 24, observamos que el grupo control joven tiene un número de lisosomas significativamente menor en comparación con el grupo malnutrido joven con una $p < 0.05$ y con el grupo malnutrido senil con una $p < 0.01$. El grupo senil control tiene un número significativamente menor de lisosomas en comparación con el grupo malnutrido joven con una $p < 0.05$ y con el malnutrido senil con una $p < 0.01$.

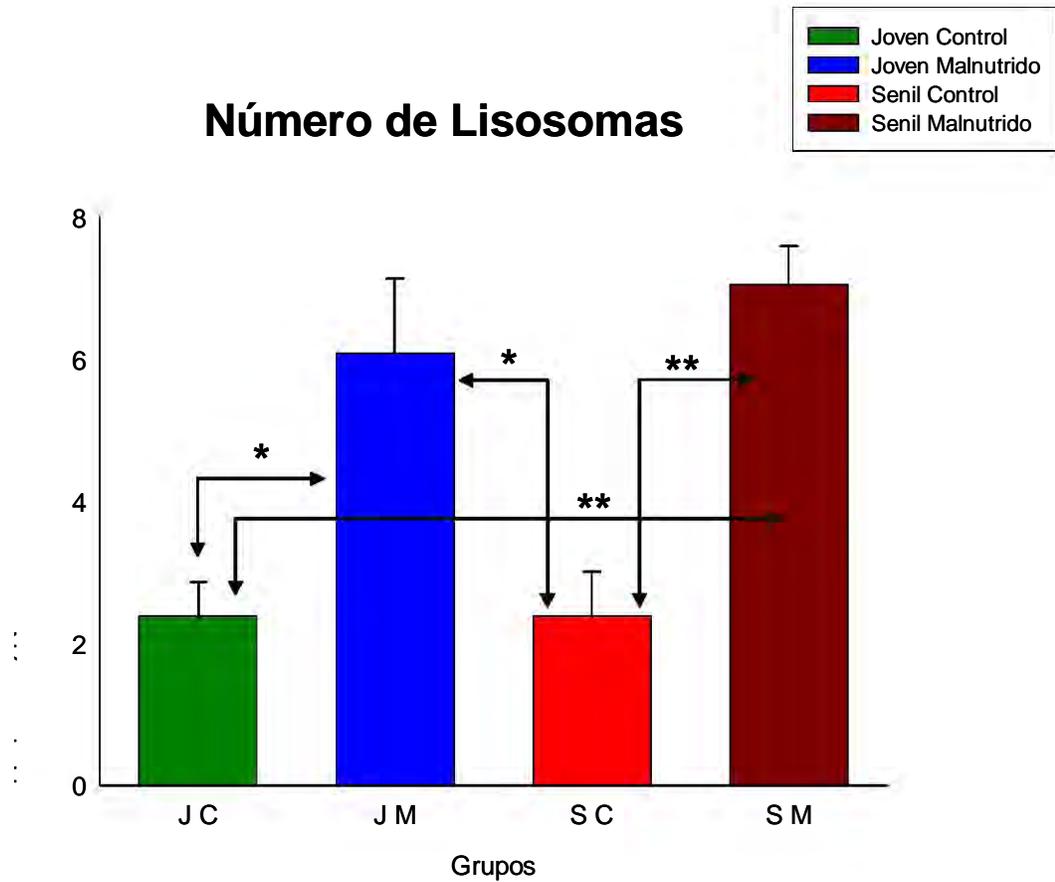


Figura 25. Análisis multifactorial para la variable lisosomas, observamos que los grupos malnutridos jóvenes y seniles muestran un número de lisosomas significativamente mayor en comparación con los grupos controles jóvenes y seniles. *= $p < 0.05$, **= $p < 0.01$. Cada barra indica la media \pm el error estándar.

7.3.7. Mitocondrias

Los resultados obtenidos del análisis multifactorial para esta variable se muestran en la Figura 25. Observamos que el grupo senil control muestra un número significativamente menor de mitocondrias en comparación con el grupo senil malnutrido con una $p < 0.05$. Para los grupos joven control y joven malnutrido no se observaron diferencias significativas.

