

11281

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO**

CAMPUS UNAM/UAQ. JURIQUILLA, QUERÉTARO

---

**CENTRO DE NEUROBIOLOGÍA**

10

“LA FORMACIÓN HIPOCÁMPICA EN RATAS BAJO  
MALNUTRICIÓN HIPOPROTEÍNICAS PRENATAL: UN  
ESTUDIO COMPARATIVO ULTRAESTRUCTURAL”

*TESIS*

Que para obtener el grado de

DOCTORA EN CIENCIAS FISIOLÓGICAS

Presenta

**M. en C. Fisiol. LETICIA GRANADOS ROJAS**

DIRECTOR DE TESIS: DR. LEON CINTRA McGLONE.

COORDIRECTOR DE TESIS: DR. JORGE LARRIVA SAHD

ASESORA DE TESIS: DRA. SOFIA DÍAZ MIRANDA.

México, D. F.

2000.

2000-7



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

# ÍNDICE

Tema	Página
ÍNDICE .....	1
RESUMEN .....	3
SUMMARY .....	4
INTRODUCCIÓN .....	5
ANTECEDENTES .....	7
<b>FORMACIÓN HIPOCÁMPICA</b> .....	7
LOCALIZACIÓN Y ANATOMÍA .....	7
NEURONAS PRINCIPALES .....	8
VÍAS DE ENTRADA A LA FORMACIÓN HIPOCÁMPICA .....	10
CIRCUITERIA HIPOCÁMPICA .....	11
CIRCUITO TRISINÁPTICO HIPOCÁMPICO .....	11
NEUROTRANSMISORES .....	13
CARACTERÍSTICAS ULTRAESTRUCTURALES DE LAS SINAPSIS ASIMÉTRICAS FM-CA3 .....	15
POTENCIACIÓN A LARGO PLAZO .....	18
EL RITMO THETA .....	18
FUNCIÓN DEL HIPOCÁMPO .....	19
MALNUTRICIÓN .....	20
MALNUTRICIÓN Y FORMACIÓN HIPOCÁMPICA .....	22
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....	27
HIPÓTESIS .....	28
OBJETIVO .....	29
OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	29
JUSTIFICACIÓN .....	30
MATERIAL Y MÉTODOS .....	31
ANIMALES .....	31
TRATAMIENTO NUTRICIONAL .....	31
REPRODUCCIÓN Y FORMACIÓN DE GRUPOS .....	31
ESTUDIO HISTOLÓGICO .....	34
Perfusión .....	34
Tinción .....	34
Análisis estereológico .....	34
Muestreo .....	34
Estimación del volumen total del sistema de fibras musgosas y de su haz suprapiramidal .....	35
ESTUDIO ULTRAESTRUCTURAL .....	35
Perfusión y obtención de las zonas de análisis .....	35
Muestreo .....	36
Técnica de postfijación con tetraóxido de osmio .....	36
Análisis estereológico .....	36
Muestreo .....	36
Estimación de la densidad numérica de las sinapsis	

asimétricas FM-CA3 por unidad de volumen.....	37
Estimación del número total de sinapsis asimétricas FM-CA3 en el haz suprapiramidal del sistema de fibras musgosas.....	39
ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	39
<b>RESULTADOS .....</b>	<b>40</b>
<b>PESO CEREBRAL .....</b>	<b>40</b>
<b>PESO CORPORAL .....</b>	<b>40</b>
<b>VOLUMEN TOTAL ESTIMADO DEL SISTEMA DE FIBRAS MUSGOSAS .....</b>	<b>41</b>
<b>VOLUMEN ESTIMADO DEL HAZ SUPRAPIRAMIDAL DEL SISTEMA DE FIBRAS MUSGOSAS .....</b>	<b>42</b>
<b>DENSIDAD NUMÉRICA DE LAS SINAPSIS ASIMÉTRICAS FM-CA3 POR UNIDAD DE VOLUMEN .....</b>	<b>43</b>
<b>NÚMERO TOTAL ESTIMADO DE SINAPSIS ASIMÉTRICAS FM-CA3 EN EL HAZ SUPRAPIRAMIDAL DEL SISTEMA DE FIBRAS MUSGOSAS .....</b>	<b>44</b>
<b>DISCUSIÓN .....</b>	<b>46</b>
<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>63</b>
<b>REFERENCIAS .....</b>	<b>64</b>

## RESUMEN

En la rata, la formación hipocámpica es una estructura que tiene un papel importante en diversos procesos cognoscitivos como son el aprendizaje y la memoria espacial, en fenómenos de plasticidad sináptica como la potenciación a largo plazo, en fenómenos electrofisiológicos como el ritmo theta y en diversas capacidades conductuales. Estos procesos se alteran en ratas adultas malnutridas prenatalmente que muestran incapacidad para iniciar y mantener la potenciación a largo plazo, alteraciones en el ritmo theta y deficiencias en la ejecución de ciertas tareas. Se ha postulado además que estos procesos pueden deberse a cambios en las conexiones sinápticas a nivel de la formación hipocámpica. Así, el objetivo de este estudio fue estimar el número de las sinapsis asimétricas establecidas entre los axones de las células granulares (fibras musgosas (FM)) y las espinas especializadas o excrecencias dendríticas de las células piramidales del CA3 (FM-CA3) en ratas adultas malnutridas prenatalmente, con el fin de conocer si estas alteraciones se deben en parte a la deficiencia del número de sinapsis en esta región neuronal. Se seleccionó este tipo de contacto sináptico ya que es el principal sitio de relevo de la información que pasa a través del circuito trisináptico hipocámpico por el patrón de fibras aferentes y eferentes que presenta, además de que es el principal modulador de la excitabilidad de las células piramidales del CA3. Se utilizaron ratas adultas de 220 días de edad de la cepa Sprague Dawley. Los animales control se alimentaron durante todo el experimento con una dieta adecuada en proteínas (al 23% de proteínas) y los animales experimentales con una dieta deficiente en proteínas (al 6% de proteínas) durante la gestación. En ambos grupos, se estimó el número total de sinapsis FM-CA3, mediante un análisis estereológico en dos fases. En la primera, se estimó el volumen total del sistema de fibras musgosas y de su haz suprapiramidal por microscopía de luz en material procesado con la técnica de Timm. En el segundo estudio se obtuvo la densidad numérica por unidad de volumen de las sinapsis asimétricas FM-CA3 en material procesado para microscopía electrónica aplicando el método del disector físico. El número total de sinapsis asimétricas FM-CA3 se obtuvo como el producto de los dos factores anteriores. Se estimó además el volumen total del sistema de FM de la formación hipocámpica. La significancia estadística se determinó usando la prueba ANOVA de una vía. Los resultados mostraron reducción significativa del volumen total del sistema de FM y de su haz suprapiramidal en el grupo de animales malnutridos prenatalmente. La densidad numérica por unidad de volumen, y la estimación del número total de sinapsis asimétricas FM-CA3 en el haz suprapiramidal del sistema de FM también se redujo significativamente en este grupo. Los resultados del presente trabajo sugieren que la malnutrición hipoproteínica prenatal induce efectos deletéreos a largo plazo en el programa de desarrollo que controla la sinaptogénesis y/o la consolidación sináptica, probablemente al afectar diversos procesos celulares. La reducción del número de sinapsis del segundo relevo de la información del circuito interno de la formación hipocámpica, podría explicar en parte, las deficiencias funcionales y conductuales observadas en ratas adultas malnutridas prenatalmente.

## SUMMARY

In the rat, the hippocampal formation is a structure thought to play a critical role in spatial memory and learning abilities and synaptic plasticity as well as long-term potentiation and theta rhythm. These behavioral features are altered in malnourished rats suggesting damages in the long term potentiation and theta rhythm. Some of these alterations can be due to changes in the synaptic connections. Thus, the goal of this study was to estimate the number of asymmetric synapses established between the granule cell axons (mossy fibers (MF)) and the CA3 pyramidal cells dendritic excrescences (MF-CA3 synapses) in adult rats following prenatal malnutrition. Sprague Dawley female rats were fed either with 6% or 23% protein diets 5 weeks before conceptions. Following delivery, litters born from 6% and 23% casein fed rats were randomly cross-fostered with 25% casein diet fed dams and maintained on this diet until sacrificed (220 days old). To estimate the total number of MF-CA3 synapses, we carried out a two stage morphological analysis. In the first one the volume of the suprapyramidal bundle was estimated at the light microscope level. In the second study the numerical density of MF-CA3 asymmetric synaptic was estimated on electron microscopic material by applying the physical disector method. The estimation of total number of MF-CA3 asymmetric synapses was calculated as the product of the volume of hippocampal formation suprapyramidal bundle and the numerical density. The total volume of the mossy fiber system also was estimated. Statistical significance was determined by using a one way ANOVA test. The statistic analysis of the total volume and of the hippocampal formation suprapyramidal bundle showed that prenatal protein malnutrition produces a reduction on this parameter. The numerical density of MF-CA3 synapses also was significantly reduced in prenatal malnourished rats when compared to control littermates. Similarly, the estimation of the total number of MF-CA3 asymmetric synapses was significantly diminished in malnourished rats as compared to controls. Hence, prenatal protein malnutrition induces long-lasting deleterious effects on the progression of developmental programs controlling synaptogenesis and/or synaptic consolidation, likely by affecting a myriad of cellular processes. The reduction in the synapses number of the principal link of the hippocampal circuit, might partly explain the functional damages documented in prenatal malnourished rats.

## INTRODUCCIÓN

Las zonas de contacto interneuronal o sinapsis son estructuras dinámicas capaces de modificar sus propiedades químicas y fisiológicas a través de la vida de un organismo. Se ha mostrado que tales modificaciones están acompañadas por cambios en su morfología y número. Cambios ultraestructurales cuantitativos, a menos que sean extremos (patológicos), son difíciles de detectar y comparar. Por tanto el estudio de las modificaciones en las características ultraestructurales sinápticas y del número de sinapsis es de importancia primaria en neurobiología.

Por otro lado, la formación hipocámpica (FH) tiene un papel importante en la regulación de diversas capacidades: a) conductuales, como la conducta asociada con el rastreo olfatorio (Swanson, 1983); b) cognoscitivas, como el aprendizaje y memoria espacial en la rata (Olton y col., 1978; Barnes, 1988; Eichenbaum y Cohen, 1988; Olton, 1989; Speakman y O'Keefe, 1989; Eichenbaum y Otto, 1992); c) de plasticidad sináptica, como la potenciación a largo plazo (Bliss y Lomo, 1973) y d) electrofisiológicas como la generación del ritmo theta (Vanderwolf y col., 1975; Vinogradova, 1995). En ratas malnutridas prenatalmente algunas de estas características se alteran y sus efectos se reflejan en deficiencias para la ejecución de ciertas tareas cognoscitivas (Tonkiss y Galler, 1990; Tonkiss y col., 1990, 1991, 1993; Morgane y col., 1993; Almeida y col., 1996), incapacidad para iniciar y mantener la potenciación a largo plazo (Bronzino y col., 1991a,b, 1996; Morgane y col., 1992, 1993) y en alteraciones del ritmo theta hipocámpico (Morgane y col., 1990, 1993; Cintra y col., 1995).

Se ha postulado además, que algunas de estas alteraciones como el aprendizaje, la memoria (Ramón y Cajal, 1899; Horn y col., 1985; Van Reempts y col., 1992), el kindling (Geinisman y col., 1992; Represa y Ben-Ari, 1992) y la potenciación a largo plazo (Chang y Greenough, 1984; Petukhov y Popov, 1986; Lee y col., 1980; Geinisman y col., 1991), se acompañan de cambios en la estructura y en el número de sinapsis.

Así, el paradigma de malnutrición proteínica prenatal en la rata, utilizando una dieta con 6% de caseína (Tonkiss y col., 1993), es un modelo que permite abordar el estudio de los mecanismos morfológicos sinápticos que subyacen a los procesos cognoscitivos como

son el aprendizaje y la memoria espacial, y de plasticidad neuronal como la potenciación a largo plazo.

En el presente trabajo se analiza la posibilidad de que las alteraciones funcionales observadas en ratas adultas malnutridas prenatalmente reportadas previamente, sean debidas en parte a la reducción de contactos sinápticos. En especial se analiza el relevo sináptico establecido entre los axones de las células granulares, las fibras musgosas (FM) y las espinas o excrecencias dendríticas de las células piramidales del *Cornu de Ammon 3* (FM-CA3). Este tipo de sinapsis representan el relevo principal de filtración de la información sensorial que proviene de la corteza de asociación y que viaja a través del circuito trisináptico hipocámpico (Beck y col., 1992) por el patrón de fibras aferentes y eferentes que presenta (Swanson y Cowan, 1977). Además de que integran el modulador principal de la excitabilidad de las células piramidales del CA3 (Ben-Ari y Represa, 1990) y de que despliegan capacidades plásticas notables bajo diferentes condiciones experimentales.

Dado que nuestros estudios se realizaron en la rata adulta (220 días de edad) y las células granulares se generan aún después del nacimiento, este estudio pretende analizar los efectos posibles de la malnutrición sobre las últimas etapas de la organización citoarquitectónica neuronal como lo son la sinaptogénesis y la consolidación sináptica.



## ANTECEDENTES

### FORMACIÓN HIPOCÁMPICA (FH)

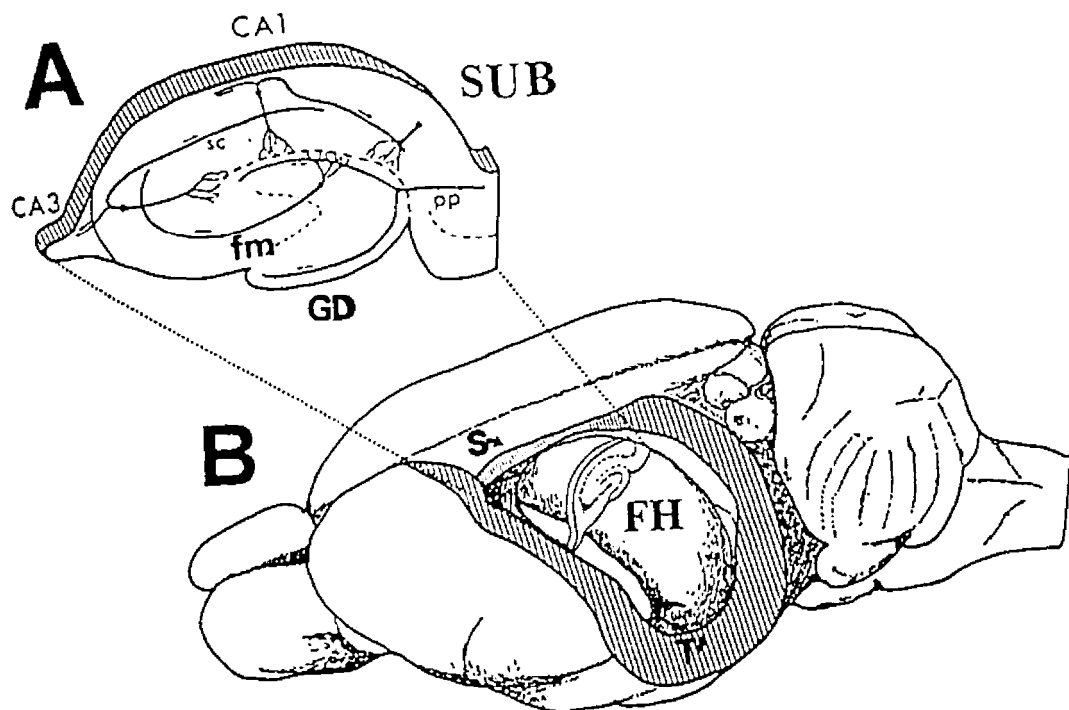
La FH forma parte del sistema límbico al cual se le ha relacionado con la integración tanto de procesos afectivos como cognoscitivos. Su organización permite llevar a cabo estudios conductuales, electrofisiológicos, anatómicos, histoquímicos y ultraestructurales encaminados a entender los cambios funcionales que se presentan debido a la influencia de factores perinatales diversos, incluyendo a una nutrición inadecuada durante el desarrollo.

