

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

03002 y
Leje.

UNIDAD ACADÉMICA DE LOS CICLOS PROFESIONAL Y DE
POSTGRADO DEL COLEGIO DE CIENCIAS Y HUMANIDADES
Centro de Neurobiología
Instituto de Fisiología Celular

CAMBIOS EN LA CITOARQUITECTURA DEL HIPOCAMPO
Y EN LA EJECUCION DE UNA TAREA DE APRENDIZAJE
POR EFECTO DE LA DESNUTRICION HIPOPROTEINICA.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

Doctor en Investigación Biomédica Básica
(Neurociencias)

P R E S E N T A:

M en IBB MAYRA GARCIA RUIZ

MEXICO, D. F.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

1994

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



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 está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

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



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

**UNIDAD ACADÉMICA DE LOS CICLOS PROFESIONAL Y DE
POSTGRADO DEL COLEGIO DE CIENCIAS Y HUMANIDADES**

**Centro de Neurobiología
Instituto de Fisiología Celular**

**CAMBIOS EN LA CITOARQUITECTURA DEL HIPOCAMPO
Y EN LA EJECUCION DE UNA TAREA DE APRENDIZAJE
POR EFECTO DE LA DESNUTRICION HIPOPROTEINICA.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

**Doctor en Investigación Biomédica Básica
(Neurociencias)**

P R E S E N T A:

M en IBB MAYRA GARCIA RUIZ

DIRECTOR: DRA. SOFIA DIAZ

MEXICO, D. F.

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'Sofia Diaz', written over a horizontal line.

1994

RESUMEN

En años recientes se ha resaltado la importancia de una nutrición adecuada para el desarrollo cerebral y conductual óptimo, debido a la incidencia de problemas de aprendizaje asociados a la desnutrición infantil. Por ello, en este trabajo se investigaron los efectos de la desnutrición hipoproteínica en un modelo animal (ratas macho de la cepa Sprague Dawley). Se llevaron a cabo dos tipos de análisis; uno morfométrico de las células piramidales del campo CA3 del hipocampo y otro conductual en el cual se evaluó el desempeño de los animales en la ejecución de una tarea de prevención pasiva.

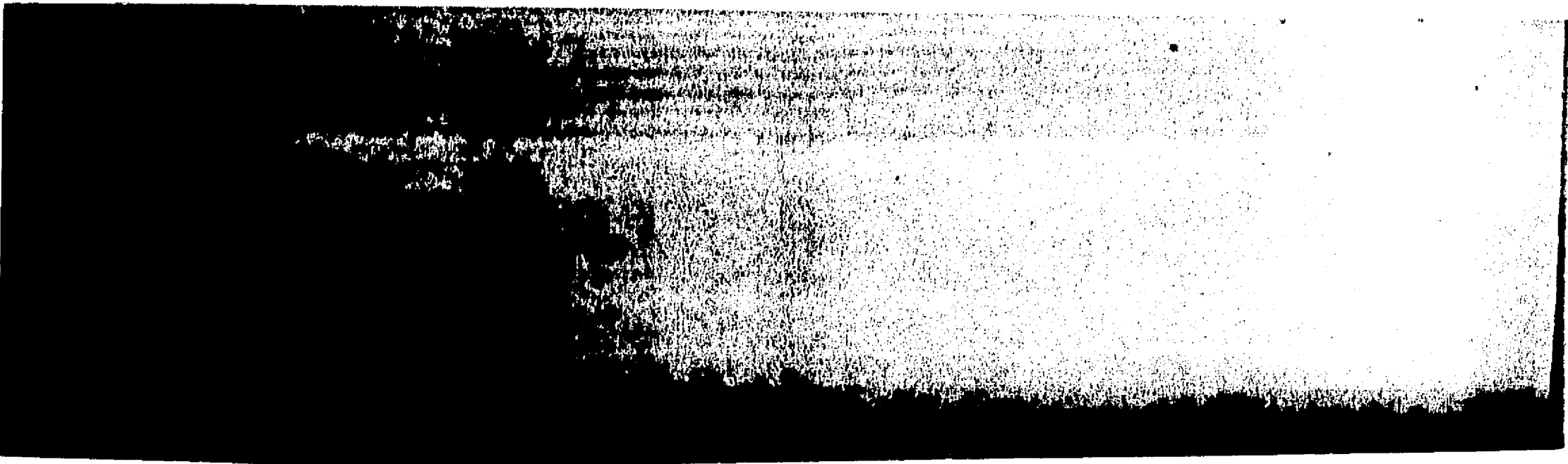
En el primero de ellos, se utilizaron 84 animales divididos en dos grupos, el desnutrido crónicamente con una dieta de 6% de caseína (constituido por ratas de 30, 90 y 220 días de edad) y el desnutrido durante el período prenatal y rehabilitado a partir del nacimiento con una dieta de 25% de caseína (constituido por ratas de 15, 30, 90 y 220 días de edad). En el análisis conductual se utilizaron 60 animales divididos de la misma manera que los anteriores, excepto que sólo se trabajó con dos edades (30 y 90 días).

En el estudio neuroanatómico los animales fueron perfundidos por vía intracardiaca y los cerebros obtenidos, fueron procesados con la técnica de Golgi-rápido. Se seleccionaron las células piramidales del campo CA3 mejor impregnadas, y en ellas se realizó el análisis morfométrico -con la ayuda de un procesamiento digital de imágenes- del tamaño del soma, longitud y diámetro de la dendrita apical (el diámetro se midió sólo en los experimentos de desnutrición crónica), número de ramificaciones dendríticas y el área de excrescencias, así como la densidad, longitud y diámetro de la cabeza de las espinas dendríticas (longitud y diámetro de las espinas fueron medidos en el caso de la desnutrición crónica únicamente) de las células piramidales.

En el estudio conductual, los animales fueron sometidos a un paradigma de prevención pasiva, en el cual se registro la adquisición y retención (a diferentes intervalos) de la conducta de evitación.

Los resultados mostraron que, en las células piramidales del campo CA3, la desnutrición hipoproteínica crónica produce: reducciones significativas en el tamaño del soma y el área de excrescencias a los 220 días de edad, en el diámetro de la dendrita apical a los 30 y 90 días de edad y en la densidad y diámetro de la cabeza de las espinas, en las 3 edades estudiadas; e incrementos significativos en las ramificaciones dendríticas apicales y en la longitud de las espinas dendríticas, a los 30 días.

El análisis de los efectos de la desnutrición únicamente prenatal seguida de la rehabilitación nutricional postnatal en las mismas células piramidales mostró, en algunos casos, reducciones significativas en el tamaño del soma (a los 220 días de edad), en la longitud de la dendrita apical (a los 15 días), en las ramificaciones apicales (a los 15 días) y basales (a los 15, 90 y 220 días) y en la densidad de espinas



dendríticas en las 4 edades estudiadas -aunque en este caso las reducciones no fueron tan severas como aquellas de la desnutrición crónica- y, en otros al igual que en la desnutrición crónica, incrementos en las ramificaciones apicales -sólo que en edades diferentes- a los 90 y 220 días para el caso de los rehabilitados.

Estos resultados indican en conjunto que tanto la desnutrición crónica como la prenatal producen efectos diferentes en las células CA3 del hipocampo que se pueden seguir observando a largo plazo. Asimismo, es de notar que estos efectos son altamente dependientes de la edad de los animales y del período en el cual se instala la privación nutricional.

Cuando fueron comparados los efectos de la desnutrición crónica con aquellos de la prenatal, se observó que en el caso de algunos de los parámetros medidos (e.g., ramificaciones apicales y área de excrescencias) y en animales de ciertas edades (e.g., 30 y 220 días) la rehabilitación nutricional postnatal parece compensar el daño provocado por la desnutrición prenatal.

Por otra parte, los estudios conductuales mostraron que los animales de 30 días desnutridos crónicamente no fueron capaces de evitar de manera eficiente el estímulo nocivo (un choque eléctrico) en ninguna de las tres pruebas de retención de la tarea aprendida, i.e., no pudieron recordar el castigo al cual habían sido sometidos, lo que indica que la desnutrición crónica deteriora los procesos de aprendizaje y memoria, de los animales jóvenes. Por el contrario, la desnutrición durante el período prenatal no produjo diferencias significativas con respecto al grupo control en ninguna de las dos edades estudiadas, lo que sugiere que la rehabilitación nutricional postnatal es una buena alternativa para compensar el daño provocado por la desnutrición prenatal, hecho que se correlaciona bien con los resultados neuroanatómicos de este estudio.

ABSTRACT

The importance of an adequate nutrition for an optimum brain and behavioral development is already known. The effects of the infantile malnutrition could be associated to problems of learning. Thus, in the present work we investigated the effects of the hypoprotein malnutrition in an animal model (male rats of Sprague-Dawley strain). Two types of analysis were carried out; one morphometric of the CA3 hippocampal pyramidal cells and the other behavioral, in which it was evaluated the animals performance in a passive prevention task.

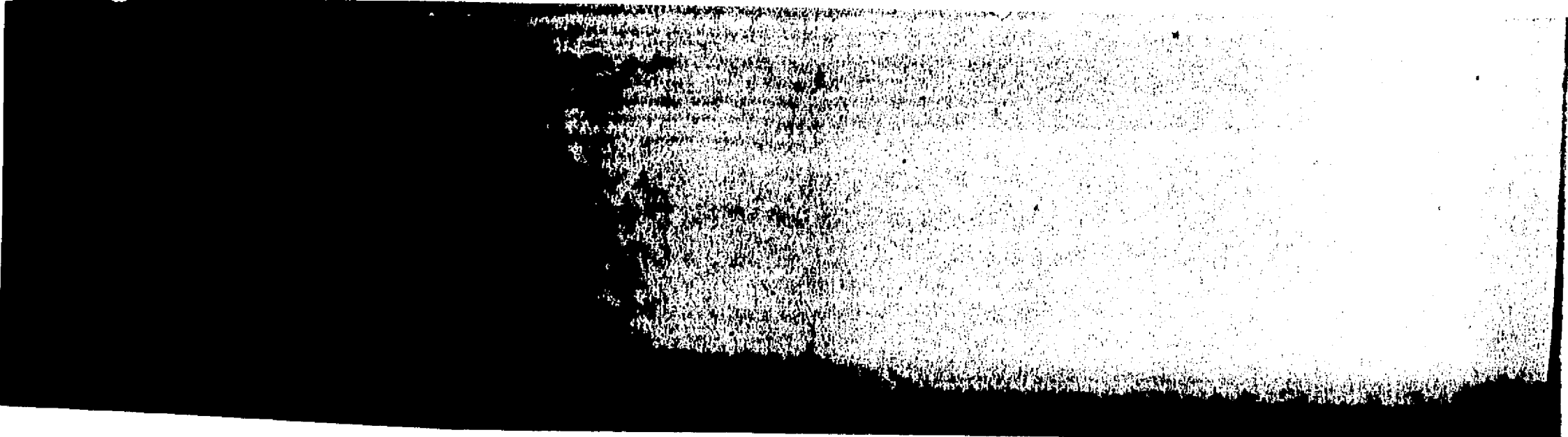
For the first analysis, we used 84 animals divided in two groups, the first one (constituted by rats of 30, 90 220 days old) was under conditions of chronic malnutrition with a 6% casein diet, and in the other (which was constituted by rats of 15, 30, 90 220 days of age) the malnutrition was settled during the prenatal period and rehabilitated at birth with a 25% casein diet. For the behavioral study, we used 60 animals which were divided in the same way than in the anatomical study, but the experiments were only made with rats of two ages (30 and 90 days).

In the neuroanatomic study the animals were perfused, and the brains were processed, using the rapid Golgi method. From each histological section, CA3 complete and well-impregnated pyramidal cells were selected, and the morphometric analysis of the size of the soma, length and diameter of the apical dendrite (diameter was only measured under conditions of chronic malnutrition), number of dendritic branching and the thorny excrescence area, as well as the density, length and head diameter of synaptic spines -with the assistance of the imaging system- was carried out (length and head diameter were only measured under conditions of chronic malnutrition).

In the behavioral study, the rats were tested using the passive prevention paradigm, in which the acquisition and retention of the avoidance behavior were registered (at different intervals).

The results showed that, in the CA3 pyramidal cells, the chronic malnutrition produces: significant reductions in the somal size and the thorny excrescences area at the 220 days old, in the diameter of the apical dendrite at the 30 and 90 days of age and in the density and head synaptic spines, in the 3 ages studied; and significant increases in the apical dendritic branching and in the length of the dendritic thorns, at 30 days.

The analysis of the effect of prenatal malnutrition followed by postnatal nutritional rehabilitation in the CA3 pyramidal cells showed, in some cases, significant reductions in the somal size (at the 220 days old), in the length of apical dendrite (at the 15 days), in the apical (at the 15 days) and basal dendritic branching (at the 15, 90 220 days), and in the density of dendritic spines in the 4 ages studied (although the reductions were lesser severe than in chronic malnutrition), and in the others, increases in the apical dendritic branching at 90 and 220 days.



Taking together these results indicate that the chronic as well as the prenatal malnutrition produce differential effects in the CA3 hippocampal pyramidal cells and those can be observed at long-term. In like manner, it is noteworthy that these effects depend on the age of the animals and the period in which is settled the nutritional deprivation.

When the effects of chronic malnutrition were compared with those of prenatal deprivation, it was observed that in some of the measured parameters (e.g., apical dendritic branching and thorny excrescence area) and for some ages (e.g., 30 and 220 days) the postnatal nutritional rehabilitation seems to compensate the prenatal malnutrition damage.

The behavioral studies showed that the malnourished animals of 30 days were not able to avoid efficiently the noxious stimulus (an electric shock) in any of the three retention tests of the learned task, i.e., the rats could not remember the punishment received. These results indicate that the chronic malnutrition deteriorates the learning and memory processes of the young animals. The rehabilitated animals did not show significant differences compared to the controls in the two ages studied, which suggests that postnatal nutritional rehabilitation is a good alternative in order to compensate the damage provoked by prenatal malnutrition, a fact that is correlated with the neuroanatomic findings of this study.

Si de noche lloras por el sol, no verás las estrellas

Rabindranaz Tagore

A mi madre, por estar conmigo en todo momento

A mi esposo, por brindarme lo más valioso que posees, tu amor.

A mi hermana, a mi cuñado y a mis sobrinos por su gran apoyo y cariño

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Sofía Díaz-Cintra por permitirme ser parte de su grupo de investigación y por su valiosa dirección.

A los miembros del jurado: Dr. Raúl Aguilar, Dr. Alfonso Cárabez, Dr. Augusto Fernández-Guardiola, Dra. Herminia Pasantes, Dr. Roberto Prado y Dr. Ricardo Tapia, por sus invaluable observaciones y críticas a este trabajo.

Parte del análisis morfométrico de este trabajo fue realizado en el laboratorio del Dr. Gabriel Corkidi, gracias por tu apoyo y tu amistad.

La parte conductual de este trabajo fue realizada en el laboratorio del Dr. Roberto Prado Alcalá con la colaboración de la M en C Gina Quirarte, muchísimas gracias a los dos por su gran apoyo, comprensión y confianza, y sobre todo por su amistad.

Al Dr. Manuel Salas por haber seguido este trabajo tan de cerca y por sus valiosos comentarios y recomendaciones.

Al Dr. León Cintra por su apoyo y comprensión.

A la Biol. Leticia Parra por su paciencia y su amistad.

A todos mis compañeros y amigos del laboratorio, por todo lo que hemos compartido.

A la Biol. Azucena Aguilar y al M en C Agustín Galván por su asistencia técnica.

A la DGAPA por haberme otorgado una beca para la realización de esta investigación.

Al Centro de Neurobiología por las facilidades prestadas para la realización de este trabajo.

CONTENIDO

RESUMEN	4
ORGANIZACION DE LA TESIS	8
PARTE I:	
INTRODUCCION	10
I. EL HIPOCAMPO	11
I.1. Localización	12
I.2. Anatomía	12
I.3. Conexiones	15
I.3.1. Aferentes	15
I.3.2. Eferentes	15
I.3.3. Conexiones intrínsecas	16
I.4. Ontogenia	17
II. EL HIPOCAMPO, EL APRENDIZAJE Y LA MEMORIA	18
III. EFECTOS PRODUCIDOS POR LA DESNUTRICION	20
OBJETIVOS	24
PARTE II:	
EFFECT OF PROTEIN MALNUTRITION ON CA3 HIPPOCAMPAL PYRAMIDAL CELLS IN RATS OF THREE AGES	26
PARTE III:	
EFFECTS OF PRENATAL MALNUTRITION AND POSTNATAL NUTRITIONAL REHABILITATION ON CA3 HIPPOCAMPAL PYRAMIDAL CELLS IN RATS OF FOUR AGES	37

PARTE IV:	
LOS EFECTOS DE LA DESNUTRICION EN LOS PROCESOS DE APRENDIZAJE Y MEMORIA EN MODELOS ANIMALES	69
PARTE V:	
EFECTOS DE LA DESNUTRICION HIPOPROTEINICA EN LA EJECUCION DE UNA TAREA DE PREVENCION PASIVA	109
PARTE VI:	
DISCUSION GENERAL Y CONCLUSIONES	123
BIBLIOGRAFIA GENERAL	126

RESUMEN

En años recientes se ha resaltado la importancia de una nutrición adecuada para el desarrollo cerebral y conductual óptimo, debido a la incidencia de problemas de aprendizaje asociados a la desnutrición infantil. Por ello, en este trabajo se investigaron los efectos de la desnutrición hipoproteínica en un modelo animal (ratas macho de la cepa Sprague Dawley). Se llevaron a cabo dos tipos de análisis; uno morfométrico de las células piramidales del campo CA3 del hipocampo y otro conductual en el cual se evaluó el desempeño de los animales en la ejecución de una tarea de prevención pasiva.

En el primero de ellos, se utilizaron 84 animales divididos en dos grupos, el desnutrido crónicamente con una dieta de 6% de caseína (constituido por ratas de 30, 90 y 220 días de edad) y el desnutrido durante el período prenatal y rehabilitado a partir del nacimiento con una dieta de 25% de caseína (constituido por ratas de 15, 30, 90 y 220 días de edad). En el análisis conductual se utilizaron 60 animales divididos de la misma manera que los anteriores, excepto que sólo se trabajó con dos edades (30 y 90 días).

En el estudio neuroanatómico los animales fueron perfundidos por vía intracardiaca y los cerebros obtenidos, fueron procesados con la técnica de Golgi-rápido. Se seleccionaron las células piramidales del campo CA3 mejor impregnadas, y en ellas se realizó el análisis morfométrico -con la ayuda de un procesamiento digital de imágenes- del tamaño del soma, longitud y diámetro de la dendrita apical (el diámetro se midió sólo en los experimentos de desnutrición crónica), número de ramificaciones dendríticas y el área de excrecencias, así como la densidad, longitud y diámetro de la cabeza de las espinas dendríticas (longitud y diámetro de las espinas fueron medidos en el caso de la desnutrición crónica únicamente) de las células piramidales.

En el estudio conductual, los animales fueron sometidos a un paradigma de prevención pasiva, en el cual se registro la adquisición y retención (a diferentes intervalos) de la conducta de evitación.

Los resultados mostraron que, en las células piramidales del campo CA3, la desnutrición hipoproteínica crónica produce: reducciones significativas en el tamaño del soma y el área de excrecencias a los 220 días de edad, en el diámetro de la dendrita apical a los 30 y 90 días de edad y en la densidad y diámetro de la cabeza de las espinas, en las 3 edades estudiadas; e incrementos significativos en las ramificaciones dendríticas apicales y en la longitud de las espinas dendríticas, a los 30 días.

El análisis de los efectos de la desnutrición únicamente prenatal seguida de la rehabilitación nutricional postnatal en las mismas células piramidales mostró, en algunos casos, reducciones significativas en el tamaño del soma (a los 220 días de edad), en la longitud de la dendrita apical (a los 15 días), en las ramificaciones apicales (a los 15 días) y basales (a los 15, 90 y 220 días) y en la densidad de espinas

dendríticas en las 4 edades estudiadas -aunque en este caso las reducciones no fueron tan severas como aquellas de la desnutrición crónica- y, en otros al igual que en la desnutrición crónica, incrementos en las ramificaciones apicales -sólo que en edades diferentes- a los 90 y 220 días para el caso de los rehabilitados.

Estos resultados indican en conjunto que tanto la desnutrición crónica como la prenatal producen efectos diferentes en las células CA3 del hipocampo que se pueden seguir observando a largo plazo. Asimismo, es de notar que estos efectos son altamente dependientes de la edad de los animales y del período en el cual se instala la privación nutricional.

Cuando fueron comparados los efectos de la desnutrición crónica con aquellos de la prenatal, se observó que en el caso de algunos de los parámetros medidos (e.g., ramificaciones apicales y área de excrescencias) y en animales de ciertas edades (e.g., 30 y 220 días) la rehabilitación nutricional postnatal parece compensar el daño provocado por la desnutrición prenatal.

Por otra parte, los estudios conductuales mostraron que los animales de 30 días desnutridos crónicamente no fueron capaces de evitar de manera eficiente el estímulo nocivo (un choque eléctrico) en ninguna de las tres pruebas de retención de la tarea aprendida, i.e., no pudieron recordar el castigo al cual habían sido sometidos, lo que indica que la desnutrición crónica deteriora los procesos de aprendizaje y memoria, de los animales jóvenes. Por el contrario, la desnutrición durante el período prenatal no produjo diferencias significativas con respecto al grupo control en ninguna de las dos edades estudiadas, lo que sugiere que la rehabilitación nutricional postnatal es una buena alternativa para compensar el daño provocado por la desnutrición prenatal, hecho que se correlaciona bien con los resultados neuroanatómicos de este estudio.

ABSTRACT

The importance of an adequate nutrition for an optimum brain and behavioral development is already known. The effects of the infantile malnutrition could be associated to problems of learning. Thus, in the present work we investigated the effects of the hipoprotein malnutrition in an animal model (male rats of Sprague-Dawley strain). Two types of analysis were carried out; one morphometric of the CA3 hippocampal pyramidal cells and the other behavioral, in which it was evaluated the animals performance in a passive prevention task.

For the first analysis, we used 84 animals divided in two groups, the first one (constituted by rats of 30, 90 220 days old) was under conditions of chronic malnutrition with a 6% casein diet, and in the other (which was constituted by rats of 15, 30, 90 220 days of age) the malnutrition was settled during the prenatal period and rehabilitated at birth with a 25% casein diet. For the behavioral study, we used 60 animals which were divided in the same way than in the anatomical study, but the experiments were only made with rats of two ages (30 and 90 days).

In the neuroanatomic study the animals were perfused, and the brains were processed, using the rapid Golgi method. From each histological section, CA3 complete and well-impregnated pyramidal cells were selected, and the morphometric analysis of the size of the soma, length and diameter of the apical dendrite (diameter was only measured under conditions of chronic malnutrition), number of dendritic branching and the thorny excrescence area, as well as the density, length and head diameter of synaptic spines -with the assistance of the imaging system- was carried out (length and head diameter were only measured under conditions of chronic malnutrition).

In the behavioral study, the rats were tested using the passive prevention paradigm, in which the acquisition and retention of the avoidance behavior were registered (at different intervals).

The results showed that, in the CA3 pyramidal cells, the chronic malnutrition produces: significant reductions in the somal size and the thorny excrescences area at the 220 days old, in the diameter of the apical dendrite at the 30 and 90 days of age and in the density and head synaptic spines, in the 3 ages studied; and significant increases in the apical dendritic branching and in the length of the dendritic thorns, at 30 days.

The analysis of the effect of prenatal malnutrition followed by postnatal nutritional rehabilitation in the CA3 pyramidal cells showed, in some cases, significant reductions in the somal size (at the 220 days old), in the length of apical dendrite (at the 15 days), in the apical (at the 15 days) and basal dendritic branching (at the 15, 90 220 days), and in the density of dendritic spines in the 4 ages studied (although the reductions were lesser severe than in chronic malnutrition), and in the others, increases in the apical dendritic branching at 90 and 220 days.

Taking together these results indicate that the chronic as well as the prenatal malnutrition produce differential effects in the CA3 hippocampal pyramidal cells and those can be observed at long-term. In like manner, it is noteworthy that these effects depend on the age of the animals and the period in which is settled the nutritional deprivation.

When the effects of chronic malnutrition were compared with those of prenatal deprivation, it was observed that in some of the measured parameters (e.g., apical dendritic branching and thorny excrescence area) and for some ages (e.g., 30 and 220 days) the postnatal nutritional rehabilitation seems to compensate the prenatal malnutrition damage.

The behavioral studies showed that the malnourished animals of 30 days were not able to avoid efficiently the noxious stimulus (an electric shock) in any of the three retention tests of the learned task, i.e., the rats could not remember the punishment received. These results indicate that the chronic malnutrition deteriorates the learning and memory processes of the young animals. The rehabilitated animals did not show significant differences compared to the controls in the two ages studied, which suggests that postnatal nutritional rehabilitation is a good alternative in order to compensate the damage provoked by prenatal malnutrition, a fact that is correlated with the neuroanatomic findings of this study.

ORGANIZACION DE LA TESIS

En la primera parte de este trabajo se presenta una introducción en la que se abordan conceptos generales sobre la anatomía del hipocampo, su relación con los procesos de aprendizaje y memoria y los efectos producidos por la desnutrición, inmediatamente después se presentan los objetivos de esta tesis. Las segunda y tercera partes se refieren a dos artículos, el primero de ellos (parte II) contiene la información y los resultados correspondientes al efecto de la desnutrición hipoproteínica crónica en las células piramidales del campo CA3 del hipocampo, publicado en la revista Brain Research y el segundo (parte III), enviado a la misma revista, contiene los resultados referentes al efecto de la desnutrición prenatal con énfasis en la rehabilitación nutricional postnatal en estas mismas células. En la cuarta parte se presenta un artículo de revisión que contiene información sobre los efectos de la desnutrición en el comportamiento y especialmente en el aprendizaje, mismo que se encuentra aceptado para su publicación en la Revista Biomédica. En la quinta parte se describen los experimentos realizados sobre el efecto de la desnutrición crónica y la rehabilitación nutricional postnatal en la ejecución de una tarea de prevención pasiva. Finalmente, en la sexta parte se presenta la discusión general y las conclusiones emanadas de todo el trabajo de investigación realizado.

PARTE I

INTRODUCCION

Para que un organismo se desarrolle adecuadamente, es necesario que mantenga una interacción equilibrada tanto con su medio ambiente externo como con su medio interno. De igual forma para que el sistema nervioso central (SNC) se desarrolle normalmente debe haber un equilibrio entre los factores intrínsecos, que son regulados por un programa genético, y los factores extrínsecos ambientales. Sin embargo, en los últimos años, se ha visto que este desarrollo es extremadamente vulnerable a diversas alteraciones medio ambientales, sobre todo cuando se producen durante el período crítico, i.e., el período en el cual se producen los picos máximos de crecimiento, diferenciación y maduración celular (Dobbing y Sands, 1971 y 1973). Una de las alteraciones que provoca efectos más drásticos en el desarrollo del SNC es la desnutrición (Leuba y Rabinowicz, 1979a y b; Morgane y col., 1978 y 1993).

El estudio de la desnutrición es importante, debido a que esta alteración provoca daños cerebrales que traen como consecuencia que los individuos adultos presenten una actividad mental subnormal y, dependiendo en que etapa del desarrollo se presente, el daño puede o no ser reversible. Además, la desnutrición es uno de los mayores problemas que existen no sólo en países subdesarrollados, sino también en los países del primer mundo.

Por otra parte, en investigaciones previas (Morgane y col., 1978; 1993) se ha mostrado que el grado de degeneración cerebral está relacionado con la deficiencia en proteínas; empero, las diferentes alteraciones asociadas a esta deficiencia no están completamente determinadas. En los años 70's se obtuvieron algunos datos (Dobbing y Sands, 1971; Morgane y col., 1978; Leuba y Rabinowicz, 1979a y b) que sugieren que los efectos más drásticos son causados cuando una desnutrición severa ocurre, en el caso de la rata, durante el período previo al nacimiento y durante en la época de lactancia, tiempos en los cuales se presenta el período crítico del desarrollo del cerebro. Estos datos se han tratado de correlacionar con los períodos críticos que se presentan en los seres humanos, los cuales ocurren durante la vida fetal y los primeros dos años de vida.

Debido a que los efectos de la desnutrición no son los mismos en las diferentes estructuras del SNC, se han llevado a cabo diversos estudios experimentales (i.e., anatómicos, electrofisiológicos, bioquímicos, etc.; Morgane y col., 1978; Díaz-Cintra y col., 1981; 1990; 1991; Cintra y col., 1990, entre otros) en algunas regiones cerebrales, tales como la corteza visual, los núcleos aminérgicos del tallo cerebral (i.e., el locus coeruleus y el rafe dorsal) y el giro dentado del hipocampo, con el objeto de determinar de manera más específica el daño provocado por la desnutrición. Con base en estos estudios, se ha visto que una de las estructuras que, por su organización neuronal regular, puede producir mayor información acerca de la fisiología sináptica del cerebro del mamífero, es el hipocampo.

El hipocampo es una estructura que forma parte del sistema límbico y que ha sido implicado como uno de los sustratos de los procesos de aprendizaje y memoria (Barnes, 1988; Eichenbaum y col., 1992; Jarrard, 1993; Morris y col., 1982; Olton y col., 1978; Scoville y Milner, 1957; Sherry y col., 1992; Squire, y Zola-Morgan, 1988). Una vez que fue reconocida la participación del hipocampo en estos procesos, se llevaron a cabo diversos estudios conductuales para probar las habilidades de aprendizaje de los animales desnutridos. Algunos de éstos proporcionaron evidencias de que la desnutrición produce deficiencias en la ejecución de ciertas tareas realizadas por los organismos, tales como el encontrar una recompensa apetitiva en un laberinto o bien encontrar una plataforma en un tanque con agua (Goodlett y col., 1986; Laughlin y col., 1984; Levitsky y Barnes, 1970; Tonkiss and Galler, 1990). Sin embargo, otros grupos de investigación no confirmaron estos resultados (Bedi, 1992; Campbell y Bedi, 1989; Castro y Rudy, 1987; Cravens, 1976; Hall, 1983; Smart, 1976).

I. EL HIPOCAMPO

Arantius en 1587 introdujo el término de hipocampo porque la estructura recordaba la imagen de un caballo de mar o hipocampo, también mencionó que la estructura sugería, la forma de un gusano de seda. Arantius fue muy criticado por los anatomistas de esa época, debido a que consideraron que esa descripción no era muy clara (Rosene y van Hoesen, 1991).

Posteriormente, Diemerbroeck en 1672 describió la misma estructura como "pedes hippocampi" o pies del hipocampo, la cual tampoco fue muy aceptada. Aparentemente, la primera ilustración clara del hipocampo fue publicada en 1729 por Duveroni. Más tarde, Winslow en 1732 describió la estructura que se encuentra en el piso del cuerno inferior del ventrículo lateral como "el cuerno de un carnero". En 1742 Garengot describió este cuerno de carnero como "Los cuernos de Ammon" un dios egipcio al que se le describía con cuernos (Rosene y van Hoesen, 1991).

Estas últimas descripciones no resultaron ser más claras que la de Arantius. Sin embargo, los diferentes términos propuestos para describir esta estructura se han quedado como sinónimos de esta parte del cerebro y en especial el término *hipocampo* llegó a ser aceptado en la Nomina Anatomica para referirse a la protuberancia que se localiza en el piso del asta inferior del ventrículo lateral (Rosene y van Hoesen, 1991) y ahora es usado para referirse al giro dentado y a los campos de células piramidales excepto el subículo (Amaral y Witter, 1989); el término *cuernos de Ammon* se utiliza para referirse a todos los campos de células piramidales, sin incluir al giro dentado ni al subículo (también a esta parte se le llama el hipocampo propio), mismos que Ramón y Cajal (1893) llamó regio inferior y regio superior y Lorente de Nó en 1934 dividió en cuatro subcampos: CA1, CA2, CA3 y CA4 (Rosene y van Hoesen, 1991).

Ahora bien, como ninguno de los términos anteriores incluía ni al subículo ni a la corteza entorrinal surgieron dos términos más: a) *formación hipocámpica* que incluye al hipocampo propio, al giro dentado y al subículo con sus diferentes divisiones (i.e., presubículo, parasubículo y el propio subículo) y b) *región hipocámpica* que incluye además de las partes anteriores, a la corteza entorrinal (Amaral y Witter, 1989; Brodal, 1992).

1.1. Localización

La formación hipocámpica en el hombre se ubica bilateralmente en la parte dorsomedial de los hemisferios cerebrales, cuyos límites se extienden desde el agujero interventricular hasta la parte rostral de la prolongación temporal del ventrículo lateral (López-Antunez, 1986).

En la rata la formación hipocámpica se extiende rostralmente desde la región septal hasta la parte temporal de la corteza cerebral, ocupando la mayor parte de su pared ventromedial y se prolonga temporalmente hasta el ventrículo lateral (Braitenberg y Schüz, 1983; Fig. I.1).

1.2. Anatomía

Tanto en el hombre como en la rata, la región hipocámpica puede dividirse en 4 subregiones que se encuentran en las partes medial y ventral de la fisura rinal: a) área entorrinal, b) complejo subicular, c) cuerno de Ammon (campos CA1 a CA4 según Lorente de Nó) o regio superior (que corresponde a los campos CA1 y CA2) y regio inferior (que corresponde a los campos CA3 y CA4) según Ramón y Cajal (1893) y d) giro dentado (Brodal, 1992; Rosene y van Hoesen, 1991).

Además de estas subregiones, en el hipocampo se considera la distribución de plexos y dendritas organizados como: 1) El *Stratum Moleculare*.- es la zona más externa del hipocampo; contiene fibras nerviosas provenientes de las células piramidales y del subículo, además de pocas células; 2) El *Stratum lacunosum*.- contiene un gran número de fibras provenientes del regio inferior que llegan al subículo y células espaciadas de manera irregular; 3) El *Stratum radiatum*.- se encuentra entre los estratos lacunoso y piramidal, contiene un número menor de células que el estrato lacunoso y contiene diferentes sistemas de fibras; 4) El *Stratum pyramidale*.- contiene 3 o 4 capas de células piramidales empaquetadas; 5) El *Stratum oriens*.- se encuentra entre el estrato piramidal y el *alveus*, contiene las dendritas basales de las células piramidales y algunas células polimórficas; 6) El *Alveus*.- en su mayor parte está compuesto de sustancia blanca, i.e., axones provenientes de las células piramidales más profundas y contiene algunas células polimórficas (Ramón y Cajal, 1893; Fig. I.2)

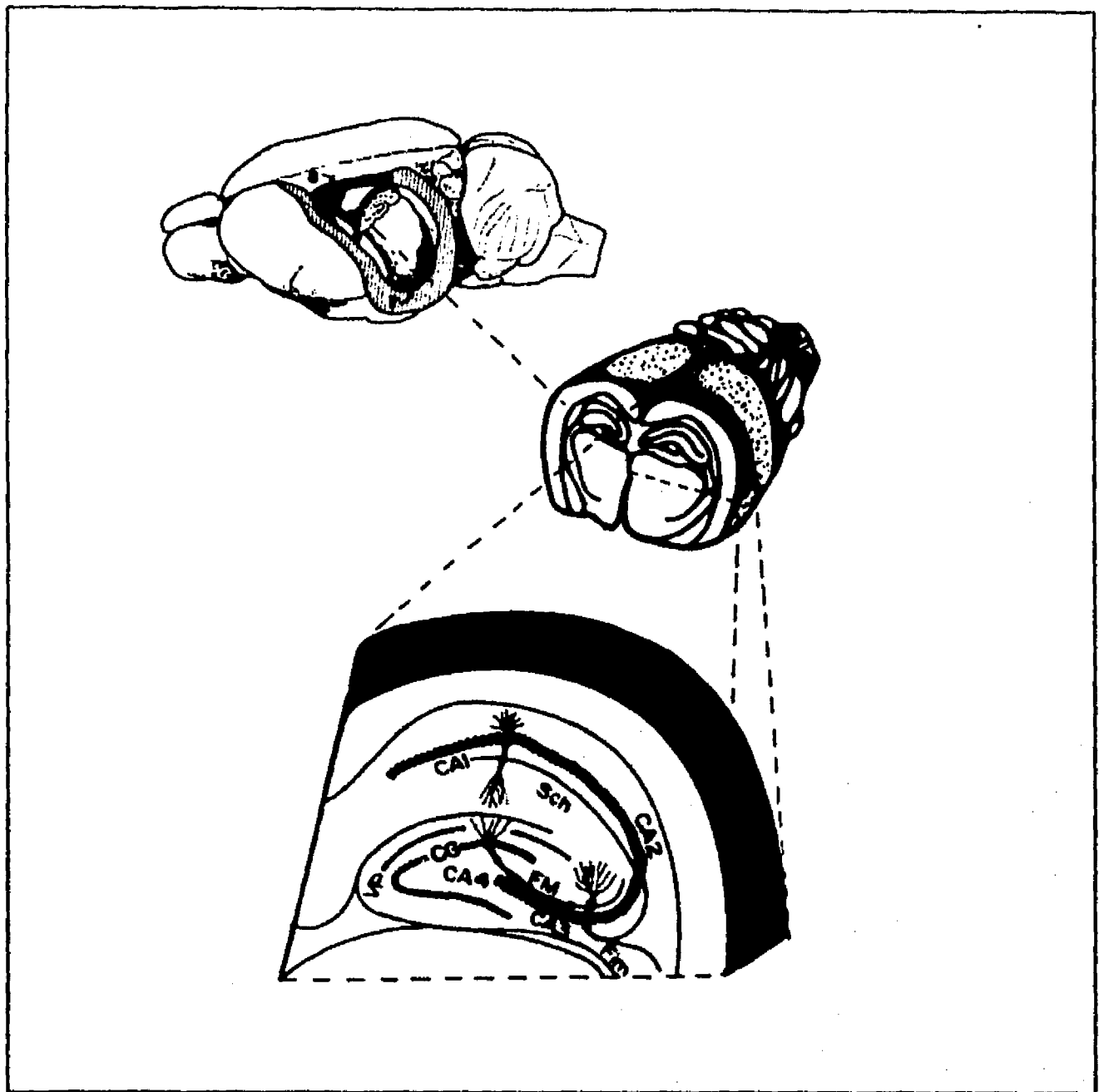


Fig. 1.1. Esquema que muestra en un corte frontal la localización del hipocampo en el cerebro de la rata desde un plano septo-temporal (S, T); sus diferentes divisiones y sus tipos celulares. En esta figura también se muestran el circuito principal de la formación hipocámpal que va desde la vía perforante (VP) hasta los campos de Ammon CA1, CA2, CA3 y CA4 compuestos de células piramidales; CG: células granulares del giro dentado; Fim: fimbria; FM: fibras musgosas; Sch: colaterales de Schaffer.