Número de Mitocondrias

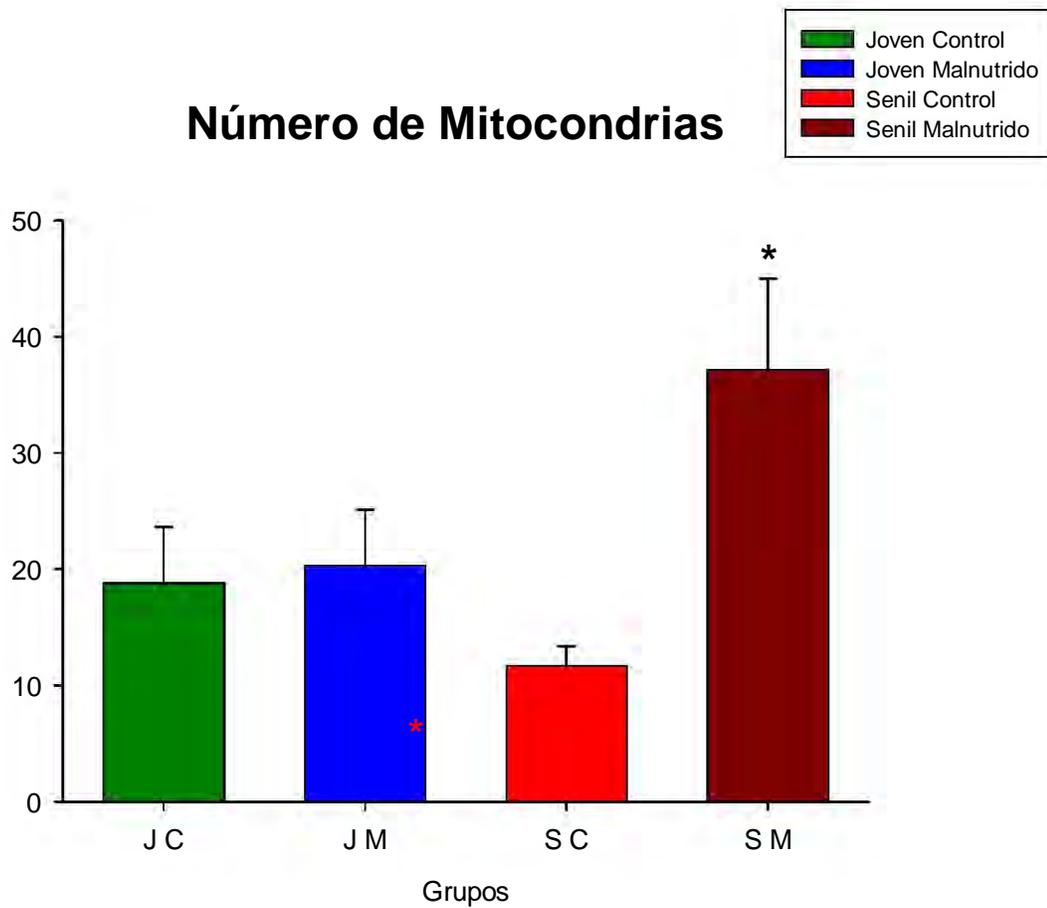


Figura 26. Análisis multifactorial para el número de mitocondrias. El grupo senil control muestra un número significativamente menor en comparación con el senil malnutrido con una $p < 0.05$. Cada barra indica la media \pm el error estándar.

8. DISCUSION

En el presente trabajo se estudiaron dos variables (malnutrición y edad) por separado y la interacción entre ambas sobre la adquisición, retención y extinción de la prueba de evitación activa y sobre la estructura subcelular de las neuronas piramidales del CA1 del hipocampo. Para mayor claridad, se argumenta cada variable por separado, y posteriormente se argumenta la interacción entre ambas. De esta manera, se discuten los resultados de la prueba conductual valorada en tres sesiones; una de adquisición, una de retención y otra de extinción, cabe hacer la aclaración que de ésta última se considera el primer ensayo como la prueba de retención y los subsecuentes ensayos como prueba de extinción. En esta parte de la discusión, se compara la capacidad plástica del sustrato neuronal hippocampal asociado a los procesos de memoria y aprendizaje en los distintos grupos experimentales. Al final de la discusión se argumentan los cambios cuantitativos y morfométricos en la estructura subcelular de las neuronas del CA1 del hipocampo; estos cambios fueron observados como resultado de la medición de las áreas del soma, del núcleo y del citoplasma; además de contar el número de los organelos (mitocondrias, aparato de Golgi, lisosomas asociados a vesículas y lisosomas); en los cuatro grupos de trabajo. Esta última parte enfoca la discusión de las alteraciones metabólicas neuronales de los distintos grupos asociados a variables experimentales analizadas.

Hasta el presente, en la literatura existe evidencia tanto conductual como anatómica de los efectos que produce la malnutrición, sobre el desarrollo SNC. En los roedores se ha mostrado que la malnutrición prenatal o postnatal produce anomalías estructurales y bioquímicas en diferentes regiones cerebrales, particularmente en la neocorteza y la FH (Lukoyanov & Andrade, 2000). A su vez, se ha mostrado que los animales malnutridos durante el desarrollo exhiben numerosos y a menudo irreversibles cambios conductuales incluyendo alteraciones en conductas como la de evitación, la exploratoria y en su comportamiento social; así como, trastornos emocionales y deficiencias relacionadas con la memoria espacial (Lukoyanov & Andrade, 2000). Se ha observado también en estos animales hiperactividad ante estímulos dolorosos y

aversivos (Rocinho, Almeida & Oliveira 1997), menores signos de ansiedad (Hernández & Almeida, 2003); y un pobre desempeño en pruebas que involucran los procesos de aprendizaje y memoria sobre todo de tipo espacial, mismos que requieren la participación del hipocampo (Bedi, 1992). Sin embargo, observaciones de este laboratorio han sugerido que los animales malnutridos presentan mayor longevidad y menores rasgos de senilidad o de enfermedades aparentes asociadas al envejecimiento. A su vez el grupo de Tacconi, et al; 1991, observaron en animales con dieta restringida, que no sufren aumento de peso debido a la edad, que se incrementa la longevidad y que el deterioro fisiológico que se observa en animales con dieta *ad libitum*, se ve retrasado en estos animales. Estas observaciones provocaron la duda de si estos rasgos aminorados del envejecimiento pudieran replicarse en la ejecución de procesos cognitivos. En el presente trabajo, obtuvimos resultados que concuerdan con estas observaciones en lo referente al desempeño en la prueba de evitación activa. Si tomamos en cuenta que la prueba de evitación activa utilizada, consta de 20 ensayos tanto para la sesión de adquisición como para la sesión de extinción; podríamos argumentar, que en la sesión de adquisición el animal normal aprende información nueva y ésta es procesada por la memoria de corto plazo durante los 20 ensayos, lo cual le permite al sujeto resolver la tarea. Nuestras observaciones conductuales de los grupos malnutridos muestran que tanto jóvenes como seniles logran aprender la tarea. Por lo tanto, podemos inferir que estos animales son capaces de procesar información nueva y mantenerla en la memoria de corto plazo para resolver la tarea. Sin embargo, el grupo joven malnutrido difiere significativamente en su menor desempeño de la prueba en comparación con los otros grupos. Este dato sugiere que el procesamiento de información requerido para adquirir nuevas conductas y resolver adecuadamente una tarea se ve alterado significativamente por el efecto negativo de la malnutrición en animales jóvenes. Asimismo, probablemente la malnutrición esté afectando significativamente al hipocampo, dando como resultado la incapacidad de unir los elementos del estímulo en combinaciones. Este dato sugiere que el daño producido por la malnutrición es más evidente en etapas tempranas, suponiendo

que, como los animales no recibieron un tratamiento de rehabilitación nutrimental, le toma mayor tiempo al organismo adaptarse a la deficiencia de proteína, y podría ser por esta razón que el daño en la conducta provocado por la malnutrición sea mas evidente en animales jóvenes. Por otro lado, no debe perderse de vista que los animales malnutridos presentan retardo en la maduración funcional (Bush & Leathwood, 1974; Kirkwood & Shanley, 2005). Así que debido a este factor, pudiera ser que los animales de 90 días presentan inmadurez en el sistema nervioso lo cual se ve reflejado en que desempeñen pobremente esta tarea, o bien a que los animales malnutridos invierten la mayor parte de su energía en el mantenimiento de las funciones celulares para lograr la supervivencia (Kirkwood & Shanley, 2005). A estas observaciones se une el hecho de analizar los pesos corporales y ver la ganancia de peso a lo largo del desarrollo en los animales de 90 días se hace más evidente la pérdida de peso en comparación con los animales controles. Asimismo, a partir de esta edad, el peso corporal en los animales malnutridos no se incrementa en la misma proporción en comparación con los animales controles.

