

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

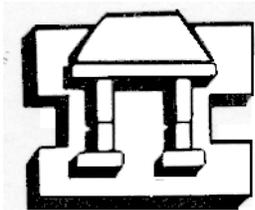
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

**“FALLAS EN LA CONDUCCIÓN DEL
POTENCIAL DE ACCIÓN DEL NERVI
SURAL DE LA RATA DESNUTRIDA”**

**ARTICULO PUBLICADO
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
BIÓLOGO**

**PRESENTA:
VERÓNICA ESTHER MERCADO HERRERA**

**Tutor:
Dra. Bertha Segura Alegría**



Tlalnepantla, Edo de México. 2004



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Dedicatoria

A mis padres, el tenerlos a ustedes como padres es el mejor regalo que me ha dado la vida. Por todo el esfuerzo que realizaron a lo largo de sus vidas para que yo pudiera superarme, a ustedes les dedico este trabajo, nunca terminare de agradecerles tantos sacrificios. Los quiero mucho.

A mis hermanos Wendy, Raúl y Carlos porque a pesar de todo hemos logrado salir adelante, gracias por su paciencia y por todos los momentos compartidos, recuerden siempre que uno vale por si mismo, que hay que tener fuerza y coraje para salir adelante y que nunca debemos olvidarnos de los demás.

A cada uno de mis seres queridos que físicamente no están presentes, pero donde quiera que se encuentren sepan que los llevo en mi mente y corazón.

A toda mi familia por su motivación y sus consejos, por las palabras de aliento cuando tanta falta me hacían, los quiero mucho.

Agradecimientos

Quiero agradecer muy especialmente a la Dra. Bertha Segura Alegría, por aceptar ser mi asesor de LICyT I y II, Servicio Social y por darme la pauta para realizar este trabajo, por todo el apoyo brindado, por su confianza y por cada una de las observaciones realizadas a este trabajo, pues sin ellas este trabajo no hubiera sido posible, muchísimas gracias.

Así mismo quiero agradecer al Dr. Ismael Jiménez Estrada por permitirme participar en este proyecto, por el apoyo y la ayuda durante mi permanencia en su laboratorio, por sus comentarios y revisiones al presente trabajo, Gracias.

Al Quím. José Carlos Guadarrama, gracias por el cuidado y manejo de los animales, pero sobre todo por tu amistad.

Agradezco también a mis sinodales Dra. Mónica Gonzáles Isais, M. en C. Jorge R. Gersenowies, M. en C. Javier Alonso Trujillo y al Biol. Hugo Jesús Castro Cortes por el tiempo dedicado para la revisión de este trabajo.

A cada una de las personas que conocí en el CINVESTAV, por cada uno de los momentos compartidos, gracias.

A mis amigos, por el apoyo que he recibido de cada uno de ellos, por todo lo que hemos compartido, pero sobre todo por brindarme su amistad.

A todas aquellas personas que he conocido y que me han apoyado en algún momento de mi vida. ¡ Gracias! . ☺

ÍNDICE

Dedicatoria y Agradecimientos	2
Índice	4
Introducción	5
➤ La Neurona	5
➤ Potencial de Membrana	7
➤ Potencial de Acción	7
➤ Fases del Potencial de Acción	8
➤ Clasificación de las Fibras Nerviosas	9
➤ Propiedades electrofisiológicas de los axones	10
➤ Mielina: Función y Ontogenia	12
Antecedentes	14
Objetivos	16
Metodología	17
➤ Métodos de Desnutrición	17
➤ Obtención del Tejido	17
➤ Registro del PAC	18
➤ Técnica Histológica	20
Resultados	22
➤ Peso Corporal	22
➤ Amplitud y Área del PAC	23
➤ Umbral de Activación Eléctrica	25
➤ Periodo Refractario Absoluto	26
➤ Velocidad de Conducción	27
➤ Variabilidad	29
➤ Diámetro del Nervio	32
➤ Número de Axones	33
➤ Diámetro del Axón	34
➤ Grosor de la Vaina de Mielina	35
Discusión	37
Bibliografía	39
Artículo	44

INTRODUCCIÓN

Para conservar la integridad anatómica y funcional de los organismos es indispensable que éstos reciban un aporte adecuado y suficiente de nutrientes. En el caso de que un organismo reciba un aporte de nutrientes insuficiente, en cantidad y/o en calidad, durante su desarrollo embrionario y/o de lactancia, presentará alteraciones anatómicas, funcionales y conductuales de consideración durante toda su vida (Waterlow y Stephen, 1969; Goldspink y Ward, 1979; Howart, 1972; Lopes y cols., 1982; Russell y cols., 1984 a, b; Morgane y cols. 1978, 1993).

Se ha puesto un considerable interés en el análisis de los posibles efectos que desencadena la reducción de la ingesta alimenticia en los diversos tejidos y órganos de los animales, entre los que destaca el sistema nervioso. A pesar de que en la actualidad se cuenta con un considerable cúmulo de evidencias, desde los puntos de vista morfológico, electrofisiológico, bioquímico y conductual, de los posibles efectos que produce la desnutrición sobre el sistema nervioso central (ver Morgane y cols., 1978, 1993), poco se conoce sobre las posibles alteraciones que genera una deficiencia alimentaria, en cantidad y/o calidad, sobre las características funcionales y/o morfológicas de los nervios periféricos.

LA NEURONA

La neurona es la unidad funcional del sistema nervioso y está especializada para generar, integrar y conducir impulsos eléctricos y/o químicos, que permiten que los elementos del sistema nervioso se comuniquen entre sí o con sistemas efectores como el muscular y el endocrino.

Las neuronas poseen un cuerpo celular llamado soma, del cual surgen el axón y las dendritas (Fig. 1). El soma o cuerpo celular contiene el núcleo y los organelos necesarios para mantener en funcionamiento a la célula nerviosa, y es en donde se integra la información proveniente de otras neuronas o de receptores sensoriales, mientras que los axones transmiten los estímulos a otras neuronas o a las células efectoras (Kandel, y cols. 1997).

El axón se origina en una proyección cónica del soma, que se denomina como axónico, aquí es donde se inician las señales eléctricas que generan el potencial de

acción en el axón, éste último está especializado para llevar información de forma rápida a través de grandes distancias (Zigmond y cols. 1999).

Desde el punto de vista funcional, las neuronas se caracterizan por ser células excitables, lo cual significa que pueden generar y transmitir potenciales electroquímicos en toda su longitud.

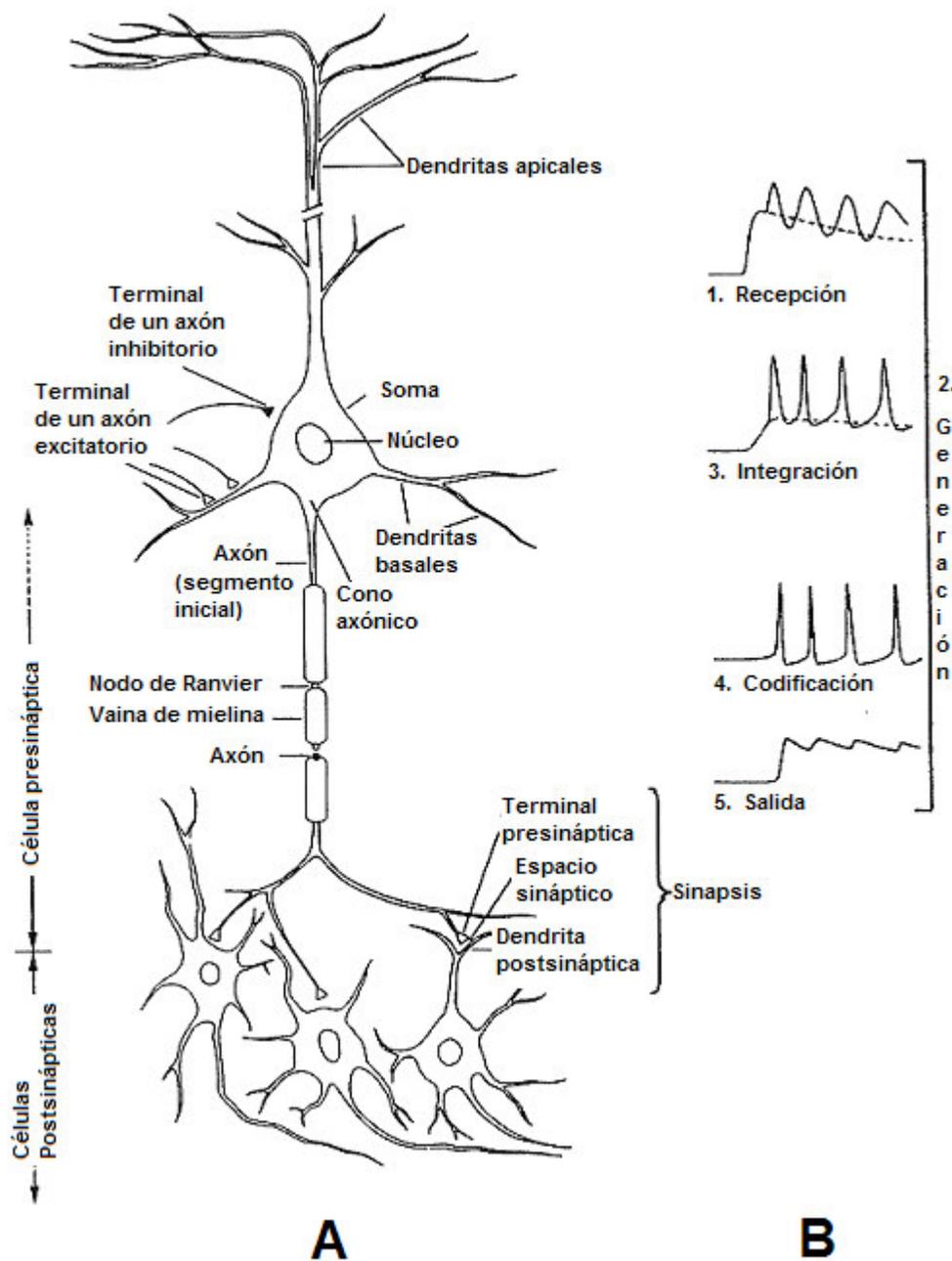


Figura 1.- A) Representación de la organización celular del sistema nervioso. B) Representación de la actividad eléctrica de los elementos celulares del sistema nervioso. (Figura modificada de Kandel y cols., 1997 y Zigmond y cols. 1999).

POTENCIAL DE MEMBRANA

La capacidad de generar y transmitir potenciales electroquímicos está asociada con las características fisicoquímicas de la membrana de la célula excitable. La característica fisiológica fundamental de ésta, consiste en mantener un gradiente eléctrico y químico entre el interior y exterior de la célula (gradiente electroquímico). El gradiente químico se produce por la diferencia de concentraciones iónicas entre el interior y el exterior de la célula. Los principales iones extracelulares son el sodio y el cloro, y los iones intracelulares son el potasio, y los fosfatos orgánicos (grupos PO_4 unidos a un ATP), además de proteínas que poseen aminoácidos con carga negativa. El gradiente eléctrico es debido a la diferencia de cargas provocada por la distribución asimétrica de estos iones entre el interior y el exterior de la célula (Tabla 1), (ver Zigmond y cols., 1999).

Tabla 1.- Distribución de los principales iones a través de la membrana neuronal en reposo del axón gigante de calamar (Kandel y cols., 1997).

ESPECIE IÓNICA	CITOPLASMA (mM)	LÍQUIDO EXTRACELULAR (mM)	POTENCIAL DE EQUILIBRIO (Mm)
K+	400	20	-75
Na+	50	440	+75
Cl-	52	560	-60
A- (Iones Orgánicos)	385	--	--

POTENCIAL DE ACCIÓN

Como se mencionó previamente la propiedad que caracteriza a las células excitables es su capacidad de generar y transmitir señales eléctricas mediante potenciales de acción. Un potencial de acción es una señal eléctrica que puede definirse como un cambio muy rápido en el valor del potencial de membrana de la célula. Durante el potencial de acción, el potencial de membrana se mueve hacia un valor más positivo (+50 mV) que el potencial de reposo (-70 mV), por lo que se dice que la célula se ha despolarizado, sin embargo el potencial de membrana también puede volverse más negativo (-80 mV) que el potencial de reposo, en cuyo caso se dice que la célula se ha hiperpolarizado. Cualquier cambio que signifique una vuelta hacia el valor del potencial de membrana en reposo es una repolarización de la célula (Guyton y Hall, 2001).

FASES DEL POTENCIAL DE ACCIÓN

En función de los cambios de permeabilidad iónica que sufre la membrana durante el potencial de acción, se pueden distinguir varias fases (Fig. 2), (Junge, 1981):

- a) Fase de reposo: es el periodo de tiempo en el que la neurona está en reposo antes de que se produzca el potencial de acción. La membrana está polarizada y hay una distribución asimétrica de cargas entre el interior y el exterior de la célula, siendo el interior de la misma electronegativo. Dependiendo del tipo neuronal, este puede oscilar entre -55mV y -75 mV (Gal, 2001).
- b) Fase de despolarización: la neurona se despolariza, debido a la salida de iones sodio desde el axoplasma hacia el líquido extracelular; sí durante ésta fase, el potencial de membrana alcanza el valor umbral, la entrada de sodio es masiva y muy rápida debido a la activación de todos los canales de sodio, cuando esto ocurre, se genera un potencial de acción. La fase de despolarización finaliza cuando se alcanza un potencial de membrana próximo al potencial de equilibrio para el sodio, éste se conoce como valor máximo de despolarización.
- c) Fase de repolarización: es la fase de vuelta al potencial de reposo de la membrana. Una vez que se ha alcanzado el valor máximo del potencial de membrana, los canales de sodio empiezan a inactivarse lentamente y comienzan a abrirse los canales de potasio, con la consecuente entrada de iones potasio a favor de su gradiente electroquímico, restableciéndose así el valor negativo de la membrana en reposo (-70 mV).
- d) Fase de hiperpolarización: al final de la fase de repolarización el potencial de membrana de la célula es más negativo que el potencial de membrana en reposo. Esto se produce debido a que los canales de potasio dependientes de voltaje tardan en cerrarse y los canales de sodio se recuperan lentamente de la inactivación. Durante este periodo el potencial de membrana vuelve lentamente a su valor de reposo.

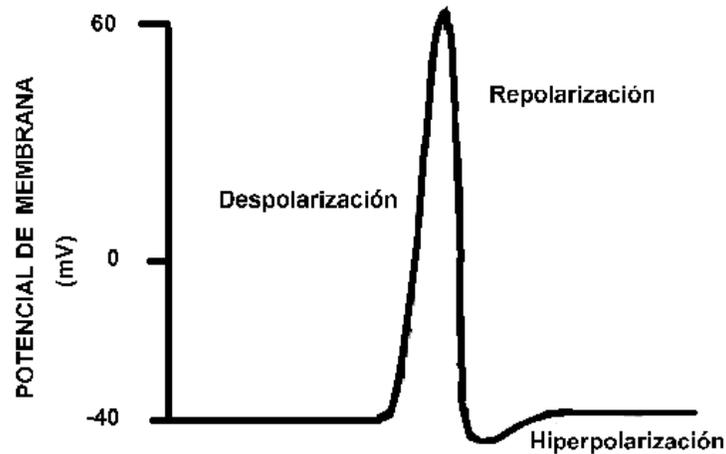


Figura 2.- Registro intracelular del potencial de acción de una fibra nerviosa, donde se muestran las diferentes fases de un impulso nervioso (Modificada de Junge, 1981).