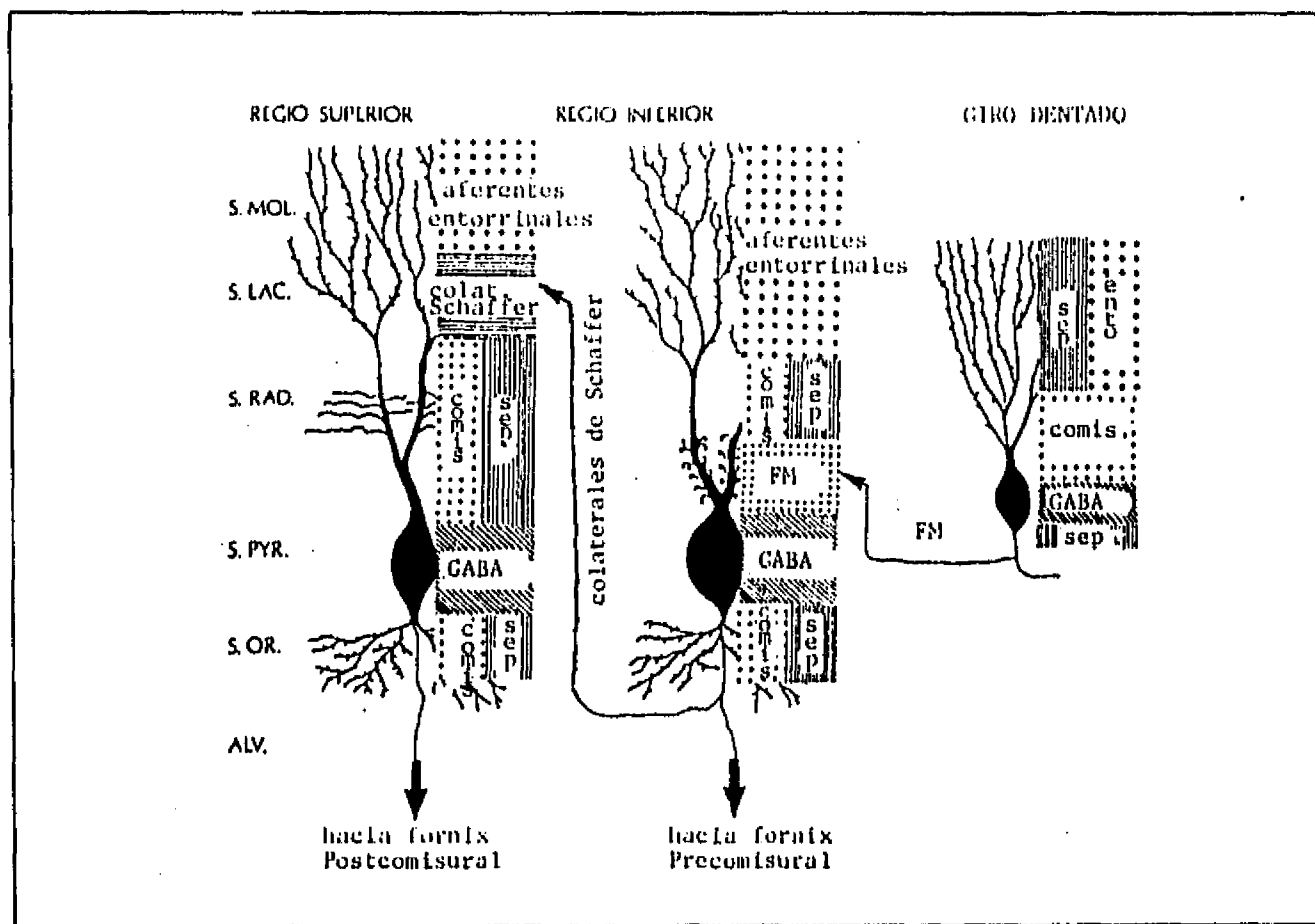


Fig. 1.2 Esquema que muestra los diferentes estratos del hipocampo descritos por Ramón y Cajal en 1893, comis.: fibras comisurales; FM: fibras musgosas; GABA: terminales gabaérgicas; sep.: fibras septales (modificado de Altman y col., 1973).

La citoarquitectura del hipocampo está formada por 4 tipos celulares: 1.- Las células piramidales de las regiones CA1 a CA4 (en la rata se encuentran aproximadamente 800,000 de éstas, de las cuales aproximadamente 330,000 corresponden a las neuronas CA3, 420,000 a las neuronas CA1 -Boss y col., 1987-, 12,390 a las neuronas de CA2 -Cassell, 1980- y el resto corresponde a las neuronas de CA4 -Amaral y col., 1990-). Fitch y col. (1989) mostraron que la forma de las células piramidales varía con respecto a su localización en el estrato piramidale. Estos autores identificaron 2 subtipos: a) neuronas de árbol dendrítico corto que tienden a ubicarse en la parte superior de la capa piramidale, con una dendrita apical corta, abundantes espinas dendríticas y las arborizaciones apical y basal muy ramificadas y b) neuronas de árbol dendrítico largo, ubicadas en la parte inferior de la capa, con una dendrita apical larga cuyas espinas son escasas y las arborizaciones apical y basal son menos ramificadas. 2.- Células granulares del giro dentado (aproximadamente 1,000,000 células; -Boss y col., 1985-), las cuales se encuentran empaquetadas en una capa delgada y sus dendritas ascienden hacia la capa molecular. 3.- Células de la región hilar (aproximadamente 32 500 células -Seress, 1988-), de las cuales las

células musgosas es el tipo más frecuentemente encontrado (Amaral, 1978). Buckmaster y col. (1993) describieron dos subtipos de células musgosas: a) las células musgosas multipolares que poseen somas triangulares o poligonales y sus dendritas proyectan radialmente desde el soma, y b) las células fusiformes que poseen somas redondos o en forma de huso y sus dendritas se extienden desde cualquier lado del soma. Y 4.- *Células gabaérgicas*, las cuales son de diferentes formas y tamaños y se localizan en todo el hipocampo; Seress y Pokorny (1981) han descrito más de 20 subtipos de éstas, sólo en la región hiliar.

1.3. Conexiones

1.3.1. Aferentes

El hipocampo es una estructura bilateral que recibe información de diferentes regiones: la corteza entorrinal, la región septal, la corteza del cíngulo, el núcleo del raphe dorsal, el locus coeruleus y del hipocampo contralateral. La corteza entorrinal es la principal fuente de aferentes al hipocampo al que llegan a través de la vía perforante y se distribuyen en los estratos lacunoso y molecular (Amaral y Witter, 1989). La vía perforante ha sido dividida en dos componentes, uno medial y otro lateral provenientes de las mismas áreas lateral y medial de la corteza entorrinal. Ambas tienen sinapsis excitadoras y constituyen el 85% del total de las sinapsis que recibe el hipocampo (Nafstad, 1967; Matthew y col., 1976). Además, el hipocampo recibe información de la región septal a través del fornix (De Vito y White, 1966); esta conexión es colinérgica y juega un papel importante en la modulación del patrón de disparo de las células hipocámpicas en respuesta a la información específica proveniente de la corteza entorrinal (Brodal, 1992). Las fibras de la corteza del cíngulo llevan información hacia los campos del cuerno de Ammon y hacia gran parte del subículo (White y col., 1960). Otras aferentes provienen de los núcleos aminérgicos del raphe dorsal y locus coeruleus; estas aferencias parecen tener también, un efecto modulador en las células del hipocampo, ya que se tienen evidencias de que el incremento en la eficacia sináptica de las células hipocámpicas producida por una estimulación repetida es reducida por antagonistas aminérgicos (Brodal, 1992). Finalmente, la comunicación intrahipocámpica se lleva a cabo a través de las fibras de asociación y comisurales (Swanson y col., 1978).

1.3.1. Eferentes

El hipocampo transmite información a través del fornix que está formado por los axones de las células piramidales y en una pequeña proporción por los axones de las células del giro dentado. Las fibras pasan primero a la fimbria, al llegar a la parte caudal del hipocampo (debajo del esplenio del cuerpo calloso), la mayor parte de las fibras pasan a las columnas posteriores del fornix, un pequeño número cruza en la comisura hipocámpica y otra parte llega a la superficie dorsal del cuerpo calloso donde se incorporan a las estrias medial y lateral y forman el fornix dorsal. Las fibras

del fornix al aproximarse a la comisura anterior, se separan en dos componentes uno precomisural y otro postcomisural. A través del primero el hipocampo envía información a la región septal, el área preóptica y los núcleos anteriores del hipotálamo y a través del segundo la información llega a las áreas ventral y lateral del hipotálamo, al núcleo anterior del tálamo y a los cuerpos mamilares Raisman y col., 1966).

1.3.3. Conexiones intrínsecas

Dentro de la región hipocámpica la información es llevada a través de las proyecciones de CA1 hacia subiculum y a las áreas medial y lateral de la corteza entorrinal (Amaral y Witter, 1989). La información proveniente del campo CA3 es enviada por el sistema colateral de Schaffer al campo CA1, a las partes mediales del subiculum y otra rama recurre a las partes apicales y basales de otras células del campo CA3 (Swanson y col, 1981). Las fibras del campo CA3 también proyectan a la región hiliar (Gottlieb y Cowan, 1972) y parece que algunos de sus axones van también a las células granulares del giro dentado.

Se ha sugerido que CA3 es el principal integrador del hipocampo por el patrón de fibras aferentes y eferentes y porque recibe y envía información intra- y extrahipocámpica (Swanson y Cowan, 1977).

En el giro dentado y en las áreas CA3 y CA1 existen además, circuitos locales de inhibición recurrente, i.e., una fibra colateral de las células granulares o piramidales conectan a una neurona inhibitoria, la cual a su vez proyecta a la misma célula granular o piramidal que la inerva (Swanson y col, 1981; Fig. I.3).

El circuito principal de la región hipocámpica es el llamado circuito trisináptico, el cual comienza con la proyección del vía perforante, que surge en la corteza entorrinal, hacia las dendritas de las células granulares por medio de sinapsis *en passant* (Ramón y Cajal, 1893) restringidas a los 2/3 exteriores del árbol dendrítico (Nafstad, 1967). Después estas células proyectan hacia el campo CA3 a través del sistema de fibras musgosas (una célula granular hace sinapsis con 36 piramides CA3), posteriormente las células piramidales de CA3 conectan hacia CA1 a través de las fibras colaterales de Schaffer y regresan al área entorrinal para completar el circuito trisináptico (Amaral y Witter, 1989; Fig. I.1 y Fig. I.3).

Las colaterales de las fibras musgosas, además proyectan a las células de la región hiliar incluyendo a las células musgosas (Ribak y col., 1985).

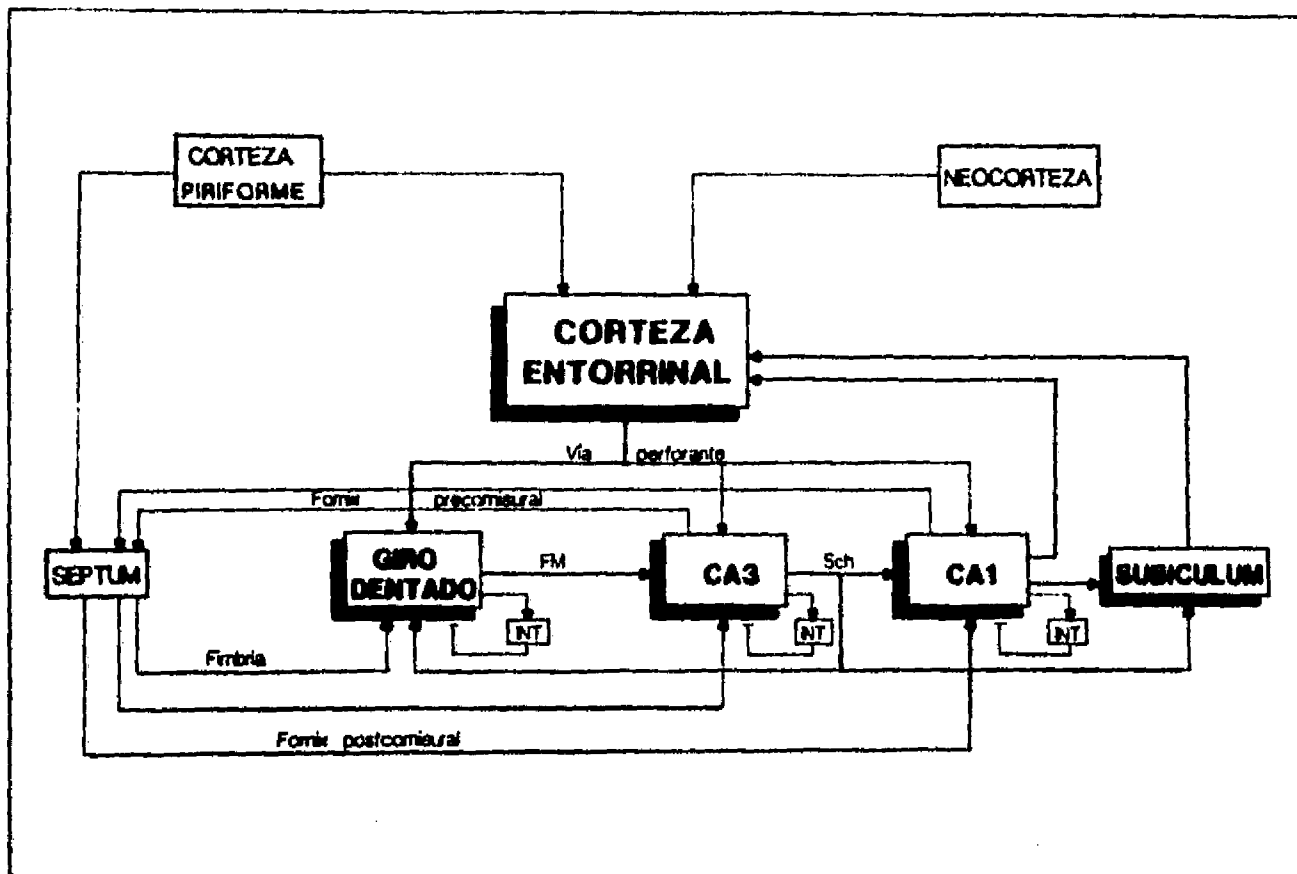


Fig. 1.3. Diagrama de bloques que muestra las conexiones principales del hipocampo resaltando las estructuras involucradas en el circuito trisináptico. FM.- fibras musgosas, INT.- interneurona, Sch.- colaterales de Schaffer.

1.4 Ontogenia

Las células del hipocampo derivan de la capa subependimal del 3er ventrículo y de los ventrículos laterales (Altman y Das, 1965; Angevine, 1965; Altman 1966; Schlessinger y col., 1975).

En términos generales, las células piramidales del hipocampo se generan prenatalmente entre los días de desarrollo embrionario (E) E14 y E20. Los tiempos de desarrollo embrionario para los diferentes campos del hipocampo son los siguientes: para las células piramidales más cercanas al subiculum, esto es las piramides de CA1 el pico de generación se da entre E18 y E19, el crecimiento de espinas dendríticas activas es postnatal (P) en P5, P7 y P15, completando su maduración aproximadamente en P30; para las piramides de CA2 y CA3 el pico se da en E17 y una pequeña fracción en el día E19, y el crecimiento dendrítico se da en P10 madurando en P20 y, para las células piramidales más cercanas al giro dentado, i.e., CA4 el pico se encuentra E14-E17 (Altman y Bayer, 1990a).

Las células CA1 que se generan más tarde, comienzan a posicionarse en el estrato piramidal más tempranamente que las CA3, las cuales son generadas primero (Altman y Bayer, 1990a). Esto quizá se deba, según las hipótesis de Altman y Bayer (1990a), en primer lugar, a la distancia que los dos grupos celulares tienen que viajar

desde el neuroepitelio Ammonico hasta alcanzar su sitio blanco, ya que las células CA1 están más cercanas a su posición final que las CA3 y, en segundo, a lo que se ha llamado *migración estacionaria* que se refiere a que la migración de las células CA3 se da en pausas, esto es, primero migran desde el neuroepitelio hacia la zona intermedia de la región CA1 y aquí tienen que esperar hasta que por lo menos algunas de las células granulares del giro dentado -las cuales son la fuente de sus aferentes- se hayan posicionado en la capa granular antes de alcanzar a su blanco final, el campo CA3 del hipocampo (Altman y Bayer, 1990a).

En el caso del giro dentado, la generación de las células granulares en su mayoría, se lleva a cabo durante el período postnatal y se prolonga hasta la vida adulta en la rata (Bayer y Altman, 1974; Lewis y col., 1979; Pokorny y Yakamoto, 1981; Bayer, 1982; Crespo y col., 1986; Stanfield y Trice, 1988). Se estima que el 85% de la población total de células granulares es generada después del nacimiento (Bayer, 1980). Estas células se empiezan a generar en el día E14 y al momento del nacimiento presentan una población de aproximadamente el 15% con respecto a la población del adulto. Bayer (1980) y Altman y Bayer (1990b) reportaron que aproximadamente entre 40 o 50% de las células granulares son generadas entre los días P3 y P10. Adicionalmente, se ha reportado que desde los primeros 30 días hasta el primer año de vida se produce un incremento substancial en la población de células granulares del 35 al 43% (Bayer, 1982; Bayer y Altman, 1974).

Con respecto a las células musgosas y a las gabaérgicas, éstas se generan durante el período prenatal, aproximadamente entre los días E14 y E17 y su maduración en el caso de las primeras es postnatal, similar al de las células granulares (Seress y Ribak, 1993) y el desarrollo de las gabaérgicas es paralela al de las neuronas piramidales, entre P5 y P20.

II. EL HIPOCAMPO, EL APRENDIZAJE Y LA MEMORIA

Se ha postulado que el hipocampo es una estructura que se encuentra involucrada en diversas funciones, a saber en la regulación visceral y endocrina, en funciones sensoriales y en la conducta emocional. Respecto a la participación del hipocampo en la integración visceral, se ha observado que la estimulación del hipocampo produce dilatación pupilar (Kaada, 1951 citado en López-Antunez, 1986) modificaciones respiratorias, salivación (MacLean y Delgado, 1953 citados en López-Antunez, 1986) y erección del pene (Chen y col., 1992). En cuanto al sistema endocrino se ha reportado que la extirpación del hipocampo o la sección bilateral del fornix producen incrementos en los niveles de ACTH y alteraciones en la secreción de orina (Fendler y col., 1961). Con respecto a las funciones sensoriales se ha encontrado la presencia de la actividad theta en el hipocampo después de estimulaciones sensoriales tales como la olfatoria, la auditiva, la visual y la somestésica. En relación a la conducta emocional, se ha observado que ratas con lesiones hipocámpicas exhiben pocas respuestas de miedo, tienen un menor número

de comportamientos agresivos (Jarrard, 1968) y responden de manera más intensa a estímulos auditivos (Isaacson, 1982).

Sin embargo, una de las funciones más importantes que se le ha adjudicado al hipocampo es su participación en la adquisición y almacenamiento de ciertas clases de información (Barnes, 1988; Cerbone y col., 1993; Eichenbaum y col., 1992; Morris y col., 1982; Olton y col., 1978; Sherry y col., 1992; Squire y Zola-Morgan, 1988). En los roedores se ha mostrado que lesiones en el hipocampo producen como resultado deterioro en la capacidad de aprendizaje, por ejemplo en la habituación a estímulos repetidos (Isaacson, 1982), en tareas de discriminación visual (Isaacson, 1982), en la habilidad de recordar información espacial y contextual (Jarrard, 1993; Nadel, 1991; O'Keefe, 1991) y en el comportamiento de evitación a estímulos nocivos (Altman y col., 1973; Liss, 1968; Coscina y Lash, 1969; Olton e Isaacson, 1968; Rich y Thompson, 1965). En los humanos con lesiones en el lóbulo temporal se han encontrado severas deficiencias en la memoria a corto plazo (Scoville y Milner, 1957).

Por otra parte, se han llevado a cabo estudios electrofisiológicos en animales en libre movimiento, con el fin de tratar de correlacionar los cambios de la actividad eléctrica del hipocampo con conductas específicas de los animales. Un ejemplo de ello es el trabajo de O'keefe (1983), en el cual se ha llevado a cabo el registro de la actividad eléctrica de las células piramidales del hipocampo y al mismo tiempo se prueba de manera conductual al animal en un laberinto. El objetivo es que el animal utilice señales medio ambientales para encontrar el brazo del laberinto que contiene una recompensa. Los resultados de estos experimentos mostraron que las células piramidales incrementaban su frecuencia de disparo con relación preferencial a una localización particular del laberinto, esto es, cuando el animal aprendía a localizar la recompensa (a través de las señales medio ambientales). Estos datos evidencian la relación del hipocampo con los procesos de aprendizaje y almacenamiento de información espacial (Barnes, 1988). Adicionalmente, otros estudios electrofisiológicos han mostrado que cambios en la actividad neuronal del hipocampo están asociados a ciertas tareas de discriminación. Específicamente se ha encontrado una relación entre el ritmo theta del hipocampo y la ejecución de tareas de discriminación de olores (Macrides y col., 1982).

Otra aproximación que relaciona el comportamiento con el procesamiento de información en el hipocampo proviene del estudio de la plasticidad sináptica en esta estructura, a través de registros de potenciales extracelulares. Una forma de plasticidad que ocurre en el hipocampo es la que involucra cambios a largo plazo en la comunicación sináptica y que puede ser inducida en varios mamíferos (e.g., conejos, ratas y hombre), la cual ha sido llamada potenciación a largo plazo (PLP) y se refiere a un incremento de la eficacia sináptica que puede ser inducida por una breve estimulación repetida de alta frecuencia de una vía aferente a una neurona. A esta forma de plasticidad se le ha postulado como el mecanismo de almacenamiento

de información en el cerebro del mamífero. Un ejemplo que muestra la relación entre la memoria y la PLP son los experimentos de Barnes (1985 en Barnes, 1988) en los cuales se comparan la PLP del hipocampo y pruebas conductuales en animales jóvenes y viejos. El objetivo de estos experimentos era que los animales localizaran a partir del centro iluminado de una plataforma una recompensa que se encontraba en un tunel oscuro, la hipótesis era que si realmente la PLP representa el mecanismo subyacente a la memoria espacial, entonces las ratas viejas, en las cuales por la edad la memoria estaba deteriorada, mostrarían una alteración en la inducción o el mantenimiento de la PLP en las sinapsis del hipocampo. Los resultados mostraron que en los animales viejos, que presentaron un pobre desempeño en la tarea, tuvieron un decaimiento sináptico más rápido de la PLP que los animales jóvenes. Estos datos sugieren que la PLP está relacionada con la memoria (Barnes, 1988).

Otros estudios que relacionan la PLP con la adquisición y retención de información son los que involucran un bloqueo farmacológico de la inducción de la PLP. En la actualidad se cuenta con suficiente información que evidencia que la inducción de la PLP hipocámpica depende de la activación de los receptores NMDA (Collinridge y col., 1983; Kirkwood y col., 1993; Ramakers y col., 1993, entre otros). Varios autores han mostrado que los antagonistas de los receptores NMDA, no sólo bloquean la inducción de la PLP, sino también deterioran la ejecución de ciertas tareas de aprendizaje. Por ejemplo, Morris y col., (1986) mostraron que la infusión intraventricular del ácido 2-amino-5-fosfonopentanoico (AP5), un antagonista selectivo de los receptores NMDA, produce deficiencias en el aprendizaje espacial y bloquea la PLP. Estos resultados sugieren que tanto el aprendizaje y memoria como la PLP del hipocampo dependen de la activación de los receptores NMDA.

Así, si se conjuntan los experimentos electrofisiológicos, de lesión y farmacológicos y se relacionan con las respuestas observadas durante las pruebas conductuales, es posible concluir que el hipocampo juega un papel relevante en los procesos de aprendizaje y memoria.

III. EFECTOS PRODUCIDOS POR LA DESNUTRICION

La desnutrición es un factor que puede reducir la capacidad intelectual del hombre. Algunos estudios han mostrado (Morgane y col., 1978; Dobbing, y Sands, 1971, Smart, 1991) que el SNC es vulnerable a la desnutrición durante su desarrollo, especialmente en el período crítico, ya que durante esta fase se están llevando a cabo los procesos de crecimiento, diferenciación y migración neuronales.

Los efectos que produce la desnutrición en un organismo han sido estudiados desde diferentes puntos de vista, a saber, neuroquímico, fisiológico, anatómico y conductual. Estos estudios han permitido establecer algunos de los mecanismos acerca de las alteraciones que se producen en el SNC, así como las repercusiones que se producen a corto y largo plazo.

Desde el punto de vista neuroquímico se han encontrado diversos efectos producidos por la desnutrición. Por una parte, en animales desnutridos hipoproteínicamente se observaron incrementos en el contenido de aminas biogénicas, tales como la serotonina y la noradrenalina (Stern y col., 1975). El aumento en los niveles de serotonina cerebral (i.e., en el diencéfalo y el tallo cerebral) parece relacionarse con una deficiencia de albúmina en la sangre, con la que se une la fracción precursora L-Triptofano en el plasma. El incremento de la noradrenalina parece estar asociado con una alteración en los receptores α_2 y β para unirse a la noradrenalina (Seidler y col., 1990 en Escobar, 1992; Stern y col., 1975). Por otra parte, Wiggins y col. (1984), encontraron -en animales desnutridos por restricción de alimento- resultados similares a los de Stern y col. en cuanto a las aminas, empero; observaron disminuciones significativas en los niveles de acetilcolina y GABA, por tanto concluyeron que no todos los sistemas de neurotransmisión son alterados de la misma manera, es decir parece ser que la desnutrición tiene un efecto selectivo en la actividad neurotransmisora del cerebro. Estos investigadores notaron también, que las alteraciones neuroquímicas podían ser revertidas si el animal es rehabilitado, sugiriendo que los cambios neuroquímicos no son necesariamente permanentes

En estudios fisiológicos se ha mostrado que en animales desnutridos la amplitud de los potenciales provocados es menor y que esto parece estar relacionado con los niveles elevados de noradrenalina. Adicionalmente, Morgane y col. (1992) y Bronzino y col. (1993) han mostrado que el establecimiento y el mantenimiento de la PLP inducida en las células granulares del giro dentado se alteran por la desnutrición prenatal. Por otra parte, en los estudios electrofisiológicos de sueño llevados a cabo en animales desnutridos crónicamente se ha observado que un retraso significativo en la maduración del sueño de ondas lentas y del sueño MOR, así como también en los mecanismos que regulan la recuperación del sueño MOR (Cintra y col., 1993).

Desde el punto de vista anatómico se ha observado que la desnutrición durante la gestación y la lactancia produce una reducción significativa en el peso corporal (Bedi, 1987) y en el cerebral (Morgane y col., 1978). Los estudios del efecto de la desnutrición en regiones específicas del cerebro han mostrado lo siguiente:

1) En el cerebelo se altera la longitud dendrítica y los patrones de ramificación en las células de purkinje (McConnel y Berry, 1978 y 1981).

2) En la corteza cerebral se ha encontrado una reducción en el grosor, longitud dendrítica, número de espinas, densidad celular y número de sinapsis por neurona cortical (Salas y col., 1974; West y Kemper, 1976; Morgane y Col., 1978; Leuba y Rabinowicz, 1979a y b; Warren y Bedi, 1981).

3) En los núcleos aminérgicos del tallo cerebral (i.e., el rafé dorsal y en el locus coeruleus) se ha encontrado que la desnutrición hipoproteínica altera la relación que existe entre estas dos estructuras con respecto a lo que se ha llamado crecimiento dendrítico fuera de fase, que se refiere al decremento e incremento en el número de espinas dendríticas acorde al estadio de desarrollo que se presenta en animales

normales y que en animales desnutridos se rompe este patrón de crecimiento (Morgane y col, 1982).

4) En el estriado y la corteza entorrinal se han encontrado alteraciones en la densidad de espinas dendríticas, producidas por una dieta baja en proteína (Brock y Prasad, 1992).

5) En el caso del hipocampo se han llevado a cabo estudios donde la desnutrición se ha instalado crónicamente, encontrándose efectos significativos en la sinaptogénesis y decrementos tanto en el volumen como en el grosor y densidad celular del hipocampo (Fish y Winick, 1969; Katz y col., 1982; Katz y Davis, 1983). Ahmed y col. (1987) encontraron que en las células granulares del giro dentado la densidad sináptica se incrementaba después de una rehabilitación nutricional. Andrade y col., (1991) observaron que en animales alimentados con una dieta baja en proteínas se reducía la densidad de sinapsis entre las fibras musgosas y el campo CA3. Díaz-Cintra y col. (1991), en estudios de desnutrición prenatal, mostraron decrementos en el tamaño del soma, así como de las dendritas y de las espinas, en células granulares del giro dentado. Galván y col. (1993) observaron decrementos significativos en el área ocupada por las fibras musgosas del hipocampo en ratas desnutridas prenatalmente, estos efectos persistieron hasta la edad de 220 días, demostrando efectos a largo plazo.

En estudios conductuales, en los cuales se ha investigado la capacidad del SNC para compensar los efectos producidos por la desnutrición, se ha observado que los animales desnutridos presentan alteraciones tales como una mayor emotividad, movilidad, agresividad y temor (Salas y Cintra, 1979; Wiener y col., 1983; Escobar y Salas, 1987); un retraso en la aparición de las primeras conductas, alteraciones en el comportamiento social, un deterioro en diferentes capacidades motoras, tales como el desplazamiento para salir del nido, la exploración y el nado (20, 31,32 Salas y Cintra, 1973) y presentan alteraciones en la responsividad a ciertos estímulos (Salas y Cintra, 1979), por ejemplo una mayor reactividad a estímulos aversivos (41-44). Además, se ha visto que la combinación de estímulos sensoriales con la desnutrición durante el desarrollo provocan cambios en la conducta animal (Levitsky y Barnes, 1972; Salas y col., 1984). Finalmente, parece ser que la desnutrición produce deficiencias severas en los procesos de aprendizaje y memoria (Franková y Barnes, 1968; Levitsky, 1975; Tonkiss y col., 1990), aunque con respecto a este punto se han desencadenado ciertas controversias, por lo que es necesario llevar a cabo más investigaciones acerca de esta problemática.

A lo largo de estos antecedentes hemos visto que se han llevado a cabo diversos estudios con el objeto de investigar el efecto de la desnutrición sobre el hipocampo y sobre el aprendizaje. Sin embargo, hasta el momento estos efectos no han sido completamente determinados y, más aún han suscitado algunas

controversias. Por lo que consideramos la necesidad de emprender estudios más cuantitativos acerca de la citoarquitectura de esta estructura debido a la relevancia que tiene en los procesos de aprendizaje y memoria. Por ello, en este trabajo se abordó el problema de la desnutrición desde dos puntos de vista: neuroanatómico y conductual. Con respecto al primer punto se llevaron a cabo estudios morfométricos del efecto de la desnutrición hipoproteínica crónica y la prenatal seguida de una rehabilitación nutricional postnatal en las células piramidales del campo CA3 del hipocampo. Desde el punto de vista conductual se evaluó el desempeño de ratas desnutridas y rehabilitadas en la ejecución de una tarea de aprendizaje.

OBJETIVOS

- 1.- Investigar los efectos de la desnutrición hipoproteínica crónica (con una dieta de 6% de caseína) en el tamaño, en la arborización y longitud dendrítica, en el área de excrescencias y en la densidad de las espinas dendríticas de las neuronas piramidales del campo CA3 del hipocampo de la rata.**
- 2.- Determinar los efectos de la desnutrición prenatal y la rehabilitación nutricional postnatal en la morfología de las neuronas piramidales del campo CA3 del hipocampo de la rata.**
- 3.- Evaluar el efecto de la desnutrición hipoproteínica crónica y valorar el grado de rehabilitación nutricional en la adquisición y retención de la conducta de evitación en el paradigma de prevención pasiva en ratas.**

En la siguientes partes de esta tesis se presentan primero (parte II y parte III) , los resultados obtenidos del trabajo neuroanatómico realizado (objetivos 1 y 2), a través de dos artículos. Posteriormente en la parte IV, se presenta una revisión sobre los efectos de la desnutrición en los procesos de aprendizaje y memoria. En la parte V se presentan y se discuten los resultados de los experimentos conductuales (referentes al objetivo número 3) y finalmente, en la parte VI se presenta la discusión general y las conclusiones de todo el trabajo de tesis.

PARTE II

BRES 19302

Effect of protein malnutrition on CA3 hippocampal pyramidal cells in rats of three ages

Mayra García-Ruiz ^a, Sofía Díaz-Cintra ^a, León Cintra ^a and Gabriel Corkidi ^b

^a Departamento de Fisiología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, Ciudad Universitaria, México, DF (México) and
^b Centro de Instrumentos, UNAM, Ciudad Universitaria, México, DF (México)

(Accepted 18 May 1993)

Key words: Protein malnutrition; Hippocampus; CA3 pyramidal cell; Morphometric Golgi study

Prenatal and postnatal protein deprivation effects on CA3 hippocampal pyramidal cells were investigated in 30-, 90- and 220-day-old rats. Female rats were fed either a 6% or a 25% casein diet 5 wk before conception and the litters were maintained on their respective diet until sacrificed. In 216 rapid Golgi-impregnated cells, we measured somal size, length and diameter of apical dendrite, number of apical dendrites intersecting 10 concentric rings 38 μ m apart, thorny excrescence area and length, head diameter and density of synaptic spines on 50- μ m segments of apical dendrite. The present experiments showed that malnutrition produced significant reductions of somal size in animals at 220 days of age. There were significant reductions of apical dendrite diameters in animals of 30 and 90 days, and of density and head diameter of synaptic spines at the three ages studied, and significant decrease of the thorny excrescence area at 220 days of age. At this latter age, dendritic branching was significantly decreased in the last four rings representing the area into which the perforant pathway projects. In 30-day malnourished rats, dendritic branching showed a significant increase in rings 4-6 representing the area in which the Schaffer collaterals synapse. The location of the deficit in dendritic spines corresponds to the sites where mossy fibers synapse on the apical dendrites of CA3 neurons. Age-related changes normally observed in control rats (e.g., the 30-day-old control group showed the smallest somal size and 220-day-old controls the largest size) failed to occur in the malnourished rats. The deficits in spine density and dendritic branching (in animals of 220 days old) were similar to those found in our previous studies on fascia dentata.

INTRODUCTION

The importance of nutrition in brain development and behavior has been emphasized in recent years^{2,7,11,16,40-42,50,61}, mainly because of the widespread incidence of infantile malnutrition and of evidence showing that many of its effects are permanent and associated with impairments of higher mental functions, including intelligence⁴⁰⁻⁴².

Studies on the effects of malnutrition during the pre- and postnatal periods have demonstrated a decrease in cell number, in dendritic length and branching, in spine density and in the number of synapses of several brain regions such as the nucleus raphe dorsalis¹⁹, locus coeruleus¹⁷, cerebellum⁵⁰, hippocampal formation^{6,11,16} visual¹⁸ and cerebral cortex^{38,39,50,51,53,60,61}. One brain region particularly affected by malnutrition during early life is the hippocampal formation in which

significant reductions of cellular density^{25,31,32}; synaptic density¹, cellular size and spine and dendritic branching density have been found^{6,11,16,50}. Several behavioral studies have been performed to test the learning and memory abilities of malnourished animals after the hippocampal formation was recognized to be important for these processes^{43,47}. These studies have shown that malnourished animals present deficits in spatial memory and learning abilities^{7,27,33,34,58}.

In the present study, the effect of a pre- and postnatal low protein diet (6% of casein diet) on CA3 hippocampal pyramidal cells was examined. To mimic more closely the human condition of underdeveloped countries, female rats were fed their diets before, during and after mating and after birth the pups were maintained on the same diet as dams.

The CA3 pyramidal cells were selected because they are an essential link in the hippocampal trisynaptic

Correspondence: S. Díaz-Cintra, Departamento de Fisiología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, Ciudad Universitaria, México 04510, DF, México. Fax: (52) (5) 550-0048.

circuit, implicated as substrate for learning and spatial memory^{4,24,37,44,48,57}. The input to the trisynaptic circuit is via the perforant pathway projection from the entorhinal cortex to the granule cell dendrites in the outer two-thirds of the molecular layer of the dentate gyrus⁴⁵. The granule cells, via their mossy fiber axonal projections, complete the next limb of the circuit with their projections to CA3 pyramidal cells. These neurons, in turn via Schaffer axonal collaterals, project to the CA1 pyramidal cells and back to the entorhinal area to complete the trisynaptic circuit.

MATERIALS AND METHODS

Animals

Virgin female and male Charles River C.D. Sprague-Dawley-descended rats were used for breeding. Female rats (250–300 g on arrival) were housed three per colony in a cage and males were housed in individual cages. They were maintained in automatically controlled animal rooms at a temperature of 22–24°C, humidity of 40–50% and dark-light cycle of 12:12. Food and water were provided ad libitum. During the 5 wk before breeding, five female rats were fed on 6% casein diet and five control rats on 25% casein diet (Fig. 1). Body weight was measured every 3rd day. Rats were mated after 5 wk of adaptation to the diet; one male, fed a standard rat chow diet, was introduced into each cage containing three females. Vaginal smears were obtained each morning to detect when mating had occurred⁵⁹.

1 wk before expected parturition, all sperm-positive females were placed in nesting cages with adequate clean nesting material. After delivery, litters born the same day from each diet group were randomized and culled to eight pups, four females and four males. The dams continued on their diets during the lactation period after which the pups were weaned and then maintained on the same diets as those fed to their mothers during gestation and lactation (Fig. 1).

Histological procedure

At 30, 90 and 220 days of age, a total of 36 males, 18 on the 25% casein diet and 18 on the 6% casein diet, were anesthetized with pentobarbital, perfused through the heart with 10% neutral buffered formalin and the brains removed the following day. Thus, we obtained six rats from each diet group in each of three age groups. From each brain, a 4-mm-wide block containing the hippocampal formation was removed and impregnated using the rapid Golgi method, modified by Díaz-Cintra et al.¹⁹. The blocks were embedded in low-viscosity nitrocellulose, serially cut along the frontal (septotemporal) plane of the hippocampal formation at a thickness of 120 μ m and mounted in serial order. Each slide was assigned a random number to ensure that observations were blind with respect to diet and age. From each histological section, one complete well-impregnated CA3 pyramidal cell was selected, the soma of these cells were localized in the anterior two-thirds of the regio inferior, i.e., in the CA3b subfield (deeper layer). These pyramidal cells exhibited spines, identified as thorny excrescences, only in the apical dendrites.

The length of the CA3 neuron apical dendrites was determined following their trajectory – until possible – toward the stratum lacunosum-moleculare (Fig. 2), within the section of 120 μ m. The first bifurcation of the apical was localized at 50 μ m away from the cell body. The thorny excrescences, which are postsynaptic sites of mossy fibers, were clearly visible. Thus, we examined a total of 216 neurons, 36 of each age and diet group.

Morphometric analysis

Of each CA3 pyramidal cell chosen, the following parameters were measured:

(a) Perimeter, major axis, minor axis of the perikaryon with a 40 \times planapochromatic oil objective (Fig. 2).

(b) Length and diameter of the apical dendrite (with 10 \times and 63 \times objectives, respectively; the diameter of the apical dendrite was measured only in the first segment, between the perikaryon and the first dendritic bifurcation).

(c) The number of apical dendrites crossing each concentric ring (according to the method by Sholl⁶⁴), with a 20 \times objective. The percentage of dendritic segments transected by the microtome was < 20% in the six different groups studied. All these measurements were performed with the imaging system described below.

(d) Length, head diameter and density of synaptic spines were counted in three 50- μ m segments (localized in the lucidum layer) as shown in Fig. 2, with the aid of a calibrated microfilar ocular and a 63 \times planapochromatic oil objective (with a 0.6-mm working distance and a numerical aperture of 1.4); in addition, these parameters were measured in each largest thin spines within the 50- μ m segment.

The imaging system, viz., HISTO 2000 (Biocom, France), used in this study, was developed by Corkidi¹⁴ and Hirsch et al.²⁸. Its main feature is that each observed microscopic field observed is preserved in its position in relation to the whole tissue section contained in a maximum of 6.4 \times 6.4 cm. In this way, the analysed field is not limited to the visual field of the video screen but can be extended to several visual fields. Therefore, the regions of interest can be drawn on multiple fields, combined with any objective. Thus, the graphic overlay is moving at the same time as the video image on the screen. The measurements are performed using a system of X, Y optoelectronic sensors (Heidenhain VRZ 720B) mounted on the microscope stage with an accuracy of 1 μ m.

Somal size (with 40 \times objective), dendrite length (with 10 \times objective) and thorny excrescence area (with 40 \times objective) of pyramidal cells were outlined in a computer monitor from the microscope, with a cursor for morphometric analysis (Fig. 2). To obtain dendritic density with an objective of 4 \times , a mask of 10 concentric rings (38 μ m apart) was created. Then, with a 20 \times objective, the number of dendrites crossing each concentric ring was determined.

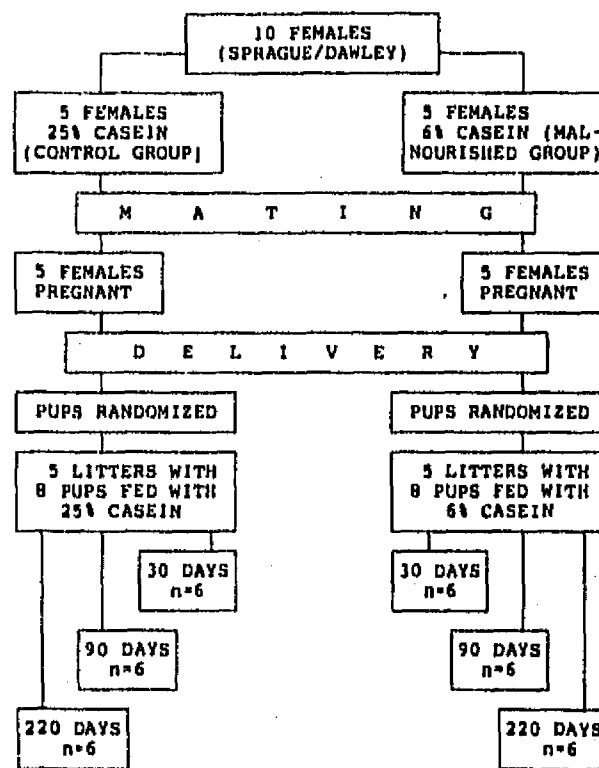


Fig. 1. Block diagram showing dietary protocol (cf. Materials and Methods).

