



03068
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

UNIDAD ACADÉMICA DE LOS CICLOS PROFESIONAL Y DE
POSGRADO DEL COLEGIO DE CIENCIAS Y HUMANIDADES
SEDE: CENTRO DE NEUROBIOLOGIA

EFFECTOS DE LA MALNUTRICION
HIPOPROTEINICA PRENATAL SOBRE LAS
CELULAS PIRAMIDALES DEL CORNUS AMMONIS I
(CA1) DEL HIPOCAMPO

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS FISIOLÓGICAS

P R E S E N T A :

BIOL. AZUCENA RUTH AGUILAR VAZQUEZ

DIRECTORA DE TESIS: DRA. SOFIA Y. DIAZ MIRANDA

MEXICO, D. F.

1996

1995



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.

RECONOCIMIENTO

El presente trabajo se realizó en el Centro de Neurobiología de la U.N.A.M., con el apoyo económico del programa de becas de la DGAPA, de los Proyectos PAPIIT de la DGAPA IN204892 y IN204093 y del Proyecto Internacional "Prenatal Malnutrition y Mental Retardation" del National Institute of Child Health and Human Development, EUA.

DEDICATORIA

**A mis padres: Victor y Soledad
Por todo su esfuerzo y dedicación,
por ver concluida mi carrera**

**A mis hermanos: Perla, Esmeralda,
Manuel, Miguel y David
Por su apoyo, comprensión y compañía**

**A mis sobrinos: Jessy, Gissel y Arturito
Por su cariño y los momentos de alegría**

**Al Ing. Abel Medina Montalvo
Por todas sus enseñanzas y por la
confianza que ha depositado en mi**

**A Jorge David
Por tu amistad incondicional**

A mi familia y amigos

AGRADECIMIENTOS:

A la Dra. Sofía Díaz Miranda y al Dr. León F. Cintra McGlone, por su constante apoyo en mi formación académica, por su confianza y amistad.

A los integrantes del jurado por la revisión de este manuscrito y por sus valiosos comentarios y sugerencias:

Dr. Manuel Salas Alvarado
Dra. Sofía Díaz Miranda
Dr. León Cintra McGlone
Dra. Carolina Escobar Briones
M. en C. Marco Antonio Martínez Avila

Al Dr. Gabriel Corkidi por su asesoría en el procesamiento de imágenes digitalizadas.

Al M. en C. Agustín Galván por su apoyo técnico y porque ha sido un gran compañero de trabajo y amigo.

Al Sr. Pedro Medina por su apoyo en las técnicas histológicas y en el bioterio

Al Sr. José Avilés por su apoyo en el trabajo de fotografía.

A la M en C. Magdalena Martínez por su apoyo hemerobibliográfico.

A mis compañeras de laboratorio, Leticia, Pilar, Ivett, Sonia y Esther, por su apoyo, amistad y porque constituyen un sin fin de vivencias en torno a la investigación.

ÍNDICE

RESUMEN	1
SUMMARY	2
INTRODUCCIÓN	3
ANTECEDENTES:	5
DESARROLLO DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL (SNC)	5
EFECTOS DE LA DESNUTRICIÓN EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL	7
Alteraciones anatómicas	7
Alteraciones fisiológicas	9
Alteraciones neuroquímicas	11
Alteraciones conductuales	11
HIPOCAMPO	12
Localización	13
Anatomía	13
Ontogenia	14
Proyecciones	16
Circuito trisináptico	16
Función	18
HIPÓTESIS	20
OBJETIVOS	20
MATERIAL Y MÉTODOS	21
Procedimiento de malnutrición y rehabilitación nutricional	21
Procedimiento histológico	23
Análisis morfométrico	24
RESULTADOS	25
Peso corporal y cerebral	25
Análisis morfométrico	27
DISCUSIÓN	31
CONCLUSIONES	39
REFERENCIAS	41

RESUMEN

Se estudió mediante el empleo de técnicas morfométricas el efecto de la malnutrición prenatal por ingesta de una dieta hipoproteínica e isocalórica de 6 % de caseína sobre las células piramidales del *Cornus Ammonis* 1 (CA1) del hipocampo, cuya función se relaciona con la regulación del ritmo theta hipocámpico, el cual es característico de los estados de atención y del sueño MOR. Se emplearon ratas macho de la cepa Sprague-Dawley las cuales provenían de hembras desnutridas con una dieta hipoproteínica con 6% de caseína, desde 5 semanas antes del apareamiento y durante la gestación. Al nacimiento las crías fueron rehabilitadas nutricionalmente por madres nodrizas normales. Para teñir al hipocampo, se empleó la técnica de Golgi rápido en animales desnutridos y controles de 15, 30, 90 y 220 días de edad (n=6), en cada uno de los cuales se seleccionaron 6 neuronas bien teñidas para el estudio morfométrico. En cada una de las 288 neuronas piramidales seleccionadas en el campo CA1, se midió: 1) el tamaño del soma, 2) la longitud de la dendrita apical, 3) el grosor de los estratos *radiatum* y *lacunosum moleculare*, 4) el número de espinas dendríticas en tres segmentos de 50 μ m cada uno en la porción proximal, medial y terminal de la dendrita apical y uno en la porción medial de las dendritas basales, y 5) la densidad dendrítica. Los resultados mostraron que la dieta baja en proteína (6% de caseína) durante la gestación provoca alteraciones en el desarrollo de las neuronas piramidales del campo CA1, en las espinas dendríticas. Así, los animales malnutridos mostraron reducción significativa de espinas dendríticas en los sitios de aferencias comisurales en las cuatro edades estudiadas (15, 30, 220 días); así como a nivel de las aferencias de la corteza entorrinal en tres edades (15, 30 y 90 días) y con excepción de la edad de 15 días, esta reducción de los sitios postsinápticos se encontró en las aferencias de la región del CA3. En el patrón de desarrollo dendrítico se encontraron alteraciones en las edades de 30 y 220 días, así como reducción significativa del tamaño neuronal sólo en los animales de 220 días de edad. Se concluye que la malnutrición prenatal produce alteraciones severas en las densidades de espinas y dendritas de las células piramidales del campo CA1 del hipocampo, cuyo desarrollo ontogenético es prenatal. Estos efectos persisten a largo plazo, lo que puede repercutir en la integración sináptica del circuito hipocámpico y por lo tanto en la información eferente del mismo; ya que la rehabilitación nutricional después del nacimiento, no alcanza a compensar el daño anatómico ocasionado por la carencia de proteínas durante la gestación en la rata.

SUMMARY

The effect of prenatal malnutrition produced in rats by a hypoproteic and isocaloric 6% casein diet on the pyramidal cells of *Cornu Ammonis 1* (CA1) of the hippocampus was studied with morphometric techniques. The hippocampus regulates the cortical theta rhythm which characteristically appears on attentional and REM sleep states. Sprague Dawley male rats born from malnourished mothers that were fed with a 6% casein diet 5 weeks before mating and during gestation, were rehabilitated by a cross-foster to a well fed mother. Rapid Golgi technique was used to stain the hippocampus of control and malnourished rats at 15, 30, 90 and 220 days of age (n=6). From each animal 6 well impregnated cells were selected for the morphometric study. In each one of 288 CA1 selected neurons the following measures were performed: 1) the size of the soma, 2) the apical dendrite's length, 3) the width of *radiatum* and *lacunosum moleculare* strata, 4) the number of dendrite spines on three 50 μ m segments at proximal, medial and terminal portions of apical dendrites and one medial segment at basal dendrites, and 5) the dendritic density. Results show that a 6% casein diet applied during gestation produces alterations on the development of dendritic spines of pyramidal cells in CA1 of the hippocampus. Malnourished rats showed significant dendritic spine reduction in commissural afferents for 4 studied ages (15, 30, 90 and 220 days); also this significant reduction was found on cortical entorhinal afferents for 3 studied ages (15, 30 and 220 days), with one exception at 15 days, this significant reduction of postsynaptic terminals was found on the region of CA3 afferents. Significant alterations on the development of the dendritic pattern were found at 30 and 220 days, and the soma size, was also reduced at 220 days of age. It is concluded that prenatal malnutrition produces significant alterations on spine and dendritic density of pyramidal cells from the hippocampal CA1 region, that undergoes a prenatal development. These effects were observed in a long time period, and they can affect the synaptic integration of the hippocampal circuit and consequently affect their efferent information, because nutritional rehabilitation implemented after birth, does not compensate the anatomical damage produced by the lack of proteins during the gestation period of the rat.

INTRODUCCIÓN

El desequilibrio nutricional en poblaciones humanas es en la actualidad un problema de alcance mundial, generado en parte por los diversos patrones culturales de alimentación y por las carencias en el aporte y la calidad los de alimentos, principalmente en las poblaciones de los países pobres y en vías de desarrollo así como por excesos debidos a malos hábitos en la alimentación, lo que es común en los países industrializados. Este desequilibrio nutricional se puede considerar en términos de desnutrición pluricarencial con deficiencias tanto de carbohidratos como de proteínas, minerales, vitaminas, etcétera. Otro tipo de desnutrición cualitativa en cuanto a la especificidad del aporte de nutrimentos, se le llama mala nutrición o malnutrición y puede ser deficiente sólo en proteínas o en vitaminas o en ciertos minerales y al igual que la desnutrición pluricarencial provoca un desequilibrio en los requerimientos del organismo para un desarrollo integral adecuado (Kaufer, 1989).

La encuesta de alimentación de 1989 realizada en 16 mil niños menores de 5 años, a través del Instituto Nacional de la Nutrición (INN) y en colaboración con los servicios de salud de los estados de la República Mexicana, reveló la situación grave que prevalece en el medio rural mexicano, en donde un 50% de la población infantil presenta desnutrición, y alcanza el 80%, en poblaciones que tienen condiciones de vida más precaria (Campuzano y col., 1990).

La desnutrición prenatal infantil en general, es consecuencia de la mala nutrición en mujeres embarazadas o bien por insuficiencia placentaria que provoca nacimiento prematuro. Los niños con este tipo de desnutrición muestran alteraciones en el desarrollo tanto de los distintos órganos como del sistema

nervioso y como consecuencia retrasos en su desarrollo físico y mental (Jacobson, 1991).

En función del grado de severidad, la desnutrición puede llegar a producir secuelas graves que limitan el desempeño del individuo durante la vida adulta. La mala nutrición en niños durante los dos primeros años de vida ocasiona en grados diversos deficiencias permanentes de funciones emocionales, cognitivas e intelectuales (Morgane y col., 1978, 1993; Katz y Davis, 1982). Asimismo, algunos periodos de mala nutrición neonatal pueden ocasionar daños cerebrales permanentes o alteraciones diversas del desarrollo psicomotor; desde problemas de torpeza motora hasta parálisis cerebral (Kaufer, 1989). Algunos efectos de la desnutrición pueden ser revertidos por terapia nutricional y enriquecimiento de condiciones sociales, siempre y cuando sea en los primeros dos años de vida, después de esta edad la rehabilitación puede ser solo parcial (Jacobson, 1991).

La mala nutrición es pues un factor epigenético cuya influencia es mayor para el desarrollo del feto y del neonato, por lo que juega un papel importante en la maduración y desarrollo funcional del sistema nervioso central (SNC). Es por esta razón que existe un interés creciente en la investigación de las alteraciones producidas por la desnutrición y la malnutrición en diversos niveles de la estructura del SNC. Así, utilizando modelos animales se pueden valorar los cambios en diferentes niveles de estudio, desde el punto de vista anatómico, fisiológico, bioquímico y conductual. Del mismo modo, se ha estudiado la posibilidad de revertir estos efectos y se ha observado que muchos de estos cambios provocados por la malnutrición persisten aún después de una ingesta adecuada de nutrimentos. Sin embargo, resulta insuficiente el conocimiento que

hasta la actualidad se tiene para comprender de una manera integral, la respuesta plástica del SNC ante factores ambientales nocivos como es la malnutrición.

En el presente trabajo experimental, se abordó el problema de la mala nutrición prenatal por deficiencia de proteínas y de la posibilidad de revertir estos efectos al rehabilitar nutricionalmente al animal al momento del nacimiento. Así mismo, se valoraron las alteraciones anatómicas en una estructura del SNC que presenta en su desarrollo heterocronía neuronal además de ser sensible a modificar su anatomía y funcionamiento por influencia de factores ambientales externos, como es la malnutrición. Desde el punto de vista anatómico, el hipocampo tiene una distribución laminar que facilita el estudio de los diferentes tipos neuronales, además de formar un importante circuito trisináptico que se sabe participa en procesos cognitivos como el aprendizaje y memoria espacial en la rata.

ANTECEDENTES

DESARROLLO DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL (SNC)

En el desarrollo del SNC de los mamíferos se llevan a cabo una serie de procesos celulares complejos, los cuales pueden ser agrupados en tres aspectos fundamentales: en el primero se originan las neuronas; en el segundo, hay diferenciación y maduración de las células nerviosas en donde se definen sus propiedades y migran desde el lugar de origen a sitios definidos para establecer conexiones específicas al mismo tiempo, hay crecimiento y elongación tanto

axonal como dendrítico, en el tercero, se establecen las conexiones neuronales que permiten integrar las funciones específicas (Díaz-Cintra y Ortega, 1991).

El desarrollo neuronal, lo determinan tanto factores internos programados genéticamente como factores externos no programados (epigenéticos) ambos, definen los detalles de la estructura neuronal y la organización de sus circuitos. Al mismo tiempo, participan eventos regresivos, los cuales ocurren de manera terminal durante el desarrollo (muerte celular programada "*apoptosis*", expansión axonal y eliminación sináptica), eventos que probablemente sirvan para optimizar la configuración final de aquellas proyecciones que permiten al SNC adaptarse a las condiciones medioambientales adversas. Existen, además de las neuronas en el SNC otras células como son los astrocitos y oligodendrocitos, cuyo desarrollo es en paralelo al de las neuronas y cuyo papel es importante tanto en la estructuración de soporte como en los procesos metabólicos a lo largo de la vida (Cavines, 1989).

El desarrollo del SNC se lleva a cabo en diferente tiempo (heterocronía neuronal), así, en especies "precoces" el sistema nervioso termina su maduración al nacimiento, mientras que en especies "altriciales" como el hombre y la rata, su desarrollo se completa posterior al nacimiento. Así mismo hay periodos "críticos", de intenso desarrollo neuronal con máxima proliferación celular, diferenciación y maduración neuroquímica (Dobbing, 1968, 1970). En la rata el período crítico comprende el último tercio de gestación y los primeros 21 días postnatales, mientras que en el hombre se ubica desde el último trimestre de gestación hasta los 2 primeros años de vida (Fig.1).

