



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA

**EFFECTO DE LA MALNUTRICIÓN Y EL ENVEJECIMIENTO
EN LAS CÉLULAS PIRAMIDALES DEL HIPOCAMPO DORSAL**

Tesis que para obtener el grado de
Maestro en Ciencias (Neurobiología)

presenta

la Lic. Susana Angélica Castro Chavira

Directora de Tesis

DRA. SOFÍA Y. DÍAZ MIRANDA

Campus Juriquilla, Querétaro. Noviembre 2009.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Universidad Nacional Autónoma de México
Instituto de Neurobiología

Los miembros del Comité Tutorial certificamos que la tesis elaborada por: Susana Angélica Castro Chavira cuyo título es: “*Efecto de la malnutrición y el envejecimiento en las células piramidales del hipocampo dorsal*” se presenta como uno de los requisitos para obtener el grado de Maestría en Ciencias (Neurobiología) y cumple con los criterios de originalidad y calidad requeridos por la División de Estudios de Posgrado de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Firmas

Presidente

Dr. Manuel Salas Alvarado

Secretaria (Tutora)

Dra. Sofía Yolanda Díaz Miranda

Vocal

Dr. Roberto A. Prado Alcalá

Suplente

Dr. Alfonso Cárabez Trejo

Suplente

Dra. Carolina Escobar Briones

Firma

Aprobado por el Comité Académico

Dra. Ma. Teresa Morales Guzmán

Coordinadora del Programa

AGRADECIMIENTOS

Agradezco su valiosísima ayuda y tutoría a la Dra. Sofía Y. Díaz Miranda, sin la cual no hubiera sido posible la realización del presente trabajo.

Gracias también a los miembros de mi comité tutorial Dr. Alfonso Cárabez Trejo y Dr. León F. Cintra McGlone[†] por sus valiosos comentarios y correcciones a mi trabajo a lo largo de la maestría.

Agradezco a los miembros del jurado Dr. Manuel Salas Alvarado, Dr. Roberto Prado Alcalá, Dr. Alfonso Cárabez Trejo y Dra. Carolina Escobar Briones por sus comentarios y correcciones.

Un agradecimiento especial a la Técnica Académica Ma. de Lourdes Palma Tirado por haber preparado el material con la técnica de microscopía electrónica y a la M. en C., Yvonne Martínez Chávez por haber facilitado el material de los animales malnutridos posnatales utilizados en la prueba de prevención activa.

Gracias a Nydia Hernández Ríos de la Unidad de Microscopía por su asesoría en la captura y análisis de imágenes utilizadas en la tesis. Agradezco también a la M. en C. Azucena Ruth Aguilar Vázquez por su asesoría en el análisis morfométrico de las imágenes utilizadas en mi proyecto y a la Psic. Verónica Tonantzin Pineda Martínez por su asesoría en la preparación de los reactivos.

Mil gracias a la Dra. Ivett Guadalupe Medina Aguirre por su apoyo, amistad y enseñanza.

Agradezco la ayuda y apoyo de Leonor Casanova Rico y Yolanda Orduña Cruz a lo largo de toda la maestría para la realización de los trámites necesarios para cursarla.

Gracias a Pilar Galarza Barrios y Román Pacheco Barrita por su apoyo en la búsqueda y préstamo de ejemplares de la Biblioteca del Campus Juriquilla de la UNAM.

Gracias al MVZ Martín García Servín por su apoyo en el Bioterio del Instituto de Neurobiología.

Gracias a mis compañeros del laboratorio por su amistad y apoyo, gracias Irma, Didis, Uriel, Patricia, Vicente, James, Michelle y Brenda. Gracias, Elvis por compartir casa conmigo estos dos años. Agradezco también a mis compañeros y profesores de la maestría por su apoyo, ayuda y hacer esta maestría enriquecedora y divertida.

AGRADECIMIENTO INSTITUCIONAL

Agradezco el apoyo de la beca recibida durante la maestría del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CVU No. 231090), así como el apoyo del fomento a la graduación recibido de la Coordinación de los Estudios del Posgrado de la UNAM.

DEDICATORIAS

Dedico esta tesis a aquellos que me han impulsado, me han dado su amor y cariño y han creído en mí antes que nadie, MI FAMILIA.

A Silvia, Ernesto, Gerardo, Joyce y María Andrea.

A Verónica Garduño por ayudarme y apoyarme durante toda la maestría. Gracias por creer en mí como nadie.

RESUMEN

EFFECTO DE LA MALNUTRICIÓN Y EL ENVEJECIMIENTO EN CÉLULAS PIRAMIDALES DEL HIPOCAMPO DORSAL

La malnutrición (M) provoca efectos permanentes e irreversibles en el Sistema Nervioso que pueden sumarse a los del envejecimiento. En las neuronas piramidales (NP) del hipocampo, la M se asocia con la reducción en el axo, dendro, espino y sinaptogénesis, siendo pocos los estudios sobre los cambios a nivel subcelular en animales seniles malnutridos de 660 días de edad. En el presente estudio se valoró el grado de alteración en los organelos de las NP del área del CA1 del hipocampo dorsal por la M (crónica, MCro o posnatal, MPos) comparados con los controles (C), tanto en jóvenes (J) de 90 días de edad (JC vs JMCro; JC vs JMPos) como en los seniles, S de 660 días de edad (SC vs SMCro; SC vs SMPos). El análisis ultraestructural se realizó mediante microscopía electrónica con aumentos de 8,000 y 20,000x en seis neuronas por animal (n=3) y en los seis grupos estudiados (n=108). Se valoraron los espacios conspicuos y la mielina circundantes al soma, y en su pericarion se cuantificó el número de: sistemas membranales de Golgi (normales y dilatados); mitocondrias (normales, chicas y dilatadas), lisosomas, cúmulos de lipofuscina y cuerpos multivesiculados. La M en los J y S, se asoció con aumentos en el número de espacios conspicuos y de mitocondrias. La edad en los SC se asoció al aumento de cúmulos de lipofuscina y cuerpos multivesiculados (signos de estrés oxidativo), no así en los SM. Sin embargo, los JM, mostraron estos signos, lo cual podría explicar su desempeño deficiente reportado en una tarea de memoria espacial.

SUMMARY

EFFECTS OF MALNOURISHMENT AND AGEING ON PYRAMIDAL CELLS OF THE DORSAL HIPPOCAMPUS

Malnourishment (M) produces permanent and irreversible effects on the Nervous System which might add up to those of aging. In pyramidal neurons (PN) of the hippocampus, M is associated to reduction in the number of axo, dendro-, spino- and synaptogenesis; existing few studies focused on changes at the subcellular level in 660 days-old senile malnourished animals. The present work evaluated the disruption degree of organella in the CA1 dorsal hippocampus PN due to M (chronical, MCro or postnatal, MPos) compared to their controls (C), in both young (J), 90 days-old (JC vs JMCro; JC vs JMPos) and senile (S), 660 days-old animals (SC vs SMCro; Sc vs SMPos). The ultrastructural analysis was performed with Electron Microscopy in enlargements of 8,000 and 20,000X of six neurons per animal (n=3) and in the six studied groups (n=108). The conspicuous spaces and myelin surrounding the soma, and the number of: Golgi complexes (normal and swollen), mitochondria (normal, small and swollen), lysosomes, lipofuscin granules and multivesicular bodies, in the perikaryon were evaluated. M, in J and S, was associated to increases in the number of conspicuous spaces and mitochondria. Age, in the SC group, was related to increased quantities of lipofuscin granules and multivesicular bodies (oxidative stress signs); in contrast with SM animals. However, JM animals showed these signs which may provide an explanation to their previously reported deficient performance in a spatial memory task.

ÍNDICE

RESUMEN	vi
SUMMARY	vii
INTRODUCCIÓN	3
ANTECEDENTES	5
1 – MALNUTRICIÓN	5
2 – ENVEJECIMIENTO	6
3 – HIPOCAMPO	9
3.1 - Organización laminar de los campos CA1, CA2 y CA3.	12
3.2 - Intracircuito, entrada principal, por vía del patrón perforante (PP).	13
4 – MALNUTRICIÓN EN HIPOCAMPO	14
5 – ENVEJECIMIENTO EN HIPOCAMPO	15
6 – NEURONAS PIRAMIDALES Y SU ESTRUCTURA SUBCELULAR	17
6.1 – Núcleo	18
6.2 – Mitocondrias	19
6.3 – Sistemas Membranales de Golgi	20
6.4 – Lisosomas	22
6.5 – Cuerpos Multivesiculares	22
6.7 – Cúmulos de Lipofusina	24
6.8 – Mielina circundante al soma	25
6.9 – Espacios conspicuos perisomáticos	27
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	28
HIPÓTESIS	29
OBJETIVOS	29
A. Generales	29
B. Particulares	29
MATERIAL Y MÉTODOS	30
A. Sujetos	30
B. Método de malnutrición	31
C. Método de microscopía electrónica	32
C.1 Inclusión en Plano	32

RESULTADOS	34
1. Pesos Corporales	34
2. Análisis morfométrico	36
2.1. Parámetros del pericarión de las neuronas piramidales del CA1 del hipocampo dorsal	36
2.1.1. Mitocondrias	36
2.1.2. Sistema membranal de Golgi, normal y dilatado	39
2.1.3. Lisosomas, cúmulos de lipofusina y cuerpos multivesiculares	41
2.2. Parámetros perisomáticos al soma de las neuronas piramidales del CA1 del hipocampo dorsal	43
2.2.1. Mielina perisomática	43
2.2.2. Espacios perisomáticos	45
DISCUSIÓN	47
CONCLUSIONES	55
REFERENCIAS	56
LISTA DE FIGURAS	63
LISTA DE TABLAS	64

INTRODUCCIÓN

La malnutrición en los periodos críticos del desarrollo cerebral, provoca efectos permanentes que pueden ser irreversibles y en el hipocampo, la malnutrición hipoproteínica pre y posnatal reduce su volumen, el número de las interneuronas, así como de las ramas dendríticas, de las espinas y de las sinapsis (García-Ruiz, et al., 1993; Díaz-Cintra, et al., 1994; Granados-Rojas, et al., 2004; Lukoyanov & Andrade, 2000; von Bohlen und Halbach, Zacher, Gass, & Unsicker 2006; Díaz-Cintra et al. 2007). Los animales malnutridos, muestran cambios emocionales, motivacionales y alteraciones en la memoria (da Silva Hernandez, et al., 2005; Francolin-Silva, et al., 2006). Adicionalmente, los animales jóvenes malnutridos, muestran niveles bajos de la proteína total y del BDNF asociados a deficiencias en la memoria de tipo espacial, dependiente del hipocampo (Wang & Xu, 2007).

En el cerebro adulto el volumen del hipocampo empieza a reducirse entre un 0.3 y 2.1 % al año (Golomb et al., 1994) y los organelos de las neuronas hipocampales se alteran durante el envejecimiento mostrando extrema vacuolación citoplásmica con dilatación mitocondrial, considerable adelgazamiento de la cubierta de mielina, importante degeneración vacuolar y marañas de gliofilamentos (Deloncle et al., 2001). En el pericarion de las neuronas piramidales del CA1, se pierde de manera paulatina la regulación de las enzimas que mantienen el crecimiento de los lisosomas, incrementándose de manera anormal en el citoplasma adyacente al segmento proximal del axón acumulándose los lisosomas y provocando la desconexión (Yong et al., 1999).

El efecto combinado de ambas variables (malnutrición y envejecimiento, de más de 660 días de edad) sobre la organización subcelular de las neuronas piramidales del hipocampo, ha sido poco estudiado. Por lo que el estudio se diseñó para resolver la pregunta de si ambas variables, la malnutrición y el envejecimiento producen alteraciones en las características subcelulares de las células piramidales del campo CA1 del hipocampo dorsal. Se utilizaron ratas macho, Sprague-Dawley en seis grupos: Joven control (JC); Senil control (SC); Joven malnutrido posnatal (JMPos); Joven malnutrido crónico (JMCro); Senil malnutrido posnatal (SMPre) y Senil malnutrido crónico (SMCro). En cada grupo se realizó el estudio de morfometría de los espacios conspicuos y la mielina circundantes al soma, así como de los elementos subcelulares

(número de sistemas membranales de Golgi (normales y dilatados); mitocondrias (normales, chicas y dilatadas), lisosomas, cúmulos de lipofuscina y cuerpos multivesiculados. Siendo estos tres últimos considerados como signos de estrés oxidativo. Las comparaciones entre los grupos tanto jóvenes (JC vs JMCro; JC vs JMPos) como los seniles, S (SC vs SMCro; SC vs SMPos), en cada uno de los parámetros medidos, se efectuaron con el ANOVA y la prueba *post hoc* de Fisher. Los resultados mostraron diferencias significativas ($p < 0.05$) en cada par de grupos analizados, e.i., la M en los J y S, se asoció con aumentos en el número de espacios conspicuos y de mitocondrias. La edad en los SC se asoció al aumento de cúmulos de lipofuscina y cuerpos multivesiculados, efectos que no mostró el grupo de los SM. Por el contrario, el grupo de los animales JM si mostraron estos signos, lo que pudiera ser una posible explicación del porque los animales JM, presentan un desempeño deficiente reportado en una tarea de memoria espacial.

ANTECEDENTES

1 - MALNUTRICIÓN

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud, el término malnutrición se refiere al desequilibrio en la ingesta de energía, proteínas y otros nutrientes (De la Mata, 2008). Un individuo se encuentra malnutrido si su dieta no lo provee de calorías y proteínas adecuadas para su crecimiento y mantenimiento, o si es incapaz de utilizar por completo el alimento que consume debido a una enfermedad o si consume demasiadas calorías (UNICEF, 2006). La desnutrición se diferencia de la malnutrición en que es el resultado de una ingesta de alimentos que es, de forma continuada, insuficiente para satisfacer las necesidades de energía alimentaria, de una absorción deficiente y/o de un uso biológico deficiente de los nutrientes consumidos.

La mala nutrición durante el desarrollo produce efectos importantes en el Sistema Nervioso Central (SNC) y en sus mecanismos celulares, que son regulados durante los periodos críticos a lo largo de todo el desarrollo. Estos incluyen división celular (neurogénesis y gliogénesis), migración celular a las áreas blanco del cerebro, diferenciación celular (arborización dendrítica, extensiones axonales, formación de circuitos), mielinización, sinaptogénesis, síntesis y liberación de neurotransmisores, angiogénesis y muerte celular programada (apoptosis). Estos procesos no se presentan al mismo tiempo (heterocronía), porque siguen un patrón distinto de manifestación, siendo diferente para cada especie. La mayoría de éstos se inician en la etapa prenatal y se extienden más allá del nacimiento, aunque algunos comienzan durante el periodo postnatal, por lo que pueden ser alterados fácilmente por estímulos tanto exógenos (v.gr. malnutrición, drogas o alcohol), como endógenos (v.gr. las hormonas). Esta vulnerabilidad neuronal temporal ha sido denominada por Kretchmer (1989), como periodos críticos del desarrollo neuronal. Así, los factores epigenéticos como la malnutrición, el estrés o el uso de drogas durante el desarrollo intrauterino o en periodos perinatales (críticos) repercuten en defectos neuronales en áreas cerebrales vulnerables (como la neocorteza o el hipocampo) produciendo trastornos que van desde la alteración del ciclo celular hasta la integración funcional a lo largo de todo el periodo de vida (para revisión ver Morgane et al., 1993).

La malnutrición experimental en roedores, puede lograrse utilizando una dieta baja en proteínas (6% de caseína), reportándose en esos casos desde disminución de la talla, peso corporal y cerebral hasta alteraciones celulares en diferentes áreas cerebrales, al compararlos con sus testigos (Morgane et al., 1993). Desde los estudios de Guthrie y Brown (1968) en animales malnutridos (alimentados con 8% de proteína y comparados con los controles (alimentados con 18% de proteína) en diferentes edades después del nacimiento y rehabilitados nutrimentalmente, encontraron que, la curva de pesos comenzó a nivelarse a la misma edad aproximadamente (16 a 18 semanas) sin importar el peso que habían alcanzado, sugiriendo que aunque los animales privados de alimento en forma temprana podrían continuar creciendo lentamente, nunca compensarían por completo la deficiencia del peso corporal resultante de la malnutrición en una etapa temprana.

Se han diseñado diversos modelos de malnutrición experimental; destacando aquel en donde se conserva tanto la estimulación sensorial ambiental como la materna, por lo que sólo se reduce la cantidad de caseína (proteína de gran importancia en la dieta del neonato por contener 20 de los 21 aminoácidos esenciales y encontrarse en la leche materna). Esta dieta hipoproteínica, contiene solo el 6% de caseína, pero es isocalórica y se considera que provoca graves consecuencias al organismo (Morgane, et al., 1978; Resnick, et al., 1979) y dependiendo del tiempo en el que se instale produce disminución de la talla y pesos corporal y cerebral (Granados et al., 2004). Así, bajo este paradigma se estudian los efectos diferenciales ocurridos durante las diversas etapas del desarrollo del SNC instalados durante periodos críticos, tanto pre como postnatales, y se relacionan con el desarrollo de funciones cognitivas como el aprendizaje y la memoria (Bonatto et al., 2005). Adicionalmente se han reportado alteraciones subcelulares (Olorunsogo, 1989) en la bioenergética de las mitocondrias neuronales de crías de ratas malnutridas proteínicamente asociadas a cambios en la estructura e integridad de los componentes de la membrana mitocondrial interna.

2 - ENVEJECIMIENTO

El envejecimiento es un proceso deletéreo, progresivo, intrínseco y universal que con el tiempo ocurre en todo ser vivo a consecuencia de la interacción de la genética del

individuo con su medio ambiente y que conducen a pérdidas funcionales y a la muerte (Strehler, 1977). Las células mitóticas tienen un número limitado de divisiones, después de las cuales comienzan un proceso de “senescencia celular” en el que dejan de dividirse y entran en apoptosis (Pardo y Delgado, 2003). Sin embargo, las células posmitóticas, como son las neuronas, presentan atrofia celular ya que su funcionamiento y transmisión sináptica se vuelven deficientes. De esta manera, el SNC es más vulnerable durante el envejecimiento debido a la atrofia neuronal y la senescencia celular de las células gliales, vasculares y del tejido conectivo (células mitóticas). Aunado a lo anterior, hay aumento en la vulnerabilidad de las células a medida que avanza la edad disminuyendo la homeostasis y los mecanismos de protección y el riesgo al daño celular aumenta. Por ello, el envejecimiento es un proceso irreversible que afecta, entre otros aspectos, a la función (i.e., pérdida de la memoria) y morfología cerebrales (disminución del peso y volumen) que pueden desencadenar atrofia y muerte neuronal. El envejecimiento en el cerebro puede producir neurodegeneración en donde una de sus formas es la formación de placas neuríticas que alteran la función de los circuitos mediados por determinados neurotransmisores, así como el estrés oxidativo, que se presenta por pérdida en el equilibrio de los radicales libres que desencadenan la muerte neuronal (Bonfoco et al., 1995; Torrades, 2004; Rodríguez-Martínez et al., 2004; Linford et al., 2006). Esta pérdida en el equilibrio de los radicales libres se debe a exceso de especies reactivas a oxígeno (ROS), que se producen normalmente como resultado de la respiración, en comparación con la cantidad de antioxidantes en las células (Sohal & Weindruch, 1996). La presencia de estrés oxidativo se debe también a la inhibición de proteosomas, ya que al estar activados de manera insuficiente para la degradación de proteínas de desecho, se presenta aumento en los radicales libres (Ding et al., 2006, Vernace et al., 2007). La destrucción regulada de proteínas en células eucariontes se realiza mediante dos sistemas principales: la vía lisosomal relativamente lenta y dependiente de vesículas y la más rápida vía ubiquitin/proteosoma que opera en los compartimentos citosólico y nuclear. Los mecanismos lisosomales son afectados por el envejecimiento (Brunk & Terman, 2002 a y b; Cuervo et al., 2005). Asimismo, la presencia de una variedad de inclusiones ubiquitinadas indica que la acumulación,

agregación y ubiquitinación, debidos a la falla de dicha vía, ocurren durante el envejecimiento tanto patológico como normal (Gray et al., 2002; Steward & Schuman, 2003).

En el cerebro se presentan diversos cambios tanto en las neuronas piramidales, como en las células gliales, que modifican su apariencia morfológica y las características electrofisiológicas de las sinapsis y mecanismos de neurotransmisión durante el envejecimiento normal (Bi et al., 1999; Nakamura et al., 1999; Foster, 1999; Gil, 2000; Shiozaki et al., 2008). Anatómicamente, las células del hipocampo senil, entre otras estructuras del SN, muestran depósitos densos de proteína similares a las redes neurofibrilares y a las placas β -amiloides características de la enfermedad de Alzheimer (Gil, 2000; Mora, 2002; Torrades, 2004).

Se ha reportado pérdida neuronal en diversas especies durante el envejecimiento normal aunque sólo en algunas áreas del SNC, entre éstas el hipocampo. En contraste, el número de células gliales se incrementa con el envejecimiento en la mayoría de las áreas cerebrales. Sin embargo, el decremento en el funcionamiento cerebral no se debe solamente a la pérdida neuronal. Existe evidencia de que la disminución en el funcionamiento cerebral durante la vejez se relaciona también con pérdida de la eficiencia sináptica, presentándose cambios en la función neurotransmisora asociados a ésta. A pesar de que se han reportado decrementos en las cantidades de algunos neurotransmisores y de sus receptores, durante el envejecimiento, los cambios no son consistentes. Más bien parece que con el envejecimiento hay un desequilibrio de neurotransmisores; por ejemplo, el metabolismo de la serotonina aumenta y otros se reducen, como el sistema colinérgico, por pérdida neuronal en áreas corticales y en el hipocampo (para revisión ver a Gil, 2000). Esto se ve reflejado en estudios electrofisiológicos en ancianos humanos, en donde se ha encontrado decremento en la respuesta de las neuronas a los estímulos humorales microambientales. Como consecuencia del estrés oxidativo, se ha reportado la presencia de daño al ADN nuclear y mitocondrial (Katyal y McKinnon, 2008; Wei et al., 2009), sin embargo, al parecer las catalasas, al degradar el peróxido, protegen tanto al ADN nuclear como al mitocondrial (Linford et al., 2006). La melatonina a su vez degrada los radicales libres ya que actúa como antioxidante y factor inactivante de

radicales libres (hidroxilos y peroxilos) además de estimular la producción de algunas enzimas antioxidantes; también está relacionada con la regulación de ritmos circadianos ya que su concentración en suero varía de acuerdo al ciclo luz-obscuridad vía el núcleo supraquiasmático del hipotálamo (alcanza su concentración máxima entre las 24 y 3hrs.) y con la modulación del sistema inmune ya que sus células tienen receptores a melatonina. Sin embargo, catalasas y melatonina son deficientes en los ancianos (Karasek, 2007).