Dentro de las ventajas que presenta la formación hipocámpica para su análisis se encuentran las siguientes: 1) su organización anatómica está bien estudiada, 2) se conoce su electrofisiología básica de manera precisa, 3) se han identificado sus relevos sinápticos, 4) participa en procesos cognoscitivos como el aprendizaje y la memoria, 5) se afecta en su desarrollo por factores ambientales como la desnutrición, 6) sus neuronas en especies altriciales se generan antes y después del nacimiento lo que permite estudios del efecto de la desnutrición y malnutrición, sobre los procesos ontogenéticos prenatales y postnatales hipocámpicos.

### LOCALIZACIÓN Y ANATOMÍA

En los roedores, la FH se encuentra inmersa en la corteza medio-basal del Sistema Nervioso Central (SNC). La estructura tridimensional de la FH en los roedores es relativamente compleja; a *grosso modo*, es una estructura cilíndrica elongada cuyo eje longitudinal se dobla en forma de "C" o en semicírculo que se extiende rostro-dorsalmente desde los núcleos septales hasta el lóbulo temporal caudo-ventralmente (Amaral y Witter, 1989) (Figura 1). Está formada por cuatro regiones que incluyen: 1) el giro dentado (GD) o *fascia dentata*, 2) el hipocampo propiamente dicho o *Cornu de Ammon* (CA), que en roedores se divide en tres: CA1, CA2 y CA3, 3) el complejo subicular (*subiculum*, *presubiculum* y *parasubiculum*) y 4) la corteza entorrinal.

Con base a la disposición y a las características de las neuronas que lo forman así como de las conexiones que presentan, el GD y el hipocampo se han dividido en capas o *stratums*. El hipocampo propiamente dicho o *Cornu de Ammon* en sus tres campos



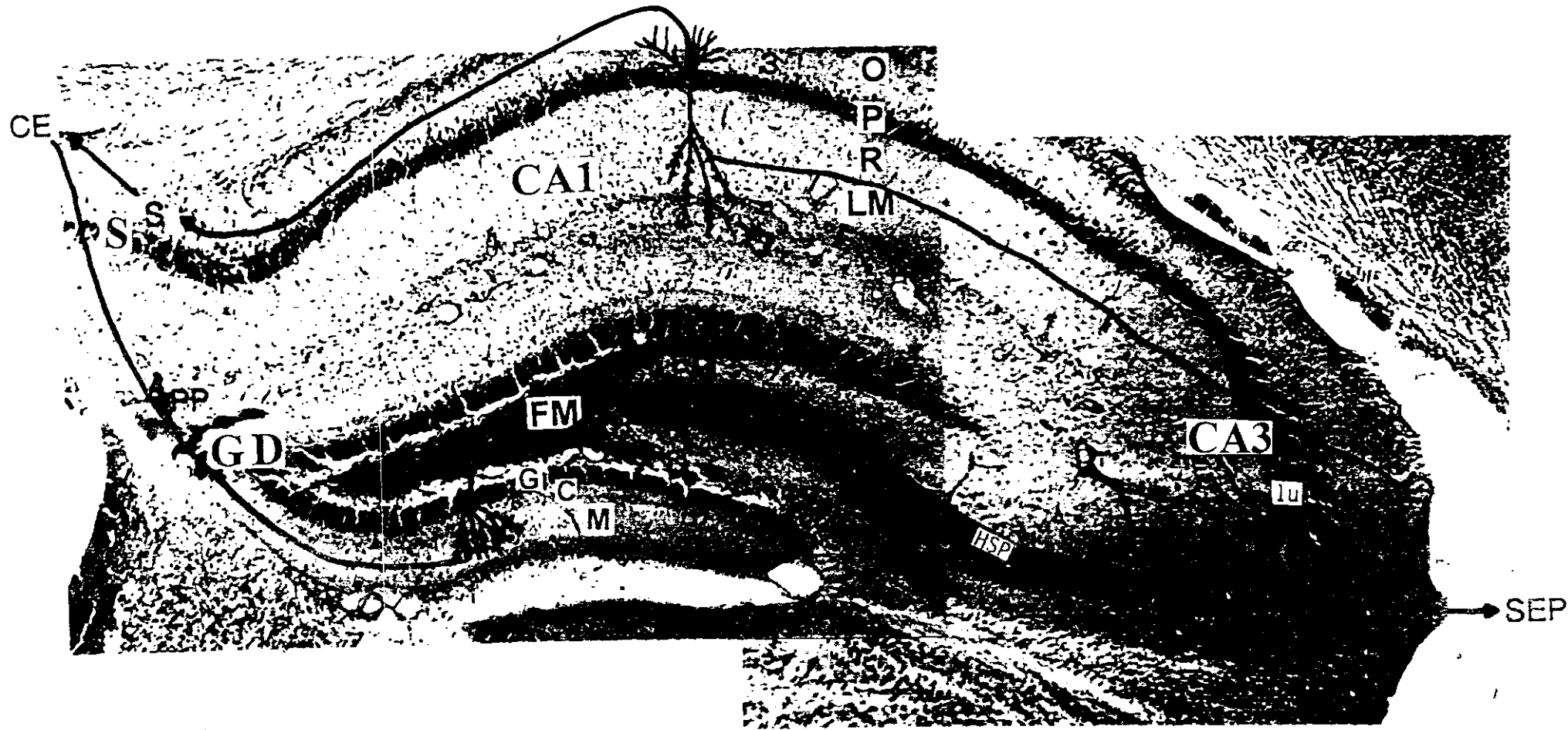
**Figura 1.** En B se representa el encéfalo de la rata del cual se ha removido parte de la corteza para ubicar a la formación hipocámpica (FH). El eje longitudinal de la FH se extiende desde el núcleo septal (S) rostro-dorsal hasta la corteza temporal (T) caudo-ventralmente, arqueándose en forma de C o en semicírculo. Las regiones principales de la FH (excepto la corteza entorrinal) se observan en la proyección superior de un corte tomado aproximadamente a la mitad del eje septo-temporal (A). También se observa el circuito interno de la FH. CA1 y CA3, Cornu de Ammon (CA) 1 y 3 respectivamente; fm, fibras musgosas; GD, giro dentado; pp, patrón perforante; sc, colaterales de Schaffer; SUB, subiculum.

presenta las siguientes capas o *strata*: *stratum oriens* (capa polimorfa), *stratum pyramidale* (capa piramidal), *stratum radiatum* (capa radiada), *stratum lacunosum-moleculare*, (capa lagunosa-molecular). En el *stratum pyramidale* se encuentran los cuerpos o somas de las neuronas piramidales, dentro del *stratum oriens* descienden las dendritas basales de estas neuronas, la región acelular superficial a la capa piramidal, donde se localizan las dendritas apicales de estas células, se divide en una capa profunda: el *stratum radiatum* y un *stratum* más superficial: el *lacunosum-moleculare*. En el CA3, la región acelular por encima de la capa piramidal que recibe las eferencias del GD se conoce como *stratum lucidum* (Ramón y Cajal, 1899; Lorente de Nó, 1934; Amaral y Witter, 1989, Figura 2). Esta última subregión fue llamada *stratum lucidum* por Ganser (1882) y más tarde *stratum* o haz suprapiramidal por Köelliker en 1896 (citados en Blackstad y Kjaerheim 1961). Es en esta región donde se encuentra la parte proximal de las dendritas apicales de las células piramidales del CA3 cuyas espinas dendríticas especializadas, las excrescencias torneadas, establecen conexiones sinápticas con las expansiones de los axones o FM de las células granulares situadas en el GD.

El GD consta de tres capas: la capa polimorfa o hiliar (*hilus*), la capa granular (*stratum granulosum*) y la capa molecular o plexiforme (*stratum moleculare*). En la capa granular se encuentran los somas de las células granulares y en la capa molecular se localizan sus dendritas. En la zona hiliar se encuentran diversas células heterogéneas además de los axones de las células granulares (Ramón y Cajal, 1899; Lorente de Nó, 1934; Amaral y Witter, 1989, Figura 2).

## NEURONAS PRINCIPALES

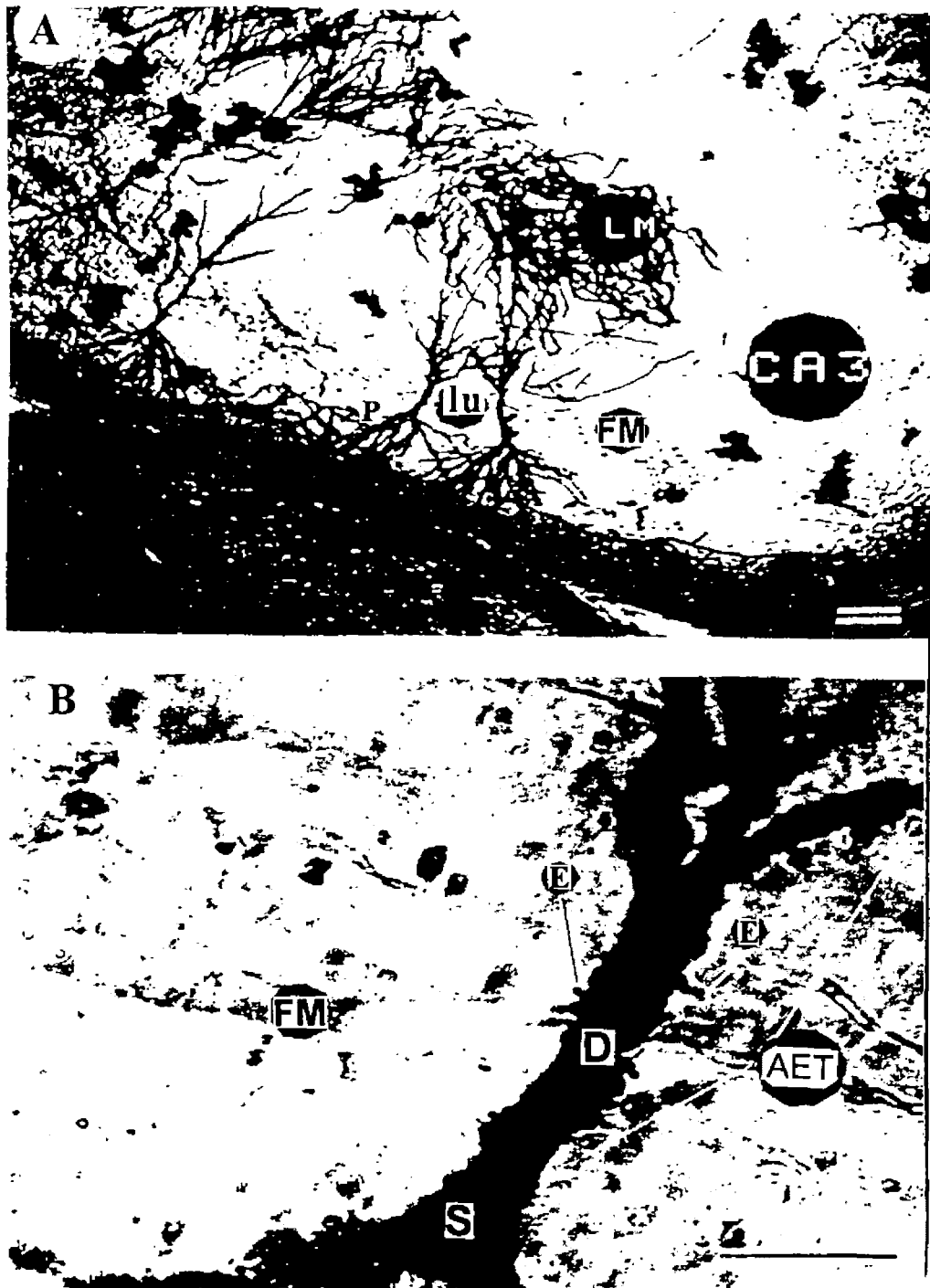
Las neuronas principales del hipocampo son las neuronas piramidales y representan su clase más numerosa. Como ya se mencionó los cuerpos de estas neuronas forman el *stratum pyramidale*, el cual forma una lámina curvada que tiene de 2 a tres células de grosor. Los cuerpos celulares piramidales son cónicos, y miden de 20-40  $\mu\text{m}$  en la base y de 40-60  $\mu\text{m}$  de altura. Cada una tiene una dendrita apical de 5-10  $\mu\text{m}$  de diámetro, que pasa a través del *stratum radiatum* al *stratum lacunosum-moleculare*. Existen también diversas dendritas basales, de 3-6  $\mu\text{m}$  de diámetro, cuyas arborizaciones se extienden 200-300  $\mu\text{m}$  y



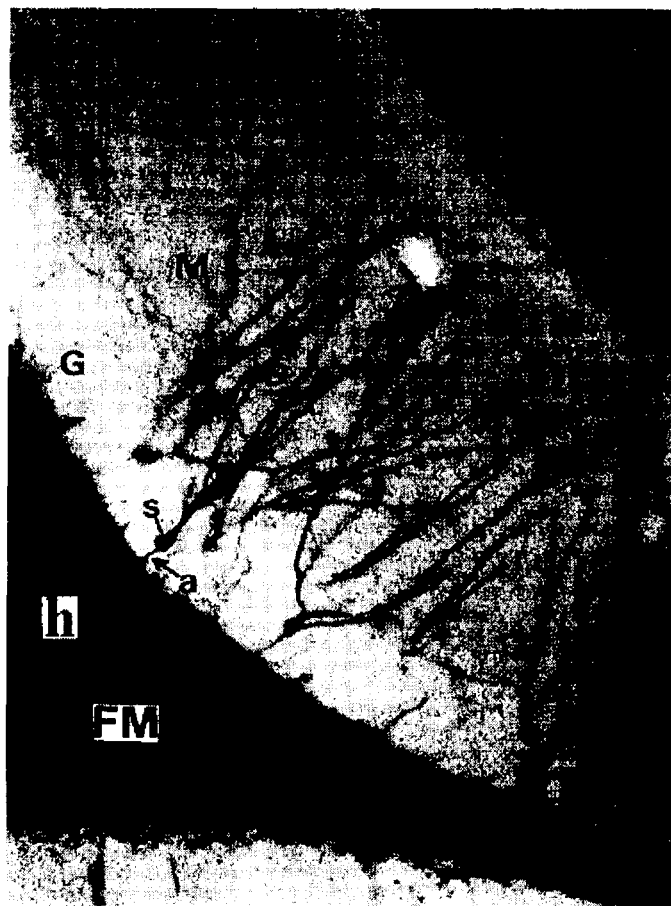
**Figura 2.** Se observan superpuestas una fotomicrografía de un corte coronal medial de la FH teñido con la técnica de Timm y un esquema de las neuronas principales interconectadas para formar el circuito trisináptico interno de la FH. La técnica histoquímica de Timm evidencia la distribución del sistema de fibras musgosas (FM) y la laminación característica de la FH. *Strata: oriens (O), pyramidale (P), radiatum (R), lacunosum-moleculare (L-M) y lucidum (lu).* CE, corteza entorrinal; S, subiculum; GD, giro dentado; CA1 y CA3, *Cornu de Ammon (CA)* 1 y 3 respectivamente; G, capa granular; M, capa molecular; C, aferencias comisurales y de asociación; CS, colaterales de Schaffer; HSP, haz suprapiramidal del sistema de fibras musgosas; SEP, *septum*; 1, 2 y 3, primer, segundo y tercer relevo sináptico del circuito interno de la FH.

forman el *stratum oriens*. Tanto las dendritas basales como las apicales están cubiertas con espinas (Amaral y Witter, 1989). La morfología y topografía de las células piramidales varía gradualmente a lo largo del hipocampo. Siguiendo desde la región del CA3 al CA1, los cuerpos celulares se hacen pequeños y las dendritas apicales largas, más delgadas y regulares en su patrón de ramificación. Las células piramidales en la región del CA3 son llamadas células piramidales gigantes y tienen espinas dendríticas inusuales grandes y ramificadas en la parte proximal del árbol dendrítico que desde 1899, Ramón y Cajal denominó espinas torneadas. Estas espinas constituyen las especializaciones postsinápticas asociadas con las expansiones sinápticas gigantes de las fibras musgosas (Ramón y Cajal, 1899; Lorente de Nó, 1934; Amaral y Witter, 1989; Brown y Zador, 1990) (Figura 3).