En esta heterocronía neuronal, algunas estructuras proliferan durante el periodo prenatal (neocorteza, células piramidales del hipocampo, hipotálamo,

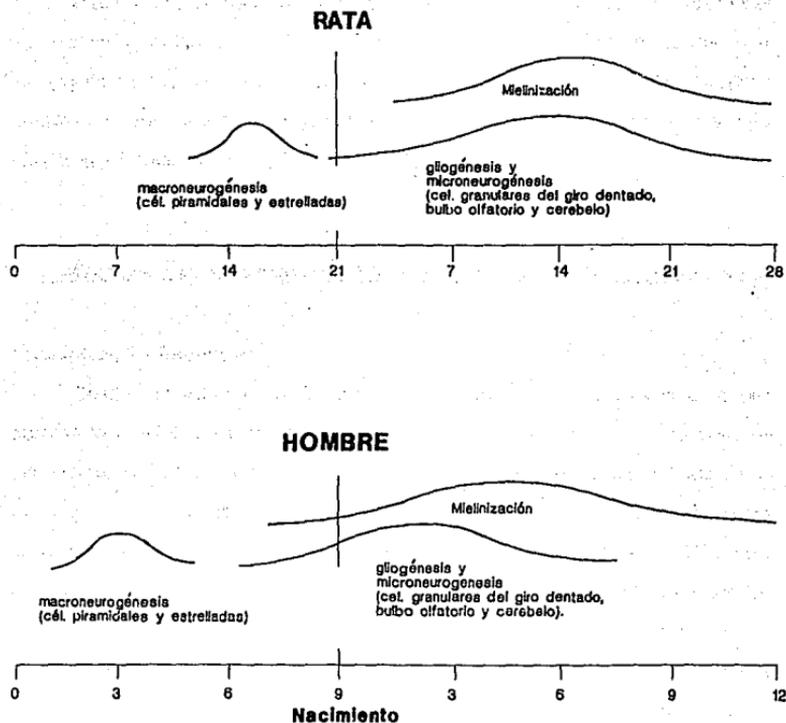


Fig. 1 Principales procesos en el desarrollo del SNC en relación al nacimiento de ratas y humanos.

etc.), en tanto que en otras, este proceso se continúa hasta el destete (bulbo olfatorio, cerebelo, etc.) o bien durante la etapa adulta, como es el caso del giro dentado del hipocampo (Fig. 2).

Durante estos periodos críticos del desarrollo, el SNC es especialmente vulnerable a cualquier factor epigenético como la desnutrición, el estrés, o el exceso de hormonas, drogas o alcohol, debido a que se modifica la estructura neuronal y en general la organización y funcionalidad del sistema nervioso (Dobbing y Sands, 1971; 1979; Smart, 1991).

EFFECTOS DE LA DESNUTRICIÓN EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL

Alteraciones anatómicas

Desde los estudios de Stewart y Sugita en 1918, se ha observado que durante la inanición severa se altera de manera considerable el peso corporal mientras que el peso cerebral se modifica en menor proporción, esto debido a que en cierta manera hay un ahorro cerebral o primacía metabólica, estas observaciones se han confirmado por los estudios de Dobbing (1970); Dobbing y Sands (1971); y de Morgane y col. (1978). La desnutrición afecta el desarrollo del SNC de manera diversa dependiendo del tiempo y duración de la misma. Así las estructuras de maduración temprana (subcorticales) resultan menos afectadas que aquellas cuya maduración es tardía, como son las estructuras corticales, el hipocampo y el cerebelo (Altman y col., 1970; West y Kemper, 1976; Kemper y col. 1978).

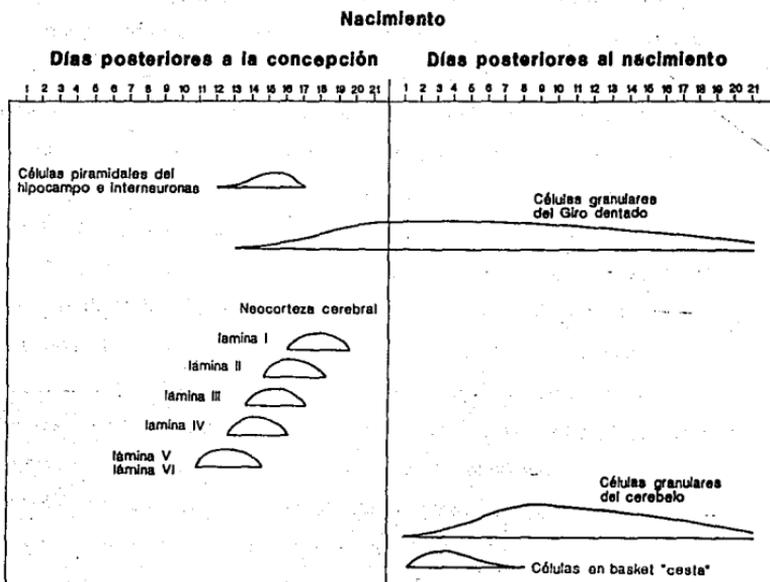


Fig. 2 Tiempo de maduración en diversas estructuras del sistema nervioso central.

En general, los efectos de la desnutrición provocan reducción en el volumen y grosor de la neocorteza, así como de regiones específicas del SNC debido a que la desnutrición durante los períodos críticos del desarrollo, causa disminuciones permanentes en el número de las neuronas (McConnell y Berry, 1981; Leuba y Rabinowics, 1979a; Patel, 1983; Paula-Barbosa y col., 1989). Esta disminución del número de neuronas se ha relacionado con muerte neuronal provocada por la insuficiencia de proteína (Bedi, 1994) o bien con alteraciones en el proceso de neurogénesis debido a que prolonga la duración del ciclo celular y se produce un menor número de células (Lewis y col., 1979; Warren y Bedi, 1984; Bedi, 1991).

En relación a la estructura neuronal, se han encontrado alteraciones a nivel del soma, en la longitud de las dendritas y en la maduración de la arborización dendrítica del cerebelo (Barnes y Altman, 1973; McConnell y Berry, 1978, 1981; Warren y Bedi, 1988), de la corteza cerebral (Salas y col., 1974; West y Kemper, 1976; Leuba y Rabinowicz, 1979b; Cordero y col., 1986; Díaz-Cintra y col., 1990) y en estructuras del tallo cerebral como son los núcleos *locus coeruleus* y rafe dorsal, que se sabe están involucrados en los patrones de sueño (Díaz-Cintra y col., 1981a y b; 1984; Cintra y Díaz-Cintra, 1985). En el núcleo supraquiasmático, del hipotálamo, que está considerado un oscilador circádico de los ritmos biológicos en el cerebro de los mamíferos (Moore, 1991) se han encontrado disminuciones en el tamaño neuronal, provocadas por dietas hipoproteínicas de 6% de caseína (Cintra y col., 1994a).

Las estructuras límbicas, responden negativamente a la desnutrición perinatal severa (Salas y Cintra, 1975; Salas y col., 1993), específicamente el complejo amigdalino (Escobar y Salas, 1993) y el hipocampo (Díaz-Cintra y col., 1994). En éste último, se han realizado estudios en el giro dentado, empleando distintos

modelos de desnutrición, en el modelo crónico, se han observado disminuciones en el volumen, en el grosor de diferentes estratos del hipocampo, así como en la densidad celular (Fish y Winick, 1969; Katz y col., 1982; Katz y Davis, 1983).

La malnutrición baja en proteínas durante la gestación se expresa en los animales adultos como modificaciones en los campos dendríticos neuronales y tiene un efecto diferencial sobre los diversos tipos celulares, dependiendo de la edad a la que se estudia el animal. En animales neonatos y adultos, se han descrito reducciones del tamaño celular y del número de espinas dendríticas en las neuronas granulares del giro dentado (Cintra y col., 1990; Díaz-Cintra y col., 1991) y de neuronas piramidales del campo CA3 del hipocampo, sin embargo, en estas últimas, se aminora el efecto de la malnutrición al ser compensado con un aumento de las ramificaciones dendríticas en edades juveniles aún cuando la malnutrición es crónica (García Ruíz y col., 1993).

Muchos de los efectos provocados por la malnutrición son permanentes, sin embargo dependiendo del período en el cual se establece la malnutrición puede haber recuperación en algunos parámetros anatómicos, como es la densidad dendrítica y el número de espinas sinápticas después de una rehabilitación nutricional (Amhed y col., 1987; Díaz-Cintra y col., 1991)

Alteraciones fisiológicas

El estudio de la ritmicidad circádica ayuda a entender las implicaciones fisiológicas de la desnutrición y malnutrición hipoproteínica, así, se ha observado en animales desnutridos crónicamente que el patrón de sueño se modifica (Salas y col., 1983), y hay reducción tanto del sueño de ondas lentas (SOL) como del sueño de movimientos oculares rápidos (MOR) (Drucker-Colín y col., 1976; Forbes

y col., 1978; Cintra y col., 1988 y 1993a). Asimismo algunos estudios de privación de sueño han mostrado que las ratas con malnutrición hipoproteínica crónica presentan alteraciones en la manifestación fisiológica de recuperación o "rebote" del sueño MOR (Galván, 1993; Durán, 1993), así como trastornos en todos los cambios de fase en el electroencefalograma (EEG) por análisis espectral (Durán y col., 1995). De igual manera, los animales malnutridos durante el periodo prenatal muestran alteraciones en la amplitud y frecuencia del ritmo theta que ocurre a través de los ciclos de sueño y vigilia (Austin y Morgane, 1986; 1992; Morgane y col., 1993). Por todo lo anterior se infiere que la malnutrición hipoproteínica provoca un retraso en la maduración de las estructuras del SNC y/o de los mecanismos neurales que regulan la función homeostática de los estados de vigilancia así como aquellas que controlan su ritmicidad circádica (Galván, 1993; Cintra y col., 1993a, b).

En estudios del EEG del hipocampo de animales con malnutrición hipoproteínica prenatal se ha mostrado que la expresión de la frecuencia máxima del ritmo theta durante el sueño MOR se encuentra significativamente retardada en etapas neonatales, lo cual manifiesta un retraso en la maduración del ritmo theta hipocámpico (Bronzino y col., 1986; Morgane y col., 1985; 1993). De igual manera se han encontrado deficiencias tanto en el establecimiento como en el mantenimiento de la potenciación a largo plazo (LTP) (Austin-LaFrance y col., 1991). Al mismo tiempo, se han reportado aumentos en la excitabilidad de las células granulares seguidas de la estimulación de la vía perforante así como cambios marcados en los correlatos fisiológicos como conductuales del "kindling". Dichas alteraciones se han relacionado con los mecanismos de inhibición hipocámpal, las cuales a su vez están moduladas por aferencias

extrahipocámpales desde el septum medial, *locus coeruleus* y rafe dorsal (Bronzino y col., 1986; 1991 a y b; Austin y col., 1992).

Alteraciones neuroquímicas

La desnutrición hipoproteínica altera el crecimiento axonal y retrasa el proceso de mielinización debido principalmente a que interfiere con la síntesis de proteínas y los lípidos necesarios en los procesos de mielinización (Sima y Sourander, 1978; Wiggins y col., 1986; Yokogoshi y col., 1992). Por otra parte, durante el desarrollo cerebral, los procesos neuronales están relacionados con los aumentos de la actividad enzimática y de la actividad de receptores a neurotransmisores en las diferentes regiones cerebrales (Venero y col., 1992). Se sabe también que animales malnutridos con dietas hipoproteínicas (de 6% y 8% de caseína), presentan aumento en las aminas biogénicas como la serotonina y la noradrenalina (Sobotka y col., 1974; Stern y col., 1974), neurotransmisores involucrados en el mantenimiento de la vigilia y estados mentales particulares que acompañan al sueño (Prosser y col., 1992). Estas alteraciones a nivel neuroquímico pueden reflejarse en las regulaciones inadecuadas de los patrones tanto electroencefalográficos (EEG) como conductuales (Austin y Morgane, 1986).

Alteraciones conductuales

La desnutrición en general provoca retrasos en la aparición de patrones de respuesta refleja y de las primeras conductas en la rata, así como un retraso en el desarrollo de los canales sensitivos (Smart y Dobbing, 1971; Salas y Cintra, 1973). Las crías, tienen menor demanda de atención a la madre lactante y existe menor competencia por el alimento materno (Massaro y col., 1977). Las crías

presentan alteraciones emocionales exageradas ante eventos novedosos, son más irritables, temerosas, presentan mayores respuestas de inmovilización y una menor capacidad de exploración, lo cual se ha relacionado con un daño en los mecanismos de atención selectiva hacia estímulos ambientales (Franková, 1973; Salas y Cintra, 1979; Escobar y Salas, 1987; Salas y col., 1993).

Los estudios de otras conductas relacionadas con la función del hipocampo, como son aspectos de motivación y atención sugieren que en ratas que han sido malnutridas con dietas bajas en proteínas durante la gestación, los mecanismos de adaptación conductual o atención selectiva son menos eficientes, requieren de mayor tiempo de adaptación o de aprendizaje para la ejecución de una tarea (Goodlett y col., 1986) y se incrementa la responsividad en reacciones de recompensa (Tonkiss y Galler, 1990; Tonkiss y col., 1990a y b).

HIPOCAMPO

El hipocampo se considera como parte del sistema límbico, fue denominado inicialmente por Camilo Golgi como Asta de Ammon o *Cornu Ammonis* (CA), y se ha descrito ampliamente en los trabajos de Ramón y Cajal (1892), Lorente de Nó (1934) y Amaral (1978) entre otros. Debido a su organización anatómica y a sus conexiones, se han realizado estudios de los procesos neuronales básicos y de la plasticidad sináptica característica de la formación hipocámpica (Lynch y Baudry, 1983).

Localización

En la rata, el hipocampo se distribuye dorsoventralmente en un eje septo-temporal, limita en su porción medial-posterior con el hemisferio cerebral, y en su porción medial ventral con el tálamo, lateralmente con el ventrículo lateral y la corteza cerebral, en la parte anterior limita con el *septum* y posteriormente con la corteza parahipocámpica (Fig. 3).

Anatomía

Se han caracterizado 4 regiones en la formación hipocámpica, el giro dentado, el propio hipocampo o *Cornu Ammonis* (CA), el *subiculum* y la corteza entorrinal y en cada una de estas regiones se pueden distinguir diferentes capas o estratos con base a su distribución laminar (Fig. 4).

El giro dentado está constituido por una capa densa de células granulares que forman una letra "C" a nivel del cuerpo celular (capa granular) y las dendritas de estas neuronas forman la capa molecular. Superior a la capa granular y en el interior de la "C" cerca de la región hilar hay una población celular heterogénea, formada por tipos diversos de interneuronas (células en canasta). Los axones de las células granulares forman las fibras musgosas que penetran al propio hipocampo y hacen sinapsis con las células piramidales del campo CA3 en la porción de excrescencias torneadas (Blackstad y col., 1970; Claiborne y col., 1986; Gaarskjaer, 1986) (Fig. 5).

El propio hipocampo se encuentra separado del giro dentado por la fisura hipocámpica y se divide en 4 campos (CA1, CA2, CA3 y CA4) constituidos principalmente por neuronas piramidales que en niveles diferentes de su estructura forman los siguientes *strata*: el *stratum oriens* se distribuye

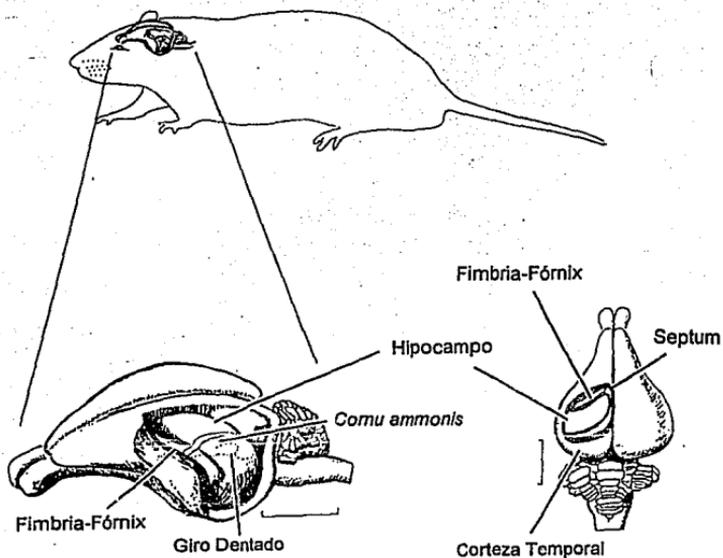


Fig. 3 Anatomía y ubicación del hipocampo de la rata. La barra representa 10 mm.