3 - HIPOCAMPO

En 1872 Maynert describió la localización del *Gyrus fornicatus* del *Cornu Ammonis* y de la corteza prepiriforme en el cerebro humano, al que posteriormente Broca (1878) denominó lóbulo límbico. Anatómicamente la corteza cerebral se divide en *allocortex* (o corteza antigua) e *isocortex* (también conocida como neocorteza, común a los mamíferos) con base en sus relaciones filogenéticas; particularmente se identifica el giro dentado como el *allocortex* y el asta de Ammon (áreas CA1 a CA4, en el humano) como el *periallocortex*.

El hipocampo pertenece al sistema límbico, el cual participa en respuestas fisiológicas ante estímulos emocionales y está relacionado con funciones cognitivas como memoria, atención, emociones, personalidad y conducta. Está constituido por la formación hipocampal, la amígdala, el tálamo, el hipotálamo, cuerpo caloso, mesencéfalo y el *septum*. La formación hipocampal está situada en el área medial del lóbulo temporal y se relaciona funcionalmente con la memoria declarativa y espacial. En la rata, aparece como una estructura elongada con su eje largo extendiéndose rostro dorsalmente en forma de letra C desde el núcleo septal del frente basal, sobre y detrás del diencéfalo y caudo-ventralmente hacia dentro del lóbulo temporal (Witter y Amaral, 2004).

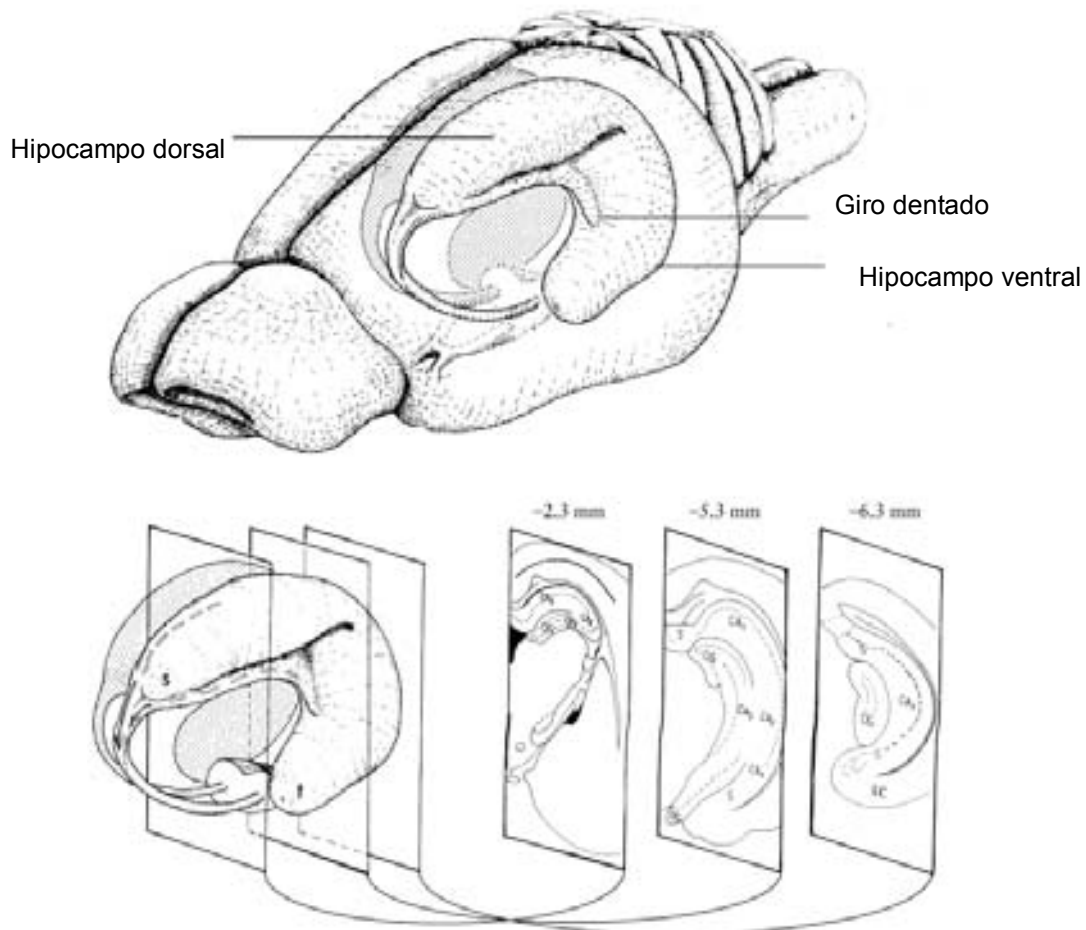


Figura 1. Diagrama del hipocampo de rata, con su organización tridimensional y estructuras relacionadas. Se muestran tres secciones coronales a través del hipocampo izquierdo en la parte inferior derecha de la figura, con su coordenada antero-posterior aproximada relativa a bregma en mm. Las áreas CA1, CA2, CA3 del *Cornu de Ammon* y el área dentada o giro dentado (DG); corteza entorrinal (EC); fornix (f); subiculum (s); y los polos septal (s) y temporal (t) del hipocampo. Esquema modificado de Witter y Amaral, 1989.

La citoarquitectura de la formación hipocámpal comprende tres regiones o áreas: 1) el área dentada o giro dentado con el hilus, 2) el *Cornu de Ammon* o hipocampo propiamente dicho, que se subdivide a su vez en tres campos: CA1, CA2 y CA3; y 3) el subiculum (dividido en pre y para subiculum) (ver figura 1). Las tres regiones hipocámpales comparten la apariencia característica de tres capas celulares, considerado el rasgo definido como la llamada alo corteza. Su conectividad es unidireccional y las células granulares dentadas (o células granulares) proyectan a

través de sus fibras musgosas características, a las células musgosas de la región del *hilus* y al campo CA3, cuyos axones (colaterales de Schaffer) llegan a los estratos radiado y *oriens* del campo CA1, y al hipocampo contralateral y los axones de las células piramidales del CA1, envían sus axones al *subiculum* formando el *alveus*. Un patrón unidireccional preferencial similar se mantiene para las otras conexiones principales intrínsecas (CA3 a CA1 y CA1 al *subiculum*) de la formación hipocámpal, diferente al patrón cortical.

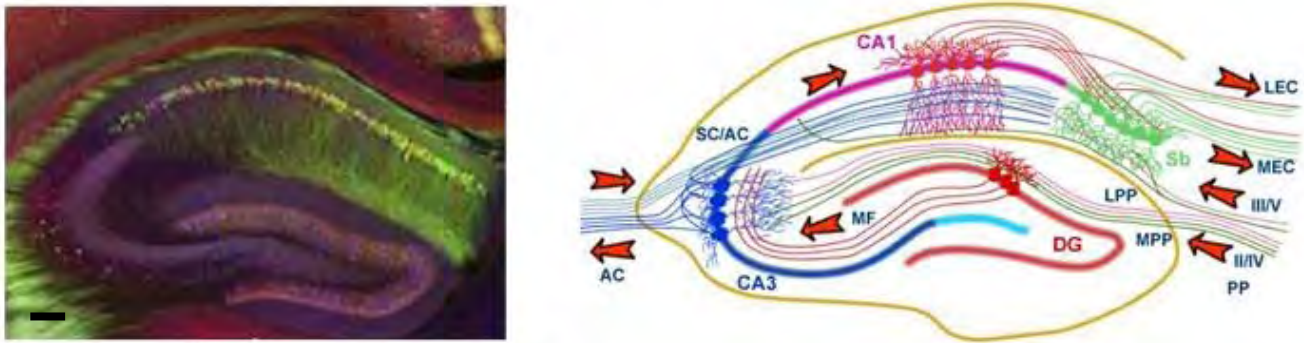


Figura 2. Cortes coronales del hipocampo dorsal de rata. En A, tinción de Harvard, modificada para hipocampo. Barra-100µm. En B, flujo de información a través del hipocampo. Patrón Perforante (PP) dividido en lateral y medial (LPP y MPP); Giro Dentado (DG); Fibras Musgosas (MF); vía Colateral de Schaffer (SC); vía comisural de asociación (AC); corteza entorrinal medial (MEC) y la lateral (LEC). Esquema de <http://www.bris.ac.uk/Depts/Synaptic/info/pathway/figs/hippocampus.gif>

El hipocampo propiamente dicho (o *Cornu de Ammon*) se divide en dos regiones principales, una proximal de células grandes y una distal de células pequeñas. Ramón y Cajal llamó a estas dos regiones inferior y superior, respectivamente. La terminología empleada por Lorente de Nó es más común, quien lo dividió en tres campos (CA3, CA2 y CA1), los campos CA2 y CA3 son equivalentes a la región inferior denominada por Ramón y Cajal y el CA1 es equivalente a la región superior. Además de las diferencias en el tamaño de las células piramidales en CA3 y CA1 hay una diferencia conectiva clara. Las células piramidales del CA3 reciben la entrada de fibras musgosas provenientes del giro dentado, en cambio las células piramidales del CA1 no reciben esta entrada, sino del CA3 o colaterales de Schaffer, ambas junto con la región dentada, reciben la entrada de la corteza entorrinal, el patrón perforante (Witter y Amaral, 2004).

3.1 - Organización laminar de los campos CA1, CA2 y CA3

La organización laminar es similar para todos los campos del hipocampo. La principal es llamada capa celular piramidal, otra capa o lámina es estrecha y relativamente sin células, localizada por debajo de la principal se denomina *stratum oriens* y bajo esta se encuentra el *alveus* (que significa “afluente”) de fibras. Particularmente en el CA3, se localiza una zona estrecha acelular justo por encima de la principal de células piramidales ocupada por los axones de las fibras musgosas provenientes del giro dentado identificada como el *stratum lucidum*, en donde las espinas se modifican como excrescencias, y en cuya terminación distal se presenta un ligero engrosamiento de la capa en donde las fibras se doblan temporalmente, este “bulbo terminal” marca el límite entre los campos CA2 y CA3. Superficial al *stratum lucidum* en el CA3 e inmediatamente superior a la capa celular piramidal en CA2 y CA1, se encuentra el *stratum radiatum*, definido como la región suprapiramidal en donde se localizan las conexiones asociativas entre el CA3 y sus conexiones colaterales de Schaffer al CA1 (Witter y Amaral, 2004).

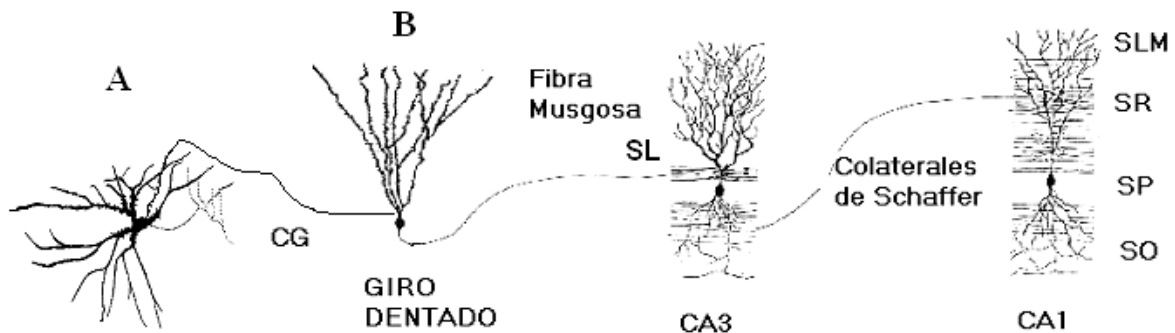


Figura 3. Neuronas de proyección que forman parte del intracircuito del hipocampo. A, musgosa del hilus, B, granular (CG) del área o región dentada de donde parte la fibra musgosa que hace sinapsis en el *stratum lucidum* (SL) de la piramidal del campo CA3, de ésta parten las colaterales de Schaffer hacia el *stratum radiatum* (SR), de la piramidal (SP) del campo CA1, en donde se localizan también los estratos *oriens* (SO) y el *lacunosum moleculare* (SLM), y de donde salen los axones hacia el *subiculum* (formando el *alveus*). Esquema del laboratorio de la Dra. Díaz-Cintra.

En los tres campos las neuronas principales (piramidales) son las denominadas neuronas de proyección (Golgi tipo I) (figura 3). Lorente de Nó observó una variedad de diferencias subyacentes en la organización de estas neuronas en diferentes partes del CA3 y el CA1, y utilizó estas distinciones para su subdivisión posterior (en a, b y c). La longitud y organización de las células piramidales del CA3 varían de manera

consistente en relación a su posición a lo largo del eje transversal del CA3. Las neuronas en la parte proximal, cercanas al área dentada (o giro dentado), poseen los árboles dendríticos más pequeños con alrededor de 10 mm de longitud total. Las neuronas en la parte distal del CA3 (cerca del CA2) tienen los árboles dendríticos más grandes presentando longitudes dendríticas totales del orden de los 16 mm. En el caso de las células piramidales del CA3, 42 a 51% del árbol dendrítico se encuentra en el *stratum oriens*. Estudios de Ramón y Cajal y Lorente de Nó hicieron evidente el hecho de que existe una variedad de tipos celulares no piramidales en los *strata oriens, radiatum y lacunosum-moleculare*. Entre éstos se encuentran interneuronas (Golgi tipo II) cuyo neurotransmisor es el GABA y sus axones no se proyectan fuera del campo donde se localizan y se clasifican en neuronas en canasta, células O-LM, en candelabro, biestratificadas o trilaminares. Sin embargo, el principal tipo neuronal del hipocampo lo conforman las células piramidales (Witter y Amaral, 2004).

Los estudios en ratas han mostrado que algunas de las neuronas principales de proyección piramidales del hipocampo tienen campos espaciales de encendido. Estas células se denominan “células de lugar” cuya importancia funcional es la participación en los procesos de aprendizaje y memoria espacial. Diversas experiencias sensoriales, pueden tener consecuencias plásticas en algunas estructuras cerebrales, también pueden afectar la adquisición de nuevas tareas. Por ejemplo, animales que habitan en ambientes sensoriales enriquecidos presentan incrementada la densidad de espinas dendríticas en el estrato *oriens* del CA1 del hipocampo al tiempo que muestran una mejor ejecución en la tarea del laberinto acuático de Morris (Moser et al., 1994).

3.2 - Intracircuito, entrada principal, por vía del patrón perforante (PP)

Los axones del PP surgen de las capas II y III de la corteza entorrinal (CE), con menores contribuciones de las capas profundas IV y V. Los axones de las capas II y IV se proyectan a las células granulares del área dentada y a las células piramidales de la región CA3, mientras que las proyecciones de las capas III y V van a las células piramidales del CA1 y el *subiculum*. El PP puede ser separado en fascículos lateral

(LPP) y medial (MPP), dependiendo del origen de estas fibras (figura 2), (Bortolotto et al., 2003).

Las conexiones del área CA3 del hipocampo conforman una red que recibe entradas sinápticas locales y dos entradas corticales. La vía “temporal amónica perforante” es una entrada proveniente de la corteza entorrinal y se considera que lleva información de tipo espacial. La vía de fibras musgosas media una entrada indirecta proveniente de la corteza entorrinal. Más aún, las neuronas piramidales del CA3 hacen sinapsis con otras neuronas piramidales del CA3 a través de la vía comisural de asociación, proveyendo una fuente interna de entradas excitatorias. Teóricamente, se considera que esta arquitectura de “red recurrente” produce dinámicas autoasociativas a las que subyace la memoria episódica. La eficacia de estas sinapsis es modulada por oscilaciones lentas espontáneas de células posinápticas piramidales del CA3 con diferentes reglas de aprendizaje, aunado a que la plasticidad sináptica es heterogénea, compleja y varía a través del tiempo (Rolls & Kesner, 2006). Además, las células piramidales del CA3 dan origen a axones altamente colateralizados que distribuyen fibras tanto al interior del hipocampo (CA3, CA2 y CA1) como a las mismas áreas del hipocampo contralateral (proyecciones comisurales). Las células del CA3, especialmente las localizadas de manera próxima al área, y las células del CA2 contribuyen con un pequeño número de colaterales que inervan la capa polimórfica del giro dentado (Witter y Amaral, 2004).

4 - MALNUTRICIÓN EN HIPOCAMPO

Estudios en animales malnutridos en el periodo posnatal en distintas edades, han mostrado disminución significativa en el volumen del hipocampo (Granados, et al., 2004), en la arborización dendrítica, en el número de espinas (Andrade & Paula-Barbosa, 1996; Díaz Cintra, et al., 1994; García-Ruiz, et al., 1993) y en la sinaptogénesis de las Fibras Musgosas (FM) que llegan al *stratum lucidum* del CA3 (Andrade et al., 1991; Granados et al, 2002). Asimismo, Díaz-Cintra et al., (1991), reportaron disminución del número de ramas dendríticas y del número de espinas en las neuronas granulares del hipocampo de animales malnutridos durante el periodo de la gestación. García-Ruiz et al. (1993) encontraron estos mismos efectos en las células

piramidales del CA3, los cuales persistieron aún después de rehabilitación nutrimental al momento del nacimiento. En etapas adultas, la malnutrición produce disminución del número de ramas dendríticas tanto en células granulares como en las piramidales, pero un aumento en el número de espinas en los segmentos terminales de las células granulares (Andrade et al., 1996) y alteración en los sistemas colinérgicos y GABAérgicos del hipocampo de animales adultos (Andrade & Paula-Barbosa, 1996; Díaz-Cintra et al., 2007). Con referencia al menor número de sinapsis entre las FM y el *stratum lucidum* del CA3 en animales adultos que fueron malnutridos en el periodo prenatal, se reportaron también reducciones significativas en el número de sinapsis asimétricas (Granados et al., 2002).

Los animales adultos jóvenes y seniles malnutridos desde su gestación o desde el nacimiento, muestran reducción de la talla y del peso corporal de hasta un 70% (figura 15). Además, cuando se sometieron a pruebas conductuales de adquisición (aprendizaje) y de retención (memoria) mostraron deficiencias significativas en su ejecución en comparación con los grupos controles (Martinez et al., 2009). Por otra parte, cuando se compararon estos efectos con la alteración en las neuronas del hipocampo dorsal, los resultados de la morfometría subcelular obtenidos en las neuronas piramidales del CA1 del grupo senil malnutrido, mostraron aumentos significativos tanto del área del soma como del núcleo así como en el número de mitocondrias y lisosomas asociados a vesículas en comparación con los otros grupos (Martínez, 2005).

5 - ENVEJECIMIENTO EN HIPOCAMPO

Se ha reportado en el ser humano que durante el envejecimiento normal existe pérdida de las células piramidales del hipocampo, existiendo hipertrofia de las ramas dendríticas en las neuronas piramidales sobrevivientes, quizá como mecanismo compensatorio paralelo a la muerte de neuronas vecinas (Buell & Coleman, 1981). Sin embargo, mientras que el decremento en la densidad neuronal parece ser un parámetro del envejecimiento en diferentes cepas de ratas, la muerte y pérdida neuronal no se presentan de manera consistente en todas las áreas. Se sabe que el número de neuronas del hipocampo se preserva a lo largo de la vida en sujetos sanos de

diferentes especies, incluyendo a los humanos. Los estudios en el área CA1 del hipocampo que reportan pérdida neuronal se refieren más a una pérdida circunscrita más que general a todo el hipocampo (Miller & O'Callaghan, 2003).

El hipocampo es más susceptible al daño por especies reactivas de oxígeno (ROS) en comparación con el estriado, la corteza y el área septal (Rodríguez-Capote et al., 1998). En los estudios de Imagen por Resonancia Magnética (IRM), en seres humanos se ha encontrado que a partir de la adultez temprana el volumen del hipocampo sufre una reducción de entre 0.3 y 2.1 % al año (Golomb et al., 1994). Los organelos neuronales también se alteran durante el envejecimiento, los estudios de Deloncle y colaboradores en el 2001 reportaron que las neuronas del hipocampo de ratas envejecidas mostraron una extrema vacuolación citoplásmica con dilatación mitocondrial, considerable adelgazamiento de la cubierta de mielina, importante degeneración vacuolar y marañas de gliofilamentos.

En el citoplasma de las neuronas piramidales del CA1, se altera la producción enzimática celular perdiéndose de manera paulatina la regulación de las enzimas que mantienen el crecimiento de los lisosomas, incrementándose de manera anormal en el citoplasma adyacente al segmento proximal del axón denominado “meganeurita”, la cual se llena de lisosomas lo que provoca su ruptura, desconectando así a la neurona de sus relevos posinápticos (figura 5) (Yong et al., 1999).

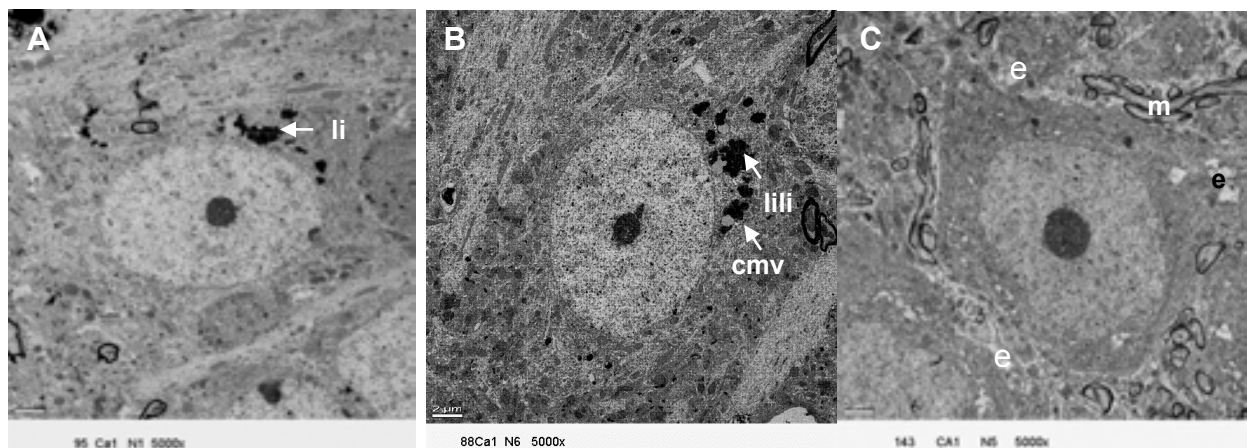


Figura 4. Signos de envejecimiento de las neuronas piramidales del CA1 a 5,000x. En A, lipofusina (li); B, lisosomas con lipofusina (lili) y cuerpos multivesiculares (cmv) y en C, espacios (e) y mielina (m) perisomáticos. Los números corresponden al animal y a la neurona. Imágenes del archivo del laboratorio de la Díaz-Cintra y del material preparado en la Unidad de Microscopía por la Tec. L. Palma.