Las neuronas principales del GD son las células granulares (Figura 4), cuyos somas son pequeños (10  $\mu\text{m}$  de diámetro en promedio). Cada célula granular da lugar a una o diversas dendritas, de 1-2  $\mu\text{m}$  de diámetro, que se ramifican extensamente y están cubiertas con espinas. Los axones de las células granulares forman el sistema de fibras musgosas, este integra la proyección principal de las células granulares hacia las células piramidales localizadas en el *stratum lucidum* del CA3, y representan la vía principal aferente de tipo excitatoria intrínseca que conecta el GD con el propio hipocampo (Andersen y col., 1971). El plexo de FM lo integran axones finos no mielinizados con botones terminales gigantes (Haug, 1967; Blackstad y Kjaerheim, 1961), que contienen niveles altos de cine (Haug, 1967; Frederickson y Danscher, 1990). Vistos con la técnica argéntica de Golgi semejan piezas individuales de musgo, por lo que Cajal los llamo “fibras musgosas” (Ramón y Cajal, 1899). La única salida del GD es hacia la región CA3 por vía de los axones de las fibras musgosas. Conforme ellos corren hacia la región CA3, estos axones dan lugar a un promedio de siete colaterales primarias (Claiborne y col., 1986), las cuales se dividen en ramas secundarias y terciarias. Estos axones colaterales están confinados a la región hiliar. La distribución de las expansiones sinápticas colaterales en el hilio, se evidencia usando la tinción de Timm, la cual es selectiva para axones y terminales con alto contenido en cine. Esta técnica también muestra la distribución de las expansiones sinápticas de las fibras musgosas en el *stratum lucidum* de la región del CA3 (Figura 2).



**Figura 3.** Imágenes capturadas de un corte frontal del CA3 de la FH. En A, una imagen panorámica (3.2x) donde se observan 2 células piramidales. LM, *stratum lacunosum-moleculare*; P, *stratum pyramidale*; lu, *stratum lucidum*; FM fibras musgosas. La barra de escala equivale a 200  $\mu$ m. B, Mayor aumento (400x) de una neurona piramidal. Note las espinas especializadas o excrescencias torneadas (E) en la parte proximal de la dendrita principal (D). FM, fibras musgosas en el *stratum lucidum* formando el haz suprapiramidal del sistema de fibras musgosas. S, soma neuronal; AET, área de excrescencias torneadas. La barra de calibración en cada figura equivale a 50  $\mu$ m. (Modificado de Díaz-Cintra y col., 1994).



**Figura 4.** Fotomicrografía de una célula granular del borde dorsal del giro dentado. Note que de la base del soma neuronal (s), emergen los axones (a) que se ramifican profusamente en la región hiliar (h) para formar el sistema de fibras musgosas (FM). D, dendritas; M, capa molecular; G, capa granular. 10x.

En la rata existe un estimado de 1,000,000 de células granulares dentadas (Gaarskjaer, 1978; Boss y col., 1985), 330,000 células piramidales del CA3 y 420,000 células piramidales del CA1 (Boss y col., 1987). El número de interneuronas intrínsecas no se conoce, aunque probablemente éstas sean menos que las células principales. Cada neurona piramidal del CA3 tiene en promedio 80 aferencias sinápticas de las fibras musgosas, localizadas principalmente sobre la dendrita apical proximal en el *stratum lucidum*. Una célula típica del CA3 puede recibir tantas como 4,500 aferencias sinápticas de la vía perforante sobre la parte distal de las dendritas apicales y 7,700 recurrentes de otras neuronas piramidales del CA3. No se dispone de estimaciones exactas del número de aferencias comisurales y de asociación a las regiones CA3 y CA1 (Brown y Zador, 1990).

## VÍAS DE ENTRADA A LA FORMACIÓN HIPOCÁMPICA

El hipocampo se encuentra dentro de la clase de corteza de asociación supramodal debido a que su principal entrada cortical emerge, ya sea de la corteza de asociación polimodal, o de otras áreas de asociación supramodal por lo que es considerado algunas veces como el área de asociación supramodal más compleja (Swanson, 1983), particularmente debido a que recibe e integra información de todas las modalidades sensoriales. La corteza entorrinal provee la entrada principal sensorial al hipocampo, GD y subiculum a través de las fibras del *alveus* y vía perforante. La corteza entorrinal recibe entrada de muchas otras regiones del cerebro como las cortezas de asociación, corteza olfatoria, diversos núcleos talámicos, el *claustrum* y la amígdala (Brown y Zador, 1990).

Una segunda entrada se origina en los núcleos septal y de la banda diagonal. Esta entra al hipocampo por cuatro rutas: la fimbria, el fornix dorsal, la estria supracallosa y el complejo amigdalóideo. Las terminaciones se distribuyen a través del hipocampo, pero preferentemente en las regiones del CA3 y del GD. Una tercera entrada considerable está integrada por las fibras comisurales desde el hipocampo contralateral las cuales entran en la fimbria y después se conectan en el fornix. En la rata, ambas regiones CA3 y CA1 reciben proyecciones significativas, organizadas de manera topográfica desde la región contralateral CA3 en adición a la entrada ipsilateral. De manera similar el tercio interno de la capa molecular del GD, recibe una gran entrada organizada topográficamente desde el hilio



contralateral en adición a la proyección desde el *hilus* ipsilateral (Swanson y col., 1978). La región del CA3 no proyecta al GD ipsilateral o contralateral (Laurberg y Sorensen, 1981).

Diversos núcleos del tallo cerebral proyectan al hipocampo, incluyendo una importante proyección noradrenérgica desde el *locus coeruleus* y una entrada serotoninérgica desde el núcleo dorsal del *rafe*. También existen evidencias de una entrada dopaminérgica, originada en el área tegmental. La proyección hipotalámica emerge de un grupo de células cercanas a los cuerpos mamilares. Esta pasa en parte a través de la fimbria y en parte a través de una ruta ventral para terminar en la capa molecular del GD y en las regiones CA2 y CA3. El núcleo talámico anterior proyecta al *subiculum* próximo (Brown y Zador, 1990).

## **CIRCUITERIA HIPOCÁMPICA**

Las conexiones básicas de la FH fueron determinadas desde los estudios clásicos de Ramón y Cajal (1899) y Lorente de Nó (1934). La organización funcional del hipocampo tradicionalmente se ha descrito en términos del circuito trisináptico (Andersen y col., 1971). Aún cuando esta vieja visión es útil pedagógicamente para introducirse al estudio del hipocampo, la organización sináptica hipocámpica es más complicada. A continuación se describirá el clásico circuito trisináptico y después otros circuitos locales del flujo de información a través del hipocampo.

## **CIRCUITO TRISINÁPTICO HIPOCÁMPICO**

La secuencia trisináptica es como sigue: las fibras de la vía perforante emergen de las células estrelladas y piramidales en las capas II y III de la corteza entorrinal medial y lateral (Steward, 1976), pasan a través del complejo subicular y de la fisura hipocámpica, entran al GD y terminan en los dos tercios externos de la capa molecular. En este lugar forman sinapsis excitatorias sobre las espinas dendríticas de las células granulares constituyendo así el primer relevo sináptico en la entrada de información al tricircuito. Las células granulares del GD envían sus axones (fibras musgosas) a la región hiliar del GD, después alcanzan el *stratum lucidum* de la región CA3. En esta región las expansiones sinápticas de las fibras musgosas terminan sobre las excrescencias torneadas localizadas en la parte proximal de las

dendritas de las células piramidales del CA3 con las que forman sinapsis *en passant*, el segundo relevo sináptico del tricircuito (sinapsis asimétricas EM-CA3). Las neuronas piramidales de la región CA3 envían sus axones fuera del hipocampo a través de la fimbria. Cada axon envía una colateral mielinizada (colaterales de Schaffer) hacia la región CA1. En los *strata radiatum y oriens*, las colaterales de Schaffer forman sinapsis *en passant* sobre las dendritas apicales de las neuronas piramidales del CA1 integrando así el tercer relevo del circuito trisináptico hipocámpico (Figura 2).

La región hipocámpica contiene sistemas de proyección que conectan a una de las principales eferencias hipocámpicas, regresando así a su principal aferencia sensorial. Axones de las neuronas piramidales del CA1 proyectan a las neuronas piramidales del complejo subicular y a la parte profunda de la corteza entorrinal. Existe una proyección principal desde el *subiculum* a las capas profundas (V y VI) de la corteza entorrinal. Las capas profundas de la corteza entorrinal proyectan a sus capas superficiales (II y III) (Köhler, 1986) y estas últimas dan lugar a las fibras de la vía perforante. Así, la entrada de la vía perforante a las células granulares originadas en la corteza entorrinal, y la salida desde el CA1 es en gran parte a la misma área, tanto por vía directa como subicular. Las conexiones de la región hipocámpica así parecen estar organizadas en un circuito cerrado que permite el flujo unidireccional de información. Además, cada región proyecta no sólo a la siguiente región dentro de la secuencia, sino también a una o dos después. La excepción es el GD, el cual no envía proyecciones más allá de la región CA3.

En adición a su gran proyección al GD, la corteza entorrinal también conecta con las regiones CA3 y CA1 en el *stratum lacunosum-moleculare*. Igualmente, la región CA3 proyecta no sólo a la región CA1 sino también al *subiculum*. En la misma forma, la región CA1 envía fibras tanto al *subiculum* como a la corteza entorrinal. El resultado es una serie de proyecciones escalonadas formando circuitos sobrepuestos y no precisamente un circuito simple.

Hasta ahora sólo se han enfatizado las conexiones sinápticas entre regiones de la FH. Sin embargo, existen también interacciones sinápticas relativamente complejas dentro de cada región. Estos circuitos locales consisten por lo menos de una neurona principal y una célula en cesta inhibitoria asociada, pero puede también incluir sinapsis excitatorias

recurrentes. El sistema de excitación recurrente es poderoso en la región CA3 (Johnston y Brown, 1981; Miles y Wong, 1986), y está formado por axones colaterales de las neuronas piramidales que proyectan de vuelta hacia sus vecinas. Las neuronas piramidales de la región CA3 también reciben gran inhibición sináptica (Miles y Wong, 1984, 1987; Griffith y col., 1986). Estimaciones basadas en registros pareados en rebanadas de cerebro transversales sugieren que cada célula piramidal está inervada por más de 15 interneuronas inhibitorias (Miles y Wong, 1987). Las conexiones inhibitorias emergen del plexo de células en cesta del GD y se extienden longitudinalmente (Struble y col., 1978).

Así, el patrón de conexiones aferentes y eferentes de las distintas regiones de la FH, sugieren que la región CA3 es el principal integrador de la FH (Swanson y Cowan, 1977). Este es el intermediario entre la entrada de información al GD y la salida del hipocampo como un todo, recibiendo el haz de proyecciones dentadas y enviando importantes tractos tanto localmente, como a otras áreas del cerebro.

## NEUROTRANSMISORES

El ácido gamma-aminobutírico (GABA) es el principal transmisor liberado por las interneuronas inhibitorias sobre el soma y las dendritas de las neuronas piramidales y granulares. La acción del GABA depende de la clase de receptor postsináptico al cual se une. Dos subtipos de receptor a GABA se distinguen en el hipocampo, el subtipo GABA<sub>A</sub>, está acoplado a una conductancia rápida de eloro, en tanto que el subtipo GABA<sub>B</sub>, está acoplado a una conductancia lenta de potasio. El GABA<sub>A</sub> se encuentra en el soma y el GABA<sub>B</sub> sobre las dendritas de las neuronas del hipocampo (Janígro y Schwartzkroin, 1988). El GABA puede interactuar con otros neurotransmisores o sustancias neuromoduladoras en el hipocampo. El glutamato aumenta la respuesta del receptor GABA<sub>A</sub> (Stelzer y Wong 1989) y la serotonina y el receptor a GABA<sub>B</sub> pueden interactuar vía canales de potasio que están acoplados por la misma proteína G (Andrade y col., 1986).

La acetilcolina (ACh) está distribuida en el hipocampo, donde ejerce diversos efectos neuromoduladores. La mayoría de las entradas colinérgicas a las células piramidales están en la capa infrapiramidal y en menor extensión en la capa suprapiramidal, un tanto distales al soma (Storm-Mathisen, 1977). La entrada colinérgica al hipocampo se origina en el

núcleo septal medial y en la banda diagonal, aunque solo el 50% de las fibras desde estas regiones son colinérgicas. Se ha sugerido que la ACh puede tener un efecto inhibitorio presináptico sobre la transmisión excitatoria (Rovira y col., 1983). La proyección noradrenérgica (NE) al hipocampo proviene desde el *locus coeruleus* (Storm-Mathisen, 1977). Esta entrada es más densa en el hilio del GD y en el *stratum lucidum* de la región CA3 y menos densa en el *stratum radiatum* de la región CA1 (Moore y Bloom, 1979; Loy y col., 1980).

El glutamato es el principal neurotransmisor excitador en el hipocampo y sus receptores pueden ser ionotrópicos o metabotrópicos. La familia de los receptores ionotrópicos está formada por tres tipos que responden a los agonistas: 1) ácido propiónico  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxasol (AMPA), 2) kainato y 3) N-metil-D-aspartato (NMDA). Aunque las secuencias primarias de los receptores AMPA y kainato son distintas, entre ellos existen similitudes farmacológicas que generan confusiones, por lo que en ocasiones se mencionan como AMPA/kainato. Este tipo receptor puede ser bloqueado por 6-cyano-7-nitroquinoxalina-2,3-diona (CNQX). Mientras que el receptor NMDA es bloqueado selectivamente por la droga 2-amino-5-fosfonovalerato (APV) y por la MK801. El receptor quisqualato B es de tipo metabotrópico y activa un sistema de segundos mensajeros unido a fosfatidilinositol (revisado en Fernández y col., 1998; Kandel y col., 1991).

Otros neurotransmisores excitadores presentes en el hipocampo, específicamente en las terminales de las fibras musgosas son los diferentes péptidos opioides. Así, se ha documentado que existen diversos péptidos opioides derivados de pro-dinorfina como la dinorfina A (Terrian y col., 1990) y la dinorfina B (McGinty y col., 1983; Hoffman y Zamir, 1984; Terrian y col., 1990). Además de péptidos derivados de la pro-encefalina como la leu-encefalina (McGinty y col., 1983; Derrick y col., 1991, 1992). Los receptores a opioides: mu, delta y kapa también están presentes en el hipocampo. Los péptidos opioides derivados de pro-encefalina son selectivos principalmente para el receptor delta, aunque también tienen afinidad para los receptores mu. Los péptidos opioides derivados de pro-dinorfina se unen principalmente al receptor kapa, aunque la dinorfina produce efectos

excitatorios en el hipocampo que son mediados por receptores  $\mu$  (Revisado en Kandel y col., 1991; Derrick y col., 1992).

### **CARACTERÍSTICAS ULTRAESTRUCTURALES DE LAS SINAPSIS ASIMÉTRICAS ENTRE FIBRAS MUSGOSAS Y EXCRECENCIAS TORNEADAS DE LAS CÉLULAS PIRAMIDALES DEL CA3 (FM-CA3)**

Los axones amielínicos de las células granulares del GD, tienen un diámetro promedio de  $0.2 \mu\text{m}$  y tienden a correr en fascículos que promedian  $1 \mu\text{m}$  en diámetro (Blackstad y Kjaerheim, 1961; Amaral y Dent, 1981; Claiborne y col., 1986). A intervalos de  $140 \mu\text{m}$ , los axones de las fibras musgosas dan lugar a grandes expansiones sinápticas penetradas por diversas cabezas de excrecencias torneadas (las espinas especializadas de las células piramidales del CA3) con las cuales establecen conexiones sinápticas. Estas especializaciones postsinápticas o excrecencias torneas son también de gran tamaño (hasta  $5 \mu\text{m}$  de diámetro), por esta razón y debido a las características morfológicas típicas tanto de la especialización pre y postsináptica, que más adelante se detallarán, estas sinapsis se reconocen inequívocamente a nivel de microscopía electrónica (Figura 5).