CLASIFICACIÓN DE LAS FIBRAS NERVIOSAS

Estructuralmente un nervio periférico está constituido por un gran número de axones, cuya función es comunicar, mediante potenciales de acción, a los receptores sensoriales localizados en la piel, los músculos y las vísceras con la médula espinal. Las características morfológicas y fisiológicas de estos axones son muy variadas, por lo cual se han clasificado tomando en cuenta varios criterios, tales como la estructura periférica que inervan, sus características histológicas, la presencia o ausencia de una vaina de mielina y/o sus propiedades electrofisiológicas.

Tomando en cuenta la presencia o ausencia de mielina los axones se clasifican en mielínicos y amielínicos, una fibra nerviosa mielínica es aquella que está rodeada por una vaina de mielina, mientras que las amielínicas carecen de ésta.

Además, las fibras mielínicas o amielínicas son de diámetro diverso, por lo que dicho parámetro también se ha utilizado como criterio para clasificar a los axones nerviosos (Willis y Coggeshall, 1978; Keynes y Aidley, 1985; Kandel y cols., 1997). Las fibras nerviosas de mayor diámetro y por consiguiente las que conducen con mayor rapidez el potencial de acción, pertenecen al grupo A y las de menor diámetro y más lentas al grupo C. A continuación se presenta la nomenclatura para las fibras nerviosas sensitivas propuesta por Erlanger y Gasser (1937) y Bovie & Perl (1975):

Las fibras tipo A son mielinizadas, de grosor variable, pertenecen al sistema nervioso somático, realizan funciones sensitivas (aférentes) o motoras (eferentes) y sus

velocidades de conducción que van de los 6 a los 120 m/seg. Son el contingente de fibras más numeroso y tienen distintos subgrupos (ver tabla 2).

Las fibras tipo B son también mielinizadas, pero su vaina de mielina es fina. Estas fibras se encuentran solamente en los axones preganglionares del sistema nervioso autónomo.

Las fibras tipo C son amielinicas, pueden pertenecer al sistema nervioso autónomo o somático, tienen una velocidad de conducción que va de 0.5 a 5 m/seg y su diámetro es muy fino, por lo que tienen un umbral de activación alto.

Tabla2.- Clasificación de las fibras nerviosas (Modificada de Willis y Coggeshall, 1978; Segura, 2003)

FIBRA CUTÁNEA	MIELINA	DIÁMETRO	VEL. DE CONDUCCIÓN	FUNCION
A α	MIELINIZADA	13 -20 μ m	70–120 m/seg	Músculo
A β	MIELINIZADA	6 – 12 μ m	24-71 m/seg	Piel, receptores de pelo y musc.
A δ	MIELINIZADA	1 – 5 μ m	6-23 m/seg	Piel
C	NO MIELINIZADA	< 1 μ m	0.5-5 m/seg	Músculo, piel

PROPIEDADES ELECTROFISIOLÓGICAS DE LOS AXONES NERVIOSOS PERIFÉRICOS.

Los axones presentes en los nervios periféricos tienen la propiedad de generar y transmitir potenciales de acción por toda su longitud. Por ello, poseen diversas propiedades funcionales, algunas de las cuales se describen a continuación:

Umbral eléctrico de activación.- Es la cantidad de corriente eléctrica que hay que aplicar para provocar el potencial de acción en los axones más excitables, varía en relación inversa con el diámetro de los axones, de manera que las fibras de los grupos A α y A β tienen un umbral de activación considerablemente inferior (entre 10 y 20 veces menor) que el de las fibras C. Esta propiedad ha sido utilizada en diversos estudios experimentales para activar de manera selectiva a los distintos grupos de axones periféricos.

Velocidad de conducción.- Otra de las propiedades funcionales de las fibras nerviosas es la velocidad a la que conducen los potenciales de acción, la cual depende de: A) grosor del axón, debido a que las fibras nerviosas más gruesas presentan menor

resistencia al flujo longitudinal de corriente, por lo que la corriente iónica se desplaza más rápidamente a lo largo de una fibra gruesa que de una de diámetro pequeño. B) la presencia de vainas de mielina alrededor del axón permite incrementar la velocidad de conducción del impulso nervioso (Waxman, 1977; Rogart y Ritchie, 1977; Wilson y Kitchener, 1996). Las fibras nerviosas miélicas conducen el potencial de acción a mayor velocidad que las amielínicas debido a que la mielina actúa como un aislante eléctrico que impide la generación del potencial de acción en la membrana axonal que se encuentra debajo de la región internodal, siendo los nodos de Ranvier los únicos sitios en donde se pueden regenerar los impulsos nerviosos. De tal manera que el potencial de acción se transmite a lo largo de los axones “saltando” de un nodo de Ranvier a otro (Keynes y Aidley, 1985).

Período refractario.- La capacidad de los axones nerviosos para generar potenciales de acción a frecuencias relativamente altas depende en gran medida de la capacidad de los mismos para retornar a sus condiciones de membrana en reposo, después de ocurrido un potencial de acción. Durante el potencial de acción existen intervalos de tiempo en los que la membrana de la neurona no puede generar otro potencial de acción (Periodo Refractario Absoluto), o bien se requiere un estímulo de mayor intensidad para producirlo que el que disparó el primer potencial de acción (Periodo Refractario Relativo). Esto es debido a que una vez producido un potencial de acción, los canales de Na⁺ necesitan pasar desde el estado inactivo en que se encuentran (compuerta de inactivación cerrada) hasta el estado cerrado (compuerta de activación cerrada y de inactivación abierta) correspondiente a la situación de reposo. El periodo refractario absoluto se define como el tiempo necesario para que los canales pasen del estado inactivo al estado cerrado. Durante este tiempo la neurona no puede generar potenciales de acción, aún cuando la intensidad del estímulo sea muy alta.

Existe, sin embargo un intervalo de tiempo en el que solamente algunos canales de Na⁺ han vuelto a su estado cerrado. Estos canales son susceptibles de abrirse y podría generarse un segundo potencial de acción, siempre y cuando el estímulo fuera lo suficientemente intenso. El intervalo de tiempo en el que es posible generar un segundo potencial de acción con estímulos de mayor intensidad que la necesaria para generar el primer potencial de acción, se conoce como periodo refractario relativo. El periodo refractario relativo también está relacionado con el hecho de que algunos canales de K⁺ dependientes de voltaje aún no se han cerrado, lo cual contribuye a que el umbral para generar el potencial de acción se incremente.

MIELINA: FUNCIÓN Y ONTOGENIA

Como ya se ha mencionado, la velocidad con la que una fibra nerviosa conduce un potencial de acción depende de las características físicas del axón y de la presencia o ausencia de mielina en este último.

La mayoría de los axones son estructuras eléctricamente aisladas, esto se debe a que están rodeadas por vainas de mielina. En el Sistema Nervioso Periférico (SNP) las células gliales que forman la vaina de mielina son las células de Schwann. La vaina de mielina no es continua, un axón visto desde su exterior, tiene la forma de un rosario, con engrosamientos que corresponden a las células de Schwann y pequeñas zonas desnudas entre una y otra célula, los nodos de Ranvier. Funcionalmente los nodos de Ranvier constituyen la base de la conducción saltatoria. Ya que aquí se localizan los canales de sodio y de potasio que participan en la generación y transmisión del potencial de acción (Guyton y Hall, 2001).

La zona de unión entre dos células de Schwann adyacentes carece de mielina y se denomina nodo de Ranvier, mientras que la región rodeada de mielina se llama internodo (Fig. 3).

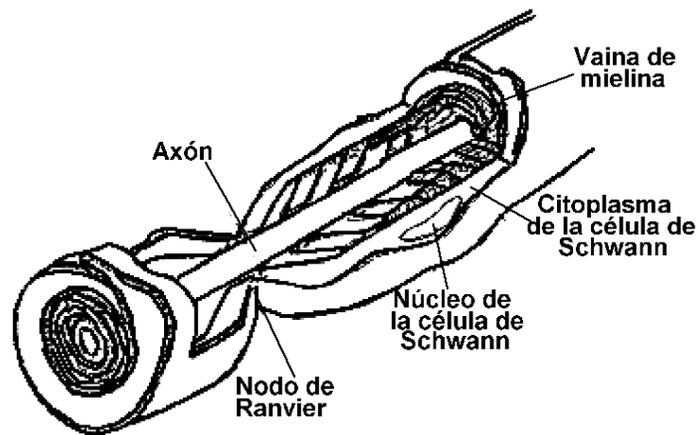


Figura 3.- Esquema de un axón mielinizado en corte longitudinal. Puede apreciarse un segmento no mielinizado o nodo de Ranvier y la disposición de la célula de Schwann al enrollarse para formar las lamelas que integran a la vaina de mielina (tomada de Guyton y Hall, 2001).

El aumento en la velocidad de conducción de los axones depende de las características intrínsecas de la vaina de mielina, por ejemplo, se ha reportado que mientras mayor sea el grado de compactación de las lamelas de mielina es mayor la

velocidad a la que se conduce el impulso nervioso (Gutierrez y cols, 1995), y existe una dependencia directa entre la velocidad de conducción del potencial de acción y la longitud del internodo (Bowe y cols, 1994; Ritchie, 1995).

La distancia internodal y el grosor de la vaina de mielina no son aleatorios, sino que se relacionan directamente con el grosor del axón, cuanto más grueso es el axón mas gruesa será la vaina de mielina y mayor la distancia internodal (Gal, 2001).

Al nacimiento, los axones de los nervios de los mamíferos altriciales (como la rata), carecen de mielina y durante las primeras semanas de vida postnatal ésta se deposita y se compacta.

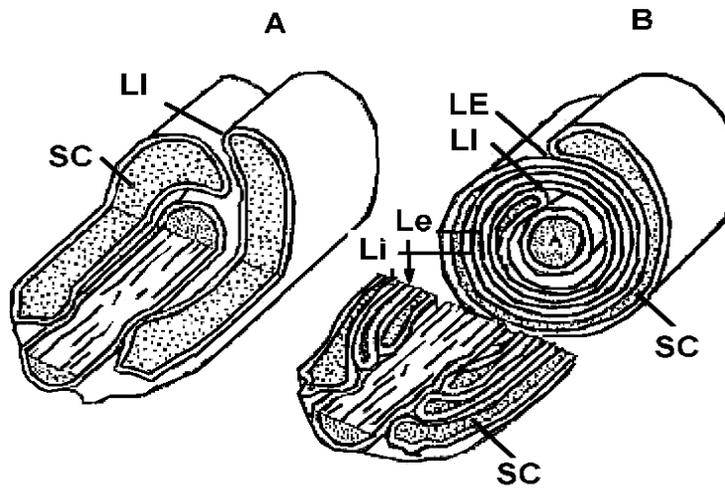


Figura 4.- Esquematación del proceso de mielinización en los axones de nervios periféricos. A, célula de Schwann que comienza a envolver el axón. B, el mismo axón tiempo después con las láminas de mielina formadas por la membrana de la célula de Schwann y con restos de su citoplasma. Las letras indican: (SC) citoplasma de la célula de Schwann, (A) axón, (LI) lengüeta interna, (LE) lengüeta externa, (Li) lamina interna y (Le) lamina externa. (Tomado de Jacobson, 1993).

Durante este proceso las células de Schwann se alinean a lo largo de los nervios periféricos, dejando intervalos que darán lugar a los nodos de Ranvier. A continuación la membrana externa de la célula rodea al axón y forma una estructura de doble membrana, la cual se alarga y forma una espiral alrededor del axón, constituyendo las capas concéntricas típicas de las fibras mielinizadas. Durante este proceso de recubrimiento, el citoplasma de la célula de Schwann es comprimido y desplazado (Fig.4). Las prolongaciones de la célula de Schwann se condensan para formar laminillas que son características de la vaina de mielina madura (Kandel y cols, 1997).

ANTECEDENTES

En la actualidad existen numerosos trabajos que estudian las alteraciones provocadas por la desnutrición en el desarrollo del Sistema Nervioso Central (SNC); (Morgane y cols. 1978, 1993), pero es escasa la información en cuanto a los efectos de ésta sobre el desarrollo postnatal del Sistema Nervioso Periférico (SNP).

En estudios realizados en el SNC, Morgane y cols. (1993); reportaron que los efectos de la desnutrición dependen de la etapa del desarrollo en la que ésta se presente, siendo los organismos jóvenes quienes mas daño sufren, así mismo Krigman y Hogan (1976), reportan que la desnutrición postnatal retrasa la mielinización del SNC de la rata, suponen que ello es debido a que es en la etapa postnatal temprana cuando ocurre la formación rápida de mielina.

Por otra parte, Wiggins y cols. (1976) reportan que una nutrición deficiente en cantidad durante la vida postnatal temprana provoca un retardo en el desarrollo de la mielinización y también una reducción en el diámetro de las fibras nerviosas mielinizadas en el SNC; esto coincide con lo reportado por Cummins y cols, (1979) y Krigman y Hogan, (1976), quienes suponen que la desnutrición podría alterar la capacidad de las células para formar las lámelas de mielina alrededor de los axones. Además Delaney y cols. (1981) encontraron que en el sistema piramidal y en el nervio tibial de animales desnutridos, existe un mayor número de fibras de diámetro pequeño que en los nervios de animales control, lo cual podría estar relacionado (Wiggins, y cols. 1976; Krigman y Hogan, 1976; y Cummins y cols, 1979) con el retardo observado en la formación de la vaina de mielina.

En cuanto a las alteraciones provocadas por la desnutrición sobre el SNP, Sima (1974 a, b) reporta una reducción en el diámetro de los axones mielinizados presentes en el nervio ciático, así como en las raíces dorsales y ventrales de la medula espinal, también reporta que en ratas sometidas a desnutrición perinatal, se presenta un retardo en el depósito de mielina en las raíces dorsales y ventrales, y encuentra que una vez sometidos a realimentación, la recuperación del diámetro axonal es casi completa en la raíz ventral, en tanto que las alteraciones producidas en las fibras nerviosas de la raíz dorsal son irreversibles.

Desde el punto de vista funcional, Quirk y colaboradores. (1995) reportan que la velocidad de conducción y la excitación del tracto corticoespinal disminuye drásticamente en ratas adultas desnutridas y realimentadas al destete; estos autores concluyen que

esto podría deberse a un retardo en la mielinización y/o reducción en la proporción de fibras A del tracto corticoespinal de los animales desnutridos.

Por otra parte, se ha demostrado que una disminución en el grosor de la vaina de mielina, produce fallas en la transmisión del potencial de acción o bien, la transmisión intermitente del mismo (Mayer y Denny-Brown, 1964; McDonald, 1963; McDonald y Sears, 1970). Tanto la transmisión intermitente como las fallas en la propagación del potencial de acción podrían asociarse a cambios estructurales drásticos en el nodo de Ranvier (Bowe y cols, 1994, Dyck y cols., 1993).