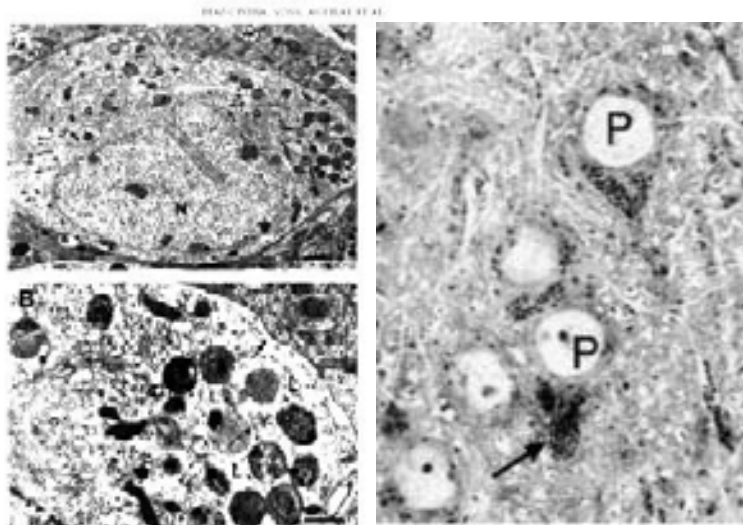


Figura 5. A, Lisosomas en célula del CA1. Se observa su núcleo (N) bilobulado y el cúmulo de lisosomas (L), ampliados en B (tomado de Díaz-Cintra et al., 2004). En la figura de la derecha, la flecha indica la “meganeurita” formada por el cúmulo de lisosomas en dos neuronas piramidales (P) del CA1 (modificado de Young, et al., 1999).

6 - NEURONAS PIRAMIDALES Y SU ESTRUCTURA SUBCELULAR

En las neuronas se reconocen tres regiones distintas: un soma que contiene el núcleo; dendritas ramificadas y finas; y un axón, recto más largo que las dendritas y que puede estar cubierto de mielina. Las neuronas se reconocen por su forma multiangular, su gran núcleo y los cuerpos de Nissl en el citoplasma. El soma es la parte globular o poliédrica rodeada por la membrana plasmática o plasmalema (7-8nm de grosor), contiene al núcleo y el citoplasma circundante que da origen a los procesos de la célula. La porción citoplásmica que circunda al núcleo constituye el pericarion. El soma es de forma piramidal (10-50 μ m de diámetro), con una dendrita que se ramifica en todas las direcciones y que tiene digitaciones denominadas espinas (figura 6). En la zona basal surge un axón que emite colaterales en ángulo recto para formar sinapsis a nivel de las distintas capas por las que pasa. Las neuronas piramidales se clasifican en: pequeñas, medianas, grandes y gigantes o de Betz (150 μ m), son de tipo excitatorio (glutamatérgicas), y elementos clave en el mecanismo del enlace global de la percepción haciéndola unificada, continua y coherente, así como de proyección (Peters et al., 1991; DeFelipe y Fariñas, 1992; Felleman y Van Essen, 1991; Dehaene et al., 2003).

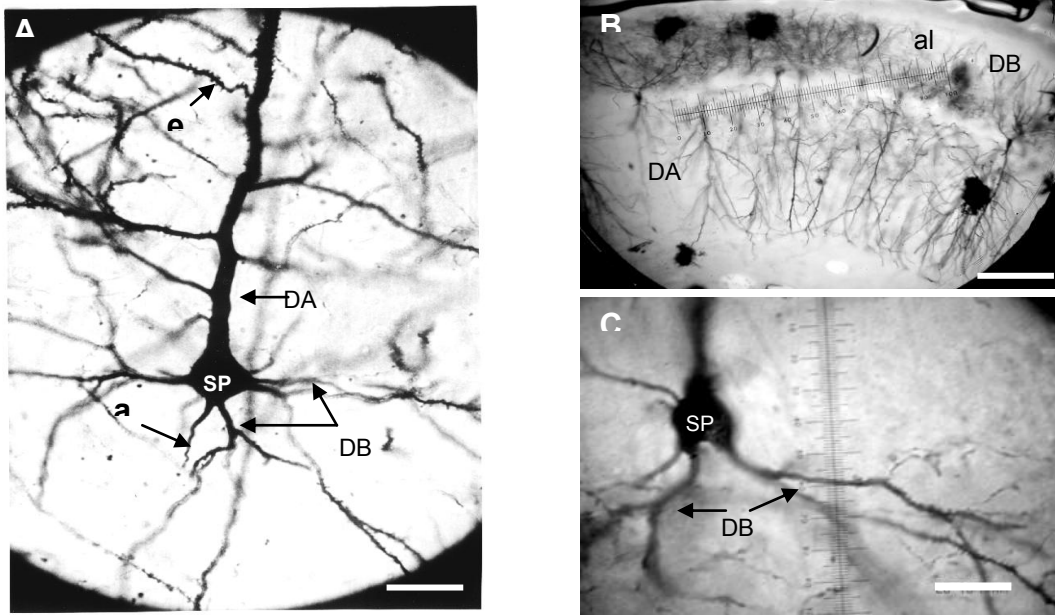


Figura 6. Neuronas piramidales observadas por contraste con la técnica de Golgi de impregnación argéntica. En A, neurona piramidal de la corteza donde se muestra el soma piramidal (SP), la dendrita apical (DA) y basales (DB), las espinas (e) y el axón (a); en B, área CA1 del hipocampo, en donde las neuronas están orientadas hacia el alveus (al) del hipocampo y en C neurona piramidal del área CA3 hipocámpica. En A y C barra-25 μm y en B, -100 μm . Imágenes del laboratorio de la Dra. Díaz-Cintra.

6.1 - Núcleo

Las neuronas piramidales tienen un núcleo grande y esférico localizado en el centro del cuerpo celular (figura 6). En neuronas pequeñas el núcleo ocupa la mayoría del cuerpo celular con solo una cubierta delgada de citoplasma alrededor. En neuronas más grandes el núcleo se encuentra libre en el citoplasma, circunscrito por una membrana nuclear y separado de otros organelos por un halo distintivo claro. El carioplasma de las neuronas no presenta partículas de cromatina y la membrana nuclear presenta poros (Peters et al., 1991). Los núcleos de las neuronas tienen pliegues y dobleces en la membrana nuclear, que es delgada con invaginaciones que le dan una apariencia dactilar la cual contribuye a la densidad de su tinción y podría en ciertas imágenes sugerir una inclusión intranuclear. El núcleo contiene un nucléolo grande, denso, esférico y conspicuo entre 3-7 μm de diámetro (Marinesco, 1909).

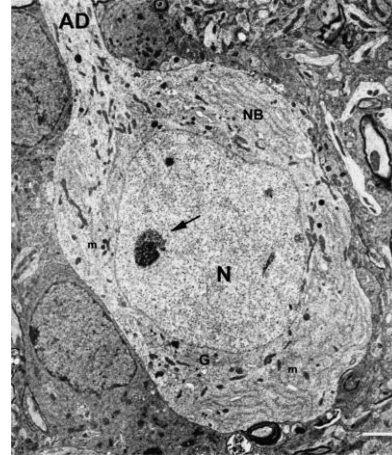
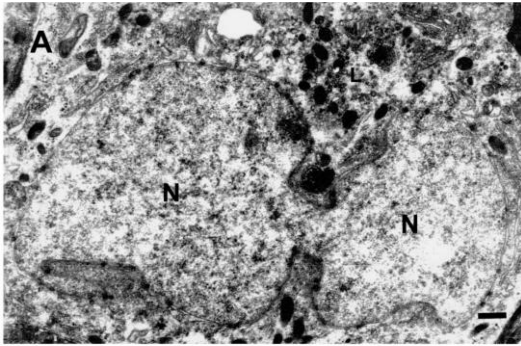


Figura 7. Somas de neuronas piramidales. La fotomicrografía de la izquierda muestra el soma de una neurona piramidal binucleada la barra =1 μ m la imagen de la derecha muestra el soma de una neurona piramidal con núcleo integro, la cromatina se encuentra formando el nucléolo (flecha); barra = 2 μ m (Díaz-Cintra et al., 2004).

6.2 - Mitocondrias

Las mitocondrias neuronales se describen como pequeños gránulos esféricos o filamentos de aproximadamente 0.1 μ m de diámetro, son variables en tamaño y forma; de forma cilíndrica de 0.5 μ m de grosor, mientras que otras son elongaciones de 0.1 μ m de diámetro y varios micrómetros de largo (figura 7). En el pericarion las mitocondrias se encuentran distribuidas al azar a través del citoplasma, e íntimamente asociadas con organelos que requieren trifosfato de adenosina (ATP) generado por su actividad oxidativa (Peters et al., 1991). Se ha mostrado que las mitocondrias se encuentran en constante movimiento, cambiando su forma, tamaño y su posición en la célula, migrando a tasas variables de una región a otra en el citoplasma, con movimientos de torsión lenta o saltatorios rápidos que resultan en un progreso lineal con patrones espacialmente confinados que en las células eucariotas, se les conoce como transporte intracelular (Alberts et al., 1996). Cada mitocondria está limitada por una membrana lisa que encierra una segunda membrana plegada interna que circunscribe un espacio interno, la matriz mitocondrial, mientras que el espacio entre las dos membranas (compartimento mitocondrial externo), tiene un contenido lúcido (figura 8A). Las dos membranas presentan importantes diferencias en estructura, composición química y función. En las neuronas, las mitocondrias elongadas son comunes y contienen

cisternas orientadas de manera longitudinal y contienen pocos gránulos densos en la matriz en comparación con hígado, riñón o músculo. Estos gránulos son depósitos de hidroxapatita confinada por la actividad oxidativa de la mitocondria en presencia de iones de calcio. Quizá la escasez de gránulos mitocondriales está ligada a las bajas reservas y a los altos requerimientos de glucosa y oxígeno característicos del sistema nervioso (Peters et al., 1991).

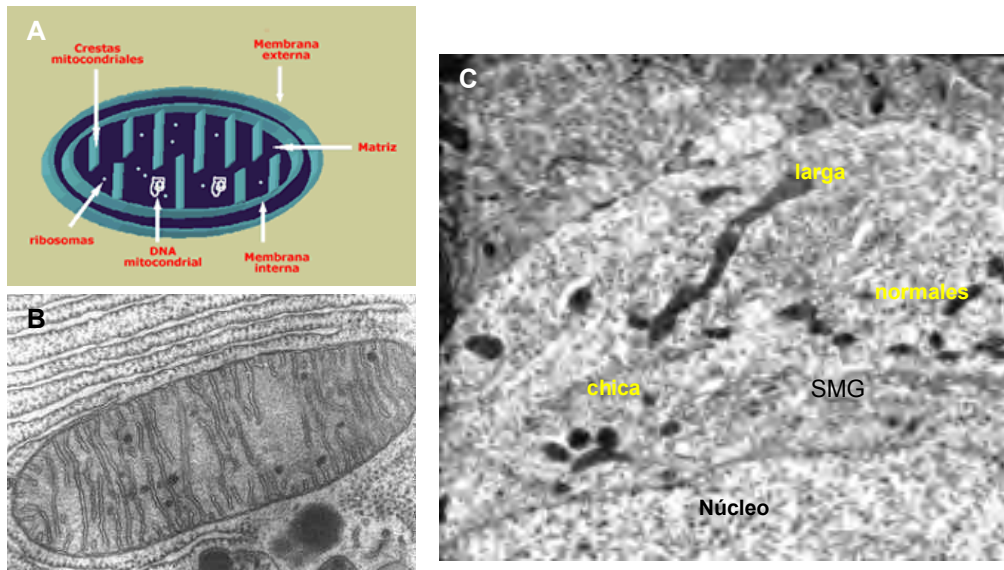


Figura 8. Mitocondrias. En A, esquema de la estructura mitocondrial¹. B, micrografía de una mitocondria con aumento de 60,000X tomada de www.biologia.edu.ar/microscopia/meb.htm. Barra=0.5 µm; en C, micrografía que muestra los diversos tamaños: chicas (<0.5µm), normales (0.5-2µm) y largas (>2µm), micrografía de archivo para el artículo de Díaz-Cintra et al., 2004. Barra = 1 µm.

6.3 – Sistema Membranal de Golgi

En neuronas observadas con microscopía óptica, el sistema membranal de Golgi (SMG) o complejo de Golgi, es un conjunto de membranas enmarañada con pequeñas vacuolas dispersas alrededor del núcleo en forma de letra C. Camilo Golgi descubrió este organelo en varios tipos celulares de diferentes especies animales. En microscopía electrónica el SMG se observa como un complejo de cisternas amplias y aplanadas contiguas con gran cantidad de pequeñas vesículas diversas (figura 9). Este agregado de cisternas está dispuesto en la zona media del pericarion, equidistante entre la membrana nuclear y al plasmalema. Las cisternas del SMG están dispuestas en

¹ <http://www.isftic.mepsyd.es/w3/eos/MaterialesEducativos/mem2001/biologia/citoplasma/organelas.htm>

arreglos curvos de varios micrómetros de extensión, cada uno de los cuales es conocido como SMG, con cisternas grandes apiladas en columnas de cinco a siete con muy poco espacio entre ellas. El empaquetamiento cercano de las cisternas y la ausencia de ribosomas, ya sean adheridos o libres, distingue al SMG tanto del retículo endoplásmico liso como de la sustancia de Nissl. Aunque las cisternas se ramifican y sus ramas se unen después entre sí, hay muy poca interconexión entre ellas a diferentes niveles dentro de una pila. Estudios morfológicos e histoquímicos en tejidos neuronales indican que el SMG no es homogéneo pero que sus cisternas presentan características diferenciales dependiendo de su localización en la pila. Se distinguen dos superficies en cada pila de cisternas: una cara convexa (*cis*) o externa y una cara cóncava o interna (*trans*). Las proteínas de secreción, entran al SMG por la cara *cis* y pasan a través de él para ser transformadas y liberadas desde la cara *trans*. Las cisternas de la cara externa o *cis*, la más exterior, presentan poros, mientras que las más profundas en la pila presentan pocas interrupciones. Las cisternas más profundas, en la cara interna o *trans* del SMG, están expandidas en vacuolas que en algunos casos alojan contenido denso (Peters et al., 1991).

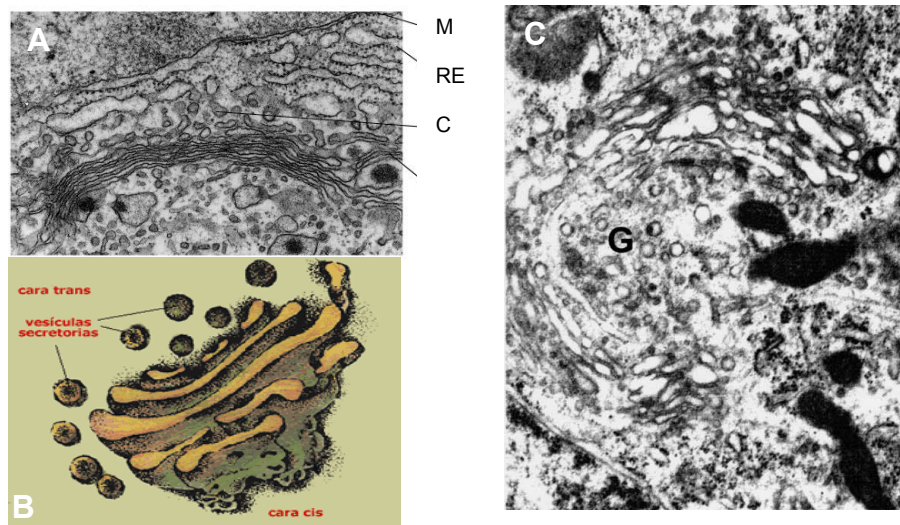


Figura 9. Sistema membranar de Golgi. En A, se aprecian la membrana celular (M), el retículo endoplásmico (RE) las cisternas (C), modificada de Peters et al., 1991. En B², la distribución del SMG. En C, el SMG (G) de una célula piramidal del hipocampo de un animal joven control (imagen de archivo laboratorio Dra. Díaz-Cintra).

² <http://www.isftic.mepsyd.es/w3/eos/MaterialesEducativos/mem2001/biologia/citoplasma/organelas5.htm>

6.4 - Lisosomas

Los lisosomas son vesículas membranosas encargadas de la digestión celular de macromoléculas mediante enzimas hidrolíticas y proteolíticas. Se conocen alrededor de 40 enzimas diferentes, entre las que se encuentran fosfatasa ácida y otras enzimas hidrolíticas, contenidas en los lisosomas. El pH de los lisosomas es de 4.8, lo que permite la acción de las enzimas digestivas. Las neuronas contienen un abundante número de lisosomas que tienen un diámetro de entre 0.3 y 0.5 μm , en su mayoría. Estos son lisosomas primarios que surgen del SMG y reciben, mediante transporte vesicular, enzimas hidrolíticas sintetizadas en el retículo endoplasmático rugoso. Tienen un contenido de enzimas hidrolíticas inactivas de apariencia homogénea finamente granular y se unen tanto a vacuolas que contienen materiales fagocitados del medio externo (mediante heterofagia, llamados fagosomas) como a vacuolas con organelos intracelulares (autosomas, formados por autofagia). Cuando los lisosomas primarios se fusionan con estas vacuolas, sus enzimas hidrolíticas se activan y digieren el contenido de las vacuolas. Esto conduce a una serie de lisosomas secundarios más grandes de una gran variedad de formas y tamaños. En las neuronas, algunos de estos lisosomas más grandes pueden medir de 1 a 2 μm y a diferencia de los lisosomas primarios su contenido es oscuro y heterogéneo. En ocasiones estos lisosomas secundarios contienen membranas en pilas o en espirales y gránulos de diversos tamaños y densidades (figura 10) (Peters et al., 1991).

6.5 - Cuerpos Multivesiculares

Son esféricos de 0.5 μm de diámetro limitados por una membrana unitaria, con pequeñas vesículas esféricas y elipsoidales y con otras inclusiones entre las cuales se pueden encontrar, filamentos, gránulos, masas densas irregulares y membranas (figura 11). La matriz en la que las inclusiones están insertas puede ser tanto clara como oscura. Un lado del cuerpo multivesicular (CMV) es aplanado y en donde se adhiere una placa de material estriado, similar en apariencia a la cubierta de una vesícula revestida de la proteína vesicular, clatrina. Aunque los CMVs se presentan de manera conspicua en el pericarion de las neuronas y en dendritas y axones, se asocian al SMG en grupos de tres o más (Peters et al., 1991).

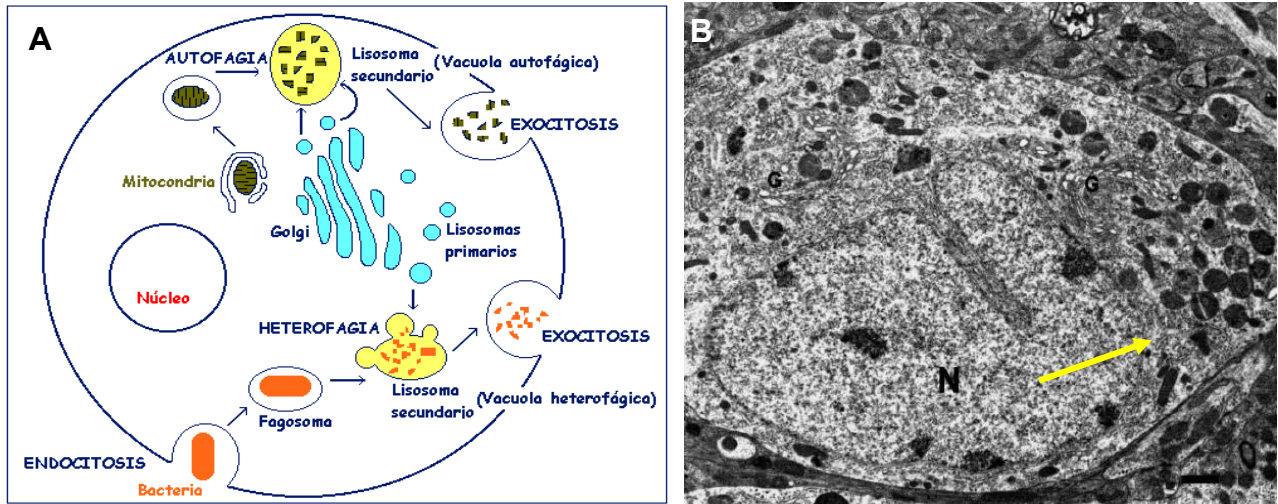


Figura 10. Lisosomas. En A, esquema de los 2 tipos de lisosomas: primario, en “reposo”, y secundario, esquema modificado de http://perso.wanadoo.es/sancayetano2000/biologia/apu/tema2_11.htm. En B, fotomicrografía (20,000x), de lisosomas acumulados por envejecimiento (flecha), núcleo (N), SMG (G); barra - 1 μ m; imagen modificada de Díaz-Cintra et al., 2004.

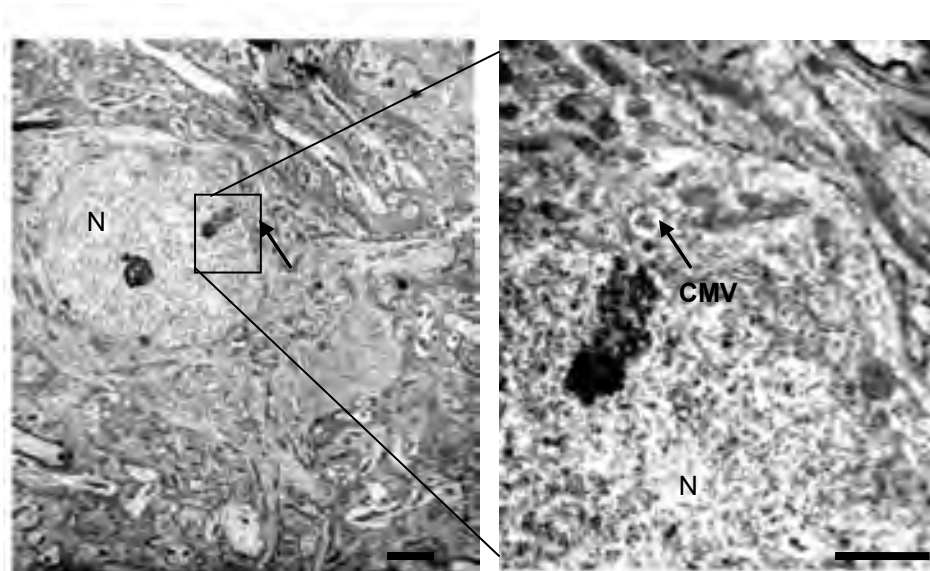
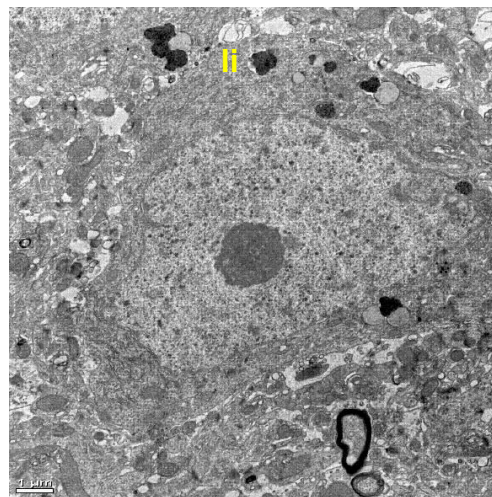


Figura 11. Cuerpo multivesicular. Micrografías de una piramidal del CA1 en donde se indican el núcleo (N) y en el recuadro una ampliación mostrando un cuerpo multivesicular (CMV), material de este trabajo. Barras = 2 μ m.