Cuando se observan micrografías electrónicas del *stratum-lucidum*, inmediatamente arriba del pericarion, se observan haces de axones finos. Estos contienen túbulos de  $170\text{-}200 \text{ \AA}$  en diámetro. El número de túbulos en un corte transversal de un axón es de  $3\text{-}12$  y generalmente corren paralelos a éste. Otros componentes observados en las porciones finas de las fibras musgosas comprenden filamentos finos y ocasionalmente vesículas pequeñas. Estas últimas son escasas y tienen un diámetro de  $60 \text{ \AA}$  o menos, algunas veces arriba de  $90 \text{ \AA}$ . Dentro de los haces, las fibras musgosas están en contacto directo unas con otras. Espacios extracelulares estrechos se observan, anchos en algunos lugares. Pueden existir contactos con procesos gliales principalmente en la periferia de los haces de fibras musgosas. También fibras musgosas simples o en haces pueden estar en contacto con otras estructuras p. e. fibras mielinizadas, eje de las dendritas y terminales axónicas (Figura 5).

De acuerdo a los estudios de Blackstad y Kjaerheim (1961), Laatsch y Cowan (1966) y Amaral y Dent (1981), los botones terminales de las fibras musgosas en micrografías electrónicas de animales adultos, aparecen como grandes expansiones sinápticas (Figura 5).

**Figura 5.** Micrografía electrónica del *stratum lucidum* del campo CA3 de la formación hipocámpica (6300x) donde se pueden identificar fácilmente los elementos tisulares típicos de esta región. En la parte superior izquierda se observan haces o fascículos de fibras musgosas (HFM) cortados transversalmente. FM, indica una expansión o terminal de una fibra musgosa llena de vesículas sinápticas. E, señala una espina especializada o excrescencia torneada de una neurona piramidal del campo CA3. Nótese como esta excrescencia torneada emerge vía un delgado tallo o cuello de una dendrita (DE) y como se divide en dos cabezas que establecen contactos sinápticos asimétricos con la terminal de una fibra musgosa a la cual penetran (sinapsis asimétricas FM-CA3). Esta terminal axónica también aparece penetrada por otras cabezas de espinas con las que también establece contactos. La flecha negra indica una sinapsis de tipo asimétrico y el contorno de flecha una sinapsis de tipo simétrico entre una terminal de una fibra musgosa y una dendrita. También se pueden apreciar varias mitocondrias (cabezas de flecha) dentro de las terminales axónicas y dendritas. La barra de calibración equivale a 1  $\mu\text{m}$ . AM, axones mielinizados.

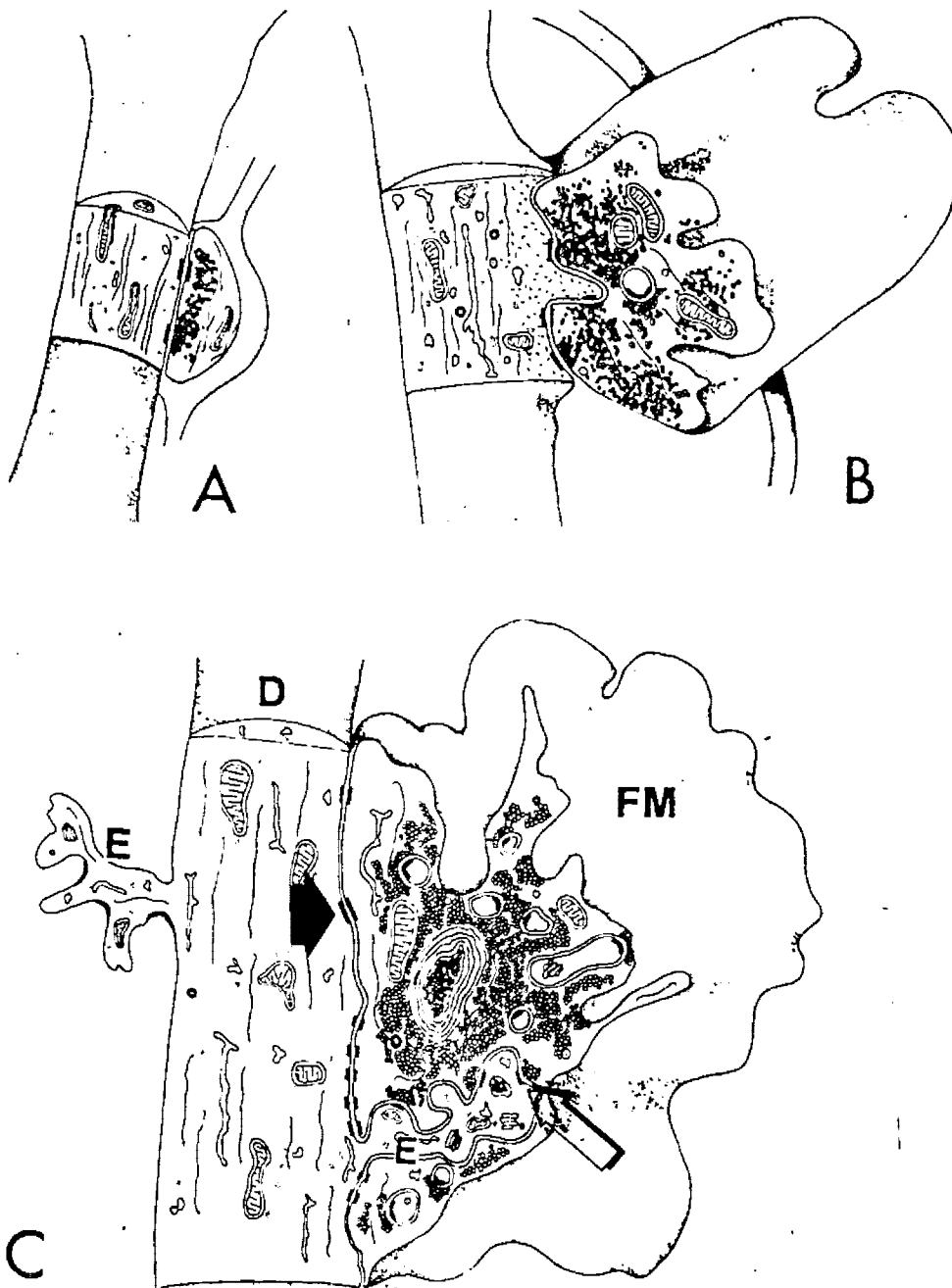


El tamaño de estos perfiles es variable, los más grandes tienen un eje longitudinal de 5 micras o más. El área promedio de estos perfiles es de  $11 \mu\text{m}^2$  y el perímetro promedio es de  $20 \mu\text{m}$ . Estos botones gigantes están llenos de vesículas de diversos tipos. En algunas regiones con gran cantidad de vesículas claras pequeñas que miden de 35-45 nm empaquetadas densamente, existen pocas vesículas con centro denso que presentan un tamaño promedio de 60-140 nm, en menor frecuencia se observan vesículas claras y grandes, las cuales varían en tamaño entre un rango de 60-200 nm (Amaral y Dent, 1981; Claiborne y col., 1986). Existen de 6-12 mitocondrias visibles en un corte a través de una expansión madura y éstas se encuentran en grupo y alineadas a lo largo de la superficie de la expansión, adyacente al eje de la dendrita. Existen algunos túbulos del retículo endoplásmico liso. Ocasionalmente se observan microtúbulos y neurofilamentos (Amaral y Dent, 1981) (Figura 6).

Las expansiones axónicas tienen dos tipos de uniones; una que se caracteriza por densidades simétricas, las cuales no se asocian comúnmente a una colección de vesículas y casi siempre se les encuentra entre la expansión axónica y el eje principal de una dendrita apical. Existen de 4-6 de estos contactos por expansión y su promedio en longitud es de  $0.17 \mu\text{m}$ . El segundo tipo de unión tiene características típicas de una sinapsis asimétrica o de tipo I, lo cual significa que estas uniones tienen densidades asimétricas, contienen grandes vesículas redondas y se localizan entre la expansión y las espinas ramificadas profusamente (excrecencias torneadas) sobre la dendrita proximal de la célula piramidal. Estas sinapsis están asociadas con grupos de vesículas claras y un número pequeño de vesículas con núcleo denso, el ancho de la hendidura para estas uniones es de 22 nm. Existen de 5-8 de estas uniones asimétricas por expansión y su longitud promedio es alrededor de  $0.12-0.24 \mu\text{m}$  (Amaral y Dent, 1981; Gaarskjaer, 1986; Chicurel y Harris, 1992).

El porcentaje de la superficie de la membrana celular que está ocupada por zonas de unión puede estar representada por la tasa de la longitud combinada de áreas de contactos y el perímetro de la expansión. Cuando ambos tipos de uniones se consideran juntas, esta tasa representa el 15% del perímetro ocupado por las zonas de unión. Cuando sólo se consideran las uniones asimétricas la tasa es el 9% del perímetro ocupado por estas densidades





**Figura 6.** Esquema que representa tres estadios en la maduración de las terminales de fibras musgosas/excrecencias tomadas de las células piramidales del CA3. En el primer estadio (A), las pequeñas expansiones de fibras musgosas establecen tanto contactos simétricos como asimétricos con el eje de la dendrita. Después de un crecimiento pronunciado y la acumulación de vesículas en la terminal axónica, la segunda fase (B) se inicia por el crecimiento de los "dedos dendríticos" o espinas especializadas que penetran la terminal axónica. Durante este estadio las sinapsis asimétricas empiezan a asociarse con los procesos dendríticos que penetran la terminal. En el estadio final, las excrecencias tomadas aumentan y su citoplasma acumula una variedad de organelos incluyendo: el aparato espinal, ribosomas, retículo endoplásmico liso y mitocondrias. En este estadio, todas las sinapsis asimétricas se establecen con las excrecencias tomadas, mientras que las simétricas se mantienen con el eje de la dendrita. (Tomado de Amaral y Dent, 1981). D, dendrita; FM, terminal de una fibra musgosa, E, excrecencia tomada, la flecha señala una sinapsis simétrica y el contorno de flecha, una sinapsis asimétrica.

sinápticas. Las uniones axo-axónicas son muy raras en esta zona. La presencia de espinas invaginadas es una característica primaria de la expansión madura (Figura 4). Existen de 3-5 espinas dendríticas invaginadas por expansión en animales adultos, además su desarrollo ocurre con la edad así, en animales de 14 días sólo se observa una espina por expansión y antes de los 9 días casi no se observan (Amaral y Dent, 1981) (Figura 6).

Las vesículas sinápticas contienen además de glutamato (Storm-Mathisen y col., 1983; Terrian y col., 1988, 1990), diferentes péptidos opioides derivados de pro-dinorfina (McGinty y col., 1983; Hoffman y Zamir, 1984; Terrian y col., 1990) y de pro-encefalina (McGinty y col., 1983; Derrick y col., 1991, 1992), ATP (Terrian y col., 1989), GABA (Sandler y Smith, 1991) y altas concentraciones de cinc (Haug, 1967; Danscher y col., 1976; Frederickson y Danscher, 1990).

Al igual que las expansiones sinápticas, las excrecencias torneadas tienen una estructura tridimensional complicada. Diversos reportes indican que las espinas emergen de la dendrita como un tallo o cuello acortado que puede ser muy delgado y medir  $0.15 \mu\text{m}$ , aunque puede variar en grosor con un promedio de  $0.5 \mu\text{m}$ . Cada tallo da lugar a dos o más lóbulos o ramas secundarias que se extienden en cabezas bulbosas y de forma irregular, las cuales en su extensión mayor miden  $0.5-1.2 \mu\text{m}$  de ancho. La longitud de estos complejos de espinas puede extenderse hasta  $2.8 \mu\text{m}$  de su dendrita principal y la distancia entre las excrecencias varía en un rango de  $1-3 \mu\text{m}$ , aunque también extensiones considerables de las dendritas se observan desprovistas de excrecencias torneadas. Las partes ramificadas externas de excrecencias vecinas pueden estar en contacto unas con otras aún, y cuando sus tallos o cuellos estén separados, la mayoría de las cabezas tienen una densidad sináptica. Dentro de la cabeza de la espina se observa una variedad de organelos que incluyen: el aparato espinal, cuerpos multivesiculares, vesículas con núcleo denso de tamaño variable en un rango de  $70-120 \text{ nm}$ , mitocondrias de varios tamaños y formas, cisternas aisladas de retículo endoplásmico liso, retículo endoplásmico rugoso, microtúbulos que se extienden desde la dendrita hasta las partes ramificadas de algunas espinas con más de cuatro cabezas y algunos polirribosomas. El número de cabezas por espina varía en un rango de 1 a 16 con un promedio de  $7 \pm 4$  cabezas. Cada espina tiene varias densidades postsinápticas las cuales están en contacto ya sea con una o con varias expansiones de fibras musgosas (Amaral y

Dent, 1981; Blackstad y Kjaerheim, 1961; Chicurel y Harris, 1992); en general, las espinas ramificadas hacen sinapsis con un solo botón, pocas establecen conexiones sinápticas con más de un botón. Como otras sinapsis excitatorias de la FH, las sinapsis FM-CA3 despliegan potenciación a largo plazo.

## **POTENCIACIÓN A LARGO PLAZO**

La potenciación a largo plazo (LTP) es un incremento persistente en la eficacia sináptica después de la estimulación repetitiva de una población sináptica, que puede durar horas, días, o más (Bliss y Lomo, 1973; Bliss y Gardner-Medwin, 1973). La LTP es uno de los pocos candidatos para explicar los mecanismos sinápticos que subyacen al aprendizaje y memoria en los mamíferos. Esta forma de plasticidad ha sido estudiada en las aferencias sinápticas desde las fibras musgosas a la región CA3, en las sinapsis entre el patrón perforante y las células granulares del GD y en la entrada sináptica de las colaterales de Schaffer a la región CA1. Existen diferencias en los mecanismos de la LTP de los dos últimos sistemas sinápticos con el primero. Por un lado, la inducción de la LTP de las fibras musgosas es independiente de receptores a NMDA y dependiente de la activación de receptores a opioides (Derrick y col., 1991, 1992), en tanto que en las restantes vías sinápticas, la inducción de la LTP es dependiente de la activación de receptores a NMDA. La LTP en la sinapsis FM-CA3 es bloqueada por naloxona un antagonista de los receptores a opioides, en tanto que la LTP de las sinapsis fibras comisurales-CA3 no es atenuada por naloxona (Derrick y col., 1992). La LTP de las sinapsis FM-CA3 esta asociada a la activación de los receptores mu (Derrick y col., 1992). Los antagonistas del receptor a NMDA, tales como DL-2-amino-5-fosfonopentanoato (AP5), previene la inducción del LTP en las sinapsis colaterales de Schaffer, pero no en las sinapsis de las fibras musgosas (Harris y Cotman, 1986; Cotman y col., 1988). Otra diferencia farmacológica, la constituyen los antagonistas del receptor beta noradrenérgico que bloquean la inducción de la LTP en el sistema de fibras musgosas mientras que éstos parecen tener poco efecto sobre la LTP en el sistema de los colaterales de Schaffer (Hopkins y Johnston, 1988).

## EL RITMO THETA

En la rata, el ritmo theta es un patrón de actividad eléctrica de 5-12 Hz generado en la región hipocámpica que coexiste con ciertos estados conductuales en el animal en libre movimiento. Éste es más pronunciado cuando el animal está alerta e interesado en su medio ambiente y disminuye a medida que el estímulo se repite (Vanderwolf y col., 1975; Vinogradova 1995). Se ha propuesto que el ritmo theta sea el reflejo de la “entrada” de información a través del circuito hipocámpico (Winson y Abzug, 1978), o bien un proceso que sirve para “cuantificar” (Vanderwolf y col., 1975) o “hacer discreto” el tiempo con respecto al paso de información a través del circuito. Se ha sugerido que el ritmo theta tiene una doble función en el procesamiento de la información: por un lado facilita y prolonga la acción del estímulo que entra al hipocampo de manera concomitante con el disparo del ritmo theta y, por otro, impide la entrada de señales que aparecen durante el disparo de la salida de theta en un evento previo, eliminando la interferencia durante el procesamiento y registro de la información. Así, el ritmo theta se propone como el mecanismo de atención selectiva, un prerrequisito para la formación de la memoria (Vinogradova, 1995). Por otra parte, su actividad se considera como un modelo de actividad rítmica lenta, pero sus bases celulares se conocen parcialmente. Este ritmo tiene una amplitud máxima en los *strata oriens* de la región del CA1 y *moleculare* del GD (Winson, 1976). Los mecanismos sinápticos que delimitan la actividad theta parecen incluir influencias colinérgicas desde la vía septohipocámpica (Vertes, 1982; Vinogradova 1995).