Statistics

Statistical analysis was performed using SPSS (Version 3)¹⁶. The tests used were two-way ANOVA ($P < 0.05$, < 0.01 and < 0.001), one-way ANOVA and Tukey ranges ($P < 0.05$).

RESULTS

The results of the two-way ANOVA are shown in Table 1.

Statistical analysis of somatic measurements showed significant age effects ($P < 0.05$ and < 0.01) regarding the three parameters studied as well as a significant interaction between age and diet ($P < 0.001$) in the perimeter and major axis. In contrast, significant diet effects were only found in the minor axis.

Two-way ANOVA showed significant differences in dendritic length due to age ($P < 0.001$) while the diam-

eter displayed significant diet ($P < 0.001$) and age ($P < 0.01$) effects as well as a significant interaction ($P < 0.001$) between them (Table 1).

The number of dendritic intersections showed significant interaction between diet and age ($P < 0.01$ and < 0.001) from the 4th to the 10th concentric rings. Specifically, significant diet effects ($P < 0.05$, < 0.01 and < 0.001) were found from the 2nd to the 5th rings and significant age effects ($P < 0.05$, < 0.01 and < 0.001) from the 2nd to the 10th rings. All synaptic spine measurements showed significant diet and age effects and an interaction between both ($P < 0.05$, < 0.01 and < 0.001), except the spine head diameter of segments 1 and 3 (Table 1). Dendritic area occupied by the thorny excrescences (spines) showed significant age effects and a significant interaction between diet and age ($P < 0.001$).

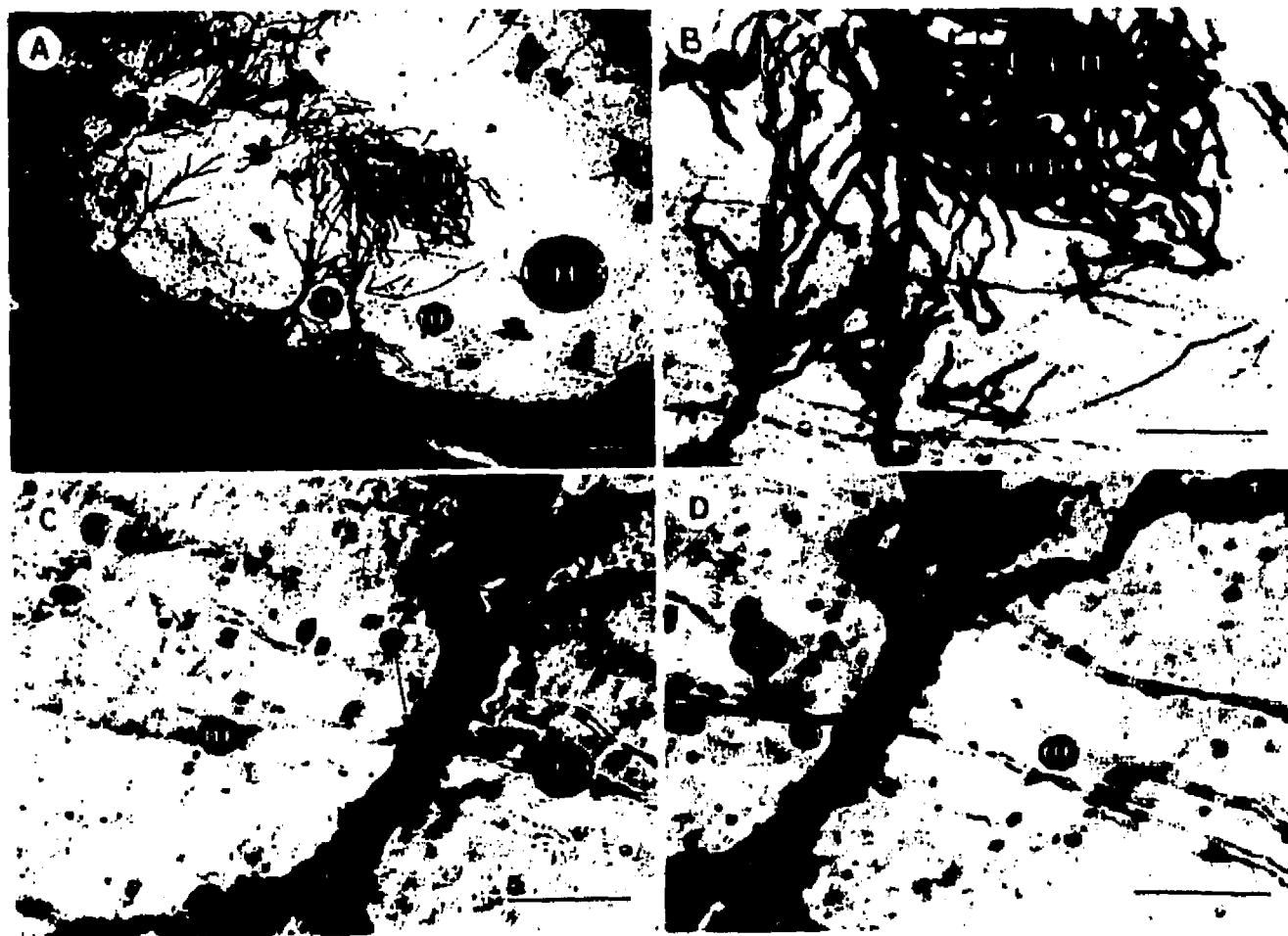


Fig. 2. Pictures of CA3 hippocampal pyramidal cells taken directly from computer monitor: A exhibits frontal level ($3.2\times$) in which CA3 pyramidal neurons were chosen (SP stratum pyramidale, SLM stratum lacunosum-moleculare.); B shows measurements made through imaging system of length of apical dendrite (LAD, $10\times$); C exhibits a neuron at $400\times$ of magnification, note spines (S) called thorny excrescences and mossy fibers (MF) crossing apical dendrites; and D shows measurements (made through imaging system) of perimeter of perikaryon (PP) and thorny excrescence area (TEa) where dendritic diameter (measured in S1), density, length and head diameter of synaptic spines were measured per $50\text{-}\mu\text{m}$ segments (S1, S2 and S3). Scale bar in A and B, $200\text{ }\mu\text{m}$; and in C and D, $50\text{ }\mu\text{m}$.

Comparisons between ages

Results from the statistical analyses (one-way ANOVA/Tukey ranges at $P < 0.05$) of each parameter measured in relation to age are shown in Table II. This table shows the percentage of change between groups (C, control groups; and M, malnourished groups). The - sign means that the age on the left of the vs. sign was significantly lower than that on the right. The + sign means that the age on the left of vs. sign was significantly higher than that on the right.

The somatic perimeter was significantly reduced (90- vs. 220-day control groups and 30- vs. 90-day malnourished animals). The major and the minor axis showed significant changes only in malnourished groups. Age-related differences were observed in dendritic parameters.

A significant decrease (Tukey test $P < 0.05$) in length concomitant with an increase in diameter were observed in the 30- and 90-day-old control groups when

compared with the 220-day-old control animals. A similar decrease in dendritic length was observed in 30- and 90-day malnourished rats but, in this case, the dendritic diameter also decreased (in animals 30 days old; Table II).

The number of dendritic intersections showed significant age effects ($P < 0.05$; Table II). In control animals, a decrease was observed in rings 6-10 (in 30- and 90-day-old animals). In malnourished groups, a significant ($P < 0.05$) increase was found crossing rings 4-6 (in 30-day-old animals compared with the 90-day-old malnourished group) and a significant ($P < 0.05$) decrease in 90-day-old rats.

Significant age effects ($P < 0.05$) in segment 1 were found in the number of synaptic spines (all comparisons, except 90- vs. 220-day malnourished rats), in the length of synaptic spines (in all comparisons) and in spine head diameter (30- vs. 90-day, 30- vs. 220-day-old controls and 30- vs. 220-day-old malnourished animals;

TABLE I

Statistical analysis of protein malnutrition on CA3 hippocampal pyramidal cells at 30, 90 and 220 days of age

Two-way ANOVA with nutritional status and age as two factors. Morphometrical analyses were carried on 216 neurons for perikarya and dendritic intersections¹ and for dendritic spines on 210 neurons².

	F values		
	Diet (df 1,210)	Age (df 2,210)	Interactions (df 2,210)
Perikarya ¹			
Perimeter	3.561 N.S.	6.663 **	13.030 ***
Major axis	3.050 N.S.	5.810 **	8.241 ***
Minor axis	6.006 *	4.318 *	3.067 N.S.
Dendrites			
Length	0.821 N.S.	45.723 ***	0.539 N.S.
Diameter	72.838 ***	6.781 **	29.357 ***
Dendritic intersections at			
Ring 1 (38 μm)	0.234 N.S.	2.186 N.S.	2.186 N.S.
Ring 2 (76 μm)	4.270 *	4.576 *	1.126 N.S.
Ring 3 (114 μm)	9.916 **	6.979 **	1.351 N.S.
Ring 4 (152 μm)	21.327 ***	11.947 ***	5.403 **
Ring 5 (190 μm)	13.547 ***	16.927 ***	5.956 **
Ring 6 (228 μm)	1.431 N.S.	24.873 ***	9.899 ***
Ring 7 (266 μm)	2.410 N.S.	13.886 ***	8.504 ***
Ring 8 (304 μm)	1.962 N.S.	6.882 **	7.615 **
Ring 9 (342 μm)	2.593 N.S.	4.862 **	7.630 **
Ring 10 (380 μm)	3.867 N.S.	5.967 **	7.321 **
Spines ²	(df 1,204)	(df 2,204)	(df 2,204)
Segment 1			
Number	511.484 ***	84.721 ***	79.820 ***
Length	7.565 **	151.398 ***	38.365 ***
Head diameter	8.373 **	28.508 ***	2.630 N.S.
Segment 2			
Number	498.556 ***	4.561 *	46.223 ***
Length	9.625 **	32.552 ***	16.578 ***
Head diameter	10.352 **	14.125 ***	4.731 *
Segment 3			
Number	244.230 ***	3.105 *	10.755 ***
Length	4.627 *	37.695 ***	54.911 ***
Head diameter	0.805 N.S.	0.687 N.S.	1.078 N.S.
Thorny excrescence area	0.021 N.S.	13.913 ***	8.992 ***

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$.

TABLE II

Statistical analysis of effect of protein malnutrition on CA3 hippocampal pyramidal cells (one-way ANOVA / Tukey ranges)

Morphometrical analyses were carried out on 216 neurons for perikarya and dendritic intersections¹ and for dendritic spines on 210 neurons². C, control groups; M, malnourished groups. -, left of vs. sign is significantly lower than right; +, left of vs. sign is significantly higher than right.

	Comparisons between ages					
	30 vs. 90 C	30 vs. 220 C	90 vs. 220 C	30 vs. 90 M	30 vs. 220 M	90 vs. 220 M
Perikarya¹						
Perimeter	N.S.	N.S.	-20% *	-14% *	N.S.	N.S.
Major axis	N.S.	N.S.	N.S.	-14% *	N.S.	-12% *
Minor axis	N.S.	N.S.	N.S.	-16% *	N.S.	+14% *
Dendrites						
Length	N.S.	-29% *	-20% *	N.S.	-29% *	-15% *
Diameter	N.S.	+10% *	+10% *	N.S.	-20% *	N.S.
Dendritic intersections at						
Ring 1 (38 μ m)	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.
Ring 2 (76 μ m)	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.
Ring 3 (114 μ m)	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.
Ring 4 (152 μ m)	N.S.	N.S.	N.S.	+39% *	N.S.	-29% *
Ring 5 (190 μ m)	N.S.	N.S.	N.S.	+32% *	N.S.	-22% *
Ring 6 (228 μ m)	N.S.	-19% *	-26% *	+29% *	N.S.	-22% *
Ring 7 (266 μ m)	N.S.	-33% *	-32% *	N.S.	N.S.	N.S.
Ring 8 (304 μ m)	N.S.	-38% *	-35% *	N.S.	N.S.	N.S.
Ring 9 (342 μ m)	N.S.	-40% *	-40% *	N.S.	N.S.	N.S.
Ring 10 (380 μ m)	N.S.	-52% *	-50% *	N.S.	N.S.	N.S.
Spines²						
Segment 1						
Number	-14% *	+26% *	+35% *	-27% *	-25% *	N.S.
Length	+15% *	+38% *	+26% *	+52% *	+41% *	-19% *
Head diameter	+22% *	+38% *	N.S.	N.S.	+25% *	N.S.
Segment 2						
Number	-18% *	N.S.	+18% *	N.S.	N.S.	-25% *
Length	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.
Head diameter	+24% *	+27% *	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.
Segment 3						
Number	-12% *	-13% *	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.
Length	N.S.	+15% *	+16% *	+42% *	+14% *	-33% *
Head diameter	+20% *	N.S.	N.S.	N.S.	-19% *	-32% *
Thorny excrescence area	N.S.	-30% *	N.S.	-25% *	N.S.	+20% *

* Significant differences at $P < 0.05$.

Table II). In segment 2, there were significant differences (Tukey test $P < 0.05$) in the number of spines (30- vs. 90-day, 90- vs. 220-day-old controls and 90- vs. 220-day-old malnourished rats) and in head diameter (30- vs. 90-day and on 30- vs. 220- old control groups). In segment 3, we observed significant changes in the number of spines (30- vs. 90-day and on 30- vs. 220-day-old controls, the number of the spines being less in 30-day-old animals than in the other groups), in spine length (all comparisons, except 30- vs. 90-day-old control groups) and in head diameter (30- vs. 90-day-old controls; 30- vs. 220-day and 90- vs. 220-day malnourished rats; Table II). The thorny excrescence area showed significant age-related differences in 30 vs. 220 C, 30 vs. 90 M and 90 vs. 220 M.

Comparisons between diets

The effects of diet variations on these parameters are graphically shown in Figs. 3-7.

As shown in Fig. 3, the effect of malnutrition was manifested as a decrease (13%) in the perimeter and in the major axis of the perikaryon (12%) in animals of 220 days of age (Tukey ranges $P < 0.05$).

Dendrite measurements showed a significant decrease ($P < 0.05$) in malnourished animals only in the diameter of apical dendrites in rats of 30 (24%) and 90 (13%) days of age (Fig. 4).

Fig. 5 shows a significant increase ($P < 0.05$) in the number of dendritic intersections in 30-day-old malnourished rats in rings 4 (30%), 5 (25%) and 6 (21%). However, in 90-day-old animals, there were no significant effects. Rats of 220 days of age showed a significant decrease in dendritic intersections ($P < 0.05$) in the last four rings, 7 (24%), 8 (32%), 9 (39%) and 10 (50%). At this age, a significant increase of dendrites crossing ring 4 (28%) was observed.

The effect of the 6% casein diet on density of synaptic spines was manifested as an important decrease (Tukey test $P < 0.05$) as shown in Fig. 6. In

segment 1, the 30- and 90-day-old low-protein diet groups showed significant reductions ($P < 0.05$) of 48 and 40%, respectively. In segment 2, the significant decreases (Tukey test $P < 0.05$) were of 33, 53 and 24% (for 30-, 90- and 220-day-old malnourished animals, respectively) and, in segment 3, the significant decreases ($P < 0.05$) were of 22, 40 and 34% (for 30-, 90- and 220-day-old malnourished groups, respectively).

Spine length showed the following changes due to malnutrition: in 30-day-old malnourished group, significant increases (Tukey test $P < 0.05$) in segments 1 (11%) and 3 (13%) while, in 90-day-old malnourished rats, significant decreases were found in the three segments (37, 36 and 36% for segments 1, 2 and 3, respectively; Tukey test $P < 0.05$). There were no significant changes in the 220-day-old malnourished group (Fig. 6).

The third graph on Fig. 6 shows the significant changes (Tukey test $P < 0.05$) found in the spine head diameter in the low-protein diet group. In segment 1, the 30-day-old malnourished group showed a significant decrease (18%, $P < 0.05$) while, in segments 2 and

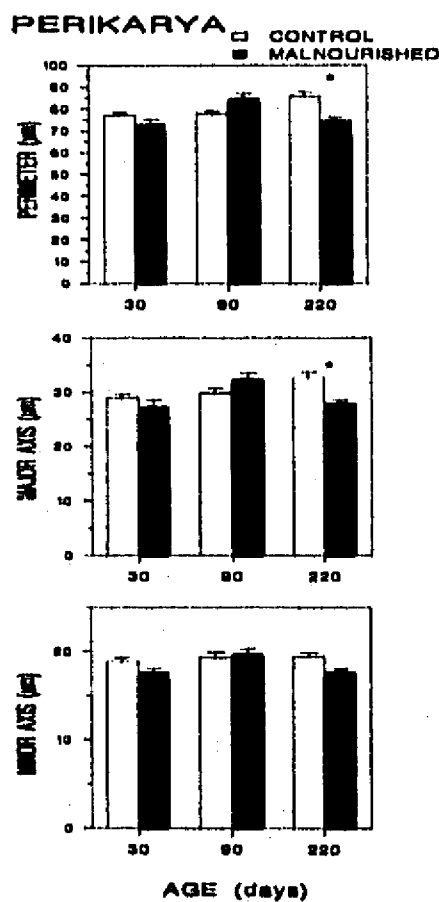


Fig. 3. Effect of protein malnutrition on CA3 cell size (\pm S.E.M.). Note decrease of perimeter and major axis in malnourished 220-day-old rats.

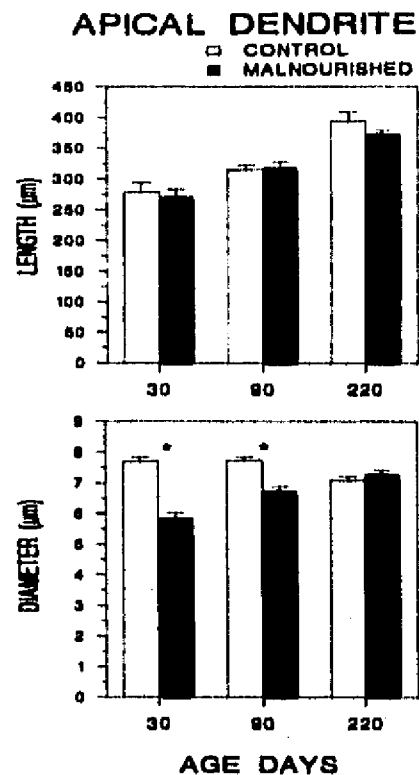


Fig. 4. Bar graphs showing effects of pre- and postnatal protein malnutrition on length and diameter of apical dendrite (\pm S.E.M.) of CA3 hippocampal pyramidal cells. Observe significant decreases ($P < 0.05$) in diameter of dendrite of malnourished rats at 30 and 90 days of age (black bars).

3, the 220-day malnourished group showed a significantly ($P < 0.05$) larger spine head diameter than 220-day-old controls (24% in segment 2 and 28% in segment 3; Fig. 6).

The thorny excrescence area showed no changes in 30- and 90-day malnourished groups. However, in 220-day-old malnourished rats, there was a significant decrease ($P < 0.05$) of 20% (Fig. 7).

DISCUSSION

This study shows that CA3 hippocampal pyramidal cells in protein-deprived rats of three different ages exhibit significant morphological alterations in all recorded measurements: cell size and complexity of dendritic branching; density, length and head diameter of synaptic spine and thorny excrescence area but not in dendrite length.

Cell size exhibited significant hypoplasia in 220-day-old malnourished animals. These results suggest an additive effect between age and diet as shown by the significant interaction found in the two-way ANOVA (Table 1). On the other hand, it is possible that animals of 220 days of age were more affected by malnutrition

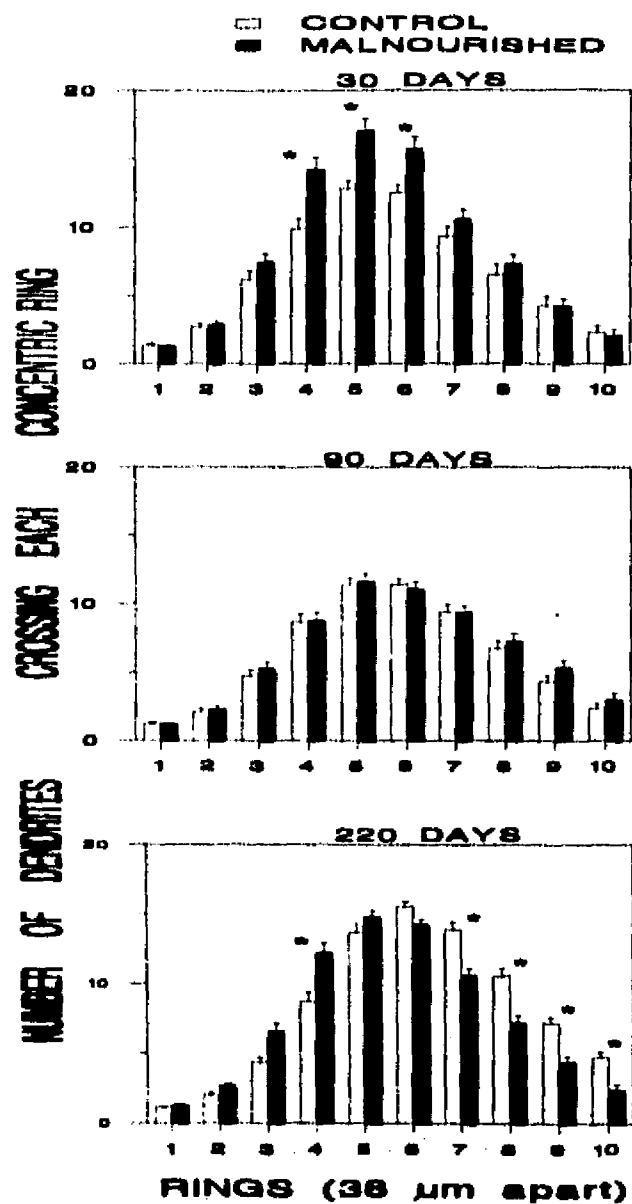


Fig. 5. Effects of pre- and postnatal 6 and 25% casein diets on number of dendritic intersections for each of 10 concentric rings (\pm S.E.M.) in rats of three ages. Note significant increase ($P < 0.05$) in dendritic density of malnourished rats at 30-days of age (black bars) crossing rings 4-6; and, significant decrease crossing rings 7-9, and 10 of 220-day-old malnourished rats.

because the low-protein diet was maintained until this age. Analysis of comparisons between ages revealed that the 30-day-old group presented the smallest somal size and 220-day-old controls the largest size. However, in the malnourished groups, the largest cellular size was found in 90-day-old animals (Table II, Fig. 3), indicating that malnutrition alters the normal developmental pattern shown by control animals.

The normal growth pattern of apical dendritic length shown by control animals was not disrupted in malnourished animals, in that 30-day animals exhibited the

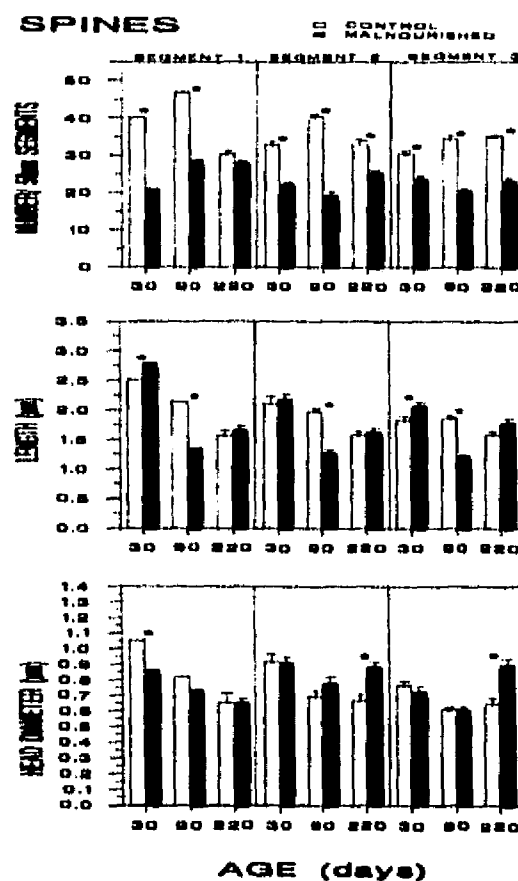


Fig. 6. Synaptic spine density, length and head diameter of CA3 hippocampal pyramidal cells (\pm S.E.M.) measured in three 50- μ m segments. Data for control groups are shown as white bars and for protein deprived rats as black bars (note that S.E.M. values are too small to be noticeable in every bar).

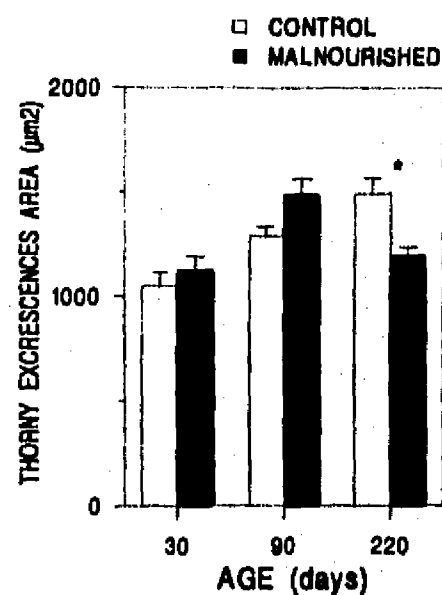


Fig. 7. Effects of low protein diet on thorny excrescence area of CA3 hippocampal pyramidal cells. Note significant decrease ($P < 0.05$) in 220-day-old malnourished rats.

shortest apical dendrite length whereas 220-day-old animals showed the longest. These data can be explained by existent neuronal heterocrony^{20,49,63}, i.e., the pyramidal cells have different maturation and development periods and, therefore, malnutrition does not affect all parts of CA3 hippocampal pyramidal cells at the same time.

For apical dendrite diameter, the two-way ANOVA showed significant interactions between diet and age, suggesting that the observed changes in diameter were due not only to age but also to diet. Analysis of comparisons between ages revealed that the control animals of 220 days of age showed the smallest value of apical dendrite diameter while, in the malnourished animals of 30 days old, there was a greater decrease in size which shows that malnutrition alters the normal maturational events. Comparisons between diets showed decreases of apical dendrite size in 30- and 90-day-old malnourished animals (Fig. 4), indicating a retardation of neuronal development^{1,5,11,35,36}.

The number of dendritic intersections showed significant increases in malnourished animals of 30 days (rings 4-6) and 220 days old (ring 4). However, spine density showed a significant decrease which was compensated by an increase in dendritic branching (Figs. 5,6). Nevertheless, previous studies have reported that pre- and postnatal malnourished rats show significant decreases in number of dendritic intersections in the cerebral cortex^{23,26}, in the frontal and visual cortex^{18,20}, in the dentate gyrus^{11,16}, in locus coeruleus¹⁷, in nucleus raphe dorsalis¹⁹. The discrepancy between previous results and the present study is probably due to the different experimental dietary protocols used. Further, each brain region reacts differently, some regions being more resistant than others. Additionally, neuronal heterocrony^{20,49,63} may play a role. Each brain region has different metabolic activity and the changes observed in neuronal elements may be secondary to metabolic changes initiated by dietary protein levels⁸. Moreover, Buell and Coleman in 1979 (quoted in Coleman and Flood¹²) suggested, with regard to age-related neuronal loss, that dendritic proliferation may represent a compensatory response of surviving neurons to the death of their close neighbors, therefore, another alternative which could explain our data is that a malnutritional insult induces a plastic response resulting in an increase in dendritic branching, so that the neuron can establish additional connections with other neurons, since it is known that one of the effects of malnutrition is the reduction in the number of nerve cells^{21,61} (e.g., in the hippocampus⁶ and the cerebellum^{25,50}).

With respect to synaptic spine density, control animals showed more spines in the first segment mea-

sured in the apical dendrite (Fig. 6) at 30 and 90 days. In this segment, mossy fibers are ontogenetically the first to develop. Malnutrition selectively affects this segment at the three ages studied (Fig. 6). The effect of protein deprivation on dendritic spine density is similar to those mentioned in previous studies for other brain regions^{8,11,13,16,17,19,23,26,50}. In addition, it has been demonstrated that the most altered cells are those involved in polysensory circuits and those that are phylogenetically more recent. Thus, Cintra and co-workers¹¹ showed an important reduction in the number of spines in granule cells of the dentate gyrus of pre- and postnatally malnourished animals, at the site of synapses with the perforant pathway. Therefore, the decreases found in CA3 pyramidal cells are not surprising. It has been postulated that CA3 pyramidal neurons are the main integrative substrate of hippocampal formation because of the pattern of their afferent and efferent fibers⁵⁶. This is the site of termination of the second limb of the hippocampal trisynaptic circuit, the circuit has been widely implicated as a substrate for learning and memory^{4,24,37,44,48,57}.

There are no previous studies on the length of the synaptic spines in hippocampal field CA3 in normal or malnourished animals. The present study was undertaken considering that the spines in CA3 pyramidal cells are particularly sensitive to other brain insults, e.g., alcohol^{22,29,52,62}. In our study, spine length showed a gradual decrease in control groups during development and maturation while in malnourished animals this pattern of development and maturation was disrupted, i.e., we found a significant increase in 30-day-old malnourished animals (Fig. 6, segments 1 and 3).

On the other hand, Schonheit and Haensel⁵⁴ found that long spines are immature and mushroom-shaped short spines are mature. In addition, they observed immature spines in 60-day-old malnourished animals. Hence, our results could indicate developmental retardation or neural plasticity mechanisms such as the increase in the length of spines in malnourished rats.

Analysis of the spine head diameter revealed a significant decrease at 30 days and a significant increase at 220 days of age (Fig. 6), suggesting both short- and long-term malnutrition effects. At 30 days of age, the maturational postsynaptic events that occur in synaptic spines are delayed during the neonatal period. In 220-day-old animals, there could be a different compensatory mechanism so that the spine head diameter is increased due to the reduced number of spines.

Results regarding the thorny excrescence areas in control groups showed a gradual tendency to increase (Fig. 7) with age (i.e., from 30- to 220-day-old animals). However, in malnourished groups, we observed a dif-

ferent tendency in that 90-day-old animals showed a larger area than 30- and 220-day-old malnourished animals. In the latter, there was a decrease with respect to the controls. We suggest that malnutrition not only affects normal CA3 pyramidal cell development but also that these malnutritional disruptions are dependent on the age of the animal. This consideration is important since, as has been suggested, field CA3 appears to be the major focus of integration of intrahippocampal activity⁵⁶. Moreover, it has been shown to play a role in spatial memory^{43,47}.

In agreement with the present work, electrophysiological and behavioral studies have shown a marked effect of malnutrition on the function of the hippocampal formation. Using a diet reversal at birth (i.e., 6/25% casein diet), Austin et al.³ have reported diminished ability to potentiate the synaptic component of long-term potentiation and Bronzino et al.^{9,10} showed alterations in the electrographic and behavioral correlates of induced seizure thresholds, longer after-discharge duration and inability or delay in obtaining complete kindling. In addition, Bedi^{6,7} observed that postnatal malnourished animals show deficits in spatial memory and learning abilities, probably due to alterations in synaptic efficacy¹⁵. The synaptic changes in CA3 described here might well underlie some deficiencies in these memory and learning abilities.

The present experiments showed that: (1) the malnutrition produced differential morphological changes on CA3 hippocampal pyramidal cells; (2) the protein-deprived rats fail to keep pace with maturational events seen in the control animals; (3) the low-protein groups presented a curtailed CA3 pyramidal cells' development; and (4) another dietary effect noted was for age-related changes observed in the control rats to be either curtailed or failing to occur in the low-protein rats.

Acknowledgments. This work was supported by NIH (HD-222539-04 and HD-23338-03) and DGAPA (IN-202891, IIB-UNAM). We are gratefully to P. Morgane and T. Kemper for their invaluable suggestions to the manuscript; to H. Olivera for his comments of this work; to A. Galván and A. Aguilar Vazquez for their technical assistance; and to I. Pérez Montfort for her inestimable style corrections.

REFERENCES

- Ahmed, M.G.E., Defi, M.A., Warren, M.A., Warren, M.A. and Kamel, M.M., Effect of a length period of undernutrition from birth and subsequent nutritional rehabilitation on the synapse: granule cell neuron ratio in the rat dentate gyrus, *J. Comp. Neurol.*, 263 (1987) 146-158.
- Andrade, J.P., Leite-Cadete, A., Madeira, M.D. and Paula-Barbosa, M.M., Long-term low-protein diet reduces the number of hippocampal mossy fiber synapses, *Exp. Neurol.*, 112 (1991) 119-124.
- Austin, K.H., Bronzino, J.D. and Morgane, P.J., Prenatal protein malnutrition affects synaptic potentiation in the dentate gyrus of rats in adulthood, *Brain Res.*, 29 (1986) 267-273.
- Barnes, A.C., Spatial learning and memory processes: the search for their neurobiological mechanisms in the rat, *Trends Neurosci.*, 11 (1988) 163-169.
- Barnes, D. and Altman, J., Effects of different schedules of early undernutrition on the preweaning growth of the rat cerebellum, *Exp. Neurol.*, 38 (1973) 406-419.
- Bedi, K.S., Effects of undernutrition in early life on granule cell numbers in the rat dentate gyrus, *J. Comp. Neurol.*, 311 (1991) 425-433.
- Bedi, K.S., Spatial learning ability of rats undernourished during early postnatal life, *Physiol. Behav.*, 51 (1992) 1001-1007.
- Brock, J.W. and Prasad, C., Alterations in dendritic spine density in the rat brain associated with protein malnutrition, *Dev. Brain Res.*, 66 (1992) 266-269.
- Bronzino, J., Austin-LaFrance, R.J., Siok, C.J. and Morgane, P.J., Effect of prenatal protein malnutrition on hippocampal kindling: electrographic and behavioral measures, *Brain Res.*, 384 (1986) 348-354.
- Bronzino, J.D., Austin-LaFrance, R.J. and Morgane, P.J., Effects of prenatal protein malnutrition on perforant path kindling in the rat, *Brain Res.*, 515 (1990) 45-50.
- Cintra, L., Díaz-Cintra, S., Galván, A., Kemper, T. and Morgane, P.J., Effects of protein undernutrition of the dentate gyrus in rats of three age groups, *Brain Res.*, 532 (1990) 271-277.
- Coleman, P.D. and Flood, D.G., Dendritic proliferation in the aging brain as a compensatory repair mechanism, *Prog. Brain Res.*, 70 (1986) 227-237.
- Cordero, M.E., Svalghit, A., Muzzo, S. and Brunser, O., Histological maturation of astroglial cells in the archiocortex of early malnourished rats, *Pediatr. Res.*, 16 (1982) 187-191.
- Corkidi, G., Système d'analyse de préparations histologiques par imagerie numérique: Histo 2000. Application à l'étude neuropathologique de la maladie de Parkinson. Thèse de Doctorat, Université Paris, Val de Marne, 1989.
- Desmond, N.L. and Levy, W.B., Anatomy of associative long-term synaptic modification. In P.W. Landfield and S.A. Deadwyler (Eds.), *Long-Term Potentiation: From Biophysics to Behavior*, Alan R. Liss, New York, NY, 1987, pp. 265-305.
- Díaz-Cintra, S., Cintra, L., Galván, A., Aguilar, A., Kemper, T. and Morgane, P.J., Effects of prenatal protein deprivation on postnatal development of granule cells in fascia dentata, *J. Comp. Neurol.*, 310 (1991) 356-364.
- Díaz-Cintra, S., Cintra, L., Kemper, T., Resnick, O. and Morgane, P.J., The effects of protein deprivation on the locus coeruleus: a morphometric Golgi study in rats of three age groups, *Brain Res.*, 304 (1984) 243-253.
- Díaz-Cintra, S., Cintra, L., Ortega, A., Kemper, T. and Morgane, P.J., Effects of protein deprivation on pyramidal cells of the visual cortex in rats of three age groups, *J. Comp. Neurol.*, 292 (1990) 117-126.
- Díaz-Cintra, S., Cintra, L., Kemper, T., Resnick, O. and Morgane, P.J., The effects of protein deprivation on the nucleus raphe dorsalis: a morphometric Golgi study in rats of three age groups, *Brain Res.*, 221 (1981) 243-245.
- Dobbing, J., Effects of experimental undernutrition on development of neurons system. In N.S. Scrimshaw and J.E. Gordon (Eds.), *Malnutrition, Learning and Behavior*, MIT Press, Cambridge, MA, 1968, pp. 181-202.
- Dobbing, J. and Sands, J., Vulnerability of development brain. IX. The effect of nutritional growth retardation on the timing of the brain growth-spurt, *Biol. Neonate*, 19 (1971) 363-378.
- Durand, D., Saint-Cyr, J.A., Gurevich, N. and Carlen, P.L., Ethanol-induced dendritic alterations in hippocampal granule cells, *Brain Res.*, 477 (1989) 373-377.
- Dyson, S.E. and Jones, E.O., Undernutrition and the developing nervous system, *Prog. Neurobiol.*, 7 (1976) 171-196.
- Eichenbaum, H. and Cohen, N.J., Representation in the hippocampus: What do hippocampal neurons code? *Trends Neurosci.*, 11 (1988) 244-248.