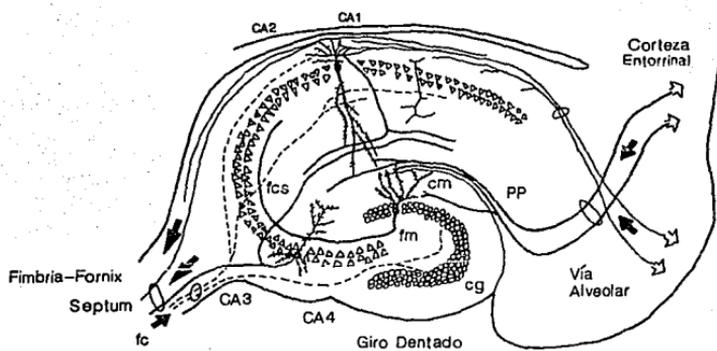


Fig. 4 Regiones del hipocampo, sus principales aferencias y su distribución laminar. cg, capa granular; cm, capa molecular; fm, fibras musgosas; fc, fibras comisurales; fcs, fibras colaterales de Schaffer; PP, patrón perforante.

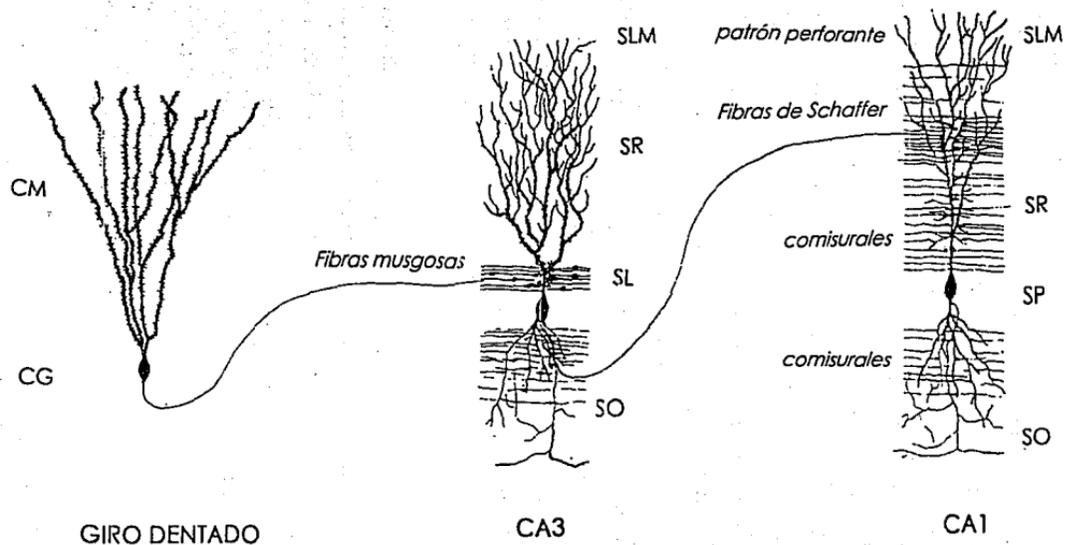


Fig. 5 Esquema de los 3 tipos celulares principales de la región hipocámpica y las capas o estratos que los conforman. CM, capa molecular; CG capa granular; SLM, stratum lacunosum moleculare; SR, stratum radiatum; SL stratum lucidum; SP stratum pyramidale; SO, stratum oriens.

horizontalmente en las dendritas basales de las neuronas piramidales y está formado por células en canasta y axones de las neuronas piramidales que atraviesan hasta el *alveus* en la superficie ventricular del hipocampo y forman la fimbria del hipocampo y el fórnix; el *stratum piramidale*, constituido por los cuerpos neuronales de las células piramidales y su arborización dendrítica apical forma al *stratum radiatum* en la porción medial y al *stratum lacunosum moleculare* en su porción terminal. En el campo CA3 del hipocampo se forma el *stratum lucidum* y abarca la zona de aferencias de las fibras musgosas del giro dentado (Fig. 5).

El complejo subicular está constituido por células piramidales y polimórficas, se encuentra dividido en 3 regiones que son: el *parasubiculo*, adyacente al campo 1 (CA1) del hipocampo, el *subiculo* y el *presubiculo* que son la región adyacente a la corteza entorrinal, aunque el *subiculum* en ocasiones se considera como un cuarto componente del circuito trisináptico debido a que sus conexiones son muy similares a las del CA1, además de que recibe aferencias prominentes de este campo (Cohen y Eichenbaum, 1993).

Ontogenia

En el hipocampo, existen diferencias en el tiempo de generación y maduración de las células que lo constituyen, las células piramidales de los distintos campos se generan prenatalmente mientras que cerca del 85% de las células granulares del giro dentado se forman después del nacimiento y una mínima parte se prolonga hasta la vida adulta en la rata (Bayer y Altman, 1974; Lewis y col., 1979; Pokorny y Yamamoto, 1981; Bayer, 1982; Crespo y Stanfield, 1986; Stanfield y Trice, 1988; Seress y Riback, 1989),

Según estudios de desarrollo hipocampal en la rata (Bayer y Altman, 1974; Cowan y col., 1980), el hipocampo se empieza a reconocer en el día 17 embrionario (E17) en donde se identifican las primeras células piramidales. En el día E19 se identifica la fimbria y la fisura hipocampal y el limbo suprapiramidal del giro dentado (GD). El limbo infrapiramidal del GD se retrasa hasta finales de la primera semana postnatal en donde también se completa el enrollamiento del hipocampo en el 8° día postnatal (P8) y en P15, el hipocampo es similar al adulto.

La neurogénesis en el giro dentado se inicia en E14 y el pico más alto de generación celular ocurre entre P5 y P7, mientras que en el hipocampo la generación de las neuronas en los diferentes campos se da entre E14 y E20. El pico de proliferación para los campos CA2, CA3 y CA4 es en el E17, mientras que en CA1 hay dos picos de proliferación, uno grande en E17 y otro pequeño en E19 (Bayer y Altman, 1974; Schlessinger y col., 1975, 1978).

Los eventos principales del desarrollo subsecuente tanto de las neuronas granulares como de las piramidales y de las interneuronas en el área dentata, se prolongan hasta el periodo postnatal. En CA3, el crecimiento dendrítico se inicia en E15 y es aparente en el día P10. Las espinas sinápticas se observan desde P4, tienen un pico de desarrollo en P15 y alcanzan los niveles de adulto en P24, presentándose algunas variaciones a nivel de los diferentes estratos (Pokorny y Yamamoto, 1981). En el campo CA1, el crecimiento dendrítico se inicia entre el E18 y E21 y la maduración dendrítica se retrasa hasta después de la maduración de CA3, hay un pico de crecimiento en P5, sin embargo las ramificaciones dendríticas siguen creciendo hasta después del día P20.

Proyecciones

Las vías aferentes a la formación hipocampal incluyen las áreas principales de asociación que provienen de zonas de convergencia multimodal tanto en la corteza del cíngulo como en la prefrontal, se interconectan con estructuras límbicas y después con otras áreas de convergencia parahipocámpicas, entre las que se encuentran las cortezas peririnal, la parahipocampal propia, la entorrinal y la del complejo subicular. La entrada principal de estas aferencias al hipocampo es por la vía del patrón perforante, el cual se origina en la corteza entorrinal (Isaacson, 1982; Cohen y Eichenbaum, 1993).

Círculo trisináptico

Parte de la vía del patrón perforante entra al hipocampo a través del subículo y el presubículo hasta llegar a los campos CA1 y CA3 en donde hace contacto con las dendritas apicales en su porción más distal a nivel del *stratum lacunosum moleculare*. Otra parte de esta vía perforante cruza la fisura hipocámpica en la región de la cresta, se bifurca extendiéndose hacia las láminas dorsal y ventral de la capa molecular y hace sinapsis con las dendritas apicales de las neuronas granulares del giro dentado, el cual es el principal receptor de las proyecciones de esta vía (Hjorth-Simonsen y Jeune, 1972; Köhler, 1985). Los axones de las neuronas granulares forman un plexo de fibras, denominadas "fibras musgosas" y son una referencia importante al CA3 del hipocampo cuyas células envían proyecciones o axones colaterales de Schaffer hacia el campo CA1, en donde se distribuyen en las regiones profundas del *stratum radiatum*. Las neuronas piramidales del campo CA1 también reciben aferencias de las fibras comisurales dirigidas principalmente al primer tercio de la dendrita apical y a las dendritas

básales (Buzaki y Eidelberg, 1982). El campo CA1 proyecta en forma columnar al *subiculum* y algunas proyecciones se dirigen a capas profundas de la corteza entorrinal, sin embargo las eferencias mayores del área subicular, van a la corteza entorrinal, cerrando de esta manera, el "circuito trisináptico". Existen proyecciones intrínsecas en la corteza entorrinal que unen varias partes de la región así como capas profundas con aquellas más superficiales, constituyendo así una serie organizada de circuitos cerrados (Steward, 1976; Isaacson, 1982) (Fig. 6).

El hipocampo recibe otras proyecciones extrínsecas desde el tallo cerebral, provenientes de células productoras de serotonina de los núcleos rafe dorsal y medial a través de la corteza entorrinal y de forma directa tanto a las células granulares como a las interneuronas del giro dentado y a las neuronas e interneuronas de CA1 y CA3, lo cual sugiere que estas aferencias juegan un papel modulador importante en la neurotransmisión del circuito trisináptico (Moore y Halaris, 1975; Köhler, 1984). De manera similar el hipocampo recibe aferencias que contienen acetilcolina y norepinefrina del *septum* y *locus coeruleus* respectivamente (Lynch y Baudry, 1983).

Las fibras eferentes de la formación hipocámpica, corren por el fórnix y llegan a las áreas septales y a las regiones hipotalámicas y talámicas. El fórnix está constituido principalmente por los axones de las células del estrato piramidal y algunas del estrato polimorfo, así como de la corteza subicular las cuales atraviesan el *alveus*, para llegar a la fimbria (Meibach, 1977). El hipocampo proyecta al diencefalo por medio de dos rutas, el fórnix postcomisural que termina en el hipotálamo, el cuerpo mamilar, el cerebro-medial rostral y en el núcleo talámico anterior. Una vía indirecta, formada por fibras precomisurales originadas en CA1, CA3 y *subiculum*, termina en el área septal a través del núcleo

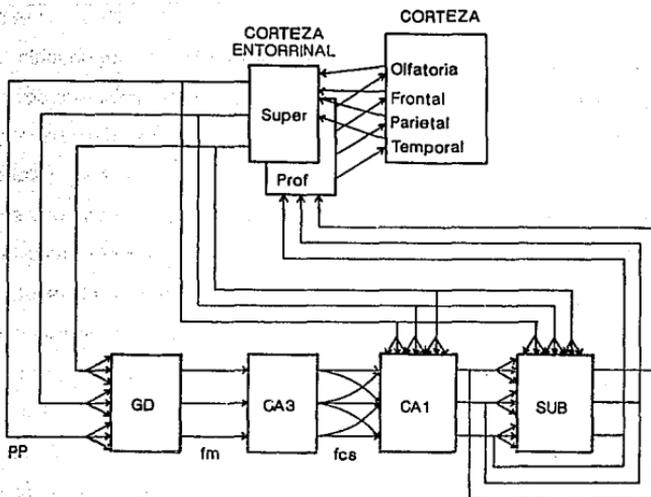


Fig. 6 Aferencias y eferencias en el circuito local del hipocampo. Super, superficial; Prof., profunda; PP, patrón perforante; fm, fibras musgosas; fcs, fibras colaterales de Schaffer; GD, giro dentado; CA *Cornu Ammonis*; SUB, *subiculum*.

septofimbrial y el núcleo habenular medial y proyecta al hipotálamo (Swanson y col., 1980; Waalas, 1983).

Función

El hipocampo participa en los procesos de memoria y aprendizaje, se ha observado que personas con lesión en los hipocampos ocasionada por tratamiento de epilepsia, presentan incapacidad de almacenamiento de recuerdos de tipo simbólico y verbal en la memoria a corto y a largo plazo. Asimismo, se ha considerado que el hipocampo junto con las estructuras asociadas de la formación hipocámpica, proveen el substrato para la memoria declarativa, la cual es responsable de la acumulación de hechos y datos derivados de las experiencias de aprendizaje (Eichenbaum y col., 1992).

En la rata, el hipocampo participa en el proceso de la fijación del aprendizaje y de la localización espacial, ya que lesiones en las vías principales, alteran estos procesos (O'Keefe y Nadel, 1978; Olton y col., 1978; 1983). Asimismo, se sabe que está implicado en conductas de exploración y huida, las cuales también se asocian a la innervación abundante de fibras de serotonina y noradrenalina (Köhler, 1984).

Por otra parte, la actividad eléctrica del hipocampo identificada en el EEG como el ritmo theta hipocámpico (frecuencia de 4-7 c/seg), también es una evidencia importante de su participación en la fijación de memoria y aprendizaje (Bayer, 1982). Estudios electrofisiológicos han mostrado que el ritmo theta se genera en el *stratum oriens* del campo CA1 del propio hipocampo y el *stratum moleculare* del giro dentado de la rata (Sinclair y col., 1982), y se ha observado que este ritmo está asociado con impulsos sensoriales exteroceptivos, con eventos

generados en la conducta y con estímulos puramente internos, cuyas representaciones funcionales en las cortezas de asociación convergen en el circuito hipocámpico (Cohen y Eichenbaum, 1993).

HIPOTESIS

La malnutrición hipoproteínica prenatal afecta el desarrollo postnatal de las células piramidales localizadas en el campo CA1 del hipocampo, en donde se genera el ritmo theta hipocámpico, relacionado con procesos como la memoria y el aprendizaje, estos efectos se manifestarán en el tamaño del soma, la longitud dendrítica, así como en el grosor de los estratos *radiatum* y *lacunosum moleculare*. El estudio morfométrico de estas células, en animales que fueron malnutridos en la etapa prenatal y rehabilitados después del nacimiento, dará la base para interpretar si las alteraciones anatómicas podrían afectar los procesos de memoria y aprendizaje en estos animales y analizar si estas alteraciones pueden ser revertidas por una rehabilitación nutricional postnatal.

OBJETIVOS

1. Estudiar a través de un análisis morfométrico el efecto de la malnutrición hipoproteínica prenatal con 6% de caseína, después de un periodo de rehabilitación nutricional postnatal sobre las células piramidales del campo CA1 del hipocampo de ratas en etapas de desarrollo (15 y 30 días de edad) y en estado adulto (90 y 220 días de edad).
2. Cuantificar los cambios morfológicos de las estructuras sinápticas producidos por la malnutrición a diferentes niveles de la neurona y asociarlos con las aferencias que reciben.

MATERIAL Y MÉTODOS

Para el presente estudio, se utilizaron 48 ratas macho de la de la cepa Sprague-Dawley de 4 diferentes edades (15, 30, 90 y 220 días) y 2 condiciones nutricionales distintas. 24 ratas del grupo experimental provenían de madres alimentadas con dietas bajas en proteína (6% de caseína) antes y durante la gestación y 24 ratas del grupo control que provenían de madres alimentadas con dietas de 25% de caseína (Fig. 7). Todos los animales se mantuvieron en un cuarto de bioferio en condiciones constantes de luz-obscuridad 12:12, temperatura (22-24 °C) y humedad relativa (40 a 50%).

Procedimiento de malnutrición y rehabilitación nutricional

Se utilizaron 30 ratas hembras y 10 machos de 90 a 120 días de edad. Durante 5 semanas antes del apareamiento, un lote de 10 hembras fue alimentado con una dieta de 6% de caseína y otro de 20 hembras con una dieta de 25% de caseína (TABLA I). Ambas dietas fueron complementadas con L-metionina (0.4%) debido a la ausencia de este aminoácido esencial en la caseína, y la mezcla de sales fue complementada con fosfato de calcio monobásico (0.6%) y carbonato de zinc (0.001%) con el objeto de que los niveles de minerales sean similares a los encontrados en otras dietas.