## FUNCIÓN DEL HIPOCAMPO

Diversos estudios apoyan la participación del hipocampo en ciertos tipos de aprendizaje y memoria. Ello deriva de estudios *in vivo* que combinan lesiones y electrofisiología con modificaciones conductuales. Basados en tales investigaciones, se ha propuesto que el hipocampo y estructuras relacionadas en roedores participan en la “memoria de trabajo” (Olton y col., 1978; Olton, 1989), en la “memoria espacial” o “memoria contextual” (Barnes, 1988; Hirsch, 1980; Speakman y O’Keefe, 1989), así como en la conducta de rastreo olfatorio (Swanson 1983).

En humanos, las lesiones en el hipocampo producen alteraciones en la memoria episódica o conocimiento declarativo (memoria de gente, lugares, cosas y eventos) (Squire, 1992). Se ha documentado también que el hipocampo participa en el reconocimiento de palabras (Heit y col., 1988) y caras (Rolls, 1996).

En roedores se ha demostrado una asociación entre el tamaño de los campos terminales y el desarrollo conductual de animales, cuando se han sometido previamente a pruebas de laberintos de agua y radiales, así como a pruebas de habituación en campo abierto (Crusio y Schwegler, 1987; Crusio y col., 1987).

Estas modalidades conductuales no son mutuamente excluyentes, ya que la circuitería hipocámpica se integra probablemente como consecuencia de una variedad de conductas adaptativas.

## **MALNUTRICIÓN**

El desarrollo adecuado de todos los organismos vivos depende de la interacción equilibrada de éstos con su medio ambiente tanto externo como interno. De la misma forma el desarrollo del sistema nervioso, depende de la interacción de éste con factores intrínsecos, regulados por un programa genético y factores extrínsecos ambientales o epigenéticos (Cintra y Díaz-Cintra, 1985). Entre los factores extrínsecos ambientales, la privación nutricional o la nutrición inadecuada perinatal es uno de los factores ambientales más severos que afecta a una gran cantidad de poblaciones en el mundo y cuyas causas son diversas y complejas.

De acuerdo a la definición de la FAO, la desnutrición o subnutrición se produce cuando se ingiere menos energía dietética de la necesaria para tener un cuerpo sano y llevar una vida activa y saludable, así la desnutrición es un término cuantitativo y significa que una persona no come lo suficiente. Malnutrición o mala nutrición es un término cualitativo que significa que la dieta de una persona carece de las cantidades necesarias de elementos esenciales para el crecimiento, tales como proteínas, vitaminas y sales (Organización de las Naciones Unidas, 1985).

En la última encuesta nacional de alimentación y nutrición en el medio rural (ENAL, 1996), llevada a cabo por el Instituto Nacional de la Nutrición "Salvador Zubirán" (INNSZ)

(Avila y col., 1996), se reportó que la distribución porcentual de la prevalencia de la desnutrición por entidad federativa de la población menor de 5 años de acuerdo con el indicador peso para la edad fue del 42.7%. La forma leve de desnutrición afectó el 25.9% de los niños la moderada al 12.7% y la forma severa al 4.2%. De acuerdo a la clasificación de Gómez (revisado en Avila y col., 1996), que toma en cuenta el peso en relación a la edad, la prevalencia de la desnutrición a nivel nacional es del 46.4%; de éste, el 36.1% es de primer grado, el 9.0% es de segundo y el 1.3% corresponde al grado tres. En una comparación con las encuestas anteriores de la serie ENAL, resulta sorprendente la similitud de la prevalencia estimada en las cuatro encuestas. Durante el periodo 1974 a 1996 la prevalencia de desnutrición se ubica en el 50%: la leve alrededor del 30% y la moderada y severa en torno al 20%.

La encuesta urbana de alimentación y nutrición en la zona metropolitana de la ciudad de México (ENURBAL) llevada a cabo por el INNSZ (Avila y col., 1995), se encuestó a 1,093 niños menores de 5 años. El 70% de la población se encontró dentro del rango de normalidad del peso para la talla, 13.6% presentó sobrepeso y únicamente el 16% mostró alguna deficiencia, el 6.1% en grado moderado o severo. La desnutrición moderada y severa fue mayor durante el primer año de vida en los estratos económicos inferiores, de acuerdo a esta encuesta la desnutrición moderada y severa afecta a uno de cada 20 de estos niños. En comparación con la prevalencia de desnutrición observada en el medio rural pobre del país, la desnutrición urbana es relativamente baja, sin embargo, en magnitud representa alrededor de 70 mil niños afectados por la desnutrición, cifra superior a la de los niños desnutridos de cualquier entidad.

El problema de la desnutrición no sólo afecta a los países en desarrollo donde la incidencia es alta, sino también a los países desarrollados como los Estados Unidos donde el 12% de los niños sufren de desnutrición.

Los estudios en seres humanos privados de algunos nutrimentos durante el desarrollo perinatal, muestran numerosas alteraciones en la estructura y función cerebral. Las observaciones se refieren a ciertas deficiencias en la capacidad de los individuos y que estas capacidades no se recuperan aún después de la rehabilitación nutricional postnatal (Cravioto y Arrieta, 1985).

Los estudios en animales de laboratorio han contribuido a la interpretación de diversos trastornos del desarrollo intelectual humano además de tratar de simular las condiciones tan complejas de la desnutrición a la cual está sometida una gran proporción de la población humana por lo que se han desarrollado diversos modelos de privación de alimento que incluyen los periodos críticos de desarrollo cerebral. El uso de modelos experimentales de desnutrición principalmente en roedores, ha permitido la determinación de ciertas alteraciones en el desarrollo cerebral en los mamíferos. En estos estudios es necesario tener en cuenta la secuencia y el momento en que se llevan a cabo las fases de desarrollo cerebral, el cual varía de una especie a otra y más aún, entre las distintas estructuras cerebrales, por lo que el extrapolar los efectos provocados por la desnutrición sobre el SNC, entre distintas especies, será únicamente válido si la comparación se realiza en animales altriciales cuyas etapas del desarrollo sean equivalentes, como es el caso del ser humano y la rata (Cintra y Díaz-Cintra, 1985).

## **MALNUTRICIÓN Y FORMACIÓN HIPOCÁMPICA**

Como se mencionó anteriormente se conoce bien que la desnutrición y malnutrición alteran el desarrollo del sistema nervioso. Estudios llevados a cabo en los últimos años por varios autores, han mostrado que la malnutrición aplicada únicamente en la etapa de gestación (usando el mismo modelo para inducirla empleado en el presente trabajo) provoca cambios conductuales, electrofisiológicos y morfológicos en el SNC.

Se han estudiado las alteraciones conductuales en animales que fueron malnutridos en el periodo prenatal bajo diferentes paradigmas de aprendizaje; en el laberinto de Morris, estas ratas mostraron latencias de escape significativamente mayores que las ratas control cuando se evaluaron a los 17, 18 y 20 días de edad (Tonkiss y col., 1993).

Tonkiss y col., (1991) compararon animales adultos normales con malnutridos prenatalmente en la ejecución de una tarea con estímulos visuales en cuanto a la brillantez, a los patrones de orientación y de forma, y observaron que los animales adultos malnutridos prenatalmente tenían un mayor número de errores y latencias más largas en el caso de la discriminación de patrones de orientación, ya que no pudieron discriminar entre rayas

horizontales de verticales, indicando así que la malnutrición prenatal deteriora el aprendizaje de discriminación visual en estos animales.

En pruebas de aversión condicionada a un sabor, las ratas son expuestas a beber de una solución con un determinado sabor (solución de sacarina) y después se inyectan con cloruro de litio lo cual les induce una sensación temporal de enfermedad. Luego de este tratamiento se les da a escoger entre beber de la solución con sabor o beber agua y las ratas evitan la solución asociada con la enfermedad. Cuando se evaluó bajo este esquema a las ratas control y se compararon con ratas malnutridas prenatalmente, se observó que después de 24 horas de la exposición, no existían diferencias entre ambos grupos, todas las ratas probaron la solución con sabor pero consumieron significativamente más agua. Cuando las ratas fueron evaluadas 72 horas después de la exposición, todas las ratas control mostraron mayor consumo de la solución con sabor. En contraste las ratas malnutridas prenatalmente mostraron menor consumo de esta solución. Este estudio indica que las ratas adultas sometidas a la malnutrición proteínica en el periodo prenatal, parecen estar menos dispuestas o son menos capaces de modificar ciertas respuestas aprendidas, cuando las condiciones de prueba cambian (Tonkiss y col., 1993).

En la prueba de alternancia espacial en un laberinto en T con recompensa alimenticia, se observó que las ratas malnutridas prenatalmente muestran una resistencia mayor a la extinción, además de que cometen más errores que las ratas control (Tonkiss y Galler, 1990).

Se han utilizado también paradigmas operantes como el reforzamiento diferencial de tasas bajas de respuesta (RDB) para evaluar los efectos de la malnutrición prenatal en el comportamiento de animales adultos. Este es un paradigma en el cual la rata debe esperar un intervalo específico entre respuestas para presionar una palanca y en consecuencia adquirir el reforzamiento (comida). En este tipo de pruebas se ha observado que las ratas malnutridas prenatalmente presentan una adquisición más lenta de la tarea (Tonkiss y col., 1991). En resumen, los estudios anteriores revelan que la malnutrición proteínica prenatal en ratas adultas altera la conducta aprendida. Los resultados caen dentro de categorías específicas: diferencias de desempeño en tareas que requieren procesamiento visual y pérdida de la flexibilidad en las estrategias de respuesta cuando cambian las condiciones de



prueba. Además, Almeida y col. (1996) reportaron que la malnutrición prenatal reduce la conducta social e incrementa la conducta no social en ratas jóvenes.

Jordan y col. (1981), reportaron que ratas adultas desnutridas (por restricción del 50% de alimento) desde la última semana de gestación y durante el periodo de lactancia, mostraron deficiencias en la ejecución en el laberinto radial y tuvieron más errores al visitar de manera alternada los brazos del laberinto. En otro estudio, Bush y Leathwood (1975), observaron que las ratas desnutridas prenatalmente (restricción al 50% de alimento) entrenadas en una tarea de evitación (que incluía un tono y una luz que anunciaba el choque eléctrico), lograron un menor número de evasiones exitosas en comparación con los controles.

Diversos experimentos se han llevado a cabo para investigar varios aspectos de la neuroplasticidad en la FH incluyendo la potenciación a largo plazo y el "kindling". Con respecto a las investigaciones de la LTP, se ha mostrado que las ratas adultas malnutridas prenatalmente (anestesiadas) responden a la tetanización de la vía perforante con aumento de la pendiente del potencial postsináptico excitatorio poblacional (PPEP) y de los componentes de la espiga poblacional de la respuesta de campo del GD. El aumento del componente de la espiga poblacional en ratas malnutridas prenatalmente, sin embargo, fue menor que el de los controles para todos los periodos de tiempo post-potenciación investigados (Bronzino y col., 1991b). El aumento del componente PPEP en animales malnutridos prenatalmente fue significativamente menor que el de los animales control, además de que cayó más rápido a niveles basales (Austin y col., 1986). En otros experimentos se analizó la capacidad de desarrollo de las ratas malnutridas prenatalmente para mantener la LTP de la sinapsis entre el patrón perforante y las células granulares del GD. Los resultados indican que las ratas malnutridas prenatalmente muestran retardo en el aumento de las mediciones de la espiga poblacional a los 90 días de edad (Bronzino y col., 1991a) y reducción a los 30 días de edad (Morgane y col., 1992). En conjunto estos reportes indican que la malnutrición prenatal altera la capacidad para establecer y mantener la LTP en animales anestesiados. En un estudio reciente Bronzino y col. (1996) documentaron que la malnutrición prenatal daña la capacidad para establecer y mantener la LTP en animales adultos con libertad de movimiento. Los estudios para evaluar la respuesta neuroplástica y

la función del circuito hipocámpico utilizando el "kindling", mostraron que las ratas malnutridas prenatalmente requieren estímulos de menor intensidad para evocar la actividad postdescarga en el GD, además de requerir más de dos veces el número de estimulaciones para alcanzar las convulsiones motoras generalizadas indicativas del estado de kindling (Bronzino y col., 1990).

Con respecto a la relación entre el estado conductual (p. e. vigilancia) y la frecuencia de las ondas theta, se ha reportado que las ratas adultas controles exhiben un cambio en el pico de la frecuencia theta entre la actividad de vigilia, con movimientos voluntarios y el sueño de movimientos oculares rápidos (MOR). En contraste, las ratas del grupo malnutrido prenatalmente no mostraron el cambio en el pico de esta frecuencia (Morgane y col., 1990). Estos resultados sugieren que la malnutrición prenatal, altera la capacidad de los animales para modificar la frecuencia del ritmo theta hipocámpico para generar los requerimientos de vigilancia particular o estados de atención.

En los últimos años se han llevado a cabo diversos estudios morfológicos en cada uno de los tres tipos neuronales que integran el circuito trisináptico de la FH bajo condiciones de malnutrición prenatal con una dieta con 6% de proteína. Así, Díaz-Cintra y col. (1991) al realizar un estudio sobre el primer relevo neuronal, las células granulares del GD, reportan reducción del tamaño del soma, del número de espinas y la complejidad del árbol dendrítico en animales de 15, 30, 90 y 220 días de edad. Estos efectos son parecidos a los reportados por Cintra y col. (1990) al aplicar una dieta al 8% de caseína de manera crónica. Los axones de las células granulares también se han evaluado en ratas malnutridas prenatalmente. El área de distribución de este plexo axonal en diferentes niveles a lo largo de la FH, se encuentra reducido en animales de 15, 90 y 220 días de edad, siendo más evidente en la última edad (Granados y col., 1995).

Los reportes de los estudios sobre el segundo relevo neuronal, las células piramidales del CA3 indican que el tamaño del soma neuronal se reduce sobre todo en animales de 220 días de edad. La complejidad del árbol dendrítico apical se incrementó en regiones mediales en animales malnutridos prenatalmente de 220 días de edad, en tanto que la complejidad de las dendritas basales se redujo en animales experimentales de 15, 30 y 220 días de edad. También se redujo la densidad de espinas en las cuatro edades analizadas (García-Ruiz y

col., 1993). En ratas de 220 días bajo malnutrición hipoproteínica crónica, se observó reducción del soma y de la complejidad de árbol dendrítico apical en animales de 220 días. La densidad de espinas fue menor en animales de 30, 90 y 220 días de edad (Díaz-Cintra y col., 1994).

En cuanto al tercer relevo neuronal, las células piramidales del CA1, Cintra y col. (1997) reportaron que la malnutrición proteínica prenatal produce reducción del tamaño del soma neuronal en animales experimentales de 220 días de edad, incremento en la densidad de espinas en el *stratum radiatum* en animales de 30 días con restricción de proteínas, seguido de reducción en animales de 90 y 220 días de edad, en el *stratum moleculare* se observó reducción de la densidad de espinas en animales malnutridos de 15, 30 y 220 días de edad. La longitud de la dendrita apical y el grosor del *stratum radiatum-moleculare* fue menor en ratas malnutridas de 30 y 220 postparto.

Se han documentado también alteraciones morfológicas y del número de las sinapsis FM-CA3. Así Andrade y col. (1995b), han mostrado reducción del número de este tipo de sinapsis en animales malnutridos crónicamente con una dieta al 8% de caseína iniciada a los dos meses de edad postnatal, y, que animales rehabilitados nutricionalmente recuperan el número de sinapsis FM-CA3.