6.6 - Cúmulo de Lipofuscina

Es un material electrodensito autofluorescente de color pardo que se acumula en gránulos. A medida que el sujeto envejece o si presenta enfermedad o trauma, muchos de los lisosomas se convierten en gránulos de lipofuscina (Brunk & Terman, 2002a; Gray & Woulfe, 2005). Después de la digestión lisosomal, las sustancias se difunden al citosol, las no digeridas se acumulan y forman el cuerpo residual, con material membranoso más líquido que al oxidarse forman el material pigmentado llamado lipofuscina. En neuronas de animales jóvenes se encuentran pocos gránulos redondos de 0.12 a 0.50 μm limitados por una membrana que contiene material homogéneo oscuro y tienden a presentarse en la vecindad del SMG. Otros cúmulos limitados por membrana dan la apariencia de fagosomas primarios ya que su matriz oscura contiene pequeños cuerpos densos y bandas de material denso. Tales gránulos muestran menos cercanía al complejo de Golgi y son más grandes que los lisosomas (0.5 a 1.5 μm de diámetro). Al avanzar la edad, un tercer tipo de gránulos de lipofuscina, comienzan a aparecer, limitados por una membrana y más grandes que los dos tipos anteriores de gránulos (1.5 a 2.5 μm). Un rasgo importante de los gránulos de lipofuscina es que tienen una o dos vacuolas localizadas en su periferia y el resto del gránulo contiene una mezcla heterogénea de partículas densas y bandas (figura 12). El depósito de gránulos de lipofuscina puede o no presentarse en las neuronas (Peters et al., 1991).



CA1 109 10000x

Figura 12. Acumulación de gránulos de lipofuscina (li). Neurona piramidal del CA1 del hipocampo. Micrografía tomada de Díaz-Cintra, 2004.

6.7 - Mielina

En los axones, las capas de las vainas de mielina se arreglan de manera espiral, terminando la más interna primero. A medida que las capas de mielina terminan la cubierta se vuelve gradualmente más delgada formando los nodos de Ranvier, que separan los internodos de mielina, en donde el axón está descubierto, pero con un recubrimiento de base denso (Peters, 2009). Un oligodendrocito forma varias extensiones internodales de mielina, cada una en un axón distinto, mientras mayor diámetro tiene el axón, más gruesa es su cubierta de mielina y más largos sus internodos. Los oligodendrocitos que mielinizan axones de diámetro pequeño forman más extensiones internodales de mielina que aquellos que mielinizan axones de mayor diámetro. La mielina contiene lipoproteínas, por lo que en cerebros no fijados las cubiertas de mielina tienen un brillo blanco. En los tractos del SNC que contienen en su mayoría fibras nerviosas mielinizadas y pocas neuronas son denominados materia blanca. En contraste, la materia gris contiene los cuerpos celulares y dendritas de neuronas y menos fibras nerviosas mielinizadas (Peters, 2009).

Mediante microscopía electrónica, se han examinado los efectos del envejecimiento normal en los oligodendrocitos de la corteza de mono Rhesus, en donde el grosor de las vainas de mielina se encontró incrementado, aunque esta mielina se encontró degenerada (figura 13). En otro estudio, mediante inmunohistoquímica para la proteína básica de la mielina, se encontró degeneración de los oligodendrocitos asociada a la edad en el campo CA1 del hipocampo del ratón transgénico para senescencia acelerada (Tanaka, 2005).

Por otra parte, Almeida y colaboradores (2005), mediante microscopía electrónica, encontraron, en ratas malnutridas posnatalmente con una dieta de 8% de proteína, formación deficiente de mielina con alteraciones en su estructura a los 30 y 60 días de edad, así como desorganización de los axones.

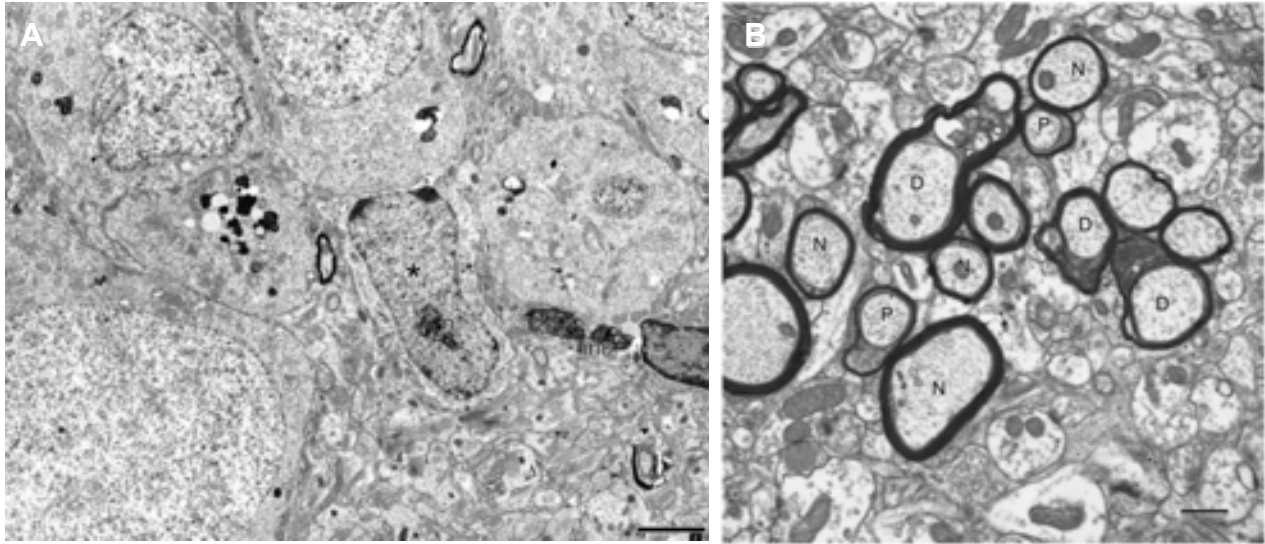


Figura 13. Mielina circundante al soma. En A, capa granular del giro dentado de mono Rhesus macho de 12.5 años de edad, se observa la mielina circundante al soma (flecha); célula inmadura marcada con BrdU (*), nucléolo (n); inclusiones (inc); barra= 2µm; micrografía modificada de Ngwenya et al., 2008. En B, haz de fibras nerviosas en la corteza visual primaria de mono Rhesus de 29 años de edad. En este haz algunas de las fibras nerviosas (N) tienen cubiertas normales y están seccionadas a través de los internodos, y otras a través de los paranodos (P). Tres fibras nerviosas (D) tienen cubiertas en proceso de degeneración, como lo indica la acumulación de citoplasma denso en se paraciones entre lamelas. Barra= 1µm. Modificado de Peters, 2009.

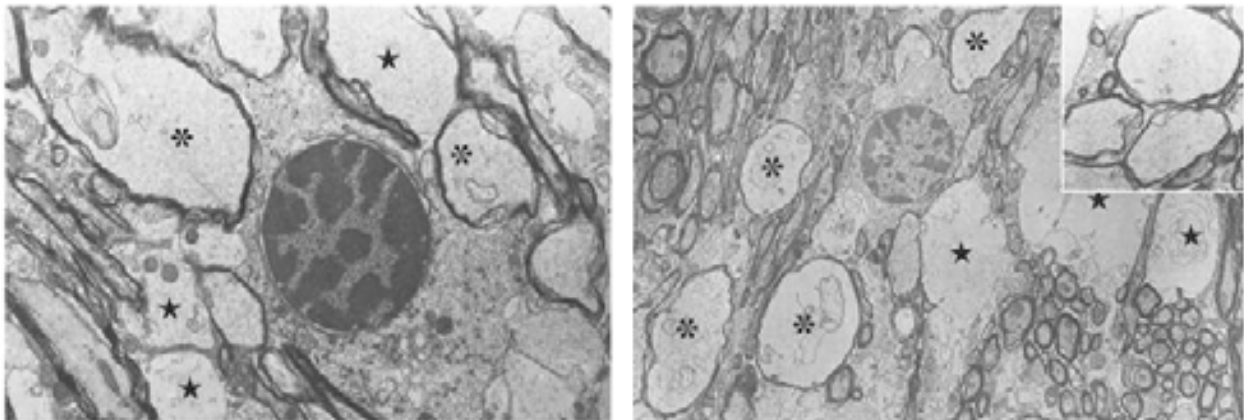


Figura 14. Espacios circundantes a somas. En A, Oligodendrocito picnótico con axones dilatados (asteriscos) mostrando disolución citoesquelética y procesos astrocíticos dilatados (estrellas); rata Wistar con oclusión de la arteria cerebral media (ACM) cuatro horas antes de su muerte (5,000x). En B, vacuolas en materia blanca isquémica que corresponden a procesos astrocíticos (estrellas) y axones mielinizados distendidos (asteriscos) observados 6 horas después de la oclusión de la ACM; el oligodendrocito también muestra cambios degenerativos avanzados (2,500x); el inserto muestra la estructura del axoplasma residual (6,200x). Micrografías modificadas de Pantoni et al., 1996.

6.8 - Espacios Conspicuos

La presencia de espacios circundantes al soma ha sido considerada un signo de degeneración en diversos estudios. En 1995, Sekiguchi y colaboradores encontraron, mediante microscopía electrónica, espacios libres de células y defectos de laminación en la capa piramidal del área CA3 del hipocampo del ratón “tejedor”, un transgénico con una mutación espontánea en el cromosoma 16 que fenotípicamente muestra tamaño disminuido, andar inestable, debilidad e hipotonía. En estudios de isquemia en el área CA1 del hipocampo se encontraron espacios circundantes a neuronas piramidales que fueron identificados como astrocitos edematosos, ya que tanto la membrana plasmática como la membrana nuclear se observan preservadas (Pagnussat et al., 2007). En ancianos, se ha sugerido una etiología isquémica para un gran grupo de lesiones de materia blanca cerebral. Existe una relación entre el daño celular y la cantidad de organelos y glía dilatados (Pantoni et al., 1996).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El hipocampo es una estructura especializada y altamente susceptible al envejecimiento y a diferentes estímulos estresantes como la malnutrición por el carácter posmitótico de sus neuronas. Asimismo, tales factores afectan al animal desde su peso corporal hasta, de manera diferencial, a las células piramidales del hipocampo y por ende a los procesos cognitivos que dependen de éste. Con base en los antecedentes se infirió que la malnutrición y el envejecimiento producen alteraciones subcelulares en las neuronas piramidales del CA1 del hipocampo. Por lo tanto, se realizó un estudio de morfometría de la organización ultraestructural de diversos organelos citoplásmicos en las células piramidales de seis grupos de ratas jóvenes y seniles, y control y malnutridas en dos periodos de vida (posnatal y crónico [tanto prenatal como posnatal]). Los resultados de la morfometría subcelular obtenidos se contrastaron entre los diversos grupos experimentales, con la finalidad de probar si estas influencias nocivas del ambiente son similares o diferentes, o bien si sus efectos son aditivos o no para alterar el funcionamiento cerebral.

HIPÓTESIS

La malnutrición y el envejecimiento en la rata producen alteraciones en el peso corporal y en las características subcelulares de las células piramidales del campo CA1 del hipocampo dorsal.

OBJETIVOS

Objetivo General

- Producir la malnutrición hipoproteínica e isocalórica en ratas hembras primíparas Sprague Dawley.
- Estudiar los efectos de la malnutrición posnatal y crónica en el peso corporal de recién nacidos (P0) al destete (P23) y a los 90 y 660 días de edad comparados con los grupos control.
- Estudiar las alteraciones subcelulares de las neuronas piramidales del hipocampo dorsal.

Objetivos particulares

- Comparar los pesos corporales de los animales malnutridos (recién nacidos, P0), al destete (P23), y los adultos (P90) y seniles (P660), con los controles de las mismas edades.
- Determinar las características subcelulares de las células piramidales del CA1 del hipocampo dorsal en los grupos:
 - Joven control (JC)
 - Senil control (SC)
 - Joven malnutrido posnatal (JMPos)
 - Senil malnutrido posnatal (SMPos)
 - Joven malnutrido crónico (JMCro)
 - Senil malnutrido crónico (SMCro)
- Establecer las diferencias y analogías subcelulares de las células piramidales del CA1 entre los seis grupos jóvenes y seniles, control y malnutridos.

MATERIALES Y MÉTODOS

1 - Sujetos

Se emplearon 18 ratas macho (3 ratas por grupo) de la cepa Sprague-Dawley criadas en el bioterio del Instituto de Neurobiología en cajas de policarbonato (24x21x45 cm), con ciclo de luz/oscuridad invertido de 12 h (luces encendidas a las 10 horas) y con agua y alimento *ad libitum*. Fueron alimentadas con dos tipos de dieta: una dieta estándar que contiene 23.4% de caseína (control) del laboratorio Purina Chow (Formula 5001), y otra de 6% de caseína (Harlan Teklad, Madison, WI; Formula TD 92090), para producir la malnutrición (ver Tabla 1). Previo al apareamiento, se inició la malnutrición de las madres del grupo MCro, continuándose en sus crías hasta los 90 y 660 días de edad (JMCro y SMCro). Al momento del parto de las madres alimentadas con dieta estándar, se formaron cuatro grupos de crías: dos que se criaron hasta los 90 ó 660 días de edad (grupos control: JC y SC) y dos para los grupos MPos que se sacrificaron a las mismas edades (90 y 660 días, JMPos y SMPos, respectivamente). Los grupos control (JC y SC) fueron alimentados con dieta estándar.

El protocolo diseñado para este trabajo se realizó conforme a las normas internacionales para el manejo y uso de animales de experimentación establecidas por la National Institutes of Health (NIH) y la National Academy of Science (2003; www.nih.gov) y fue aprobado por el Comité de Bioética del Instituto Nacional de Neurobiología de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Dieta Estándar - 23.4% de proteína <i>Lab Rodent Diet 5001 PM1 Feeds, Inc.</i>		Dieta Hipoproteínica – 6% de proteína <i>Teklad Diet 170916</i>	
COMPONENTES	%	COMPONENTES	g/kg
Caseína	23.49	Caseína	60
Metionina	0.67	L-metionina	3.7
Grasa cruda	5.70	Sucrosa	511.74
Cenizas	8.00	Fécula de maíz	153.52
Minerales	2.50	Aceite de maíz	151.80
Kcal/g	4.07	Celulosa	67.16
Fibra	5.10	Minerales	35.00
Extractos libres de nitrógeno	48.70	Fosfato de calcio dibásico	6.02
		Carbonato de calcio	0.73
		Vitaminas	10.00
		Kcal/g	4.30
		Colorante	0.33

Tabla 1. Tabla comparativa de los componentes de los dos tipos de alimento.

2 - Método de malnutrición

Se inició en ratas hembras primíparas con la dieta de 6% de caseína (Morgane et al., 2002) 5 semanas antes del apareamiento, para estabilizar su metabolismo hepático. La dieta se mantuvo durante el apareamiento y se utilizó el tapón vaginal para determinar el inicio de la gestación. Al momento del nacimiento, las crías, se pesaron, y la camada se limitó a 4 hembras y 4 machos. Los grupos de malnutridos crónicos (MCro), permanecieron con la madre hasta el destete, y el grupo de malnutridos posnatales (MPos) se formó con las crías de las madres control que fueron alimentadas por una madre nodriza malnutrida (figura 15). En el día 23, se destetaron todas las crías y se colocaron 3 animales en cada caja con su respectiva dieta. Este diseño de malnutrición (M) permite valorar el daño que producen la MPos y la MCro por carencia de la proteína principal de la leche materna (caseína).

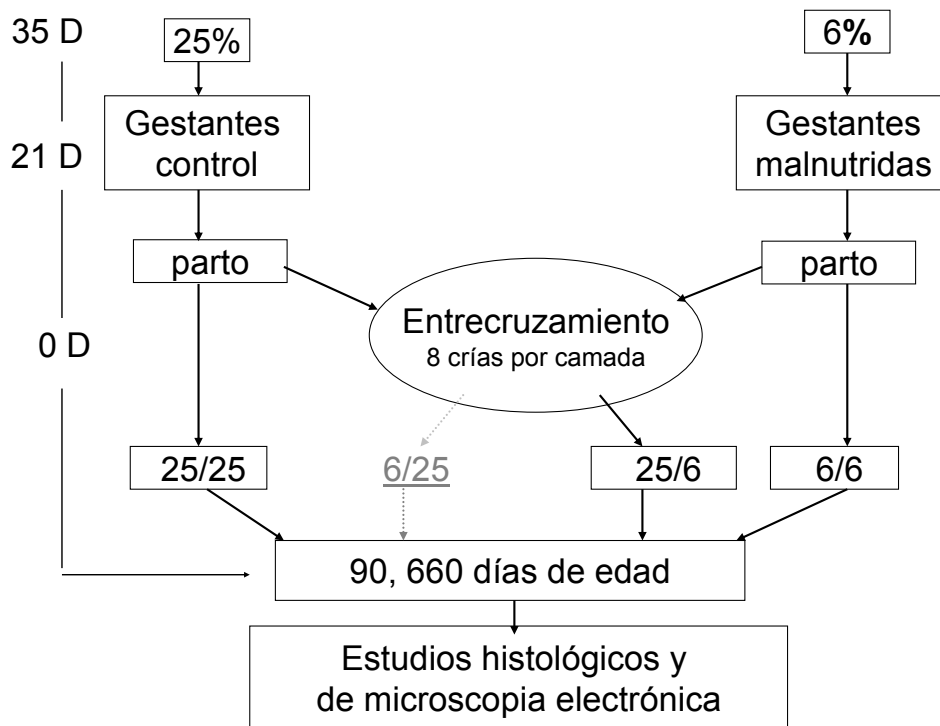


Figura 15. Diagrama de flujo para malnutrición. Se indican como 25% la dieta normal y 6% la dieta hipoproteínica de caseína. Al margen derecho los días (D), 35 antes del apareamiento previos a la gestación, 21 días de gestación y el parto como día 0 (P0), en donde se efectuó el entrecruzamiento de camadas con madres nodrizas. Cada nodriza con 8 crías: malnutridas durante la gestación (6%) y rehabilitadas con una madre nodriza (6/25; usadas para otros estudios); 25/6 malnutridas desde el momento del nacimiento (MPos); el grupo control, 25/25 (C); y el malnutrido crónico, 6/6 (MCro). Al final, las dos edades (90 y 660) objeto del estudio ultraestructural.

3 - Técnica de microscopía electrónica

Todos los animales empleados en el estudio se perfundieron, previa anestesia por inyección vía intraperitoneal con pentobarbital sódico (dosis 1 ml/kg de peso; laboratorio Cheminova), seguida de la perfusión por vía intracardíaca con una solución salina (NaCl 9%) y a continuación otra solución de paraformaldehído al 4% (Laboratorios Sigma-Aldrich) y glutaraldehído al 1.5% (laboratorio Golden Bell) en una solución de 0.1M de buffer de fosfatos (Laboratorios Sigma) a pH 7.4, luego se extrajo el encéfalo, se post fijó 2 horas en la misma solución fijadora y se dejó en buffer de fosfatos, para ser cortado en rebanadas coronales de 200 μ m en el vibratomo (marca Vibratome, modelo 3000). Se separó el hipocampo dorsal a -3.3 de Bregma y se dividió a su vez en los campos CA1, CA3 y giro dentado de acuerdo con el atlas de Paxinos y Watson (1982). Cada bloque se posfijó en una solución de glutaraldehído al 5% y tetróxido de osmio (Ted Pella Inc.) al 2%, posteriormente se deshidrató en etanol a concentraciones crecientes (50%, 70%, 90%, 95% y absoluto) manteniendo la orientación del tejido.

3.1 - Preparación del tejido en plano

Se infiltró el tejido con óxido de propileno (Spi-Chem) y a continuación con resina epóxica (Eponate Polybed-812, Ted Pella Inc.) por 3 días. Su polimerización (en estufa para cultivos marca Felisa a 60°C) se efectuó en dos pasos, primero los bloques individuales se mantuvieron “planos” y se colocaron entre dos portaobjetos de plástico (12h) para su polimerización. Se separaron como pequeñas lentejuelas que requirieron ser reincluidas y fijadas por polimerización a un cilindro de resina epóxica, polimerizado procurando que quedaran en el centro. Después se obtuvo la “pirámide” de la zona de estudio y se hicieron cortes semi finos de 500 nm en un ultramicrotomo MTX de RMC para identificar las neuronas en el CA1 del hipocampo dorsal, tiñéndolas con 0.1% de azul de toluidina a 100°C durante 5 minutos sobre una placa caliente, se lavaron y se observaron al microscopio fotónico Nikon de campo claro. Una vez ubicada la zona se procedió a obtener cortes finos, para ello los cortes se empleó la navaja de diamante, y se colectaron en rejillas de malla de cobre para microscopía electrónica. A continuación fueron impregnados con acetato de uranilo (SPI-Chem) al 2% y citrato de plomo (SPI-Chem) al 2%. Las rejillas clasificadas se observaron en el microscopio electrónico de

transmisión operado a 80 kV (modelo Jeol-100). El criterio de inclusión para todas las neuronas fue que se les distinguiera la dendrita apical, se capturaron imágenes a 5,000X y 8,000X e imágenes de 8 a 12 campos de cada neurona a 20,000X, para la reconstrucción de la imagen de cada neurona completa pegada sobre papel bond, tamaño rotafolio; cada neurona se cubrió con plástico, lo que permitió marcar cada uno de los parámetros celulares incluidos en el estudio morfométrico (figura 16). Para el análisis e interpretación de los montajes se consideró lo establecido por Bozzola (1999) y Peters et al. (1991). En las impresiones a 5,000X, se analizaron en cada neurona dos parámetros perisomáticos los espacios y la mielina. En cada neurona completa se identificaron y marcaron (con diferentes colores) el sistema membranal de Golgi (normal y dilatado), las mitocondrias (normales, chicas y dilatadas), los lisosomas (normales y pleomórficos), los depósitos de lipofuscina y los cuerpos multivesiculares, cerca del sistema membranal de Golgi o dispersos (figuras 11 y 12).