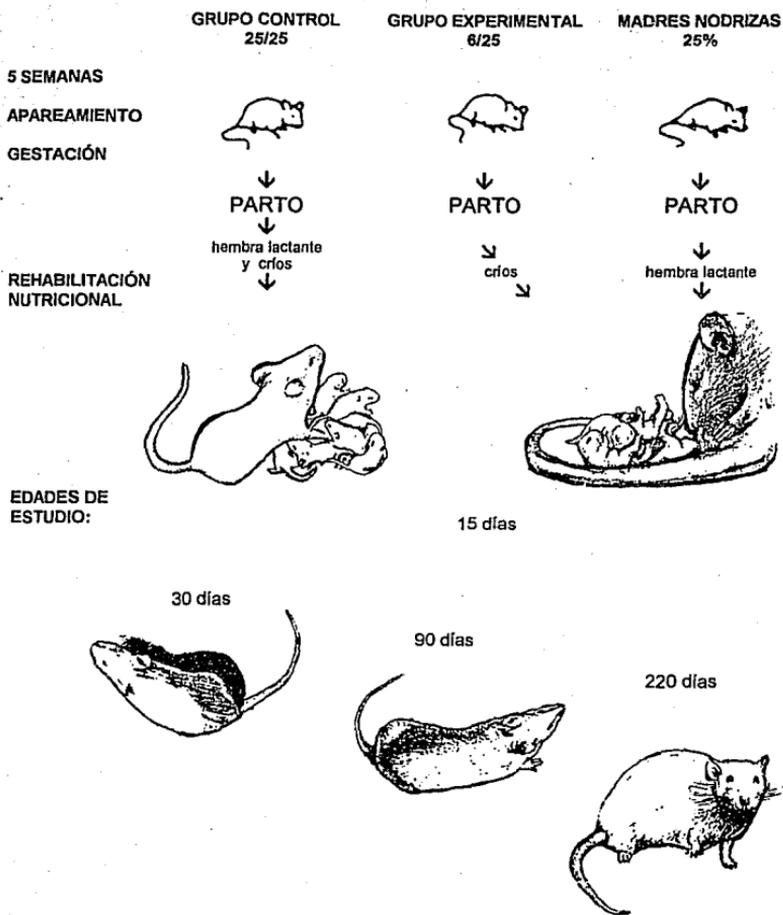


FIG. 7. Metodología del manejo de las camadas, utilizada para producir malnutrición prenatal y rehabilitación postnatal en ratas.

TABLA I
COMPOSICIÓN DE NUTRIMENTOS DE LAS DIETAS

COMPONENTE	DIETA 25% DE CASEÍNA (gr.)	DIETA 6% DE CASEÍNA (gr.)
Proteína	21.8	5.3
Grasa	15.4	15.0
Carbohidratos	50.9	68.9
Sales	4.7	4.0
Vitaminas	1.0	1.0
Agua	2.2	1.2
Componente no nutritivo	4.2	4.2
kcal/g	4.3	4.3

Para el apareamiento fueron colocadas 3 hembras con un macho alimentado con una dieta normal de 25% de caseína. A las hembras se les puso una marca con violeta de cresilo en una de las extremidades (izquierda o derecha) para facilitar su identificación y así llevar un control del día probable de fertilización, mediante frotis vaginales. Posteriormente todas las hembras que mostraron espermia en el frotis fueron separadas en cajas de cría y durante el apareamiento y todo el período de gestación se les suministró sus dietas correspondientes.

Al momento del parto las camadas nacidas el mismo día y de la misma condición experimental se mezclaron entre sí, con la finalidad de tener camadas genéticamente heterogéneas. Posteriormente las crías de 10 madres nutridas con la dieta hipoproteínica del 6% de caseína, fueron colocadas con nodrizas alimentadas con una dieta normal con 25% de caseína, para su rehabilitación nutricional, constituyendo el lote experimental (6/25); y las crías de 10 madres nutridas con dieta 25% continuaron con una madre nutrida al 25%, constituyendo

éste el lote control (25/25). En ambas condiciones se homogenizó la camada a 8 crías (4 hembras y 4 machos) y se continuó suministrando una dieta de 25% de caseína. A los 21 días se procedió al destete y se separaron los machos (4 en cada caja) hasta alcanzar las edades de 15, 30, 90 y 220 días de edad, en que fueron sacrificadas.

Procedimiento histológico

Se utilizaron 48 ratas macho 6 por cada edad (15, 30, 90 y 220 días) y por cada una de las dos condiciones experimentales, se tomaron los pesos corporales antes de sacrificarlos y los pesos cerebrales, después de la perfusión.

Los animales fueron anestesiados con pentobarbital sódico (55 mg/Kg de peso) y perfundidos por vía intracardíaca con formalina buferada (Ph 7.4) al 10%. Se extrajo el encéfalo, después de 24 horas de la perfusión y se procedió a seccionarlo en un plano coronal, para obtener el área del hipocampo en bloques de 4 mm de grosor (Fig. 8).

Los bloques de tejido se colocaron en frascos ámbar con una solución de dicromato de potasio al 2.5% y ácido ósmico al 1% en una proporción de 8:1 respectivamente, durante 8-12 días y posteriormente se diferenciaron en una solución de nitrato de plata al 0.75% durante 12 hr. Después se deshidrataron en alcoholes graduales para ser incluidos en nitrocelulosa de baja densidad y así obtener secciones de 120 μ m de grosor en un microtomo de deslizamiento. Dichos cortes se recogieron en alcohol al 70%, se deshidrataron en alcoholes graduales (80%, 96% e isopropanol), se aclararon en terpinol y se pasaron por xilol, para finalmente ser montarlos en laminillas con resina sintética.

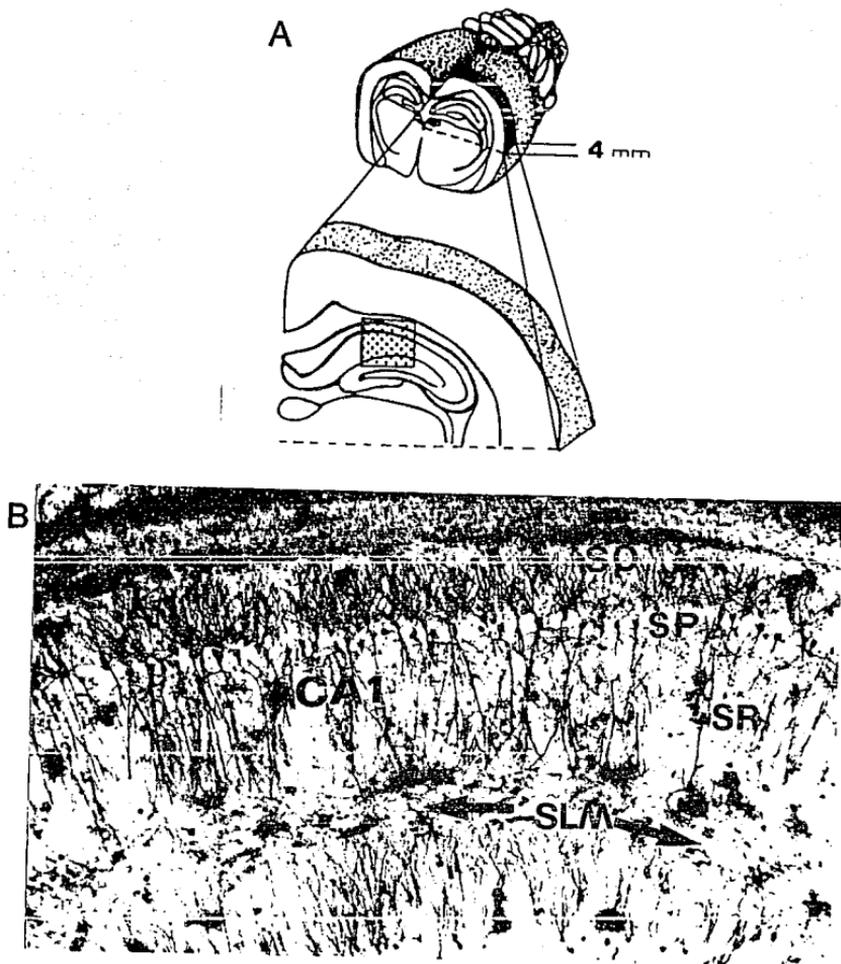


Fig. 8 A. Sección frontal del cerebro de una rata mostrando el área del hipocampo. La región sombreada corresponde al campo CA1 del hipocampo. B. fotomicrografía del CA1 teñido con Golgi, indicando los diferentes estratos SO, oriens, SP, piramidale, SR, radiatum y SLM lacunosum-moleculare, GD, giro dentado. a 10X.

Análisis morfométrico

Una vez obtenidas las preparaciones que contenían cortes coronales del hipocampo y localizado el CA1, se seleccionaron 6 células piramidales bien teñidas en cada animal. Se mezclaron las preparaciones provenientes de las dos condiciones experimentales y de las cuatro edades, a cada una se asignó un número al azar y se realizó el análisis morfométrico con ayuda de un sistema digital de imágenes "Histo 2000" de Biocom, France (Corkidi, 1989). Es importante mencionar que el número al azar de cada laminilla, evitó cualquier sesgo en el observador ya que desconocía tanto la condición experimental como la edad, así las observaciones se realizaron a doble ciego.

Los parámetros celulares que se midieron, fueron los siguientes (Fig. 9):

1) Del soma neuronal se obtuvo el tamaño celular tanto del eje mayor como del menor así como el área, ésta se obtuvo siguiendo el contorno del cuerpo de la neurona sobre una imagen digitalizada en el monitor de una computadora.

2) La longitud de la dendrita apical se midió siguiendo su trayectoria desde el soma hasta su término dentro del *stratum lacunosum moleculare*.

3) El grosor de los estratos se tomó en línea recta y en paralelo a las neuronas piramidales del campo CA1 del hipocampo. El *stratum radiatum* fue medido desde el límite del *stratum piramidale* hasta donde cruzan las fibras aferentes del patrón perforante y el grosor del *stratum lacunosum-moleculare* se obtuvo del área en donde atraviesan las fibras del patrón perforante, la cual corresponde al último tercio de la dendrita apical hasta la fisura hipocámpica.

4) Se cuantificó el número de espinas en 3 segmentos de la dendrita apical, de 50 μm cada uno, el segmento proximal se midió a nivel del primer tercio de la dendrita, en donde llegan aferencias comisurales; el segmento medial, se midió en

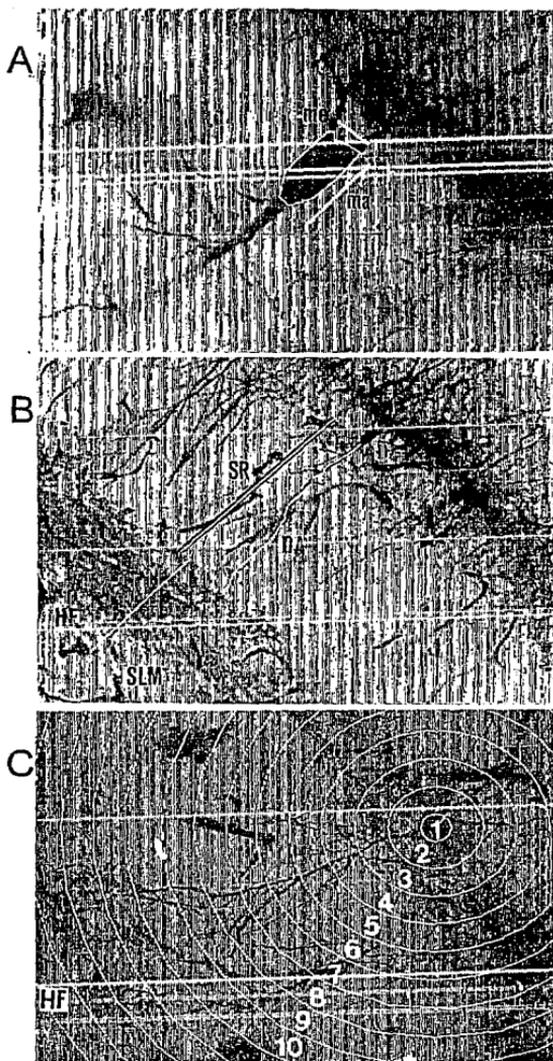


Fig. 9 Campo CA1 del hipocampo. **A)** mediciones realizadas en el soma de la neurona, eje mayor (ma) y menor (me). **B)** neurona piramidal y las diferentes mediciones realizadas en la longitud de la dendrita apical (DA), y el grosor en los *stratum radiatum* (SR) y *lacunosum moleculare* (SLM). **C)** 10 círculos concéntricos en donde se midió la densidad dendrítica.

el segundo tercio de la dendrita en donde se reciben aferencias de las fibras colaterales de Schaffer y el segmento terminal en la zona donde cruzan las fibras del patrón perforante. Un cuarto segmento se midió en la porción medial de la dendrita basal, en donde se reciben aferencias comisurales (Fig. 10).

5) La densidad dendrítica fue cuantificada por el número de dendritas que atravesaron 10 círculos concéntricos según el método de Sholl (1953), y para hacer la comparación con los segmentos en donde se cuantificaron las espinas dendríticas, se consideraron dos círculos concéntricos (76 μm) a nivel de cada segmento.

En total se midieron 288 células en las 4 edades y las dos condiciones experimentales. Los resultados obtenidos fueron analizados estadísticamente aplicando primero un ANOVA de 2 factores con el objeto de saber si existía algún efecto combinado entre la dieta y la edad, posteriormente se utilizó una prueba post hoc de Tukey con el objeto de discernir específicamente cuales grupos diferían significativamente entre sí, a una probabilidad de $p > 0.05$.

RESULTADOS

Peso corporal y cerebral

El análisis estadístico del ANOVA de dos vías (TABLA II) del efecto de la desnutrición proteínica prenatal sobre los pesos corporal y cerebral no mostró efectos significativos por la dieta, no así, por la interacción dieta-edad, la cual presentó significancia de $p < 0.001$. El análisis con la prueba de Tukey (TABLA III), no mostró diferencias significativas entre los grupos control y rehabilitado en las cuatro edades estudiadas.