En conjunto estos resultados neuroanatómicos sugieren una disminución de las conexiones sinápticas, indicando que la accesibilidad de la información pudiera estar limitada, y que el procesamiento de tal información dentro del hipocampo puede estar alterada como un resultado de la malnutrición proteínica prenatal. El hecho de que las ratas malnutridas no cambien la frecuencia theta entre los dos estados de vigilancia de vigilia activa y sueño MOR, conlleva a la noción de que la malnutrición hipoproteínica prenatal altera irreversiblemente la actividad del circuito neuronal, de tal modo que el animal no puede recibir o procesar apropiadamente la información que llega a la FH desde las estructuras corticales sensoriales polimodales. Así, la cantidad de información medio ambiental disponible a la rata malnutrida puede estar reducida de manera significativa.

## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Los mecanismos morfológicos sinápticos que subyacen a los fenómenos cognoscitivos como el aprendizaje y la memoria, neuroplásticos como la potenciación a largo plazo y electrofisiológicos como el ritmo theta son aún desconocidos. Sin embargo, se ha propuesto que algunos de estos procesos se deben en parte a modificaciones de la estructura y número de las conexiones sinápticas.

La malnutrición hipoproteínica prenatal es un modelo experimental que permite estudiar estos fenómenos ya que se ha documentado que produce alteraciones en la capacidad conductual, cognoscitiva, electrofisiológica y plástica de la FH. Aún hoy en día no existen trabajos en ratas malnutridas prenatalmente donde se analicen los cambios en la estructura y en el número de sinapsis de la FH. Las sinapsis FM-CA3 son el principal filtro de la información que pasa a través de la FH y son el principal modulador de la excitabilidad de las neuronas piramidales del CA3. Esto nos lleva a plantear que la alteración en su número, podrían explicar, al menos en parte, las alteraciones documentadas en ratas adultas malnutridas prenatalmente.

Para poder saber ésto, en el presente trabajo se evaluó si la malnutrición hipoproteínica prenatal conlleva alteraciones en el número de las sinapsis asimétricas FM-CA3.

Por lo que las preguntas que surgen son:

- 1) ¿Se altera el volumen total del sistema de FM, así como el volumen de su haz suprapiramidal?
- 2) ¿Se altera la densidad numérica por unidad de volumen y total entre las fibras musgosas y las espinas dendríticas de las neuronas piramidales del CA3 localizadas en el *stratum lucidum* de este campo? (segunda sinapsis del tricircuito hipocámpico).

## **HIPÓTESIS**

La malnutrición prenatal disminuye el área ocupada por las fibra musgosas y el número de ramas y espinas dendríticas de las neuronas piramidales del CA3, (además de producir alteraciones conductuales y fisiológicas en la rata adulta), por lo que es de esperarse que la estimación del número de sinapsis asimétricas FM-CA3 será menor en los animales malnutridos prenatalmente.

## OBJETIVO GENERAL

Determinar si la malnutrición hipoproteínica prenatal conduce a cambios que deterioran el establecimiento de las conexiones sinápticas del segundo relevo de comunicación del circuito interno de la FH. Asimismo, si los cambios anatómicos provocados por la malnutrición prenatal sobre la FH permanecen a largo plazo, tanto a nivel histológico como ultraestructural.

## OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Mediante el uso de técnicas de microscopía de luz y electrónica de transmisión, con un análisis estereológico, tanto en animales normales como en malnutridos prenatalmente de 220 días de edad:

- A) Estimar el volumen total del sistema de fibras musgosas y de su haz suprapiramidal.
- B) Estimar la densidad numérica por unidad de volumen de las sinapsis asimétricas FM-CA3.
- C) Estimar el número total de las sinapsis asimétricas FM-CA3 en el *stratum lucidum*.
- D) Establecer las diferencias entre los animales control y malnutridos prenatalmente en los parámetros anteriores.

## OBJETIVO GENERAL

Determinar si la malnutrición hipoproteínica prenatal conduce a cambios que deterioran el establecimiento de las conexiones sinápticas del segundo relevo de comunicación del circuito interno de la FH. Asimismo, si los cambios anatómicos provocados por la malnutrición prenatal sobre la FH permanecen a largo plazo, tanto a nivel histológico como ultraestructural.

## OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Mediante el uso de técnicas de microscopía de luz y electrónica de transmisión, con un análisis estereológico, tanto en animales normales como en malnutridos prenatalmente de 220 días de edad:

- A) Estimar el volumen total del sistema de fibras musgosas y de su haz suprapiramidal.
- B) Estimar la densidad numérica por unidad de volumen de las sinapsis asimétricas FM-CA3.
- C) Estimar el número total de las sinapsis asimétricas FM-CA3 en el *stratum lucidum*.
- D) Establecer las diferencias entre los animales control y malnutridos prenatalmente en los parámetros anteriores.

## JUSTIFICACIÓN

De los estudios diseñados para analizar los efectos de la malnutrición sobre la morfología cerebral, sólo unos cuantos se han enfocado al análisis de los efectos sobre la estructura y número de contactos sinápticos en la FH. Aunque existe información sobre los efectos de la malnutrición en el hipocampo, es importante llevar a cabo estudios más detallados de tipo ultraestructural con el fin de conocer los cambios que existen a nivel de las conexiones sinápticas al aplicar una dieta hipoproteínica con 6% de caseína, lo que aunado a los hallazgos conductuales y electrofisiológicos previos, servirá para entender mejor la función de esta región del cerebro. Estos estudios, sumados a los datos morfológicos reportados previamente, podrían explicar, al menos en parte, las alteraciones en la potenciación a largo plazo (Bronzino y col., 1991a,b; Morgane y col., 1992, 1993), o bien en aspectos conductuales (Tonkiss y Galler, 1990; Tonkiss y col., 1990, 1991, 1993; Morgane y col., 1993; Almeida y col., 1996) observados en animales malnutridos prenatalmente con una dieta conteniendo 6% de proteína.

Se seleccionó el relevo sináptico FM-CA3 debido a que éste es el principal relevo que permite la modulación sensorial en el circuito trisináptico hipocámpico, además de que tiene capacidades plásticas notables bajo diferentes condiciones experimentales.

Además estudios previos han revelado que las sinapsis FM-CA3 pueden reorganizarse bajo un paradigma de malnutrición postnatal con una dieta al 8% de caseína, seguido de rehabilitación también postnatal (Andrade y col., 1995b), por lo que es importante conocer si en animales malnutridos prenatalmente con una dieta al 6% de caseína las sinapsis asimétricas FM-CA3, desarrollan también capacidades de reorganización o sí, por el contrario, se dañan por este paradigma de malnutrición, lo cual daría evidencia en el sentido de que la malnutrición prenatal es un factor desorganizador durante el desarrollo de la FH, que persiste hasta la edad adulta.

Por otro lado los hallazgos podrían ayudar a entender los eventos sinápticos de la formación hipocámpica que subyacen a las alteraciones conductuales, cognoscitivas y neuroplásticas que se relacionan con esta estructura y que han sido documentados en animales adultos malnutridos prenatalmente.



## **MATERIAL Y MÉTODOS**

### **ANIMALES**

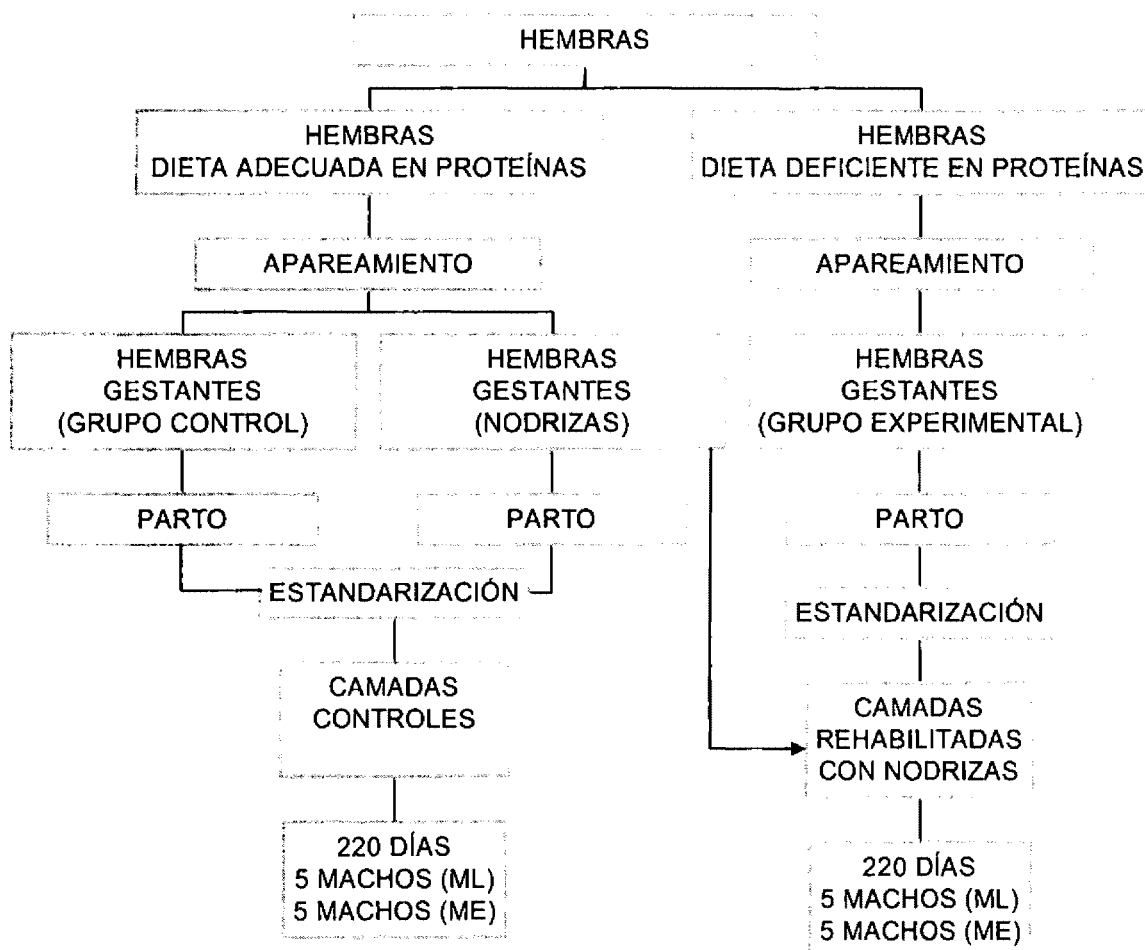
Se emplearon ratas hembras y machos de la cepa Sprague-Dawley para efectuar las cruces. Las hembras tuvieron un peso de 250 a 300 gramos (90-120 días de edad) y fueron mantenidas bajo condiciones idénticas de luz oscuridad (12:12 hrs.), temperatura (22-24° C), humedad relativa (40-50%) y libre acceso a las respectivas dietas y al agua.

### **TRATAMIENTO NUTRICIONAL**

Diez hembras se alimentaron con una dieta deficiente en proteínas que contenía únicamente el 6% de este nutrimento (madres malnutridas) y veinte hembras con una dieta adecuada en proteínas, con 23.4% de este componente nutricional (madres controles y nodrizas, diez en cada grupo), durante cinco semanas antes de apareamiento. Los machos que se usaron para las cruces también se alimentaron con estas dietas durante una semana antes del apareamiento. Los componentes nutricionales de cada una de las dietas se especifican en la tabla I (Tonkiss y col., 1993).

### **REPRODUCCIÓN Y FORMACIÓN DE LOS GRUPOS DE ESTUDIO**

Después de este periodo, se cruzaron 3 hembras con 1 macho. Los animales se colocaron en una caja de policarbonato transparente (50.8 x 40.63 x 20.32 cm) y el macho se alimentó durante este periodo con la misma dieta de las hembras correspondientes. El día del nacimiento de las camadas se tomó como el día 0 de edad. Al día siguiente del parto, las crías de las diferentes camadas nacidas el mismo día y alimentadas con la misma dieta nutricional se separaron por sexo, se mezclaron entre sí y se asignaron al azar a las diferentes camadas que se formaron, de preferencia con 4 machos y 4 hembras. Las crías descendientes de madres malnutridas se asignaron a madres nodrizas, alimentadas con la dieta control durante la gestación, estableciendo de esta manera la rehabilitación nutricional postnatal al momento del nacimiento (grupo experimental), (Figura 7). Las camadas provenientes de madres alimentadas con una dieta adecuada en proteínas formaron el grupo control (Figura 7). Finalmente se formaron 5 camadas control y 5 malnutridas



**Figura 7.** Modelo de malnutrición hipoproteínica prenatal en la rata. ML, estudio de microscopía de luz; ME, estudio de microscopía electrónica.

prenatalmente. El resto de los animales: las madres malnutridas y las camadas controles restantes no se emplearon en este estudio.

Durante la lactancia las madres de todas las camadas se alimentaron con una dieta con 23.4% de proteínas. A los 21 días de edad, se procedió al destete y se colocaron 5 animales en una caja de policarbonato transparente (49.53 x 26.67 x 20.32 cm), los cuales se separaron por sexos y por condición nutricional y se les continuó alimentando con una dieta al 23.4% hasta el momento del sacrificio. Cumplida la edad requerida (220 días de edad postnatal), se seleccionó al azar un animal macho de cada camada para formar cada uno de los siguientes cuatro grupos con cinco animales en cada uno:

- 1) Grupo control para estudios histoquímicos (obtención del volumen).
- 2) Grupo control para estudios de microscopía electrónica (obtención de la densidad sináptica).
- 3) Grupo malnutrido prenatalmente para estudios histoquímicos (obtención del volumen).
- 4) Grupo malnutrido prenatalmente para estudios de microscopía electrónica (obtención de la densidad sináptica).

La estimación del número total de sinapsis ( $N$  (sin)) en una región o subregión dada del SNC, se llevó a cabo en dos pasos. El primero implicó obtener el volumen total o de referencia de la estructura en la cual se encuentran las sinapsis asimétricas FM-CA3, en este caso el volumen del *stratum lucidum* o haz suprapiramidal del sistema de fibras musgosas. Esta evaluación se llevó a cabo en material histológico procesado con la técnica de Timm.

El segundo paso consistió en obtener la densidad numérica de la sinapsis FM-CA3 por unidad de volumen. Esta cuantificación se llevó a cabo observando bajo microscopía electrónica el material procesado con la técnica de rutina con postfijación usando tetraóxido de osmio.

Finalmente, la estimación del número total de sinapsis FM-CA3 se obtuvo como el producto del volumen del haz suprapiramidal y la densidad de sinapsis FM-CA3 por unidad de volumen.

**TABLA I**  
Composición nutricia de las dietas

**DIETA DEFICIENTE EN PROTEÍNAS**

<b>COMPONENTES</b>	<b>g/k</b>
Proteína (6% caseína)	60.00
L-Metionina	3.70
Sucrosa	511.74
Fécula de maíz	153.52
Aceite de maíz	151.80
Celulosa (fibra)	67.16
Sales minerales	35.00
Fosfato de calcio dibásico	6.02
Carbonato de calcio	0.73
Mezcla de vitaminas	10.00
Color	0.33
Kcal/g	4.30

Teklad diet 170915, Teklad, Madison, WI.

**DIETA ADECUADA EN PROTEÍNAS**

<b>COMPONENTES</b>	<b>%</b>
Proteína	no menos de 23.4
Grasa cruda	no menos de 4.5
Fibra (cruda)	no más de 6.0
Cenizas	no más de 8.0
Minerales adicionados	no más de 2.5
Energía neta, kcal/g	4.0
Energía metabolizable, kcal/g	3.04

Lab Rodent Diet 5001, PMI Feeds, Inc.