Además, en un trabajo previo, se mostró (Segura y cols., 2001) que las deficiencias alimentarias perinatales provocan una reducción significativa en la amplitud y el área del potencial de acción compuesto (PAC), registrado en el nervio sural de la rata en desarrollo. Tales resultados podrían ser explicados de varias maneras, la más simple sería que en el nervio sural de animales sometidos a desnutrición perinatal se redujo considerablemente el número, el diámetro y posiblemente el grosor de la vaina de mielina en los axones que lo constituyen. Esta posibilidad fue estudiada en el trabajo antes mencionado mediante el análisis de las características histológicas del nervio sural de ratas controles y desnutridas de 30 días de edad. Los resultados obtenidos en este estudio mostraron que los nervios procedentes de animales desnutridos contenían el mismo número de axones y que éstos eran de diámetros semejantes a los de las ratas control; sin embargo el grosor de la vaina de mielina se redujo significativamente en los axones de animales desnutridos.

En función de lo anterior, se sugirió que los cambios registrados en la propagación del potencial de acción compuesto (PAC) del nervio sural de ratas desnutridas, podrían ser provocados por alteraciones severas en el desarrollo postnatal de la vaina de mielina. Sin embargo, las diferencias reportadas (Segura y cols. 2001) entre las características funcionales y morfológicas de los nervios sensitivos de ratas desnutridas podrían ser debidas, al menos parcialmente, a que los nervios utilizados en ambos tipos de análisis procedían de animales distintos. Por lo cual en el presente estudio, se realizó un análisis electrofisiológico e histológico en el mismo nervio sural de animales control y desnutridos, con el objeto de caracterizar con mayor precisión las alteraciones morfológicas y electrofisiológicas provocadas por la alimentación deficiente en los nervios sensitivos de la rata en desarrollo.

OBJETIVO GENERAL

Determinar si las alteraciones funcionales, provocadas por la desnutrición sobre el potencial de acción compuesto (PAC) de nervios sensitivos de ratas desnutridas perinatalmente, están relacionadas con cambios morfológicos axonales y/o de la vaina de mielina presentes en el nervio sural de la rata de 30 y 90 días de edad postnatal.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Analizar las propiedades funcionales del potencial de acción compuesto en el nervio sural de animales control y desnutridos de 30 y 90 días de edad.
- Establecer si la desnutrición perinatal provoca transmisión intermitente o fallas en la propagación del PAC, mediante el coeficiente de variación de la respuesta electrofisiológica del nervio sural a un estímulo eléctrico de intensidad supramáxima.
- Cuantificar el número, el diámetro y el grosor de la vaina de mielina de los axones presentes en el nervio sural de ratas control y desnutridas de 30 y 90 días de edad.
- Determinar si existe correlación entre las características histológicas de los axones y la respuesta electrofisiológica del nervio sural de ratas control y desnutridas.

METODOLOGÍA

MÉTODOS DE DESNUTRICIÓN

Se utilizaron crías de ratas de la cepa Wistar, sometidas a deficiencias alimentarias durante el período perinatal. Para ello un lote de ratas hembras en edad reproductiva fue dividido al azar en dos grupos:

- a) Grupo de animales control. Este grupo de ratas hembras gestantes tuvo libre acceso al agua y alimento (Formulab 5008, LabDiet) durante toda la fase experimental;
- b) Grupo de animales desnutridos. Este grupo de ratas fue alimentado con el 50% de la cantidad de alimento que, en promedio ingirieron las ratas hembras control, desde dos semanas antes del apareamiento con el macho y durante los períodos de gestación y lactancia (Chow y Lee, 1964; Bedi, 1994). Las crías de este lote fueron alimentadas con el mismo régimen alimenticio después del destete (día 21 postnatal).

El día del nacimiento se ajustó a ocho el número de crías por camada y desde entonces, periódicamente se determinó el peso corporal de cada una de las crías hasta el día en que se realizó el experimento agudo (registro del PAC en el nervio sural y fijación con solución Karnovsky de una porción de éstos).

OBTENCIÓN DEL TEJIDO PARA EL ESTUDIO ELECTROFISIOLÓGICO Y PARA EL ANÁLISIS

HISTOLÓGICO

En esta serie de experimentos se utilizó el nervio sural, debido a que esta conformado predominantemente por fibras aferentes de origen cutáneo (provenientes de mecano-receptores localizados en la piel de la parte anterior de la pata del animal; sin embargo, vease Harrison, 1975; Liguori y Trojaborg, 1990; Nakanishi y Forbes, 1970), es fácil de acceder por disección y presenta una longitud relativamente grande, aún en animales muy jóvenes.

Los registros se efectuaron en nervios de ratas macho de 30 y 90 días de edad post-natal de los lotes control y experimental (n = 6 por edad y por tratamiento).

En las edades antes señaladas, se anestesiaron las ratas con hidrato de cloral (400 mg / Kg. de peso), administrado por vía intraperitoneal. Cada rata fue sujeta, en

posición ventral, a una plancha de madera y corcho mediante alfileres insertados en las patas posteriores, y se efectuó una incisión en la región dorsal de cada extremidad con el objeto de localizar y aislar el nervio sural (Fig. 5), una vez localizado éste se extrajo cuidadosamente y fue dividido transversalmente en dos segmentos; uno de ellos con longitud de 2 ó 3 mm, fue utilizado para realizar el análisis histológico, mientras que el otro segmento, de mayor longitud, se utilizó para efectuar el registro electrofisiológico del PAC.

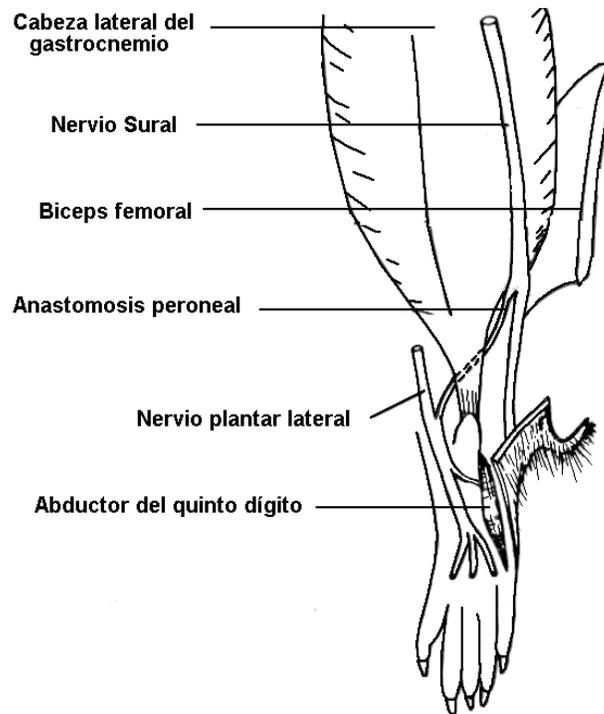


Figura 5.- Localización del nervio sural en la extremidad posterior derecha de la ratona. Se señalan además los músculos y nervios que lo circundan. (Peyronnard y Charron, 1982).

REGISTRO DEL POTENCIAL DE ACCIÓN COMPUESTO (PAC)

La sección de mayor longitud del nervio sural fue colocada en una cámara de registro con solución Krebs (NaCl 128, KCl 3, NaH_2PO_4 0.5, CaCl_2 1.5, MgSO_4 1, NaHCO_3 21, Glucosa 30 mM; Baker) a temperatura ambiente ($18-22^\circ\text{C}$). Uno de los extremos del nervio fue introducido en una micro pipeta de succión para estimulación, la cual estaba conectada a un generador de pulsos (Digitimer tipo 3290), con el que se aplicaron pulsos de corriente de amplitud y duración controlados. La magnitud de la corriente eléctrica aplicada, se determinó a partir de la caída de voltaje registrada a través

de una resistencia eléctrica (1000Ω), colocada en la vía de regreso a tierra del estímulo (ver Fig. 6). La respuesta eléctrica del nervio estimulado, el Potencial de Acción Compuesto (PAC), se registró mediante otra micro pipeta de succión (Stys y cols., 1991), conectada a un amplificador de alta ganancia (Grass modelo p711) y éste a su vez a un osciloscopio Textronix, (modelo D13) y a un sistema de video grabación Sony (Fig. 6).

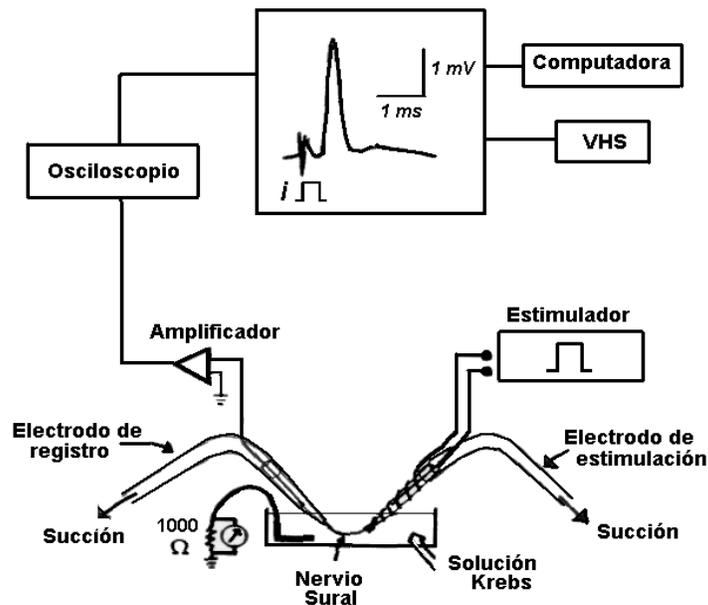


Figura 6.- Registro del potencial de acción compuesto por medio de micropipetas de succión, para la estimulación y el registro.

Los registros obtenidos se almacenaron en cintas de video, para su posterior análisis (cálculo del área individual y promedio), para lo que se utilizó un programa de computadora construido en ambiente LabView, elaborado ex profeso para ello en el laboratorio por el M. en C. Enrique Velázquez y el M. en C. Porfirio Reyes.

Para provocar el potencial de acción compuesto las fibras aferentes mielinicas del grupo A de los nervios sural de los animales control y desnutridos, fueron estimuladas con pulsos únicos de 0.05 ms de duración y de intensidad dos a tres veces la necesaria para activar las fibras nerviosas más excitables ($2-3 \times U$). Se determinaron la amplitud y área del componente A del PAC registrado, ya que es aceptado que el área del potencial de acción compuesto es un índice del número de axones activados por el estímulo (Patton, 1965).

Con el objeto de establecer si la desnutrición modifica la excitabilidad de los axones mielinicos del nervio sural de la rata en desarrollo, se determinó el umbral de activación de los axones más excitables, para ello se midió la intensidad de la corriente

eléctrica necesaria para activarlos. Posteriormente se incrementó gradualmente la intensidad del estímulo para activar la mayor cantidad de fibras nerviosas. En cada una de las intensidades empleadas se midió la amplitud (A), y la latencia al pico (Lp) y se calculó el área del componente A del PAC mediante el programa antes mencionado.

Puesto que la velocidad de conducción del PAC, depende en gran medida de la presencia y de las características de la vaina de mielina, se calculó la velocidad de conducción promedio del componente A del PAC registrado en el nervio sural de los grupos experimentales y control; para ello se utilizó la fórmula $V = d / t$, donde V es la velocidad de conducción del PAC generado por un pulso de corriente de intensidad $2xU$; d es la longitud del nervio sural aislado, y t representa la latencia al pico del PAC.

Por otra parte se ha establecido que una reducción en el grosor de la vaina de mielina puede llevar a un decremento en la velocidad de conducción, fallas en la conducción del potencial de acción, a una conducción intermitente y/o al bloqueo total del potencial de acción (Waxman y Kocsis, 1995). La posibilidad anterior fue analizada en el presente estudio mediante la determinación de la variabilidad del área del PAC, generado de evento a evento, en los nervios de animales controles y desnutridos, esto mediante la aplicación de 64 estímulos sucesivos con pulsos de intensidad supra-máxima (1 Hz, 2.5 – 3.0 xU). Posteriormente se calcularon el promedio, la desviación estándar y el coeficiente de variación de las series de eventos registrados en los nervios de ratas control y desnutridas de 30 y 90 días de edad postnatal.

TÉCNICA HISTOLÓGICA

Las secciones de menor longitud del nervio sural, fueron fijadas con solución Karnovsky, y postfijadas con tetraóxido de osmio. Se colocó la sección del nervio en el fijador durante dos horas (Solución Karnovsky: constituida por paraformaldehído, 1%; glutaraldehído, 2.5% y cacodilato de sodio 0.2M, pH 7.5; Karnovsky, 1965), fueron lavados con una solución amortiguadora de cacodilato de sodio (pH 7.4 – 7.6) y postfijadas con tetraóxido de osmio (1%). Posteriormente se deshidrató con alcohol a concentraciones crecientes (desde 70 hasta 100%).

Después de deshidratar la muestra se infiltró con un medio de inclusión no polimerizado (EPON 812). Este tipo de resina dura permite que se obtengan las rebanadas finas que se requieren para ser analizadas en el microscopio electrónico.

Las muestras fueron cortadas en secciones finas de 1 o 2 micrómetros (μm) de espesor. En este caso los cortes se hicieron con ultra microtomo, usando cuchillas finas, o cuchillas de diamante. Los cortes se hicieron flotar en agua y se colocaron en una pequeña rejilla de cobre cubierta con una película de carbono o plástico, que permite el paso de los electrones al hacer la observación del corte al microscopio electrónico.

Los cortes fueron teñidos con azul de toluidina (diluida en una solución 0.5 % en borato de sodio al 4 %).

Un corte de cada nervio fue seleccionado y fotografiado. La fotografía fue ampliada para efectuar la cuantificación del número de axones, el área y el grosor de la vaina de mielina de los mismos. El área de los axones fue medida con un planímetro, mientras que el grosor de la vaina de mielina fue medida mediante un vernier.

Los datos obtenidos en ambas series de observaciones fueron sometidos a la prueba estadística de análisis de varianza vía simple (ANOVA), para determinar las posibles diferencias entre grupos control y experimentales (Zar,1974).

RESULTADOS

1) EFECTO DE LA DESNUTRICIÓN SOBRE EL PESO CORPORAL

Tanto las ratas control como las desnutridas presentaron un incremento en su peso corporal entre los 30 y los 90 días de edad postnatal (figura R1, tabla R1). Sin embargo, el peso corporal de las ratas sometidas a desnutrición perinatal fue significativamente menor (ANOVA, $p < 0.001$) que el de los animales control (71 y 74% para 30 y 90 días, respectivamente).

Tabla R1.- Promedio del peso corporal (en gramos) de los grupos control y los sometidos a desnutrición perinatal.

30 DÍAS		90 DÍAS	
C	D	C	D
128.10±12.70	37.5±4.60	504.60±25.10	130.5±0.57

Estos resultados concuerdan notablemente con los reportados en diversos estudios, en los que se han empleado diferentes técnicas de desnutrición (Chow y Lee, 1964; Sima, 1974 a, b; Krigman y Hogan, 1976; Delaney y cols, 1981; Wiggins, 1982; Quirk y cols, 1995).