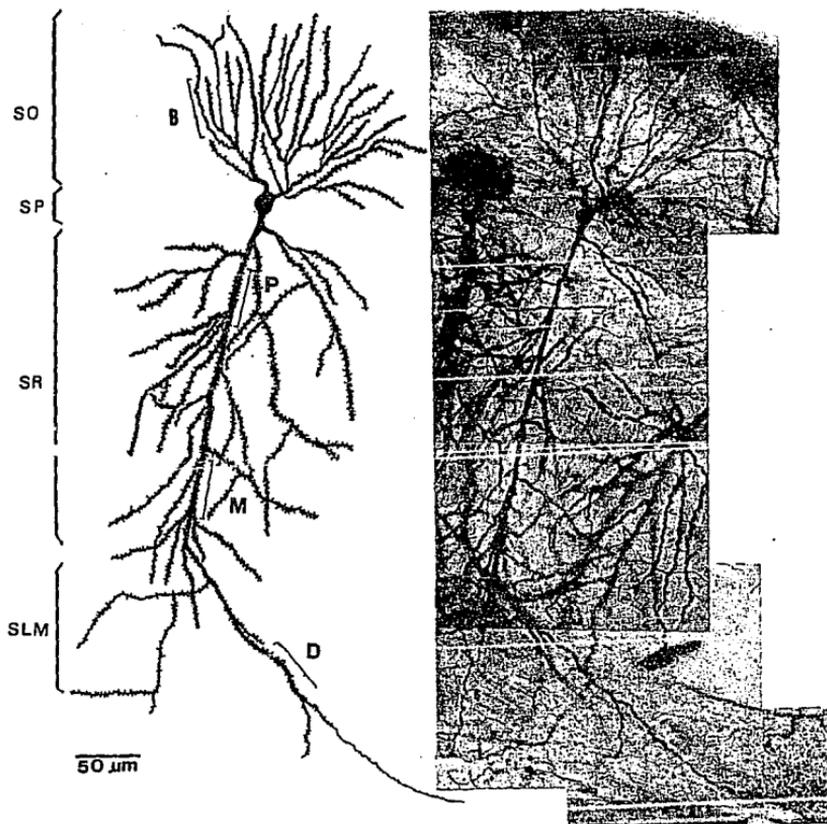


Fig. 10 Fotomicrografía de una célula piramidal del campo CA1 del hipocampo, teñida con Golgi rápido y su dibujo a cámara lúcida (izquierda), en donde se muestran segmentos de 50 micras en las porciones; proximal (P), medial (M) y distal (D) de la dendrita apical y en las dendritas basales (B), en donde se cuantificó el número de espinas dendríticas.

TABLA II

Análisis estadístico del efecto de la malnutrición proteínica prenatal sobre los pesos corporal y cerebral de ratas de 15, 30, 90 y 220 días de edad¹.

PESO	DIETA (gl 1,48)	VALORES F EDAD (gl 3,44)	INTERACCION (gl 3,44)
Corporal	0.05 NS	583.29 ***	281.67 ***
Cerebral	2.00 NS	181.48 ***	91.74 ***

1. Análisis de varianza de dos vías (ANOVA) con dos factores, dieta y edad. gl, grados de libertad; NS, no significativo; *** p<0.001;

Los valores promedio del peso corporal y cerebral, así como el porcentaje de cambio del grupo rehabilitado con respecto al grupo control, se muestran en la TABLA III.

TABLA III

Pesos corporal y cerebral (en gramos) de ratas de 15, 30, 90 y 220 días de edad y el porcentaje de cambio del peso de los grupos control (25/25) y rehabilitado (6/25)¹.

EDAD (días)	25/25	6/25	% DE CAMBIO	SIGNIFICANCIA
PESO CORPORAL				
15	34.50 ± 1.20	34.00 ± 0.51	- 1.45	NS
30	119.50 ± 8.02	130.50 ± 4.94	+ 9.20	NS
90	487.00 ± 26.40	500.00 ± 15.18	+ 2.67	NS
220	898.88 ± 30.53	850.18 ± 36.14	- 5.40	NS
PESO CEREBRAL				
15	1.30 ± 0.03	1.18 ± 0.04	- 9.23	NS
30	1.47 ± 0.04	1.30 ± 0.05	- 11.58	NS
90	2.27 ± 0.05	2.25 ± 0.03	- 0.88	NS
220	2.24 ± 0.02	2.19 ± 0.02	- 2.23	NS

1. Los valores representan el promedio ± la desviación estandar.

NS = No significativo (Nivel de significancia de acuerdo a el analisis estadístico ANOVA de una vía/Tukey. p<0.05)

Análisis morfométrico

Los resultados obtenidos con el análisis de varianza tanto para la edad como por la dieta se muestran en la TABLA IV, los datos y las diferencias significativas por la dieta se graficaron en las figuras 16 y 17. Las comparaciones del análisis entre grupos relacionados con la edad se muestra en la TABLA V.

El soma de las neuronas piramidales del CA1 del hipocampo, en el análisis de varianza no mostró efectos significativos por la dieta, sin embargo por la edad se encontraron efectos significativos en ambos ejes mayor y menor ($p < 0.01$ y $p < 0.001$ respectivamente) así como en el área ($p < 0.01$) celular. La interacción dieta-edad mostró efectos significativos en el eje menor y el área ($p < 0.001$) así como en el eje mayor ($p < 0.01$). Con la prueba de Tukey se encontraron reducciones significativas ($p < 0.05$) por efecto de la dieta en el área (-10%) y en el eje mayor del soma (-9%) en los animales de P220 (Fig. 11). Esta deficiencia estuvo asociada con un aumento significativo en el animal control al comparar el área del soma de P15 y P90 con P220 días y el eje menor de P30 con P220, mientras que en el grupo experimental se redujo el área y el eje mayor en las edades de 15, 30, 90 y 220, con excepción del área a los 90 días.

Longitud de la dendrita apical. El análisis de varianza mostró efectos significativos ($p < 0.01$) como consecuencia de la malnutrición, de la edad y por la combinación de ambos factores (TABLA IV). Con la prueba de Tukey se encontraron reducciones significativas ($p < 0.05$) por efecto de la dieta en P30 y P220 (de -10 y -9%, respectivamente) (Fig. 12). El grupo control alcanzó su máximo crecimiento dendrítico (de 375 μm) a los 30 días de edad, en tanto que el grupo G/25 lo alcanzó (357 μm) a los 90 días, sin embargo, estos valores fueron más bajos que en el grupo control.

TABLA IV Análisis estadístico del efecto de la malnutrición proteínica prenatal sobre las células piramidales del campo CA1 de hipocampo, en ratas de 15, 30 90 y 220 días de edad¹.

MEDICIÓN CELULAR	DIETA (gl 1,284)	VALORES DE F EDAD (gl 3,284)	INTERACCIÓN (gl 3,284)
Cuerpo neuronal:			
Eje mayor:	0.78 NS	4.15 **	4.54 **
Eje menor:	0.28 NS	9.95 ***	4.81 ***
Area:	0.69 NS	4.09 **	8.60 ***
Longitud de la dendrita apical:			
Grosor del <i>Striatum radiatum</i> :	21.30 ***	190.18 ***	8.62 ***
Grosor del <i>Striatum lacunosum</i> :	24.14 ***	214.09 ***	9.22 ***
	26.37 ***	0.41 NS	3.47 **
Densidad de espinas (segmentos de 50 µm)			
Proximal	49.99 NS	55.79 ***	30.35 ***
Medial	36.76 ***	31.84 ***	67.89 ***
Distal	92.52 ***	108.37 ***	6.14 ***
Basal	281.42 ***	543.10 ***	39.60 ***
Intersecciones dendríticas²:			
Segmento proximal			
76 µm vs 114 µm	0.44 NS	31.91 ***	2.54 *
114 µm vs 152 µm	2.41 NS	4.38 ***	0.88 NS
Segmento medial			
152 µm vs 228 µm	0.23 NS	3.87 **	1.05 NS
190 µm vs 268 µm	0.04 NS	7.34 ***	0.19 NS
Segmento distal			
228 µm vs 324 µm	0.29 NS	17.60 ***	1.54 NS
268 µm vs 380 µm	1.27 NS	12.89 ***	1.32 NS
Segmento basal			
76 µm	9.09 **	4.14 ***	7.18 NS
114 µm	3.15 NS	6.49 ***	1.18 NS

1. Análisis de varianza de dos vías (ANOVA) con dos factores, dieta y edad

2. La comparación es entre las edades de 15 vs 30, 90 y 220 días.

gl=grados de libertad (*** p<0.001; ** p< 0.01; * p< 0.05).

TABLA V Cambios relacionados con la edad en células piramidales del campo CA1 del hipocampo¹.

PARAMETROS	15 vs 30		15 vs 90		15 vs 220		30 vs 90		30 vs 220		90 vs 220	
	C	R	C	R	C	R	C	R	C	R	C	R
Cuerpo neuronal:												
Area	NS	-12%*	NS	NS	+16%*	-12%	NS	NS	+14%*	NS	+16%*	NS
Eje mayor	NS	-9%*	NS	-9%*	NS	-11%*	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Eje menor	+8%*	NS	NS	NS	+14%*	NS	NS	NS	NS	+10%*	NS	NS
Longitud dendrita apical	+53%*	+31%*	+50%*	+38%*	+51%*	+31%*	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Grosor <i>Str. Radiatum</i>	+53%*	+35%*	+44%*	+52%*	+36%*	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Grosor <i>Str. Moleculare</i>	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Densidad de espinas en segmentos de 50 µm												
Proximal	NS	+31%*	+16%*	+30%*	+44%*	+24%*	+19%*	NS	+41%*	NS	+24%*	NS
Medial	NS	+19%*	+17%*	NS	+40%*	NS	+17%*	-12%*	+40%*	-16%*	+20%*	NS
Distal	NS	NS	+25%*	+32%*	+16%*	NS	+30%*	+39%*	+21%*	+10%*	-7%*	-20%*
Basal	+41%*	+NS	+79%*	+98%*	+68%*	+94%*	+27%*	+89%*	+19%*	+87%*	-3%*	NS
Intersecciones dendríticas ²												
Segmento proximal												
76 µm vs 114 µm	+46%	+45%	+30%	+60%	+58%	+61%	NS	NS	NS	NS	+22%	NS
114 µm vs 152 µm	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Segmento medial												
152µm vs 228 µm	-17%*	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
190 µm vs 266 µm	NS	NS	-16%*	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Segmento distal												
228 µm vs 324 µm	-22%*	NS	-28%*	-20%*	-22%*	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
266 µm vs 380 µm	-24%*	NS	-28%*	-18%*	-17%*	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Segmento basal												
76 µm	NS	NS	NS	NS	NS	+16%*	NS	NS	NS	NS	NS	NS
114 µm	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	+19%	NS	NS

1. Análisis de varianza de una vía (ANOVA/RANGOS TUKEY, $p < 0.05$).

2. Comparaciones entre las edades de 15 vs 30, 90 y 220 días.

C= Control, R= Rehabilitado, NS= no significativo.

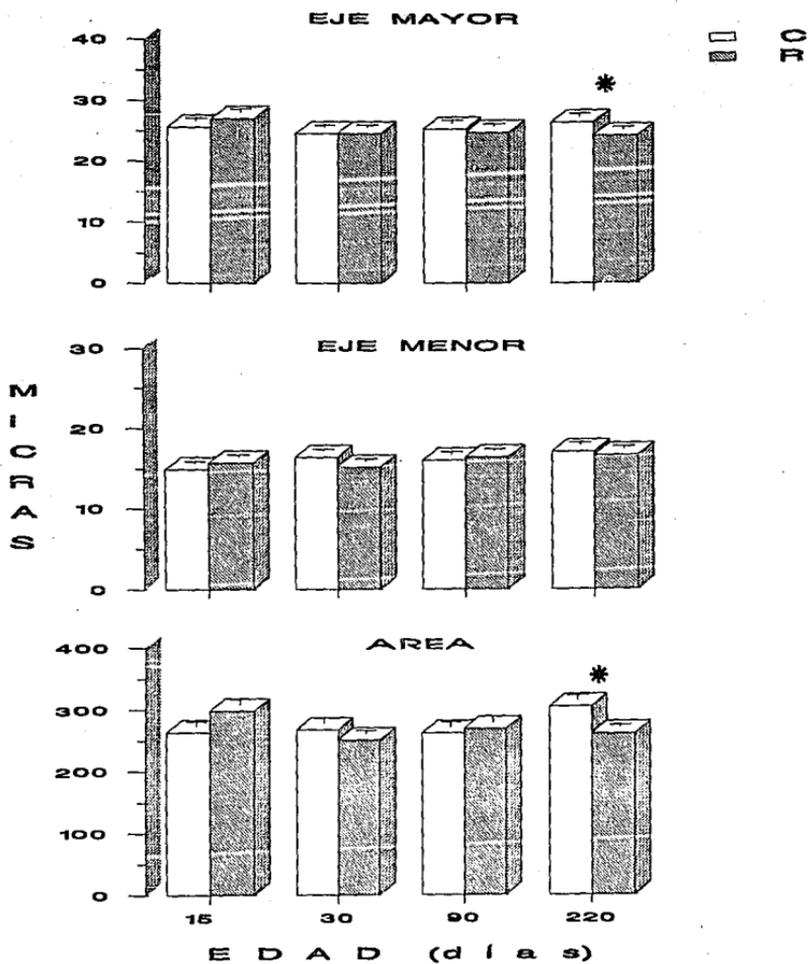


Fig. 11 Efectos de la malnutrición proteínica prenatal (6% de caseína) y rehabilitación nutricional postnatal sobre el eje mayor, eje menor y área de las células piramidales del campo CA1 del hipocampo. *p < 0.05.

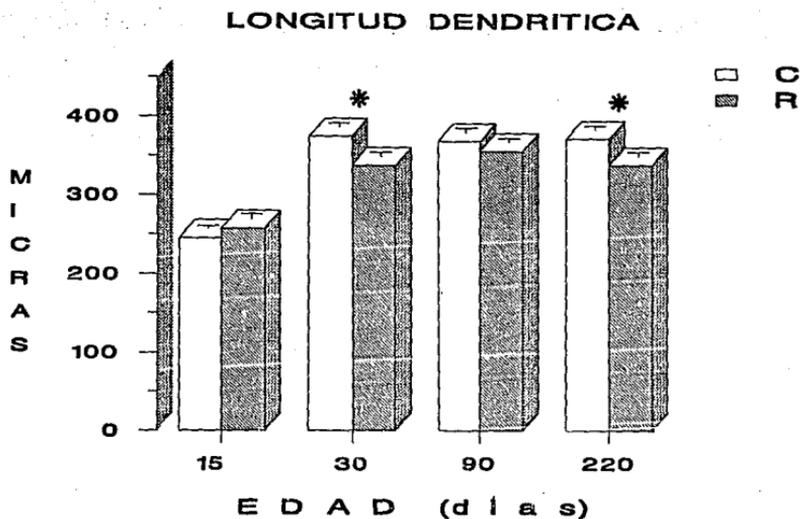


Fig. 12 Efectos de la malnutrición proteínica prenatal (6% de caseína) y rehabilitación nutricional postnatal sobre la longitud de la dendrita apical de las células piramidales del campo CA1.

En el grosor de los diferentes estratos, el análisis de varianza mostró que el *stratum radiatum*, se modificó significativamente ($p < 0.001$) por la dieta y la edad habiendo interacción entre ambos factores, mientras que el grosor del *stratum lacunosum moleculare*, mostró diferencias significativas por la dieta ($p < 0.001$) y por la interacción de los dos factores ($p < 0.01$). Con la prueba de Tukey se encontraron reducciones significativas ($p < 0.05$) por efecto de la dieta en P30 y P220 (Fig. 13). Estas reducciones fueron en promedio del 9% y 11% a nivel del *stratum radiatum* y del 14% y 16% en el grosor del *stratum lacunosum moleculare*, respectivamente.

El *stratum radiatum* guarda el mismo patrón de desarrollo que se observa en la longitud de la dendrita apical, alcanzando el máximo grosor en P30 el animal control (360 μm) y a los 90 días en el desnutrido prenatalmente (342 μm). Mientras que a nivel del *stratum radiatum* no se encontraron modificaciones significativas durante el desarrollo.