Durante el proceso de aprendizaje, se observó que la intensidad de choque utilizada (1mA), es suficiente para que los animales malnutridos jóvenes y malnutridos seniles adquieran la tarea; sería interesante para estudios posteriores utilizar diferentes intensidades de choque, para definir si los animales en estas condiciones pueden aprender la tarea con una intensidad de choque menor o si su rendimiento mejora utilizando una intensidad mayor. Para la variable edad observamos el mismo patrón ya que los animales seniles controles aprendieron la tarea, sin diferir significativamente del grupo joven control. Esto permite inferir que ni el aprendizaje ni la memoria de corto plazo se ven afectados por la edad, y que la intensidad de choque utilizada (1mA) fue suficiente para producir el aprendizaje.

Al analizar los resultados del ensayo 1 de la sesión de extinción el cual se tomó como prueba de memoria d largo plazo, únicamente el grupo joven malnutrido no retiene la tarea, esto puede deberse al pobre desempeño en la sesión de entrenamiento, ya que aunque logra aprender la tarea, lo hace de manera deficiente. Este resultado puede tener una doble explicación: la primera es

que los animales jóvenes malnutridos no establecen correctamente la relación entre el estímulo condicionado y el reforzador negativo utilizados en esta prueba; la segunda posibilidad es que establezcan de manera correcta la relación, pero no sean capaces de mantenerla en la memoria de corto plazo y debido a esto se vean forzados a aprender constantemente la tarea durante toda la sesión. Resultan sobremanera interesantes los resultados obtenidos en este ensayo ya que ni el factor edad, ni la interacción entre edad y malnutrición afectan la retención de la tarea 24 h después, dato que sustenta nuestras hipótesis. Asimismo, las curvas de extinción obtenidas en los ensayos subsecuentes, del grupo senil control y del grupo senil malnutrido muestran que estos grupos son capaces de entender el cambio en los estímulos presentados, y por lo tanto de adquirir un nuevo aprendizaje, estos resultados sustentan la sugerencia de que una dieta restringida en calorías no afecta la capacidad de aprender y recordar una nueva tarea en animales seniles. Esta capacidad no se observa tan clara en el grupo joven malnutrido ya que presenta recuperación espontánea en la sesión de extinción y requiere de más ensayos para asociar la nueva relación entre los estímulos. Esto podría deberse a que en edades tempranas el daño por la malnutrición es mayor, debido a que el organismo requiere de un tiempo más prolongado para lograr adaptarse a la deficiencia de proteína. Esta idea se puede corroborar con los estudios de aprendizaje espacial en el laberinto acuático de Morris, realizados por Bedi (1992), quien estudió los efectos postnatales de la malnutrición en animales de diferentes edades (35, 65, 170 y 220 días de edad). Este autor encontró que solo los animales de 35 días de edad tuvieron alteraciones en el aprendizaje espacial en comparación con los controles, en las otras edades no encontró deficiencias significativas, debido a que después de un largo periodo de rehabilitación nutricional se eliminaron las diferencias entre los controles y los grupos previamente malnutridos, sin importar la edad, ni el grado de malnutrición. Es decir, los animales que fueron probados con menor tiempo de rehabilitación nutricional presentaron alteraciones conductuales y los animales que recibieron por un periodo más largo la rehabilitación no presentaron alteraciones conductuales. En el caso de nuestro trabajo la malnutrición se indujo durante toda

la vida de los animales, sugiriendo que con la edad el organismo es capaz de generar un mecanismo de compensación, y quizás por éste el grupo senil malnutrido incluso presenta mayor número de aciertos en ambas sesiones en comparación con el grupo joven malnutrido. Por lo tanto, podemos inferir que los rasgos de envejecimiento menos evidentes observados en animales seniles malnutridos, de alguna manera se pueden extrapolar a la conducta de éstos. Con respecto a esta observación, es importante señalar que los animales malnutridos logran mantener mecanismos de plasticidad (respuestas celulares adaptativas ante un factor nocivo externo); los cuales podrían contrarrestar algunos de los daños producidos por la malnutrición posnatal crónica. Esta respuesta de plasticidad adaptativa se muestra en los resultados conductuales obtenidos en este trabajo, sugiriendo que la capacidad de aprendizaje y de retención se preserva a lo largo del desarrollo aún en animales seniles malnutridos. Por lo tanto, puede sugerirse que el efecto de la malnutrición por sí sola es más evidente en edades tempranas.

El segundo aspecto considerado en esta investigación fue identificar los cambios producidos por la malnutrición y por la edad en la estructura subcelular de las neuronas piramidales del CA1, tomando en cuenta que las células se suelen encontrar en un estado de equilibrio homeostático. Así que éstas pueden modificar su estado funcional en respuesta a estímulos de intensidad moderada, manteniendo su equilibrio, pero frente a estímulos fisiológicos más excesivos o estímulos patológicos. Bajo estas condiciones, las células reaccionan utilizando diferentes mecanismos de compensación al daño y a la senectud que incluyen entre otros a los siguientes:

- a) Adaptación: Estímulos fisiológicos excesivos o algunos estímulos patológicos que dan lugar a un estado nuevo y alterado que preserva la viabilidad de la célula.
- b) Lesión celular reversible: Se refiere a cuando la célula ha sufrido modificaciones patológicas que pueden desaparecer cuando dicho estímulo cesa, o la lesión es leve.
- c) Lesión celular irreversible: Se refiere a alteraciones patológicas de carácter permanente que gradualmente dan lugar a la muerte celular.