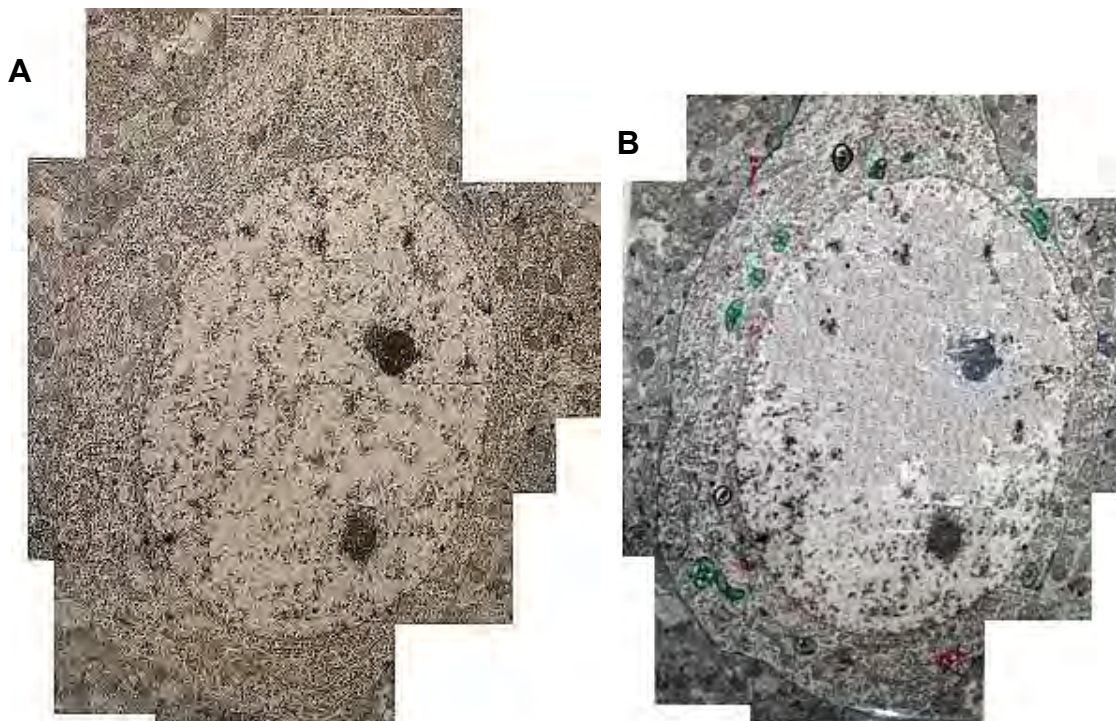


Figura 16. Montaje de una neurona piramidal del CA1 del hipocampo dorsal. En A, el ensamble de 12 impresiones para su reconstrucción, en B, el mismo ensamble, cubierto con plástico y en donde se delimitó el contorno y se marcaron los parámetros de los elementos subcelulares que se incluyeron para el estudio. Barras - 0.5 μ m.

RESULTADOS

1 - Pesos corporales

Se analizaron los pesos corporales de los 6 grupos de ratas macho de la cepa Sprague-Dawley con una ANOVA de dos factores (edad y dieta) que mostró diferencias significativas ($F_{(5,54)} = 175.78$, $P < 0.0001$, $\alpha \leq 0.01$). El análisis *post hoc* de Fisher entre los grupos, con excepción de los grupos JC vs SMPos y entre los grupos JMCro vs JMPos, indicó diferencias significativas entre los demás grupos con valores de p entre 0.05 y 0.001. Las gráficas indican que el grupo que mostró mayor peso corporal fue el SC seguido del SMPos y del JC, al mismo tiempo que los grupos con menor peso fueron los JMCro (figura 17).

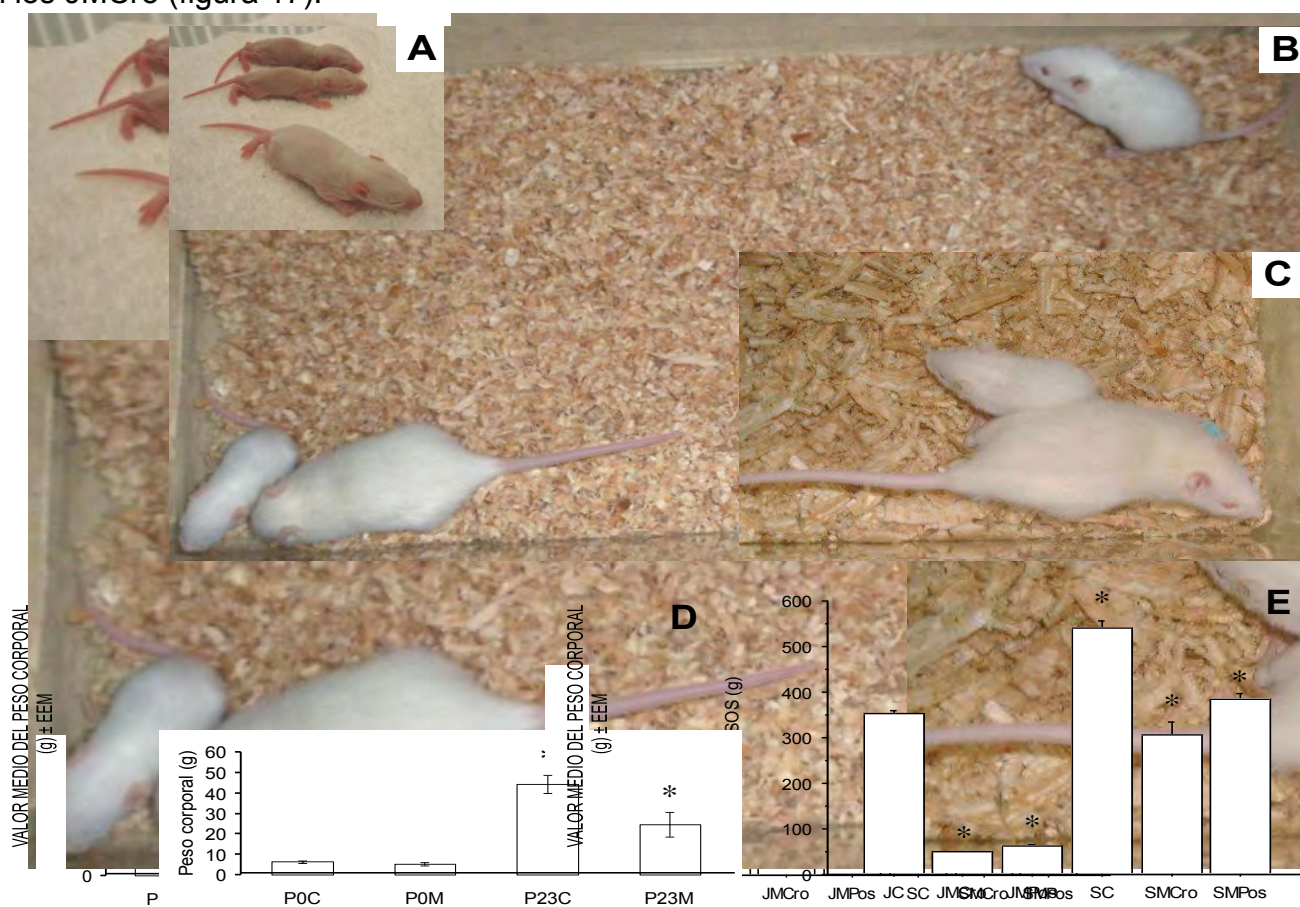
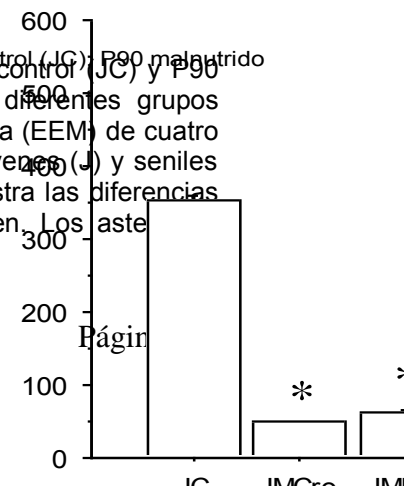
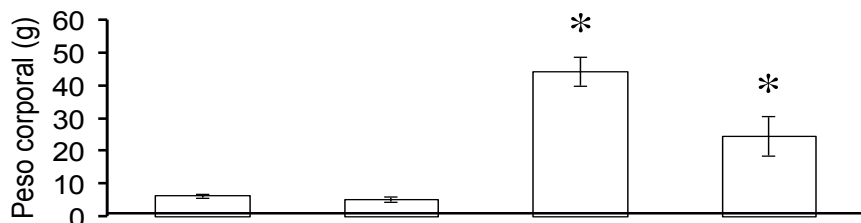


Figura 17. Pesos corporales de los 6 grupos. En A, P0, en B, P23, y en C, P90 control (JC) y P90 malnutrido crónico (JMCro); se muestra el aspecto físico de los sujetos de los diferentes grupos experimentales. En D, gráficas de los pesos corporales (g) ± error estándar de la media (EEM) de cuatro grupos P0 y P23 de controles (C) y malnutridos (M). E, los pesos de los 6 grupos jóvenes (J) y seniles (S), control (C) y malnutridos (M), posnatales (Pos) y crónicos (Cro). La gráfica muestra las diferencias significativas entre los grupos comparados con el grupo de edad al que pertenecen. Los asteriscos indican diferencias significativas.



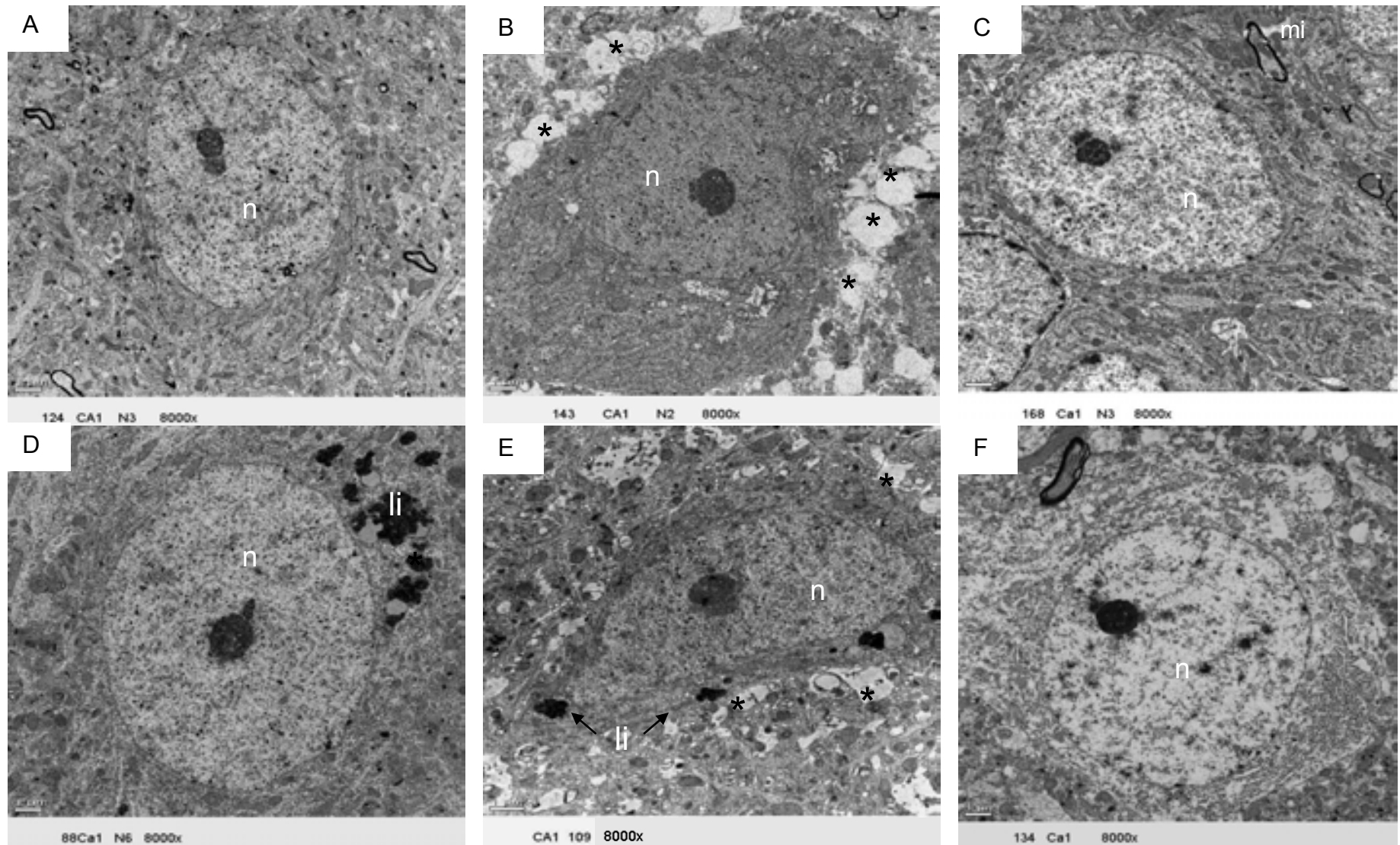


Figura 18. Fotomicrografías de neuronas piramidales del CA1. En A-C, jóvenes (J); control (C) y malnutridos (M), MPos y MCro, respectivamente. En D-F, seniles (S): C, MPos y MCro, respectivamente. Se marcan los espacios perisomáticos con asteriscos (*), abundantes en los MPos (J y S). La lipofusina (Li), es abundante en el SC y SMPos. Abreviaturas, n, núcleo; mi, mielina. En cada imagen el aumento y la barra de calibración = 1 μ m.

2 - Análisis Morfométrico

2.1 - Parámetros del pericarion de las neuronas piramidales del CA1 del hipocampo dorsal

2.1.1 - Mitocondrias

En las figuras 19 y en la Tabla 2, se indican los cambios asociados a la malnutrición y a la edad, en el promedio del número de mitocondrias divididas en normales, chicas y anormales en los 6 grupos analizados. El ANOVA ($\alpha \leq 0.05$) mostró diferencias significativas en las mitocondrias normales entre los grupos ($F_{5,102} = 18.252$ y $P < 0.0001$). En las mitocondrias chicas ($F_{5,102} = 7.33$ y $P < 0.0001$) y en las anormales ($F_{5,102} = 4.69$ y $P < 0.0001$). La prueba *post hoc* de Fisher mostró diferencias entre los grupos con valores de p, entre 0.05 a 0.001.

- a) En las mitocondrias normales las diferencias se localizaron entre los grupos JC con los grupos SC y SMCro. El SC, mostró diferencias significativas con los 4 grupos de malnutridos jóvenes y seniles, además entre los seniles SMPre vs SMCro, ver tabla 2.
- b) En las mitocondrias chicas las diferencias se encontraron entre el grupo de JC con los JMCro y con el SC. El JMCro mostró diferencias con los grupos JMPos, SMCro y SMPos y el grupo SC fue diferente con los SMPos y SMCro, tabla 2.
- c) Las mitocondrias anormales de los animales JC fueron diferentes a los JMPos y SMCro, tabla 2.

En la figura 20, se muestra en cada grupo, la cantidad de los tres tipos de mitocondrias, en donde se pueden distinguir los efectos por la malnutrición y por la edad. Así el grupo JC, mostró menor número de mitocondrias anormales, en tanto que el SC, mostró el mayor número de mitocondrias normales y chicas. La malnutrición crónica produjo mayor número de mitocondrias chicas y la edad y la malnutrición crónica (SMCro), disminución del número de mitocondrias normales y un aumento de las anormales, las diferencias estadísticas se indican en la tabla 2.

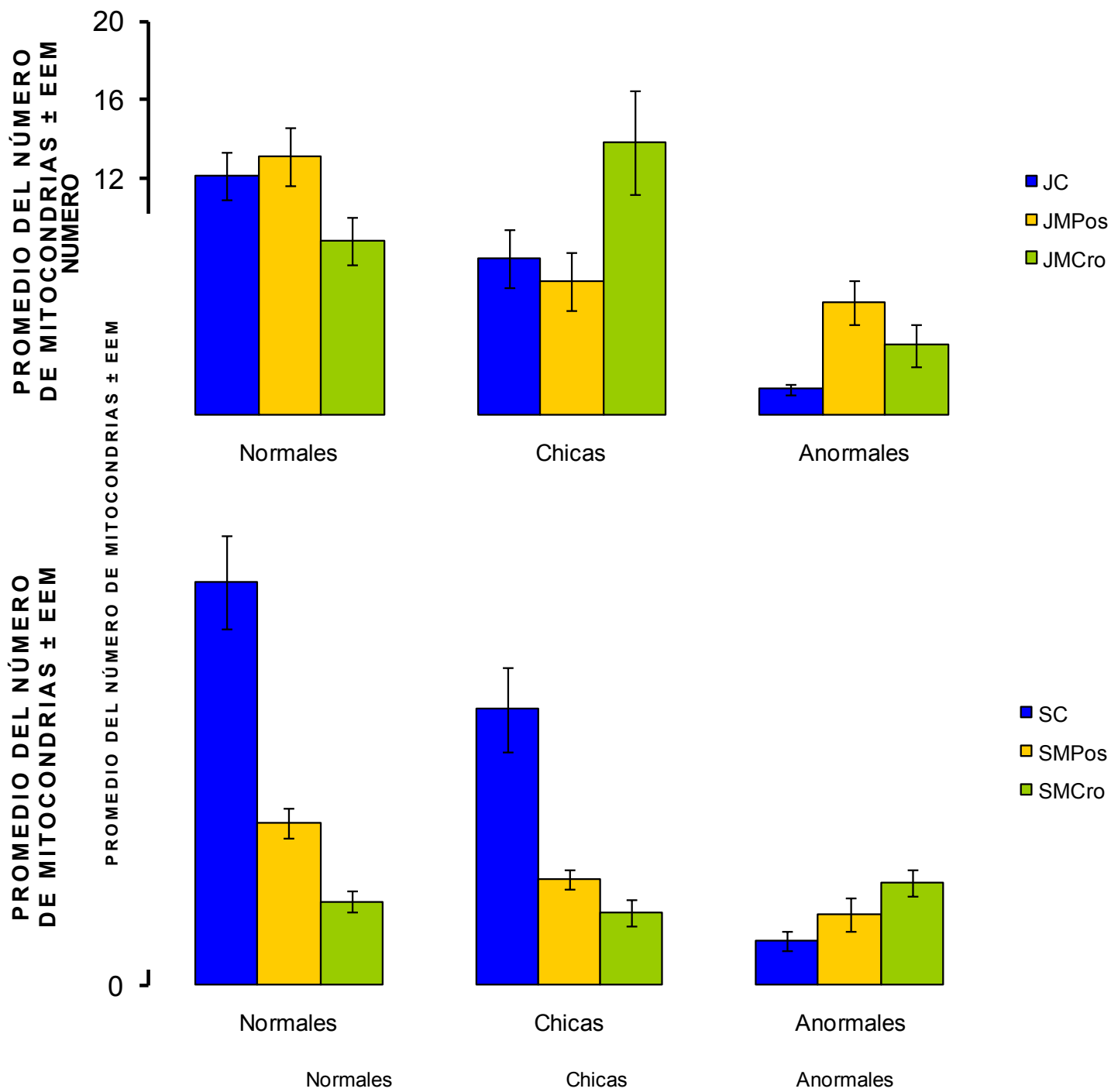


Figura 18.

Figura 18. Promedio del número de mitocondrias. Arriba gráfica de los animales jóvenes (J); abajo gráficas de los animales seniles (S), en ambas los grupos malnutridos (M), posnatal (MPos) y crónicos (MCro). Las diferencias significativas entre los grupos se muestran en la tabla 2.

MITOCONDRIAS

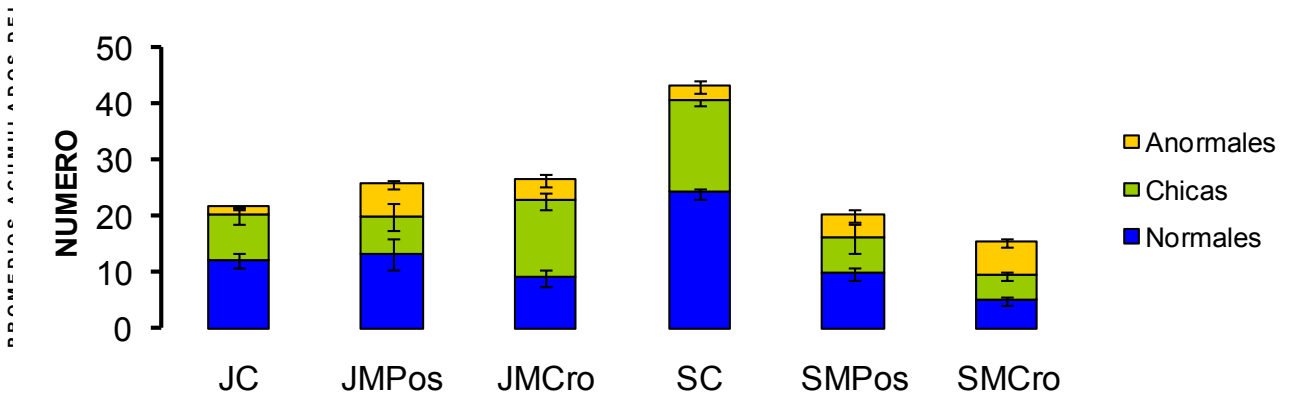


Figura 20. Promedios acumulados del número de mitocondrias por grupos. Columnas divididas en normales, chicas y anormales con los errores estándar para cada grupo. Las diferencias significativas entre los grupos se muestran en la tabla 2.

GRUPO	Vs.	PORCENTAJE DE DIFERENCIAS ENTRE GRUPOS EN EL NÚMERO DE MITOCONDRIAS			
		N	CH	ANOR	TOTAL
JC	JMPos	8	-15	312 ***	22
	JMCro	-27	73 *	156	24
	SC	98 ***	106 **	88	89 ***
	SMPos	-20	-21	204 *	-4
	SMCro	-59 **	-46	340 ***	-27
JMPos	JMCro	-32	104 **	-38	2
	SC	83 ***	143 ***	-54 *	56 ***
	SMPos	-26	-7	-26	-21
	SMCro	-62 ***	-36	7	-40 **
JMCro	SC	171 ***	19	-27	52 ***
	SMPos	9	-54 **	19	-23
	SMCro	-44	-69 ***	72 *	-41 **
SC	SMPos	-60 ***	-61 ***	62	-49 ***
	SMCro	-79 ***	-74 ***	134 **	-61 ***
SMPos	SMCro	-49 *	-31	45	-24

Tabla 2. Porcentajes de diferencias significativas entre las medias del número de mitocondrias normales (N), chicas (CH) y anormales (ANOR) de todos los grupos. Asteriscos: *** $p \leq 0.001$, ** $p \leq 0.01$, * $p \leq 0.05$.