- 25 Fish, I. and Winick, M., Effect of malnutrition on regional growth and development of the developing rat brain, *Exp. Neurol.*, 25 (1969) 534-540.
- 26 Gambetti, P., Autilio-Gambetti, L., Rizzuto, N., Shaffer, B. and Pfaff, L., Synapses and malnutrition: quantitative ultrastructural study of rat cerebral cortex, *Exp. Neurol.*, 43 (1974) 464-473.
- 27 Goodlett, C.H.R., Valentino, M.L., Morgane, P.J. and Resnick, O., Spatial cue utilization in chronically malnourished rats: task-specific learning deficits, *Dev. Psychobiol.*, 19 (1986) 1-15.
- 28 Hirsch, E.C., Lejeune, O., Collot, G., Corkidi, G. and Tajani, M., Computer methods in nuclei cartography. In *Methods in Neurosciences*, Academic Press, New York, NY, 1992, pp. 62-79.
- 29 Hoff, S.F., Synaptogenesis in the hippocampal dentate gyrus: effects of in utero ethanol exposure, *Brain Res. Bull.*, 21 (1988) 47-54.
- 30 Jordan, T.C., Howells, K.F., McNaughton, N. and Heatlic, P., Effects of early undernutrition on hippocampal development and function, *Res. Exp. Med.*, 180 (1982) 201-207.
- 31 Katz, H.B. and Davies, C.A., The separate and combined effects of early undernutrition and environmental complexity at different ages on cerebral measures in rats, *Dev. Psychobiol.*, 16 (1983) 47-58.
- 32 Katz, H.B., Davies, C.A. and Dobbing, J., Effects of undernutrition at different ages early in life and later environmental complexity on parameters of the cerebrum and hippocampus in rats, *J. Nutr.*, 112 (1982) 1362-1368.
- 33 Laughlin, N.K., Sranley, F. and Bell, J., Early undernutrition and later hippocampal damage: effect of spontaneous behaviors and reversal learning, *Physiol. Psychol.*, 11 (1984) 268-277.
- 34 Levitsky, D.A. and Barnes, R.H., Effect of early malnutrition on the reaction of adult rats to aversive stimuli, *Nature (London)*, 225 (1970) 469-469.
- 35 Lewis, P., Balázs, R., Patel, A. and Johnson, A., The effect of undernutrition in early life on cell generation in the rat brain, *Brain Res.*, 83 (1975) 235-247.
- 36 Lewis, P.D., Nutrition and anatomical development of the brain. In N. VanGelder et al. (Eds.), *Malnutrition in the Infant Brain*, Wiley-Liss, New York, NY, 1990, pp. 89-109.
- 37 Lynch, G., Muller, D., Seubert, P. and Larson, L., Long-term potentiation: persisting problems and recent results, *Brain Res. Bull.*, 21 (1988) 363-372.
- 38 McConnell, P. and Berry, M., The effect of refeeding after varying periods of neonatal undernutrition on the morphology of Purkinje cells in the cerebellum of the rat, *J. Comp. Neurol.*, 200 (1981) 463-479.
- 39 McConnell, P. and Berry, M., The effects of undernutrition on Purkinje cell dendritic growth in the rat, *J. Comp. Neurol.*, 177 (1978) 159-171.
- 40 Morgane, P.J., Austin-LaFrance, R., Bronzino, J., Tonkiss, J., Díaz-Cintra, S., Cintra, L., Kemper, T. and Galler, J.R., Prenatal malnutrition and development of the brain, *Neurosci. Biobehav. Rev.*, 17 (1993) 91-128.
- 41 Morgane, P.J., Austin-LaFrance, Bronzino, J.D., Tonkiss, J. and Galler, J.R., Malnutrition and the developing central nervous system. In R.L. Isaacson and K.F. Jensen (Eds.), *The Vulnerable Brain and Environmental Risks*, Plenum, New York, NY, 1992, pp. 3-44.
- 42 Morgane, P.J., Miller, M., Kemper, T., Stern, W., Forbes, W., Hall, R., Bronzino, J. and Kissane, J., The effects of protein malnutrition on the developing nervous system in the rat, *Neurosci. Biobehav. Rev.*, 2 (1978) 137-230.
- 43 Morris, R.G.M., Garrad, P., Rawlins, J.N.P. and O'Keefe, J., Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions, *Nature (London)*, 297 (1982) 681-683.
- 44 Morris, R.G.M., Schenk, F., Tweedie, F. and Jarrad, L.E., Ibotenate lesions of hippocampus and or subiculum: dissociating components of allocentric spatial learning, *J. Neurosci.*, 2 (1990) 1016-1028.
- 45 Nafstad, P.H., An electron microscope study of termination of perforant path fibers in the hippocampus and the fascia dentata, *Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat.*, 76 (1967) 532-542.
- 46 Norusis, M.J., *SPSS Update Manual and Statistical Guide*, 1988.
- 47 Olton, D.S., Walker, J.A. and Gage, F.H., Hippocampal connections and spatial discrimination, *Brain Res.*, 139 (1978) 295-308.
- 48 O'Keefe, J. and Nadel, L., *The Hippocampus as a Cognitive Map*, Oxford University Press, Oxford, UK, 1978.
- 49 Patel, A., Undernutrition and brain development, *Trends Neurosci.*, 6 (1983) 151-154.
- 50 Paula-Barbosa, M.M., Andrade, J.P., Castedo, J.L., Azevedo, F.P., Comoes, I., Voght, B. and Tavares, M.A., Cell loss in the cerebellum and hippocampal formation in adult rats after long-term low-protein diet, *Exp. Neurol.*, 103 (1989) 186-193.
- 51 Paula-Barbosa, M.M., Tavares, M.A., Borges, M.M. and Gray, E.G., Presynaptic inclusions in mossy fiber terminals of the cerebellar cortex following long-term undernutrition in adult rats, *J. Neurocytol.*, 13 (1984) 841-847.
- 52 Riley, J.N. and Walker, D.W., Morphological alterations in hippocampus after long-term alcohol consumption in mice, *Science*, 201 (1978) 646-648.
- 53 Safas, M., Diaz, S. and Nieto, A., Effects of neonatal food deprivation on cortical and dendritic development of the rat, *Brain Res.*, 73 (1974) 139-144.
- 54 Schönheit, B. and Haensel, P., Neurohistological study of the dendrites of lamina V-pyramidal neurons of the rat following recovery from postnatal malnutrition, *J. Hirnforsch.*, 30 (1989) 385-397.
- 55 Sholl, D.A., *The Organization of the Neurons in the Cerebral Cortex*, Hafner, New York, NY, 1956.
- 56 Swanson, L.W. and Cowan, W.M., Autoradiographic studies of the organization of the efferent connections of the hippocampal formation in the rat, *J. Comp. Neurol.*, 172 (1977) 49-84.
- 57 Teyler, T.J. and DiScenna, P., The topographical anatomy of the hippocampus: a clue to its function, *Brain Res. Bull.*, 12 (1984) 711-719.
- 58 Tonkiss, J. and Galler, J.R., Prenatal protein malnutrition and working memory performance in adult rats, *Behav. Brain Res.*, 40 (1990a) 95-107.
- 59 Tonkiss, J., Cohen, C.A. and Sparber, S.B., Different methods for the producing neonatal undernutrition in rats cause different brain changes in the face of equivalent somatic growth parameters, *Dev. Neurosci.*, 10 (1988) 141-151.
- 60 Warren, M.A. and Bedi, K.S., A quantitative assessment at development of synapses and neurons in the visual cortex of control and undernourished rats, *J. Comp. Neurol.*, 227 (1981) 104-108.
- 61 West, C.D. and Kemper, T., The effect of low protein diet on the anatomical development of the rat brain, *Brain Res.*, 107 (1976) 221-237.
- 62 Wigal, T. and Amsel, A., Behavioral and neuroanatomical effects of prenatal, postnatal, or combined exposure to ethanol in weaning rats, *Neuroscience*, 104 (1990) 116-126.
- 63 Winick, M. and Noble, A., Cellular response in rats during malnutrition at various ages, *J. Nutr.*, 89 (1966) 300-306.

PARTE III

**EFFECTS OF PRENATAL MALNUTRITION AND POSTNATAL
NUTRITIONAL REHABILITATION ON CA3 HIPPOCAMPAL
PYRAMIDAL CELLS IN RATS OF FOUR AGES**

by

Sofía Díaz-Cintra^a, Mayra García-Ruiza, León Cintra^a and Gabriel Corkidib.

**a Centro de Neurobiología, UNAM, Ciudad Universitaria, México 04510,
D.F., México.**

**b Centro de Instrumentos, UNAM, Ciudad Universitaria, México 04510,
D.F., México.**

**Keywords: Protein malnutrition, Hippocampus, CA3 pyramidal cells,
Morphometric Golgi study, Malnutrition and hippocampal formation.**

Request for reprints should be directed to:

**Dra. Sofía Díaz-Cintra
Centro de Neurobiología PO BOX 70-228, UNAM,
Ciudad Universitaria, México 04510, D.F., México.
Fax Number: (525) 622-3839.**

(Enviado a Brain Research)

ABSTRACT

The effects of prenatal protein malnutrition and postnatal nutritional rehabilitation on CA3 hippocampal pyramidal cells were investigated in rats of 15, 30, 90 and 220 days of age. Female rats were fed either 6% or 25% casein diet 5 wk before conception. Following delivery, litters born the same day to 6% and 25% casein diet rats were randomly cross-fostered to 25% casein diet dams and maintained on that diet until sacrificed. In 288 rapid-Golgi impregnated cells, we measured somal size, length of the longest apical dendrite, number of apical and basal dendrites intersecting 10 concentric rings 38 μm apart, synaptic spine density in three 50 μm segments of the longest apical dendrite and the thorny excrescence area. Prenatal protein malnutrition produced differential morphological changes on CA3 pyramidal cells. We observed significant decreases of somal size (at 90 and 220 days of age), of length of apical dendrites (at 15 days old), of apical (in 15 day animals) and basal (in 15, 90 and 220 day animals) dendritic branching and of spine density (in 30, 90 and 220 day animals). We also found significant increases of apical dendritic branching in 90 and 220 day old rats. These results indicate that prenatal protein malnutrition affects normal development and produces long-term effects on CA3 pyramidal cells.

INTRODUCTION

It is widely accepted that the proper maturation of the brain and development of optimal mental capacities depends on three critical factors, namely: a) genetics, b) complexity and degree of environmental stimulation and c) adequate and balanced nutrition⁴². With regard to the nutritional factor, it is well known that malnutrition alters neurophysiological functions and anatomy^{35,39} the degree of severity of the damage depends largely -among other factors- on the timing of the insult. One of the most vulnerable periods for the effects of malnutrition on the brain is during gestation^{16,42,43,55}.

A brain region particularly affected by undernutrition during early life is the hippocampal formation^{1,6,5,7,10,18,22,30,36,42,43,51}. For instance, a severe decrease in hippocampal DNA, reflecting a decrease in cell number, is produced by early life malnutrition^{29,36,50}. Specifically, reduced cell numbers in hippocampal areas CA1, CA3, CA4 and dentate gyrus have been reported^{33,40}. Our previous morphological studies on the dentate gyrus have revealed that prenatal malnutrition results in long-term alterations on granule cells, such as decreases in somatic size, dendritic density and spine density²².

Moreover, several studies have shown alterations in neuronal plasticity of the hippocampal formation in malnourished rats as measured by changes in long-term potentiation and kindling^{6,14,15}. Disruptions in learning and spatial memory (processes in which the hippocampus has been implicated⁴⁵) have also been shown following prenatal nutritional deprivation^{28,31,37,48,58-61}.

The present study was designed to examine the effects of prenatal protein malnutrition and postnatal nutritional rehabilitation on CA3 hippocampal pyramidal cells in rats of four ages. We selected the gestation period to institute protein malnutrition because there is evidence^{22,36,42,43} of the importance of prenatal undernutrition on the postnatal development of the hippocampus.

The CA3 pyramidal cells were selected because they are an essential link in the hippocampal trisynaptic circuit. The hippocampal formation has been implicated as substrate for learning and spatial memory^{8,27,41,46,48,49,57}.

MATERIALS AND METHOD

Animals

Virgin female and male Charles River C.D. Sprague-Dawley descended rats were used for breeding. Female rats, weighing 250 to 300 grams on arrival, were housed 3 to a cage. Males were housed in individual cages. They were maintained in automatically controlled animal rooms at a temperature of 22-24°C., humidity between 40 and 50%, and a 12:12 dark-light cycle. Food and water were provided *ad libitum*. During the 5 wk period before breeding, 6 female rats were fed a 6% casein diet while 6 control rats were fed a 25% casein diet. Body weight was measured every third day. Rats were mated after a 5 wk period of adaptation to the diet. One male, fed a standard rat chow diet, was introduced into each cage containing 3 females. Vaginal smears were obtained each morning to detect when mating had occurred⁶².

One week prior to expected parturition, all sperm-positive females were placed in nesting cages (48 x 27 x 16cm) with adequate clean nesting material. Following delivery, litters born the same day to 6% and 25% casein diet rats were weighed and sexed, and 4 females and 4 males were randomly cross-fostered to a 25% casein diet dam. This resulted in 6 litters with eight 6% casein diet pups cross-fostered to a 25% casein diet dam (6/25% diet protocol), and 6 litters with 8 pups on the 25% casein diet (25/25% diet protocol).

Histological Procedure

At 15, 30, 90 and 220 days of age a total of 48 males, 24 on the 25/25% casein diet and 24 on the 6/25% diet, were anesthetized with pentobarbital, perfused through the heart with 10% neutral buffered formalin and the brains were removed the following day. Thus, we obtained 6 rats from each diet group from each of the 4 age groups. From each rat's brain a 4 mm-wide block containing the hippocampal formation was removed and impregnated using the rapid Golgi method as modified by Díaz-Cintra et al.²⁴. The blocks were embedded in low viscosity nitrocellulose, serially cut in the frontal (septo-temporal) plane of the hippocampal formation at a thickness of 120 μ m and mounted in serial order. Each slide was assigned a random number to ensure that observations were blind with respect to diet and age. From each histological section, one complete, well-impregnated CA3 pyramidal cell was selected, the somata of these cells were localized in the anterior two-thirds of the *regio inferior*, i.e., in the CA3b subfield. These pyramidal cells exhibited spines, identified as thorny excrescences⁵², only on the apical dendrites.

The length of apical dendrites of the CA3 neuron was determined following their trajectory -until possible- toward the *stratum lacunosum-moleculare*³⁰ within the 120 μ m section. The first bifurcation of the apical dendrite was localized approximately at 50 μ m away from the cell body. The thorny excrescences, which are postsynaptic sites of mossy fibers, were clearly visible. Thus, we examined a total of 288 neurons, 36 of each age and diet group.

Morphometric Analysis

On each CA3 pyramidal cell chosen for study, the following parameters were measured³⁰:

a) Perimeter, major axis and minor axis of the perikaryon and thorny excrescence area using a 40X objective.

b) Length of the apical dendrite (using 10X objective)

c) The number of apical and basal dendrites crossing each concentric ring according to the method by Sholl⁵³, using a 25X objective (Fig. 1B). The percentage of dendritic segments transected by the microtome was less than 20% in the 8 different age-diet groups studied.

d) Density of synaptic spines was counted on three 50 μm dendrite segments (localized in the *lucidum* layer) as shown in Figure 1C (using a 40X planapochromatic oil objective). All these measurements were performed with an imaging system.

The imaging system, viz., HISTO 2000 (by Biocom, France) used in this study was developed by Corkidi²¹ and Hirsch et al.³² and described elsewhere³⁰.

Somal size (using a 40X objective), dendrite length (using a 10X objective) and thorny excrescence area (using 40X objective) of pyramidal cells were outlined on a computer monitor from the microscope using a cursor for morphometric analysis. To obtain dendritic density with an objective of 4X, a mask of 10 concentric rings (38 μm apart) was created (Fig. 1B) with the imaging system. Then, using a 25X objective, the number of dendrites crossing each concentric ring was determined. To measure the density of synaptic spines, another mask of three separated circles of 50 μm diameter was generated and with a planapochromatic oil objective of 40X the number of synaptic spines of each 50 μm segment was determined (Fig. 1C).

Statistics

Statistical analysis was performed using the SPSS version 34⁷. The tests used were two-way ANOVA (at probability values of $p < 0.05$, $p < 0.01$ and $p < 0.001$), one-way ANOVA and Tukey Ranges (at probability value of $p < 0.05$).

RESULTS

The results of the two-way ANOVA are shown in Table 1. There were no significant diet effects in perimeter and major axis, but significant changes by age and interaction between age and diet were observed ($p < 0.01$ and $p < 0.05$). In contrast, a significant ($p < 0.001$) diet effect was only found on the minor axis.

With respect to dendritic length there was no effect of diet. However, we found significant age and interactions between diet and age effects ($p < 0.001$).

The number of apical dendrites (measured in 10 concentric rings) showed significant diet effects from the 2nd to the 5th concentric rings ($p < 0.01$ and $p < 0.001$). Significant age effects in all concentric rings ($p < 0.01$ and $p < 0.001$), and significant interaction between both from the 4th to the 8th concentric rings ($p < 0.05$, $p < 0.01$ and $p < 0.001$, see Table 1).

The number of basal dendrites showed significant changes by diet (i.e., from the 1st to the 4th, $p < 0.05$, $p < 0.01$ and $p < 0.001$), age (from 1st to 7th, $p < 0.001$) and interaction between both (from 3th-6th rings, $p < 0.05$, $p < 0.01$ and $p < 0.001$, see Table 1).

All synaptic spine measurements in the three 50 μm segments except in segment 3, showed significant diet and age effects as well as an interaction between both ($p < 0.001$).

The thorny excrescence area only showed significant changes by age ($p < 0.001$, Table 1).

Comparisons between ages.

Comparisons between ages are shown in Table 2 for control groups (C), and in Table 3 for rehabilitated groups (R). These tables show the percentage of change between groups.

With respect to control groups, we found significant changes (Tukey test $p < 0.05$) in neuron size, i.e., in the perimeter (30 vs. 220C and 90 vs. 220C) and in the major axis (30 vs. 220C); the dendritic length showed increases in 15 day-old animals (with respect to 30 and 90 day-old animals) and decreases in 30 vs. 220C and 90 vs. 220C. The number of apical dendritic intersections showed significant reductions ($p < 0.05$) in rings 2 and 3 (15 vs. 30C) and in rings 6-10 (15 vs. 220C, 30 vs. 220C and 90 vs. 220C). The basal dendrites showed a distinct tendency, namely, we found not only significant decreases ($p < 0.05$) in rings 2 (15 vs. 90 and 220C) and 4-7 (15 vs. 90C) and in rings 3 (30 vs. 90 and 220C) and 4-7 (30 vs. 90C), but also significant increases ($p < 0.05$) in rings 4-7 (90 vs. 220C, Table 2). Significant age effects ($p < 0.05$) were found in the density of synaptic spines in all comparisons, except 30 vs. 220C in segment 2 and 90 vs. 220C in segment 3 (Table 2). The thorny excrescence area showed significant age-related differences in all comparisons, except 15 vs. 30C and 90 vs. 220C.

With respect to dietary rehabilitated groups (6/25%) we also observed age changes (Table 3). The major axis showed significant increases ($p < 0.05$) in two comparisons (15 vs. 90R and 15 vs. 220R). The length of the longest apical dendrite showed an increase (15 vs. 90R) as well as decreases (15 vs. 220R, 30 vs. 220R and 90 vs. 220R, Table 3). The number of apical dendrites displayed decreases in 15 day-old animals in rings 2-10 (15 vs. 30R) and in 4-10 (15 vs. 90 and 220R), however in 30 day-old rats there were increases in ring 2 (30 vs. 90 and 220R) as well as decreases in rings 6-7 (30 vs. 220R). Basal dendrites showed increases in rings 2-3 (15 vs. 30R), 4-5 (30 vs. 220R) and 3-6 (90-220R), and decreases in rings 2-5 (15 vs. 90), 2-

3 (15 vs. 220R) and 3-4 (30 vs. 90R; Table 3). The synaptic spine density showed significant age effects in almost all comparisons, i. e., decreases in 15 vs. 30R (in three segments), in 15 vs. 90R (segment 3), in 30 vs. 90 and 220R (in segment 1), and in 90 vs. 220R (in segment 2), and increases 15 vs. 90 (in segment 1) and 15 vs. 220R (segments 1 and 2; Table 3). The thorny excrescence area displayed significant age changes in all comparisons, except the 15 vs. 30R and 90 vs. 220R.

Comparisons between diets.

The effects of prenatal malnutrition on the measured parameters are shown graphically in Figs. 2-6.

As shown in Fig. 2 the effect of prenatal malnutrition was manifested as significant reductions ($p < 0.05$) in the perimeter (11%) and major axis (12%) in animals of 220 days of age, and in minor axis (10%) in 90 day old rats.

The length of the longest apical dendrite showed a significant decrease in prenatal malnourished rats of 15 days of age (16%, $p < 0.05$; Fig. 3).

Apical dendrite measurements of rehabilitated animals showed significant decreases ($p < 0.05$) in rings 5 (22%) and 6 (24%) in animals of 15 days of age (Fig. 4), and significant increases in rings 4 (26%), 5 (26%) and 6 (21%, in 90 day old rats), and 4 (26%) and 5 (17%) in 220 day old animals (Fig. 4).

Fig. 5 shows the results of basal dendrites, significant decreases in ring 3 (29%, at 15 days), in ring 6 (39%, at 90 days) and in rings 3 (21%) and 4 (23%, at 220 days of age).

Fig. 6 shows the effects of prenatal malnutrition on spine density. There were significant reductions ($p < 0.05$) in the 3 measured segments in animals of 30 days of age (17, 14 and 12%, respectively). In rats of 90 (in segment 1) and 220 (segment 2) days there were significant decreases (19% and 10%, respectively). Taking together the results of the 3 segments (i.e., the whole thorny excrescence area), it was possible

to observe significant reductions ($p < 0.05$) in four ages studied (right side graph). The thorny excrescence area showed no significant diet changes.

DISCUSSION

This study shows that prenatal protein malnutrition produces significant morphological alterations in CA3 hippocampal pyramidal cells. Almost all morphometric parameters measured show changes in the protein deprived rats, namely cell size, dendrite length, complexity of dendritic branching and density of synaptic spines, but not in the thorny excrescence area.

Cell size (i.e., perimeter major and minor axes) exhibited a significant decrease in 90 and 220 day-old malnourished rats (Fig. 2), indicating that the effect of prenatal malnutrition dependent on animal age. There is evidence from other studies, that the effect of malnutrition is more severe at older ages^{1,51,63}. In agreement with these findings, Fig. 2 shows that the deficits in morphometric measurement are correspondingly more severe at older ages. Moreover, the fact that not only the perimeter but also the major and minor axis have been modified by low-protein diet, shows that the morphology of CA3 pyramidal cells is being altered by prenatal malnutrition and, as a consequence, the normal functioning of these cells could be disrupted. Furthermore, postnatal nutritional rehabilitation is not sufficient to compensate for the prenatal insult. Analysis of comparisons between ages showed, in control animals, that the 220 day old group presented the longest cellular size (Table 2), while in rehabilitated groups the longest one was found in 15 day old animals (Table 3). These results indicate that prenatal protein malnutrition alters the normal developmental pattern shown by control animals³⁰.

The normal growth pattern of apical dendritic length shown by control animals was not disrupted by prenatal malnutrition (Fig. 3). However, there was a significant decrease in the dendritic length of 15 day-old rehabilitated rats, suggesting that the

observed change in length is due not only to age but also to the diet as shown by the significant interaction found in the two-way ANOVA (Table 1). It appears that, in 15 day-old animals, the rehabilitation period is too short to compensate for the prenatal insult in this parameter.

The effects of prenatal malnutrition and postnatal nutritional rehabilitation in the number of apical dendritic intersection were manifested both as significant decreases in 15 day-old animals, and significant increases in 90 and 220 day-old rats (Fig. 4). The deficit in the protein-deprived rats at 15 days was associated with the retardation of neuronal development produced by malnutrition^{1,9,18,22,39}. The increases in dendritic branching shown by 90 and 220 day-old rehabilitated animals were interpreted as a compensatory mechanism for the significant decreases found in spine density. On the other hand, it is known that one effect of malnutrition is the reduction in the number of nerve cells, e.g., in the hippocampus¹⁰ and the cerebellum^{29,51}. Therefore, dendritic proliferation could represent a plastic response by which the neuron can establish additional connections with other neurons^{19,30}.

The number of basal dendritic intersections showed significant decreases in 15 and 220 day-old rehabilitated rats (Fig. 5). These basal dendrites are the sites where commissural fibers and GABAergic cells synapse. Therefore, the reductions in these ramifications could represent deficits in the functional integrity of field CA3, since it has been suggested that CA3 appears to be the major focus of integration of intrahippocampal activity⁵⁶, and has been implicated as one of the substrates for learning and memory^{8,27,41,46,48}. In this context, Morgane et al.⁴⁴ and Bronzino et al.¹³, found that the establishment and maintenance of long-term potentiation in granule cells -which synapse in CA3- were altered in prenatally malnourished rats, suggesting possible consequences for learning and memory processes. In addition, several behavioral studies have shown that malnutrition produces deficits in spatial memory and learning abilities^{11,31,34,38,54,59}. The morphological alterations found in

dendritic branching of CA3 pyramidal cells might indicate some deficiencies in the integration of these learning processes.

The synaptic spine density showed considerable decreases. When the 3 segments together were analyzed (Fig. 6), we observed significant deficits in all ages studied, suggesting that prenatal protein malnutrition produces long-term effects. On the other hand, Altman^{2,3} has shown that alterations on hippocampal formation lead to hyperactive behavior and learning disabilities. Therefore, the deficits found in spine density could imply deficiencies in the integration of these processes. Furthermore, the segments in which spine density was measured are the sites where mossy fibers of granule cells synapse. Because it has been shown that prenatal malnutrition produces severe reductions in the mossy fiber plexus¹⁷, the deficits found in thorny excrescences could reflect a delay in the time course of synaptogenesis with mossy fibers. In addition, Amaral and Dent⁴ have postulated that mossy fibers play an important role in inducing the development of these thorny excrescences. Therefore, it appears that the normal sequence of maturation of hippocampal cells and synapses is being disrupted by prenatal malnutrition.

The effects of protein deprivation on dendritic spine density are similar to those mentioned in previous studies^{12,20,22,23,30,51}.

The thorny excrescence area was not affected by prenatal protein malnutrition, probably due to existent neuronal heterocrony^{25,26,50,64}, i.e., the pyramidal cells have different development and maturation periods, therefore, malnutrition could not affect all parts of the CA3 neurons at the same time.

The present results emphasize the important role of prenatal malnutrition on the postnatal development of the brain.

Acknowledgments. This work was supported by NIH (HD-222539-04 and HD-23338-03) and DGAPA (IN-202891, IN-204892 and IN-204093, IIB-UNAM). The authors are grateful to Dr. Peter Morgane for his invaluable suggestions, to M.Sc. Agustín Galván, B.Sc. Azucena Aguilar and B.Sc. Leticia Parra for their technical assistance and to B.Sc. Isabel Pérez Montfort for her inestimable style corrections.

REFERENCES

- 1 Ahmed, M.G.E., Bedi, K.S., Warren, M.A. and Kamel, M. M., Effect of a lengthy period of undernutrition from birth and subsequent nutritional rehabilitation on the synapse: Granule cell neuron ratio in the rat dentate gyrus, *J. Comp. Neurol.*: 263 (1987) 146-158.
- 2 Altman, J., Morphological and behavioral markers of environmentally induced retardation of brain development: An animal model, *Environ. Health Perspectives* 74 (1987) 153-168
- 3 Altman, J., An animal model of minimal brain dysfunction. In Lewis, M. (Ed.), *Learning Disabilities and Prenatal Risk*, Urbana Univ. Illinois Press, 1986, pp. 241-304.
- 4 Amaral, D. and Dent, J., Development of the mossy fibers on the dentate gyrus: I. A light and electron microscopic study of the mossy fibers and their expansions, *J. Comp. Neurol.*, 195 (1981) 51-86.
- 5 Andrade, J.P., Leite-Cadete, A., Madeira, M.D. and Paula-Barbosa, M. M., Long-term low-protein diet reduces the number of hippocampal mossy fiber synapses, *Exp. Neurol*, 112 (1991) 119-124.
- 6 Austin-LaFrance, R.J., Bronzino, J.D. and Morgane, P.J., Prenatal protein malnutrition affects synaptic potentiation in the dentate gyrus of rats in adulthood, *Brain Research*, 29 (1986) 267-273.
- 7 Austin, K.B., Beiswanger, C., Bronzino, J.D, Austin-LaFrance, R.J., Galler, J, R., Morgane, P.J., Prenatal protein malnutrition alters behavioral state modulation of inhibition and facilitation in the dentate gyrus, *Brain Research Bulletin*, 28 (1992) 245-255.
- 8 Barnes, A.C., Spatial learning and memory processes: the search for their neurobiological mechanisms in the rat, *Trends Neurosci.*, 11 (1988) 163-169.

- 9 Barnes, D. and Altman, J., Effects of different schedules of early undernutrition on the preweaning growth of the rat cerebellum, *Exp. Neurol.*, 38 (1973) 406-419.
- 10 Bedi, K.S., Effects of undernutrition in early life on granule cell numbers in the rat dentate gyrus, *J. Comp. Neurol.*, 311 (1991) 425-433.
- 11 Bedi, K.S., Spatial learning ability of rats undernourished during early postnatal life, *Physiol. Behav.*, 51 (1992) 1001-1007.
- 12 Brock, J.W. and Prasad, C.h., Alterations in dendritic spine density in the rat brain associated with protein malnutrition, *Dev. Brain Res.*, 66 (1992) 266-269.
- 13 Bronzino, J., Hasaballah, R.J., Austin-LaFrance, and Morgane, P.J., Ontogeny of long-term potentiation, Abstract number 546.7 of Society for Neurosciences 23rd Annual Meeting, Washington, D.C. USA, 1993 pp. 1324.
- 14 Bronzino, J., Austin-La France, R., Morgane, P.J., Galler, J., Effects of prenatal protein malnutrition on kindling-induced alterations in dentate granule cell excitability. I. Paired-pulse measures, *Exp. Neurol.* 112 (1991) 216-223.
- 15 Bronzino, J.D., Austin-LaFrance, R.J. and Morgane, P.J., Effects of prenatal protein malnutrition on perforant path kindling in the rat, *Brain Research*, 515 (1990) 45-50.
- 16 Bush, M. and Leathwood, P.D., Effects of different regimens of early malnutrition on behavioral development and avoidance learning in Swiss white mice, *Br. J. Nutr.*, 33 (1975) 373-385.
- 17 Cintra, L., Granados, L., Díaz-Cintra, S., Kemper, T. and Morgane, P., Effects of prenatal malnutrition and postnatal nutritional rehabilitation on the dentate gyrus of the rat, Abstract number 548.7 of Society for Neurosciences 22nd Annual Meeting, Anaheim, Cal. USA, 1992 pp. 1300.

- 18 Cintra, L., Díaz-Cintra, S., Galván, A., Kemper, T. and Morgane, P.J., Effects of protein undernutrition of the dentate gyrus in rats of three age groups, *Brain Research*, 532 (1990) 271-277.
- 19 Coleman, P.D. and Flood, D.G., Dendritic proliferation in the aging brain as a compensatory repair mechanism, *Progress in Brain Research*, 70 (1986) 227-237.
- 20 Cordero, M.E., Svaighft, A., Muzzo, S. and Brunser, O., Histological maturation of astroglial cells in the archiocortex of early malnourished rats, *Pediatr. Res.*, 16 (1982) 187-191.
- 21 Corkidi, G., Système d'analyse de préparations histologiques par imagerie numérique: Histo 2000. Application a l'étude physiopathologique de la maladie de Parkinson. *These de Doctorat*, Université Paris, Val de Marne, 1989.
- 22 Díaz-Cintra, S., Cintra, L., Galván, A., Aguilar, A., Kemper, T. and Morgane, P.J., Effects of prenatal protein deprivation on postnatal development of granule cells in fascia dentata., *J. Comp. Neurol.*, 310 (1991) 356-364.
- 23 Díaz-Cintra, S., Cintra, L., Kemper, T., Resnick, O. and Morgane, P.J., The effects of protein deprivation on the locus coeruleus: A morphometric Golgi study in rats of three age groups, *Brain Research*, 304 (1984) 243-253.
- 24 Díaz-Cintra, S., Cintra, L., Kemper, T., Resnick, O. and Morgane, P.J., The effects of protein deprivation on the nucleus raphe dorsalis: A morphometric Golgi study in rats of three age groups, *Brain Research*, 221 (1981) 243-245.
- 25 Dobbing, J., Effects of experimental undernutrition on development of neurons system. In N.S. Scrimshaw and J.E. Gordon (Eds.), *Malnutrition, Learning and Behavior*, MIT Press, Cambridge, MA, 1968, pp. 181-202.
- 26 Dobbing, J. and Sands, J., Vulnerability of development brain. IX. The effect of nutritional growth retardation on the timing of the brain growth-spurt, *Biol. Neonate*, 19 (1971) 363-378.

- 27 Eichenbaum, H. and Cohen, N.J., Representation in the hippocampus: What do hippocampal neurons code?, *Trends Neurosci.*, 11 (1988) 244-248.
- 28 Franková, S. and Barnes, R.H., Effect of malnutrition in early life on avoidance conditioning and behavior of adult rats, *J. Nutr.*, 95 (1968) 485-493.
- 29 Fish, I. and Winick, M., Effect of malnutrition on regional growth and development of the developing rat brain, *Exp. Neurol.*, 25 (1969) 534-540.
- 30 García-Ruiz, M., Díaz-Cintra, S., Cintra, L. and Corkidi, G., Effect of protein malnutrition on CA3 hippocampal pyramidal cells in rats of three ages, *Brain Research*, 625 (1993) 203-212.
- 31 Goodlett, C.H.R., Valentino, M.L., Morgane, P.J. and Resnick, O., Spatial cue utilization in chronically malnourished rats: Task- specific learning deficits, *Dev. Psychobiol.*, 19 (1986) 1-15.
- 32 Hirsch, E.C., Lejeune, O., Colliot, G., Corkidi, G. and Tajani, M., Computer methods in nuclei cartography. In (Eds.), *Methods in Neurosciences*, Academic Press, New York, 1992, pp. 62-79.
- 33 Jordan, T.C., Howells, K.F., McNaughton, N. and Heatlie, P., Effects of early undernutrition on hippocampal development and function, *Res., Exp. Med.*, 180 (1982) 201-207.
- 34 Jordan, T.C., Cane, S.E. and Howells, K.F., Deficits in spatial memory performance induced by early undernutrition, *Dev. Psychobiol.*, 14 (1981) 317-325.
- 35 Katz, H.B. and Davies, C.A., The separate and combined effects of early undernutrition and environmental complexity at different ages on cerebral measures in rats, *Dev. Psychobiol.*, 16 (1983) 47-58.
- 36 Katz, H.B., Davies, C.A. and Dobbing, J., Effects of undernutrition at different ages early in life and later environmental complexity on parameters of the cerebrum and hippocampus in rats., *J. Nutr.*, 112 (1982) 1362-1368.

- 37 Laughlin, N.K., Sranley, F. and Bell, J., Early undernutrition and later hippocampal damage: effect of spontaneous behaviors and reversal learning, *Physiol. Psychol.*, 11 (1984) 268-277.
- 38 Levitsky, D.A., Malnutrition and animal models of cognitive development. In Serban, G. (Ed.), *Nutrition and Mental Function*, Plenum Press, New York, 1975 pp. 75-89.
- 39 Lewis, P.D., Balázs, R., Patel, A. and Johnson, A., The effect of undernutrition in early life on cell generation in the rat brain, *Brain Research*, 83 (1975) 235-247.
- 40 Lewis, P.D., Patel, J.A. and Balazs, R., Effect of undernutrition on cell generation in the rat hippocampus, *Brain Research*, 168 (1979) 186-189.
- 41 Lynch, G., Muller, D., Seubert, P. and Larson, L., Long-term potentiation: persisting problems and recent results, *Brain Research Bull.*, 21 (1988) 363-372.
- 42 Morgane, P.J., Austin-LaFrance, R., Bronzino, J., Tonkiss, J., Díaz- Cintra, S., Cintra, L., Kemper, T. and Galler, J.R., Prenatal malnutrition and development of the brain, *Neurosci. Biobehav. Rev.*, 17 (1993) 91-128.
- 43 Morgane, P.J., Austin-LaFrance R.J., Bronzino, J.D., Tonkiss, J., Galler, J., Malnutrition and the developing nervous system. In Isaacson, R. and Jensen (Eds.) *The vulnerable brain and enviromental risks*, vol. 1 Malnutrition and Hazard assesment, Plenum Press, New York 1992a pp. 3-44.
- 44 Morgane, P.J., Austin-LaFrance R.J. and Bronzino, J.D., Impact of prenatal protein malnutrition on long-term potentiation in juvenile rats, Abstract number 548.10 of Society for Neurosciences 22nd Annual Meeting, Anaheim, Cal. USA, 1992b pp. 1301.
- 45 Morris, R.G.M., Garrad, P., Rawlins, J.N.P. and O'Keefe, J., Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions, *Nature*, 297 (1982) 681-683.

- 46 Morris, R.G.M., Schenk, F., Tweedie, F. and Jarrad, L.E., Ibotenate lesions of hippocampus and or subiculum: dissociating components of allocentric spatial learning, *J. Neurosci.*, 2 (1990) 1016-1028.
- 47 Norusis, M.J., SPSS Update Manual and Statistical Guide, 1988.
- 48 Olton, D.S., Walker, J.A. and Gage, F.H., Hippocampal connections and spatial discrimination, *Brain Research*, 139 (1978) 295-308.
- 49 O'Keefe, J. and Nadel, L., The hippocampus as a cognitive map, Oxford: Oxford Univ. Press, 1978.
- 50 Patel, A., Undernutrition and brain development, *Trends Neurosci.*, 6 (1983) 151-154.
- 51 Paula-Barbosa, M.M., Andrade, J.P., Castedo, J.L., Azevedo, F.P., Comoes, I., Voght, B. and Tavares, M.A., Cell loss in the cerebellum and hippocampal formation in adult rats after long-term low-protein diet, *Exp. Neurol*, 103 (1989) 186-193.
- 52 Ramón y Cajal, S., The structure of Ammon's horn, trans. by Kraft, L., Thomas publisher, U.S.A., 1893, the year of book publication 1968 pp. 7-31.
- 53 Sholl, D.A., The organization of the neurons in the cerebral cortex, Hafner, New York, 1956.
- 54 Simonson, M. and Chow, B.F., Maze studies on progeny of underfed mother rats, *J. Nutr.*, 100 (1970) 685-690.
- 55 Smart, J.L., Early life malnutrition and later learning ability: A critical analysis. In Oliverio, A. (Ed.), *Genetics, Environmental and Intelligence*, Elsevier North Holland Biomedical Press, Amsterdam 1977, pp. 215-235.
- 56 Swanson, L.W. and Cowan, W.M., Autoradiographic studies of the organization of the efferent connections of the hippocampal formation in the rat, *J. Comp. Neurol.* 172 (1977) 49-84.

- 57 Teyler, T.J. and DiScenna, P., The topographical anatomy of the hippocampus: a clue to its function, *Brain Research Bull.*, 12 (1984) 711-719.
- 58 Tonkiss, J., Foster, G. and Galler, J., Prenatal protein malnutrition and hippocampal function: Partial reinforcement extinction effect, *Brain Research Bulletin*, 27 (1991a) 809-813.
- 59 Tonkiss, J. Galler, J., Shukitt-Hale, B. and Rocco, F., Prenatal protein malnutrition impairs visual discrimination learning in adult rats, *Psychobiol.*, 19 (1991b) 247-250.
- 60 Tonkiss, J., and Galler, J., Prenatal protein malnutrition and working memory performance in adult rats, *Behav. Brain Res.* 40 (1990a) 95-107.
- 61 Tonkiss, J. Galler, J., Formica, R., Shukitt-Hale, B., and Timm, R., Fetal protein malnutrition impairs acquisition of a DRL task in adult rats, *Physiol. Behav.*, 48 (1990b) .
- 62 Tonkiss, J., Cohen, C.A. and Sparber, S.B., Different methods for the producing neonatal undernutrition in rats cause different brain changes in the face of equivalent somatic growth parameters, *Dev. Neurosci.*, 10 (1988) 141-151.
- 63 Warren, M.A. and Bedi, K.S., The effects of a lengthy period of undernutrition from birth and subsequent nutritional rehabilitation on the granule-to-Purkinje cell ratio in the rat cerebellum, *J. Anat.*, 159 (1988) 147-150.
- 64 Winick, M. and Noble, A., Cellular response in rats during malnutrition at various ages, *J. Nutr.*, 89 (1966) 300-306.

TABLE 1.

Statistical analysis of prenatal protein malnutrition and postnatal nutritional rehabilitation on CA3 hippocampal pyramidal cells at 15, 30, 90 and 220 days of age.

Two-way ANOVA with nutritional status and age as the two factors. Morphometrical analyses were carried on 288 neurons.

	F VALUES		
	DIET (df 1,280)	AGE (df 3,280)	INTERACTIONS (df 3,280)
PERIKARYA:			
Perimeter	1.3NS	4.9**	7.3***
Major axis	0.4NS	3.7*	6.0*
Minor axis	15.2***	0.4NS	1.4NS
APICAL DENDRITES:			
Length	0.4NS	47.9***	6.2***
Intersections at:			
Ring 1 (38µm)	0.0NS	4.6**	1.3NS
Ring 2 (76µm)	8.9**	13.6***	0.24NS
Ring 3 (114µm)	12.4***	8.6***	0.4NS
Ring 4 (152µm)	15.7***	7.2***	4.2**
Ring 5 (190µm)	10.3**	17.7***	12.4***
Ring 6 (228µm)	0.3NS	42.5***	11.3***
Ring 7 (266µm)	0.4NS	32.7***	4.6**
Ring 8 (304µm)	1.7NS	27.4***	2.7*
Ring 9 (342µm)	2.7NS	21.2***	2.4NS
Ring 10 (380µm)	1.6NS	22.2***	2.2NS
BASAL DENDRITES:			
Intersections at:			
Ring 1 (38µm)	5.1*	6.7***	0.5NS
Ring 2 (76µm)	6.3*	21.3***	1.6NS
Ring 3 (114µm)	34.3***	21.3***	7.3***
Ring 4 (152µm)	11.8**	38.6***	4.3**
Ring 5 (190µm)	0.1NS	37.5***	3.0*
Ring 6 (228µm)	1.5NS	21.3***	3.8*
Ring 7 (266µm)	2.3NS	9.8***	2.3NS
Ring 8 (304µm)	0.5NS	1.2NS	1.4NS
Ring 9 (342µm)	0.0NS	0.0NS	0.0NS
Ring 10 (380µm)	0.0NS	0.0NS	0.0NS
SPINES			
Segment 1	75.6***	258.9***	12.8***
Segment 2	15.0***	243.8***	6.3***
Segment 3	17.5***	164.0***	1.5NS
THORNY EXCRESCENCE AREA	1.1NS	40.5***	0.9NS

* p<0.05, ** p<0.01 and *** p<0.001

TABLE 2.