## **ESTUDIO HISTOLOGICO**

### **Perfusión**

Los animales se anestesiaron con pentobarbital sódico (Lab. Sedalphorte S. A. de C. V.). La perfusión se llevó a cabo por vía intracardiaca iniciándose con una solución de sulfuro de sodio (Lab. Fisher Scientific Company) (5.85 g) y fosfato de sodio monobásico (Lab. Merck Farma y Química, S. A.) (5.95) en agua destilada (500 ml) hasta que la base de la dentina (en los dientes incisivos de la rata) se observó obscura, la perfusión se continuó con el fijador "Karnovsky" (1.0% de paraformaldehído (Lab. Electron Microscopy Sciences) y 1.25% de glutaraldehído (Lab. Sigma Chemical Company, S. A. de C. V.) en buffer de fosfatos 0.1M, pH 7.4) de acuerdo a West y col., (1981) y West y Dewey (1984). Después de la perfusión se extrajeron los encéfalos, se pesaron y transfirieron a una solución crioprotectora en frascos con el fijador de Karnovsky y sacarosa (Lab. Merck Farma y Química, S. A.) al 30%, se mantuvieron en esta solución durante 72 horas o hasta que el tejido se sumergiera al fondo del frasco.

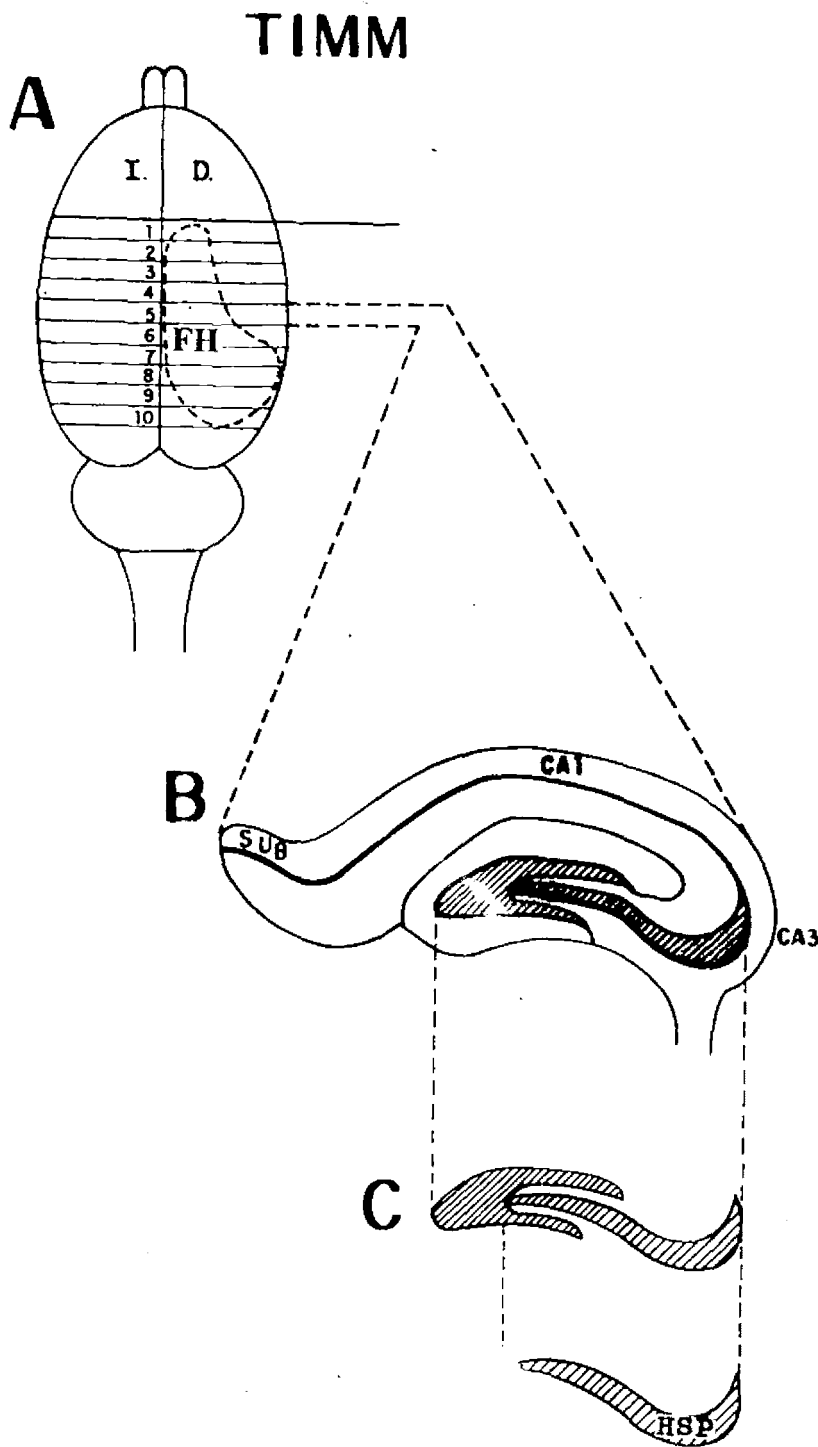
### **Tinción**

Posteriormente, se procedió a cortar por congelación los bloques de tejido que contenían la FH. Los cortes de 40 micras obtenidos en un plano coronal, se montaron en portaobjetos tratados con gelatina (Lab. Merck Farma y Química, S. A.) y sulfato de cromo y potasio (Lab. Fisher Scientific Company) siguiendo una estricta seriación. Estas secciones se procesaron de acuerdo a una modificación de la técnica de Timm (West y col., 1981; West y Hodges-Savola, 1983) la cual contiene goma arábica (Reasol, Depósitos Unidos, S. A. de C. V.), buffer de citratos, hidroquinona (Lab. Sigma Chemical Company, S. A. de C. V.) y nitrato de plata (Lab. Merck Farma y Química, S. A.). Esta técnica histoquímica evidencia principalmente el sistema de fibras musgosas además de la laminación de la FH.

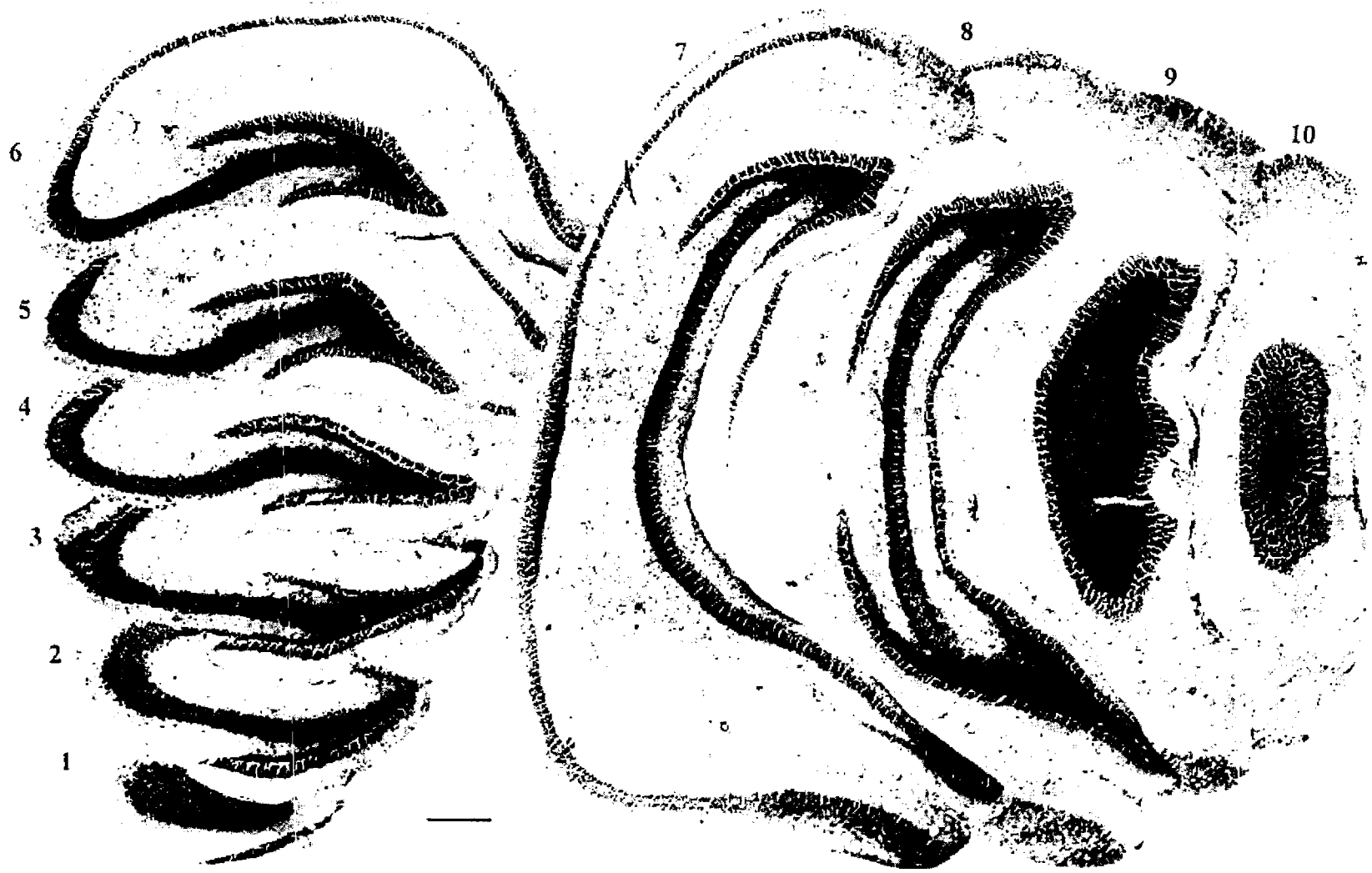
### **Análisis estereológico**

#### **Muestreo**

Las estimaciones volumétricas se realizaron en el hipocampo derecho. El volumen total del sistema de FM y de su haz suprapiramidal, se estimó a partir de 10-11 secciones de la FH entera (Figuras 8 y 9) que se seleccionaron por un procedimiento de muestreo sistemático (Gundersen y Jensen, 1987). La posición del primer corte fue escogida al azar



**Figura 8.** Diseño experimental seguido para la estimación del volumen total del sistema de fibras musgosas y de su haz suprapiramidal a nivel de microscopía de luz. En A, una vista dorsal del encéfalo de la rata, donde se muestra la posición de los diez niveles coronales seleccionados sistemáticamente a lo largo de la formación hipocámpica. En B, una proyección de un corte coronal medial de la formación hipocámpica derecha. En C, la proyección del área total y del haz suprapiramidal (HSP) del sistema de fibras musgosas que fue analizada con un sistema de análisis de imágenes (BIOCOM). I, izquierdo; D, derecho; SUB, subiculum; CA1 y CA3, *Cornnu de Ammon* 1 y 3 respectivamente.



**Figura 9.** Fotomontaje de los diez cortes coronales seleccionados sistemáticamente a lo largo de la formación hipocámpica de una rata control de 220 días de edad, usados para la estimación del volumen total y del haz suprapiramidal del sistema de fibras musgosas (2.5x). Los cortes se tiñeron con la técnica de Timm y se contrastaron con la técnica de violeta de cresilo. La barra de calibración equivale a 400  $\mu$ m.

dentro de los primeros 15 cortes (600 micras), después cada decimoquinto corte (cada 600 micras) del grupo de cortes montados seriadamente fueron marcados sobre la laminilla hasta abarcar toda la FH. En la mayoría de los casos fueron 10 cortes analizados a lo largo de la FH, sólo en dos casos se analizaron 11 cortes, esto fue debido a que la longitud del sistema de fibras musgosas es variable.

### **Estimación del volumen total del sistema de fibras musgosas y de su haz suprapiramidal**

El área total sistema de fibras musgosas de su haz suprapiramidal (Figura 10) se obtuvo en cada corte con la ayuda de un sistema de análisis de imágenes digitalizadas (Histo 2000 de BIOCROM). Se usó un objetivo 4x y las imágenes que se observaban en el microscopio óptico se digitalizaron con este sistema de tal manera que se pudieran manejar en la pantalla de un monitor de computadora. En cada corte digitalizado y con la ayuda del cursor, los límites del área del total y del haz suprapiramidal del sistema de fibras musgosas de la FH derecha fueron definidos de acuerdo a Gaarksjaer (1978) y Amaral y Dent (1981) (Figura 10). El área de cada región se obtuvo automáticamente en  $\mu\text{m}^2$ . El volumen del haz suprapiramidal ampliamente corresponde al *stratum lucidum* (Amaral y Dent 1981). El volumen de cada región fue calculado de acuerdo al principio de Cavalieri (Michel y Cruz-Orive, 1988), se tomó en cuenta el área de cada corte así como el grosor de ellos de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$V = T \cdot (A_1 + A_2 + \dots + A_n)$$

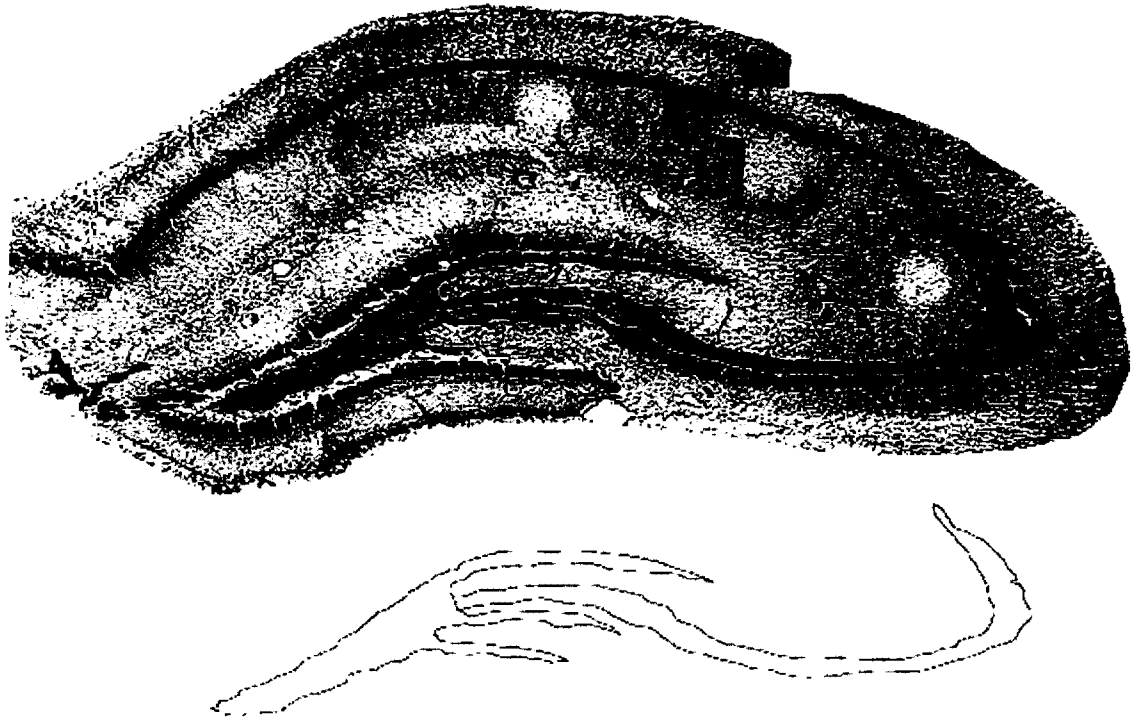
donde V = volumen, T = grosor de los cortes, A = área de cada corte, n = número ilimitado de cortes.

## **ESTUDIO ULTRAESTRUCTURAL**

### **Perfusión y obtención de las zonas de análisis**

Los animales se anestesiaron con pentobarbital sódico diluido en agua destilada (1:10) y se perfundieron por vía intracardiaca, introduciendo primeramente solución salina normal seguida de una solución de Karnovsky que contenía paraformaldehído al 4% y glutaraldehído al 1.25% (Lab. Sigma Chemical Company, S. A. de C. V.) en buffer de cacodilatos (Lab. Electron Microscopy Sciences) 0.15 M, pH 7.3. Se extrajeron los





**Figura 10.** Se ilustra una imagen digitalizada de la FH en donde se observan los bordes de las regiones analizadas de acuerdo a Amaral y Dent (1981) y abajo una proyección de éstas. La barra de calibración equivale a 720  $\mu\text{m}$ .

encéfalos, se pesaron y se mantuvieron en la solución fijadora durante 24 horas. Posteriormente, se lavaron con buffer de cacodilatos y se mantuvieron a temperatura baja. Más tarde se obtuvo un bloque del encéfalo que contenía la FH.