2.1.2– Sistema membranal de Golgi normal y dilatado

En la figura 21 y en la tabla 3, se indican los cambios por la malnutrición en el promedio del número de SMG normal (GN) y dilatado (GD) en los 6 grupos analizados y el ANOVA mostró diferencias significativas en el GN entre los grupos ($F_{5,102} = 4.028$ y $P < 0.0022$). La prueba *post hoc* de Fisher mostró diferencias entre los grupos con valores de p , entre 0.05 a 0.001 como se indica en la tabla 3.

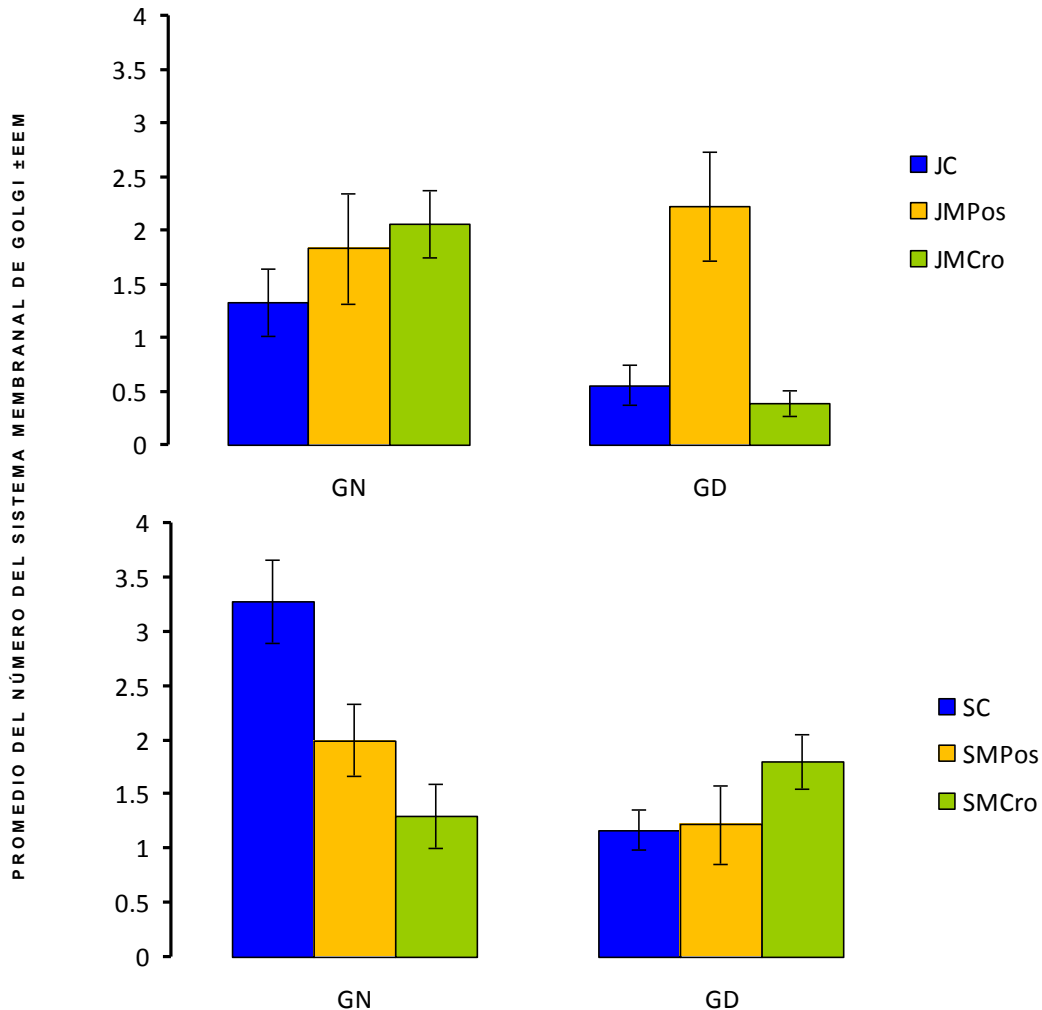


Figura 21. Promedio del número de sistemas membranales de Golgi. Arriba, para los grupos jóvenes. Abajo, para los grupos seniles. Divididos en SMG normal (GN) y SMG dilatado (GD). Nótese la diferencia del grupo SC en relación a los demás grupos tanto en el GN como en el GD. En la Tabla 3 se indican los porcentajes de cambio y los valores de p .

En la figura 22, se muestra en cada grupo, la cantidad del sistema mambranal de Golgi, normal y dilatado, en donde se pueden distinguir un aumento significativo por la malnutrición posnatal en los jóvenes, por la edad en el grupo control y por ambos (M y edad) en el grupo SMCro, ver tabla 3.

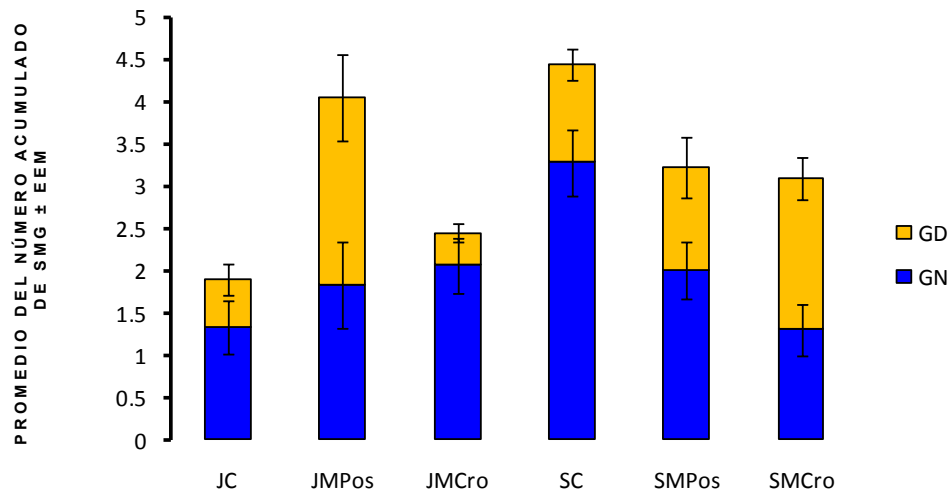


Figura 22. Promedios acumulados del número de SMG por grupos. Columnas divididas en normales y dilatados con los errores estándar para cada grupo. Las diferencias significativas entre los grupos se muestran en la Tabla 3.

GRUPO	Vs.	PORCENTAJE DE DIFERENCIAS ENTRE GRUPOS EN EL NÚMERO DE SMG		
		N	D	TOTAL
JC	JMPos	38 *	300 ***	115 ***
	JMCro	54	-30	29 **
	SC	146 ***	110	135 ***
	SMPos	50	120	71 *
	SMCro	-3	217 **	62 *
JMPos	JMCro	12	-82 ***	-40
	SC	79 **	-47 *	10
	SMPos	9	-45 *	-21
	SMCro	-29	-21	-25
JMCro	SC	59 *	200	82 ***
	SMPos	-3	214	32
	SMCro	-37	354 **	25
SC	SMPos	-39	5	-27 *
	SMCro	-61 ***	51	-31 *
SMPos	SMCro	-35	44	-5

Tabla 3. Porcentajes de diferencias significativas entre las medias del número de sistema mambranal de Golgi (SMG) de todos los grupos. Asteriscos: *** $p \leq 0.001$, ** $p \leq 0.01$, * $p \leq 0.05$.

2.1.3 –Lisosomas, cúmulos de lipofuscina y cuerpos multivesiculares

La figura 23, muestra los cambios por la malnutrición en el promedio del numero de los lisosomas y lipofuscina en los 6 grupos analizados, el ANOVA mostró diferencias significativas en los lisosomas entre los grupos ($F_{5,102} = 13.534$ y $P < 0.0001$). La prueba *post hoc* de Fisher mostró diferencias entre los grupos con valores de p, entre 0.05 a 0.001. En la Tabla 4 se indican los porcentajes de cambio y las diferencias significativas entre los grupos.

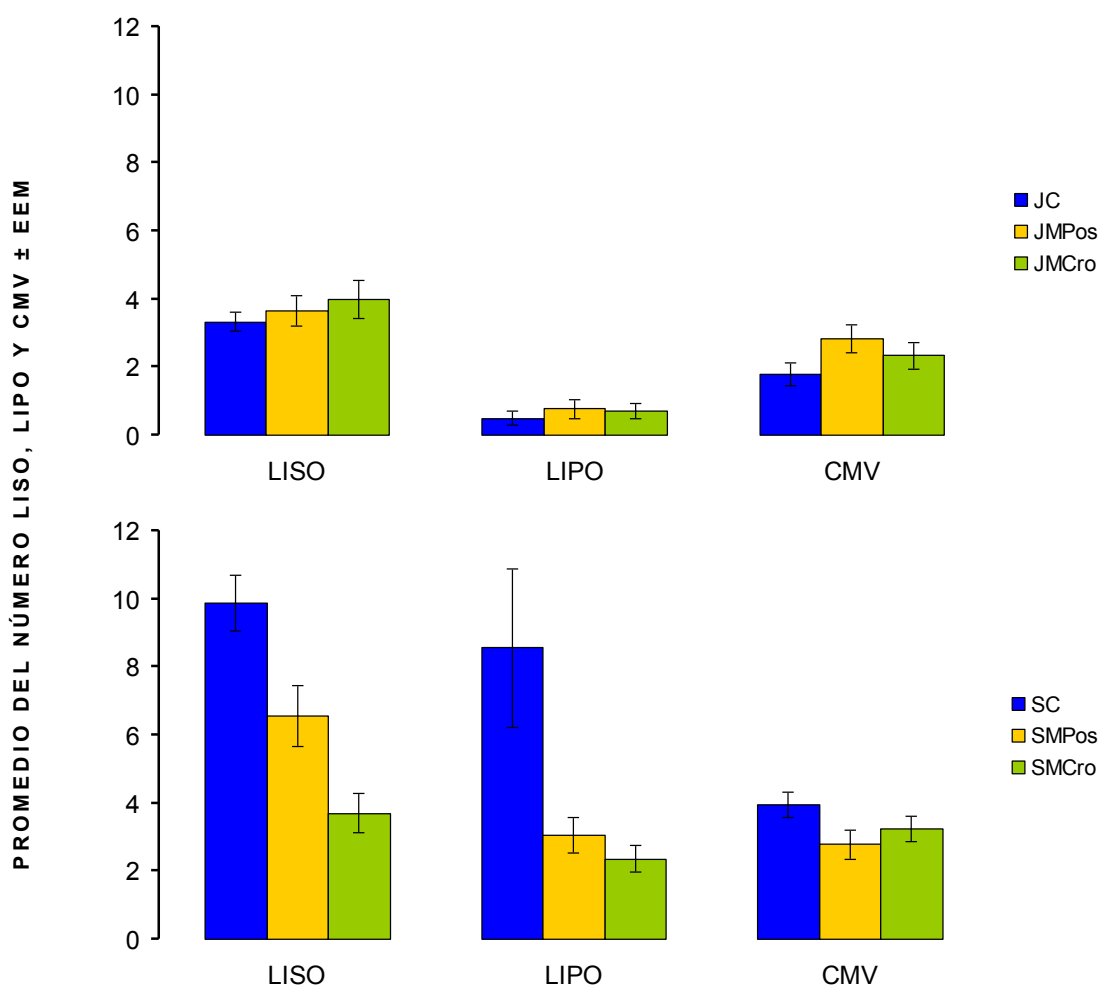


Figura 23. Promedio del número de lisosomas (LISO), lipofuscina (LIPO) y cuerpos multivesiculados (CMV). Arriba graficas de animales jóvenes (J); abajo gráficas de los seniles (S), en ambas, los grupos malnutridos (M), posnatal (MPos) y crónicos (MCro). Las diferencias significativas entre los grupos se muestran en la tabla 4.

En la figura 24, se muestra en cada grupo, la cantidad de lisosomas, lipofuscina y cuerpos multivesiculados, en donde se pueden distinguir un aumento significativo por ambos factores, la edad (SC) y la malnutrición posnatal (SMPos) y crónica (SMCro) ver tabla 4.

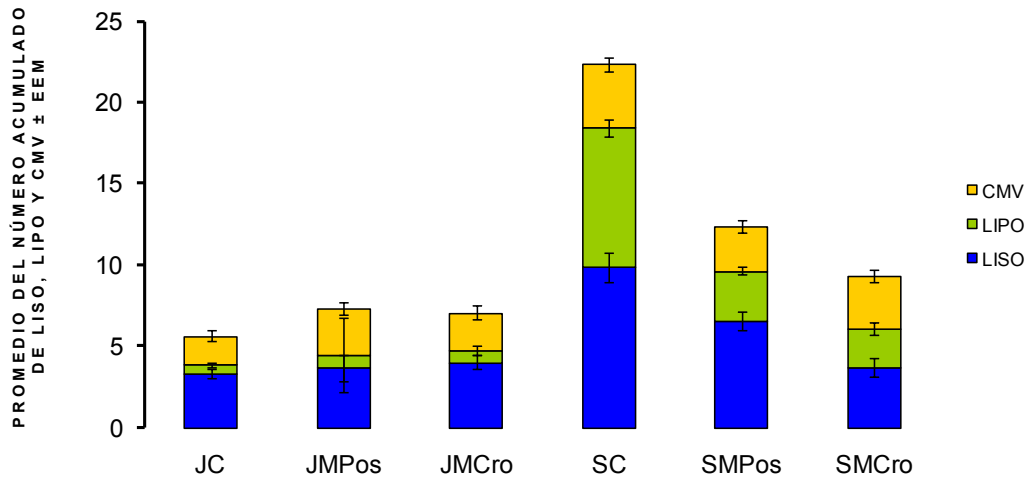


Figura 24. Promedios acumulados del número de lisosomas, lipofuscina y cuerpos multivesiculados. Columnas divididas en cuerpos multivesiculados (CMV), lipofuscina (LIPO) y Lisosomas (LISO), de seis grupos: control jóvenes (JC); y seniles (SC), y malnutridos jóvenes (JMPpre, MCro) y seniles (MSPre y SMCro).

GRUPO	Vs.	PORCENTAJE DE DIFERENCIAS ENTRE GRUPOS		
		LISO	LIPO	CMV
JC	JMPos	28	22	59
	JMCro	20	44	31
	SC	177 ***	1611 ***	122 ***
	SMPos	97 ***	511	56
	SMCro	11	371	82 **
JMPos	JMCro	-6	18	-18
	SC	116 ***	1300 ***	39 *
	SMPos	53 *	400	-2
	SMCro	-13	285	14
JMCro	SC	131 ***	1085 ***	69 **
	SMPos	64 **	323	19
	SMCro	-7	226	39
SC	SMPos	-29 **	-64 ***	-30 *
	SMCro	-60 ***	-72 ***	-18
SMPos	SMCro	-43 **	-23	16

Tabla 4. Porcentajes de diferencias significativas entre las medias del número de lisosomas (LISO), cúmulos de lipofuscina (LIPO) y cuerpos multivesiculares (CMV) de todos los grupos. Asteriscos: *** $p \leq 0.001$, ** $p \leq 0.01$, * $p \leq 0.05$.

2.2 - Parámetros perisomáticos al soma de las neuronas piramidales del CA1 del hipocampo dorsal

El criterio utilizado para la cuantificación de mielina y espacios fue de carácter ordinal: 0, sin espacios o mielina aparente; y I, II, y III cuando se presentaron escasos, regulares o abundantes, respectivamente.

2.2.1 - Mielina perisomática

En la figura 25, se muestran los cambios asociados a la malnutrición en el promedio de mielina circundante al soma en los 6 grupos analizados y el ANOVA mostró diferencias significativas entre los grupos ($F_{5,102} = 13.697$ y $P < 0.0001$). La prueba *post hoc* de Fisher mostró diferencias entre los grupos con valores de p entre 0.05 a 0.001 como se indica en la tabla 5.

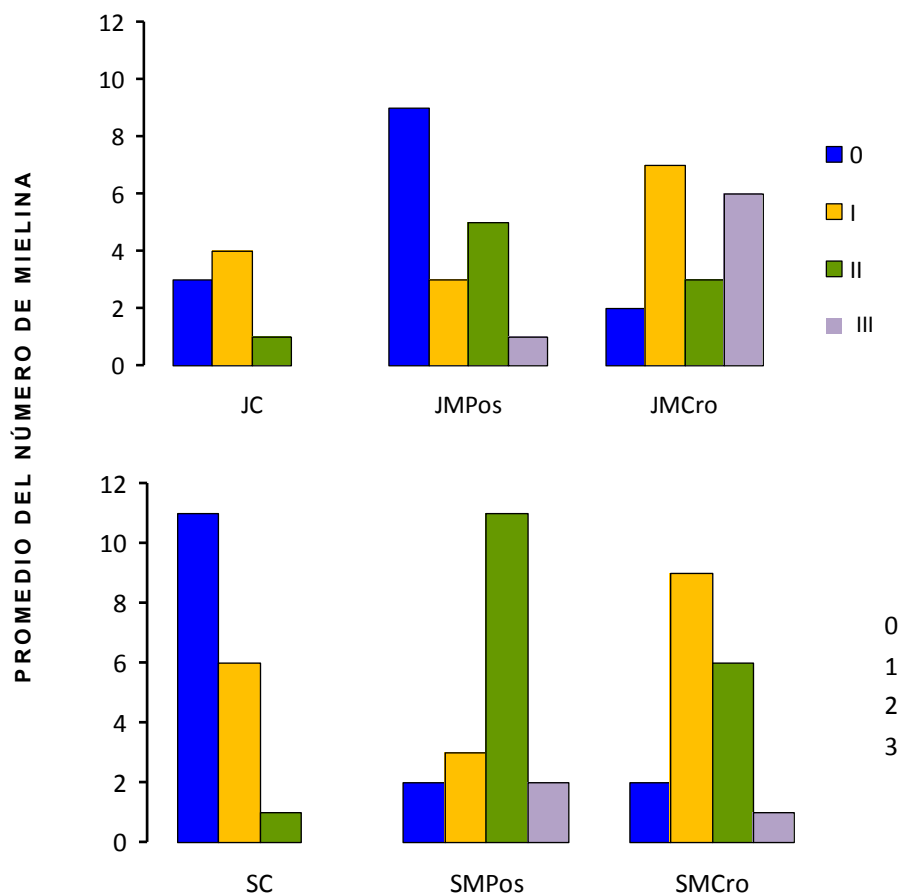


Figura 25. Promedio del número de mielina. Arriba graficas de animales jóvenes (J); abajo gráficas de los seniles (S), en ambas, los grupos malnutridos (M), posnatal (MPos) y crónicos (MCro). Las diferencias significativas entre los grupos se muestran en la tabla 5.

En la figura 26, se muestra en cada grupo, la cantidad de mielina que es menor en los grupos control J y el efecto de la malnutrición en el JMCro y por ambos, edad y malnutrición en los grupos SMPos y SMCro ver tabla 4.

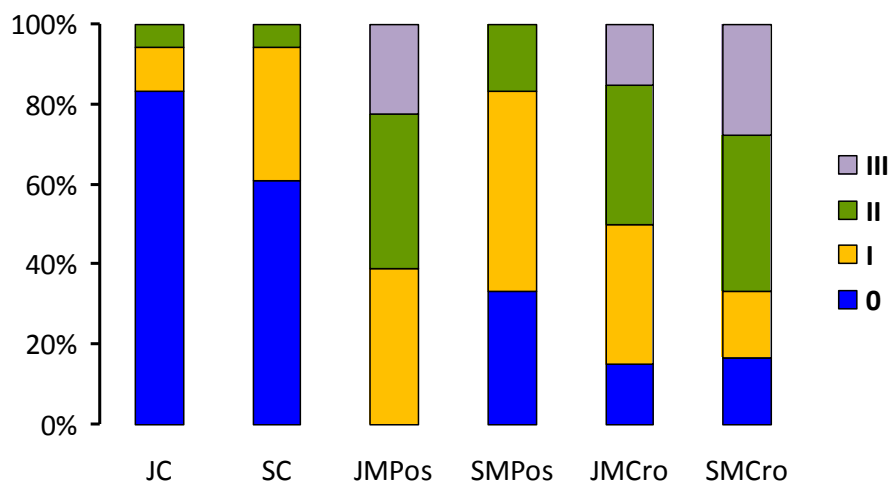


Figura 26. Pocerajes acumulados del número de mielina. Columnas divididas en categorías: 0, I, II y III, nada, poca, regular y abundante, respectivamente de los seis grupos: control jóvenes (JC); y seniles (SC), y malnutridos jóvenes (JMPpre, MCro) y seniles (MSPre y SMCro).

GRUPO	Vs.	MIELINA
JC	JMPos	726 ***
	JMCro	676 ***
	SC	100
	SMPos	275 *
	SMCro	509 ***
JMPos	JMCro	-6
	SC	-76 ***
	SMPos	-55 ***
	SMCro	-26
JMCro	SC	-74 ***
	SMPos	-52 ***
	SMCro	-21
SC	SMPos	88
	SMCro	205 ***
SMPos	SMCro	62 *

Tabla 5. Porcentajes de diferencias significativas entre cada una de las medias de la mielina de todos los grupos. Asteriscos: *** $p \leq 0.001$, ** $p \leq 0.01$, * $p \leq 0.05$.

2.2.2 - Espacios perisomáticos

En las figuras 27, se indica los cambios por la malnutrición y por la edad en la aparición de espacios perisomáticos. El ANOVA mostró diferencias significativas entre los 6 grupos ($F_{5,102} = 14.43$ y $P < 0.0001$), la prueba *post hoc* de Fisher mostró diferencias entre los grupos con valores de *p* entre 0.05 a 0.001, como se muestra en la tabla 6.

La figura 28, indica que fue mayor el porcentaje de espacios perisomáticos en los grupos jóvenes malnutridos (JMPos, JMCro) y por la malnutrición y la edad en los grupos SMPos y SMCro.