Statistical analysis of comparisons between ages of control groups (ANOVA one-way/TUKEY ranges)

	15vs30C	15vs90C	15vs220C	30vs90C	30vs220C	90vs220C
PERIKARYA:						
Perimeter	NS	NS	NS	NS	-10%*	-10%*
Major axis	NS	NS	NS	NS	-12%*	NS
Minor axis	NS	NS	NS	NS	NS	NS
APICAL DENDRITES:						
Length	+13%*	+15%*	NS	NS	-30%*	-21%*
Intersections at:						
Ring 1 (38µm)	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Ring 2 (76µm)	-44%*	NS	NS	NS	NS	NS
Ring 3 (114µm)	-39%*	NS	NS	NS	NS	NS
Ring 4 (152µm)	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Ring 5 (190µm)	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Ring 6 (228µm)	NS	NS	-27%*	NS	-20%*	-26%*
Ring 7 (266µm)	NS	NS	-38%*	NS	-33%*	-32%*
Ring 8 (304µm)	NS	NS	-49%*	NS	-38%*	-36%*
Ring 9 (342µm)	NS	NS	-58%*	NS	-41%*	-40%*
Ring 10 (380µm)	NS	NS	-69%*	NS	-52%*	-50%*
BASAL DENDRITES						
Intersections at:						
Ring 1 (38µm)	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Ring 2 (76µm)	NS	-24%*	-23%*	NS	NS	NS
Ring 3 (114µm)	NS	NS	NS	-18%*	-15%*	NS
Ring 4 (152µm)	NS	-28%*	NS	-34%*	NS	+29%*
Ring 5 (190µm)	NS	-48%*	NS	-49%*	NS	+56%*
Ring 6 (228µm)	NS	-75%*	NS	-72%*	NS	+78%*
Ring 7 (266µm)	NS	-91%*	NS	-78%*	NS	+94%*
Ring 8 (304µm)	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Ring 9 (342µm)	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Ring 10 (380µm)	NS	NS	NS	NS	NS	NS
SPINES						
Segment 1	-41%*	-50%*	-22%*	-14%*	-24%*	+35%*
Segment 2	-35%*	-47%*	-35%*	-18%*	NS	+18%*
Segment 3	-33%*	-40%*	-41%*	-12%*	-13%*	NS
THORNY EXCRESCENCES		-25%*	-35%*	-18%*	-30%*	NS
AREA						

*: Significant differences at p<0.05 . C control groups.

(-) Left of the vs sign is significantly lower than right

(+) Left of the vs sign is significantly higher than right

TABLE 3.

Statistical analysis of comparisons between ages of rehabilitated groups (ANOVA one-way Tukey ranges).

	15vs30R	15vs90R	15vs220R	30vs90R	30vs220R	90vs220R
PERIKARYA:						
Perimeter	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Major axis	NS	+13%*	+12%*	NS	NS	NS
Minor axis	NS	NS	NS	NS	NS	NS
APICAL DENDRITES:						
Length	NS	+15%*	-29%*	-16%*	-38%*	-26%*
Intersections at:						
Ring 1 (38µm)	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Ring 2 (76µm)	-38%*	NS	NS	+27%*	+26%*	NS
Ring 3 (114µm)	-38%*	NS	NS	NS	NS	NS
Ring 4 (152µm)	-37%*	-35%*	-36%*	NS	NS	NS
Ring 5 (190µm)	-25%*	-38%*	-42%*	NS	NS	NS
Ring 6 (228µm)	-34%*	-40%*	-44%*	NS	-16%*	NS
Ring 7 (266µm)	-35%*	-45%*	-52%*	NS	-21%*	NS
Ring 8 (304µm)	-50%*	-53%*	-60%*	NS	NS	NS
Ring 9 (342µm)	-58%*	-60%*	-65%*	NS	NS	NS
Ring 10 (380µm)	-70%*	-71%*	-78%*	NS	NS	NS
BASAL DENDRITES						
Intersections at:						
Ring 1 (38µm)	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Ring 2 (76µm)	+30%*	-39%*	-32%*	NS	NS	NS
Ring 3 (114µm)	+22%*	-36%*	-19%*	-19%*	NS	+21%*
Ring 4 (152µm)	NS	-35%*	NS	-20%*	+24%*	+40%*
Ring 5 (190µm)	NS	-32%*	NS	NS	+37%*	+53%*
Ring 6 (228µm)	NS	NS	NS	NS	NS	+74%*
Ring 7 (266µm)	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Ring 8 (304µm)	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Ring 9 (342µm)	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Ring 10 (380µm)	NS	NS	NS	NS	NS	NS
SPINES						
Segment 1	-14%*	+26%*	+35%*	-27%*	-25%*	NS
Segment 2	-18%*	NS	+18%*	NS	NS	-25%*
Segment 3	-12%*	-13%*	NS	NS	NS	NS
THORNY EXCRESCENCES						
		-20%*	-40%*	-20%*	-25%*	NS
AREA						

*: Significant differences at $p < 0.05$. R rehabilitated groups.

(-) Left of the vs sign is significantly lower than right

(+) Left of the vs sign is significantly higher than right

Figure 1. Photomicrographs of CA3 hippocampal pyramidal cells taken directly from computer monitor; **A** exhibits the frontal level (3.2x) in which CA3 pyramidal neurons were chosen (SP: *stratum pyramidale*; SLM: *stratum lacunosum-moleculare*); **B** shows the measurements made through imaging system of the number of dendritic intersections (cross marks show every dendrite counted), and **C** exhibits a neuron at 200x of magnification. The synaptic spines were measured, per 50µm segments (S1, S2 and S3). Note the mossy fibers (MF) crossing the apical dendrites. Scale bar in **A** is equal to 200µm, in **B** and **C** to 50µm.

Figure 2. Bar graph showing effect of prenatal protein malnutrition and postnatal nutritional rehabilitation on CA3 cell size (\pm SEM). Note the significant decreases in rehabilitated rats, on the perimeter and major axis at 220 days and on minor the axis at 90 days of age (C, control groups and R, rehabilitated groups).

Figure 3. Bar graphs showing effects of prenatal protein malnutrition on the length of the apical dendrite (\pm SEM) of CA3 hippocampal pyramidal cells. There is a significant decrease ($p < 0.05$) in 15 day-old malnourished rats (C, control groups and R, rehabilitated groups).

Figure 4. Bar graphs showing effects of prenatal 6% casein diet on the number of apical dendritic intersections for each of the 10 concentric rings (\pm SEM) in rats of four ages. There is a significant decrease ($p < 0.05$) in dendritic density of malnourished rats at 15 days of age crossing rings 5 and 6; and, the significant increases in 90 (crossing rings 4, 5 and 6) and 220 (crossing rings 4 and 5) day old malnourished rats (C, control groups and R, rehabilitated groups).

Figure 5. Bar graph showing number of basal dendritic intersections (\pm SEM). Observe the significant decreases on rehabilitated animals at 15 (ring 3), 90 (ring 6) and 220 (ring 3 and 4) days of age (C, control groups and R, rehabilitated groups).

Figure 6. Bar graph showing synaptic spine density of CA3 hippocampal pyramidal cells (\pm SEM) measured in three 50 μ m segments. The graph on the right shows the total spine density of these three segments (C, control groups R, rehabilitated groups; note that the SEM values are too small to be noticeable in every bar).



Fig. 1

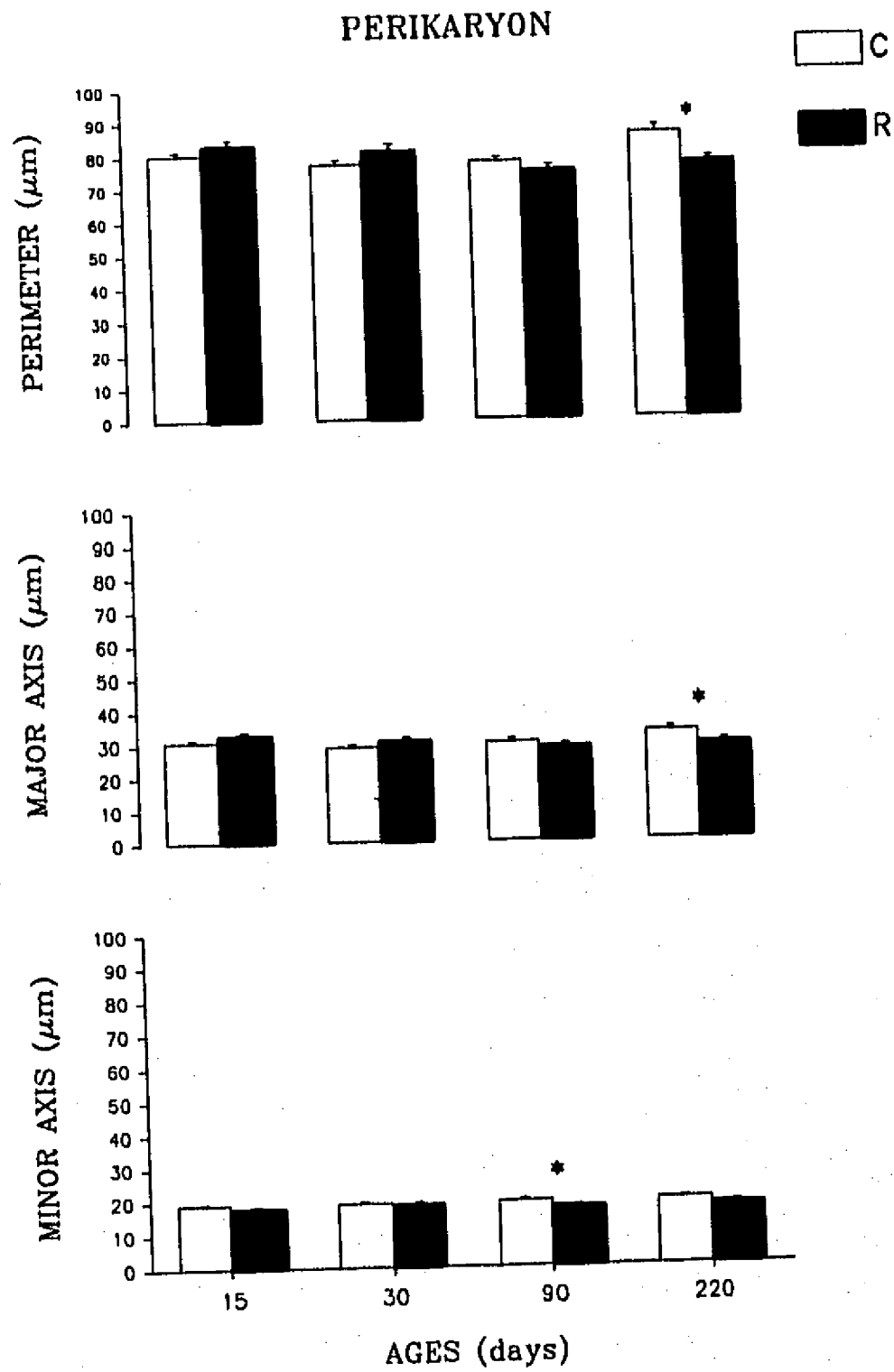


Fig. 2

APICAL DENDRITE

□ C
■ R

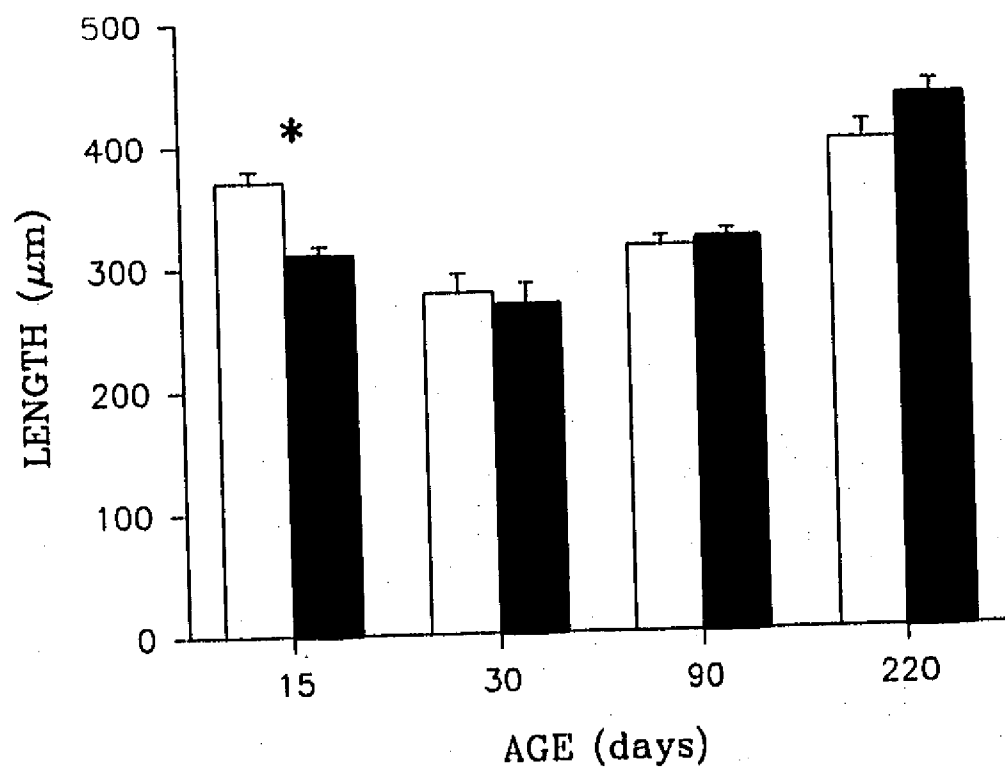


Fig. 3

NUMBER OF DENDRITES CROSSING EACH CONCENTRIC RING

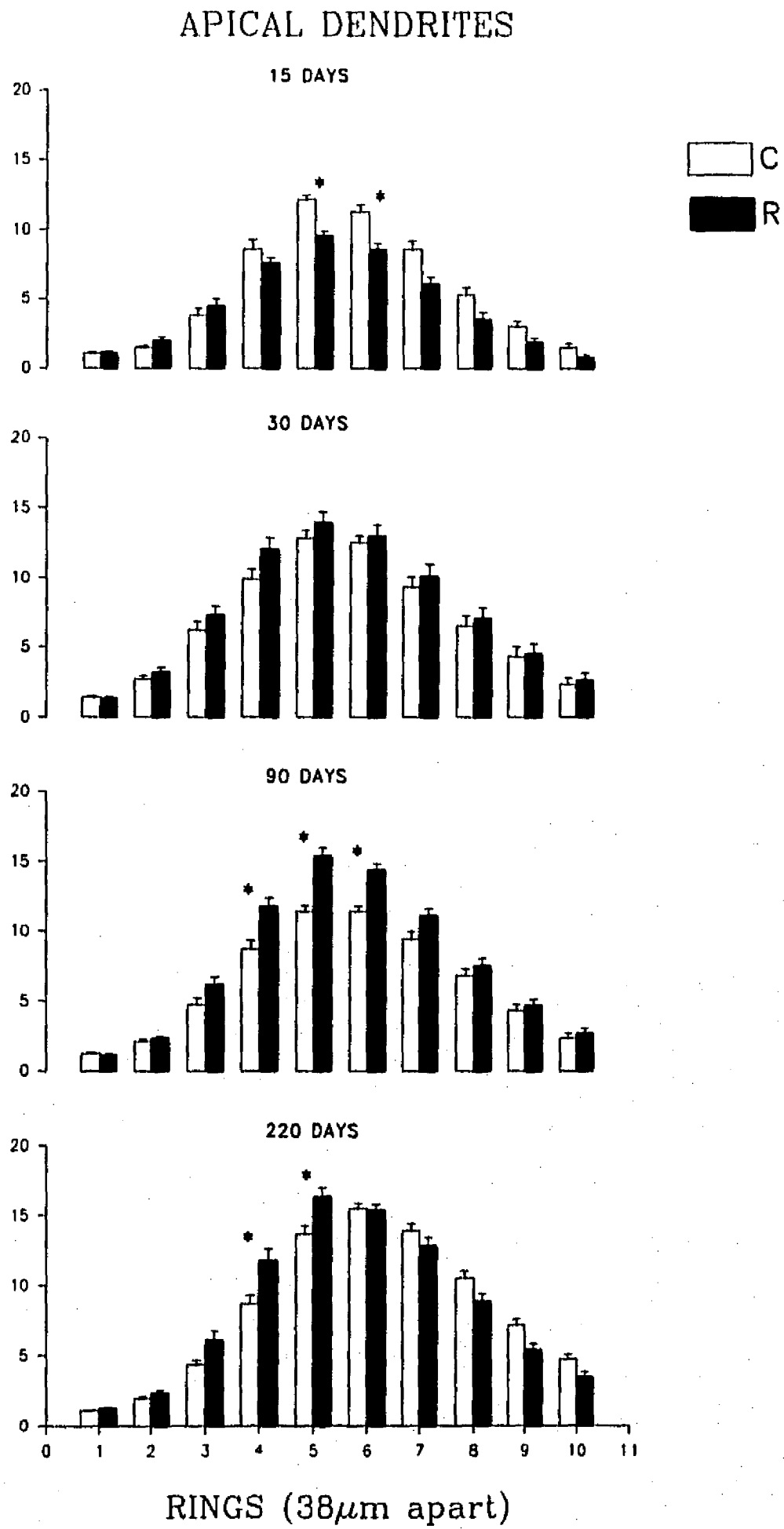


Fig. 4

BASAL DENDRITES

NUMBER OF DENDRITES CROSSING EACH CONCENTRIC RING

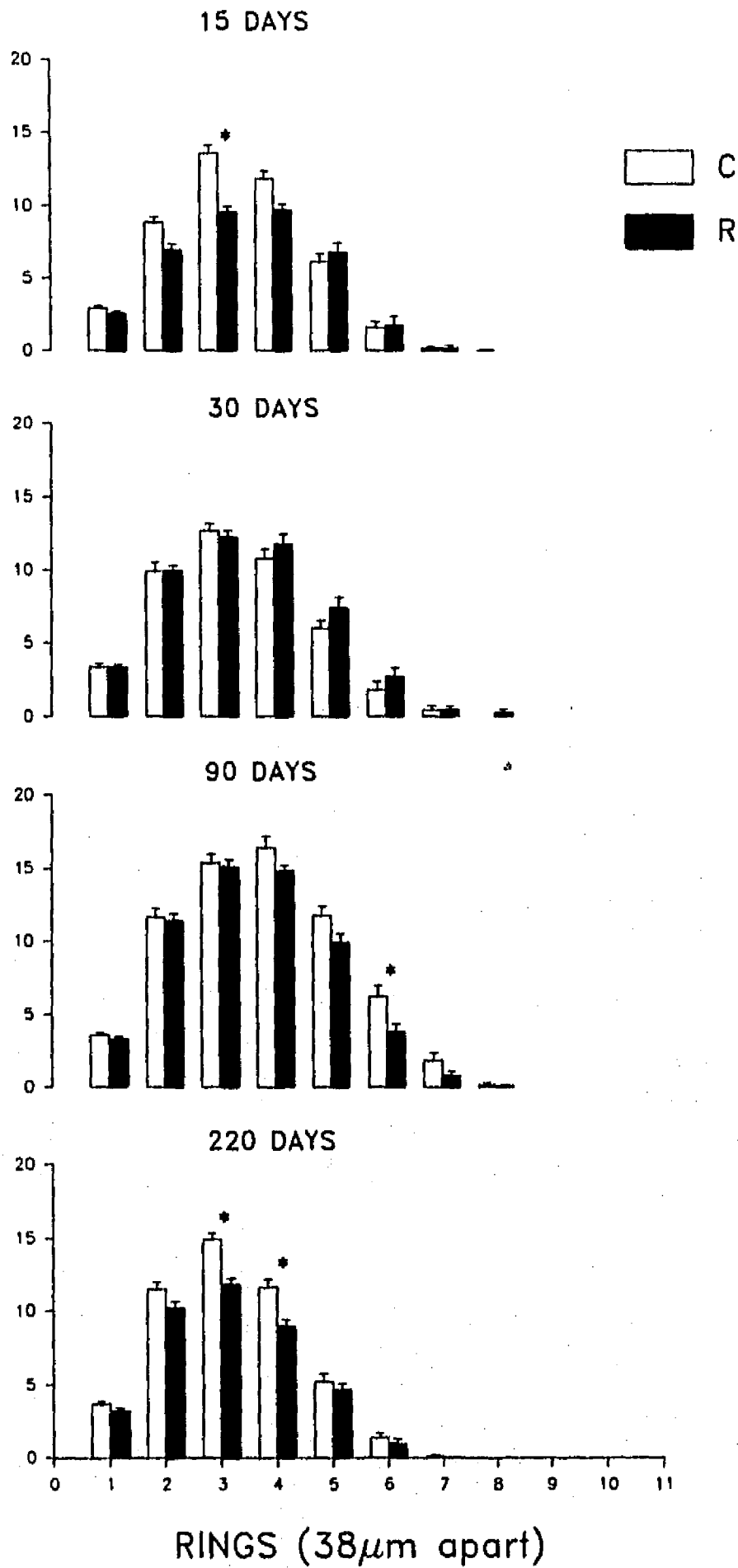


Fig. 5

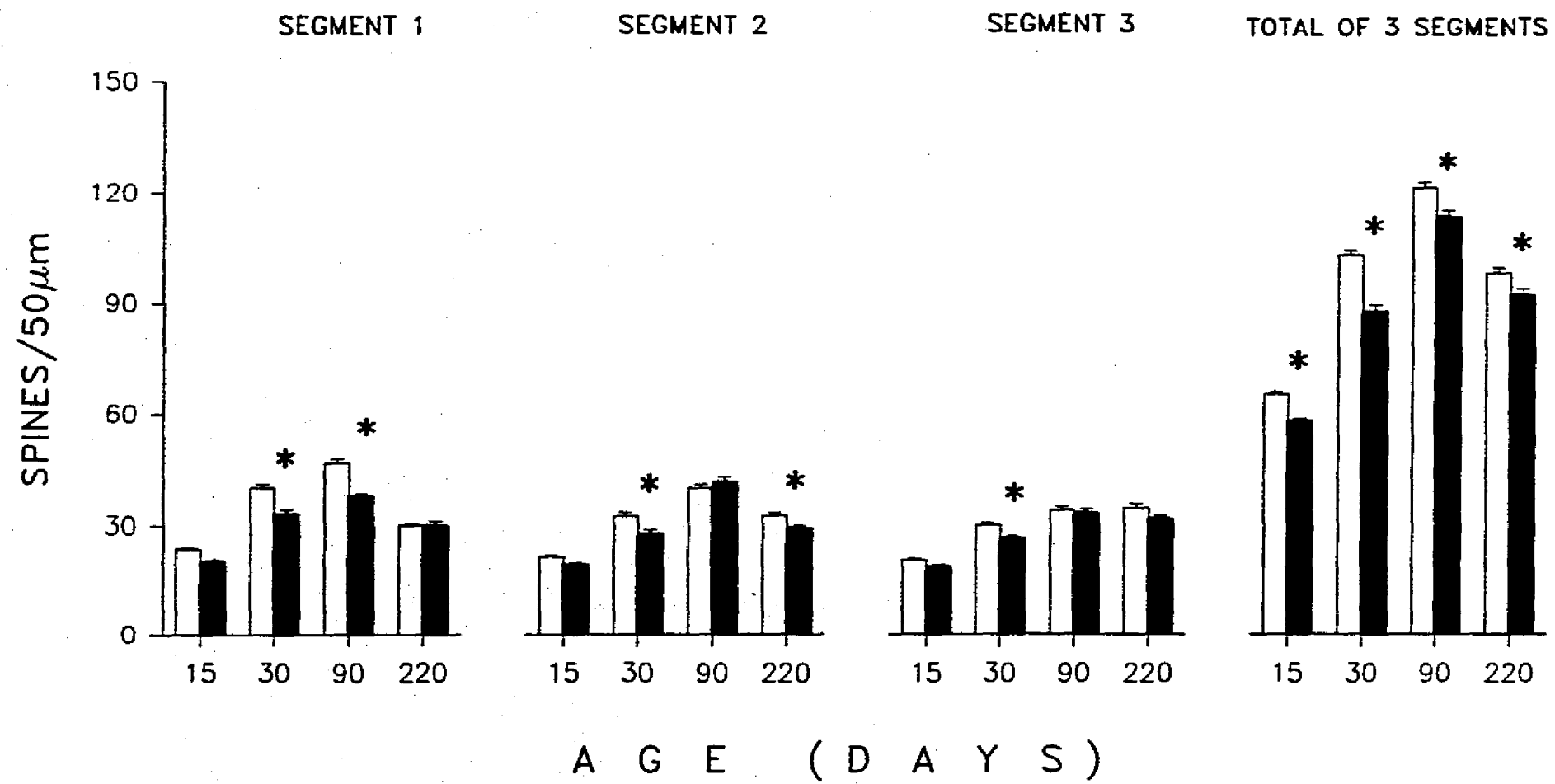


Fig. 6

PARTE IV

Los efectos de la desnutrición sobre los procesos de aprendizaje y memoria en modelos animales

por

Mayra García-Ruiz, Leticia Parra y Sofía Díaz-Cintra.

Centro de Neurobiología, UNAM, Ciudad Universitaria, México 04510, D.F., México.

Correspondencia: Dra. Sofía Díaz-Cintra, Centro de Neurobiología, Universidad Nacional Autónoma de México AP 70-228, Cd. Universitaria, México D.F. 04510, México. Fax (525) 550-0048.

(Aceptado para su publicación en la Revista Biomédica)

RESUMEN

El sistema nervioso central (SNC) es extremadamente vulnerable a diversos factores del medio ambiente. Uno de los factores que provoca efectos más drásticos en el desarrollo de este sistema es la desnutrición. En los últimos años se ha tratado de relacionar los daños provocados por la desnutrición sobre el SNC con los procesos cognitivos. Sin embargo y a pesar de las evidencias que muestran que los seres humanos desnutridos presentan cambios conductuales y sobretodo una actividad mental subnormal, es sorprendente el hecho de que los resultados obtenidos hasta la fecha sean controversiales. Algunos autores describen que la habilidad para el aprendizaje de los organismos desnutridos es deficiente, otros que esta habilidad no cambia y otros más que es mejor que aquella mostrada en los organismos bien nutridos. Es por ésto que el objetivo del presente escrito es hacer una revisión del trabajo experimental realizado acerca de los efectos de la desnutrición en el comportamiento y especialmente en los procesos de aprendizaje y memoria en modelos animales.

Palabras claves: Desnutrición, aprendizaje y memoria.

ABSTRACT

EFFECTS OF MALNUTRITION ON LEARNING AND MEMORY PROCESSES IN ANIMAL MODELS. The central nervous system (CNS) is extremely vulnerable to environmental factors. One of the factors that causes the most drastic effect in the development of this system is malnutrition. In the last few years it has been tried to relate alterations produced by malnutrition on the CNS with the cognitive processes of the malnourished organisms. Evidence shows that malnourished human beings present behavioral changes and mainly a subnormal mental activity. However, it is surprising that results obtained hitherto are controversial. Several groups have reported that malnourished animals can perform either worse than, similar as or even better than well nourished organisms. In this review we analyzed those experimental studies with reference to the effects of malnutrition on behavior and specially on learning and memory processes in animal models.

Key words: Malnutrition, learning and memory.

INTRODUCCIÓN

En años recientes se ha enfatizado la importancia que tiene la nutrición adecuada para el desarrollo funcional óptimo de los organismos (1). Esto es debido a la alta incidencia de la desnutrición infantil en el mundo y a las evidencias que muestran que esta alteración provoca daños cerebrales que traen como consecuencia un deterioro en sus capacidades de aprendizaje y memoria y por tanto, una actividad mental subnormal (2-6).

Los estudios referentes a los efectos de la desnutrición pre-, postnatal o ambas, han descrito severas alteraciones neurales, a saber: a) modificaciones en el ritmo de división celular (7,8), b) reducciones del número de neuronas, de sus ramificaciones dendríticas y de sus espinas así como del número de sinapsis en diversas regiones cerebrales tales como, el núcleo del raphe dorsal, el locus coeruleus, el cerebelo, el área visual 17 de la corteza cerebral y el hipocampo (7, 9-12), c) reducciones en la densidad de las células gliales del cuerpo calloso (13) y d) inhibición de la mielinización cerebral (14).

En vista de estas alteraciones, ha surgido un gran interés por investigar los efectos de la desnutrición sobre los procesos de aprendizaje y memoria. Desafortunadamente, los estudios de la desnutrición en los seres humanos son difíciles de evaluar, ya que en el desarrollo del niño influyen diversos factores, tales como, los genéticos, los medio ambientales, los culturales y los nutricionales que hacen difícil especificar la causa exacta del deterioro mental y más aún, se dificulta el control de aquellas condiciones antecedentes provocadas por dichos factores. El uso de modelos animales parece ser adecuado debido a que en éstos es posible controlar de manera más precisa los diversos factores que pueden intervenir sobre su desarrollo (15,16).

El objetivo de la presente revisión, es hacer una evaluación de los trabajos experimentales más relevantes -a nuestro juicio- que a la fecha se han llevado a cabo

sobre el efecto de la desnutrición en el comportamiento y especialmente en los procesos de aprendizaje y memoria en algunos modelos animales.

En la primera parte, es nuestro propósito revisar de manera general los cambios conductuales producidos por la desnutrición y, en la segunda discutiremos los efectos de este factor en los procesos de aprendizaje y memoria a través de diferentes paradigmas experimentales.

CAMBIOS CONDUCTUALES PRODUCIDOS POR LA DESNUTRICION

En términos generales se ha descrito que la desnutrición temprana provoca un retraso en la aparición de los reflejos y de las primeras conductas de las ratas desnutridas en desarrollo (17-19). Diversos estudios han mostrado que las crías desnutridas compiten menos con sus hermanos por el alimento materno (16,20), tienen alteraciones en el comportamiento de orientación hacia el nido (21-26), son menos activas, disminuyen la frecuencia de acercamientos hacia sus madres (27) y emiten un menor número de vocalizaciones que estimulan en la hembra las respuestas de lamido, de acarreo o de alimentación de las crías, por lo que se dice que las crías desnutridas demandan menos atención de la hembra lactante (28).

Las crías desnutridas tardan algunos días más que las controles en que les aparezca el pelaje, se les abran los conductos auditivos externos y los párpados y les inicie el ciclo estral (29,30). Las conductas motoras tales como, el desplazamiento para salir del nido, la exploración y el nado ocurren más tardíamente (20,31,32), además presentan deterioro en la coordinación motora (32-35). Con respecto a la conducta de aseo, también se ha observado un retraso inicial en su desarrollo, que posteriormente se intensifica persistiendo así hasta la edad adulta (36).

Se han observado también, incrementos en la responsividad en situaciones en las que el objetivo es el acceso a satisfactores, tales como agua o comida, (37-39),

confusión en la discriminación entre un olor conocido y el olor materno (40) y mayor reactividad a estímulos dolorosos o aversivos (41-44).

A largo plazo se observan deficiencias conductuales entre las que son de llamar la atención, por parte de las hembras, descuido en el mantenimiento del nido (45,46) y una disminución en la atención maternal hacia las crías (27); en ambos sexos se han encontrado alteraciones en el comportamiento social (47), respuestas emocionales exageradas y reducción en los comportamientos exploratorios (48). Alteraciones conductuales similares se han observado también en cerdos desnutridos (49).

Por otra parte, con la prueba de campo abierto se ha observado que ratas desnutridas postnatalmente permanecen más tiempo en el cuadro de salida antes de empezar la exploración (49). El desplazamiento dentro del campo abierto parece ser sin una finalidad definida y sin husmeo (15, 50-52). En esta situación de actividad libre las ratas desnutridas muestran un estado de alto nerviosismo de tal manera que cualquier evento extraño, como un ruido, puede provocar en ellas respuestas de congelamiento de mayor duración y chillidos (50,42,53). En ambientes novedosos los animales desnutridos (ésto se ha observado en ratas y monos) muestran apatía y temor a los objetos o estímulos del medio ambiente, poca habilidad de los animales para adaptarse a cambios que se les presenten (44) y disminución de la atención (16,54). Este tipo de respuestas ha conducido a la conclusión de que el estado emocional exagerado de los animales desnutridos interfiere con su capacidad de actuar y explorar en situaciones novedosas.

Se ha sugerido que estas alteraciones en la conducta podrían deberse a la alta emotividad que muestran los organismos desnutridos, ya que la desnutrición provoca que los animales sean extremadamente activos, temerosos y agresivos cuando se encuentran ante situaciones novedosas (15,48,52, 55-58). Un ejemplo de ello es cuando se somete a los animales a pruebas conductuales, en las cuales se ha observado que la reacción emocional (e.g., en el caso de las ratas desnutridas) impide

la expresión de una respuesta adecuada o eficiente (59). Massaro y col. (20) y Salas y col. (36) describieron un exceso en la conducta de aseo de ratas desnutridas, lo que podría interferir con la expresión de una conducta adecuada o bien podría ser la expresión de una respuesta emocional exagerada de estos animales. De la misma manera podría suponerse que la conducta materna inadecuada sea una consecuencia de la alta emocionalidad que presentan los animales desnutridos (27,59).

Por tanto, parece ser que las alteraciones conductuales observadas son principalmente debidas a que la desnutrición modifica el estado emocional de los organismos.

EL EFECTO DE LA DESNUTRICION SOBRE EL APRENDIZAJE Y LA MEMORIA.

En el estudio de los efectos de la desnutrición en los procesos de aprendizaje y memoria, continuamente se encuentran inconsistencias en los resultados. Se reportan ejecuciones inferiores, iguales o inclusive mejores en las tareas desempeñadas por los animales desnutridos. En esta sección analizaremos diversos estudios acerca de este problema y discutiremos las posibles causas que han provocado estas inconsistencias.

APRENDIZAJE INSTRUMENTAL

Se sabe que la desnutrición temprana puede producir secuelas conductuales tardías, que no logran compensarse a pesar de la rehabilitación nutricional posterior. Para indagar acerca de las causas de estas secuelas, se ha empleado el condicionamiento operante o instrumental y de éste el que involucra el reforzamiento a diferentes intervalos de tiempo y razón.

El condicionamiento operante (también llamado condicionamiento instrumental o aprendizaje de ensayo y error), descubierto por E. Thorndike y estudiado de manera sistemática por B.F. Skinner, consiste en colocar una rata hambrienta en una cámara

de prueba sonoamortiguada (a la que se le conoce como "caja de Skinner") que tiene una palanca emergiendo de una de las paredes (Fig. 1). La rata eventualmente tenderá a presionar la palanca y obtendrá una recompensa apetitiva. La rata entonces aprenderá que una cierta respuesta es recompensada con comida (60). Posteriormente, a este dispositivo experimental se le hicieron diversas modificaciones, entre ellas tenemos a los reforzamientos intermitentes, los cuales son de dos clases, los de intervalo y los de razón. En cuanto a los reforzamientos de intervalo, éstos pueden ser de tipo fijo o variable. El reforzamiento de intervalo fijo se refiere que la recompensa o reforzador se proporciona a la primera respuesta que ocurra después de un intervalo designado (fijo); por ejemplo, un minuto después de que la rata apretó la palanca se le proporciona la recompensa. En el reforzamiento de intervalo variable el reforzador se le proporciona a la rata aleatoriamente en un rango de intervalos, desde uno muy breve hasta uno muy largo, en un orden variable. Al igual que los intervalos, el reforzamiento de razón puede ser fijo o variable. En el reforzamiento de razón fija, el reforzador se proporciona después de un número predeterminado de respuestas, por ejemplo después de que la rata presione 10 veces la palanca se le proporciona la recompensa. En el de razón variable, la razón varía aleatoriamente de pequeña a grande (61).

Halas y col. (37) mostraron que ratas desnutridas postnatalmente, probadas en un condicionamiento operante apretaban un mayor número de veces la palanca que las controles y estos resultados fueron confirmados años más tarde por Tonkiss y col., (62). Este experimento mostró que las ratas desnutridas estaban más motivadas para obtener la comida que las controles. Smart y Dobbing (38), explicaron que las ratas desnutridas mostraban una alta motivación a la comida debido a que la desnutrición modifica su metabolismo basal provocando que se requiera más alimento. Por tanto, parece ser que la ejecución de esta tarea es afectada por dos variables críticas: la habilidad de aprendizaje y la motivación.

Por otra parte, Stephens y Tonkiss (63) compararon la habilidad de ratas controles y desnutridas postnatalmente (durante las primeras tres semanas de vida), para asociar estímulos redundantes con un castigo. Esto es, las ratas tenían que aprender a suprimir la presión de una palanca que les proporcionaba una recompensa apetitiva cuando estímulos medioambientales, tales como un tono y/o una luz, señalaban que la presión de la palanca sería castigada con un choque eléctrico en las patas. No hubo diferencia entre los grupos en el ritmo al cual aprendieron a suprimir la respuesta cuando una luz fue usada como señal de castigo, ni cuando un tono fue probado al mismo tiempo con la luz, pero cuando subsecuentemente fue probado el tono solo, los desnutridos fueron incapaces de asociarlo con el castigo. Por lo que los autores sugirieron que el tono podría ser un inhibidor condicionado -ya que el tono no estuvo pareado con el castigo- en los desnutridos, pero no así en los controles, por tanto parece ser que hay diferencias intrínsecas (e.g., motivación, curiosidad o fuerza del condicionamiento) entre los dos grupos de animales en su habilidad para formar asociaciones entre estímulos. Resultados similares fueron reportados por Stephens y col. (64).

Por esa misma época, Roberts y col. (65) propusieron que una estrategia que podría evitar los problemas asociados con las diferencias conductuales en términos de variables motivacionales, era usar las técnicas estándar de análisis experimental del comportamiento, por ejemplo paradigmas de reforzamiento (65). En sus experimentos compararon ratas controles con ratas desnutridas postnatalmente (desde el período de lactancia hasta el día 43 posterior al destete), por reducción al 50% del alimento de las hembras lactantes y posteriormente a las crías destetadas. Una vez que los animales llegaron a la etapa adulta, fueron entrenados y probados en un paradigma operacional de reforzamiento de intervalos fijo y variable. No hubo diferencias significativas entre controles y desnutridos durante el paradigma de intervalo fijo y, en el caso del reforzamiento de intervalo variable, el grupo desnutrido respondió

significativamente más rápido que los controles. Lo que permitiría pensar que la ocurrencia de diferencias entre controles y desnutridos durante un condicionamiento operante depende del tipo de paradigma de recompensa que se emplee. Por ejemplo, si cada vez que los animales presionan la palanca reciben la recompensa será difícil encontrar diferencias entre los grupos, pero si varía el intervalo entre la presión de la palanca y la aparición de la recompensa, de tal manera que el reforzador se haga más impredecible, las diferencias entre controles y desnutridos se hacen más grandes y evidentes. Estos autores concluyeron que la desnutrición temprana no necesariamente produce incremento en las respuestas de los animales probados en paradigmas que incluyen recompensas apetitivas.

Otro paradigma utilizado para analizar los efectos de la desnutrición temprana en el comportamiento de animales adultos, es el reforzamiento diferencial de tasas bajas de respuesta (RDB). Este es un paradigma operante en el cual la rata, debe esperar un intervalo específico entre respuestas para presionar una palanca y en consecuencia adquirir el reforzamiento (comida). Un ejemplo de ello es el trabajo de Tonkiss y col. (66). Estos investigadores probaron, en este paradigma, ratas cuyas madres fueron desnutridas (con una dieta baja en caseína) desde 5 semanas antes del apareamiento hasta el término de la gestación y encontraron que el efecto de la desnutrición se manifestó como una adquisición más lenta de la tarea -estos resultados corroboran los experimentos de Laughlin y col. (30)-, por lo que sugirieron varias hipótesis para explicar sus resultados: a) los animales desnutridos prenatalmente podrían ser menos capaces de cronometrar sus respuestas adecuadamente, b) el desarrollo de la estrategia de cronometraje podría haber sido alterado por la desnutrición prenatal, c) los animales desnutridos se encontraban en un estado motivacional diferente que los controles, ya que se ha reportado que el nivel de privación tiene efecto en el RDB (67) y d) las ratas desnutridas estaban inicialmente más sensibles a la frustración provocada por la no-recompensa, ya que se ha mostrado

(44) que las ratas desnutridas muestran una resistencia mayor a la extinción. Esta resistencia a la extinción se observó en una prueba de alternación espacial en un laberinto en T con recompensa apetitiva, lo cual sugiere un decremento en la sensibilidad a la no-recompensa. Cualquiera que sea la explicación más adecuada, lo que parece ser claro es que la rehabilitación nutricional postnatal no es suficiente para compensar el daño prenatal.