Entre las diversas causas que provocan estas reacciones se encuentran los desequilibrios nutricionales (carencias proteíco-calóricas, de vitaminas y otros componentes de la dieta) y el proceso natural del envejecimiento. Ambas observaciones indican que la estructura celular, se altera de manera importante desencadenando procesos tales como la apoptosis o la necrosis; cabe hacer la aclaración de que los mecanismos que desencadenan el proceso de apoptosis son con mayor frecuencia factores internos del organismo y los mecanismos que desencadenan procesos necróticos son con mayor frecuencia factores externos (Velasco, Beas-Zarate & Gómez-Pinedo, 2004). Las características particulares de cada proceso están totalmente diferenciadas y ya han sido presentadas en la sección de antecedentes.

Las lesiones celulares que se producen por estos dos factores pueden ser de carácter reversible dependiendo de la lesión y del estadio de la misma. La célula puede activar mecanismos de reparación para compensar dicha lesión. Tomando en cuenta estas observaciones, en el presente trabajo, se hizo un estudio cuantitativo de algunas estructuras subcelulares de las neuronas del CA1, para valorar cómo se ven afectadas por la malnutrición postnatal crónica y por la edad. En primer lugar, se hizo el cálculo del área del soma, del núcleo y del citoplasma, debido a que cuando la célula recibe un estímulo nocivo pierde la permeabilidad selectiva de la membrana plasmática produciendo alteraciones en el transporte de las sustancias hacia el interior de la célula, sobre todo afectando al transporte activo y produciendo un cúmulo de sodio intracelular, con el cual aumenta la presión osmótica en el interior de la célula provocando la entrada de agua y produciendo edema intracelular también conocido como tumefacción celular. Como respuesta a la lesión celular se distienden las cisternas del retículo endoplásmico y del aparato de Golgi. Asimismo, se dilatan las mitocondrias, se dispersan los polirribosomas, se forman vacuolas confluentes en el citoplasma y se rompe la membrana plasmática (Velasco, Beas-Zarate & Gómez-Pinedo, 2004). En nuestros hallazgos observamos cómo afecta la malnutrición postnatal crónica el tamaño de las neuronas y obtuvimos que producto de la interacción entre la malnutrición postnatal crónica y la edad, encontramos que el área del

soma es significativamente mayor en el grupo senil malnutrido en comparación con los otros tres grupos de trabajo. Este resultado muestra que las células de estos animales perdieron la permeabilidad de la membrana promoviendo la entrada de sustancias a la neurona y por lo tanto, estas neuronas se encuentran en estado de edema o tumefacción celular. Por otro lado, observamos que en el grupo senil malnutrido el área del núcleo es significativamente mayor en comparación con los otros 3 grupos de trabajo. Este resultado es congruente con un estado de tumefacción en el que posiblemente, se encuentran estas células quizás por el daño oxidativo que es más frecuente en animales malnutridos, ya que se ha mostrado que una dieta baja en proteínas disminuye las defensas antioxidantes (Bonatto, et al., 2005). Este daño provoca disminución en la producción de ATP, en consecuencia se impide el funcionamiento normal de las bombas metabólicas y se permite la entrada masiva de agua y Na⁺ a la célula, que provoca un edema celular irreversible (Martínez, Vargas & Arancibia, 2003).

En los grupos malnutridos tanto jóvenes como seniles se observó que el área del citoplasma fue significativamente mayor en comparación con los grupos controles de ambas edades. Estos resultados parecen ser consistentes con el estado de edema celular en el que se encuentran las neuronas de estos animales, producto de la malnutrición. En particular haciendo un análisis cualitativo las neuronas del grupo malnutrido joven, son las que presentan mayores rasgos de necrofanerosis, que incluyen la deformación del núcleo, tumefacción simple de las mitocondrias e inflamación de las cisternas del aparato de Golgi. Estas observaciones refuerzan la idea de que a los 90 días de edad los animales parecen ser más vulnerables a los efectos de la malnutrición postnatal tanto al nivel conductual como celular.

Los principales cambios en la matriz celular, se encontraron en los grupos malnutridos tanto jóvenes como seniles, siendo los cambios subcelulares más evidentes en el grupo malnutrido senil, ya que se encontró un número de mitocondrias y lisosomas asociados a vesículas significativamente mayor en comparación con los otros grupos. Este dato, es importante debido a que en casos de lesión severa e irreversible, se produce lesión en la membrana de los

lisosomas, que al romperse liberan enzimas líticas que generan auto-digestión o autólisis (Velasco, Beas-Zarate & Pinedo-Gómez, 2004). Este resultado nos indica el grado de autofagocitosis en el que entra la neurona, ya que al no poder degradar normalmente los desechos celulares, se empiezan a acumular los lisosomas que dan lugar a la formación de lipofucsina signo característico asociado a la edad (aunque también se puede observar en animales jóvenes). El número de lisosomas fue significativamente mayor en los grupos malnutridos tanto jóvenes como seniles en comparación con los otros grupos. Con el proceso de necrosis las mitocondrias se ven afectadas provocando una serie de reacciones que en su mayoría son irreversibles. Se frena la fosforilación oxidativa y en consecuencia disminuye la producción de ATP, esta respuesta celular provoca que los mecanismos que requieren ATP se detengan, tales como: a) el funcionamiento de la bomba de sodio, b) la agregación de polirribosomas asociados a las membranas del retículo endoplásmico y c) la captación de calcio al interior de las mitocondrias (Velasco, Beas-Zarate & Pinedo-Gómez, 2004). El hecho de no encontrar diferencias significativas de la ultraestructura entre el grupo malnutrido joven, malnutrido senil y senil control, puede sugerir que la malnutrición en animales jóvenes simula lo que ocurre en animales seniles producto del daño oxidativo. Es decir, que las lesiones neuronales observadas en el grupo malnutrido joven son debidas a la malnutrición; y que las lesiones celulares observadas en los animales seniles son producto del estrés oxidativo, y por último en el grupo malnutrido senil las lesiones neuronales observadas son producto de la malnutrición y del estrés oxidativo. Lo que resalta es que a pesar de que en el grupo senil interactúan las dos variables, el grupo malnutrido joven no presenta un estado celular significativamente mejor, es decir que la malnutrición en animales jóvenes provoca el mismo estado celular que la interacción malnutrición y edad.