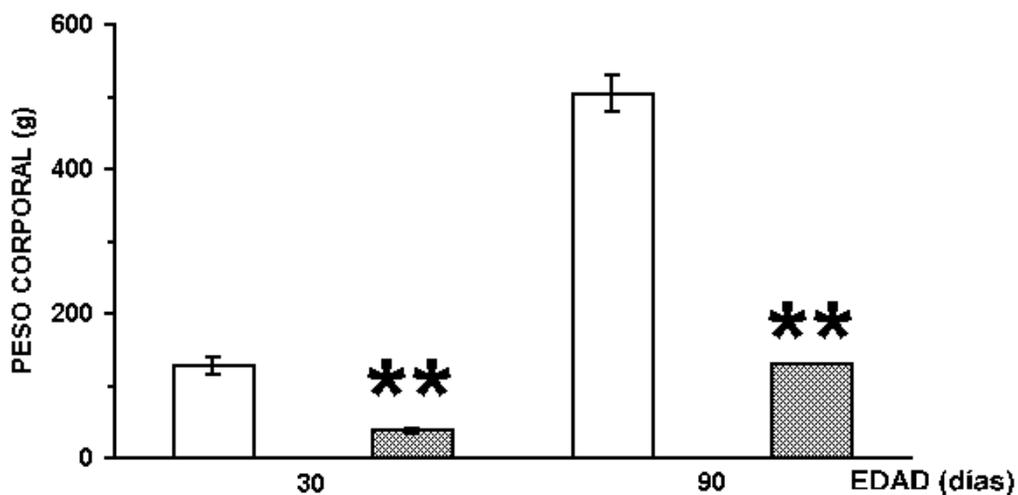


Figura R1.- Peso corporal de las ratas control (barras vacías) y desnutridas (barras sombreadas). Las líneas verticales representan la desviación estándar. Los asteriscos (**) indican diferencias significativas entre el grupo control y el desnutrido (ANOVA, $p < 0.001$) Cada grupo consta de 6 animales ($n=6$).

2) REGISTROS ELECTROFISIOLÓGICOS EN EL NERVIOS SURAL

EFFECTO DE LA DESNUTRICIÓN SOBRE LA AMPLITUD Y EL ÁREA DEL POTENCIAL DE ACCIÓN COMPUESTO (PAC)

La aplicación de pulsos de corriente en un extremo del nervio sural genera un potencial de acción compuesto, el cual fue registrado en el extremo opuesto de dicho nervio. Las respuestas electrofisiológicas del nervio (por ejemplo: el umbral de activación) dependen en gran medida del número de axones que generen potenciales de acción, así como de las propiedades electrofisiológicas de las fibras excitadas. La figura R2, muestra las respuestas correspondientes a los animales control y desnutridos de (A) 30 y (B) 90 días de edad postnatal. Éstas fueron generadas por estímulos simples independientes, con una intensidad de entre 2 y 3 veces umbral ($2-3 \times U$), por lo cual solamente fueron activadas las fibras del grupo A presentes en los nervios estudiados.

La respuesta máxima, generada por la activación de los axones mielinizados, fue obtenida utilizando una secuencia de pulsos de voltaje de intensidad creciente. Con esto se logró la excitación gradual de los axones, hasta obtener la respuesta de amplitud y área máximas. Este protocolo fue utilizado para obtener el PAC de máxima amplitud y área, en cada uno de los nervios registrados.

El PAC registrado en nervios de animales desnutridos de 30 y 90 días postnatales presentó una disminución tanto en amplitud como en área (figura R2, R3 y tabla R2).

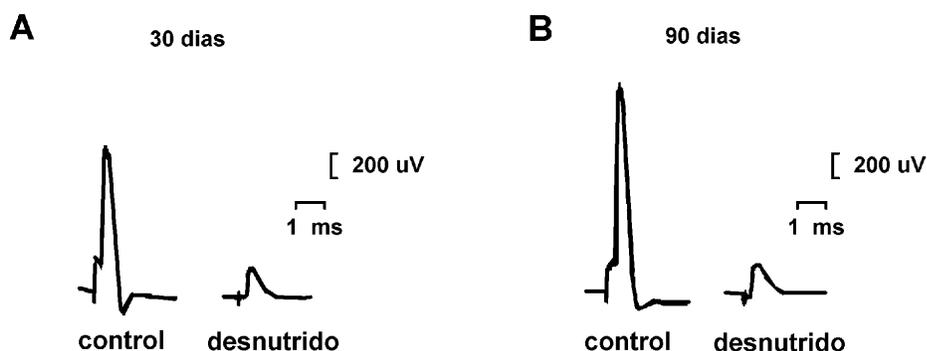


Figura R2.- Efectos provocados por la desnutrición sobre la amplitud y el área máximas, del nervio sural de ratas de 30 (A) y 90 (B) días de edad postnatal.

Es probable que la reducción de la amplitud y área del PAC pueda ser provocada por una disminución en el número de axones activados por un estímulo de intensidad supramáxima en los nervios de los animales desnutridos. Así mismo, tal reducción en el número de axones excitados podría ser una consecuencia de muerte axonal, de un bloqueo en la transmisión del impulso nervioso, o bien de una reducción en el diámetro de los axones o en el grosor de la vaina de mielina. Ahora bien, la alteración del diámetro del axón o del grosor de la vaina de mielina provocaría que los nervios de animales desnutridos presentasen un incremento en el umbral de activación de las fibras mielinizadas.

Tabla R2.- Áreas del PAC obtenidas de los registros de los nervios surales de 30 y 90 días de edad, de los grupos control y desnutridos (mV.ms).

30 DÍAS		90 DÍAS	
C	D	C	D
1162.7± 177.7	409.7± 109.3	1438.0± 196.3	590.1± 84.3

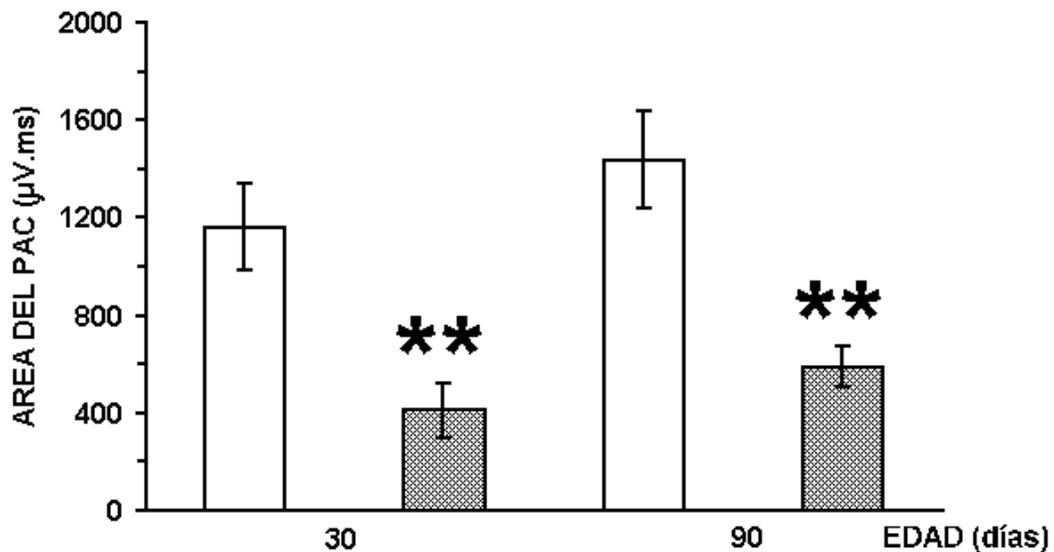


Figura R3.- Área del PAC en el lote control (barras vacías) comparado con los desnutridos (barras sombreadas). Las líneas verticales representan la desviación estándar. Los asteriscos (**) indican diferencias significativas entre el grupo control y el desnutridos (n =6, p<0.001).

UMBRAL DE ACTIVACIÓN ELÉCTRICA

Se puede explicar la posible reducción en amplitud y área del PAC del nervio sural de las ratas desnutridas, debido a que, podría suponerse que las fibras aferentes sufrieron una reducción en su excitabilidad, lo que a su vez provocaría un incremento en el umbral de activación de los axones presentes en ese nervio. Para analizar esta posibilidad, se midió la cantidad de corriente necesaria para activar las fibras más excitables del nervio sural de los animales control y experimentales.

En la tabla R3 se muestra la cantidad de corriente, que en promedio, es necesario aplicar para activar las fibras más excitables del nervio sural, tanto para los grupos control, como para los experimentales.

Tabla R3.- Umbral (\bar{I} A) de activación de los axones más excitables del nervio sural de animales de los grupos control y experimentales.

30 DÍAS		90 DÍAS	
C	D	C	D
75.5±19.1	100.0±70.7	112.5±70.8	117.5±20.6

Como puede observarse, el umbral de activación para los nervios de ratas desnutridas, fue relativamente mayor que el de los animales control para ambas edades estudiadas; sin embargo, las diferencias encontradas no fueron estadísticamente significativas (figura R4).

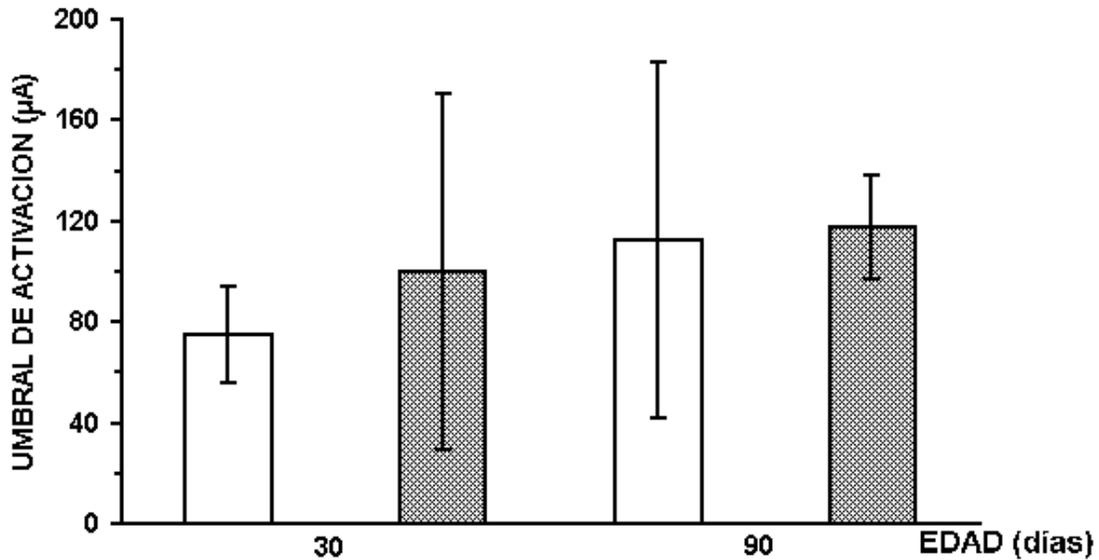


Figura R4.- Intensidades de estimulación utilizadas para provocar el PAC del nervio sural de ratas control (barras vacías; n = 6) y desnutridas (barras sombreadas; n = 6). Las líneas verticales representan la desviación estándar. Nótese que no hay diferencias significativas en el umbral de activación de las fibras más excitables, en los nervios de animales control y desnutridos.

Este resultado muestra que la desnutrición no reduce significativamente la excitabilidad de los axones más gruesos y con mielina, presentes en el nervio sural de la rata de 30 y 90 días de edad. Ahora bien, si se considera que existe una relación lineal inversa entre el diámetro de los axones y umbral eléctrico de activación (Patton, 1965; Rogart y Ritchie, 1977), es posible suponer que la disminución de la amplitud y el área del PAC registrado en los nervios de animales desnutridos no está asociada con una reducción en el diámetro de las fibras del grupo A.

PERIODO REFRACTARIO ABSOLUTO

En el presente estudio, el período refractario absoluto se determinó aplicando dos estímulos, cuya separación temporal cada vez fue menor, esto se hizo con el objeto de analizar el efecto de la desnutrición sobre la capacidad de las fibras nerviosas para generar potenciales de acción ante estímulos sucesivos.

Como se observa en la tabla R4 y en la figura R5, el período refractario absoluto de los nervios control y desnutridos no difiere significativamente entre los grupos control y

desnutrido de 30 y 90 días de edad postnatal. Esto sugiere que la desnutrición perinatal no influye de manera drástica en el proceso de recuperación de la excitabilidad de las fibras aferentes, después de la generación de un potencial de acción.

Tabla R4.- Periodo refractario absoluto del PAC registrado en el nervio sural de ratas control y desnutridas (ms).

30 DÍAS		90 DÍAS	
C	D	C	D
1.62±0.05	1.65±0.13	1.85±0.03	1.62±0.08

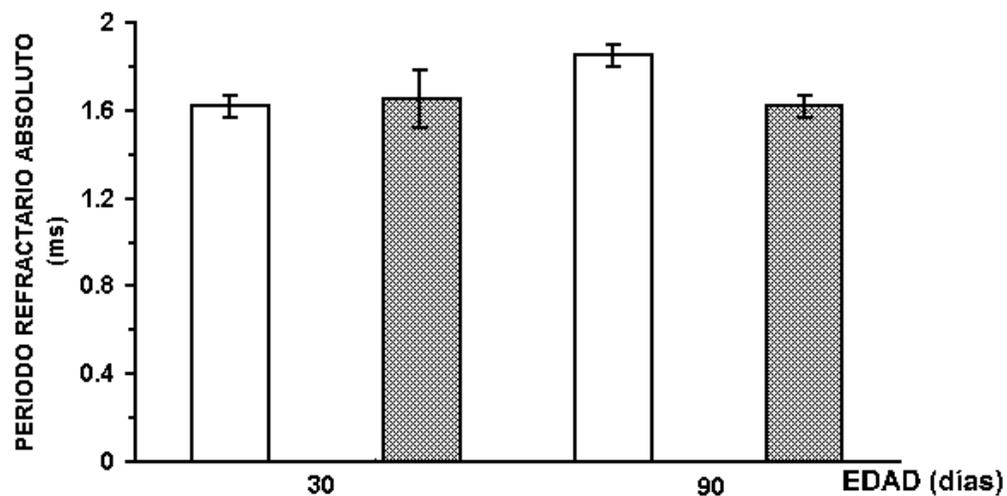


Figura R5.- Promedios del periodo refractario absoluto del nervio sural de ratas control (barras vacías) y desnutridas (barras sombreadas). Las líneas verticales representan la desviación estándar.

VELOCIDAD DE CONDUCCIÓN

En estudios realizados por otros investigadores (Sima y Jankowska, 1976; Oldfors y Ullman, 1980); se ha reportado que la desnutrición produce una reducción significativa en la velocidad de conducción del impulso nervioso registrado en el nervio ciático de la rata, lo cual fue asociado a una mielinización deficiente (Wiggins, 1982). Para evaluar esta posibilidad se determinó la velocidad de conducción de las fibras aferentes que generan el componente A del PAC en nervios de ratas controles y desnutridas, con las dos edades estudiadas.

En la tabla R5 y Fig. R6 se muestra que la velocidad de conducción del impulso nervioso es mayor en los animales de 90 días que en los de 30 días de edad postnatal, tanto en los grupos control como en los experimentales. No obstante, estos mismos resultados nos muestran que no existen diferencias significativas en la velocidad de conducción registrada en los grupos control y desnutridos de 30 y 90 días postnatales.

Tabla R5.- Velocidad de conducción de las fibras del nervio sural (m/s).