Posteriormente, Tonkiss y col. (68) evaluaron el efecto de la desnutrición prenatal en la extinción en un paradigma de reforzamiento parcial, bajo la hipótesis de que el efecto de un reforzamiento parcial en la extinción (RPE) sería atenuado o abolido en animales desnutridos. El RPE se refiere a que las ratas entrenadas en un paradigma de reforzamiento parcial (con una recompensa apetitiva) en una proporción de las pruebas elegida azarosamente (típicamente 50%), son más resistentes a la extinción, cuando la recompensa es presentada de manera completamente discontinua, que esas ratas entrenadas en un paradigma de reforzamiento continuo. Los resultados mostraron que el RPE no fue afectado por la desnutrición prenatal, lo cual no es sorprendente ya que previamente se había observado (44) en animales desnutridos un incremento de resistencia a la extinción en un paradigma de alternación espacial en un laberinto en T. Con base en estos resultados estos investigadores postulan que la desnutrición prenatal probablemente no interfiere con los procesos de extinción *per se* en ratas maduras, sino más bien puede causar pérdida de la flexibilidad en las estrategias de respuesta cuando cambian las condiciones de prueba.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

APRENDIZAJE DE DISCRIMINACION VISUAL

Otra estrategia para determinar la capacidad de aprendizaje en animales desnutridos, la constituyen las pruebas que exploran los procesos involucrados en resolver los problemas de la discriminación visual.

Rogers y col. (69) probaron, en ratas desnutridas postnatalmente (desde el nacimiento hasta los 45 días de edad), la habilidad para discriminar estímulos visuales (i.e., círculos y triángulos), a los que habían estado expuestos previamente, usando la versión no apetitiva de la técnica de Lashley. En esta prueba se coloca al animal en una plataforma frente a un pizarrón que contiene dos compuertas, detrás de las cuales se encuentran los estímulos visuales y el sujeto experimental debe aprender a discriminar entre los estímulos a través de un salto hacia la compuerta abierta que contiene el estímulo correcto. Los resultados mostraron que el aprendizaje de discriminación no fue deteriorado por la desnutrición postnatal -estos resultados confirman experimentos anteriores (70,71)-. Sin embargo, sólo los controles mejoraron la ejecución de la tarea de discriminación con la exposición previa, aparentemente esta exposición no influyó en el aprendizaje de discriminación de los animales desnutridos. Estos resultados apoyan la hipótesis de que los animales desnutridos parecen sufrir deficiencias en lo que Levitsky (72) llamó "aprendizaje incidental", el cual se refiere a que los animales bien nutridos muestran "hambre" por aprender todo acerca de su medio ambiente, mientras que en los desnutridos el "hambre" o interés por aprender se ve inhibido. Los desnutridos aparentemente responden sólo a esas características medio ambientales que son de consecuencia biológica inmediata para ellos.

Por otra parte, debido a que los efectos de la desnutrición temprana pueden ser a largo plazo se ha sugerido que la desnutrición no disminuye el aprendizaje durante la exposición temprana, sino que afecta la expresión de este aprendizaje durante el entrenamiento de discriminación en la etapa adulta.

Por el contrario, Castro y Rudy (73) cuando compararon animales normales y desnutridos (desde el 2o al 16avo postnatal) de diferentes edades (20-40 días y 70-77 días) en la ejecución de una tarea de discriminación de estímulos visuales de acuerdo a su posición, patrón y brillantez a través de una versión acuática de la técnica de Lashley, encontraron deficiencias en la discriminación visual. Estos investigadores observaron que la desnutrición temprana deterioró la ejecución en la tarea de discriminación de brillantez (en crías de 20 y 40 días de edad) y en la discriminación de patrones (en animales de 40-77 días), mientras que en la discriminación de la posición (i.e., izquierda vs. derecha), no encontraron diferencias significativas, por lo que concluyeron que la desnutrición temprana no sólo tiene influencia en la ejecución de la discriminación visual, sino que puede dañar especialmente a los organismos que todavía están en desarrollo y permanecer el daño hasta la etapa adulta.

Tonkiss y col. (74) encontraron resultados similares, empleando un paradigma de desnutrición diferente (ver 66). Estos investigadores compararon animales normales y prenatalmente desnutridos en la ejecución de una tarea de discriminación de estímulos visuales en cuanto a la brillantez (i.e., negro vs. blanco), a los patrones de orientación (i.e, barras horizontales vs. verticales) y de forma (i.e., círculos vs. cuadrados). Los animales prenatalmente desnutridos de 91 días de edad, mostraron un número mayor de errores y latencias más largas en los tres problemas de discriminación visual, aunque estos resultados no fueron significativos. Sin embargo, sólo en el caso de la discriminación de patrones de orientación los animales desnutridos mostraron deficiencias que si alcanzaron significación estadística. Los resultados de este trabajo indican que la desnutrición hipoproteínica prenatal, deteriora el aprendizaje de discriminación visual en animales adultos, lo que estaría indicando efectos a largo plazo. Resultados similares fueron previamente reportados por Celedón y col. (75).

De los resultados de Castro y Rudy (73) y los de Tonkiss y col. (74) emanan evidencias que muestran que el efecto de la desnutrición temprana es selectivo, ya que influye sobre ciertas habilidades, mientras que otras parecen no modificarse.

Lashley (76) propuso que el aprendizaje de discriminación involucra 2 procesos: a) atención a la dimensión relevante del estímulo y b) asociaciones de los valores específicos de la dimensión con los resultados de la elección correcta e incorrecta. Por tanto, los animales podrían fallar en los problemas de discriminación por cualquiera de estos dos procesos. La propuesta de Lashley ofrece una explicación en cuanto a las deficiencias encontradas en el aprendizaje de discriminación visual. Empero, a la fecha no hay un consenso con respecto a los efectos de la desnutrición en este tipo de aprendizaje, ya que como hicimos notar previamente existen estudios que no confirman que la desnutrición pueda alterar el aprendizaje de discriminación visual. Es necesario por tanto, enfatizar que los efectos de la desnutrición tienen que ser evaluados e interpretados según las condiciones bajo las cuales se lleven a cabo los experimentos, esto es, deben de tomarse en cuenta diversos factores que podrían intervenir en la ejecución de las tareas de aprendizaje, tales como la edad de los animales, el método de desnutrición, el grado de dificultad de la tarea, etc..

APRENDIZAJE Y MEMORIA ESPACIAL

Los intentos para identificar cambios funcionales permanentes en el aprendizaje y memoria espacial que pueden reflejar cambios en la estructura y función de determinadas regiones cerebrales, han producido resultados disímolos. Por ejemplo, deficiencias en el aprendizaje de discriminación espacial -en el cual el animal debe aprender a discriminar entre un lugar en donde se encuentra la recompensa y otro vacío (e.g., laberintos en T, Y o radiales, Fig. 2)-, que es un efecto consistente con la disfunción hipocampal, fueron encontradas por Barnes y col. (49); Simonson y Chow

(77) y Hsueh y col. (78). Sin embargo, estos resultados no fueron confirmados en otros estudios (79,80).

Posteriormente, Jordan y col. (81) reportaron que ratas adultas desnutridas (a través de la restricción de alimento) desde la última semana de gestación y durante el período de lactancia mostraron deficiencias en la ejecución en el laberinto radial (el cual ha sido vinculado a la función hipocampal, 82) y fallaban en visitar de manera alternada los brazos del laberinto (i.e., alternación espontánea) que es la respuesta típica de los bien nutridos (83).

Hall (84) por su parte, no encontró deficiencias en la ejecución del laberinto radial o la alternación espontánea en ratas cuyas madres fueron desnutridas por una dieta restringida en proteína, desde 5 semanas antes del apareamiento hasta el período de lactancia. Parece ser que la discrepancia entre Hall y Jordan y col. se debe a que Hall sobre-entrenó a sus ratas y por esta razón Hall podría haber reducido aspectos emocionales, esto sugeriría que el sobre-entrenamiento podría reducir las deficiencias conductuales producidas por la desnutrición. Sin embargo, existen otras posibilidades, la primera de ellas se refiere a los diferentes protocolos de dieta empleados en ambos trabajos, ya que Jordan y col., utilizaron un método de desnutrición pluricarencial y Hall sólo restringió la cantidad de proteína. La segunda, es que la desnutrición fue impuesta en períodos diferentes, como fue mencionado, Jordan y col. privaron a sus animales desde la última semana de gestación hasta la lactancia, mientras que Hall impuso la dieta hipoproteínica a las hembras desde 5 semanas antes del apareamiento hasta la lactancia.

Por otra parte y con el objetivo de evaluar el efecto de la experiencia previa en el aprendizaje de animales desnutridos, Levitsky (85) comparó un grupo control contra un grupo de animales desnutridos durante la lactancia y postdestete temprano (con una dieta baja en proteína), en el campo abierto una vez y, semanas después de la rehabilitación nutricional, expuso a ambos grupos a un laberinto con recompensa de

comida. Encontró que el grupo desnutrido cometía más errores en el laberinto que el grupo control, por lo que concluyó que el efecto de la experiencia -adquirida en el campo abierto- en el aprendizaje tardío es bloqueado por la desnutrición.

En 1981 Morris (86) introdujo una metodología (el ahora llamado laberinto de Morris, Fig. 3) para estudiar los procesos de aprendizaje y la memoria espacial a través de dos formas de navegación espacial. En ambas formas la rata es colocada en un tanque circular con agua, en el cual debe nadar hacia una plataforma de escape. En la primera de ellas, llamada de "señal-proximal" la plataforma esta visible y la rata debe nadar directamente hacia ella, la señal proximal. En la segunda, llamada de "señal-distal" la plataforma está oculta bajo la superficie del agua, pero siempre está colocada en una posición fija relativa a señales externas al laberinto, por tanto la rata debe aprender a utilizar las señales distales del medio ambiente para navegar hacia la plataforma de escape.

Goodlett y col., (87) analizaron los efectos de la desnutrición hipoproteínica en dos tareas, una tarea de alternación espacial recompensada (i.e., los animales tenían que visitar de manera alternada cada brazo del laberinto en T para obtener la recompensa) y otra de navegación en el laberinto de Morris de señal-distal. Sus ratas crónicamente malnutridas cometieron más errores que las controles en la tarea de alternación espacial. Tonkiss y Galler (44) observaron resultados similares, aunque en animales desnutridos prenatalmente. Por el contrario, en el laberinto de Morris, observaron que los sujetos desnutridos aprendieron a usar las señales distales tan bien como los controles. Por lo que concluyeron que el procesamiento complejo de información espacial es deteriorado por la desnutrición, mientras que la localización y el mapeo espacial *per se* no son afectados por tal alteración. Además, la falta total de deterioro en la localización espacial en el laberinto de Morris podría deberse a que - como se ha reportado (72,88,89)- las ratas con antecedentes de desnutrición a menudo no tienen dificultades con problemas simples de aprendizaje, sino que los

efectos de esta alteración son fácilmente detectables cuando las tareas de evaluación son más complejas.

Resultados similares, en cuanto al laberinto de Morris, fueron encontrados por Campbell y Bedi (90) y Bedi (91) y estos autores sugieren que el hecho de no haber encontrado diferencias entre las ratas controles y las desnutridas podría indicar que el cerebro de la rata tiene un grado considerable de "capacidad disponible". Esto es, que pueda funcionar de manera aparentemente normal aún con un daño substancial y alteraciones morfológicas de varias regiones cerebrales, o bien que la desnutrición temprana no afecta permanentemente el comportamiento de aprendizaje espacial de las ratas.

Por su parte, Castro y Rudy (92) trataron de explorar otra alternativa que pudiese ser la causa de las inconsistencias en los resultados conductuales de animales desnutridos. Estos investigadores notaron que los efectos conductuales de la desnutrición temprana se evaluaban en animales adultos, por lo que decidieron probar la posibilidad de que la desnutrición temprana pudiese tener efectos mayores en el comportamiento de los animales que todavía estaban en desarrollo. El método de desnutrición que emplearon fue el de separación de la camada durante los primeros 16 días de vida y, a través del laberinto de Morris, en sus dos modalidades, probaron a sus animales a los 19, 22, 24, 27 y 30 días de edad. Estos autores encontraron que las ratas desnutridas, desde los 19 días de edad eran capaces de localizar la plataforma de escape en el laberinto de señal-proximal. Con respecto a los animales de 27 días probados en el laberinto de señal-distal, observaron que las ratas desnutridas no aprendieron a utilizar las señales distales para localizar la plataforma oculta. A los 30 días de edad, no hubo diferencias entre los controles y desnutridos con respecto al uso de señales distales para localizar la plataforma. Sin embargo, las latencias de escape fueron más largas en los animales desnutridos de esta edad que en los controles. Estos experimentos mostraron que la desnutrición temprana no produce deficiencias en el

aprendizaje con señal proximal, pero sí deteriora la ejecución de la navegación en el paradigma de señal distal. Los resultados de estos autores sugieren que los efectos de la desnutrición temprana son dependientes de la edad y de la tarea de aprendizaje.

El efecto de la desnutrición en el aprendizaje y la memoria espacial no sólo ha suscitado controversias en cuanto a si se producen deficiencias o no se producen, sino también, en cuanto a un mejoramiento en la ejecución de tareas espaciales. Un ejemplo de ello es el trabajo de Idrobo y col. (93) en el cual fue mostrado que ratones desnutridos postnatalmente desde los tres hasta los quince meses, tuvieron un mayor número de respuestas correctas en el paradigma del laberinto radial que los controles, por tanto parecería que los animales desnutridos aprenden mejor la tarea que los controles, lo cual ya había sido reportado años antes por Laughlin y col. (30).

Sin embargo, es necesario hacer notar que los paradigmas conductuales que involucran una recompensa apetitiva (i.e., los laberintos en Y, T, radiales y algunos condicionamientos operantes), presentan problemas de interpretación, ya que como mostraron Halas y col. (37) y Tonkiss y col. (94) los animales desnutridos presentan una mayor motivación a la recompensa apetitiva que los controles, por tanto no es claro si los cambios en el aprendizaje que se observan en este tipo de dispositivos son debidos a la desnutrición o a que los animales están en un estado motivacional distinto.

APRENDIZAJE DE EVITACION

Como una alternativa a los paradigmas que involucran recompensas apetitivas se ha recurrido a paradigmas de aprendizaje con consecuencias aversivas (e.g., castigos). Por ejemplo, que el sujeto aprenda a evitar un evento desagradable (e.g., un choque eléctrico) inhibiendo (e.g., la prevención pasiva, Fig. 4) o alternando su

movimiento (e.g., prevención activa), o bien que el animal asocie cierto tipo de estímulo (e.g., un tono o una luz) con la presentación de un castigo.

En una situación no apetitiva Barnes y col. (49) notaron que a cerdos con desnutrición temprana (con dietas bajas en proteína) les tomaba más tiempo extinguir una respuesta de evitación condicionada a un estímulo nocivo que a los organismos controles, aunque no encontraron diferencias en el ritmo de adquisición de la respuesta (i.e., en el ritmo de evitación del estímulo nocivo). Resultados similares encontraron Franková y Barnes (41) en ratas. Sin embargo, estos autores enfatizaron que aunque no hubo diferencia entre controles y desnutridos en el ritmo de aprendizaje (expresado en términos de latencias), las ratas desnutridas mostraron grandes alteraciones conductuales, tales como ansiedad y excitación exageradas. Por esta misma época Guthrie (15) reportó que las ratas desnutridas durante la lactancia y postdestete temprano, eran tan capaces como las controles de asociar un estímulo auditivo para evitar un choque eléctrico.

Posteriormente, Levitsky y Barnes (42) compararon las respuestas de ratas adultas desnutridas con una dieta baja en caseína (impuesta durante la lactancia y 4 semanas después del destete), con las respuestas de ratas bien alimentadas, en los paradigmas de prevención pasiva y activa y observaron que las ratas desnutridas mostraban una respuesta emocional más intensa en la evitación al choque, i.e., permanecían más tiempo en la plataforma después de haber recibido el choque eléctrico que las ratas controles. En el caso de la prevención activa observaron que las ratas desnutridas mostraban una respuesta más rápida y más prolongada que las ratas normales. Estos autores concluyeron que la desnutrición temprana produce efectos a largo plazo disminuyendo el umbral de respuesta. Franková (16), observó resultados similares aunque en sus experimentos las ratas desnutridas mostraron aprender mejor que las controles. El mejoramiento en el aprendizaje, previamente fue reportado por Smart y Dobbing (95), por lo que sugerimos que, además de la desnutrición, podría

haber otros factores de tipo metodológico, como el grado y duración del período de desnutrición, la motivación, la edad de los animales, la manipulación temprana, etc. que estuviesen interfiriendo para producir las diferentes respuestas de los animales.

Por su parte, Smart y Dobbing (96) no encontraron alteraciones en la ejecución de una tarea de prevención pasiva en ratas desnutridas (por reducción al 50% de la cantidad de alimento) durante la gestación y la lactancia. Sin embargo, años más tarde fue reportado (39,53,58) que las ratas previamente desnutridas mostraban umbrales de alerta más bajos que las controles, lo cual podría explicar el incremento en la respuestas de las ratas desnutridas ante un estímulo aversivo.

Con un tipo de desnutrición diferente, en el cual ratones fueron desnutridos a partir del séptimo día de la gestación hasta el destete, desde el nacimiento hasta el destete o ambos, Bush y Leathwood (29) observaron que todos los ratones desnutridos probados en un paradigma de evitación (i.e., que incluía un tono y una luz que anunciaban el choque eléctrico), lograron un número menor de evitaciones exitosas que los controles y, más aún, que la manipulación temprana no tuvo ningún efecto en el comportamiento de evitación. Adicionalmente, notaron que la desnutrición prenatal tenía un mayor efecto que la postnatal. Estos resultados fueron confirmados por Tonjes y col. (98).

Posteriormente, fue sugerido que las diferencias en el comportamiento de ratas desnutridas y las bien nutridas podrían deberse a las alteraciones en las interacciones maternas y sociales más que a la desnutrición *per se* (99), por lo que se llevaron a cabo experimentos para probar los efectos de la desnutrición y la privación maternal como factores que interfiriesen en la ejecución de una tarea de prevención pasiva (43). En cuanto a las alteraciones en el comportamiento se encontraron resultados similares a los previamente reportados (39,42,58). En cuanto a las interacciones maternas se llegó a la conclusión de que la desnutrición y los efectos de ésta en el crecimiento corporal y cerebral, son los factores primordiales que afectan el

comportamiento tardío de las ratas previamente desnutridas más que las alteraciones madre-infante asociadas con un régimen nutricional (43).

Aunque, no queda claro si la desnutrición produce deficiencias en la habilidad de aprendizaje de evitación a estímulos nocivos, sí es posible concluir que la desnutrición por una parte, disminuye el umbral de respuesta de los animales y por otra produce anomalías conductuales tales como la ocurrencia de comportamientos estereotipados (e.g. un acicalamiento exagerado) que en los animales bien nutridos no se presentan cuando son expuestos a pruebas de aprendizaje de este tipo.

En el cuadro 1, se resumen los resultados obtenidos por los grupos de investigación -analizados en el presente trabajo-, sobre el efecto de los diferentes procedimientos de desnutrición en la ejecución de diversas tareas de aprendizaje.

DISCUSION

A lo largo de esta revisión hemos tratado de analizar los efectos que produce la mala nutrición, no sólo en ciertos patrones conductuales, sino también en los procesos involucrados en el aprendizaje. Con respecto al primer punto parece haber un consenso en cuanto a las alteraciones que la desnutrición provoca, ya que los trabajos reportados por diversos grupos de investigación convergen en los mismos puntos, por ejemplo en que la desnutrición produce un retraso en la aparición de las primeras conductas, alteraciones en el comportamiento social, menor exploración y sobre todo algo que consistentemente se ha observado es una respuesta emocional exagerada. Empero, en cuanto a las alteraciones que produce la desnutrición en los procesos de aprendizaje y memoria, los resultados obtenidos hasta ahora son controversiales.

Sin embargo, hay muchas variables que podrían afectar la ejecución que no tienen nada que ver con el aprendizaje. Este aspecto es particularmente serio, ya que en muchos trabajos se usan nutrientes como reforzadores para la ejecución de la tarea

de aprendizaje. El problema de los paradigmas que involucran una recompensa apetitiva, como es el caso de algunos laberintos y del condicionamiento operante, es el hecho de que para que el animal lleve a cabo la conducta se le debe de privar de alimento horas antes de la prueba, por tanto de los resultados emanados de estas pruebas se pueden originar conclusiones inadecuadas, por lo que no queda claro si el cambio conductual observado se debe a la desnutrición, a la motivación o a la privación de alimento. De todos estos factores, la motivación parece ser la que más influye, ya que se ha reportado que la desnutrición produce diversas alteraciones fisiológicas que persisten aún después del período en el que fue impuesta. Estas alteraciones incluyen cambios en la eficiencia de la asimilación del alimento (78) y cambios en los niveles de glucosa en sangre (100). Parece ser que estos cambios fisiológicos son la base de la gran motivación a la comida que muestran los animales desnutridos.

Por otra parte, si no son los nutrientes los que se usan como reforzadores son los estímulos nocivos. Con este tipo de reforzadores, también se han encontrado inconsistencias en los resultados. Algunos autores reportan deficiencias en la evitación a los estímulos nocivos, mientras que otros o no encuentran diferencias o reportan un número mayor de evitaciones exitosas por parte de los animales desnutridos. Parece ser, que la base de estas inconsistencias es la diferencia en el grado de emocionalidad entre animales normales y desnutridos, ya que el común denominador de todos estos trabajos, como mencionamos en párrafos anteriores, es que los animales desnutridos presentan una alta emocionalidad y exhiben una respuesta exagerada, probablemente debido a que los umbrales para provocar un estado de alerta son más bajos que en los animales bien nutridos (39,58,72).

Otro elemento que influye en la ocurrencia o no de diferencias entre controles y desnutridos es el grado de dificultad de la tarea del aprendizaje que se utilice. Por ejemplo, hay datos que muestran que el sobre-entrenamiento reduce la alta

emocionalidad que caracteriza a los desnutridos (84), por tanto se podría esperar que las deficiencias conductuales producidas por la mala nutrición se redujeran si se sobreentrena a los animales. Más aún, se tienen datos que sugieren que los organismos desnutridos no tienen dificultades con problemas simples de aprendizaje (e.g. asociaciones entre estímulos), sino los efectos de la desnutrición son fácilmente detectables cuando las tareas de evaluación son más complejas (72,88,89). Es posible que los parámetros de evaluación de la capacidad para resolver problemas simples de aprendizaje de algunos paradigmas, no sean las medidas adecuadas de una deficiencia en el desarrollo cognitivo (85).

Hasta ahora, hemos mencionado algunas condiciones bajo las cuales se llevan a cabo los experimentos para analizar los posibles efectos de la desnutrición en los procesos de aprendizaje y memoria. Sin embargo, existen otros factores que pueden enmascarar estos efectos, entre los más importantes tenemos a la edad, el sexo, el período en el que se instala la desnutrición y el grado de severidad de la desnutrición.

Es importante que se tome en cuenta la edad de los animales, ya que se ha observado que la desnutrición temprana tiene efectos más drásticos en los organismos en desarrollo que en los adultos, aunque en algunos casos el daño puede permanecer hasta la etapa adulta (73,89). A este respecto se ha sugerido que un efecto de la desnutrición durante la vida temprana es deteriorar la habilidad para aprender aspectos del medioambiente que no están inmediatamente relacionados al desempeño de la tarea de ese momento (72). Con respecto al sexo, la mayoría de los experimentos se han llevado a cabo en machos, pero los pocos experimentos que se han realizado en hembras muestran que los efectos de la desnutrición parecen ser menos severos o quizá sea más difícil evaluar los resultados en las hembras, ya que en ellas el ciclo estral puede provocar variaciones conductuales (101).

En cuanto al período de instalación de la desnutrición y al grado de severidad de ésta, hay evidencias que muestran que la intensidad del daño depende, de la etapa

de la vida del animal en que se presente la desnutrición. Se sabe que existe un período crítico en el desarrollo del SNC (i.e., período de crecimiento rápido, 7) que para el hombre sería el último trimestre de la gestación y los dos primeros años de vida y para la rata la última semana de la gestación y todo el período de lactancia. Si la desnutrición se instala durante este período crítico, los daños podrían ser irreversibles (102,103) y desde luego, las alteraciones en los procesos de aprendizaje serían más evidentes. Inclusive, se ha postulado que el mejoramiento en el aprendizaje por parte de los animales desnutridos, se debe a que la desnutrición fue instalada después del período crítico. Un ejemplo de ello es el trabajo de Idrobo y col. (93), en el cual los animales fueron desnutridos postnatalmente desde el 3° al 15avo mes, cuando el período crítico ya había pasado.

Por otra parte, Katz (104) y Smart (101) se dieron a la tarea de hacer una evaluación de los trabajos reportados hasta esas fechas sobre la influencia de la desnutrición en el aprendizaje. Estos autores encontraron que aproximadamente en el 60% de los experimentos no se reportaban diferencias significativas entre controles y desnutridos, en el 30% de los casos los animales bien nutridos desempeñaban mejor la tarea que los desnutridos y en el 10% restante los desnutridos tenían mejores ejecuciones que los controles. En la actualidad estos porcentajes han variado un poco. Con respecto a los trabajos que se mencionan en esta revisión, notamos que aproximadamente el 37% de los reportes no muestran diferencias significativas entre controles y desnutridos, el 49% favorece a los controles y el 14% muestran una mejor ejecución por parte de los desnutridos. Como es posible notar, a la fecha se han incrementado los estudios que apoyan la idea de que los animales bien nutridos se desempeñan mejor que los desnutridos, ha disminuído el número de estudios que no muestran diferencias significativas y han aumentado muy ligeramente los trabajos en los que se favorece a los desnutridos. Probablemente, estos cambios desde 1984 a la fecha se deban a que se han empleado mejores diseños experimentales y desde luego

a que se ha tratado de controlar el mayor número de variables posibles que pudiesen confundir los resultados.

Los estudios más recientes parecen apoyar la idea de que la desnutrición puede alterar la habilidad de aprendizaje, sin embargo se debe tener cuidado en el momento de interpretar los resultados, por lo cual queremos finalizar enfatizando dos puntos que consideramos de gran importancia; en primer lugar que el agua o el alimento son reforzadores inapropiados en los estudios de aprendizaje en animales privados nutricionalmente y en segundo, que se deben de tomar en cuenta los diversos factores que pueden influir en el desempeño de las tareas de aprendizaje de los animales desnutridos (e.g., la motivación, el período de la desnutrición, la edad de los sujetos, el grado de dificultad de la tarea, etc.) antes de llegar a una conclusión definitiva sobre los efectos de la desnutrición en los procesos de aprendizaje y memoria.

AGRADECIMIENTOS

Los autores desean expresar su agradecimiento a las siguientes personas: Dr. Manuel Salas Alvarado y Dra. Carolina Escobar Briones, por sus valiosos e inapreciables comentarios a este trabajo y, al apoyo proporcionado por la DGAPA, No. de Proyecto IN204892.

REFERENCIAS

- 1.-Morgane PJ, Austin-LaFrance R, Bronzino J, y col. Prenatal malnutrition and development of the brain. *Neurosci Biobehav Rev* 1993; 17: 91-128.
- 2.-Barnes RH. Reflections on the study of malnutrition and mental development. Levitsky DA En: *Malnutrition, environment, and behavior*. Cornell University Press Ltd, 1979: 19-27.
- 3.-Galler JR, Ramsey F, Solimano G. The influence of early malnutrition on subsequent behavioral development III. Learning disabilities as a sequel to malnutrition. *Pediatric Res* 1984; 18: 309-313.
- 4.-Galler RH, Ramsey F, Forde V, Salt P, Archer E. Long-term effects of early kwashiorkor compared with marasmus. II. Intellectual performance. *J Pediatric Gastroenterol Nutr* 1987; 6: 847-854.
- 5.-Galler RH, Ramsey F, Salt P, Archer E. Long-term effects of early kwashiorkor compared with marasmus. III. Fine motor skills. *J Pediatric Gastroenterol Nutr* 1987; 6: 855-859.
- 6.-Winick M. Nutrition and brain development. En: Serban G ed. *Nutrition and mental functions*. New York: Plenum Press, 1975: 65-73.
- 7.-Dobbing J, Sands J. Vulnerability of development brain IX. The effect of nutritional growth retardation on the timing of the brain growth-spurt. *Biol Neonate* 1971; 19: 363-378.
- 8.-West CD, Kemper T. The effect of low protein diet on the anatomical development of the rat brain. *Brain Res* 1976; 107: 221-237.
- 9.-Cintra L, Díaz-Cintra S, Galván A, Kemper T, Morgane PJ. Effects of protein undernutrition on the dentate gyrus in rats of three age groups. *Brain Res* 1990; 532: 271-277.

- 10.-Díaz-Cintra S, Cintra L, Galván A, Aguilar A, Kemper T, Morgane PJ. Effects of prenatal protein deprivation on the postnatal development of granule cells in the fascia dentata. *J Comp Neurol* 1991; 310: 356-364.
- 11.-García-Ruiz M, Díaz-Cintra S, Cintra L, Corkidi G. Effect of protein malnutrition on CA3 hippocampal pyramidal cells in rats of three ages. *Brain Res* 1993; 625:203-212.
- 12.-Lewis P, Patel A, Balázs R. Effect of undernutrition on cell generation in the adult rat brain. *Brain Res.* 1979; 168: 186-189.
- 13.-De Oliveira LM, Almeida SS, Lima JG, Rocinholi LF. Environmental stimulation and anxiolytic drugs: Differential effects in early malnourished animals. En: Cintra L. ed. International workshop on malnutrition and the developing central nervous system : Sociedad Mexicana de Ciencias Fisiológicas A.C. y Universidad Americana de Acapulco, 1993:15.
- 14.-Davison AN, Dobbing J. The developing brain. En: Davison AN, Dobbing J eds. *Applied neurochemistry*. Philadelphia: FA Davis Co, 1968: 253-286.
- 15.-Guthrie HA. Severe undernutrition in early infancy and behavior in rehabilitated albino rats. *Physiol Behav* 1968; 3: 619-623.
- 16.-Franková S. Influence of the familiarity what the environment and early malnutrition on the avoidance learning and behavior in rats. *Act Nerv Sup* 1973; 15: 207-216.
- 17.-Cowley JJ, Griesel RD. The effect on growth and behaviour of rehabilitating first and second generation low protein rats. *Anim Behav* 1966; 14: 506-517.
- 18.-Simonson M, Sherwin RW, Anilane JK, Yu WY, Chow BF. Neuromotor development in progeny of underfed mother rats. *J Nutr* 1969; 98: 18-24.
- 19.-Smart JL, Dobbing J. Vulnerability of developing brain: II. Effects of early nutritional deprivation on reflex ontogeny and development of behaviour in the rat. *Brain Res* 1971; 28: 85-95.

- 20.-Massaro TF, Levitsky D, Barnes RH. Early protein malnutrition in the rat Behavioral changes during rehabilitation. *Dev Psychobiol* 1977; 10: 105-111.
- 21.-Fleischer SF, Turkewitz G. Effect of neonatal stunting on development of rats: Large litter rearing. *Dev Psychobiol* 1979; 12: 137-149.
- 22.-Fleischer SF, Turkewitz G. Behavioral effects of rotation between lactating and nonlactating females. *Dev Psychobiol* 1979; 12: 245-254.
- 23.-Fleischer SF, Turkewitz G, Finklestein H. Sensory influences on homing of stunted rat pups. *Dev Psychobiol* 1981; 14: 29-39.
- 24.-Galler JR. Home orientation in nursing rats: The effects of rehabilitation following intergenerational malnutrition. *Dev Psychobiol* 1979; 12: 499-508.
- 25.-Galler JR. Home-orienting behavior in rat pups surviving postnatal of intergenerational malnutrition. *Dev Psychobiol* 1980; 13: 563-572.
- 26.-Galler JR, Seelig C. Home-orienting behavior in rat pups: The effect of 2 and 3 generations of rehabilitation following intergenerational malnutrition. *Dev Psychobiol* 1981; 14: 541-548.
- 27.-Franková S. Influence of early social environment on behavioural development and on later maternal behaviour of protein deprived rats. *Activ Ner Sup* 1981; 23: 81-91.
- 28.-Hunt L, Smotherman W, Wiener S y Levine S. Nutritional variables and their effects on the development of ultrasonic vocalizations in rat pups. *Physiol Behav* 1976; 17: 1037-1039.
- 29.-Bush M, Leathwood PD. Effects of different regimens of early malnutrition on behavioral development and avoidance learning in Swiss white mice. *Br J Nutr* 1975; 33: 373-385.
- 30.-Laughlin NK, Sranley F, Bell J. Early undernutrition and later hippocampal damage: effect of spontaneous behaviors and reversal learning. *Physiol Psychol* 1984; 11: 268-277.

- 31.-Altman J, Sudarshan K, Das G, McCormick N, Barnes D. The influence of nutrition on neural and behavioral development: II. Development of some motor, particularly locomotor patterns during infancy. *Dev Psychobiol* 1971; 4: 97-114.
- 32.-Salas M, Cintra L. Behavioral effects of undernutrition on the rat. *Bol Estud Med Biol Mex* 1973; 28: 23-27.
- 33.-Chase HP, Lindsley WFB, O'Brien D. Undernutrition and cerebellar development. *Nature* 1969; 221: 554- 555.
- 34.-Culley WJ, Lineberger RD. Effect of undernutrition on the size and composition of the rat brain. *J Nutr* 1968; 96: 375-381.
- 35.-Wallingford JC, Shrader RE, Zeman FJ. Effect of maternal protein-calorie malnutrition on fetal cerebellar neurogenesis. *J Nutr* 1980; 110: 543-551.
- 36.-Salas M, Pulido S, Torrero C, Escobar C. Neonatal undernutrition and self-grooming development in the rat: long-term effects. *Physiol Behav* 1991; 50: 567-572.
- 37.-Halas ES, Burger PA, Sandstead HH. Food motivation of rehabilitated malnourished rats: Implications for learning studies. *Anim Learn Behav* 1980; 8: 152-158.
- 38.-Smart JL, Dobbing J. Increased thirst and hunger in adult rats undernourished as infants: An alternative explanation. *Br J Nutr* 1977; 37: 421-429.
- 39.-Smart JL, Dobbing J, Adlard BPF, Lynch A, Sanda J. Vulnerability of developing brain: Relative effects of growth restriction during the fetal and suckling periods on behavior and brain composition of adult rats. *J Nutr* 1973; 103: 1327-1338.
- 40.-Escobar C, Pulido S, Caldelas I. Early olfactory response in neonatally undernourished rats. En: Cintra L, ed. International workshop on malnutrition and the developing central nervous system. Sociedad Mexicana de Ciencias Fisiológicas A.C. y Universidad Americana de Acapulco, 1993:13-14.
- 41.-Franková S, Barnes RH. Effect of malnutrition in early life on avoidance conditioning and behavior of adult rats. *J Nutr* 1968; 96: 485-493.

- 42.-Levitsky DA, Barnes RH. Effect of early malnutrition on the reaction of adult rats to aversive stimuli. *Nature* 1970; 225: 468-469.
- 43.-Lynch A. Passive avoidance behavior and response thresholds in adult male rats after early postnatal undernutrition. *Physiol Behav* 1976; 16: 27-32.
- 44.-Tonkiss J, Galler JR. Prenatal protein malnutrition and working memory performance in adult rats. *Behav Brain Res* 1990; 40: 95-107.
- 45.-Salas M, Torrero C. Maternal behavior of rats undernourished in the early postnatal period. *Bol Estud Med Biol Mex* 1979; 30: 237-244.
- 46.-Wiener SG, Fitzpatrick KM, Levin R, Smotherman WP, Levin S. Alterations in the maternal behavior of rats rearing malnourished offspring. *Dev Psychobiol* 1977; 10: 243-254.
- 47.-Watson TS, Smart JL. Social behaviour of rats following pre and early postnatal undernutrition. *Physiol Behav* 1978; 20: 749-753.
- 48.-Escobar C, Salas M. Ameliorating effects of early sensory stimulation on the behavior of adult rats underfed during the lactating period. *Bol Estud Med Biol Mex* 1987; 35: 195-202.
- 49.-Barnes RH, Neely CS, Kwong E, Labadan, BA, Franková S. Postnatal nutritional deprivations as determinants of adult rat behavior toward food, its consumption and utilization. *J Nutr* 1968; 96: 467-476.
- 50.-Salas M, Cintra L. Undernutrition and novelty responses influence of early food restriction on the responsiveness to novel stimuli in adult rats. *Bol Estud Med Biol Mex* 1979; 30: 201-204.
- 51.-File SE, Dale S. Effects of time of day and food deprivation on exploratory activity in the rat. *Anim Behav* 1972; 20: 758-762.
- 52.-Wiener SG, Robinson L, Levine S. Influence of perinatal malnutrition on adult physiological and behavioral reactivity in rats. *Physiol Behav* 1983; 30: 41-50.

- 53.-Levitsky DA. Malnutrition and the hunger to learn. En: Levitsky DA, ed. Malnutrition, environment and behavior. Ithaca: Cornell University Press 1979: 161-179.
- 54.-Zimmerman RR, Strobel DA, Maguire D. Neophobic reactions in protein malnourished infant monkeys. Proc 78th Ann Conv APA 1970; 6: 197.
- 55.-Barnett SA, Smart JL, Widdowson EM. Early nutrition and the activity and feeding of rats in an artificial environment. Dev Psychobiol 1971; 4: 1-15.
- 56.-Levitsky DA, Barnes RH. Nutritional and environmental interactions in the development of the rat: Long-term effects. Science 1972; 176: 67-71.
- 57.-Watson TS, Smart JL, Dobbing J. Undernutrition in early life: Lasting effects on activity and social behavior of male and female rats. Dev Psychobiol 1976; 9: 529-538.
- 58.-Stern W, Morgane PJ, Miller M, Resnick O. Protein Malnutrition in rats: Response of brain amines and behavior to foot shock stress. Exp Neurol 1975; 47: 56-67.
- 59.-Escobar BC. Alteraciones morfológicas en la amígdala y el claustrum asociadas a la desnutrición neonatal en la rata. Tesis Doctorado. UNAM 1992.
- 60.- Kupfermann I. Learning and memory. En:Kandel ER, Schwartz JH, Jessel TM.ed. Principles of Neural Science 3a ed. USA: Elsevier 1991: 997-1008.
- 61.-Bower G, Hilgard E. El condicionamiento operante de Skinner. En: Bower GH.ed. Teorias del aprendizaje. 2a ed. México: Trillas, 1992:16-267.
- 62.-Tonkiss J, Smart JL, Massey RF. Effects of early life undernutrition in artificially-reared rats 2. Subsequent behaviour. Physiol Behav 1987; 41: 555-562.
- 63.-Stephens DN, Tonkiss J. Rats undernourished as infants differ from controls in learning about a compound but not a simple discriminative stimulus. Physiol Behav 1981; 26: 803-808.

- 64.-Stephens DN, Tonkiss J, Wearden JH. differences between rats undernourished preweaning and controls in learning about redundant stimulus during acquisition of a conditioned emotional response. *Physiol Behav* 1982; 28: 95-101.
- 65.-Roberts HJ, Smart JL, Wearden JH. Early life undernutrition and operant responding in the rat: The effect of the reinforcement schedule employed. *Physiol Behav* 1982; 28: 777-785.
- 66.-Tonkiss J, Galler J R, Formica N, Shukitt H, Timm RR. Fetal Protein malnutrition impairs acquisition of a DRL task in adult rats. *Physiol Behav* 1990; 48: 73-77.
- 67.-Kramer TJ, Rilling M. Differential reinforcement of low rates: a selective critique. *Psychol Bull* 1970; 74:225-254.
- 68.-Tonkiss J, Foster GA, Galler JR. Prenatal protein malnutrition and hippocampal function: partial reinforcement extinction effect. *Brain Res Bull* 1991; 27: 809-813.
- 69.-Rogers PJ, Tonkiss J, Smart JL. Incidental learning is impaired during early-life undernutrition. *Dev Psychobiol* 1986; 19: 113-124.
- 70.-Crnic L. Effects of nutrition on brain chemistry and behavior. *Dev Psychobiol* 1983; 16: 129-145.
- 71.-Slob AK, Snow CE, Natris-Mathot E. Absence of behavioral deficits following neonatal undernutrition in the rat. *Dev Psychobiol* 1973; 6: 177-186.
- 72.-Levitsky DA. Malnutrition and the hunger to learn. En: Levitsky, DA. *Malnutrition, Environment and Behavior*. Ithaca: Cornell University Press; 1979: 161-179.
- 73.-Castro C A, Rudy JW. Early-life malnutrition impairs the performance of both young and adult rats on visual discrimination learning tasks. *Dev Psychobiol* 1989; 22: 15-28.
- 74.-Tonkiss J, Galler JR, Shukitt-Hale B, Rocco FJ. Prenatal protein malnutrition impairs visual discrimination learning in adult rats. *Psychobiol* 1991; 19: 247-250.