En observaciones cualitativas de las neuronas piramidales del CA1, las mitocondrias presentaron cambios importantes como dilataciones, alargamientos y pérdida de las crestas mitocondriales; estos cambios fueron mas evidentes en el grupo de malnutridos tanto jóvenes como seniles. La alteración mitocondrial, por la malnutrición es importante debido a que hay que considerar la herencia matrilineal

de las mitocondrias, en efecto, se hereda el DNAm solo de la madre, ya que la del padre se pierde. Por lo tanto, la actividad mitocondrial se basa en el control del DNA tanto nuclear como mitocondrial, dando lugar a patrones matrilineales típicos para las mitocondrias (Johns, 1995). Esto puede ser alterado por múltiples factores, en el humano, se manifiesta como encefalomiopatías o bien en la enfermedad de Parkinson, y algunas demencias debidas a fallas mitocondriales por las alteraciones en la síntesis proteica, insuficiencia de los mecanismos de reparación y por el deterioro en la función respiratoria mitocondrial parcial o total (Di Mauro & Moraes, 1993).

A pesar de que no se encontraron diferencias significativas en el número de los aparatos de Golgi, se observó que en el grupo malnutrido joven este organelo presenta rasgos de edema, dilatación y en algunos casos pierde totalmente su forma.

En un intento de recapitular los resultados obtenidos en este trabajo, puede mencionarse que el grupo joven malnutrido, muestra diferencias significativas en las sesiones de adquisición, retención y extinción de la tarea de evitación activa, cuando se le compara con el resto de los grupos. Con base a lo anterior, puede resumirse que: La malnutrición postnatal en animales de 90 días produce daños a nivel subcelular en las neuronas del CA1, así como deficiencias en las conductas dependientes del hipocampo, aquí evaluadas. Asimismo, que a lo largo del desarrollo los animales malnutridos preservan mecanismos de compensación los cuales les permiten adquirir nuevas conductas y retenerlas en la memoria de largo plazo.

9. CONCLUSIONES

9.1 Conductuales

1. A pesar de que los cuatro grupos considerados en este trabajo aprenden la tarea de evitación activa, existen diferencias significativas en su desempeño.
2. El factor malnutrición afecta significativamente la adquisición de la tarea evitación activa en animales jóvenes, sin embargo este grupo logra adquirir la tarea.
3. El factor edad no afecta de manera significativa la adquisición de la tarea de evitación activa.
4. La interacción de los factores edad y malnutrición no afectan de manera significativa la adquisición de la tarea evitación activa en animales seniles malnutridos.
5. La malnutrición afecta significativamente la retención de la tarea evitación activa 24h después del entrenamiento en animales jóvenes.
6. La edad no interfiere negativamente en la retención de la tarea de evitación activa 24h después del entrenamiento en animales seniles.
7. La interacción edad y malnutrición no afecta negativamente la retención de la tarea de evitación activa 24h después del entrenamiento en animales seniles malnutridos.
8. La malnutrición afecta significativamente la extinción de la tarea de evitación activa 24h después del entrenamiento en animales jóvenes.
9. La edad no interfiere con la extinción de la tarea de evitación activa 24h después del entrenamiento a partir del ensayo 6 en el animales seniles.
10. La interacción edad y malnutrición no afectan la extinción de la tarea de evitación activa 24h después del entrenamiento en el grupo senil malnutrido.

9.2 Subcelulares:

9.2.1 Áreas

1. La malnutrición incrementa significativamente el área del soma en animales jóvenes.
2. La interacción de los factores edad y malnutrición incrementa significativamente el área del soma en animales seniles malnutridos.
3. La interacción de los factores edad y malnutrición incrementa significativamente el área del núcleo en animales seniles malnutridos.
4. La malnutrición incrementa significativamente el área del citoplasma en animales jóvenes.
5. La interacción de los factores edad y malnutrición incrementa significativamente el área del citoplasma en animales seniles malnutridos.

9.2.2 Organelos

1. La interacción de los factores edad y malnutrición aumenta significativamente el número de mitocondrias en animales seniles malnutridos.
2. La interacción de los factores edad y malnutrición aumenta significativamente el número de lisosomas asociados a vesículas en animales seniles malnutridos.
3. La malnutrición aumenta significativamente el número de lisosomas en animales jóvenes.
4. La interacción de los factores edad y malnutrición aumenta significativamente el número de lisosomas en animales seniles malnutridos.