30 DÍAS		90 DÍAS	
C	D	C	D
17.5 ± 3.2	13.7 ± 2.5	32.3 ± 3.9	30.5 ± 7.7

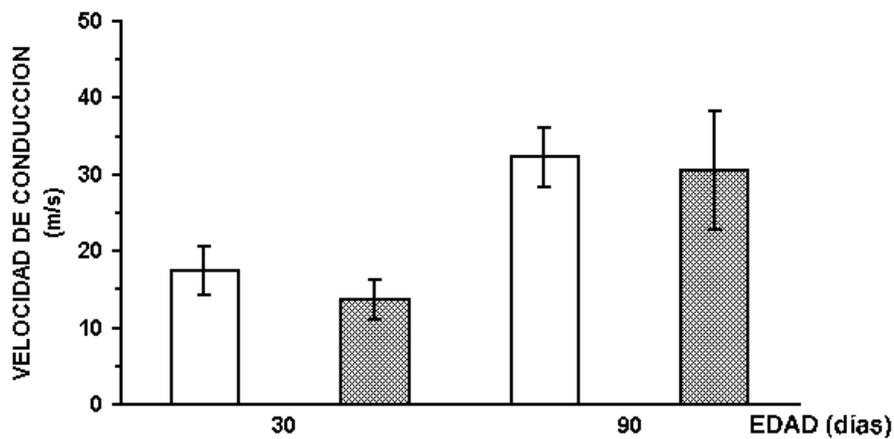


Figura R6.- Velocidad de conducción promedio de las fibras de tipo A, en el nervio sural de ratas control (barras vacías) y desnutridas (barras sombreada). Las líneas verticales indican la desviación estándar (ANOVA; $p < 0.01$, $n = 6$).

Sin embargo, la disminución relativa en la velocidad de conducción media del PAC, en los nervios sural de crías desnutridas de 30 y 90 días postnatales, podría indicar la presencia de un retardo en el proceso de mielinización, y que esto posiblemente altere la conducción del impulso nervioso (figura R6).

VARIABILIDAD

Está bien establecido que una reducción en el grosor de la vaina de mielina puede resultar en la disminución de la velocidad de conducción, fallas en la transmisión del evento electrofisiológico, una conducción intermitente y/o el bloqueo total del potencial de acción (Waxman y Kocsis, 1995). Si la desnutrición perinatal causa una conducción intermitente del potencial de acción o bien provoca fallas en la transmisión de éste, cabría esperar que en la población de axones de animales desnutridos, se incrementen las fluctuaciones en la amplitud y el área del PAC. Esta posibilidad fue analizada en el presente estudio, midiendo la variación en el área del PAC durante una serie de 64 estímulos aplicados sucesivamente (con frecuencia de 1 Hz; 2-3 X U; n= 64 estímulos) en el nervio sural de ratas control y desnutridas.

En la figura R7 (A-D) se ilustra la variabilidad registrada en el área del PAC y del ruido eléctrico basal en 64 eventos consecutivos, registrados en el nervio sural de una rata control y una desnutrida. En la parte inferior de cada una de las gráficas se han representado las fluctuaciones del PAC provocado en el nervio sural de ratas control y desnutridas de 30 (A y B) y 90 (C y D) días de edad postnatal; las líneas continuas, trazadas en el centro de las nubes de puntos indican el área promedio y la desviación estándar, del PAC, para cada edad y tratamiento. Como puede observarse, los nervios de animales desnutridos presentaron mayor variabilidad en sus respuestas.

Sin embargo, se podría argumentar que las fluctuaciones encontradas en el área del PAC podrían estar enmascaradas por la variabilidad del ruido eléctrico basal introducido a través del sistema de registro (ver Redman, 1990). Por tal motivo, en el presente trabajo se comparó la variabilidad en el área del PAC con la del ruido eléctrico basal, encontrándose en todos los casos que la variabilidad de la respuesta electrofisiológica fue significativamente mayor que variación en el ruido eléctrico basal (ver tabla R6; prueba de $F_{PAC/ruido\ basal}$; $p < 0.05$). Además el PAC registrado en los nervios de animales desnutridos mostró mayores fluctuaciones en el área que aquellos procedentes de ratas control (figura R7 A-D gráficas inferiores y tabla R6).

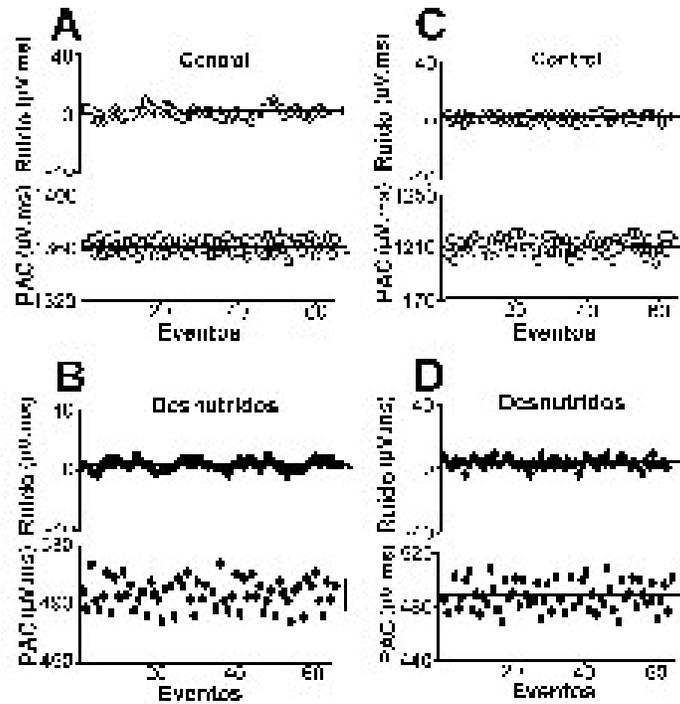


Figura R7.- A-D. Fluctuaciones en el área del potencial de acción compuesto y el ruido de la base eléctrica registrados en el nervio sural de animales control y desnutridos de 30 (A y B) y de 90 (C y D) días de edad. Las respuestas del PAC fueron obtenidas aplicando al nervio estímulos sucesivos de intensidad supra-máxima ($n=64$ eventos; 1 Hz; $2.5 - 3.0 \times U$). El área del PAC y el ruido de la base eléctrica fueron determinados mediante un programa de computadora designado especialmente para ello. Se usó un par de cursores uno determinó el área del PAC y el segundo se ubicó 5 ms después del artefacto del estímulo para determinar el ruido de la base eléctrica. Las barras verticales indican la desviación estándar.

Las observaciones aquí descritas, se repitieron en otros cinco nervios de cada edad y de cada paradigma alimentario (ver tabla R6). Así mismo se utilizó una prueba de F para comparar la desviación estándar de las respuestas electrofisiológicas (PAC) de los animales control y desnutridos, encontrándose que la desviación estándar del PAC registrado en el nervio sural de animales desnutridos es significativamente mayor que la del mismo nervio de ratas control (tabla R6).

Tabla R6.- Área del PAC y Ruido (\pm Desv. Est.), medido individualmente en el nervio sural de animales control y desnutridos a los 30 y 90 días de edad postnatal.

Control				Desnutrido			
Rata	área del PAC (\bar{x} V.ms)	área del ruido (\bar{x} V.ms)	$F_{PAC/Ruido}$	Rata	área del PAC (\bar{x} V.ms)	área del ruido (\bar{x} V.ms)	$F_{PAC/Ruido}$
<i>Edad</i>		<i>30 días</i>					
C1	1360.0 \pm 8.1	2.93 \pm 4.1	1.98 **	U1	243.0 \pm 11.0	3.56 \pm 2.9	3.80 **
C2	1054.9 \pm 7.6	5.42 \pm 3.7	2.03 **	U2	357.0 \pm 19.8	6.13 \pm 5.1	3.87 **
C3	1214.0 \pm 7.8	4.63 \pm 3.6	2.19 **	U3	492.0 \pm 19.5	5.90 \pm 5.3	3.65 **
C4	873.6 \pm 5.2	2.92 \pm 2.3	2.25 **	U4	558.6 \pm 12.2	4.28 \pm 2.1	5.85 **
C5	1308.3 \pm 6.7	2.64 \pm 2.3	2.09 **	U5	415.1 \pm 15.5	6.84 \pm 3.8	3.67 **
C6	1165.9 \pm 5.9	3.17 \pm 3.1	2.13 **	U6	392.6 \pm 17.2	6.44 \pm 4.7	4.06 **
<i>Edad</i>		<i>90 días</i>					
C7	1210.0 \pm 8.4	3.14 \pm 2.8	2.98 **	U7	517.8 \pm 21.4	6.34 \pm 4.2	5.08 **
C8	1664.9 \pm 8.8	3.06 \pm 3.0	2.91 **	U8	652.8 \pm 18.2	4.55 \pm 4.4	4.16 **
C9	1341.0 \pm 9.7	4.73 \pm 3.7	2.59 **	U9	490.0 \pm 17.2	4.27 \pm 4.0	4.25 **
C10	1656.2 \pm 13	5.30 \pm 5.7	2.22 **	U10	714.0 \pm 20.4	5.45 \pm 4.9	4.12 **
C11	1266.3 \pm 9.2	5.11 \pm 4.6	2.86 **	U11	561.4 \pm 23.7	4.96 \pm 4.3	5.33 **
C12	1489.8 \pm 10.8	4.98 \pm 4.9	2.76 **	U12	605.0 \pm 26.9	5.64 \pm 5.1	4.28 **

Los asteriscos indican diferencias significativas entre los valores obtenidos de los animales control y desnutridos. Prueba de F (Valores $F_{PAC/Ruido}$), $p < 0.05$ [11].

3) HISTOLOGÍA

Las observaciones obtenidas en los registros electrofisiológicos podrían explicarse si se consideran alteraciones en la morfología de las fibras que componen el nervio sural de las ratas desnutridas. Por lo anterior, se realizaron observaciones histológicas de los axones, en las que se determinó el diámetro del nervio, el número y el diámetro de los axones, así como el grosor de la vaina de mielina, en los mismos nervios en que se realizaron los registros electrofisiológicos, antes descritos. Para ello cada nervio sural, de animales control y desnutridos de 30 y 90 días postnatales, fue dividido en dos segmentos, uno para la evaluación electrofisiológica y el otro para el análisis histológico (ver sección de métodos).

DIÁMETRO DEL NERVI

El diámetro del nervio fue medido para determinar los posibles efectos de la desnutrición sobre las características morfológicas del sistema nervioso periférico, en este caso sobre el nervio sural.

En la figura R8 (A y B) se puede apreciar que las secciones transversales de los nervios desnutridos de 30 y 90 días de edad postnatal tienen un diámetro significativamente menor (ANOVA; $p < 0.01$) que los nervios control de las mismas edades (ver tabla R7 y figura R8 C). Tomando en cuenta este resultado, podría suponerse que los nervios procedentes de animales desnutridos contarían con un menor número de axones que los nervios control, o bien que los axones presentes en los nervios de animales desnutridos tuvieran un diámetro menor y/o una vaina de mielina de menor grosor que aquellos que constituyen los nervios de los animales control.

Tabla R7.- Diámetro promedio (n =6 por tratamiento y por edad) del nervio sural de los grupos experimental y control.

30 DÍAS		90 DIAS	
C	D	C	D
258.5± 47.4	73.3± 5.6	291.0± 25.7	231.4± 42.0

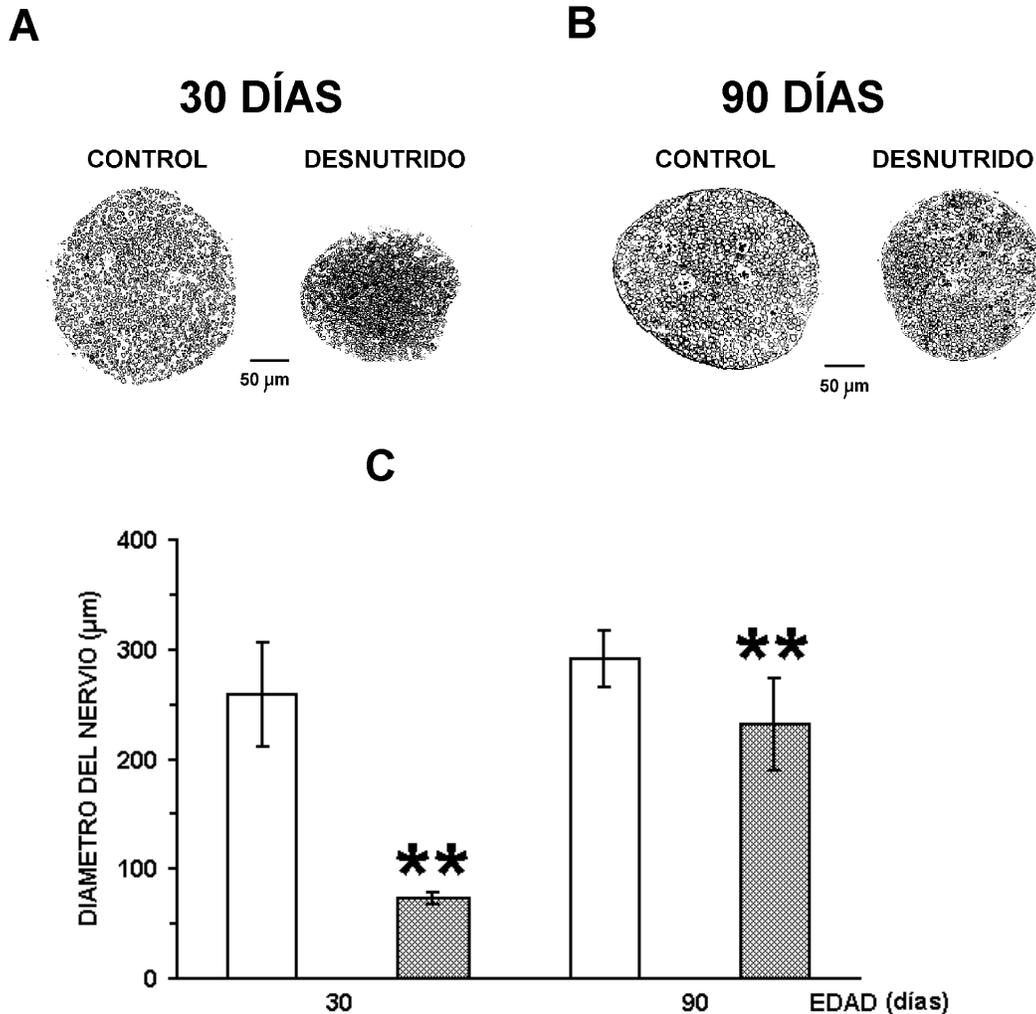


Figura R8.- Efectos provocados por la desnutrición sobre la morfología de un nervio sural de ratas de 30 y 90 días de edad (A y B respectivamente). C diámetro promedio del nervio sural de ratas control (barras vacías) y desnutridos (barras sombreadas). Las líneas verticales representan la desviación estándar; los asteriscos (**) indican diferencias significativas entre el grupo control y el desnutrido (ANOVA; $p < 0.01$; $n = 6$ por edad y por tratamiento).

NÚMERO DE AXONES

Para establecer si la desnutrición reduce la cantidad de axones contenidos en el nervio sural, se determinó el número de éstos en animales control y desnutrido de las dos edades estudiadas ($n = 6$, por edad y por tratamiento).

La tabla R8 y a figura R9 muestran que el número de axones contenidos en el nervio sural de animales control y desnutridos es semejante tanto a los 30 como a los 90 días de edad postnatal. Esto significa que la disminución en la amplitud y el área del PAC registrada en el nervio sural de las ratas desnutridas de 30 y 90 días postnatales, podría

ser provocada por la alteración de otros parámetros morfológicos, tales como el diámetro de los axones o el grosor de la vaina de mielina que los rodea.

Tabla R8.- Promedio del número de axones presentes en el nervio sural de ratas control y desnutridas de dos diferentes edades (n = 6).