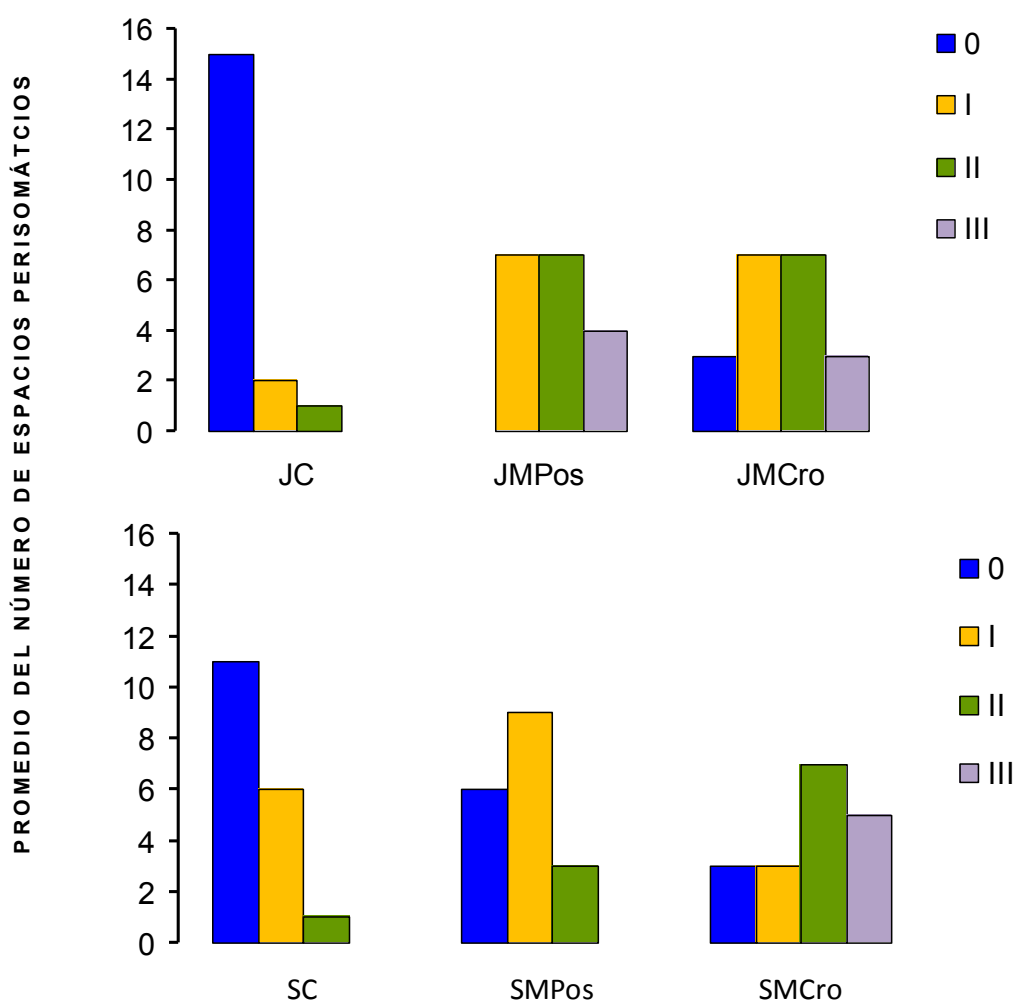


Figura 27. Promedio del número de espacios perisomáticos. Arriba graficas de animales jóvenes (J); abajo gráficas de los seniles (S), en ambas, los grupos malnutridos (M), posnatal (MPos) y crónicos (MCro). Las diferencias significativas entre los grupos se muestran en la tabla 6.

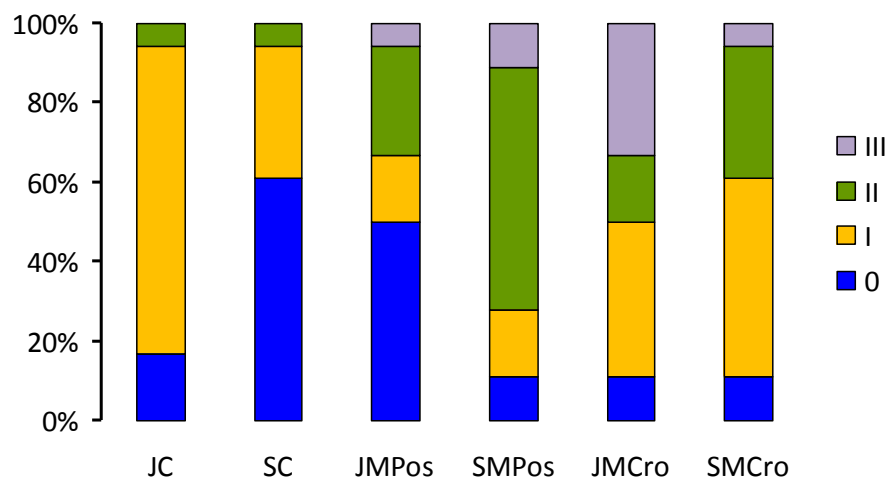


Figura 28. Pocerajes acumulados del número de espacios perisomáricos. Columnas divididas en categorías: 0, I, II y III, ninguno, pocos, regulares y abundantes, respectivamente de los seis grupos: control jóvenes (JC); y seniles (SC), y malnutridos jóvenes (JMPpre, MCro) y seniles (MSPre y SMCro).

GRUPO	Vs.	ESPACIOS
JC	JMPos	726 ***
	JMCro	500 ***
	SC	100
	SMPos	275 *
	SMCro	722 ***
JMPos	JMCro	-27
	SC	-76 ***
	SMPos	-55 ***
	SMCro	0
JMCro	SC	-67 ***
	SMPos	-38
	SMCro	37
SC	SMPos	88
	SMCro	311 ***
SMPos	SMCro	119 ***

Tabla 6. Porcentajes de diferencias significativas entre cada una de las medias de espacios circundantes a somas de todos los grupos. Asteriscos: *** $p \leq 0.001$, ** $p \leq 0.01$, * $p \leq 0.05$.

DISCUSIÓN

Se estudiaron dos variables (malnutrición y el envejecimiento) en dos modelos experimentales de malnutrición durante el periodo posnatal (MPos) y desde la gestación y durante la vida posnatal, malnutrición crónica (MCro), en animales jóvenes de 90 días de edad (J) y seniles de 660 días de edad (S), comparados con sus respectivos controles. El peso corporal de las crías se redujo al momento del nacimiento de manera significativa en los animales malnutridos *in utero* (MCro) y los MPos, en los cuales la reducción fue significativa en relación a los MCro de la misma edad (90 días), considerados animales jóvenes.

El estudio morfométrico se llevó a cabo en 3 animales por grupo de aquellos sujetos experimentales que se utilizaron en la prueba de prevención activa, cuyos datos fueron publicados (Martinez et al., 2009) y en donde se observó que los seniles de 660 días, mostraron reducción del peso en ambos grupos MPos como MCro, y que escasamente alcanzaron el de los controles jóvenes de 90 días (ver figura 17).

Los estudios por periodos largos de tiempo en los animales malnutridos han permitido observar que presentan mayor longevidad y menores rasgos de senilidad o de enfermedades aparentes asociadas al envejecimiento. En apoyo a esta observación, el grupo de Tacconi et al. (1991), pero en animales con dieta restringida, encontraron que no hay aumento de peso debido a la edad, que se incrementa la longevidad y que el deterioro fisiológico que se observa con dieta *ad libitum*, se ve retrasado en estos animales. En conjunto, estas observaciones provocaron la duda de si estos rasgos aminorados del envejecimiento pudieran replicarse en la ejecución de procesos cognitivos, por lo que en el trabajo previo de este laboratorio por Martinez et al. (2009), se reportaron efectos en lo referente al desempeño en la prueba de evitación activa, en donde se tomó en cuenta 20 ensayos tanto para la sesión de adquisición como para la de extinción. Aún cuando los grupos malnutridos (jóvenes y seniles) logran aprender la tarea, el grupo joven malnutrido difiere de manera significativa en su menor desempeño de la prueba en comparación con los otros grupos. Probablemente la malnutrición esté afectando al tejido nervioso y en particular al hipocampo, y quizás el daño producido por la malnutrición es más evidente en etapas tempranas.

Por lo anterior, fue importante conocer los cambios cuantitativos en la estructura neuronal solo en las neuronas piramidales del CA1 del hipocampo dorsal como sustrato anatómico asociado a este aprendizaje (Martínez, 2009). Se diseñó el estudio en donde y después de valorar cualitativamente los parámetros más afectados, evidentes en la mayoría de las neuronas, se procedió al estudio cuantitativo de: los espacios y la mielina alrededor del soma y en el citoplasma y aquellos subcelulares del número de los organelos identificados como mitocondrias, complejos de Golgi, lisosomas asociados a vesículas y lipofuscina. Adicionalmente se hicieron subdivisiones de las mitocondrias (normales, chicas y anormales), del sistema membranal de Golgi (normal o dilatado) y los lisosomas normales o con la lipofuscina. La cual, fue evidente en el grupo SC, probablemente debido a las alteraciones metabólicas de la ingesta *ad libitum* de una dieta normal en animales poco activos y que a largo plazo produce un cúmulo mayor de grasa no solo en el cuerpo sino también en las neuronas.

En los roedores se ha mostrado que la malnutrición prenatal o postnatal produce anomalías estructurales y bioquímicas en diferentes regiones cerebrales, de manera particular en la neocorteza y la formación hipocámpal (Lukoyanov & Andrade, 2000). A su vez, se ha mostrado que durante el desarrollo exhiben numerosos y a menudo cambios conductuales irreversibles incluyendo alteraciones en conductas como la de evitación, la exploratoria y en su comportamiento social; así como, trastornos emocionales y deficiencias relacionadas con la memoria espacial (Lukoyanov & Andrade, 2000). Estos animales muestran hiperactividad ante estímulos dolorosos y aversivos (Rocinholi et al., 1997), menores signos de ansiedad (Hernández & Almeida, 2003); y un pobre desempeño en pruebas que involucran los procesos de aprendizaje y memoria sobre todo de tipo espacial, mismos que requieren la participación del hipocampo (Bedi, 1992).

Por otro lado, es importante considerar que los animales malnutridos presentan retardo en la maduración funcional (Leathwood et al., 1974; Kirkwood & Shanley, 2005). Así que debido a este factor, pudiera ser que los animales de 90 días presentan inmadurez en el sistema nervioso lo cual se ve reflejado en que desempeñen pobremente esta tarea, o bien a que los animales malnutridos invierten la mayor parte de su energía en el mantenimiento de las funciones celulares para lograr la

supervivencia (Kirkwood & Shanley, 2005). En adición a esta idea, en un trabajo previo de Díaz-Cintra et al. (2007), se reportaron efectos diferenciales de las interneuronas GABAérgicas en el hipocampo dorsal de animales malnutridos de 90 días y que pudieran ser el origen de las alteraciones en la excitabilidad, y en la memoria.

Además, los animales malnutridos son sometidos a estrés por el bajo régimen de proteínas, lo que eleva los niveles de cortisol y glucocorticoides en el organismo. Niveles elevados de cortisol en el hipocampo causan daño neuronal, con disminución de la supervivencia y crecimiento de las neuronas, y disminución del factor neurotrófico. Las neuronas hipocampales, al ser sometidas a sobrecarga de estrés y de glucocorticoides, muestran reducción en la densidad dendrítica e inducción de apoptosis (Risco, 2005).

Adicionalmente a estas observaciones, se analizaron los pesos corporales para establecer la ganancia de peso a lo largo del desarrollo, en los animales de 90 días se hace más evidente la menor ganancia de peso en comparación con los animales controles en los animales MPos y MCro, por lo que a partir de esta edad, el peso corporal en los animales malnutridos no se incrementa en la misma proporción en comparación con los animales controles, quizás por haber inducido la malnutrición durante toda su vida lo cual sugiere que con la edad el organismo es capaz de generar un mecanismo de compensación. Con respecto a esta observación, es importante señalar que los animales malnutridos logran mantener mecanismos de plasticidad (respuestas celulares adaptativas ante un factor nocivo externo); los cuales podrían contrarrestar algunos de los daños producidos por la malnutrición posnatal crónica. Esta respuesta adaptativa de plasticidad se muestra en los resultados conductuales obtenidos previamente (Martinez et al., 2009), sugiriendo que la capacidad de aprendizaje y de retención se preserva a lo largo del desarrollo aún en animales SM. Por tanto, se puede inferir que el efecto de la malnutrición por sí sola es más evidente en edades tempranas.

El principal objetivo del presente trabajo fue la identificación del grado de alteración subcelular en el hipocampo de los animales malnutridos comparados con sus controles, así como el factor edad en la estructura subcelular de las neuronas piramidales del CA1. Si se toma en cuenta que las neuronas se encuentran en un

estado de equilibrio homeostático, el cual se puede mantener en respuesta a estímulos de intensidad moderada, pero no frente a estímulos fisiológicos de alta demanda energética y funcional. Bajo estas condiciones, las neuronas reaccionan utilizando diferentes mecanismos de compensación al daño o bien durante el envejecimiento, entre otros, a aquellos en donde los estímulos fisiológicos pueden ser altamente demandantes dando lugar a un estado nuevo y alterado que preserva la viabilidad de la célula (adaptación), cuando la célula ha sufrido modificaciones patológicas que pueden desaparecer cuando dicho estímulo cesa (lesión celular reversible) o cuando la lesión es leve y la lesión celular irreversible, o en donde las alteraciones patológicas son de carácter permanente y que de manera gradual dan lugar a la muerte celular (Feria-Velasco et al., 2004).

En estudios de Neurobiología, se ha estudiado a las alteraciones morfológicas de las células del hipocampo en pacientes con relación a su padecimiento de epilepsia, quienes presentan además de la esclerosis, ablandamiento del tejido neuronal del hipocampo. Desde 1880, Sommer reportó que algunos de sus pacientes epilépticos mostraron una pérdida extensiva de las neuronas del CA1, asociada a gliosis del lóbulo temporal. Demoor (1898), describió con impregnaciones argénticas de Golgi, alteraciones del neuropilo en la corteza de sujetos humanos epilépticos encontrando deformidades moniliformes de las dendritas y pérdida de las espinas. En el giro dentado, los cambios incluyen pérdida de las espinas y falta de desarrollo en la modulación de los segmentos dendríticos de la células piramidales del CA1, efectos contrarios en cuanto al desarrollo de las ramas dendríticas de las células granulares se encontraron en estudios realizados por Flood y cols, (1987) en seres humanos con demencia senil alrededor de los 50 años de edad, y luego una regresión en los 90 años.

Entre las diversas causas que provocan estas reacciones se encuentran los desequilibrios nutrimentales (carencias proteíco-calóricas, de vitaminas y otros componentes de la dieta) y el proceso natural del envejecimiento. Ambas observaciones indican que la estructura neuronal, se altera de manera importante desencadenando procesos tales como la apoptosis o la necrosis; cabe hacer la aclaración de que los mecanismos que desencadenan el proceso de apoptosis son factores internos y aquellos que desencadenan procesos necróticos son factores

externos (Feria-Velasco et al., 2004). Las lesiones neuronales que se producen por estos dos factores pueden ser de carácter reversible dependiendo de la lesión y del estadio de la misma. La neurona puede activar mecanismos de reparación para compensar dicha lesión. Tomando en cuenta estas observaciones, en el presente trabajo se muestra de manera comparativa, que tipo de elementos subcelulares se afectan más por la malnutrición o por la edad (ver tablas).

En este contexto, el parámetro analizado de los espacios perisomales fue evidente en los animales JM y una posible explicación de esta observación es que al encontrarse, la neurona rodeada de glía ésta posiblemente pierda la permeabilidad selectiva de su membrana plasmática, perdiendo su adhesión (Fisher, 1969). Con relación a esto, se ha reportado que como respuesta a la lesión celular se distienden las cisternas del complejo de Golgi y se dilatan las mitocondrias, se dispersan los polirribosomas, se forman vacuolas confluentes en el citoplasma y se rompe la membrana plasmática (Feria-Velasco et al., 2004). Si consideramos a la malnutrición como un factor que desequilibra la homeostasis de la neurona y al envejecimiento como factor de estrés oxidativo neuronal, entonces ambos efectos, pudieran provocar alteraciones en las membranas de los organelos más evidentes en el Golgi, o en las mitocondrias. Haciendo una analogía, este efecto es claro cuando comparamos ambos factores, la malnutrición y el envejecimiento que produjeron un efecto diferencial en los diferentes organelos neuronales (ver tablas y gráficas).

Por una parte, por la edad el número de mitocondrias normales se aumentó en el grupo SC y disminuyó por la malnutrición, este efecto no se encontró en los grupos jóvenes. Las mitocondrias chicas, que pudieran ser consideradas fragmentadas, fueron mas abundantes en el grupo SC y en el grupo JMCro y las anormales (aquellas dilatadas y sin crestas), su número fue mayor en los grupos SMCro y JMPos. El Golgi normal, se encontró en mayor número en el grupo SC y el dilatado en los grupos senil y JMCro. El grupo JC mostró el menor número de Golgi dilatado así como el grupo JMCro, se observó también que en estos grupos malnutridos jóvenes este organelo presenta rasgos de edema, dilatación y en algunos casos pierde totalmente su forma, todos estos efectos producto de la pérdida de la homeostasis neuronal.

Con relación al número de lisosomas fue mayor en los grupos SC y SMPos, y el SC también presentó mayor número de cuerpos multivesiculados y lipofuscina, sin embargo en los grupos jóvenes (C y M) no aumentó la lipofuscina y si los cuerpos multivesiculados. Así, en los animales normales, por la edad se aumenta el número del SMGs, de mitocondrias, de lisosomas asociados a vesículas y la lipofuscina y según sea el tipo de malnutrición y la edad, se altera la distribución de los espacios y la mielina perisomáticos, tanto en los jóvenes malnutridos Pre y Cro y en lo seniles con malnutrición crónica. El Golgi dilatado se incrementó en el grupo JMPos así como las mitocondrias anormales en los grupos JMPos y en el grupo SMCro.

Estos cambios descritos, producidos por la edad son importantes cuando se les compara a casos de lesión severa e irreversible en donde se produce lesión en la membrana de los lisosomas, que al romperse liberan enzimas líticas que generan auto-digestión o autólisis (Feria-Velasco et al., 2004). Se podría considerar como resultado del grado de autofagocitosis en el que entra la neurona, ya que al no poder degradar normalmente los desechos celulares, se empiezan a acumular los lisosomas que dan lugar a la formación de lipofuscina signo característico asociado a la edad. El número de lisosomas fue significativamente mayor en el grupo SC en comparación con los otros grupos. Una posible explicación a este aumento, es que quizás por la edad, el proceso de envejecimiento las mitocondrias se ven afectadas provocando una serie de reacciones que en su mayoría son irreversibles. Se frena la fosforilación oxidativa y en consecuencia disminuye la producción de ATP, esta respuesta celular provoca que los mecanismos que requieren ATP se detengan, tales como: a) el funcionamiento de la bomba de sodio, b) la agregación de polirribosomas asociados a las membranas del retículo endoplásmico y c) la captación de calcio al interior de las mitocondrias (Feria-Velasco et al., 2004). El hecho de encontrar diferencias en la ultraestructura neuronal, entre los grupos JM, SMPos con el SC, puede sugerir que la malnutrición en animales jóvenes simula lo que ocurre en animales seniles producto del daño oxidativo. Es decir, que las alteraciones neuronales observadas en el grupo malnutrido joven son debidas a la malnutrición; y que las alteraciones celulares observadas en los animales seniles son producto del estrés oxidativo, y que en los grupos SM las alteraciones neuronales son producto de la malnutrición y del estrés oxidativo. Lo importante es que a pesar de que

en el grupo senil interactúan las dos variables, en el grupo malnutrido joven no presenta un estado celular significativamente mejor, es decir que la malnutrición en animales jóvenes provoca el mismo estado celular que la interacción malnutrición y edad.

Otro aspecto se las observaciones en las mitocondrias es que presentaron cambios importantes como dilataciones, alargamientos y pérdida de las crestas mitocondriales; estos cambios fueron mas evidentes en el grupo de malnutridos tanto jóvenes como seniles. La alteración mitocondrial, por la malnutrición es importante debido a que hay que considerar la herencia materna de las mitocondrias, en efecto, se hereda el DNAm solo de la madre, ya que la del padre se pierde. Por lo tanto, la actividad mitocondrial se basa en el control del DNA tanto nuclear como mitocondrial, dando lugar a patrones matrilineales típicos para las mitocondrias (Johns, 1995). Esto puede ser alterado por múltiples factores, en el ser humano, se manifiesta como encefalomiopatías o bien en la enfermedad de Parkinson, y algunas demencias debidas a disfunción mitocondrial asociadas a alteraciones en la síntesis proteica, insuficiencia de los mecanismos de reparación y por el deterioro en la función respiratoria mitocondrial parcial o total (Di Mauro & Moraes, 1993).

En resumen, y en un intento por recapitular los resultados obtenidos en este trabajo, con el previo de Martinez et al., 2009, se podría mencionar que el grupo de animales JM, muestra diferencias significativas en las sesiones de adquisición, retención y extinción de la tarea de evitación activa, cuando se le compara con el resto de los grupos. La posible relación con este estudio, es que la malnutrición crónica y postnatal prolongada en ratas jóvenes y seniles produce daños desde el peso corporal hasta el nivel subcelular en las neuronas del CA1 del hipocampo dorsal, y los efectos son diferenciales dependiendo del parámetro celular que se estudie. La evidencia de que la malnutrición en las neuronas de los animales jóvenes produce mayores espacios que se mantienen hasta las edades seniles, puede provocar menor integración celular tanto con la glía como con las sinapsis perisomáticas. Siendo evidente la mayor cantidad de espacios que pueden deberse a un proceso inflamatorio glial como se ha reportado en el hipocampo de animales intoxicados con plomo (Struzynska et al., 2007; Selvin-Testa et al., 1994).

Otro hallazgo importante es la cantidad acumulada de lipofuscina en los lisosomas que presentan los animales seniles, que es mayor en el grupo control, comparado con los otros grupos SMPro y SMCro, que aunque también muestran espacios conspicuos y lipofuscina, es en menor grado, como se indica en las gráficas. Adicionalmente, en los animales SC, se aumenta la cantidad de cuerpos multivesiculados y mayor cantidad de organela, rasgo que varía en los SMPos y SMCro. Por el contrario, en los animales de 90 días la malnutrición, produce deficiencias en el número de los organela, de las neuronas del CA1, deficiencias que se podrían asociar a la alteración en las conductas dependientes del hipocampo, como ya se había publicado (Martinez et al., 2009).