La densidad de espinas dendríticas valoradas en 3 segmentos de 50 μm de la dendrita apical y uno de la dendrita basal mostraron efectos significativos ($p < 0.001$) con el análisis de varianza por la dieta, la edad e interacción entre los factores con excepción del segmento proximal que no presentó efectos por la dieta. Con la prueba de Tukey, se observaron diferencias significativas ($p < 0.05$) en todos los segmentos como sigue:

En la zona en donde se reciben aferencias de las fibras comisurales, se observó disminución de espinas dendríticas por efecto de la dieta en P15 (-15%) y P220 (-27%) del segmento proximal y en P15 (-22%), P30 (-40%), P90 (-12%) y P220 (-7%) del segmento basal (Fig. 14). La deficiencia del número de espinas en el segmento apical a los 220 días estuvo asociado con el máximo incremento

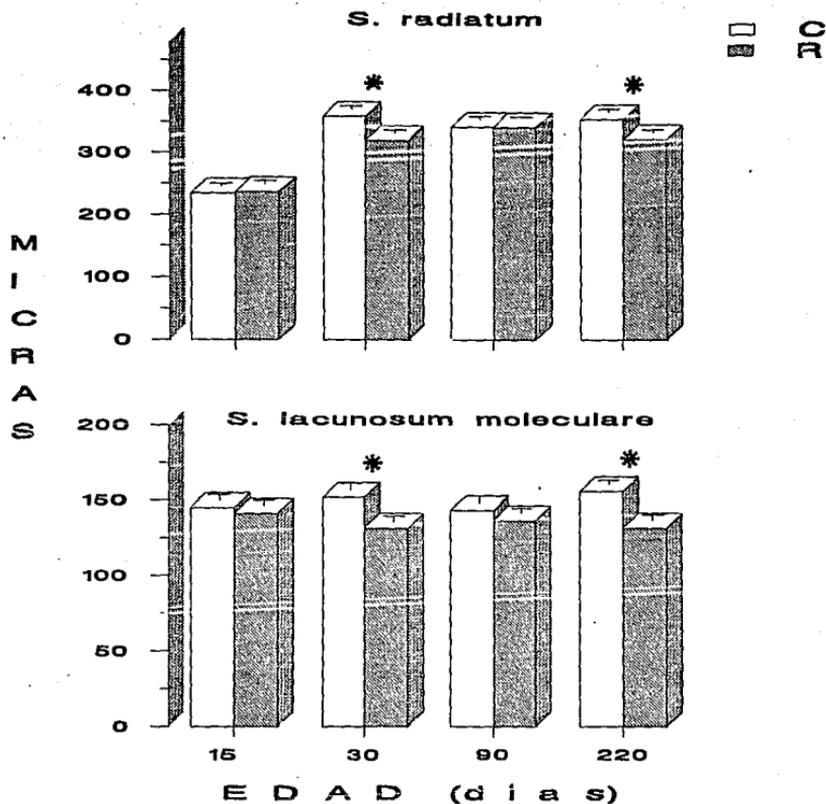


Fig. 13 Efectos de la malnutrición proteínica prenatal (6% de caseína) y rehabilitación nutricional postnatal sobre el grosor en los estratos *radiatum* y *lacunosum moleculare*, * $p < 0.05$.

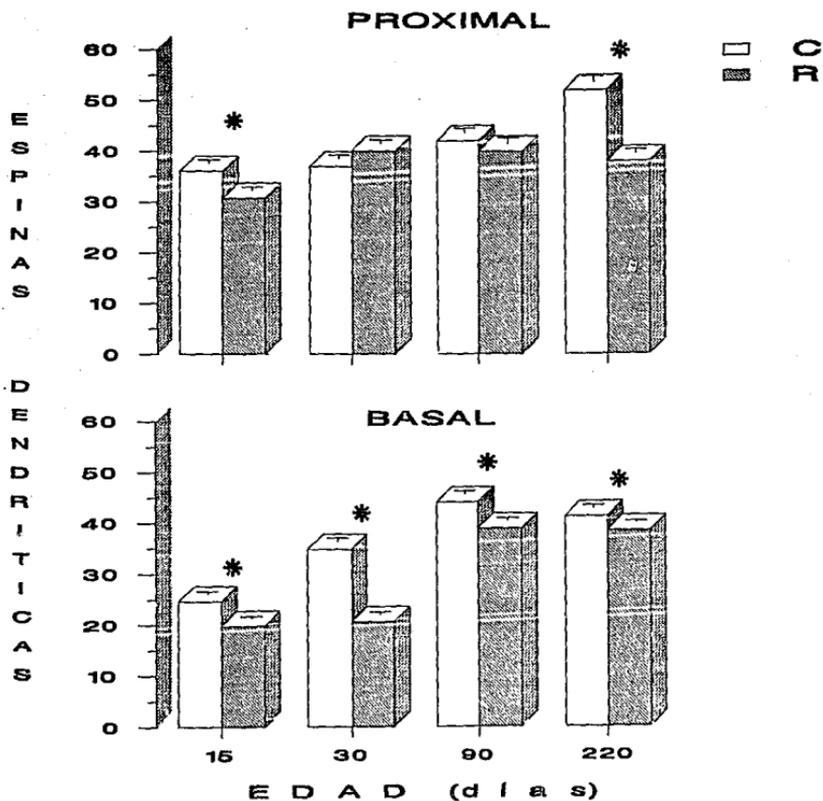


Fig. 14 Efecto de la malnutrición hipoproteínica prenatal (6% de caseína) sobre la densidad dendrítica, en los segmentos (de 50µm) proximal y basal de las neuronas del campo CA1 del hipocampo de ratas de 4 edades* $p < 0.05$.

de espinas en el grupo control, mientras que en el grupo 6/25 alcanzó el máximo a los 30 días de edad. La deficiencia encontrada en P30 en el segmento basal, estuvo asociada con un retraso en el crecimiento de espinas dendríticas, en el grupo 6/25, el cual se incrementó significativamente hasta la edad de 90 días.

En el **segmento medial**, que recibe aferencias de las fibras de Schaffer, las espinas dendríticas disminuyeron en P90 y P220 (20 y 35%, respectivamente), mientras que se incrementaron (9%) en P30 (Fig. 15). Este aumento estuvo asociado con un aumento de espinas dendríticas relacionado con edad en el grupo 6/25 de P15 a P30 y no en el grupo control. La disminución en la densidad de P90 y P220 estuvo asociada con un aumento en el grupo control de P30 a P90 y de P90 a P220 y una disminución en el grupo 6/25 de P30 a P220.

A nivel del **segmento distal**, en donde se reciben aferencias de la corteza entorrinal a través del patrón perforante, las espinas dendríticas fueron menores en P15, P30 y P220 días (-11%, -11% y -19% respectivamente) en los animales desnutridos prenatalmente. La disminución en el número de espinas en P220 estuvo asociada con una reducción de espinas de P90 a P220 en ambos grupos, siendo mayor en el grupo 6/25.

La **densidad dendrítica** se midió a nivel de los segmentos proximal, medial, terminal y distal, con la finalidad de hacer equivalentes los campos dendríticos en las cuatro edades estudiadas y tomando en cuenta que la dendrita apical alcanzó su máximo crecimiento a los 30 días. Al mismo tiempo, se realizaron comparaciones en segmentos dendríticos equivalentes de los animales de 15 días en donde la longitud dendrítica aún es muy corta, en comparación con los animales de P30, P90 y P220. Así, se comparó a nivel de las aferencias comisurales el segmento proximal entre 76 y 114 μm de ratas de 15 días edad con

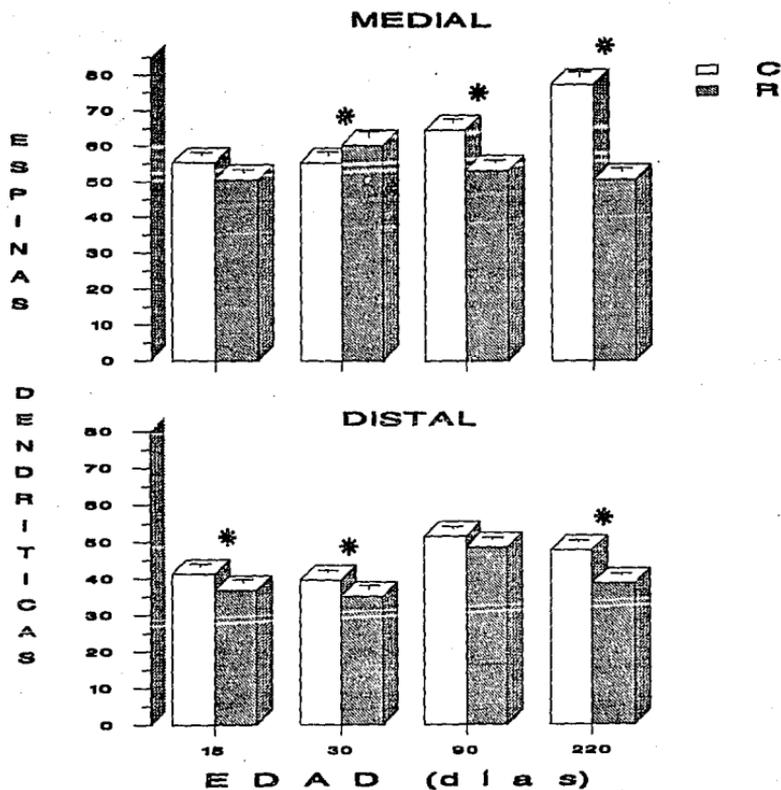


Fig. 15. Efecto de la malnutrición hipoproteínica prenatal (6% de caseína) sobre la densidad dendrítica, en los segmentos (de 50 μm) medial y distal de la dendrita apical de neuronas piramidales del campo CA1 del hipocampo de ratas de 4 edades * $p < 0.05$.

114 y 152 μm de ratas de 30, 90 y 220 días de edad. El segmento basal se valoró entre 76 y 114 μm en todas las edades estudiadas (Fig. 16). A nivel de las aferencias de las fibras colaterales de Schaffer, el segmento medial se comparó entre 152 y 190 μm de ratas de 15 días de edad con 228 y 266 μm de ratas de 30, 90 y 220 días de edad mientras que a nivel de las aferencias del patrón perforante, el segmento distal se comparó entre 228 y 266 μm con 324 y 380 μm , respectivamente (Fig. 17).

El análisis de varianza mostró diferencias significativas en las intersecciones dendríticas por efecto de la dieta ($p < 0.01$) en el segmento basal, por efecto de la edad ($p < 0.001$) en todos los segmentos estudiados y por la interacción de la dieta y la edad ($p < 0.05$) solo en el segmento proximal (ver TABLA II).

Al realizar las comparaciones por grupos experimentales (25/25 vs 6/25) con la prueba de Tukey se observaron aumentos significativos ($p < 0.05$) de las ramificaciones dendríticas por efecto de la dieta en la zona de aferencias de fibras comisurales. Así, en el segmento proximal se aumento 13% el número de intersecciones dendríticas (a 114 μm) en animales rehabilitados de 90 días de edad, mientras que en el segmento basal se incrementó el número de intersecciones dendríticas en 28% y 18% (76 y 114 μm , respectivamente) en los animales rehabilitados de 220 días.

Cuando se compararon las edades, se encontraron aumentos significativos de las ramas dendríticas ($p < 0.05$) entre P15 vs P30 en ambos grupos control y desnutrido, así como entre P15 vs P90 y entre P15 vs P220 a nivel del segmento proximal (entre 76 a 114 μm). Sólo un aumento significativo en este segmento se encontró al comparar los grupos P90 vs P220 del grupo control (TABLA III). En el segmento medial (152 a 228 μm) se encontraron disminuciones entre los grupos

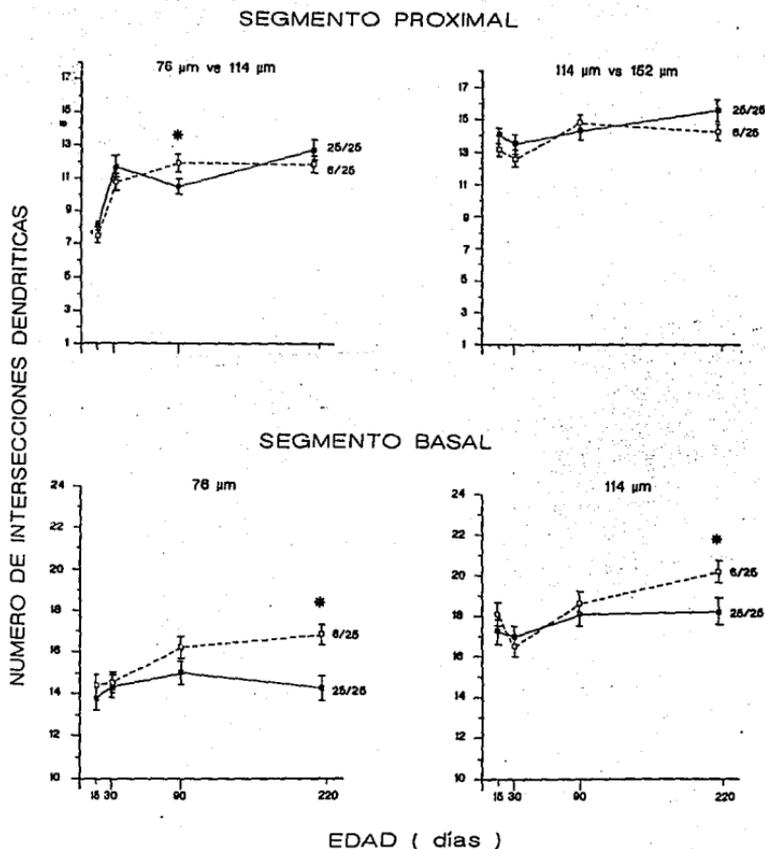


Fig. 16. Comparaciones en el número de intersecciones dendríticas en círculos concéntricos en los segmentos proximal y basal de las neuronas piramidales del campo CA1 del hipocampo de ratas de 4 edades. Se muestran los valores significativos por la edad * $p < 0.05$.

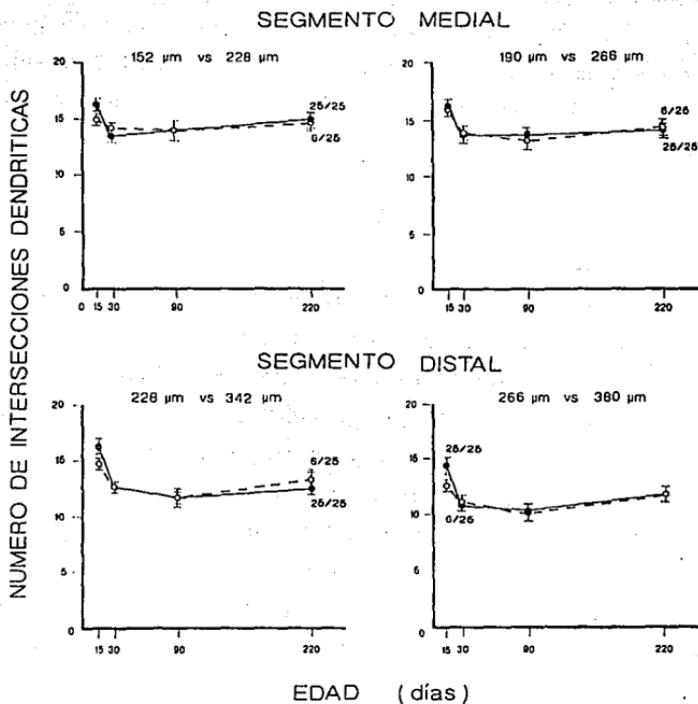


Fig. 17. Comparaciones en el número de intersecciones dendríticas en los círculos concéntricos de los segmentos medial y distal de las neuronas piramidales del campo CA1 del hipocampo de ratas de 4 edades. Se muestran los valores significativos por la edad * $p < 0.05$.

control de P15 vs P30. En el segmento distal (228 a 324 μ m y entre 266 a 380 μ m) el grupo control mostró disminuciones significativas cuando se compararon las edades de P15 vs P30, P15 vs P90 y P15 vs P220, el grupo desnutrido sólo mostró disminución cuando se comparó la edad P15 vs P90. En este mismo segmento. En las dendritas basales a las 76 μ m, se encontraron aumentos en el grupo desnutrido entre las edades de P15 vs P220 y entre P30 y P220 (TABLA V).