30 DÍAS		90 DÍAS	
C	D	C	D
1103.2±68.6	1230.2±167.9	932.5±125.6	1023.0±119.1

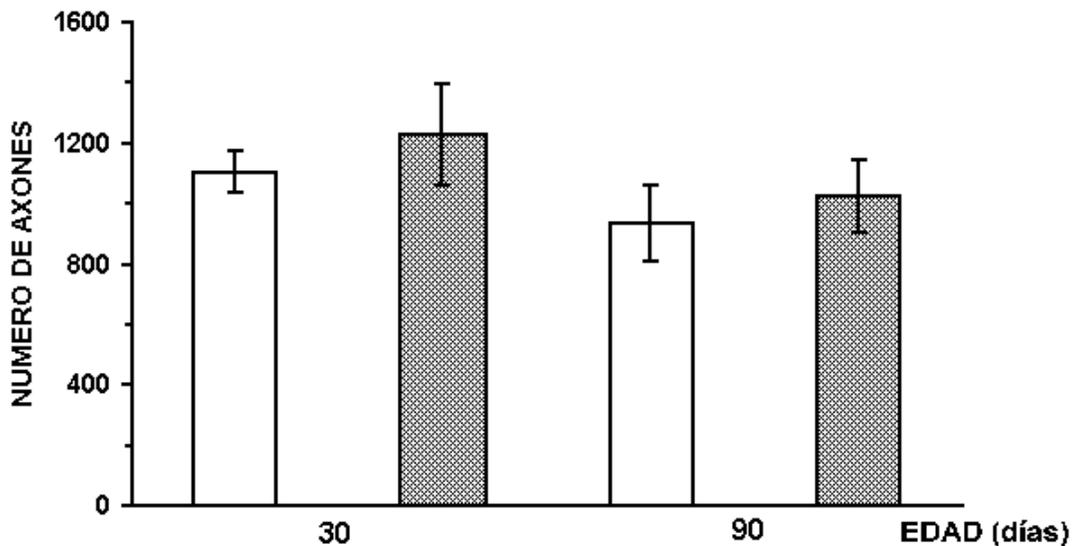


Figura R9.- Promedio del número de axones presentes en el nervio sural de animales control (barras vacías) y desnutridos (barras sombreadas). Las líneas verticales representan la desviación estándar (n = 6).

DIÁMETRO DEL AXÓN

En la tabla R9 y la figura R10 se muestra que a los 30 días de edad, los axones presentes en el nervio sural de ratas control y desnutridas presentan un diámetro semejante, mientras que a los 90 días postnatales, el diámetro de los axones que constituyen el nervio sural de los animales desnutridos fue significativamente menor que el de las fibras nerviosas contenidas en el mismo nervio pero de animales control (ANOVA; $p < 0.01$; $n = 6$).

Tabla R9.- Diámetro de las fibras nerviosas (en μm) presentes en el nervio sural de los organismos control y desnutridos de dos diferentes edades postnatales.

30 DÍAS		90 DÍAS	
C	D	C	D
2.05±0.20	2.30±0.05	3.35±0.39	2.30±0.52

Estos resultados podrían explicar, la gran disminución en el área del PAC observada en los animales desnutridos de 90 días postnatales, pero no la registrada en los animales de 30 días de edad. No obstante ellos nos permiten suponer que además de la reducción en su diámetro, los axones constituyentes de los nervios desnutridos podrían sufrir alteraciones en otros parámetros morfológicos, entre ellos el grosor de la vaina de mielina.

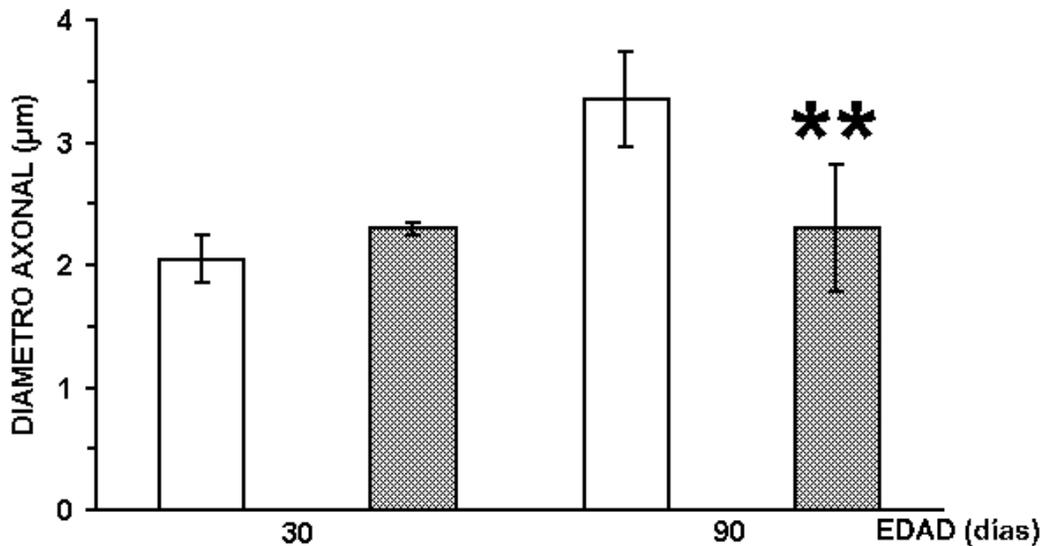


Figura R10.- Diámetro del axón de los grupos control (barras vacías) y desnutridos (barras sombreadas) de las dos edades estudiadas. Las líneas verticales representan la desviación estándar. Los asteriscos (**) indican diferencias significativas entre el grupo control y desnutridos ($n = 6$, $p < 0.01$).

GROSOR DE LA VAINA DE MIELINA

En la tabla R10 se muestra que el grosor de la vaina de mielina en los axones de los nervios control fue mayor que el de los organismos desnutridos tanto a los 30 como a los 90 días de edad postnatal (ver figura R11).

Tabla R10.- Grosor de la vaina de mielina (μm), que rodea a las fibras nerviosas presentes en el nervio sural de los organismos control y desnutridos (promedio de 6 animales).

30 DÍAS		90 DÍAS	
C	D	C	D
0.58 ± 0.01	0.48 ± 0.01	6.70 ± 1.44	5.35 ± 1.15

Esta disminución en el grosor de la vaina de mielina podría provocar la transmisión intermitente del potencial de acción, o bien fallas en la transmisión del mismo (Mayer y Denny-Brown, 1964; McDonald, 1963; McDonald y Sears, 1970). Ahora bien, tanto la transmisión intermitente como la presencia de fallas en la transmisión del potencial de acción en los axones que conforman el nervio sural, podrían provocar la disminución de la amplitud y el área del PAC, ya que un mismo axón podría responder o no (de manera aleatoria), al ser estimulado con una serie de pulsos de intensidad supramáxima. Lo anterior significa que en la población de axones que constituyen el nervio sural siempre existirían algunos que no responden a la estimulación eléctrica y esto causaría, por una parte la disminución en la amplitud y el área del PAC y por otra un incremento en la variabilidad de la respuesta electrofisiológica, ya que a cada uno de los estímulos respondería una población diferente de axones, tal y como se ha descrito en la sección de registros electrofisiológicos de este estudio y como se ha descrito en la sección de registros electrofisiológicos de este estudio.

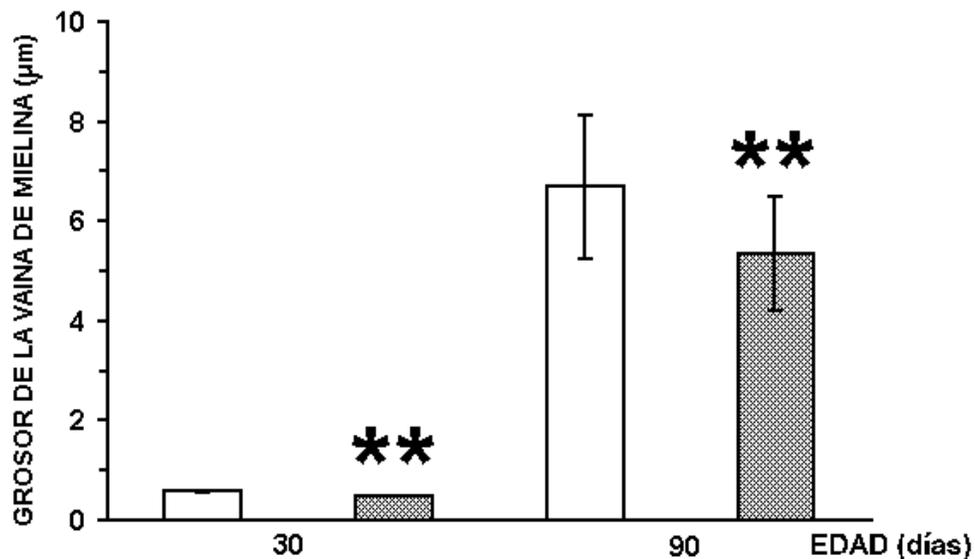


Figura R11.- Grosor de la vaina de mielina. Grupo control (barras vacías), Desnutridas (barras sombreada). Las líneas verticales representan la desviación estándar. Los asteriscos (**) indican diferencias significativas entre los grupos control y desnutrido (ANOVA; $p < 0.001$; $n=6$).

DISCUSIÓN

Es comúnmente aceptado que el área del PAC es proporcional al número de axones activados por un pulso de estimulación (Patton, 1965) por lo que se podría suponer que la disminución observada en el área del PAC provocado en el nervio sural de ratas desnutridas de 30 y 60 días de edad, estuviese asociado a una reducción en el número de fibras aferentes capaces de generar y/o propagar potenciales de acción en dicho nervio periférico. De acuerdo a lo anterior, nuestros resultados indicarían que una gran proporción de los axones que constituyen el nervio sural de animales desnutridos pierden su habilidad para generar y/o propagar potenciales de acción; no obstante, una pequeña proporción de éstos conserva la habilidad de generar y transmitir el potencial de acción a pesar de la privación neonatal de alimento. La presencia de axones que exhiben propiedades electrofisiológicas casi normales podría explicar la ausencia de diferencias estadísticamente significativas entre los nervios control y los desnutridos para muchos de los parámetros fisiológicos analizados, entre ellos el umbral de activación de las fibras más excitables, el período refractario absoluto y la velocidad de conducción. Esto último contrasta con las observaciones de Sima y Jankowska (1976), quienes observaron una disminución significativa en la velocidad de conducción del PAC provocado en el nervio ciático de ratas adultas que fueron desnutridas durante el período perinatal. En este caso cabría señalar que el nervio ciático es un nervio mixto, esto es, se encuentra conformado por axones tanto sensitivos como motores y que posiblemente los efectos de la desnutrición perinatal sean distintos en las vías aferentes y eferentes, ya que las alteraciones morfológicas causadas por una alimentación deficiente son más conspicuas en los nervios sensitivos que en los motores Sima (1974 a).

Por otra parte, nuestros datos muestran que el cambio morfológico más conspicuo observado en los nervios de animales desnutridos fue la reducción significativa en el grosor de la vaina de mielina que rodea al axón. Esto mismo ha sido observado en numerosos estudios, en los que la restricción de alimento pre- y post-natal causó una notable disminución en el grosor de la vaina y en el número de las lamelas de mielina que rodean a los axones del nervio ciático (Delaney y cols., 1981; Hedley - White y Meuser, 1971). Por otra parte, Bowe y cols. (1994) y Ritchie (1995) señalan que la reducción, aunque moderada, en el grosor de la vaina de mielina induce cambios marcados en la estructura y morfología de los nodos de Ranvier. Por otra parte, Dyck y colaboradores (1993) reportan que la ausencia de dos o más nodos de Ranvier puede provocar un

bloqueo en la conducción del potencial de acción en los nervios periféricos. También se ha demostrado que varias enfermedades desmielinizantes provocan serias anormalidades en la conducción de los axones presentes tanto en el sistema nervioso central como en el periférico, entre estas destacan la disminución en la velocidad de conducción, la ocurrencia de fallas frecuentes y la dispersión temporal de los potenciales de acción (para revisión ver Waxman y Kocsis (1995).

En este estudio nosotros mostramos un incremento en las fluctuaciones del área del PAC provocado en nervios sensitivos de ratas desnutridas de 30 y 90 días postnatales y en base a los hallazgos señalados en el párrafo anterior, esto podría indicar la existencia de fallas en la transmisión (y/o la conducción intermitente) del potencial de acción en los axones de los animales desnutridos. De acuerdo a esto último, podría suponerse que la considerable reducción del área así como el incremento en la variabilidad del PAC registrado en el nervio sural de animales desnutridos, se debe principalmente al bloqueo total de la conducción y/o a la propagación intermitente de los potenciales de acción en un número elevado de axones del nervio sural y que tales anormalidades posiblemente están asociadas con una inadecuada formación o compactación de la vaina de mielina y/o con la reducción en el diámetro de los axones presentes en el nervio periférico de ratas de 90 días de edad.

En resumen, nuestros datos sugieren que la desnutrición perinatal severa, provoca alteraciones de consideración en la generación y propagación de los potenciales de acción (bloqueo y/o propagación intermitente) en los axones sensitivos periféricos y que tales efectos podrían disminuir la información de transmisión sensorial desde los receptores periféricos hasta la médula espinal de la rata en desarrollo.

BIBLIOGRAFÍA

- Bedi, K. S. (1994). Undernutrition of rats during early life does not affect the total number of cortical neurons. **J. Comp. Neurol.** **342**: 596 – 602.
- Bovie, J. & Perl, E. R. (1975) Neural substrates of somatic sensation. En: Hunt, C. C. (Ed.). **MTP International Review of Science, Physiology Series One**. Vol.3: Neurophysiology. p.p. 303 – 411
- Bowe, C. C., Johanson, C. S. Hildebrand, C. y Evans, N. H. (1994) Functional properties and nodal spacing of myelinated fibers in developing rat mental and sural nerves. **Dev. Brain Res.** **79**: 186 – 194.
- Chow, B. F. and Lee, C. J. (1964). Effect of dietary restriction of pregnant rats of body weight. Gain of the offspring. **J. Nutr.** **82**: 10 – 18.
- Cummins, K. L., Perkel D. H. & Dorfman L. (1979). Nerve fiber conduction velocity distributions. I. Estimation based on the single – fiber and compound action potentials. **Electroencephalography and clinical Neurophysiology.** **46**: 634 – 646.
- Delaney, A. J., Samorajsky, T., Fuller, C. N. And Wiggins, R. C. (1981). A morphometric comparison of central and peripheral hypomyelination induced by postnatal undernourishment of rats. **J. Nutr.** **111**: 746 – 754.
- Dyck, P. J., Giannini, C. y Lais, A. (1993) Pathologic alteration of nerves. En: Dyck, P. J., Thomas, P. K., Griffin, J. W., Low, P. A. & Poduslo, J. F. (Eds.) **Peripheral Neuropathy**. W. B Saunders, Philadelphia, E. U. A. p.p. 514 – 595.
- Erlanger, J. & Gasser, H. S. (1937) Citado en: Willis, W. D. y Cogeshall, R. E. (1978) **Sensory mechanisms of the spinal cord**, (New York: Plenum Press), p.p. 9 – 128.
- Gal, I. B. (2001) **Bases de la Fisiología**. Ed. Tebar. p.p. 35 – 54.
- Goldspink, G. & Ward, D. (1979). Changes in Rodent Muscle Fibre Types During Postnatal Growth, Undernutrition and exercise. **J. Physiol.** **296**: 453 – 469.
- Gutierrez, R., Boison, D., Heineman, O. & Stoffel, W. (1995) Decompaction of central nervous system myelin leads to a reduction of the velocity of action potential in optic nerve. **Neurosc. Letters** **195**: 93 – 96.
- Guyton, C., Hall, E. (2001) **Tratado de Fisiología Medica**. Mc Graw Hill. 10a Ed.
- Harrison, L. M. (1975) Fiber diameter spectrum of the motor fibers of rat sural nerve. **Exp. Neurol.** **47**: 364 – 366.
- Hedley – Whyte, E. T. And Meuse,r C. S. (1971). The effect of undernutrition of myelination of rat sciatic nerve. **Laboratory Investigation.** **24 (2)**: 156 – 161.