CONCLUSIONES

- La malnutrición hipoproteínica e isocalórica instalada en los periodos pre y posnatal (crónica) y solo durante el posnatal se asocian a disminución significativa del peso corporal.
- Dependiendo del tiempo en el que la malnutrición sea instalada (periodo posnatal, desde el nacimiento o crónica desde la gestación hasta la vida adulta o senil), los efectos sobre la organización, distribución y densidad de los organelos de las neuronas del CA1 del hipocampo dorsal, son diferentes.
- Se definieron como signos de envejecimiento neuronal el aumento en el número de sistemas membranales de Golgi dilatados, de mitocondrias anormales, lisosomas, lipofusina y cuerpos multivesiculares (signos de estrés oxidativo), en animales normales y malnutridos.
- Aparentemente, la malnutrición crónica en los animales seniles, se asoció a la recuperación adaptativa de los organelos citoplásmicos en las neuronas piramidales del CA1, al presentar menores alteraciones en los organelos neuronales como aumentos en el número de mitocondrias anormales, lisosomas, lipofusina y cuerpos multivesiculares.
- Por otra parte, la malnutrición posnatal en los animales jóvenes, mostró su efecto mayor al aumentar estos signos (número de mitocondrias anormales, lisosomas, lipofusina y cuerpos multivesiculares), lo cual podría explicar su desempeño deficiente reportado en una tarea de memoria espacial.

REFERENCIAS

- Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD. 1996. *Biología Molecular de la Célula*. Barcelona: Garland Publishing. Pp. 843-852.
- Almeida MFL, Silveira ACD, Guedes RCA, Hokoç JN, Martinez AMB. 2005. Quantitative ultrastructural evidence of myelin malformation in optic nerves of rats submitted to a multideficient diet. *Nutritional Neuroscience*. 8, 91-99.
- Andrade JP, Cadete-Leite A, Madeira MD, Paula-Barbosa MM. 1991. Long-term low-protein diet reduces the number of hippocampal mossy fiber synapses. *Exp Neurol*. 112,119-124.
- Andrade JP, Castanheira-Vale AJ, Paz-Dias PG, Madeira MD y Paula-Barbosa MM. 1996. The dendritic trees of neurons from the hippocampal formation of protein-deprived adult rats. A quantitative Golgi study. *Exp Brain Res*. 109, 419-433.
- Andrade JP, Paula-Barbosa MM. 1996. Protein malnutrition alters the cholinergic and GABAergic systems of the hippocampal formation of the adult rat: an immunocytochemical study. *Neurosci Lett*. 211, 211-215.
- Bedi KS. 1992. Spatial learning ability of rats undernourished during early postnatal life. *Physiol Behav*. 51, 1001-1007.
- Bi X, Zhou J, Lynch G. 1999. Lysosomal protease inhibitors induce meganeurites and tangle-like structures in entorhinohippocampal regions vulnerable to Alzheimer's disease. *Exp Neurol*. 158, 312-327.
- Bonato F, Polydoro M, Everton A, Conte da Frota Junior ML, Dal-Pizzol F, Rotta NL, Souza O. D, Perry ML y Moreira Fonseca JC. 2005. Effect of protein malnutrition on redox state of the hippocampus of rat. *Brain Res*.1042, 17-22.
- Bonfoco E, Krainc D, Ankarcrona M, Nicotera P, Lipton SA. 1995. Apoptosis and necrosis: two distinct events induced, respectively, by mild and intense insults with N-methyl-D-aspartate or nitric oxide/superoxide in cortical cell cultures. *Proc Natl Acad Sci USA*. 92, 7162-7166.
- Bortolotto ZA, Lauri S, Isaac JT, Collingridge GL. 2003. Kainate receptors and the induction of mossy fibre long-term potentiation. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. Apr 29; 358, 657-666.
- Bozzola JJ, Russell LD. 1999. *Electron Microscopy*. Second edition. Massachusetts, USA: Jones and Bartlett Publishers, Inc.
- Brunk UT, Terman A. 2002a. Lipofuscin: mechanisms of age-related accumulation and influence on cell function. *Free Radic Biol Med*. 33, 611-619.

- Brunk UT, Terman A. 2002b. The mitochondrial-lysosomal axis theory of aging. Accumulation of damaged mitochondria as a result of imperfect autophagocytosis. *Eur J Biochem.* 269, 1996-2002.
- Buell SJ, Coleman PD. 1981. Quantitative evidence for selective dendritic growth in normal human aging but not in senile dementia. *Brain Res.* 214, 23-41.
- Calabrese V, Mancuso C, Calvani M, Rizzarelli E, Butterfield DA, Stella AMG. 2007. Nitric oxide in the central nervous system: neuroprotection versus neurotoxicity. *Nat Rev Neurosci.* 8, 766-775.
- Cuervo AM, Bergamini E, Brunk UT, Dröge W, Ffrench M, Terman A. 2005. Autophagy and Aging. The importance of maintaining “clean” cells. *Autophagy.* 1, 131-140.
- Da Silva Hernandez A, Francolin-Silva AL, Valadares CT, Fukuda MT, Almeida SS. 2005. Effects of different malnutrition techniques on the behavior of rats tested in the elevated T-maze. *Behav Brain Res.* 162, 240-245.
- De Felipe J, Fariñas I. 1992. The pyramidal neuron of the cerebral cortex: morphological and chemical characteristics of the synaptic inputs. *Prog Neurobiol.* 39, 563-607.
- De la Mata C. 2008. Malnutrición, desnutrición y sobrealimentación. *Rev Med Rosario.* 74, 17-20.
- Dehaene S, Sergent C, Changeux JP. 2003. A neuronal network model linking subjective reports and objective physiological data during conscious perception. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100, 8520-8525.
- Deloncle R, Huguet F, Fernandez B, Quellard N, Babin Ph, Guillard O. 2001. Ultrastructural study of rat hippocampus after chronic administration of aluminium L-glutamate: an acceleration of the aging process. *Exp Gerontol.* 36, 231-244.
- Demoor J. 1898. La mécanique et la signification de l'état moniliforme des neurones. *Ann Soc Roy Sei Med Nat Brux.* 7, 205-250.
- Díaz-Cintra S, Cintra L, Galván A, Aguilar A, Kemper T y Morgane PJ. 1991. Effects of prenatal protein deprivation on the posnatal development of granule cells in the fascia dentata. *J Comp Neurology.* 310, 356-364.
- Díaz-Cintra S, García-Ruiz M, Corkidi G, y Cintra L. 1994. Effects of prenatal malnutrition and posnatal nutritional rehabilitation on CA3 hippocampal pyramidal cells in rats of four ages. *Brain Res.* 662, 117-126.

- Díaz-Cintra S, González-Maciel A, Morales MA, Aguilar A, Cintra L, Prado-Alcalá RA. 2007. Protein malnutrition differentially alters the number of glutamic acid decarboxylase-67 interneurons in dentate gyrus and CA1-3 subfields of the dorsal hippocampus. *Exp Neurol.* 208, 47-53.
- Díaz-Cintra S, Granados Rojas L, Sánchez A y Cintra L. 2001. En: *Temas Selectos de Neurociencias II*. Capítulo 21. El Hipocampo y la Malnutrición. Velásquez Moctezuma J. México: UAM-PUIS; pp 437-456.
- Díaz-Cintra S, Granados-Rojas L, Aguilar-Vázquez A, Sánchez-Martínez A, Cintra-McGlone L. 2002. La formación hipocámpica y el envejecimiento. *Gaceta Médica.* 11, 27-33.
- Díaz-Cintra S, Yong AP, Aguilar A, Bi X, Lynch G. y Ribak CE. 2004. Ultrastructural analysis of changes in neuronal features of hippocampal pyramidal cells treated with a cathepsin inhibitor from apolipoprotein e-deficient mice. *J.Neurocytol.* 33, 37-48.
- DiMauro S, Moraes CT. 1993. Mitochondrial encephalomyopathies. *Arch Neurol.* 50, 1197-1208.
- Ding Q, Dimayuga E, Keller JN. 2006. Proteasome regulation of oxidative stress in aging and age-related diseases of the CNS. *Antioxid Redox Signal.* 8, 163-172.
- Felleman DJ, Van Essen DC. 1991. Distributed hierarchical processing in the primate cerebral cortex. *Cereb Cortex.* 1, 1-47.
- Feria-Velasco A, Zarate-Beas C y Pinedo-Gómez U. 2004. Mecanismos de muerte celular en el Sistema Nervioso Central. En *Temas Selectos de Neurociencias III*, ED. Javier Velázquez Moctezuma.
- Fischer J. 1969. Electron microscopic alterations in the vicinity of epileptogenic cobalt-gelatine necrosis in the cerebral cortex of the rat. A contribution to the ultrastructure of "plasmatic infiltration" of the central nervous system. *Acta Neuropathol.* 14, 201-214.
- Flood DG, Buell SJ, Horwitz GJ, Coleman PD. 1987. Dendritic extent in human dentate gyrus granule cells in normal aging and senile dementia. *Brain Res.* 402, 205-216.
- Foster TC. 1999. Involvement of hippocampal synaptic plasticity in age-related memory decline. *Brain Res Rev.* 30, 236-249.
- Francolin-Silva AL, da Silva Hernandez A, Fukuda MT, Valadares CT, Almeida SS. 2006. Anxiolytic-like effects of short-term postnatal protein malnutrition in the elevated plus-maze test. *Behav Brain Res.* 173, 310-314.
- García-Ruiz M, Díaz-Cintra S, Cintra L, y Corkidi G. 1993. Effects of prenatal malnutrition on CA3 hippocampal pyramidal cells in rats of three ages. *Brain Res.* 625, 203-212.
- Gil P. 2000. Bases fisiológicas del envejecimiento cerebral. *Rev Mult Gerontol.* 10, 67-73.

- Golomb J, Kluger A, de Leon MJ, Ferris SH, Convit A, Mittelman MS, Cohen J, Rusinek H, De Santi S, George AE. 1994. Hippocampal formation size in normal human aging: a correlate of delayed secondary memory performance. *Learning and Memory*; 1, 45–54.
- Granados L, Aguilar A y Diaz-Cintra S. 2004. The mossy fiber system of hippocampal formations is decreased by chronic and postnatal but not by prenatal protein malnutrition in rats. *J. Nutri Neurosci.* 00, 1-9.
- Granados-Rojas L, Larriva-Sahd J, Cintra I, Gutierrez-Ospina G Rondan A, Aguilar A y Diaz-Cintra S. 2002. Prenatal protein malnutrition decreases hippocampal CA3 asymmetric synaptic contacts in adult rats. *Brain Res.* 933, 91-173.
- Gray DA, Woulfe J. 2005. Lipofuscin and aging: a matter of toxic waste. *SAGE KE.* 5, 1-5.
- Guthrie HA, Brown ML. 1968. Effect of severe undernutrition in early life on growth, brain size and composition in adult rats. *Nutrition.* 94, 419-426.
- Hernandes AS, Almeida SS. 2003. Postnatal protein malnutrition affects inhibitory avoidance and risk assessment behaviors in two models of anxiety in rats. *Nutr Neurosci.* 6, 213-219.
- Johns DR. 1995. Mitochondrial DNA and disease. *N Engl Med.* 333, 638-644.
- Jordán J. 2003. Apoptosis: muerte celular programada. *OFFARM.* 22, 100-106.
- Karasek M. 2007. Does melatonin play a role in aging processes? *Physiol Pharmacol.* 58, 105-113.
- Katyal S, McKinnon PJ. 2008. DNA strand breaks, neurodegeneration and aging in the brain. *Mech Ageing Dev.* 129, 483-491.
- Kirkwood TB, Shanley DP. 2005. Food restriction, evolution and ageing. *Mech Ageing Dev.* 126, 1011-1016.
- Kretchmer N. 1989. Expression of lactase during development. *Am J Hum Genet.* 45, 487-488.
- Leathwood P, Bush M, Berent C, Mauron J. 1974. Effects of early malnutrition on Swiss white mice: avoidance learning after rearing in large litters. *Life Sci.* 14, 157-162.
- Linford NJ, Schriener SE, Rabinovitch PS. 2006. Oxidative damage and aging: spotlight on mitochondria. *Cancer Res.* 66, 2497-2499.
- Lukoyanov NV, Andrade JP. 2000. Behavioral effects of protein deprivation and rehabilitation in adult rats: relevance to morphological alterations in the hippocampal formation. *Behav Brain Res.* 112, 85-97.
- Marinesco, G. 1909. *La Cellula Nerveuse.* Vols I. Paris: Doin.
- Martinez Y, Diaz-Cintra S, Leon-Jacinto U, Aguilar-Vazquez A, Medina AC, Quirate GL, Prado-Alcala RA. 2009. Effects of postnatal malnutrition and senescence on learning, long-term memory, and extinction in the rat. *Behav Brain Res.* 203, 48-53.

- Martínez Y. 2006. Malnutrición y envejecimiento: un estudio conductual y subcelular en el hipocampo. Tesis de maestría: Maestría en Ciencias (Neurobiología) – UNAM, Instituto de Neurobiología.
- Miller DB, O'Callaghan JP. 2003. Effects of aging and stress on hippocampal structure and function. *Metabolism*. 52, 17-21.
- Mora F. 2002. Envejecimiento Cerebral: Perspectivas actuales. Capítulo 2. Libro: Enfermedades Neurodegenerativas. Serie Científica. Madrid: Farmaindustria.
- Morgane PJ, Austin-LFrance R, Bronzino J, Tonkiss J, Díaz-Cintra S, Cintra L, Kemper T, Galler JR. 1993. Prenatal malnutrition and development of the brain. *Neurosci Biobehav Rev*. 17, 91-128.
- Morgane PJ, Miller M, Kemper T, Stern 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. *Neurosci Biobehav Rev*. 2, 137-230.
- Morgane PJ, Mockler DJ y Galler JR. 2002. Effects of prenatal protein malnutrition on the hippocampal formation. *Neurosci Biobehav Rev*. 26, 471-483.
- Moser MB, Trommald M, Andersen P. 1994. An increase in dendritic spine density on hippocampal CA1 pyramidal cells following spatial learning in adult rats suggests the formation of new synapses. *Proc Natl Acad Sci USA*. 91, 12673-12675.
- Nakamura H, Kobayashi S, Ohashi Y, Ando S. 1999. Age-changes of brain synapses and synaptic plasticity in response to an enriched environment. *J Neurosci Res*. 56, 307-315.
- Ngwenya LB, Rosene DL, Peters A. 2008. An ultrastructural characterization of the newly generated cells in the adult monkey dentate gyrus. *Hippocampus*. 18, 210-220.
- Olorunsogo OO. 1989. Changes in brain mitochondrial bioenergetics in protein-deficient rats. *Br J Exp Path*. 70, 607-619.
- Pagnussat AS, Faccioni-Heuser MC, Netto CA, Achaval M. 2007. An ultrasctructural study of cell death in the CA1 pyramidal field of the hippocampus in rats submitted to transient global ischemia followed by reperfusion. *J Anat*. 211, 589-599.
- Pantoni L, Garcia JH, Gutierrez JA. 1996. Cerebral White matter is highly vulnerable to ischemia. *Stroke*. 27, 1641-1647.
- Pardo G, Delgado R. 2003. Senescencia celular y envejecimiento. *Rev Cubana Invest Biomed*. 22, 204-212.
- Paxinos G, Watson C. 1982. The rat brain in stereotaxic coordinates. Australia: Academic Press.
- Peters A, Palay SL, Webster H. 1991. The Fine Structure of the Nervous System. Neurons and Their Supporting Cells. New York: Oxford.

- Peters A. 2009. The effects of normal aging on myelinated nerve fibers in monkey central nervous system. *Frontiers in neuroanatomy*. 11, 1-10.
- Risco L. 2005. Trastorno de Estrés Postraumático II Desarrollo y Neurobiología. *Medwave*. Año V, 11.
- Resnick O, Miller M, Forbes W, Hall R, Kemper T, Bronzino J, Morgane PJ. 1979. Developmental protein malnutrition: influences on the central nervous system of the rat. *Neurosci Biobehav Rev*. 3, 233-246.
- Rocinho LF, Almeida SS, De-Oliveira LM. 1997. Response threshold to aversive stimuli in stimulated early protein-malnourished rats. *Braz J Med Biol Res*. 30, 407-413.
- Rodríguez-Capote K, Céspedes E, Arencibia R, González-Hoyuela M. 1998. Indicadores de estrés oxidativo en el cerebro de rata durante el envejecimiento. Efecto del factor de crecimiento nervioso. *Rev Neurol*. 27, 494-500.
- Rodriguez-Martinez E, Rugerio-Vargas C, Rodriguez AI, Borgonio-Perez G, Rivas-Arancibia S. 2004. Antioxidant effects of taurine, vitamin C, and vitamin E on oxidative damage in hippocampus caused by the administration of 3-nitropropionic acid in rats. *Int J Neurosci*. 114, 1133-1145.
- Rolls ET, Kesner RP. 2006. A computational theory of hippocampal function, and empirical tests of the theory. *Progress in Neurobiology*. 79, 1-48.
- Selvin-Testa A, Loidl CF, Lopez-Costa JJ, Lopez EM, Pecci-Saavedra J. 1994. Chronic lead exposure induces astrogliosis in hippocampus and cerebellum. *Neurotoxicology*. 15, 381-401.
- Shiozaki M, Yoshimura K, Shibata M, Koike M, Matsuura N, Uchiyama Y, Gotow T. 2008. Morphological and biochemical signs of age-related neurodegenerative changes in klotho mutant mice. *Neuroscience*. 152, 924-941.
- Sohal RS, Weindruch R. 1996. Oxidative Stress, caloric restriction and aging. *Science*. 273, 59-63.
- Sommer W. 1880. Erkrankung des Ammonshornes als aetiologisches Moment der Epilepsie. *Arch Psychiat Nervkrankh*. 10, 631-675.
- Steward O, Schuman EM. 2003. Compartmentalized synthesis and degradation of proteins in neurons. *Neuron*. 40, 347-359.
- Strehler B. 1977. *Time, Cells and Aging*. Second Edition. New York, USA: Academic Press.
- Struzynska L, Daabroska-Bouta B, Koka K, Sulkowski G. 2007. Inflammation-like glial response in lead-exposed immature rat brain. *Toxicol Sci*. 95, 156-162.

- Tacconi MT, Lligoña L, Salmona M, Pitsikas N, Algeri S. 1991. Aging and food restriction: effect on lipids of cerebral cortex. *Neurobiol Aging*. 12, 55-59.
- Tanaka J, Okuma Y, Tomobe K, Nomura Y. 2005. The age-related degeneration of oligodendrocytes in the hippocampus of the senescence-accelerated mouse (SAM) P8: a quantitative immunohistochemical study. *Biol Pharm Bull*. 28, 615-618.
- The United Nations Children's Fund (UNICEF). 2006. Progress for children. A report card on nutrition. New York: UNICEF.
<http://www.unicef.org/progressforchildren/2006n4/malnutritiondefinition.html>
- Torrades S. 2004. Aspectos neurológicos del envejecimiento. La lucha para retrasar el deterioro cerebral. *OFFARM Ámbito Farmacéutico. Neurofisiología*. 23, 106-109.
- Vernace VA, Schmidt-Glenewinkel T, Figueiredo-Pereira ME. 2007. Aging and regulated protein degradation: who has the UPPER hand? *Aging cell*. 6, 599-606.
- Von Bohlen und Halbach O, Zacher C, Gass P, Unsicker K. 2006. Age-related alterations in hippocampal spines and deficiencies in spatial memory in mice. *J Neurosci Res*. 83, 525-531.
- Wang L, Xu RJ. 2007. The effects of perinatal protein malnutrition on spatial learning and memory behavior and brain-derived neurotrophic factor concentration in the brain tissue in young rats. *Asia Pac J Clin Nutr*. 16, 467-472.
- Wei Y, Wu S, Ma Y, Lee H. 2009. Respiratory function decline and DNA mutation in mitochondria, oxidative stress and altered gene expression during aging. *Chang Gung Med J*. 32, 113-32.
- Witter MP, Amaral DG. 1989. The three dimensional organization of the hippocampal formation: A review of anatomical data. *Neurosci*. 31, 571-591.
- Witter MP, Amaral DG. 2004. Hippocampal Formation. En: *The Rat Nervous System*. Editado por G. Paxinos. Tercera edición. Elsevier Academic Press.
- Yong AP, Bednarsk, E, Gall CM, Lynch G y Ribak CE. 1999. Lysosomal dysfunction results in lamina-specific meganeurite formation but not apoptosis in frontal cortex. *Exp Neurol*. 157, 150-160.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Diagrama del hipocampo de rata, con su organización tridimensional y estructuras relacionadas.
- Figura 2. Cortes coronales del hipocampo dorsal de rata.
- Figura 3. Neuronas de proyección que forman parte del intracircuito del hipocampo.
- Figura 4. Signos de envejecimiento de las neuronas piramidales del CA1 a 5,000x.
- Figura 5. Lisosomas en célula del CA1.
- Figura 6. Neuronas piramidales observadas por contraste con la técnica de Golgi de impregnación argéntica.
- Figura 7. Somas de neuronas piramidales.
- Figura 8. Mitocondrias.
- Figura 9. Sistema membranal de Golgi (SMG).
- Figura 10. Lisosomas.
- Figura 11. Cuerpo multivesicular (CMV).
- Figura 12. Acumulación de gránulos de lipofuscina (li).
- Figura 13. Mielina circundante al soma.
- Figura 14. Espacios circundantes a somas.
- Figura 15. Diagrama de flujo para malnutrición.
- Figura 16. Montaje de una neurona piramidal del CA1 del hipocampo dorsal.
- Figura 17. Pesos corporales de los 6 grupos.
- Figura 18. Fotomicrografías de neuronas piramidales del CA1.
- Figura 19. Promedio del número de mitocondrias.
- Figura 20. Promedios acumulados del número de mitocondrias por grupos.
- Figura 21. Promedio del número de sistemas membranales de Golgi.
- Figura 22. Promedios acumulados del número de SMG por grupos.
- Figura 23. Promedio del número de lisosomas (LISO), cúmulos de lipofuscina (LIPO) y cuerpos multivesiculares (CMV).
- Figura 24. Promedios acumulados del número de lisosomas, cúmulos de lipofuscina y cuerpos multivesiculados.
- Figura 25. Promedio del número de mielina.
- Figura 26. Porcentajes acumulados del número de mielina.
- Figura 27. Promedio del número de espacios perisomáticos.
- Figura 28. Porcentajes acumulados del número de espacios perisomáticos.

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Tabla comparativa de los componentes de los dos tipos de alimento.

Tabla 2. Porcentajes de diferencias significativas entre las medias del número de mitocondrias normales (N), chicas (CH) y anormales (ANOR) de todos los grupos.

Tabla 3. Porcentajes de diferencias significativas entre las medias del número de sistema membranal de Golgi (SMG) de todos los grupos.

Tabla 4. Porcentajes de diferencias significativas entre las medias del número de lisosomas (LISO), cúmulos de lipofuscina (LIPO) y cuerpos multivesiculares (CMV) de todos los grupos.

Tabla 5. Porcentajes de diferencias significativas entre cada una de las medias de la mielina de todos los grupos.

Tabla 6. Porcentajes de diferencias significativas entre cada una de las medias de espacios circundantes a somas de todos los grupos