DISCUSIÓN

Se sabe que el estatus nutricional de la madre antes de la concepción altera la ingesta maternal de nutrimentos durante el periodo de la gestación, además de causar un fuerte impacto sobre el desarrollo del cerebro fetal (Rosso, 1990; Zamenhof y Van Martheen, 1978; Morgane y col., 1993). Por otra parte, se ha observado que las madres lactantes con este tipo de desnutrición muestran alteraciones importantes en la conducta materna, así como en la actividad eléctrica del cerebro (Cintra, 1994b). Tomando en consideración estas observaciones, se diseñó el presente estudio utilizando el modelo de malnutrición hipoproteínica con una dieta de 6% de caseína desde 5 semanas antes del apareamiento y durante la preñez. Con la finalidad de revertir estos efectos, se rehabilitó a los críos malnutridos al momento del nacimiento, siendo amamantados por hembras bien nutridas con 25% de caseína que parieron el mismo día.

El modelo de malnutrición con dietas de 6% de caseína, es considerado como una malnutrición severa, la cual permite el crecimiento físico deficiente, sin embargo se altera la función cerebral debido a que interfiere el desarrollo

ontogenético del sistema nervioso central (Bedi, 1991; Morgane y col., 1993). Hemos seleccionado el hipocampo y en particular el *cornu ammonis 1* (CA1), debido a su relativa simplicidad en su organización anatómica y en su circuitería sináptica, para observar la respuesta plástica de la rehabilitación nutricional después del nacimiento, a través del análisis morfológico de áreas y de la sinaptogénesis neuronal, los cuales marcan un índice de la capacidad de las neuronas para recibir y procesar información, reflejando así la capacidad de diversas estructuras para integrar respuestas adecuadas a ciertos estímulos.

Los resultados obtenidos en este estudio muestran que la deficiencia de proteínas durante el período gestacional altera el desarrollo y la maduración de las células piramidales del campo CA1 del hipocampo, aún cuando se ha rehabilitado nutricionalmente a los animales desde el nacimiento. Se observaron reducciones a diferentes niveles de las neuronas, el soma neuronal en animales 6/25 de 220 días de edad fue menor con respecto a sus controles y es interesante que a este nivel no se presentaran alteraciones provocadas por la malnutrición en etapas neonatales y si en estado adulto, lo cual muestra la suma de efectos de la malnutrición prenatal con la edad del animal. En estudios previos con el mismo paradigma de malnutrición se han encontrado reducciones a nivel del soma en neuronas piramidales de CA3 de animales de 90 y 220 días de edad (Díaz-Cintra y col., 1994) y del giro dentado en animales de 15, 30, 90 y 220 días de edad (Díaz-Cintra y col., 1991; Granados y col., 1995). Podemos observar una diferencia marcada entre las neuronas piramidales del hipocampo y las neuronas granulares del giro dentado; las primeras, aún cuando su generación es prenatal, presentan efectos a largo plazo, mientras que las neuronas granulares muestran una mayor susceptibilidad a la malnutrición hipoproteínica prenatal, debido a que

se reduce el soma tanto en etapas neonatales como en estado adulto. Esta diferencia pudiera deberse en parte a que el giro dentado es el principal receptor de la información que entra al hipocampo proveniente de la corteza entorrinal y constituye el primer relevo sináptico; las alteraciones encontradas en ésta zona, se reflejan a nivel de las eferencias que envía a CA3 a través de las fibras musgosas.

Por otra parte, la integración del ritmo theta esta regulado por el sistema gabaérgico, debido a que existen neuronas del circuito local gabaérgico que desarrollan conexiones sinápticas con el soma y dendritas de neuronas piramidales de CA1 y neuronas granulares del giro dentado, desde los cinco días de edad en la rata y ejercen un efecto inhibitorio a partir del día 6 postnatal (Seress y Ribak, 1988; Seress y cols., 1989). La inervación gabaérgica se genera en ambas zonas de manera similar a pesar de que mantiene un desarrollo independiente con respecto a las neuronas granulares y piramidales (Seress y cols. 1989) y se ha visto en estudios electrofisiológicos que hay un retraso en la maduración de los sistemas de modulación inhibitoria en el hipocampo por efecto de la malnutrición hipoproteínica (Morgane, 1993), asimismo en estudios con técnica de Golgi rápido e inmunocitoquímica encontramos que la malnutrición prenatal provoca efectos a largo plazo en el número y tamaño celular de las neuronas GABAérgicas (Aguilar y cols., 1994), por lo que podemos suponer que la deficiencia de proteínas en etapa prenatal altera el desarrollo y maduración de los circuitos neuronales locales inhibitorios del hipocampo, lo cual se ve reflejado a nivel de la estructura de las neuronas, modificando el área del soma neuronal y reduciendo el número de contactos sinápticos con las células del campo CA1, y en general de la formación hipocámpica.

El tamaño de las neuronas de CA1 a nivel de la dendrita apical también se modificó por causa de la desnutrición hipoproteínica prenatal. La longitud dendrítica y el grosor del *stratum radiatum* alcanzaron su máximo crecimiento (de 375 μm y 360 μm , respectivamente) en el grupo control a la edad de 30 días, en tanto que en los animales malnutridos prenatalmente su crecimiento (357 μm y 342 μm , respectivamente) se prolongó hasta la edad de 90 días. Los valores para los animales control estuvieron entre los rangos reportados en estudios de desarrollo sináptico en neuronas piramidales de CA1 (Pokorny y Yamamoto, 1981), mientras que el grupo experimental mostró un retraso en el desarrollo dendrítico.

La disminución en la longitud dendrítica fue del 9 y 10% en los animales de 30 y 220 días de edad, siendo consistente con las disminuciones en el grosor del *stratum radiatum* (11 y 9%) y del *stratum lacunosum moleculare* (14 y 16 %) en las mismas edades, lo cual representa una reducción del área de aferencias que llegan al campo CA1 del hipocampo y apoya el hecho de que la malnutrición hipoproteínica reduce el área de las diferentes regiones del hipocampo (Jordan y col., 1982; Katz y col., 1982; Paula-Barbosa, 1989). La diferencia en el porcentaje de disminución entre los dos estratos muestra que la dendrita apical se altera más a nivel del *estratum lacunosum* en donde llegan aferencias del patrón perforante. Asimismo, el patrón perforante envía aferencias al giro dentado a nivel de la capa molecular, en donde Granados y col., (1993) reportaron una reducción del 20 al 30% en animales malnutridos prenatalmente en edades adultas (90 y 220 días) y en menor grado en la edad de 15 días, lo que manifiesta una deficiencia en la entrada de información proveniente de la corteza entorrinal. Se ha sugerido que está vía está involucrada en los procesos de memoria y aprendizaje (Barnes,

1988; Eichenbaum y col., 1992), por lo que las modificaciones anatómicas encontradas en este estudio pudieran relacionarse con las deficiencias encontradas en dichos procesos.

Se ha visto que la desnutrición proteico-calórica en etapas tempranas del desarrollo, tiene efectos sobre la función del SNC en niños de edades escolares, en adolescentes y aún en el desempeño de personas adultas. Galler y colaboradores (1983a y b; 1984a y b), reportaron que en niños con desnutrición temprana y rehabilitados desde el primer año de vida, manifiestan falta de atención, inestabilidad emocional, menor interacción social en edades escolares (5-11 años) así como una menor capacidad de aprendizaje en las materias académicas del programa escolar, lo cual representa un menor coeficiente intelectual (CI). En etapas de adolescencia, se ha visto que la desnutrición hasta el primer año de vida provoca deficiencias del aprendizaje y de patrones motores de importancia para un individuo que esta próximo a iniciar un desempeño laboral (Galler y col., 1985b). Adicionalmente se ha encontrado que la desnutrición aún después de la rehabilitación es suficiente para causar un retraso en la maduración sexual, y en el desarrollo del sistema endocrino y como consecuencia, hay un retraso en el inicio de la pubertad. Es difícil de darle seguimiento a los efectos a largo plazo en poblaciones humanas, sin embargo se han observado cambios permanentes tanto bioquímicos como anatómicos en el SNC sobre todo de individuos que sufrieron desnutrición severa durante la niñez (Galler y col., 1985a).

El análisis de la sinaptogénesis en las neuronas piramidales del campo CA1, se realizó tomando en cuenta el tipo de aferencias que recibe, así, las espinas dendríticas en el segmento terminal, correspondientes al *stratum lacunosum*

moleculare en donde se reciben aferencias del patrón perforante, mostraron una disminución entre el 11 al 19% en animales de 15, 30 y 220 días, lo cual pudiera ser un reflejo de la reducción del estrato y por lo tanto de la disminución de fibras que entran através de patrón perforante. Estos resultados concuerdan con los encontrados en neuronas granulares del giro dentado, con el mismo paradigma de malnutrición, en las que se reportaron reducciones tanto de espinas como de ramificaciones dendríticas a nivel de las aferencias del patrón perforante, en edades neonatales y en estado adulto (Díaz-Cintra y col., 1991), podemos decir que este sitio es una de las zonas de mayor vulnerabilidad a la malnutrición proteínica y que estas alteraciones pudieran reflejarse en alteraciones conductuales y electrofisiológicas.

Bronzino y col. (1986), han utilizando el "kindling" como un modelo de plasticidad neuronal para evaluar el impacto de la malnutrición hipoproteínica crónica, sobre las células piramidales del campo CA1 del hipocampo, han encontraron cambios marcados en los correlatos del "kindling" tanto electrofisiológicos como conductuales. Las ratas desnutridas no activan completamente el "kindling" y desarrollan manifestaciones conductuales diferentes al grupo control, sugiriendo que se altera el balance normal entre la actividad inhibitoria y la excitatoria de la región CA1 hipocampal. Además, se ha visto también que la rehabilitación nutricional es incapaz de revertir o disminuir significativamente los efectos provocados durante la gestación (Bronzino y col., 1990, 1991a y b).

Las alteraciones en la transmisión sináptica puede relacionarse intrínsecamente con los circuitos locales que interactúan con neuronas GABAérgicas, las cuales a su vez están moduladas por aferencias

extrahipocampales desde el septum medial, *locus coeruleus* y *rafe dorsal*. Existe la posibilidad de que uno o más de los sistemas neuronales que actúan en el hipocampo, estén alterados por la malnutrición hipoproteínica y se ha considerado que la resistencia al "kindling", así como la dificultad para mantener LTP puede deberse a: 1) un aumento en la excitabilidad de interneuronas GABAérgicas; 2) a una reducción en la capacidad de recaptura para el GABA; o bien 3) a que se encuentre alterada la modulación extrahipocampal hacia las interneuronas GABAérgicas (Austin y col., 1992; Morgane, 1993).

En las espinas dendríticas cuantificadas a nivel del primer tercio de la dendrita apical y en las dendritas basales de la neurona piramidal en donde llegan las aferencias de las fibras comisurales y de asociación (Buzsaki y Eidelberg, 1982), encontramos menor cantidad de espinas dendríticas en los animales malnutridos prenatalmente; el mayor efecto se observó en las dendritas basales, cuyos valores fueron significativos en todas las edades y en particular a la edad de 30 días, el decremento fue del 40%, así mismo en las edades de 15 y 220 días, los decrementos fueron significativos tanto en el segmento apical como en el segmento basal, lo cual representa que la malnutrición prenatal afectó la cantidad de contactos sinápticos tanto en etapas perinatales como en estado adulto. Las alteraciones en esta zona, representan deficiencias en la entrada de información proveniente del área septal y de la conexión contralateral de ambos hipocampos.

Por otra parte las neuronas piramidales, mostraron en esta misma zona de aferencias comisurales, un incremento en el número de ramas dendríticas a la edad de 90 días en el segmento apical y a los 220 días en el segmento basal, en proporción de 13 a 28%. De acuerdo con Boublikova (1991) la arborización dendrítica refleja el estado funcional de las neuronas y responde de manera

plástica a las alteraciones durante el desarrollo, por lo que el mayor número de ramas observado en la arborización dendrítica, representa un aumento en los sitios de contacto sináptico de fibras comisurales, compensando de esta manera, la deficiencia encontrada en el número de espinas dendríticas. Este tipo de compensación neuronal, se ha observado en otros estudios de malnutrición y rehabilitación nutricional (Díaz-Cintra y col., 1994) y se ha considerado también, que es debido a una respuesta compensatoria debido a que la desnutrición causa muerte neuronal, por lo tanto la neurona establece conexiones adicionales con otras neuronas (Coleman y Flood, 1986).

Las espinas dendríticas localizadas en la zona de aferencias de las fibras colaterales de Schaffer (segmento medial) provenientes del campo CA3 del hipocampo, fueron más abundantes en los animales rehabilitados a la edad de 30 días, lo cual refleja nuevamente un proceso plástico de compensación para incrementar la superficie de contacto sináptico, debido a que la longitud de la dendrita apical se encuentra reducida. Este incremento en el número de espinas dendríticas, no se mantiene, sino por el contrario decae en las edades de 90 y 220 en proporción de 17% a 35% respectivamente y sumado a la reducción de la longitud dendrítica a los 220 días de edad, muestra un deterioro importante en el área de contacto sináptico. Sin embargo, podemos considerar que esta deficiencia es una manifestación del deterioro provocado en las neuronas piramidales de CA3, las cuales presentan alteraciones similares por efecto de la malnutrición crónica (García-Ruiz y col., 1993).

CONCLUSIONES

La malnutrición hipoproteínica prenatal, produce alteraciones en el desarrollo de las neuronas piramidales del campo CA1 del hipocampo. Las principales modificaciones se dan en los sitios postsinápticos (espinas dendríticas) de la neurona, lo cual pudiera representar una interferencia en la eficacia de la transmisión sináptica y en la integración de la información eferente del hipocampo.

Dependiendo de los diferentes estratos que constituyen la región del campo CA1, encontramos reducciones significativas en el siguiente orden:

1) A nivel en las dendritas basales y en el primer tercio de la dendrita apical, las cuales mantienen conexiones contralaterales intrahipocámpicos, encontradas en las cuatro edades estudiadas.

2) Del número de espinas a nivel de las aferencias de la corteza entorrinal cuya proyección multisensorial juega un papel importante en la integración de procesos de memoria y aprendizaje (en las cuatro edades estudiadas).

3) De las aferencias provenientes de la región CA3, la cual se ha considerado como el principal integrador de la actividad hipocámpica en tres edades (30, 90 y 220 días).

4) Menor longitud dendrítica y grosor en los estratos *radiatum* y *lacunosum moleculare* a los 30 y 220 días de edad, lo que manifiesta una alteración importante en el patrón de maduración dendrítico y en la entrada de información que reciben.

A los 220 días de edad se encontraron 9 de los 20 cambios estadísticamente significativos ocasionados por la malnutrición hipoproteínica prenatal. En particular, el soma neuronal de las células piramidales de CA1, resultó menor

solamente en esta edad, lo cual representa un efecto secundario a largo plazo en la actividad metabólica de estas neuronas, iniciado por la carencia de proteína durante la gestación.

Podemos concluir que las células piramidales del campo CA1 del hipocampo, cuyo desarrollo ontogenético es prenatal, son fuertemente alteradas por la malnutrición prenatal y que la rehabilitación nutricional después del nacimiento, no alcanza a compensar el daño ocasionado por la carencia de proteínas durante la gestación.

REFERENCIAS

Ahmed, M. G., K. S. Bedi, M. A. Warren y M. M. Kamel (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.