10. REFERENCIAS

1. Amaral DG y Witter MP. 1989. The three dimensional organization of the hippocampal formation: A review of anatomical data. *Neurosci.* 31, 571-591.
2. Anderson JR. 2001. Aprendizaje y Memoria. Mc Graw Hill, pp. 7-32
3. Andrade JP y Paula-Barbosa MM. 1996. Protein malnutrition alters the cholinergic and GABAergic systems of the hippocampal formation of the adult rat: an immunocytochemical study. *Neurosci.* 28, 211-215.
4. Andrade JP, Castanheira-Vale AJ, Paz-Dias PG, Madeira MD y Paula-Barbosa MM. 1996. The dendritic trees of neurons from the hippocampal formation of protein-deprived adult rats. A quantitative Golgi study. *Exp Brain Res.* 109, 419-433.
5. Barondes SH. 1970. Cerebral protein synthesis inhibitors block long-term memory. *Int. Rev. Neurobiol.* 12, 177-205.
6. Bedi KS. 1992. Spatial learning ability of rats undernourished during early postnatal life. *Physiol Behav.* 51, 1001-1007.
7. Berger TW, Rinaldi PC, Weisz DJ y Thompson RF. 1983. Single-unit analysis of different hippocampal cell types during classical conditioning of rabbit nictitating membrane response. *J. Neurophysiol.* 50, 1197- 1217.
8. Bonatto F, Polydoro M, Éverton A, Conte da Frota Júnior ML, Dal-Pizzol F, Rotta NL, Souza O. D, Perry ML y Moreira Fonseca JC. 2005. Effect of protein malnutrition on redox state of the hippocampus of rat. *Brain Res.*1042, 17-22.
9. Bortolotto ZA y Collingridge GL. 1993. Characterization of LTP induced by the activation of glutamate metabotropic receptors in area CA1 of the hippocampus. *Neurophar.* 32, 1-9.
10. Bush M y Leathwood PD. 1975. Effect of different regimens of early malnutrition on behavioral development and adult avoidance learning in Swiss white mice. *Br. J. Nutr.* 33, 373-385.
11. Brunk UT y Terman A. 2002. Lipofuscin: Mechanisms of age-related accumulation and influence on cell function. *Free Radic. Biol. Med.* 33, 611-619.

12. Brunk UT y Terman A. 2002. The mitochondrial-lysosomal axis theory of aging. Accumulation of damaged mitochondria as a result of imperfect autophagocytosis. *Eur. J. Biochem.* 369, 1996-2002.
13. Cárabez, T. A, Sandoval F y Palma L. 1998. Ultrastructural Changes of Tissues Produced by Inhalation of Thinner in Rats. *Micros. Res.Tech.* 40, 56-62.
14. Carlson NR. 1996. *Fundamentos de Psicología Fisiológica*. Prentice-Hall Hispanoamericana, S.A, pp. 377-381.
15. Castro CA, Tracy M y Rudy JM. 1989. Early-life undernutrition impairs the development of the learning and short-term memory processes mediating performance in a conditional spatial discrimination task. *Behav. Brain. Res.* 32, 255-264.
16. Di Mauro S y Moraes, CT. 1993. Mitochondrial encephalopathies. *Arch. Neurol.* 50, 1197-1208.
17. Díaz-Cintra S, Granados Rojas L, Sánchez A y Cintra L. 2001. En: *Temas Selectos de Neurociencias II*. Velásquez Moctezuma J. Ed. UNAM-Puis, pp 434-456.
18. Díaz-Cintra S, Cintra L, Galván A, Aguilar A, Kemper T y Morgane PJ. 1991. Effects of prenatal protein deprivation on the postnatal development of granule cells in the fascia dentata. *J. Comp. Neurol.* 310, 356-364.
19. Díaz-Cintra S, García-Ruiz M, Corkidi G y Cintra L. 1994. Effects of prenatal malnutrition and postnatal nutritional rehabilitation on CA3 hippocampal pyramidal cells in rats of four ages. *Brain Res.* 662, 117-126.
20. Díaz-Cintra S, Yong AP, Aguilar A, Bi X, Lynch G y Ribak CE. 2004. Ultrastructural analysis of changes in neuronal features of hippocampal pyramidal cells treated with a cathepsin inhibitor from apolipoprotein e-deficient mice. *J.Neurocytol.* 33, 37-48.
21. Fernández RJ y López GG. 2001. *Sustratos neuronales de la memoria*. En: *Memoria Donde reside y cómo se forma?* Bermúdez-Rattoni F. y Prado-Alcalá RA. pp.137-148.

22. Foster TC. 1999. Involvement of hippocampal synaptic plasticity in age-related memory decline. *Brain Res. Rev.* 30, 236-249.
23. Fuchs A, Martin JR, Bender R y Harting J. 1986. Avoidance acquisition in adult and senescent rats. *Gerontology.* 32, 91-97.
24. Fukuda Hebiara MT, Francolin-Silva AL y Almeida Sousa S. 2002. Early postnatal protein malnutrition affects learning and memory in the distal but not in the proximal cue version of the Morris water maze. *Behav. Brain. Res.* 133, 271-277.
25. Flood JF y Morley JE. 1993. Age-related changes in footshock avoidance acquisition and retention in senescence accelerated mouse (SAM). *Neurobiol Aging.* 14, 153-157.
26. García-Ruiz M, Díaz-Cintra S, Cintra L y Corkidi G. 1993. Effects of prenatal malnutrition on CA3 hippocampal pyramidal cells in rats of three age. *Brain Res.* 625, 203-212.
27. Granados-Rojas L, Aguilar A y Díaz-Cintra S. 2004. The mossy fiber system of hippocampal formation is decreased by chronic and postnatal but not by prenatal protein malnutrition in rats. *J. Nutri. Neurosci.* 7, 301-308.
28. Granados-Rojas L, Larriva-Sahd J, Cintra I, Gutiérrez-Ospina G Rondán A, Aguilar A y Díaz-Cintra S. 2002. Prenatal protein malnutrition decreases hippocampal CA3 asymmetric synaptic contacts in adult rats. *Brain Res.* 933, 91-73.
29. Hebb DO. 1949. *The Organization of Behavior.* New York: Wiley.
30. Johns DR. 1995. Mitochondrial DNA and disease. *N. Engl. Med.* 333, 638-644.
31. Jordan TC, Cane SE y Howells KF. 1981. Deficits in spatial memory performance induced by early undernutrition. *Dev. Psychobiol.* 14; 317-325.
32. Kandel ER, Schwartz JH y Jessell MT. 2001. *Principios de Neurociencia.* Mc- Graw Hill Interamericana, pp 1227-1246.
33. Kirkwood BL y Shanley DP. 2005. Food restriction, evolution and ageing. *Mechanisms of ageing and development.* 126, 1011-1016.