- 75.-Celedón JM, Smart JL, Dobbing, J. Effects of level of motivation on visual discrimination, transfer of learning, and long-term memory in previously undernourished and control rats. *Nutr Behav* 1982; 1:89-97.
- 76.-Lashley KS. Brain mechanisms and intelligence, a quantitative study of injuries to the brain. Dover Publications, Inc. New York 1929; 1-185.
- 77.-Simonson M, Chow BF. Maze studies on progeny of underfed mother rats. *J Nutr* 1970; 100: 685-690.
- 78.-Hsueh, AM., Simonson, M., Chow, BF. Hanson, AM. The importance of period of dietary restriction of the dam on behavior and growth in the rat. *J Nutr* 1974; 104; 37-46.
- 79.-Cravens RW. Effects of maternal undernutrition on offspring behavior: Incentive value of food reward and escape from water. *Dev Psychobiol* 1974; 7: 61-69.
- 80.-Smart JL. Reversal of spatial discrimination learning in a water maze by previously undernourished rats. *Anim Learn Behav* 1976; 4: 313-316.
- 81.-Jordan TC, Cane SE, Howells KF. Deficits in Spatial memory performance induced by early undernutrition. *Dev Psychobiol* 1981; 14: 317-325.
- 82.-Olton DS, Becker JT, Handelmann GE. Hippocampus, space and memory. *Behav Brain Sci* 1979; 2: 313-365.
- 83.-Jordan TC, Howells KF, McNaughton N, Heatlie P. Effects of early undernutrition on hippocampal development and function. *Res Exp Med* 1982; 180: 201-207.
- 84.-Hall RD. Is hippocampal function in the adult rat impaired by early protein or protein-calorie deficiencies? *Dev Psychobiol* 1983; 16: 395-411.
- 85.-Levitsky DA. Malnutrition and animal models of cognitive development. En: Serban, G., ed. *Nutrition and Mental Function*. New York: Plenum Press; 1975: 75-89.

- 86.-Morris RGM. Spatial localization does not depend on the presence of local cues. *Learning Motiv* 1981; 12: 239-260.
- 87.-Goodlett CR, Valentino ML, Morgane PJ, Resnick O. Spatial cue utilization in chronically malnourished rats: Task-specific learning deficits. *Dev Psychobiol* 1986; 19: 1-15.
- 88.-Galler JR, Mane M. Gender differences in visual discrimination by rats in response to malnutrition of varying durations. *Dev Psychobiol* 1980; 13: 409-416.
- 89.-Rudy JW, Castro CA. Undernutrition during the brain growth period of the rat significantly delays development of processes mediating Pavlovian trace conditioning. *Behav Neural Biol* 1990; 53: 307-320.
- 90.-Campbell LF, Bedi KS. The effects of undernutrition in early life on spatial learning. *Physiol Behav* 1989; 45: 883-890.
- 91.-Bedi KS. Spatial learning ability of rats undernourished during early postnatal life. *Physiol Behav* 1992; 51: 1001-1007.
- 92.-Castro CA, Rudy JW. Early-life malnutrition selectively retards the development of distal-but not proximal-cue navigation. *Dev Psychobiol* 1987; 20: 521-537.
- 93.-Idrobo F, Nandy K, Mostofsky DI, Blatt L, Nandy L. Dietary restriction: effects on radial maze learning and lipofuscin pigment deposition in the hippocampus and frontal cortex. *Arch Gerontol Geriatr* 1987; 6: 355-362.
- 94.-Tonkiss J, Shukitt-Hale B, Formica RN, Rocco FJ, Galler JR. Prenatal protein alters response to reward in adult rats. *Physiol Behav* 1990; 48: 675-680.
- 95.-Smart JL, Dobbing J. Vulnerability of developing brain. VI. Relative effects of fetal and early postnatal undernutrition on reflex ontogeny and development of behaviour in the rat. *Brain Res* 1971; 33: 303-314.
- 96.-Smart JL, Dobbing J. Vulnerability of developing brain. IV. Passive avoidance behavior in young rats following maternal undernutrition. *Dev Psychobiol* 1972; 5: 129-136.

- 97.-Morgane PJ, Austin-LaFrance RJ, Bronzino JD, Tonkiss J, Galler JR. Malnutrition and the developing central nervous system. En: Robert L, L K Jensen, ed. The vulnerable brain and environmental risks, volumen 1: Malnutrition and hazard assessment Plenum Press, New York 1992:3-44.
- 98.-Tonjes R, Hecht K, Hinz G, Docke F, Doner G. Effects of neonatal pyridostigmine on sexual maturation and adult behaviour in female rats subjected to maternal deprivation. *Endocrinol* 1981; 78: 1-11.
- 99.-Plaut SM. Studies of undernutrition in the young rat: methodological considerations. 1970; 3:157-167.
- 100.-Wapnir RA, Lifshitz F. Fasting-induced hypoglycemia in experimentally malnourished rats. *J Nutr* 1977; 107:383-390.
- 101.- Smart JL. Undernutrition, learning and memory: a critical analysis. *Clin Neuropharma* 1984; 7 suppl 1: 358-359.
- 102.-Winick M, Noble A. Cellular response in the rats during maturation at various ages. *J Nutr* 1966; 89: 300-306.
- 103.-Cordero ME, Trejo M, García E, Barros T, Rojas AM, Colombo M. Dendritic development in the neocortex of adult rats following a maintained prenatal and/or early postnatal life undernutrition. *Early Hum Dev.* 1986; 14: 245-258.
- 104.-Katz HB. The influence of undernutrition on learning performance in rodents. *Common Bureau Nut* 1980; 50: 767-784.

CUADRO 1.-DESEMPEÑO DE ANIMALES CONTROL Y DESNUTRIDOS EN DIFERENTES TAREAS DE APRENDIZAJE

AUTOR	METODO DE DESNUTRICION	PARADIGMA DE APRENDIZAJE	ESPECIE	RESULTADO
APRENDIZAJE INSTRUMENTAL				
Halas y col. (37)	RCML	RC	1	C
Stephens y Tonkiss (83)	RCML	RC	1	C
Stephens y col. (84)	RCML	RC	1	C
Roberts y col. (85)	RCML	IF e IV	1	D
Tonkiss y col. (82)	RCML	IV y RC	1	C
Tonkiss y Galler (44)	RPG	RC	1	NS
Tonkiss y col. (86)	RPG	RDB	1	C
Laughlin y col. (30)	RCPN	RC	1	D
Tonkiss y col. (84)	RPG	IV	1	C
Tonkiss y col. (88)	RPG	RP	1	NS
APRENDIZAJE DE DISCRIMINACION VISUAL				
Rogers y col. (69)	RCPN	Técnica de Lashley	1	NS
Rogers y col. (69)	RCPN	Lashley+exposición previa	1	C
Crnic (70)	RCPN	discrimin. de objetos	1	NS
Slob y col. (71)	RCPN	Caja de Thompson	1	NS
Castro y Rudy (73)	RCPN	Lashley acuático	1	C
Celedón y col. (75)	RCGL	discrimin. de objetos	1	C
Tonkiss y col. (74)	RPG	discrimin. de objetos	1	C
Levitsky (85)	RPPN	discrimin. de señales	1	NS
APRENDIZAJE Y MEMORIA Y ESPACIAL				
Barnes y col. (49)	RCPN	L. acuático en Y	1	C
Simonson y Chow (72)	RCGL	L. en T	1	C
Hsueh y col. (78)	RCML	L. en T	1	C
Cravens (79)	RCPN	L. acuático en Y	1	NS
Smart (80)	RCGL	L. acuático en T	1	NS
Jordan y col. (81)	RCGL	L. radial	1	C
Hall (84)	RPGL	L. radial	1	NS
Levitsky (85)	RPPN	L. radial	1	C
Goodlett y col. (87)	RPGL	L. en T	1	C
Goodlett y col. (87)	RPGL	L. de Morris	1	NS
Tonkiss y Galler (44)	RPG	L. en T	1	NS
Campbell y Bedl (90)	RCPN	L. de Morris	1	NS
Bedl (91)	RCPN	L. de Morris	1	NS
Castro y Rudy (92)	RCPN	L. de Morris Señal distal	1	C
Castro y Rudy (92)	RCPN	L. de Morris Señal proximal	1	NS
Idrobo y col. (93)	RCPN	L. radial	2	D
APRENDIZAJE DE EVITACION A ESTIMULOS NOCIVOS				
Barnes y col. (49)	RPML	PP	3	C
Franková y Barnes (41)	RPML	PP	1	C
Guthrie (15)	RPPN	EC	1	NS
Levitsky y Barnes (42)	RPPN	PP y PA	1	C
Franková (16)	RPML	EC	1	D
Smart y Dobbing (95)	RCGL	PP	1	D
Smart y Dobbing (95)	RCML	PP	1	NS
Bush y Leathwood (29)	RCGL	EC	2	C
Lynch (43)	RCPN	PP	1	C

Nota: Los números entre paréntesis indican el número de la referencia.

RCML: restricción de comida a la madre durante la lactancia.

RPML: restricción de proteína a la madre durante la lactancia.

RCPN: restricción de comida en el período postnatal (lactancia y postdestete temprano).

RPPN: restricción de proteína en el período postnatal (lactancia y postdestete temprano).

RCGL: restricción de comida durante la gestación y la lactancia.

RPGL: restricción de proteína durante la gestación y la lactancia.

RPG: restricción de proteína durante la gestación

RC: reforzamiento continuo

IF: reforzamiento de intervalo fijo

IV: reforzamiento de intervalo variable

RDB: reforzamiento diferencial de tasas bajas de respuesta

RP: reforzamiento parcial

L: laberinto

PP: prevención pasiva

PA: prevención activa

EC: evitación condicionada

C: mejor ejecución por parte de los animales control

D: mejor ejecución por parte de los animales desnutridos

NS: no significativo

1: rata

2: ratón

3: cerdo

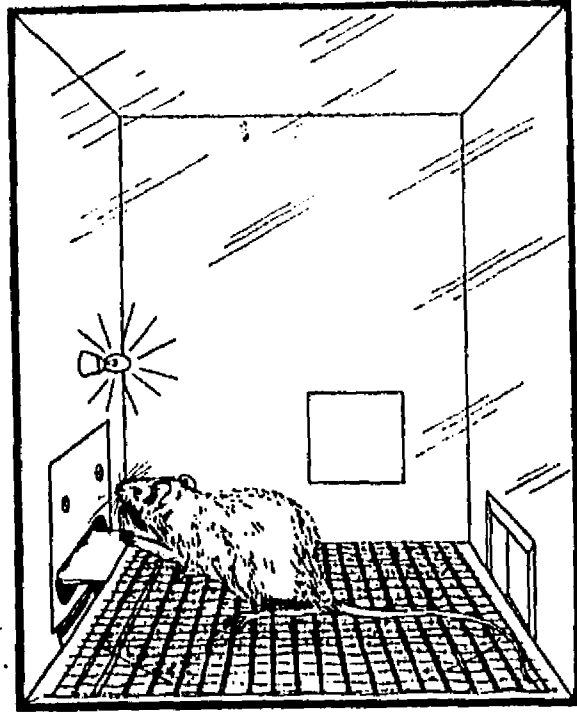


Figura 1. Esquema que muestra una caja de Skinner utilizada en los experimentos de aprendizaje instrumental.

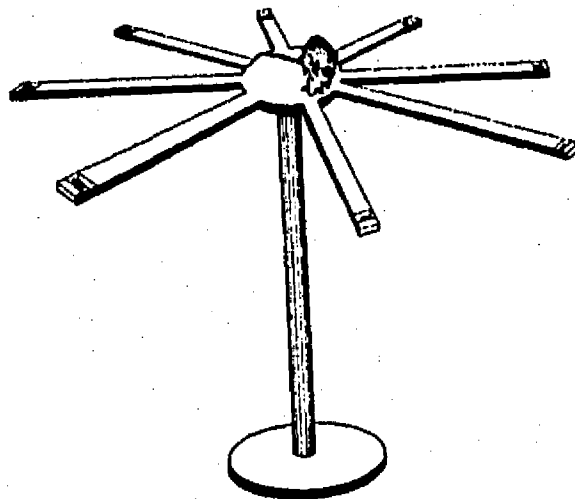


Figura 2. Ejemplo de un laberinto radial de 8 brazos. La rata es colocada en el centro para que se desplace a través de los brazos del laberinto en busca de una recompensa apetitiva.

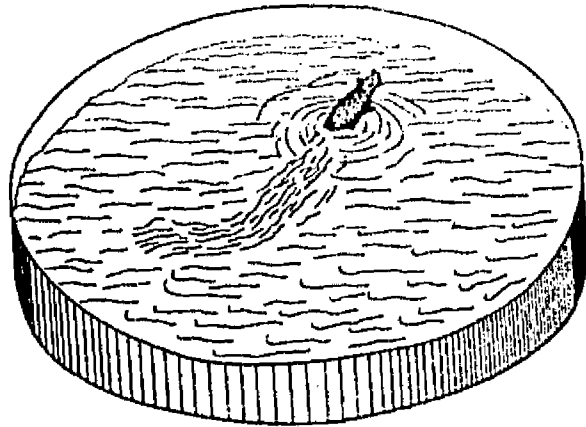


Figura 3. Representación esquemática del laberinto acuático de Morris. La línea ondulada muestra un ejemplo de la trayectoria que puede seguir una rata para encontrar la plataforma de escape.

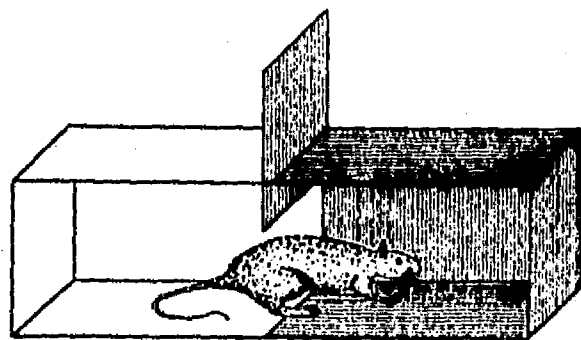


Figura 4. Esquema que muestra el dispositivo experimental más común, utilizado para la prevención pasiva. En este tipo de dispositivo la rata debe aprender a evitar un estímulo nocivo a través de la inhibición de su paso hacia el compartimiento oscuro (lado derecho del esquema).

PARTE V

EFFECTO DE LA DESNUTRICIÓN HIPOPROTEINICA EN LA EJECUCION DE UNA TAREA DE PREVENCION PASIVA.

INTRODUCCION

Como fue mencionado en el capítulo anterior se han llevado a cabo diversos estudios acerca de los efectos de la desnutrición en los procesos de aprendizaje y memoria y los resultados obtenidos hasta ahora son controvertibles. Quizá los orígenes de estas controversias se encuentren en los diferentes factores que pueden influir en el desempeño de las tareas de aprendizaje de los animales desnutridos, tales como la motivación, el tipo de reforzador (e.g., agua o comida), el período de la desnutrición, la edad de los sujetos, el grado de dificultad de la tarea, etc., factores que se deben de tomar en cuenta antes de llegar a una conclusión definitiva.

El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de la desnutrición hipoproteínica y valorar el grado de rehabilitación nutricional en la adquisición y retención de la conducta de evitación en el paradigma de prevención pasiva en ratas de 30 y 90 días.

En este paradigma el sujeto experimental aprende a evitar un estímulo nocivo inhibiendo su movimiento (i.e., dejando de hacer algo) y esta conducta la adquiere en un solo ensayo (Prado-Alcalá y Quirarte, 1993).

Se eligió este paradigma por dos razones, la primera de ellas porque hay trabajos previos que muestran que el hipocampo juega un papel relevante en el comportamiento de evitación (Altman y col., 1973; Coscina y Lash, 1969; Olton e Isaacson, 1968; Rich y Thompson, 1965) hecho importante para la presente investigación y segunda, porque consideramos que no sólo no presenta las desventajas de otros dispositivos sino que ofrece ventajas adicionales. Como fue mencionado en el capítulo anterior, el uso de algunos condicionamientos operantes y de laberintos en T, Y o radiales para probar la habilidad de aprendizaje de animales desnutridos, presenta problemas de interpretación de resultados, ya que se debe utilizar una recompensa apetitiva para inducir a los animales a llevar a cabo una tarea, por lo que es necesario previo a la ejecución del experimento, privarlos de comida o de agua. Este hecho provoca confusión en los resultados, pues es prácticamente imposible discriminar entre los efectos de la desnutrición y los de la privación de alimento.

Una de las ventajas que ofrece el paradigma de prevención pasiva es que no se requiere una recompensa apetitiva y por tanto no es necesario privar a los animales previamente al experimento conductual.

Existen otro tipo de paradigmas que no requieren de una recompensa apetitiva para que animal lleve a cabo alguna tarea, por ejemplo el laberinto de Morris, en este paradigma la rata debe aprender a localizar una plataforma y nadar

hacia ella; empero la rata aprende la tarea en varios ensayos, lo que incrementa la posibilidad de que los resultados se compliquen por la intervención de factores incontrolables, tales como variaciones ambientales térmicas, de humedad, etc. (Prado-Alcalá y Quirarte, 1993).

Otra de las ventajas de la prevención pasiva es que el entrenamiento se lleva cabo en un solo ensayo de corta duración, por tanto se reduce considerablemente la intervención de factores ajenos al problema. En este dispositivo experimental el evento que asociará el animal para aprender es un choque eléctrico, por lo que se puede asegurar que el factor motivacional es razonablemente constante para todos los animales que sean entrenados (Prado-Alcalá y Quirarte, 1993), esto último es de primordial importancia en el caso de nuestros experimentos, debido a que, como fue mencionado previamente, los animales desnutridos presentan una mayor motivación a la comida.

MATERIALES Y METODOS

Se utilizaron 15 ratas hembras y 5 machos de la cepa Sprague-Dawley de un peso entre 250 y 300g, las cuales fueron mantenidas en un cuarto de bioferio en condiciones oscuridad-luz 12:12 y temperatura constante (22-24°C).

Durante 5 semanas antes del apareamiento un lote de 5 hembras fue alimentado con una dieta de 6% de caseína y otro de 10 hembras con una dieta de 25% de caseína, a estas dietas se les adiciona metionina debido a que la caseína tiene un contenido muy bajo de aminoácidos sulfurados (el paradigma de desnutrición proteínica esta basado en condiciones observadas en poblaciones humanas desnutridas; Morgane y col.,1978). Para el apareamiento fueron colocadas 3 hembras con un macho, marcadas previamente con violeta de cresilo en la cola para llevar un control y así fuese posible identificar mediante frotis vaginales por las mañanas el día probable de fertilización de cada hembra; posteriormente todas las hembras que resultaron positivas fueron separadas en cajas de cría y se continuaron suministrando las dietas respectivas durante todo el período de gestación.

Una vez obtenidas las crías se dividieron en tres grupos: 1) las crías de madres nutridas con dieta 25% de caseína fueron colocadas con madres nutridas también con 25% (i.e., grupo control; 4 machos y 4 hembras); 2) las hijas de madres nutridas con dieta 6% fueron colocadas con madres nodrizas alimentadas con dieta 6% (i.e., grupo de desnutrición crónica) y 3) las crías de madres nutridas con 6% de caseína fueron colocadas con madres nutridas con 25% (i.e., grupo de desnutrición prenatal y rehabilitación nutricional postnatal; Fig 1).

A los 21 días se destetaron las crías y se colocó 1 animal en cada caja separándolos por condición experimental. Se utilizaron sólo ratas macho con el fin de reducir la posible variabilidad debida al sexo.

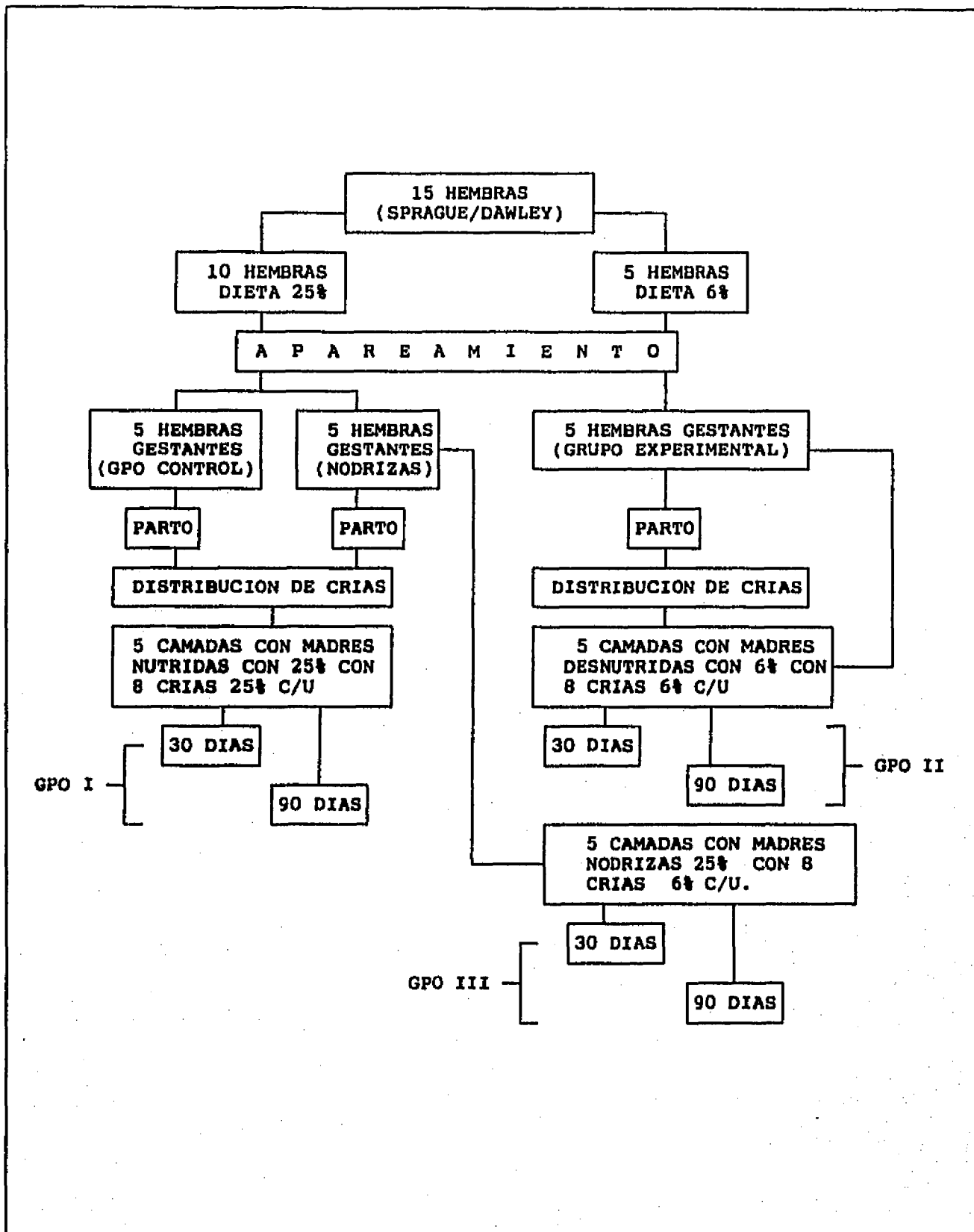


Fig. 1 Protocolo de dieta

Una vez que los animales llegaron a la edad requerida fueron entrenados y probados en el paradigma de prevención pasiva (10 animales para cada dieta y edad:

10 controles con dieta 25/25%, 10 con dieta 6/6%, y 10 con dieta 6/25% de 30 y 90 días).

El dispositivo experimental de prevención pasiva consiste de una cámara con dos compartimientos separados por una compuerta deslizable. Uno de los compartimientos, que se le denomina *de seguridad*, está más iluminado que el otro, al que se le llama *de castigo*; el piso de este último está constituido por dos placas metálicas, las cuales pueden ser electrificadas.

El procedimiento que se llevó cabo para probar conductualmente a los animales en este paradigma fue el siguiente (Fig. 2):

- 1.- En la primera sesión, la sesión de adquisición, se colocó al animal en el compartimiento de seguridad durante 10 segundos, al término de este tiempo se abrió la compuerta que comunica hacia el compartimiento de castigo (el oscuro) para dejar pasar al animal. El 95% de las ratas pasaron rápidamente al compartimiento oscuro, esta conducta se debe a su alto grado de curiosidad, que las lleva a explorar nuevos ambientes y a que son fotofóbicas (se alejan de la luz, Prado-Alcalá y Quirarte, 1993, Fig. 2).
- 2.- Cuando el animal se encontraba en el compartimiento de castigo se cerró la compuerta y se le dió a la rata un choque eléctrico de 2 mA durante 5 segundos.
- 3.- Una vez transcurrido ese tiempo la compuerta fue abierta para que el animal regresara al compartimiento de seguridad (latencia de escape), en el cual permanecería 30 segundos, con el objeto de que la rata asociara el compartimiento iluminado con seguridad (i.e., que aprendiera que en ese sitio estaría protegida del choque).
- 4.- Posteriormente, se sacó al animal del compartimiento y se regresó a su caja de estancia.
- 5.- Las siguientes sesiones, que son las sesiones de prueba o retención se realizaron a las 24 horas, 48 horas y 7 días después del día de la adquisición. Se colocó nuevamente el animal en el compartimiento de seguridad, se le dejó ahí durante 10 segundos y se abrió la compuerta que comunica con el compartimiento de castigo.
- 6.- Se cronometró el tiempo que tardaba la rata en pasar hacia el otro compartimiento. Si transcurrían 600 segundos y el animal no pasaba, se consideraba que había aprendido que en el compartimiento oscuro recibiría un castigo y que en el compartimiento iluminado estaría seguro, si antes de 600seg pasaba al compartimiento de castigo se daba por concluida la sesión.

Es necesario mencionar que se llevaron a cabo experimentos piloto con el objeto de estandarizar los parámetros a usar dentro de este paradigma, que consistieron en lo siguiente: A) se probó a los animales control (i.e., no desnutridos) con 4 intensidades de choque diferentes (1, 1.7, 2 y 3 mA) con el fin de encontrar la

intensidad a la cual aprenderían a evitarlo; y B) una vez que se obtuvo la intensidad apropiada era necesario saber si podría ser aplicada a los animales de las dos diferentes edades, por lo cual se probaron dos grupos de animales control uno de 30 días y uno de 90 días. Al término de estos experimentos se llevaron a cabo los experimentos en animales control, desnutridos crónicamente y desnutridos prenatalmente y rehabilitados postnatalmente de 30 y 90 días de edad.

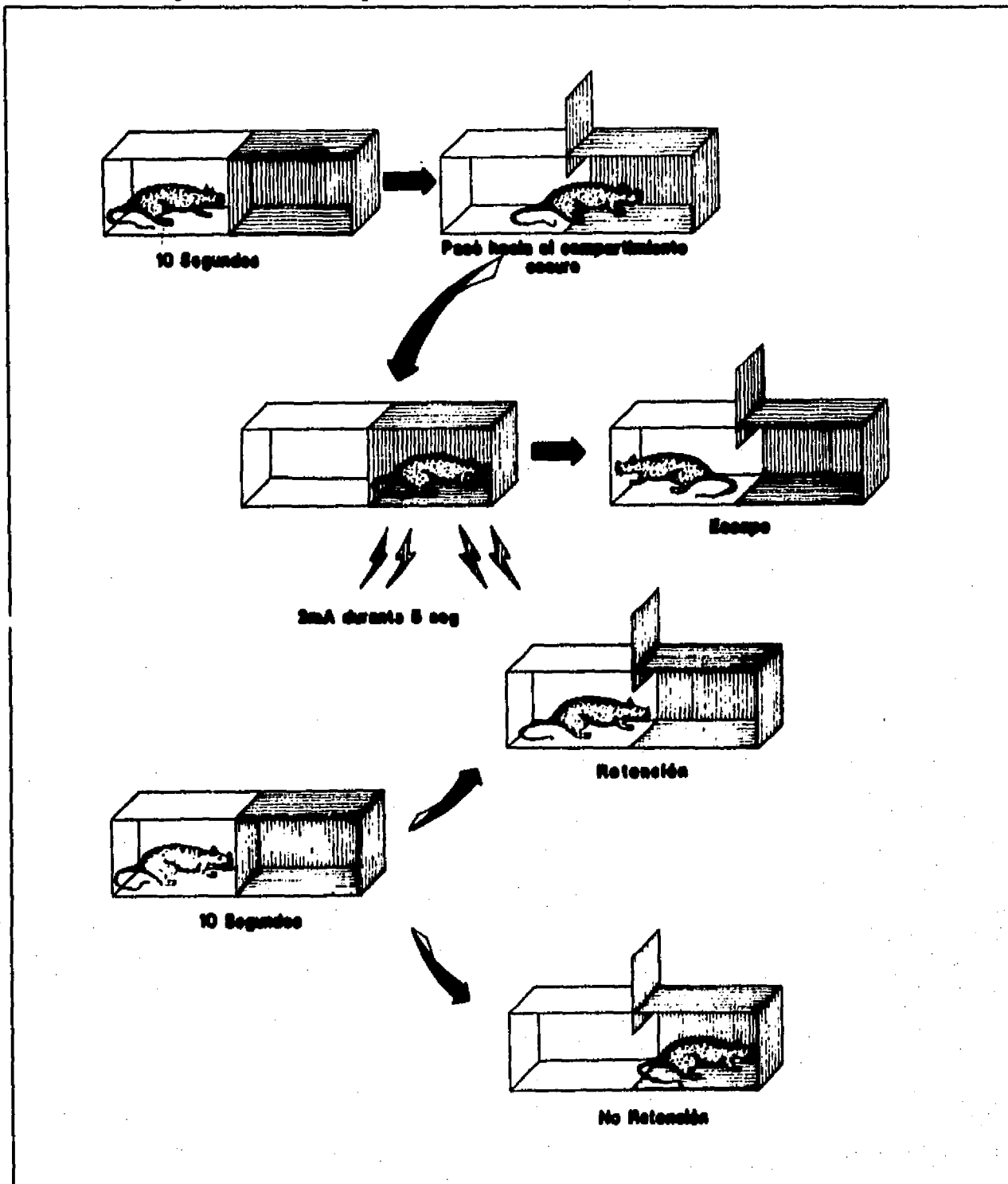


Fig. 2 Procedimiento llevado a cabo en el paradigma de prevención pasiva.

Una vez obtenidos los datos de estos experimentos se realizó un análisis estadístico con pruebas no paramétricas. Se compararon las medianas de las latencias de adquisición y de escape, así como los tiempos que tardaban en pasar los animales al compartimiento oscuro en las sesiones de retención, a través del análisis de varianza de Kruskal-Wallis y para conocer las diferencias entre parejas de grupos se utilizó la prueba de U de Mann-Withney, con un nivel de significancia a una $p < 0.05$.

RESULTADOS

Prueba de intensidad de choque y respuesta de evitación en ratas de dos diferentes edades.

Los resultados de estos experimentos son mostrados en figura VI.3. En la gráfica superior de esta figura se pueden observar los resultados de la respuesta de evitación de ratas normales a cuatro intensidades diferentes. Como es posible notar los animales no logran aprender a evitar un estímulo nocivo a intensidades menores de 2.0mA, mientras que a partir de 2mA notablemente evitan el choque (estos experimentos se realizaron en ratas de 30 días).

En la gráfica inferior de la figura 3 se muestra la respuesta de evitación emitida por ratas de 30 y de 90 días. En esta gráfica es posible observar que no hay diferencia significativa en la mediana de ambos grupos, la cual representa el tiempo que los animales permanecen en el compartimiento de seguridad y como fue mencionado en la metodología si transcurren más de 600 seg y el animal no pasa al compartimiento de castigo se considera que aprendió la tarea.

Por tanto, quedaron establecidos los parámetros de estimulación. Las ratas Sprague-Dawley aprenden con una intensidad de 2.0mA independientemente de la edad.

Efecto de la desnutrición hipoproteínica en la respuesta de evitación en ratas de dos edades.

En la figura 4 se muestran los resultados obtenidos de las latencias de adquisición y de escape de ratas control y desnutridas crónicamente y con desnutrición únicamente prenatal en las dos edades estudiadas. Los datos fueron graficados en medias \pm ES (aunque el análisis estadístico fue realizado con medianas) con el fin de facilitar la visualización de las diferencias significativas.

En la gráfica superior (latencia de adquisición) se puede observar que la media de los animales control de 30 días es significativamente mayor ($p < 0.05$) que la de los desnutridos de esa misma edad, mientras que en el caso de los animales rehabilitados no se observó ninguna diferencia con respecto al grupo control y al desnutrido. Con respecto a los animales de 90 días es posible notar que los valores son muy similares entre los tres grupos, esto es, no hubo diferencias significativas entre ellos.

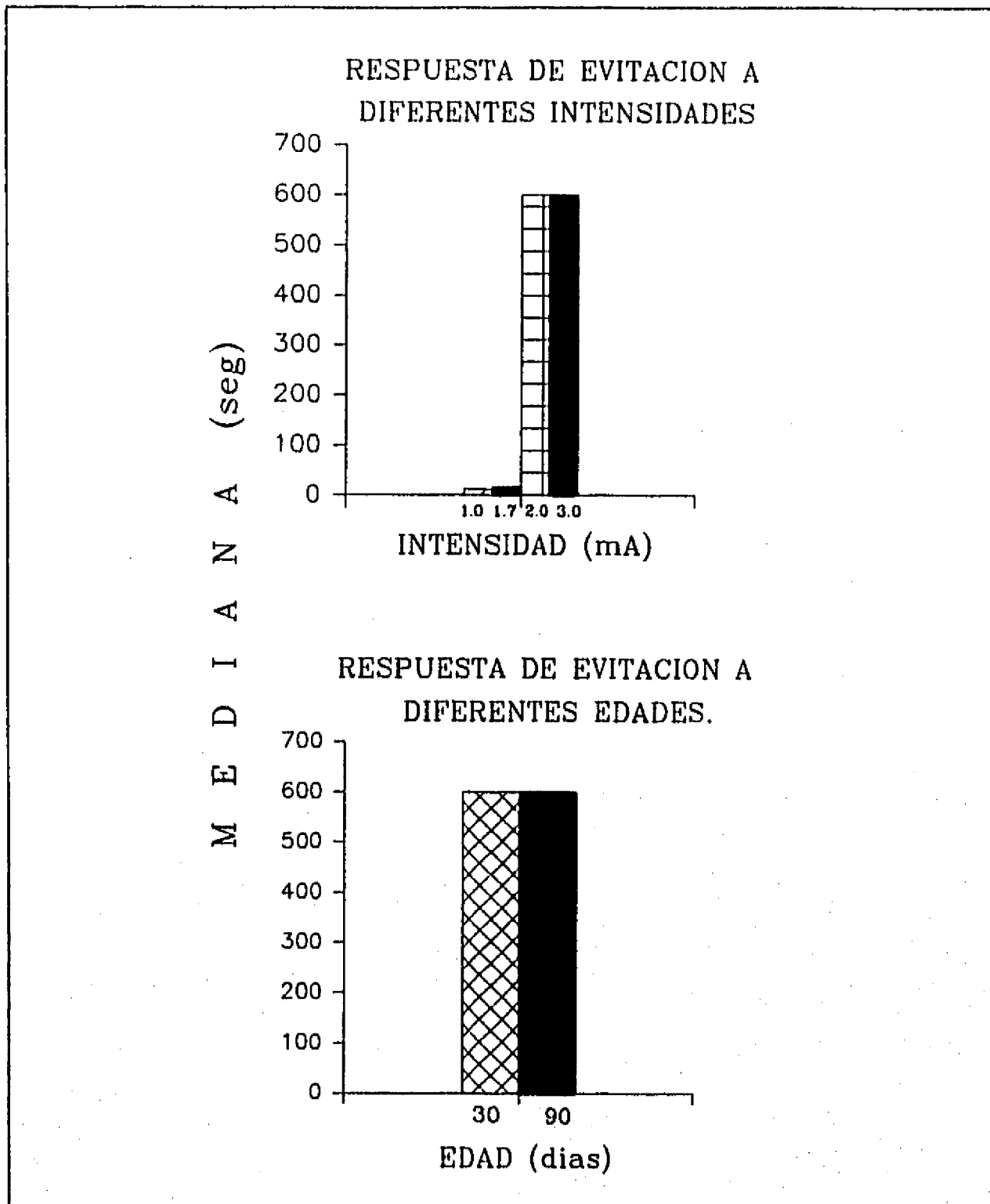


Fig. 3 Respuestas de evitación a diferentes intensidades y a diferentes edades.

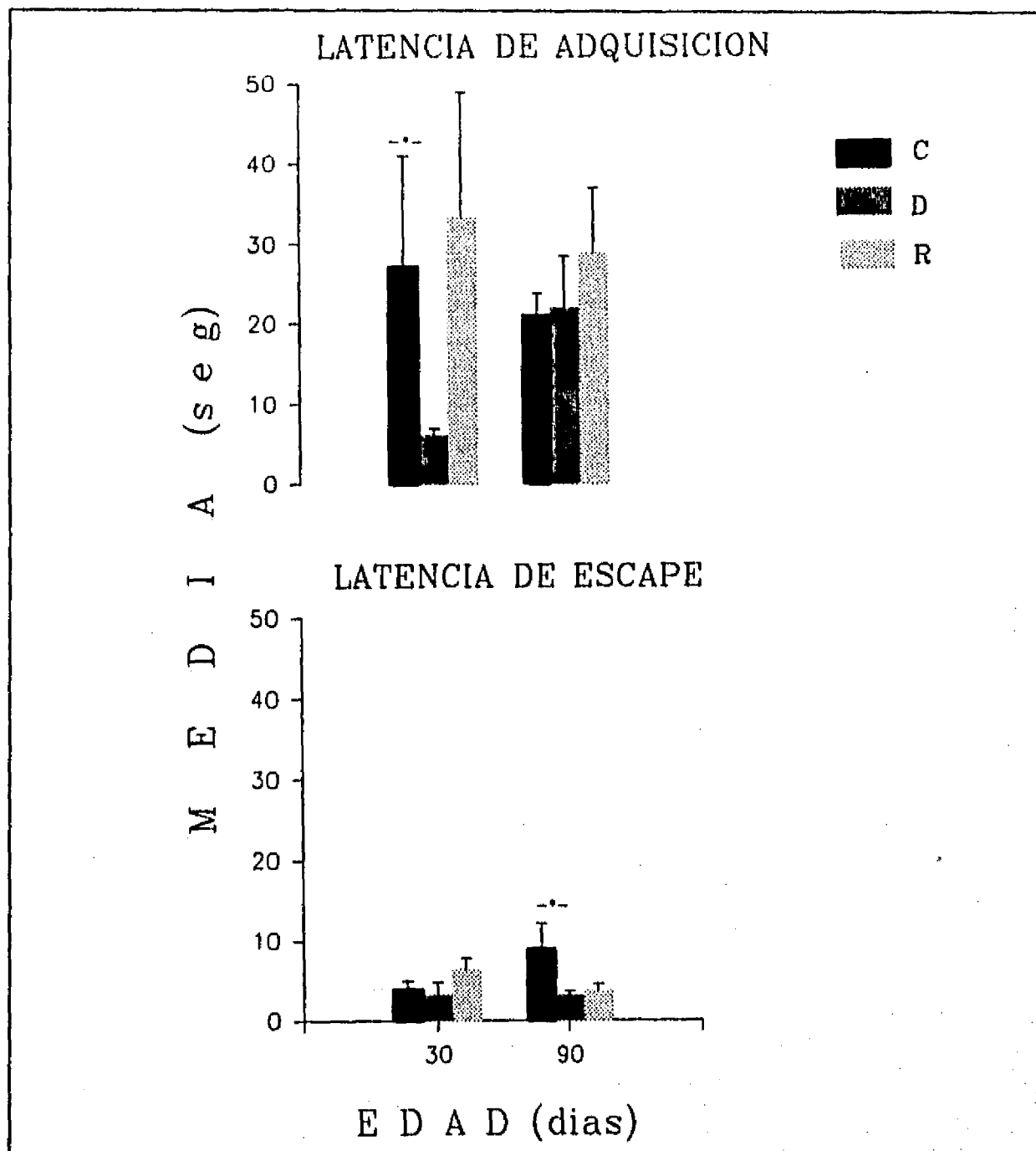


Fig. 4 Latencias de adquisición y escape de ratas normales (C), desnutridas (D) y rehabilitadas (R).