- Howart, R. E. (1972). Influence of dietary protein on rat skeletal muscle Growth. **J. Nutr.** **102**: 37 – 39.
- Jacobson, M. (1993) **Developmental neurobiology**. Plenum Press. New York and London. p.p. 163 – 215.
- Junge, D. (1981) **Nerve and Muscle excitation**. Second edition. Sinauer Associates. U.S.A.
- Kandel, E. R., Schwartz, J. H. & Jessell, T. M. (1997) **Principle of neural science**. Appleton and Lang. Norwalk, Connecticut. p.p. 349 – 351.
- Karnovsky, M. J. (1965). A formaldehyde – glutaraldehyde fixative of high osmolarity for use in electron microscopy. **J. Cell. Biol.** **27**: 137 A – 138 A.
- Keynes, A. M. & Aidley, D. J. (1985) **Nerve and Muscle**. Cambridge Univ. Press. Cambridge p.p. 1 – 10.
- Krigman, M. B. & Hogan, E. L. (1976). Undernutrition in the developing rat. Effect upon myelination. **Brain Research.** **107**: 239 – 255.
- Liguuri, R. y Trojaborg, W. (1990) Are there motor fibers in the sural nerve?. **Muscle and Nerve** **13**: 12 – 15.
- Lopes, J., Russell, D. M., Whitwell, B. S. & Jeejeebhoy, K. N. (1982). Skeletal muscle Function in malnutrition. **Amer. J. Clin. Nut.** **36**: 602 – 610.
- Mayer, R. F. & Denny-Brown, D. (1964) Conduction velocity in peripheral nerve during experimental demyelination in the cat. **Neurology** **14**: 714 – 726. En: Waxman, S. G., Kocsis, J. D. Y Stys, P. K. (Eds.), **The Axon: Structure, Function and Pathophysiology** (New York, London: Oxford University Press), p.p. 328 – 340.
- McDonald, W. I. (1963) The effects of experimental demyelination on conduction in peripheral nerve: A histological study. Electrophysiological observations. **Brain** **86**: 501 – 524. En: Waxman, S. G., Kocsis, J. D. Y Stys, P. K. (Eds.), **The Axon: Structure, Function and Pathophysiology** (New York, London: Oxford University Press), p.p. 328 – 340.
- McDonald, W. I. & Sears, T. A. 1970. The effects of experimental demyelination on conduction in the central nervous system. **Brain** **93**: 583 – 598. En: Waxman, S. G., Kocsis, J. D. Y Stys, P. K. (Eds.), **The Axon: Structure, Function and Pathophysiology** (New York, London: Oxford University Press), p.p. 328 – 340.
- Morgane, P. J., Austin-LaFrance, R. J., Bronzino, J., Tonkiss, J., Díaz-Cintra, S., Cintra, L., Kemper, T. & Galler, J. R. (1993). Prenatal malnutrition and the development of the brain. **Neurosc. And Biobehav.** **17**: 91 – 128.

- Morgane, P. J., Miller, M., Kemper, T., Stein, W., Forbes, W., Hall, R., Bronzino, J., Kissane, J., Hawrylewicz, E. & Resnick, O. (1978). The effects of protein malnutrition on the developing central nervous system in the rat. **Neurosc. And Biobehav. Rev. 2:** 137 – 230.
- Nakanishi, T. y Forbes, N. (1970) Motor fibers in rat sural nerve. **Exp. Neurol. 26:** 433 – 435.
- Oldfors, A. & Ullman, M. (1980) Motor nerve conduction velocity and nerve fiber diameter in experimental protein deprivation. **Acta Neuropathol. 51:** 215 – 221.
- Patton, T. C. (1965). Special properties of nerve trunks and tracts. In: Rutch, T. C., Patton, H. D. Woodbury, J & Towe, A. (Eds), **Physiology and biophysics**. Philadelphia, London: W. B. Saunders Company, p.p. 73 – 95.
- Peyronnard, J. & Charron, L.(1982) Motor and sensory neurons of the rat sural nerve: a horseradish peroxidase study. **Muscle & Nerve. 5:** 654 – 660.
- Quirk, G. J., Mejia, W. R., Hesse, H. & Su, H. (1995). Early malnutrition followed by nutritional restoration lowers the conduction velocity and excitability of the corticospinal tract. **Brain research. 670:** 272 – 289.
- Redman, S. J. (1990) Quantal analysis of synaptic potentials in neurons of the central nervous system, **Physiol. Rev. 70:** 165 – 198.
- Ritchie, J. M. (1995) Physiology of axons. in: Waxman, S. G., Kocsis, J. D. Y Stys, P. K. (Eds.), **The Axon: Structure, Function and Pathophysiology** (New York, London: Oxford University Press), p.p. 328 – 340.
- Rogart, R. B. & Ritchie, J. M. (1977) Physiological basis of conduction in myelinated nerve fibers. In Morell, P. (Ed.) : **Myelin** (New York, London: Plenum Press), p.p. 117 – 159.
- Russell, D., Walker, P., Leiter, L., Sima, A., Tanner, W., Mickle, D., Whitwell, J., Marliss, E., & Jeejeebhoy, K. N. (1984 a). Metabolic and structural changes in skeletal muscle during hipocaloring dieting. **Am. Clin. Nutr. 39:** 503 – 513.
- Russell, D., Atwood, H., Whittaker, S., Itakura, I. Walker, M., Mickle, D. & Jeejeebhoy, K.N., (1984 b). The effect of fasting and hypocaloric diets on the functional and metabolic characteristics of rat gastrocnemius muscle. **Clin, Science. 67:** 185-194.
- Segura, B. (2003). Efectos de la desnutrición y malnutrición sobre la actividad contráctil del músculo esquelético y el potencial de acción compuesto de nervios cutáneos en la rata en desarrollo. **Tesis de Doctorado. Instituto de Neurobiología.** 126 p.p.

- Segura, B., Guadarrama, J. C., Gutierrez, A. L., Merchant, H., Cintra, L., Jiménez, I. (2001) Effect of perinatal food deficiencies on the compound action potential evoked in sensory nerves of developing rats. **Nutr. Neurosc.** **4**: 475 – 488.
- Sima, A. (1974 a). Studies on fiber size in developing sciatic nerve and spinal roots in normal undernourished and rehabilitated rats. **Acta Physiologica Scandinavica, Supplementum.** **406**: 5 – 55.
- Sima, A. (1974 b). Relation between the number of myelin lamellae and axon circumference in fibers of ventral and dorsal roots and optic nerve in normal, undernourished and rehabilitated rats. **Acta Physiologica Scandinavica, Supplementum.** **410**: 1 – 38.
- Sima, A. y Jankowska, E. (1976) Sensory nerve conduction velocity as correlated to fibre size in experimental undernutrition in the rat. **Neuropathol. And Applied Neurobiol.** **1**: 31 – 37-
- Stys, P. K., Ranson, B. R. y Waxman, S. G. (1991). Compound action potential of nerve recorded by suction electrode: a theoretical and experimental analysis. **Brain Res.** **546**: 18-32.
- Waterlow, J. C. y Stephen, J. M. L. (1969). Enzymes and assesment of protein nutrition. **Proc. Nutr. Soc.** **28**: 234-240.
- Waxman, S. G. (1977) Conduction in myelinated, Unmyelinated, and demyelinated fibers. **Arch. Neurol.** **34**: 585 – 589.
- Waxman, S. G., Kocsis, J. D., Black (1995) Pathophysiology of demyelinated axons, in Waxman, S. G., Kocsis, J. D., y Stys, P. K. (Eds.), **The Axon: Structure, Function and Pathophysiology**. Oxford University Press, New York, p.p. 438 – 461.
- Wiggins, R. (1982) Myelin development and nutritional insufficiency. **Brain Res. Rev.** **4**: 151 – 175.
- Wiggins, R. C., Miller, S. L.; Benjamins, J; Krigman, M; y Morrell, P. (1976). Myelin syntesis during postnatal nutritional deprivation and subsequent rehabilitation. **Brain Research,** **107**: 257 – 273.
- Willis, W. D. Y Cogesshall, R. E. (1978). **Sensory mechanisms of the spinal cord**, (New York: Plenum press), p.p.: 9 – 128.
- Wilson, P. y Kitchener, P. D. (1996) Plasticity of cutaneous primary afferent projections to the spinal dorsal horn. **Prog. Neurobiol.** **48**: 105 – 129.
- Zar, J. H. (1974). **Biostatistical Analysis**, Prentice Hall, Englewood Cliffs, New Jersey. p.p. 121 – 124.

- Zigmond M., Bloom F., Landis S., Roberts James & Squire L. (1999) **Fundamental Neuroscience**. Academic Press. San Diego. Capítulo 5



ELSEVIER

Neuroscience Letters 354 (2004) 181–184

Neuroscience
Letters

www.elsevier.com/locate/neulet

Conduction failure of action potentials in sensory sural nerves of undernourished rats

B. Segura^a, J.C. Guadarrama^b, G. Pratz^a, V. Mercado^a, H. Merchant^c, L. Cintra^d, I. Jiménez^{b,*}

^aFacultad de Estudios Superiores 'Iztacala', Mexico City, Mexico

^bDepartamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias, Centro de Investigación y Estudios Avanzados del IPN, Av. Instituto Politécnico Nacional 2508, Col. San Pedro Zacatenco, A.P. 14-740, Mexico D.F. 07000, Mexico

^cInstituto de Investigaciones Biomedicas, Mexico D.F., Mexico

^dInstituto de Neurobiología, Campus Juriquilla, UNAM, Queretaro, Mexico

Received 9 July 2003; received in revised form 2 October 2003; accepted 6 October 2003

Abstract

In order to determine possible functional and morphometrical alterations produced by perinatal undernourishment on peripheral nerves, sensory sural nerves from control and undernourished rats of 30 and 90 postnatal days of age were dissected and divided in two segments, one for recording the compound action potential (CAP) and the other for histological examination. Nerves from undernourished animals showed maximal CAP responses of smaller amplitude and area, larger trial-to-trial variability in area, and a significant reduction in axonal myelin sheath thickness than nerves from control animals. It is suggested that perinatal undernourishment produces changes in axonal myelin sheath structure, resulting in severe alterations in the generation and propagation of action potentials (block and/or intermittent conduction) in sensory afferent fibers in the rat.

© 2003 Published by Elsevier Ireland Ltd.

Keywords: Undernutrition; Compound action potential; Nerve transmission failure; Myelin deficit; Axon diameter

We have shown previously [8] that perinatal food deficiencies result in a considerable reduction in amplitude and area of the compound action potential (CAP) evoked in the sensory sural nerves of developing rats. This observation was explained in several ways, the simplest being that perinatal undernourishment induces a marked decrement in the number, diameter and/or myelin sheath thickness of axons of the sural nerve. This possibility was analyzed in the same study by determining the histological characteristics of the sural nerve of control and undernourished animals at postnatal day 30. It was found that both the number and diameter of axons of nerves from undernourished animals were similar to those measured in controls but that the myelin sheath thickness was significantly reduced. It was suggested that perinatal undernourishment induces severe alterations in the propagation of action potentials of sensory axons by altering the postnatal development of the myelin sheath. It can be argued, however, that the reported differences between functional and morphological characteristics of nerves from undernourished animals were

partially due to differences between nerves used for electrophysiological or morphometrical analysis. In this study we made a combined electrophysiological and histological analysis of the sural nerve in control and undernourished animals in order to have a more detailed characterization of the functional and morphological alterations produced by perinatal undernourishment on peripheral sensory nerves.

Similar perinatal feeding paradigms to those used in the previous study from our laboratory [9] to induce undernourishment in the developing rat were followed. In short, two groups of female Wistar rats were subjected to different feeding conditions. (a) Control: One group of female rats and their offspring had free access to food throughout the whole experimental period (Lab diet, Formulab 5008). (b) Undernourished: Rats fed with half of the food intake of control animals from 3 to 4 weeks before mating and during pregnancy and lactation periods [8]. The corresponding offspring were also undernourished after the weaning period (postnatal day 21). All experiments were carried out in accordance with the National Institutes of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (NIH Publication No. 8023, revised 1978).

From postnatal days 30 to 90, undernourished rats

* Corresponding author. Tel: +52-55-747-7000x5163; fax: +52-55-747-7106.

E-mail address: ijimenez@fisio.cinvestav.mx (I. Jiménez).

showed sparser fur hair, increased grooming and locomotor behavior and considerably lower weight than control animals (see Table 1).

On postnatal days 30 and 90 (P30 and P90), male rats from control and experimental litters were anesthetized with chloral hydrate (400 mg/kg) and the sural nerve of the right hind limb was carefully dissected out and divided into two segments. One segment (2–3 mm long) was prepared for histological examination and the other for recording the CAP. The same histological, electrophysiological and data analysis procedures used in our previous study [8] were then followed.

In order to determine the histological characteristics of axons in control and undernourished sural nerves, one selected nerve section was photographed and amplified and the nerve diameter, axon diameter and myelin sheath thickness were measured by means of a calibrated vernier at five different locations around the circumference of each individual axon. The values obtained were adjusted according to the factor used to amplified the nerve section, and averaged values were determined for the population of axons of the sural nerves of control and undernourished animals (Table 1).

Fig. 1A and C show transversal sections of sural nerves from control and undernourished animals, and their respective CAP responses evoked by single electrical pulses of graded intensity (0.05 ms duration, 1 Hz and 2.5 times the stimulus strength needed to evoke the lowest CAP response, or $2.5 \times T$). Compared with nerves from controls, it can be seen that nerves from the undernourished animals showed a notable decrement in diameter (67.7 and 58.8%, respectively) and maximal CAP area (36.1 and 40.5%; Fig. 1A,C), while the number of axons for the two groups was approximately the same at both P30 and P90 (Table 1). Similar observations were obtained in a further five nerves per age and feeding paradigm (Table 1).