Aguilar, A., S. Díaz-Cintra, A. Gonzalez, M. A. Morales, T. Kemper y P. J. Morgane (1994) Prenatal malnutrition on the basket (GABAérgic) dentate gyrus cells in the rat. *Society for Neuroscience, Miami, Abstr.* 20:1696.

Altman, J., G. Das y K. Sudarshan (1970) The influence of nutrition on neural and behavioral development: I. Critical review of some data on the growth of the body and brain following dietary deprivation during gestation and lactation. *Dev. Psychobiol.* 3:281-301.

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

Austin, K. B. y P. J. Morgane (1986) Prenatal protein malnutrition affects synaptic potentiation in the dentate gyrus of rats in adulthood. *Dev. Brain Res.* 29: 267-273.

Austin, K. B., C. Beiswanger, J. D. Bronzino, R. J. Austin-LaFrance, J. R. Galler y P. J. Morgane (1992) Prenatal protein malnutrition alters behavioral state modulation of inhibition and facilitation in the dentate gyrus. *Brain Res. Bull.* 28:245-255.

Austin La-France, R. J., P. J. Morgane y J. D. Bronzino (1991) Prenatal protein malnutrition and hippocampal function: Rapid Kindling. *Brain Res. Bull.* 27:815-818.

Barnes, D. y J. Altman (1973) Effects of different schedules of early undernutrition on the preweaning growth of the rat cerebellum. *Exp. Neurol.* 38:406-419.

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

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

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

Bedi, K. S. (1991) Effects of undernutrition during early life on granule cell numbers in the rat dentate gyrus. *J. Comp. Neurol.* 311:425-433.

Blackstad T. W., K. Brink, J. Hem, y B. Jeune (1970) Distribution of hippocampal mossy fibers in the rat. An experimental study with silver impregnation methods. *J. Comp. Neurol.* 123:433-450.

Boublikova, L., A. Jiresova, J. Pokorny, M. Langmeier, S. Trojan (1991) Postnatal neuronal plasticity of the pyramidal cells of CA1 ara of the hippocampus as a reaction to neurotoxic damage. *Physiol. Res.* 40:585-593.

Bronzino, J. D., R. J. Austin-LaFrance, C. J. Siok y P. J. Morgane (1986) Effects of prenatal protein malnutrition on hippocampal kindling. Electrographic and behavioral measures. *Brain Res.* 384:348-354.

Bronzino, J. D., R. J. Austin-LaFrance y P.J. Morgane (1990) Effects of prenatal protein malnutrition on perforant kindling in the rat. *Brain Res.* 515:45-50.

Bronzino, J. D., R. J. Austin-LaFrance, P. J. Morgane y J. R. Galler (1991a) Effects of prenatal protein malnutrition on Kindling induced alterations in dentate granule cell excitability. I. Synaptic transmission measures. *Exp. Neurol.* 112: 206-215.

Bronzino, J. D., R. J. Austin-LaFrance, P. J. Morgane, J. R. Galler (1991b) Effects of prenatal protein malnutrition on Kindling induced alterations in dentate granule cell excitability. II. Paired pulse measures. *Exp. Neurol.* 112:216-223.

Buzsaki, G. y E. Eidelberg (1982) Convergence of associational and commissural pathways on CA1 pyramidal cell of the rat hippocampus. *Brain Res.* 237:283-295.

Campuzano, F. M., P. P. Ojeda, C. A. Avila y S. Zubirán (1990) Encuesta nacional de alimentación en el medio rural. Presentación de datos preliminares. *Rev. Inst. Nal. Nutr.* 2:2-6.

Caviness, V. S. Normal Development of Cerebral Neocortex. En: Evrard, P. and A. Minkowski (Ed.) *Developmental Neurobiology*. Nestlé Nutrition Workshop Series. Vol. 12. Nestec Ltd., Vevey/Raven Press, New York, 1989.

Cintra, L. y S. Díaz-Cintra (1985) Efecto de la desnutrición proteínica en los núcleos rafe dorsal, locus coeruleus y en las células no piramidales de la corteza visual de la rata. *Rev. Chil. Nutr.* 13:76-82.

Cintra, L., S. Díaz-Cintra, A. Galván y P. J. Morgane (1988) Circadian rhythm of sleep in normal and undernourished rats. *Bol. Estud. Med. Biol. Méx.* 36:3-17.

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

Cintra, L., A. Galván, P. Durán y E. Pérez (1993a) Alteration in the sleep-wake cycle and its circadian rhythmicity in malnourished rats. En: *International Workshop on Malnutrition and the Developing Central Nervous System*. XXXVI Soc. Méx. Ciencias Fisiol. Acapulco, Méx. p. 9.

Cintra, L., A. Galván y S. Díaz-Cintra (1993b) Privación de sueño en ratas normales y desnutridas de 30 días de edad. En: *Memorias del Congreso*

Conmemorativo del jubileo del Instituto de Investigaciones Biomédicas, U.N.A.M. I:511-517.

Cintra, L., A. Galván, S. Díaz-Cintra y C. Escobar (1994a) Protein malnutrition on suprachiasmatic nucleus cells in rats of three ages. *Bol. Estud. Med. Biol. Méx.* 42:11-19.

Cintra, L., S. Ramírez, F. Mena, P. Durán y C. Escobar (1994b) EGG power spectral analysis of malnourished lactating rats. *Society for Neuroscience, Miami.* abstr. 20:1696.

Claiborne B. J., D. G. Amaral y W. M. Cowan (1986) A light and electron microscopic analysis of the mossy fibers of the rat dentate gyrus. *J. Comp. Neurol.* 246:435-458.

Cohen, N. J. y H. Eichenbaum. *Memory, Amnesia and the Hippocampal System.* MIT Press, England. pp. 54-108, 1993.

Coleman, P. D. y Flood, D. G. (1986) Dendritic proliferation in the aging brain as a compensatory repair mechanism. *Prog. Brain Res.* 70:227-237.

Cordero, M. E., M. Trejo, E. García, T. Barrios, A. M. Rojas y M. Colombo (1986) Dendritic development in the neocortex of adult rats following a maintained prenatal and/or early postnatal life undernutrition. *Early Hum. Dev.* 114:245-258.

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 doctoral, Université Paris, Val de Marne, 1989.

Cowan, W. M., B. B. Stanfield y K. Kishi. The development of the dentate gyrus. En A. A. Mascona y A. Moroy (Eds) *Current Topics in Development Biology*, Vol. 15 New York, Academic Press. pp. 103-153. 1980.

Crespo, D., B. B. Stanfield y W. N. Cowan (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.

Díaz-Cintra, A., L. Cintra, T. Kemper, O. Resnick y P. J. Morgane (1981a) The nucleus raphe dorsalis: a morphological Golgi study in rats of three age-groups. *Brain Res.* 207:1-16.

Díaz-Cintra, A., L. Cintra, T., Kemper, O. Resnick, y P. J. Morgane (1981b) The effects of protein deprivation on the nucleus raphe dorsalis: a morphometric Golgi study in rats of three age groups. *Brain Res.* 221:243-253.

Díaz-Cintra, S., L. Cintra, T. Kemper, O. Resnick y P. J. Morgane (1984) The effects of protein deprivation on the nucleus locus coeruleus: a morphometric Golgi study in rats of three age groups. *Brain Res.* 304:243-253.

Díaz-Cintra, S., L. Cintra, A. Ortega, T. Kemper y P. J. Morgane (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., A. Ortega. Histogénesis y morfogénesis en el sistema nervioso central. En: Salas M. (Ed.). *Ontogenia neural. Aspectos comparativos y mecanismos de regulación.* UNAM, SMCF, Méx. pp. 129-133, 1991.

Díaz-Cintra, S., L. Cintra, A. Galvan, A. Aguilar, T. Kemper y P. J. Morgane (1991) Effects of protein prenatal malnutrition and postnatal rehabilitation on the dentate gyrus in rats of four age groups. *J. Comp. Neurol.* 310:356-364.

Díaz-Cintra, S., M. García-Ruiz, G. Corkidi y L. Cintra (1994) Effects of prenatal malnutrition and postnatal nutritional rehabilitation on CA3 hippocampal pyramidal cells in rats of four ages. *Brain Res.* 662:117-126.

Dobbing, J. (1968) Vulnerable period in developing brain. En: Davison A.N. y J. Dobbing (Eds.) *Applied Neurochemistry.* Blackwell, Oxford. pp. 287-316.

Dobbing, J. (1970) Undernutrition and the developing brain. En: Himwich, W. (Ed.) *Developmental Neurobiology*. C. C. Thomas, Springfield. pp. 241-261.

Dobbing, J. y J. Sands (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.

Dobbing, J. y J. Sands (1979) Comparative aspects of the brain growth spurt. *Early Hum. Dev.* 3:79-83.

Drucker-Colin, R. R., M. Shkurovich, J. C. Domínguez y J. A. Ramírez (1976) Sleep patterns in malnutrition *Proceedings. 16th Annual Meeting Society for the Psychophysiological Study of Sleep, Cincinnati*. Abstr. p. 95.

Durán, P.H., Privación de sueño MOR en ratas normales y malnutridas. Tesis de licenciatura. Unidad Académica de los Ciclos Profesional y de Posgrado, U.N.A.M. pp. 62, 1993.

Durán, P., L. Cintra, A. Galván y M. A. Guevara (1995) EEG power spectral analysis before and after REM sleep deprivation in normal and malnourished rats of 30 days. *WFSRS Second International Congress. Nassau, The Bahamas*. Abstr. 429

Eichenbaum, H., T. Otto y N. J. Cohen (1992) The Hippocampus-What does it do? *Behav. Neur. Biol.* 57:2-36.

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

Escobar, C. y M. Salas (1993) Neonatal undernutrition and amygdaloid nuclear complex development: an experimental study in the rat. *Exp. Neurol.* 122:311-318.

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

Forbes, W. B., W. C. Stern, C. S. Tracy, O. Resnick y P. J. Morgane (1979) Effects of chronic malnutrition on experimentally induced seizures in rats. *Exp. Neurol.* 62: 475-481.

Franková, S. (1973) Effect of protein-caloric malnutrition on the development of social behavior in rats. *Dev. Psychobiol.* 6:33-43.

García-Ruiz, M., S. Díaz-Cintra y G. Corkidi (1993) Effect of protein malnutrition on CA3 hippocampal pyramidal cells in rats of three ages. *Brain Res.* 625:203-212.

Gaarskjaer F. B. (1986) Organization of the mossy fibers of the rat dentate gyrus. *J. Comp. Neurol.* 246:435-458.

Galler, J. R., F. Ramsey, G. Solimano, W. E. Lowell y E. Mason (1983a) The influence of early malnutrition on subsequent behavioral development. I. Degree of impairment in intellectual performance. *J. Am. Acad. Child Psychiatry*, 22:8-15.

Galler, J. R., F. Ramsey, G. Solimano, W. E. Lowell y E. Mason (1983b) The influence of early malnutrition on subsequent behavioral development. II. Classroom behavior. *J. Am. Acad. Child Psychiatry*, 22:16-22.

Galler, J. R., F. Ramsey y G. Solimano (1984a) The influence of early malnutrition on subsequent behavioral development III. Learning disabilities as a sequel to malnutrition. *Pediatric Res.* 18:309-313.

Galler, J. R., F. Ramsey, G. Solimano, L. T. Kucharski y R. Harrison (1984b) The influence of early malnutrition on subsequent behavioral development IV. Soft neurologic signs. *Pediatric Res.* 18:827-832.

Galler, J. R., F. Ramsey y G. Solimano (1985a) A follow-up study of the effects of early malnutrition on subsequent development. I. Physical growth and sexual maturation during adolescence. *Pediatric Res.* 19: 518-523.

Galler, J. R., F. Ramsey y G. Solimano (1985b) A follow-up study of the effects of early malnutrition on subsequent development. II. Fine motor skills in adolescence. *Pediatric Res.* 19: 518-523.

Galván, R. A. Efectos de la privación total de sueño en ratas con desnutrición proteínica crónica. Tesis de Maestría. Unidad Académica de los Ciclos Profesional y de Posgrado. U.N.A.M. pp. 76, 1993.

Goodlett, C. R., M. L. Valentino, P. J. Morgane y O. Resnick (1986) Spatial cue utilization in chronically malnourished rats: Task specific learning deficits. *Dev. Psychobiol.* 19:1-15.

Granados R. L., L. Cintra, P. Duran, A. Galván, A. Alfaro (1993) Cambios morfológicos en el giro dentado de ratas desnutridas prenatalmente y rehabilitadas postnatalmente. XXXVI Cong. Nal. Soc. Méx. Cienc. Fisiol. p. C61.

Granados R. L., Efecto de la malnutrición hipoproteínica prenatal sobre el desarrollo de las fibras musgosas de la formación hipocámpica. Tesis de Maestría. Unidad Académica de los Ciclos Profesional y de Posgrado. U.N.A.M. pp. 58, 1995.

Hjorth-Simonsen, A. y B. Jeune (1972) Origin and termination of the hippocampal perforant path in the rat studied by silver impregnation. *J. Comp. Neurol.* 144:215-232.

Isaacson, R. L. The hippocampus. En: *The limbic system*. 2a ed. Plenum Press, New York. pp. 22-59, 1982.

**ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

Jacobson, M. Dependence of the developing nervous system on nutrition and hormones. En: *Developmental Neurobiology*. 3a ed. Plenum Press, New York, pp 186-235, 1991.

Jordan T. C., K. F. Howells, N. McNaughton y P. L. Heatlie (1982) Effects of early undernutrition on hippocampal development and function. *Res. Exp. Med. Berl.* 180:201-207.

Katz, H. B., C. A. Davis y J. Dobbing (1982) Effects of undernutrition at different ages early in life and later environmental complexity on parameters of the cerebrum and hippocampus in rat. *J. Nutr.* 112:1352-1368.

Katz, H.B. y C.A. Davis (1983) The separate and combined effects of early undernutrition and environmental complexity at different ages on cerebral measures in rats. *Dev. Psychobiol.* 16:47-58.

Kaufers, H.M. (1989) Principales deficiencias. El rumbo de la desnutrición en el mundo. *Cuadernos de Nutrición.* 2:3-11.

Kemper, T., D.A. Pasquier y S. Drazen (1978) Effect of a low protein diet on the anatomical development of subcortical formations. *Brain Res. Bull.* 3:443-450.

Köhler, C. (1984) The distribution of serotonin binding sites in the hippocampal region of the rat brain. An autoradiographic study. *Neurosci.* 13:667-680.

Köhler, C. (1985) A projection from the deep layers of the entorhinal area to the hippocampal formation in the rat brain. *Neurosci. Lett.* 56:13-19.

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

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

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

Lynch, G.S. y M. Baudry. Origins and manifestations of neural plasticity in the hippocampus. En: Rosenberg, R.N. (Ed.) *The clinical Neurosciences*. Churchill Livingstone, New York. pp.171-202, 1983.

Lorente de Nó, R. (1934) Studies on the structure of the cerebral cortex. I. The area entorhinalis. *J. Physiol. Neurol.* 45:381-438.

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

McConell, P. y M. Berry (1978) The effects of undernutrition on purkinje cell dendritic growth in the rat. *J. Comp. Neurol.* 177:159-172.

McConell, P. y M. Berry (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.

Meibach, C.R. (1977) Efferent connections of the hippocampal formations in the rat. *Brain Res.* 124:197-224.

Moore, R.Y. y A.E. Halaris (1975) Hippocampal innervation by serotonin neurons of midbrain raphe in the rat. *J. Comp. Neurol.* 164:171-184.

Moore, R.Y. (1991) The suprachiasmatic nucleus and the circadian timing system. En: Klein, D.S., R.Y. Moore, S.M. Reppert (Eds.) *The suprachiasmatic nucleus*. Oxford University Press, New York. pp. 13-15.