34. Lukoyanov NV, Andrade JP, Dulce Madeira M y Paula-Barbosa MM. 1999. Effects of age and sex on the water maze performance and hippocampal cholinergic fibers in rats. *Neurosci Lett.* 269, 141-144.
35. Lukoyanov NV y Andrade JP. 2000. Behavioral effects of protein deprivation and rehabilitation in adult rats: relevance to morphological alterations in the hippocampal formation. *Behav. Brain. Res.* 112, 85-97.
36. Martínez CD, Vargas RC y Rivas AS. 2003. Estrés oxidativo y neurodegeneración. *Rev. Fac. Med.* 46, 229-235.
37. Martínez I, Quirarte GL, Díaz-Cintra S, Quiroz C y Prado-Alcalá RA. 2002. Effects of lesions of hippocampal fields CA1 and CA3 on acquisition of inhibitory avoidance. *Neuropsychobiol.* 46, 97-103.
38. Morgane PJ, Mockler DJ y Galler JR. 2002. Effects of prenatal protein malnutrition on the hippocampal formation. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 26, 471-483.
39. Morgane PJ, Miller M, Kemper T, Stern W, Forbes W, Hall, R, Bronzino J, Kissane J, Hawrylewicz E y Resnick O. 1978. The effects of protein malnutrition on the developing central nervous system in the rat. *Neurosci. Biobehav.* 2, 137-239.
40. Peters A, Sanford LP y Webster H. 1991. *The Fine Structure of the Nervous System. Neurons and Their Supporting Cells.* Oxford, New York. 3th ed. Oxford University Press Cap. 2 The neuronal cell body pp 14-48.
41. Prado-Alcalá RA. 1995. *Serial and parallel processing during memory consolidation.* En: McGaugh, JL. Bermúdez-Rattoni Fy Prado-Alcalá, RA. (Eds.) *Plasticity in the Central Nervous system. Learning and Memory.* Lawrence Erlbaum Publishers, New Jersey, pp. 57-65.
42. Prado-Alcalá RA, Quiroz RC, Garín ME, Trujillo DA, Del Guante MA, Galindo E L, Martínez I y Quirarte G. 2004. *Memoria: Consolidación y experiencia. Temas selectos de Neurociencias.* Moctezuma, VJ, Ed. UNAM-Puis, pp 127-136.

43. Rapp PR y Gallagher M. 1996. Preserved neuron number in the hippocampus of aged rats with spatial learning deficits. *Proc Natl Acad Sci.* 3, 9926- 9930.
44. Rosenzweig ES y Barnes CA. 2003. Impact of aging on hippocampal function: plasticity, network dynamics, and cognition. *Prog. Neurobiol.* 69, 143-179.
45. Scoville WB y Milner B. 1957. Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. *J Neurol. Neurosurg. Psychiatry.* 20, 11-12.
46. Shuell TJ. 1986. Cognitive conceptions of learning. *Rev. Edu. Res.* 56, 411-436.
47. Shunk DH. 1997. *Teorías del aprendizaje.* Prentice-Hall Hispanoamericana.
48. Tacconi MT, Lligoña L, Saltona M, Pitsikas N y Algeri S. 1991. Aging and food restriction: Effect on lipids of cerebral cortex. *Neurobiol Aging.* 12, 55-59.
49. Thomson RF. 2005. In search of memory traces. *Annu. Rev. Psychol.* 56; 1-23.
50. Thompson RF y Jeansok JK. 1996. Memory systems in the brain and localization of a memory. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93; 13438-13444.
51. Velasco-Feria A, Zarate- Beas C y Pinedo-Gómez U. 2004. Mecanismos de muerte celular en el Sistema Nervioso Central. En: Temas Selectos de Neurociencias III, ED. Javier Velásquez Moctezuma.
52. Yong AP, Bednarsk, E, Gall CM, Lynch G y Ribak CE. 1999. Lysosomal dysfunction results in lamina-specific meganeurite formation but not apoptosis in frontal cortex. *Exp. Neurol.* 157, 150-160.

11. ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

Figura 1. Se observa en A la ubicación del hipocampo en el cerebro del roedor y en B el dibujo de Santiago Ramón y Cajal del hipocampo y su analogía con el caballo de mar.

Página 4.

Figura 2. Corte horizontal de la formación hipocámpica, teñida con la técnica histológica de Timm's, la cuál marca el Zinc en el hipocampo permitiendo distinguir las distintas capas celulares. Figura modificada de Paxinos, 1995.

Página 5.

Figura 3. Circuito unidireccional del hipocampo del roedor. Entrada de las capas II/IV del patrón perforante de la corteza entorrinal hacia el GD y hacia las células piramidales del CA3, éstas reciben a las FM del patrón perforante provenientes de la corteza entorrinal pero de las capas II/IV. Las células piramidales del CA3 envían dos tipos de axones al CA1, cuyos axones van hacia el subiculum y de ahí hacia la corteza entorrinal lateral y medial. Esquema modificado de Bortolotto y Collingridge, 1993.

Página 7.

Figura 4. Se observa en A disminución de las ramas dendríticas en animales malnutridos durante la gestación a los 90 días de edad. En B se observa disminución de espinas dendríticas en los mismos animales. Figura modificada de Díaz-Cintra, Cintra, Galván, Aguilar, Kemper y Morgane, (1991).

Página 10.

Figura 5. Esquema de los distintos estadios por los cuales atraviesa la células tras recibir una lesión. Del lado izquierdo observamos los estadios que conlleva la necrosis; del lado derecho observamos los estadios por los que conlleva la apoptosis.

Página 12.

Figura 6. Acumulación progresiva de mitocondrias alteradas y de inclusiones de lipofuscina por el envejecimiento en células postmitóticas: A, joven, B, maduro y C, senil. Las barras indican: la intensidad de producción de ATP; la capacidad

autofagocitaria (APS); el contenido de lipofuscina (LF) y la formación de especies de oxígeno reactivo (ROS). Esquema modificado de Brunk y Terman, 2002.

Página 15.

Figura 7. Fotomicrografías de microscopia electrónica modificadas de Díaz–Cintra, Yong, Aguilar, Bi, Lynch y Ribak, (2004). Se observa la excentricidad del núcleo en A.y en B la acumulación de lisosomas y dilatación del aparato de Golgi.

Página 17.