No significant differences were found in electrical threshold, absolute refractory period or conduction velocity of CAP responses between nerves from the control and

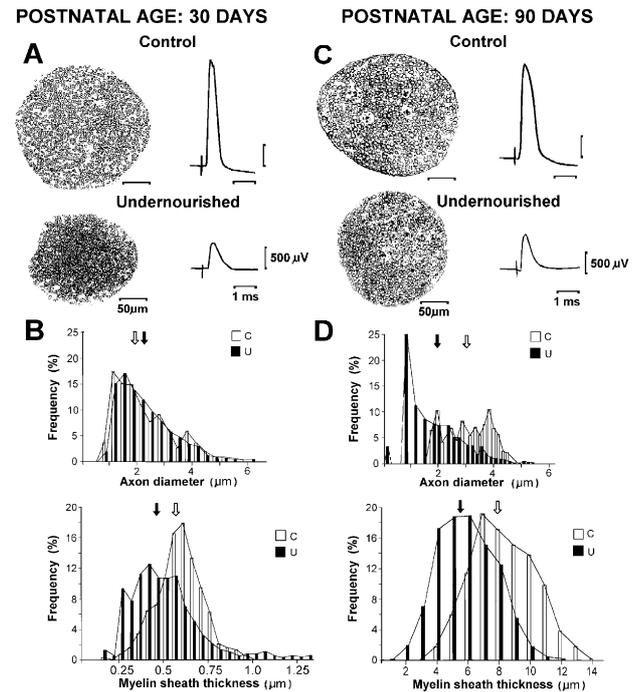


Fig. 1. (A,C) Transversal histological sections and compound action potentials (CAP responses; $2.5 \times T$) obtained from the sural nerve of control and undernourished rats at 30 and 90 postnatal days of age. (B,D) Histograms show the percent frequency distribution of axon diameter (upper graphs) and myelin sheath thickness (lower graphs) of axons from control (C) and undernourished (U) animals, respectively. Mean values for nerves from control (open arrows) and undernourished (closed arrows) animals are indicated.

undernourished animals (analysis of variance (ANOVA), $P > 0.001$; Table 1). In contrast, a discernible reduction in myelin sheath thickness was found in axons of undernourished animals at P30 (ANOVA, $P < 0.001$; lower graph in Fig. 1B and Table 1), while a reduction in axon diameter and myelin sheath thickness was observed at P90 (ANOVA, $P < 0.001$; Fig. 1D and Table 1).

It is well established that a reduction in myelin sheath thickness may lead to decreased conduction velocity, failure to transmit high-frequency trains, to intermittent conduction

Table 1

Mean (\pm S.D.) values of morphological and electrophysiological parameters measured in sural nerves of control (C) and undernourished (U) rats at different postnatal ages (P30 and P60)

Rat	Histological characteristics					Electrophysiological characteristics			
	Animal weight (g)	Nerve diam. (μ m)	No. of axons	Axon diam. (μ m)	Myelin sheath (μ m)	CAP area (μ V ms)	Cond. veloc. (m/s)	Thresh. (μ A)	Refrac. period (ms)
<i>Postnatal age: 30 days</i>									
C	128.1 \pm 12.7	258.5 \pm 47.4	1103.2 \pm 68.6	2.05 \pm 0.2	0.58 \pm 0.01	1162.7 \pm 177.7	17.5 \pm 3.2	75.0 \pm 19.1	1.62 \pm 0.05
U	37.5 \pm 4.6**	73.3 \pm 5.6**	1230.2 \pm 167.9	2.30 \pm 0.05	0.48 \pm 0.01**	409.7 \pm 109.3**	13.7 \pm 2.5	100.0 \pm 70.7	1.65 \pm 0.13
<i>Postnatal age: 90 days</i>									
C	504.6 \pm 25.1	291.0 \pm 25.7	932.5 \pm 125.6	3.35 \pm 0.39	6.70 \pm 1.44	1438.0 \pm 196.3	32.3 \pm 3.9	112.5 \pm 70.8	1.85 \pm 0.05
U	130.5 \pm 0.57**	231.4 \pm 42.0**	1023.0 \pm 119.1	2.30 \pm 0.52**	5.35 \pm 1.15**	590.1 \pm 84.3	30.5 \pm 7.7	117.5 \pm 20.6	1.62 \pm 0.05

Asterisks indicate significant differences between the nerves of control and undernourished animals ($n = 6$; ANOVA, $P < 0.001$) [11]. Diam., diameter; Cond. veloc., conduction velocity; Thresh., electrical threshold; Refrac. period, absolute refractory period.

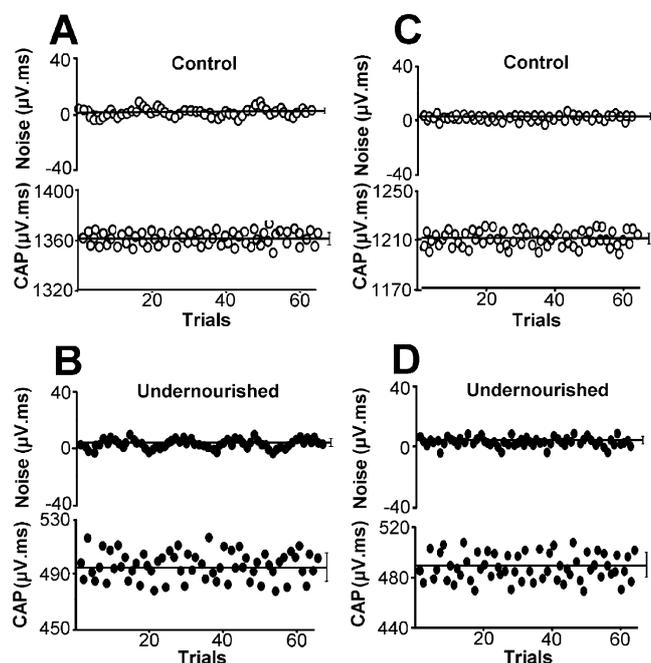


Fig. 2. Fluctuations in area of compound action potentials (CAP) and baseline electrical noise recorded in sural nerves from control and undernourished animals at P30 (A,B) and P90 (C,D). CAP responses were evoked by successive stimuli of maximal intensity ($n = 450$ trials; 1 Hz; $2.50\text{--}3.0 \times T$) applied to sural nerves. The area of CAP responses and baseline electrical noise was determined by means of cursors included in a specially designed computer program: One pair of cursors was used to measure the CAP response area, while a second pair was located 5 ms before the stimulus artifact in order to determine the area of basal electrical noise. Mean \pm S.D. values are indicated as a continuous horizontal line and a bracket, respectively.

and/or to the total block of action potentials (see [10]). If perinatal undernourishment induces intermittent failure in the propagation of action potentials in a population of axons, an increment in the occurrence of fluctuations in the area of

CAP responses could also be expected. This possibility was analyzed in the present study by measuring the trial-to-trial variation in area of CAP responses evoked in the nerves of control and experimental animals by successive stimulus pulses of maximal strength (1 Hz, $2.5\text{--}3.0 \times T$; $n = 64$ trials).

Fig. 2A–D illustrate the trial-to-trial variation in CAP-response area and baseline electrical noise determined in sural nerves of control and undernourished animals. As shown in the lower graphs of Fig. 2A–D, CAP responses of sural nerves from control and undernourished animals fluctuated in area from trial to trial around a mean level (indicated with a continuous line). However, it could be argued that variation in CAP area was mainly due to fluctuations in baseline electrical noise introduced through the recording system (see [6]). This possibility was partially excluded by comparing the variation in area of CAP responses with that of baseline electrical noise. In all cases the variability in area of nerve responses was significantly larger than the electrical noise variation ($F_{\text{CAP/Noise}}$ test, $P < 0.05$, see Fig. 2A–D and Table 2). In addition, CAP responses of nerves from undernourished animals showed larger fluctuations in area than those of control animals at both postnatal ages (see lower graphs in Fig. 2A–D). A similar difference in variability of CAP responses was observed when the intensity of the electrical stimulus applied to nerves from control animals was adjusted to provoke CAP responses of similar area than the CAP responses produced in nerves of undernourished animals (not illustrated). Similar observations were made in a further five nerves per age and feeding paradigm, as indicated in Table 2. The increased variability of CAP-response area in the undernourished animals can also be seen by comparing the standard deviation of CAP responses of control and undernourished animals (F test [11]). As indicated in Table

Table 2

Mean (\pm S.D.) PAC and noise area measured in individual sural nerves of control and undernourished animals at P30 and P90

Control				Undernourished			
Rat	CAP Area ($\mu\text{V ms}$)	Noise area ($\mu\text{V ms}$)	$F_{\text{CAP/Noise}}$	Rat	CAP Area ($\mu\text{V ms}$)	Noise area ($\mu\text{V ms}$)	$F_{\text{CAP/Noise}}$
<i>Postnatal age: 30 days</i>							
C1	1360.0 \pm 8.1	2.93 \pm 4.1	1.98**	U1	243.0 \pm 11.0	3.56 \pm 2.9	3.80**
C2	1054.9 \pm 7.6	5.42 \pm 3.7	2.03**	U2	357.0 \pm 19.8	6.13 \pm 5.1	3.87**
C3	1214.0 \pm 7.8	4.63 \pm 3.6	2.19**	U3	492.0 \pm 19.5	5.90 \pm 5.3	3.65**
C4	873.6 \pm 5.2	2.92 \pm 2.3	2.25**	U4	558.6 \pm 12.2	4.28 \pm 2.1	5.85**
C5	1308.3 \pm 6.7	2.64 \pm 2.3	2.09**	U5	415.1 \pm 15.5	6.84 \pm 3.8	3.67**
C6	1165.9 \pm 5.9	3.17 \pm 3.1	2.13**	U6	392.6 \pm 17.2	6.44 \pm 4.7	4.06**
<i>Postnatal age: 90 days</i>							
C7	1210.0 \pm 8.4	3.14 \pm 2.8	2.98**	U7	517.8 \pm 21.4	6.34 \pm 4.2	5.08**
C8	1664.9 \pm 8.8	3.06 \pm 3.0	2.91**	U8	652.8 \pm 18.2	4.55 \pm 4.4	4.16**
C9	1341.0 \pm 9.7	4.73 \pm 3.7	2.59**	U9	490.0 \pm 17.2	4.27 \pm 4.0	4.25**
C10	1656.2 \pm 13	5.30 \pm 5.7	2.22**	U10	714.0 \pm 20.4	5.45 \pm 4.9	4.12**
C11	1266.3 \pm 9.2	5.11 \pm 4.6	2.86**	U11	561.4 \pm 23.7	4.96 \pm 4.3	5.33**
C12	1489.8 \pm 10.8	4.98 \pm 4.9	2.76**	U12	605.0 \pm 26.9	5.64 \pm 5.1	4.28**

Asterisks indicate significant differences between the values for the control and undernourished animals. F test ($F_{\text{CAP/Noise}}$ values), $P < 0.05$ [11].

2, the standard deviation of successive CAP response areas was practically twice or triple in undernourished than in control animals at both postnatal ages (Table 2).

In agreement with our previous report [8], the evidence obtained in this study indicates a notable reduction in area of CAP responses which was not related to a proportional decrement in the number of axons forming the sural nerve of undernourished animals.

By assuming that the area of CAP responses is proportional to the number of axons activated by the stimulating pulse [5], it could be argued that any decrement in area of CAP responses is indicative of a reduction in the number of afferent fibers in the peripheral nerve capable of generating and/or propagating action potentials. According to the latter, our results would indicate that a large proportion of fibers forming the sural nerves of undernourished animals lose their ability to generate and/or propagate action potentials, while a small number of fibers retain the ability to evoke and transmit action potential despite perinatal food deprivation. The presence of fibers exhibiting close to normal electrophysiological properties could explain the absence of statistical differences between the nerves of control and undernourished animals in most of the physiological parameters analyzed (however, see [9]).

On the other hand, the most conspicuous morphometrical change seen in the nerves of the undernourished animals was a noteworthy reduction in axon myelin sheath thickness. Similar observations have been reported in several other studies, in which pre- and post-natal food deprivation caused a noticeable decrement in myelin thickness and number of lamellas in sciatic nerve axons [2,4]. Bove and collaborators [1] and Ritchie [7] proposed that even a moderate reduction in the axon myelin sheath induces marked changes in the structure and morphology of Ranvier's nodes. Absence of two or more nodes of Ranvier may lead to conduction block of action potentials in peripheral axons [3]. In addition, it has been shown that various demyelinating diseases provoke severe conduction abnormalities in individual axons within the peripheral nervous system and central nervous system, resulting among others in a decreased conduction velocity, total conduction block, frequency-related failures and temporal dispersion of action potentials (for review see [10]). In this study, we show the occurrence of increased fluctuations in area of CAP responses evoked in the nerves of undernourished animals. This could indicate failure in transmission (intermittent conduction) of action potentials in axons due to undernutrition.

According to the latter, it is proposed that the considerable

reduction in area and the increased variability of CAP responses recorded in the sural nerve of undernourished animals were mainly due to the occurrence of total conduction block and/or intermittent propagation of action potentials in a relatively large number of axons, and that such abnormalities are associated with inadequate perinatal formation and/or packing of the myelin sheath and/or with a reduction in diameter (at P90) of peripheral nerve axons.

In summary, our results indicate that severe perinatal undernourishment produces considerable alterations in the generation and propagation of action potentials (blockade and/or intermittent propagation) by peripheral sensory axons and that such effects could result in decreased transmission of sensory information from peripheral receptors to the spinal cord in the postnatally developing rat.

References

- [1] C.M. Bove, C.S. Johanson, C.D. Hildebrand, N.H. Evans, Functional properties and nodal spacing of myelinated fibers in developing rat mental and sural nerves, *Dev. Brain Res.* 79 (1994) 186–194.
- [2] A.J. Delaney, T. Samorajski, G.N. Fuller, R.C. Wiggins, A morphometric comparison of central and peripheral hypomyelination induced by postnatal undernourishment of rats, *J. Nutr.* 111 (1981) 746–754.
- [3] P.J. Dyck, C. Giannini, A. Lais, Pathologic alterations of nerves, in: P.J. Dyck, P.K. Thomas, J.W. Griffin, P.A. Low, J.F. Poduslo (Eds.), *Peripheral Neuropathy*, Saunders, Philadelphia, PA, 1984, pp. 514–595.
- [4] E.T. Hedley-White, C.S. Meuser, The effect of undernutrition on myelination of rat sciatic nerve, *Lab. Invest.* 24 (1971) 156–161.
- [5] H.D. Patton, Special properties of nerve trunks and tracts, in: T.C. Ruch, H.D. Patton, J. Woodbury, A. Towe (Eds.), *Physiology and Biophysics*, Saunders, Philadelphia, PA, 1965, pp. 73–95.
- [6] S.J. Redman, Quantal analysis of synaptic potentials in neurons of the central nervous system, *Physiol. Rev.* 70 (1990) 165–198.
- [7] J.M. Ritchie, Physiology of axons, in: S.G. Waxman, J.D. Kocsis, P.K. Stys (Eds.), *The Axon: Structure, Function and Pathophysiology*, Oxford University Press, New York, 1995, pp. 328–340.
- [8] B. Segura, J.C. Guadarrama, A.L. Gutierrez, H. Merchant, L. Cintra, I. Jiménez, Effect of perinatal food deficiencies on the compound action potential evoked in sensory nerves of developing rats, *Nutr. Neurosci.* 4 (2001) 475–488.
- [9] A. Sima, E. Jankowska, Sensory nerve conduction velocity as correlated to fibre size in experimental undernutrition in the rat, *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 1 (1976) 31–37.
- [10] S.G. Waxman, J.D. Kocsis, J.A. Black, Pathophysiology of demyelinated axons, in: S.G. Waxman, J.D. Kocsis, P.K. Stys (Eds.), *The Axon: Structure, Function and Pathophysiology*, Oxford University Press, New York, 1995, pp. 438–461.
- [11] J.H. Zar, *Biostatistical Analysis*, Prentice Hall, Englewood Cliffs, NJ, 1974, pp. 101–102.