En la latencia de escape (gráfica inferior) se puede observar una diferencia significativa ($p < 0.05$) entre el grupo control y el grupo desnutrido de 90 días de edad. Entre las latencias de los animales de 30 días de edad no hubo diferencias significativas.

En la figura 5 se muestran los resultados obtenidos de la retenciones registradas en diferentes intervalos. En la primera gráfica (retención a las 24 horas) es de notar la diferencia significativa ($p < 0.05$) entre los animales control y los desnutridos de 30

días, mientras que los animales rehabilitados de esta misma edad no presentaron diferencias. En los animales de 90 días no hubo diferencias entre ninguno de los tres grupos registrados.

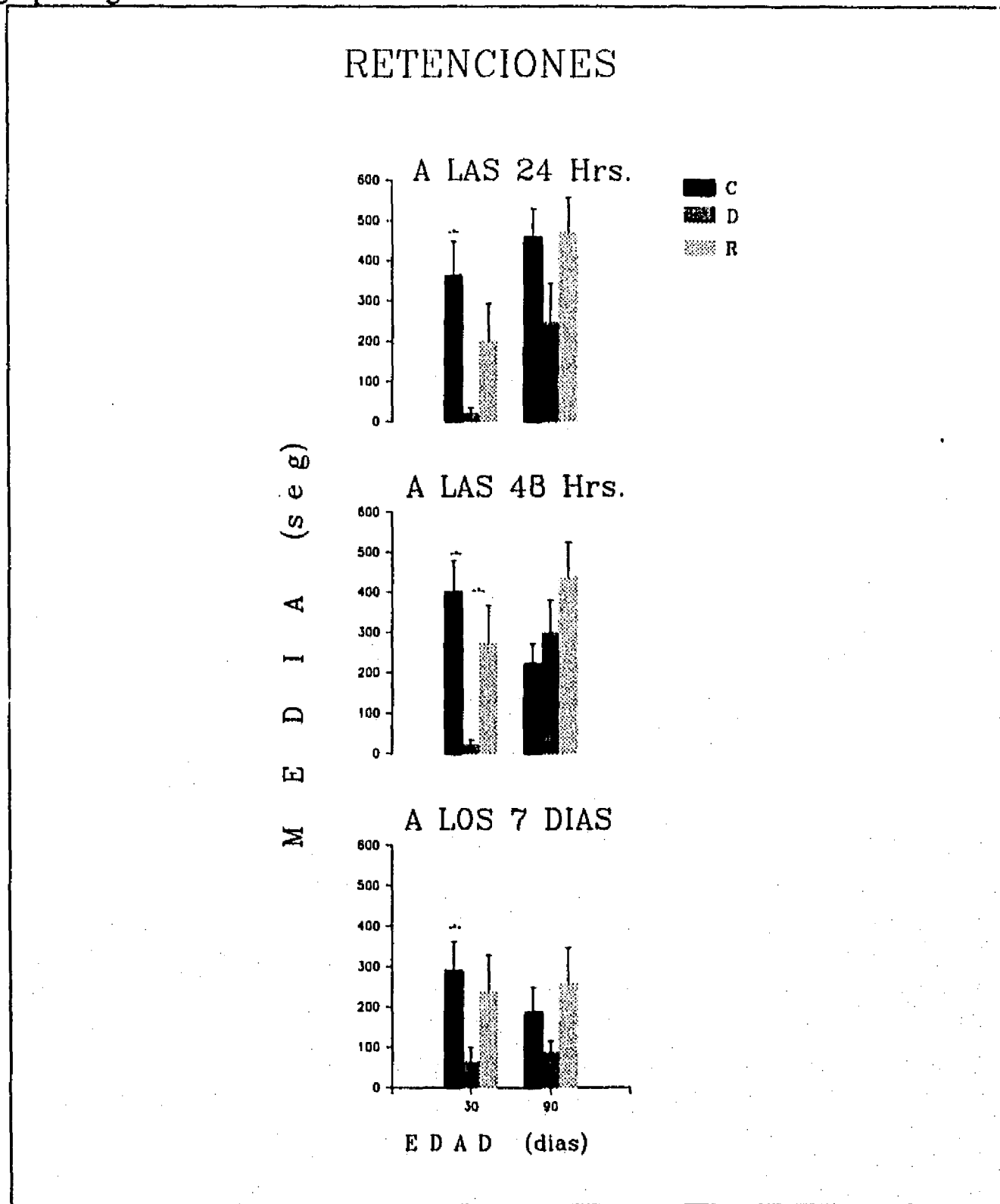


Fig. 5 Retenciones a diferentes intervalos de ratas normales (C), desnutridas (D) y rehabilitadas (R).

En la segunda gráfica se muestra la retención a las 48 horas de los diferentes grupos estudiados. Se observaron diferencias significativas ($p < 0.05$) en los animales desnutridos de 30 días cuando fueron comparados con los animales de los grupos control y rehabilitado de la misma edad. No hubo diferencias significativas entre los grupos de 90 días de edad.

En la tercera gráfica se muestran los resultados de la retención registrada 7 días después de la adquisición. Sólo se observaron diferencias significativas entre el grupo control y el desnutrido de 30 días de edad.

VI.4. DISCUSION

Los resultados de la prueba de intensidad (Fig. 3) mostraron que la intensidad apropiada a la cual las ratas Sprague Dawley logran aprender a evitar un estímulo nocivo (i.e., un choque eléctrico) es a 2 mA. Una vez que se investigó la intensidad adecuada se probaron animales de dos edades. Se encontró que a pesar de que un grupo era juvenil (30 días) y el otro adulto (90 días) aprendían a evitar el choque de manera eficiente con la misma intensidad (Fig. 3). Esto probablemente se debe a que los mecanismos colinérgicos hipocámpicos, involucrados en el aprendizaje de evitación, ya están maduros desde antes de los 30 días postnatal (Ray y Nagy, 1978; Smith y col., 1982). Adicionalmente, debemos mencionar que la conducta de evitación es importante para la sobrevivencia del animal, por tanto es uno de los comportamientos que se presenta más tempranamente. Myslivecek y Hassmannová (1990) han mostrado que el comportamiento de evitación pasiva en las ratas normales puede ser observado a las pocas horas de su nacimiento y que éstas son capaces de retener este tipo de información por 24 horas o más a partir del día 5 postnatal.

En cuanto a la latencia de adquisición (Fig. 4) se observó que los animales control de 30 días permanecían más tiempo explorando en el compartimiento iluminado -antes de pasar al compartimiento oscuro- que los desnutridos de esa misma edad, lo cual no es sorprendente ya que como fue reportado previamente (ver parte IV) los animales desnutridos presentan una menor actividad exploratoria (Altman y col., 1971; Escobar y Salas, 1987; Massaro y col., 1977; Salas y Cintra, 1973). Esta diferencia en la latencia de adquisición podría deberse también, a que los animales desnutridos son hiperactivos (Escobar y Salas, 1987; Guthrie, 1968; Wiener y col., 1983) y quizá esa hiperactividad sea la causa de que pasen más rápidamente al otro compartimiento.

Los resultados de la latencia de escape no mostraron diferencias significativas entre los grupos de 30 días, pero sí las hubo entre controles y los desnutridos de 90 días de edad. Esto quizá se deba a que los animales desnutridos, como fue reportado por Stern y col. (1975) tienen un umbral más bajo a los estímulos nocivos que los

control y por tal razón los animales desnutridos de 90 días regresaron más rápidamente al compartimiento de seguridad que los animales control. Adicionalmente, el hecho de observar diferencias sólo en cierta edad nos permite sugerir que el efecto de la desnutrición es dependiente de la edad.

Con respecto a las pruebas de retención de la información los resultados (Fig. 5) indicaron que las ratas control evitan eficientemente el estímulo nocivo (i.e., no vuelven a pasar al compartimiento de castigo), mientras que las ratas desnutridas crónicamente de 30 días de edad fueron incapaces de aprender a evitarlo, no así las de 90 días de edad. En un trabajo previo Levitsky (1979) sugirió que la desnutrición deteriora la habilidad para aprender aspectos del medio ambiente que no están inmediatamente relacionados con el desempeño de la tarea de ese momento, por tanto lo que podría haber sucedido con los animales desnutridos crónicamente del presente estudio es que fueran incapaces de asociar la oscuridad con castigo y la iluminación con seguridad y por esa razón pasaron nuevamente al compartimiento de castigo.

Por otra parte, no se observaron diferencias significativas entre los animales control y los animales rehabilitados hecho que sugiere, desde el punto de vista conductual, que la rehabilitación nutricional postnatal podría ser suficiente para compensar el daño provocado prenatalmente.

En conclusión, los resultados de este trabajo apoyan la idea de que una dieta baja en proteína instalada crónicamente produce severas alteraciones en los procesos de aprendizaje y memoria; estos resultados confirman los de previas investigaciones (Bush y Leathwood, 1975; Levitsky y Barnes, 1970; Lynch, 1976; Smart y col., 1972). Sin embargo, si se instala una buena nutrición a partir del nacimiento se podrían revertir los efectos producidos por la desnutrición en la ejecución de una tarea de prevención pasiva.

REFERENCIAS

Altman, J., Brunner, R.L. and Bayer, S.A. (1973). The hippocampus and behavioral maturation. *Behav. Biol.* 8:557-596.

Altman, J. Sudarshan, K. Das, G., McCormick, N. and Barnes, D. (1971). The influence of nutrition on neural and behavioral development: II. Development of some motor, particularly locomotor patterns during infancy. *Dev. Psychobiol.* 4:97-114.

Bush M, Leathwood PD. Effects of different regimens of early malnutrition on behavioral development and avoidance learning in Swiss white mice. *Br J Nutr* 1975; 33: 373-385.

Coscina, D.V. and Lash, L. (1969). The effects of differential hippocampal lesions on a shock versus shock conflict. *Physiol. Behav.* 4:227-233.

Escobar C, Salas M.(1987) Ameliorating effects of early sensory stimulation on the behavior of adult rats underfed during the lactating period. *Bol Estud Med Biol Mex* 35: 195-202.

Guthrie HA. Severe undernutrition in early infancy and behavior in rehabilitated albino rats. *Physiol Behav* 1968; 3: 619-623.

Levitsky DA, Barnes RH.1970; Effect of early malnutrition on the reaction of adult rats to aversive stimuli. *Nature* 225: 468-469.

Levitsky DA. (1979). Malnutrition and the hunger to learn. En: Levitsky DA, ed. *Malnutrition, environment and behavior*. Ithaca: Cornell University Press 161-179.

Lynch A. (1976). Passive avoidance behavior and response thresholds in adult male rats after early postnatal undernutrition. *Physiol Behav* 16: 27-32.

Massaro TF, Levitsky D, Barnes RH. (1977). Early protein malnutrition in the rat: Behavioral changes during rehabilitation. *Dev Psychobiol* 10: 105-111.

Morgane, P.J., Miller M., Kemper T., Stern W., Forbes W., Hall R., Kissane J., Hawrylewicz E. and Resnick O. (1978). The effects of protein malnutrition on developing central nervous system in the rat. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 2:137-230.

Myslivecek, J. and Hassmannová, J. (1990). Early inhibitory learning in the rat. I. Learning and memory development. *Dev. Psychobiol.* 23: 119-128.

Olton, D.S. and Isaacson, R.L. (1968). Hippocampal lesions and active avoidance. *Physiol. Behav.* 3:719-724.

Prado-Alcalá. R.A. y Quirarte, G. (1993). La conducta y la mente. *Información Científica y tecnológica* 15:21-26.

Ray, D. and Nagy, Z.M. (1978). Emerging cholinergic mechanism and ontogeny of response inhibition in the mouse. *J. Comp. Physiol. Psychol.* 92: 335-349.

Rich, I. and Thompson, R. (1965). Role of the hippocampo-septal system, thalamus and hypothalamus in avoidance conditioning. *J. Comp. Physiol. Psychol.* 59:66-72.

Salas M, Cintra L. Behavioral effects of undernutrition on the rat. *Bol Estud Med Biol Mex* 1973; 28: 23-27.

Smart JL, Dobbing J. Vulnerability of developing brain. IV. Passive avoidance behavior in young rats following maternal undernutrition. *Dev Psychobiol* 1972; 5: 129-136.

Smith, G.J., Spear, L.P. and Spear, N.E. (1982). Detection of cholinergic mediation of behavior in 7-,9- and 12-day-old rat pups. *Pharm. Biochem. Behav.* 16:805-811

Stern W, Morgane PJ, Miller M, Resnick O. (1975). Protein Malnutrition in rats: Response of brain amines and behavior to foot shock stress. *Exp Neurol* 47: 56-67.

Wiener SG, Robinson L, Levine S. Influence of perinatal malnutrition on adult physiological and behavioral reactivity in rats. *Physiol Behav* 1983; 30: 41-50.

PARTE VI

DISCUSION GENERAL Y CONCLUSIONES

Los trabajos reseñados en los capítulos anteriores representan un intento para clarificar las relaciones entre la desnutrición y el desarrollo y funcionamiento del SNC, particularmente el estudio de las repercusiones de la desnutrición en una estructura cerebral -el hipocampo- involucrada en procesos cognitivos.

Los resultados obtenidos a lo largo de la presente investigación mostraron, desde el punto de vista neuroanatómico, que la desnutrición hipoproteínica produce diversas alteraciones en la citoarquitectura de las células piramidales del campo CA3 del hipocampo. Por ejemplo, la desnutrición crónica produjo tanto reducciones (e.g. en el tamaño del soma, en la densidad de espinas, longitud dendrítica) como incrementos (e.g. en las ramificaciones apicales y en la longitud de las espinas dendríticas), lo que podría indicar un efecto diferencial en las neuronas, i.e., que la desnutrición no afecte todas las partes de la neurona al mismo tiempo ni de la misma manera, o bien, el desencadenamiento de mecanismos plásticos para tratar de compensar el insulto que se le hizo al sistema (ver parte III).

Se ha sugerido que el desarrollo de las células CA3 depende de la maduración de las células granulares del giro dentado (Altman y Bayer, 1990a; Gaiarsa y col., 1992), ya que estas últimas son la fuente principal de sus aferentes, las fibras musgosas. Por otra parte, se ha mostrado que la desnutrición hipoproteínica produce alteraciones (i.e., decrementos del tamaño del soma de la densidad dendrítica y del área de fibras musgosas) en dichas células granulares (Cintra y col., 1994; Díaz-Cintra y col., 1991). Por tanto, parece ser que las reducciones observadas en algunos de los parámetros medidos en las neuronas piramidales del campo CA3 son las consecuencias de las alteraciones en el desarrollo de las células granulares del giro dentado.

Los incrementos significativos en las ramificaciones apicales y la longitud de las espinas dendríticas de los animales desnutridos crónicamente representan un ejemplo de plasticidad, i.e., estos incrementos pudieron surgir por una parte, como compensación a la reducción de la densidad de espinas dendríticas, ya que como han puntualizado Boublikova y col., (1991) la densidad dendrítica es el reflejo del estado de las neuronas y los cambios observados en dicha densidad representan sus respuestas plásticas a las alteraciones medio ambientales durante el desarrollo; y por otra, como una respuesta de las neuronas para establecer conexiones con neuronas más lejanas, ya que como fue mencionado en los capítulos anteriores, uno de los efectos de la desnutrición es la pérdida neuronal (ver discusión de la parte III).

En el caso de la desnutrición únicamente prenatal se observaron también efectos diferenciales, i.e., incrementos y decrementos en algunos de los parámetros medidos (ver parte. III); empero el hallazgo más interesante fue la demostración de que una buena nutrición postnatal es capaz de compensar algunos de los daños producidos por la desnutrición hipoproteínica, tanto a nivel neuroanatómico como conductual. A nivel neuroanatómico se observó un severo decremento de casi el 50% en la densidad de espinas dendríticas en los animales desnutridos crónicamente, mientras que en los animales rehabilitados postnatalmente, aunque hubo un decremento no fue tan severo (aproximadamente el 20%), lo que indica cierta recuperación producida por la rehabilitación nutricional postnatal (ver parte III). A nivel conductual no se observaron diferencias significativas entre los animales control y los rehabilitados, lo que muestra que la rehabilitación nutricional postnatal es una buena alternativa para compensar al menos parte del daño provocado por la desnutrición prenatal, hecho que se correlaciona bien con los hallazgos neuroanatómicos encontrados en este estudio.

Otro hecho interesante que emana del análisis de los experimentos conductuales es que el efecto de la desnutrición hipoproteínica fue dependiente de la edad. Los resultados que ejemplifican claramente este hecho son los mostrados en la fig. 5 de la parte V, en la cual se observan diferencias significativas entre los animales control y los desnutridos crónicamente de 30 días, pero no así entre los animales de 90 días. Estos resultados indican que la desnutrición provoca alteraciones morfológicas más severas en las neuronas hipocámpicas de ratas de 30 días que en aquellas de los animales de 90 días (como fue mostrado por los estudios neuroanatómicos del presente trabajo, parte III). Esto quizá se deba a que los 30 días es una edad cercana al destete (ésto implica un evento nuevo y drástico al cual se tiene que adaptar el animal), o bien al hecho de que en un animal de 30 días todavía se presentan en su desarrollo procesos de microneurogénesis, mielinización y sinaptogénesis, mientras que en un animal de 90 días, el cual ya es completamente adulto, ya estos procesos han finalizado.

Por otra parte, aunado al daño neuroanatómico, podría ser que las ratas desnutridas crónicamente si hayan aprendido la tarea, pero no sean capaces de almacenar la información por mucho tiempo. Empero, para poder confirmar o descartar esta idea es necesario llevar a cabo nuevas series de experimentos en las cuales se analice la retención de ratas tanto normales como desnutridas a intervalos más pequeños (e.g., 15 minutos después del choque eléctrico).

En resumen, de los resultados obtenidos en esta investigación se desprenden las siguientes conclusiones: 1) la desnutrición hipoproteínica es el factor causal de las

diversas alteraciones neuroanatómicas y conductuales observadas y 2) la rehabilitación nutricional postnatal parece ser el factor que echa a andar los mecanismos plásticos que podrían compensar el daño provocado por la desnutrición prenatal.

BIBLIOGRAFIA

Ahmed, M.G.E., Bedi, K.S., Warren, M.A. and Kamel, M.M. (1987). Effect of a length period of undernutrition from birth and subsequent nutritional rehabilitation on the synapse: granule cell neuron ratio in the rat dentate gyrus. *J. Comp. Neurol.* 263:146-158.

Altman, J., Brunner, R.L. and Bayer, S.A. (1973). The hippocampus and behavioral maturation. *Behav. Biol.* 8:557-596.

Altman, J. (1966). Autoradiographic and histological studies of postnatal neurogenesis. II. A longitudinal investigation of kinetics, migration and transformation of cells incorporating tritiated thymidine in infant rats, with special reference to postnatal neurogenesis in some brain region. *J. Comp. Neurol.* 128:431-474.

Altman, J. and Das, G.D. (1965). Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. *J. Comp. Neurol.* 124:319-336.

Altman, J. and Bayer, S.A. (1990a). Prolonged sojourn of developing pyramidal cells in the intermediate zone of the hippocampus and their settling in the stratum pyramidale. *J. Comp. Neurol.* 301: 343-364.

Altman, J. and Bayer, S.A. (1990b). Migration and distribution of two populations of hippocampal granule cell precursors during the perinatal and postnatal periods. *J. Comp. Neurol.* 301: 365-381.

Amaral, D.G., Ishizuka N. and Claiborne, B. (1990). Neurons, numbers and the hippocampal network. In Storm-Mathisen, J., Zimmer, J. and Ottersen, O.P. (Eds.) *Progress in Brain Res.* 83: 1-11.

Amaral, D.G. and Witter, M.P. (1989). The three-dimensional organization of the hippocampal formation: A review of anatomical data.

Amaral, D.G. (1978). A golgi study of the cell types in the hilar region of the hippocampus in the rat. *J. Comp. Neurol.* 182:851-914.

Angevine, J.B. (1965). Time of neuronal origin of the hippocampal region. An autoradiographic study in the mouse. *Exp. Neurol. Suppl.* 2:1-70.

Barnes, C.A. (1988). Spatial learning and memory processes: the search for their neurobiological mechanisms in the rat. *TINS* 11:163-169

Bayer, S.A. (1980). Development of the hippocampal region in the rat. I. Neurogenesis examined with [³H] thymidine autoradiography. *J. Comp. Neurol.* 190: 87-114.

Bayer, S.A. (1982). Changes on the total number of dentate granule cells in juvenile and adult rats: a correlated volumetric and ³H-Thymidine autoradiographic study. *Exp. Brain Res.* 46:315-323.

Bayer, S.A. and Altman, J. (1974) Hippocampal development in the rat: cytogenesis and morphogenesis examined with autoradiography and low-level X-irradiation. *J. Comp. Neurol.* 158:55-80.

Bedi, K.S. (1987). Lasting neuroanatomical changes following undernutrition during early life. In: J. Dobbing (Ed). *Early Nutrition and Later Achievement*, Academic Press, London, pp 1-49.

Bedi, K.S. (1992). Spatial learning ability of rats undernourished during early postnatal life. *Physiol. and Behav.* 51:1001-1007.

Boss, B., Turlejski, K., Stanfield, B and Cowan W. (1987). On the numbers of neurons in fields CA1 and CA3 of hippocampus of Sprague-Dawley and Wistar rats. *Brain Res.* 406:280-287.

Boss, B., Peterson, G. and Cowan, W. (1985). On the number of neurons in the dentate gyrus of the rat. *Brain Res.* 338: 144-150.

Boubliková, L., Jiresová, A., Pokorny, J., Langmeier, M. and Trojan, S. (1991). Postnatal Neuronal plasticity of pyramidal cells of CA1 area of the hippocampus as a reaction to neurotoxic damage. *Physiol. Res.* 40:585-593.

Braitenberg, V. and Schüz, A. (1983). Some anatomical comments of the hippocampus. In *Neurobiology of the hippocampus*, W. Siefert (Ed), pp 21-38.

Brodal,(p391).

Bronzino, J.D. , Abu-Hasaballah, K.S., Austin-LaFrance, R.J. and Morgane, P.J. (1993). Ontogeny of long-term potentiation. Abstract number 546.7 of Society for Neuroscience 23rd Annual Meeting, Washington, D.C., USA. November 7-12.

Buckmaster, P. Strowbridge, B. and Schwartzkroin, P. (1993). A comparisons of rat hippocampal mossy cells and CAc pyramidal cells. *J. Neurophysiol.* 70: 1281:1299.

Campbell, L.F. and Bedi, K.S. (1989). The effects of undernutrition during early life on spatial learning. *Physiol. Behav.* 45: 883-890.

Cassell, . (1980).

Castro CA, Rudy JW. (1987). Early-life malnutrition selectively retards the development of distal-but not proximal-cue navigation. *Dev Psychobiol* 20: 521-537.

Cerbone, A., Patacchioli, F.R. and Sadile, A.G. (1993). A neurogenetic and morphogenetic approach to hippocampal functions based on individual differences and neurobehavioral covariations. *Behav. Brain Res.* 55: 1-16.

Chen, K.K., Chan, J.Y., Chang, L., Chen, M.T. and Chan S.H. (1992). Elicitation of penile erection following activation of the hippocampal formation in the rat. *Neurosci. Lett.* 141:218-222.

Cintra, L., Duran, P., Granados, L. and Galván, A. (1993). REM-sleep deprivation in normal and malnourished rats at 30 days of age. Abstract number 713.5

of Society for Neuroscience 23rd Annual Meeting, Washington, D.C., USA. November 7-12.

Cintra, L., Granados, G., Díaz-Cintra, S., Kemper, T. and Morgane, P. (1994). Effect of prenatal protein malnutrition on mossy fibers of the hippocampal formation in rats of four age groups (en preparación).

Cintra, L., Díaz-Cintra, S., Galvan, A., Kemper, T. and Morgane, P.J. (1990). Effects of protein undernutrition on the dentate gyrus in rats of three age groups. *Brain Res.* 532:271-277.

Coscina, D.V. and Lash, L. (1969). The effects of differential hippocampal lesions on a shock versus shock conflict. *Physiol. Behav.* 4:227-233.

Cravens RW. Effects of maternal undernutrition on offspring behavior: (1974). Incentive value of food reward and escape from water. *Dev Psychobiol* 7: 61-69.

Crespo, D., Standfield, B.B. and Cowan, W.N. (1986). Evidence that late-generated granule cells do not simply replace earlier formed neurons in the rat dentate gyrus. *Exp. Brain Res.* 62:541-548.

De Vito, J. and White, L.E. Jr. (1966). Projections from the fornix to the hippocampal formation in the squirrel monkey. *J. Comp. Neurol.* 127: 389-398.

Díaz-Cintra, S., Cintra, L., Ortega, A., Kemper, T. and Morgane, P.J. (1990). Effects of protein deprivation on pyramidal cells of the visual cortex in rats of three age groups. *J. Comp. Neurol.* 292:117-126.

Díaz-Cintra, S., Cintra, L., Kemper, T., Resnick, O. and Morgane, P.J. (1981). The effects of protein deprivation on the nucleus raphe dorsalis: A morphometric golgi study in rats of three age groups. *Brain Res.* 221:243-245.

Díaz-Cintra, S., Cintra, L., Galván, A., Aguilar, A., Kemper, T. and Morgane, P.J. (1991). Effects of prenatal protein deprivation on postnatal development of granule cells in fascia dentata. *J. Comp. Neurol.* 310:356-364.

Dobbing, J. (1968). Effects of experimental undernutrition on development of neurons system. In: *Malnutrition, Learning and Behavior*, Ed. by N.S. Scrimshaw and J.E. Gordon. Cambridge, MA: MIT Press, pp 181-202.

Dobbing, J. and Sands, J. (1971). Vulnerability of development brain. IX. The effect of nutritional growth retardation on the timing of the brain growth-spurt. *Biol. Neonate* 19:363-378.

Eichenbaum, H., Otto, T. and Cohen, N. (1992). The hippocampus-what does it do? *Behav. and Neural Biol.* 57:2-36.

Escobar, C. (1992). Alteraciones morfológicas en la amígdala y el claustrum asociadas a la desnutrición neonatal en la rata. Tesis de doctorado en Ciencias Fisiológicas, UACPyP del CCH de la UNAM.

Escobar C, Salas M.(1987) Ameliorating effects of early sensory stimulation on the behavior of adult rats underfed during the lactating period. *Bol Estud Med Biol Mex* 35: 195-202.

Fedler, K., Karmos, G. and Teledgy, G. (1961). The effects of hippocampal lesions on pituitary adrenal function. *Acta Physiol. Acad. Sci. Hung.* 20:293-297.

Fish, T. and Winnick, M. (1969). Effect of malnutrition on regional growth of the developing rat brain. *Exp. Neurol.* 25:534-540.

Fitch, J.M., Juraska, J.M., Washington, L.W. (1989). The dendritic morphology of pyramidal neurons in the rat hippocampal area CA3. II Effects if gender an enviroment. *Brain Res.* 479:105-114.

Franková, S. and Barnes R.H. (1968). Effect of malnutrition in early life on avoidance conditioning and behavior of adult rats. *J. Nutrition* 96:485-493.

Gaiarsa, J.L., Beaudoin, M. and Ben-Ari, Y. (1992). Effect of neonatal degranulation on the morphological development of rat CA3 pyramidal neurons: Inductive role of mossy fibers on the formation of thorny excrescences. *J. Comp. Neurol.* 321:612-625.

Galván, A., Granados, L. Diaz-Cintra, S., Cintra, L., Aguilar, A., Kemper, T. and Morgane, P.J. (1993). Prenatl malnutrition and postnatal nutritional rehabilitation on mossy fibers area of dentate gyrus of the rat. Abstract number 713.7 of Society for Neuroscience 23rd Annual Meeting, Washington, D.C., USA. Novenber 7-12.

Goodlett CR, Valentino ML, Morgane PJ, Resnick O. (1986). Spatial cue utilization in chronically malnourished rats: Task-specific learning deficits. *Dev Psychobiol* 19: 1-15.

Gottlieb, D.I. and Cowan, W.M. (1972). Evidence for a temporal factor in the occupation of available synaptic sites during the development of the dentate gyrus. *Brain Res.* 41:452-456.

Hall RD. Is hippocampal function in the adult rat impaired by early protein or protein-calorie deficiencies? *Dev Psychobiol* 1983; 16: 395-411.

Isaacson, R. L. (1982). *The limbic system.* Plenum Press New York.

Jarrard, L. (1993). On the role of the hippocampus in learning and memory in the rat. *Behav. Neural Biol.* 60:9-26.

Jarrard, L. (1968). Behavior of hippocampal lesioned rats in home cage and novel situations. *Physiol. Behav.* 3: 65-70.

Katz, H.B. and Davis, C.A. (1983). The separte and combined effects of early undernutrition an enviromental complexity at different ages on cerebral measures in rats. *Dev. Psychobiol.* 14:47-58.

Katz, H.B., C.A. Davis and Dobbing, J. (1982). Effects of undernutrition at different age early in life and later enviromental complexity on parameters of cerebrum and hippocampus in rat. *J. Nutr.* 112:1362-1368.

Kirkwood, A., Dudek, S.M., Gold, J.T., Aizenman, C.D. and Bear, M.F. (1993). Common forms of synaptic plasticity in the hippocampus and neocortex in vitro. *Science* 260: 1518-1521.

Laughlin NK, Sranley F, Bell J. (1984). Early undernutrition and later hippocampal damage: effect of spontaneous behaviors and reversal learning. *Physiol Psychol* 11: 268-277.

Leuba, G. and Rabinowicz, T.H. (1979a). Long-term effects of postnatal undernutrition and maternal malnutrition on mouse cerebral cortex (I). *Exp. Brain Res.* 37:283-298.

Leuba, G. and Rabinowicz, T.H. (1979b). Long-term effects of postnatal undernutrition and maternal malnutrition on mouse cerebral cortex (II). *Exp. Brain Res.* 37:299-308.

Levistky, D.A. and Barnes, R.H. (1970). Effect of early malnutrition on the reaction of adult rats to aversive stimuli. *Nature* 225:468-469.

Levitsky, D. A. and R.H. Barnes (1972). Nutritional and enviromental interactions in the behavioral development of the rat: long-term effects. *Science* 176:68-71.

Levitsky DA. (1975) Malnutrition and animal models of cognitive development. En: Serban, G., ed. *Nutrition and Mental Function*. New York: Plenum Press 75-89.

Lewis, P.D., Patel, A.J. and R. Balazs (1979). Effect of undernutrition on cell generation in the rat hippocampus. *Brain Res.* 168:186-189.

Liss, P. (1968). Avoidance and freezing behavior following damage to the hippocampus or fornix. *J. Comp. Physiol. Psychol.* 66:193-197.

Macrides, F., Eichenbaum, H. and Forbes, W. (1982). Temporal relationship between sniffing and limbic theta rhythm during odor discrimination reversal learning. *J. Neurosci.* 2: 1705-1717).

Matthews, D.A., Cotman, C and Lynch, G. (1976). An electron microscopic study of lesion induced synaptogenesis in the dentate gyrus of the adult rat. I. Magnitud and time course of degeneration. *Brain Res.* 115: 1-21.

McConnel, P. and Berry, M. (1978). Effects of refeeding after neonatal undernutrition on purkinje cells dendritic growth in the rat. *J. Comp. Neurol.* 177:159-172.

McConnel, P. and Berry, M. (1981). The effects of refeeding after varying periods of neonatal undernutrition on the morphology of purkinje cells in the cerebellum of the rat. *J. Comp. Neurol.* 200:463-479.

Morgane, P.J., Austin-LaFrance, R.J. and Bronzino, J.D. (1992). Impact of prenatal protein malnutrition on long-term potentiation in juvenil rats. Abstract

number 548.10 of Society for Neuroscience, 22nd Annual Meeting, Anaheim, Cal. USA, October 25-30.

Morgane, P.J., Austin-LaFrance, R., Bronzino, J., Tonkiss, J., Díaz-Cintra, S., Cintra, L., Kemper, T. and Galler, J. (1993). Prenatal malnutrition and development of the brain. *Neurosc. Behav. Rev.* 17:91-128.

Morgane, P.J., Miller, M., Kemper, T., Stern, W., Forbes, W. Hall, R. Kissane, J., Hawrylewicz, E. and Resnick, O. (1978). The effects of protein malnutrition on developing central nervous system in the rat. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 2:137-230.

Morgane, P.J., Kemper, T., Cintra, L. and Díaz-Cintra, S. (1982). Out of phase development of dendritic spines in locus coeruleus and nucleus raphe dorsalis in rats of three age groups.

Morris, R.G., Anderson, E., Lynch, G. and Baudry, M. (1986). Selective impairment of learning and blockade of long-term potentiation by an N-methyl-D-aspartate receptor antagonist AP5. *Nature* 319: 774-776.

Morris, R.G., Garrard, P., Rawlins, J.N. and O'Keef, J. (1982). Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions. *Nature* 297:681-683.

Muñoz, C. and Grossman, S. (1980). Some behavioral effects of selective neuronal depletion by kainic acid in the dorsal hippocampus of rats. *Physiol. Behav.* 25: 581-587.

Nadel, L. (1991). The hippocampus and space revisited. *Hippocampus* 1:221-229.

Nafstad, P.H.J. (1967). An electron microscope study of termination of perforant path fibers in the hippocampus and the fascia dentata. *Z. Zellforsch.* 76:532-542.

O'Keefe, J. (1983). Spatial memory within and without the hippocampal system. In *Neurobiology of the Hippocampus*, Siefert, W. (ed.), pp. 375-403, Academic Press.

O'Keefe, J. (1991). An allocentric spatial model for the hippocampal cognitive map. *Hippocampus* 1:230-235.

Olton, D.S. and Isaacson, R.L. (1968). Hippocampal lesions and active avoidance. *Physiol. Behav.* 3:719-724.

Olton, D.S. and Isaacson, R.L. (1968). Hippocampal lesions and active avoidance. *Physiol. Behav.* 3:719-724.

Olton DS, Becker, JT, Handelmann, GE. *Hippocampus*. (1979) Space and memory. *Behav Brain Sci* 2: 313-365.

Pokorny, J. and Yakamoto (1981). Postnatal ontogenesis of hippocampal CA4 area rats. I. Development of dendritic arborizations in pyramidal neurons. *Brain Res. Bull.*

Raisman, G., Cowan, W. and Powell, T. (1966). An experimental analysis of the efferent projection of the hippocampus. *Brain* 89: 83-108.

Ramakers, G., Urban, I., De-Graan, P., Di-Luca, M., Cattabeni, F. and Gispen, W. (1993). The impaired long-term potentiation in the CA1 field of the hippocampus of cognitive deficient microencephalic rats is restored by D-Serine. *Neurosci.* 54: 49-60.

Ramón y Cajal, S., The structure of Ammo's horn, trans. by Kraft, L., Thomas publisher, U.S.A., 1893, the year of book publication 1968 pp. 7-31.

Ribak, C.E., Seress, L. and Amaral, D.G. (1985). Development ultrastructure and synaptic connections of the mossy cells of the dentate gyrus. *J. Neurocytol.* 14:835-857.

Rich, I. and Thompson, R. (1965). Role of the hippocampo-septal system, thalamus and hypothalamus in avoidance conditioning. *J. Comp. Physiol. Psychol.* 59:66-72.

Rich, I. and Thompson, R. (1965). Role of the hippocampo-septal system, thalamus and hypothalamus in avoidance conditioning. *J. Comp. Physiol. Psychol.* 59:66-72.

Rosene, D. and Van Hoesen, G. (1991). The hippocampal formation of the primate brain. In Peters, A. and Jones E.G. (Eds.) *Cerebral cortex* vol. 9. pp. 345-456. Plenum Press New York.

Salas, M. and Cintra, L. (1973). Behavioral effects of undernutrition on the neonatal rat. *Bol. Estud. Méd. Biol. Méx.* 28:23-27.

Salas, M. and Cintra, L. (1979). Undernutrition and novelty responses influences of early food restriction on the responsiveness to novel stimuli in adult rats. *Bol. Estud. Méd. Biol. Méx.* 30:201-204.

Salas, M., Torrero, C. and Pulido, S. (1984). Long-term alterations in the material behavior of neonatally undernourished rats. *Physiol. and Behav.* 33:273-278.

Salas, M., Díaz, S. and Nieto, A. (1974). Effects of neonatal food deprivation on cortical and dendritic development of the rat. *Brain Res.* 73:139-144.

Schlessinger, A.R., Cowan, W.M. Gottlieb, D.I. (1975). An autoradiographic study of the time of origin and the pattern of granule cell migration in the dentate gyrus of the rat. *J. Comp. Neurol.* 159:149-176.

Scoville, W.B. and Milner B. (1957). Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. *J. Neurosurg. Psychiat.* 20:11-21.

Seress, L. and Ribak, C.E. (1993). Postnatal development of mossy cells in the dentate gyrus of rhesus monkeys: a golgi and electron microscopic study. Abstract number 352.11 of Society for Neuroscience 23rd Annual Meeting, Washington, D.C., USA. November 7-12.

Seress, L. and J. Pokorny (1981). Structure of the granular layer of the rat dentate gyrus. A light microscopic and Golgi study. *J. Anat.* 133:181-195.

Sherry, D., Jacobs, L. and Gaulin, S. (1992). Spatial memory and adaptative specialization of the hippocampus. *TINS* 15: 298-303.

Smart, J.L. (1991). Critical periods in brain development. The childhood environment and adult disease. Wiley, Chichester (Ciba Foundation Symposium 156) pp. 109-128.

Smart J.L. (1976). Reversal of spatial discrimination learning in a water maze by previously undernourished rats. *Anim Learn Behav* 4: 313-316.

Squire, L and Zola-Morgan, S. (1988). Memory: brain systems and behavior. *TINS* 11: 170-175.

Standfield, B.B. and Trice, J.E. (1988). Evidence that granule cells generated in dentate gyrus of adult rats extend axonal projections. *Exp. Brain Res.* 72:399-406.

Stern W, Morgane PJ, Miller M, Resnick O. (1975). Protein Malnutrition in rats: Response of brain amines and behavior to foot shock stress. *Exp Neurol* 47: 56-67.

Swanson, L.W. and Cowan, W.M. (1977). Autoradiographic studies of the development and connections of septal area in the rat. In: *The Septal Nuclei*, Ed. by J. De France, Plenum New York, pp 37-64.

Swanson, L.W., Wyss, J. and Cowan, W. (1978). An autoradiographic study of the organization of intrahippocampal association pathways in the rat. *J. Comp. Neurol.* 181: 681-716.

Swanson, L.W., Sawchenko, P.E. and Cowan, W.M. (1981). Evidence for collateral projections by neurons in Ammon's horn, the dentate gyrus and the subiculum. A multiple retrograde labeling study in the rat. *J. Neurosci.* 1:548-559.

Tonkiss, J. and Galler J. (1990). Prenatal protein malnutrition and working memory performance in adult rat. *Behav. Brain Res.* 40:95-107.

Tonkiss J, Shukitt-Hale B, Formica RN, Rocco FJ, Galler JR. (1990). Prenatal protein alters response to reward in adult rats. *Physiol Behav* 48: 675-680.

Warren, M.A. and Bedi, K.S. (1981). A quantitative assessment of development of synapses and neurons in the visual cortex of control and undernourished rats. *J. Comp. Neurol.* 227:104-108.

West, C.H.D. and Kemper, T (1976). The effect of a low protein diet on the anatomical development of the rat. *Brain Res.* 107:221-237.

White, L.E. Jr., Nelson, W. and Foltz, E. (1960). Cingulum fasciculus study by evoked potentials. *Exp. Neurol.* 2: 406-421.

Wiener SG, Robinson L, Levine S. Influence of perinatal malnutrition on adult physiological and behavioral reactivity in rats. *Physiol Behav* 1983; 30: 41-50.

Wiggins, R.C., Fuller, G. and Enna S.J. (1984). Undernutrition and the development of brain neurotransmitter systems. *Life Sci.* 35:2083-2094.