Figura 8. Esquema de los distintos tipos de aprendizaje; asociativo (habituación y sensibilización) y el no asociativo o condicionamiento (C) clásico y operante dentro del cual se encuentra el modelo de aprendizaje de evitación (usado en el presente trabajo).

Página 19.

Figura 9. Esquema modificado de Thompson y Jeansok, 1996.

Página 24.

Tabla 1. Número de sujetos y condiciones de nutrición que fueron considerados para este estudio

Página 31.

Figura 10. Método de malnutrición postnatal.

Página 32.

Figura 11. Cámara de evitación activa

Página 34.

Figura 12. Fotomicrografía a 8,000x de una neurona piramidal del CA1 de un animal senil control. Las flechas indican las diferentes áreas que se midieron en cada neurona, para obtener el área del citoplasma se hizo la substracción del área del núcleo al área del soma.

Página 37.

Figura 13: Fotografías de cortes incluidos en resina, donde se puede observar cómo se le va dando a la preparación forma de pirámide para proceder a realizar los cortes semifinos (teñidos con azul de toluidina). Se observa la capa de células piramidales (CP), la capa molecular (CM) con las dendritas apicales (DA) del CA1.

Página 39.

Figura 14. Fotomicrografías de cortes finos a 20,000x de neuronas piramidales del CA1, se observan los organelos considerados para este estudio: lisosomas (A), mitocondrias (B), lisosomas asociados a vesículas (C) y aparato de Golgi (D)

Página 39.

Tabla 2. ANOVA de medidas repetidas para la sesión de adquisición, los valores en rojo indican diferencias significativas con una $p < 0.05$.

Página 41.

Figura 15. Medias y errores estándar de la latencia de escape ensayo por ensayo para la sesión de adquisición, nótese que el grupo joven malnutrido muestra valores más altos de latencia de escape en toda la sesión. Los grupos joven control, senil control y senil malnutrido muestran un desempeño similar a lo largo de toda la sesión. * $= p < 0.05$

Página 42.

Figura 16. Análisis *post hoc* para la sesión de adquisición. Se observa que en todos los bloques el grupo joven malnutrido muestra valores de latencia de escape significativamente mayores en comparación con los otros grupos, entre los cuales no se encuentran diferencias significativas. Cada punto muestra la media \pm el error estándar. ** $= p < 0.01$; *** $= p < 0.001$.

Página 43.

Tabla 3. ANOVA de medidas repetidas para la sesión de extinción, los valores en rojo indican diferencias significativas con una $p < 0.05$.

Página 44.

Figura 17. ANOVA de medidas repetidas para la sesión de extinción. Se observan diferencias significativas entre el grupo joven control y el grupo joven malnutrido en todos los ensayos excepto en los ensayos 4, 5, 7, 8 y 14. Cada punto indica las medias \pm errores estándar de la latencia de escape ensayo por ensayo. Nótese que el grupo malnutrido senil muestra valores más altos de latencia de escape en toda la sesión, seguido del grupo joven malnutrido aunque este presenta una recuperación espontánea en el ensayo 5. El grupo control senil presenta extinción

de la conducta a partir del ensayo 6. El grupo joven control mantiene valores de latencia de escape inferiores a los 10s en todos los ensayos con excepción del ensayo 14. * $p < 0.05$.

Página 45.

Figura 18. Análisis *post hoc* para la sesión de extinción, se observa que en todos los bloques el grupo senil malnutrido muestra valores de latencia de escape significativamente mayores en comparación con los otros grupos. El grupo control joven mantiene valores de latencia de escape por debajo de 10s en los 4 bloques. Cada barra muestra la media \pm el error estándar. **= $p < 0.01$; ***= $p < 0.001$.

Página 46.

Figura 19: Análisis factorial para el ensayo 1, el cual se tomó como ensayo de retención. Se observa que el grupo joven malnutrido es diferente significativamente en comparación con los otros 3 grupos de trabajo. **= $p < 0.01$; ***= $p < 0.001$.

Página 47.

Tabla 4. Muestra las medias \pm las desviaciones estándar de los pesos corporales de animales controles y malnutridos al momento del nacimiento, del destete, a los 90 días y a los 660 días de edad.

Página 48.

Tabla 5. Muestra las medias \pm las desviaciones estándar de los pesos cerebrales de animales controles y malnutridos a los 90 días y a los 660 días de edad.

Página 49.

Figura 20. Análisis multifactorial para la variable área del soma, el grupo joven control tiene un área del soma significativamente menor en comparación con el grupo senil malnutrido con una $p < 0.01$; el grupo senil control tiene un área significativamente menor en comparación con el grupo senil malnutrido con una $p < 0.01$. Cada barra indica la media \pm el error estándar.

Página 50.

Figura 21. Análisis multifactorial para el área del núcleo, observamos que el grupo senil control tiene un tamaño del área significativamente menor en comparación con el grupo senil malnutrido. Cada punto indica la media \pm el error estándar.

Página 50.

Figura 22. Análisis multifactorial para el área del núcleo, observamos que el grupo senil control tiene un tamaño del área significativamente menor en comparación con el grupo senil malnutrido. Cada punto indica la media \pm el error estándar.

Página 51.

Figura 23. Se muestran las medias y los errores estándar para esta variable. No se observan diferencias significativas entre los grupos.

Página 52.

Figura 24. Análisis multifactorial para la variable lisosomas asociados a vesículas. Se observa que el grupo senil malnutrido tiene un número de este organelo significativamente mayor en comparación con los otros tres grupos. * = $p < 0.05$, ** = $p < 0.01$. Cada barra indica la media \pm el error estándar.

Página 53.

Figura 25. Análisis multifactorial para la variable lisosomas, observamos que los grupos malnutridos jóvenes y seniles muestran un número de lisosomas significativamente mayor en comparación con los grupos controles jóvenes y seniles. * = $p < 0.05$, ** = $p < 0.01$. Cada barra indica la media \pm el error estándar.

Página 54.

Figura 26. Análisis multifactorial para el número de mitocondrias. El grupo senil control muestra un número significativamente menor en comparación con el senil malnutrido con una $p < 0.05$. Cada barra indica la media \pm el error estándar.

Página 55.