### **Muestreo**

De cada bloque de tejido conteniendo la FH se obtuvieron rebanadas seriadas de 300 micras en el vibratomo, con el fin de escoger al azar tres niveles a lo largo de la FH derecha seleccionadas por un procedimiento de muestreo sistemático (Gundersen y Jensen, 1987). En este caso, dado que en promedio se obtuvieron de 20 a 21 rebanadas coronales que contenían la FH, el primer nivel se seleccionó al azar entre las primeras 7 rebanadas, después cada séptima rebanada de la serie de rebanadas seriadas también fueron seleccionadas. Finalmente, se obtuvo una rebanada anterior, medial y posterior a lo largo de la FH. De cada uno de ellos se obtuvo la región CA3 para procesarse con la técnica de rutina de microscopía electrónica (Figura 11).

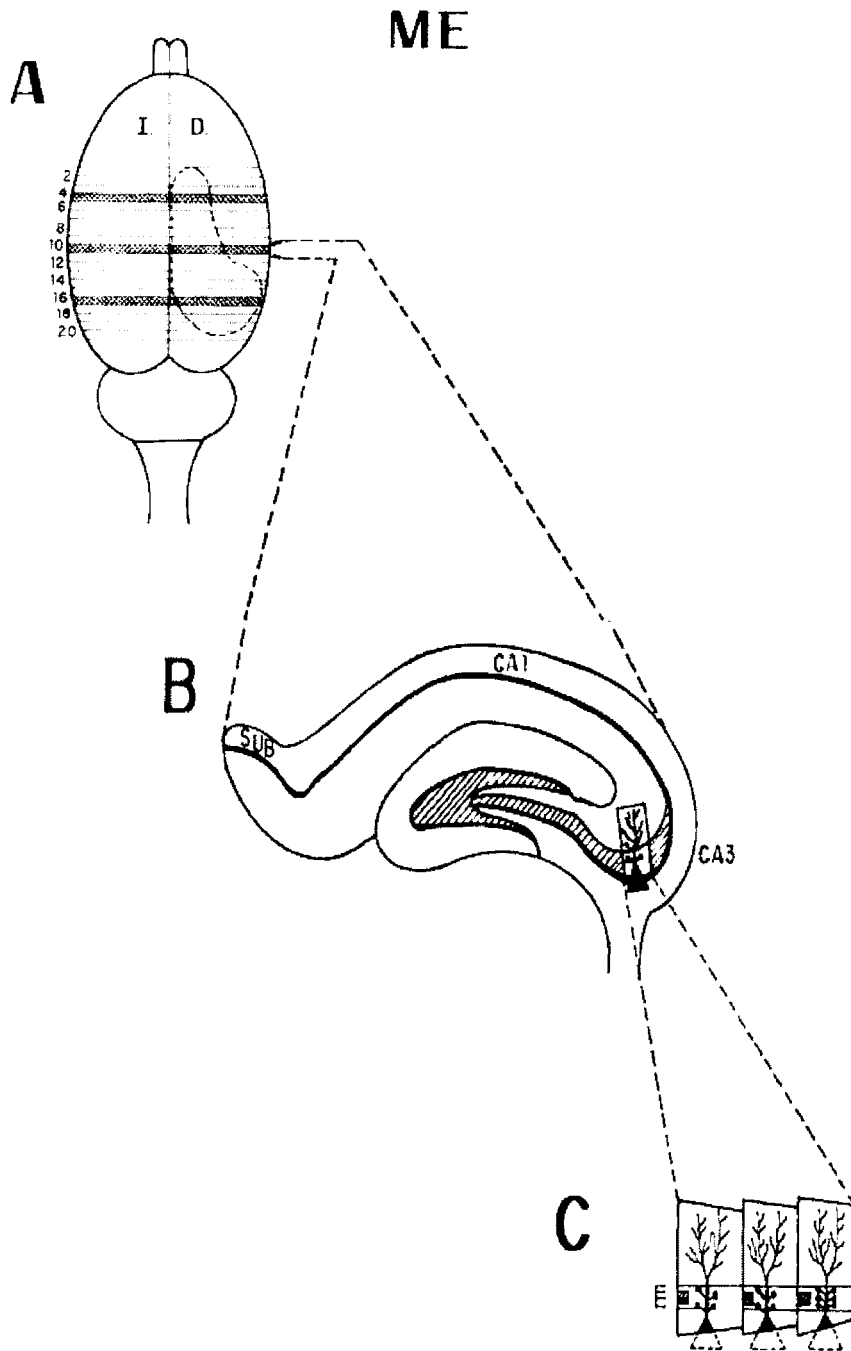
### **Técnica de postfijación con tetraóxido de osmio**

Los tejidos seleccionados para ser procesados con la técnica de postfijación con tetraóxido de osmio, se lavaron primeramente en buffer de cacodilatos, a continuación se postfijaron en una solución 1:1 de tetraóxido de osmio (Lab. Merck Farma y Química, S. A.) (al 2% inicial) y buffer de cacodilatos durante una hora y media, posteriormente se lavaron con buffer de cacodilatos y se deshidrataron en alcohol etílico (Lab. Merck Farma y Química, S. A.) en concentraciones graduales (50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% y 100%). Después se pasaron a óxido de propileno (Lab. Merck Farma y Química, S. A.) y se infiltraron en una mezcla 1:1 de resina epóxica-óxido de propileno durante 24 horas. Al día siguiente se infiltraron en resina pura (epon) (Lab. Electron Microscopy Sciences) y por último se incluyeron en plano en epon. Los bloques se etiquetaron y polimerizaron durante 24 horas a 60° C.

### **Análisis estereológico**

#### **Muestreo**

De cada bloque, se obtuvieron cortes semifinos (1 µm) en un ultramicrotomo (Ultracut E, Reichert-Jung), los cuales se tiñeron con azul de toluidina para su posterior observación al microscopio de luz, con la finalidad de escoger el campo de interés y lograr

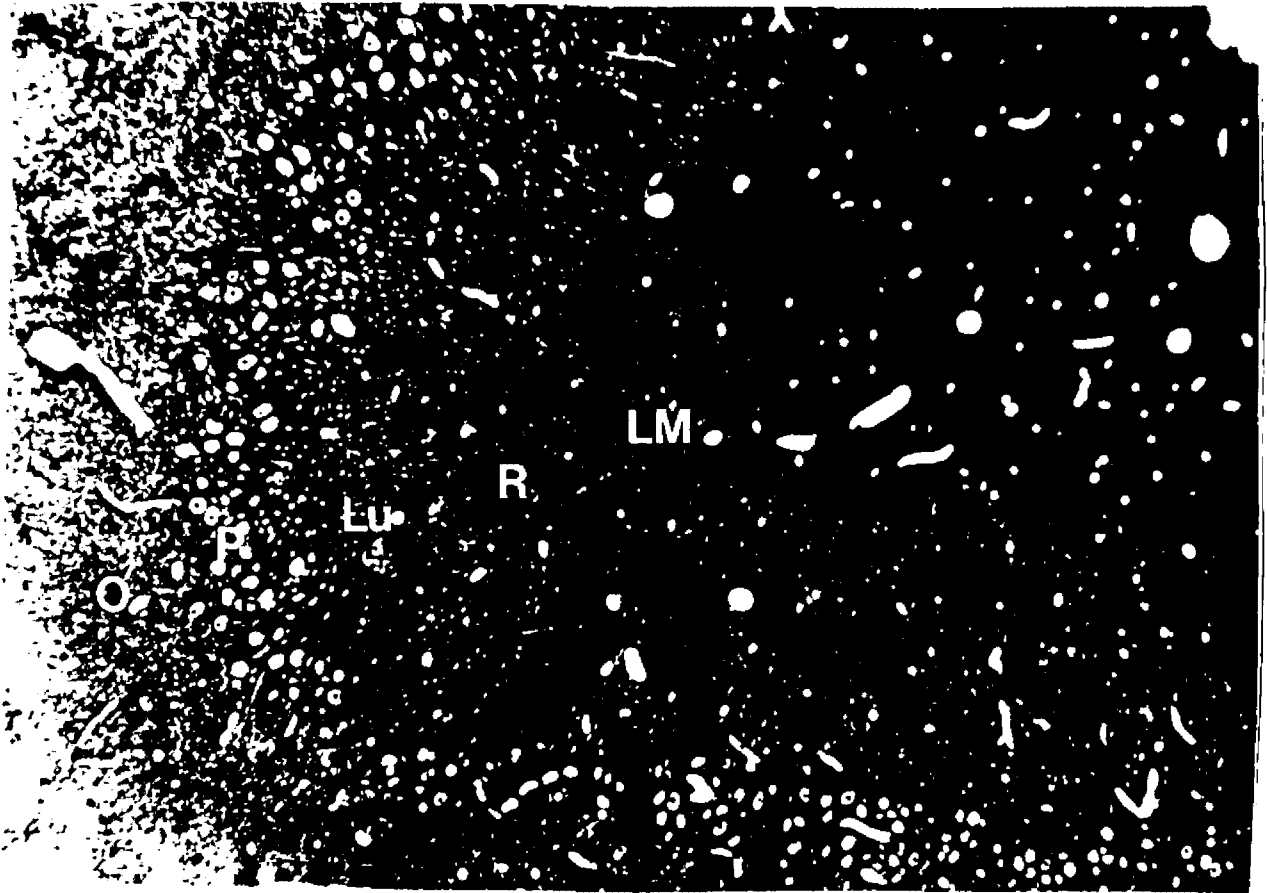


**Figura 11.** Método seguido para la estimación de la densidad de las sinapsis asimétricas FM-CA3, a nivel de microscopía electrónica (ME). A, vista dorsal del encéfalo de la rata, se indica la posición de los tres niveles coronales seleccionados sistemáticamente a lo largo de la FH derecha. B, proyección de un corte coronal medial mostrando la cara superficial de una pirámide de la cual se obtuvieron cortes ultrafinos. C, serie consecutiva de cortes ultrafinos indicando las zonas (sombreadas) en las que se tomaron las micrografías electrónicas para estimar la densidad de sinapsis por unidad de volumen con el método del disector físico.

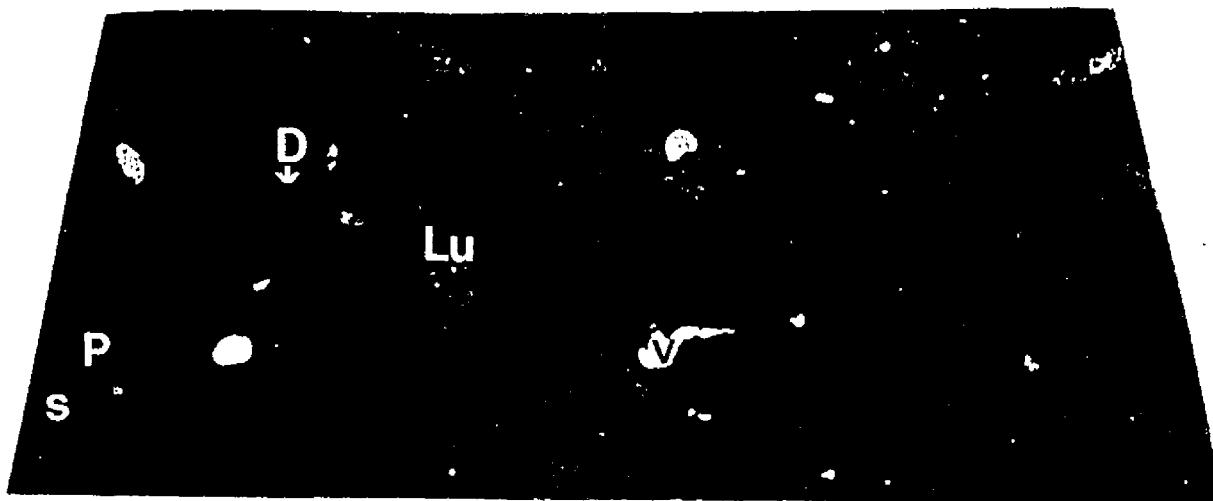
una superficie completa que contuviera el tejido (cara de la pirámide) (Figura 12). Se hicieron dibujos con la ayuda de la cámara lúcida de estos cortes y después de delimitar la zona de interés, se retallaron las pirámides para obtener cortes ultrafinos (Figura 13). Se trató de obtener solamente el área que ocupaba el *stratum lucidum* y se dejaron algunas células piramidales superficiales del *stratum pyramidale* en el lado derecho de la pirámide (Figura 13) con el fin de tener un punto de referencia al momento de observar los cortes en el microscopio electrónico de transmisión (Zeiss, M9) operado a 60 kV. Se obtuvieron de 11 a 12 cortes seriados ultrafinos de 86 nanómetros en promedio (color de interferencia plateado) con una navaja de diamante, los cuáles se colocaron en rejillas de cobre de 1 sólo orificio o anillo de Sjöstrand cubiertas con membranas de formvar (Electron Microscopy). Después se llevó a cabo una doble contrastación del tejido con acetato de uranilo (Ted Pella) y citrato de plomo (Ted Pella) para su análisis posterior bajo el microscopio electrónico de transmisión. Se obtuvieron micrografías electrónicas a 6300x de la misma zona en cada uno de los cortes seriados. Las secciones fueron alineadas al colocar marcas prominentes como vasos sanguíneos, astrocitos, fibras mielinizadas cortadas transversalmente, etc. en la misma posición en la pantalla del microscopio electrónico en cada corte. Los rollos que contenían las micrografías se revelaron y después se imprimieron. Se les asignó una clave para que el observador no conociera la condición nutricional de la muestra al momento de llevar a cabo la cuantificación del número de sinapsis.

### **Estimación de la densidad numérica de las sinapsis asimétricas FM-CA3 por unidad de volumen**

El número de sinapsis asimétricas (entre fibras musgosas y exrecencias torneadas de las células piramidales del CA3) por unidad de volumen del *stratum lucidum* (densidad numérica,  $N_v$ ) fue estimado al aplicar el método del disector físico (Sterio, 1984; Gundersen, 1986, Andrade y col., 1995b, Geinisman y col., 1996). De cada grupo de micrografías se formaron 10 disectores. Cada disector consistió de dos micrografías electrónicas de cortes ultrafinos adyacentes, una sección de referencia y una sección de análisis, ésta última después se usó como la sección de referencia en el análisis del siguiente par de micrografías electrónicas y así sucesivamente (Figura 14). De esta manera, se



**Figura 12.** Fotomicrografía de un corte semifino del campo CA3 de la formación hipocámpica. *Strata: oriens (O), pyramidale (P), lucidum (lu), radiatum (R) y lacunosum-moleculare (LM).* (3.6x).



**Figura 13.** Fotomicrografía de un corte semifino teñido con azul de toluidina que indica la superficie de una pirámide retallada para obtener los cortes ultrafinos seriados del *stratum lucidum* (lu). Note que en la parte lateral de la pirámide se dejaron algunas células piramidales superficiales del estrato piramidal (P) con el fin de tener un punto de referencia al momento de observar los cortes en el microscopio electrónico. S, somá neuronal; D, dendrita, V, vasos sanguíneos (40x).

analizaron 10 disectores por bloque, obteniendo un total de 30 disectores por animal. Para cuantificar los contactos asimétricos entre las terminales de las fibras musgosas y las excrecencias dendríticas de las células piramidales del CA3, se superpuso al azar un acetato con un marco de conteo de área conocida (10 micras cuadradas) sobre las micrografías electrónicas que formaban cada disector (Figura 11) y se usaron las densidades posinápticas como unidades de conteo. Las sinapsis eran identificadas en la sección de referencia por la presencia de densidades sinápticas en un elemento postsináptico y cuando al menos cinco vesículas sinápticas aparecían cerca de la membrana de la terminal axónica presináptica (Hoff 1986; Cadete-Leite y col., 1989). Las sinapsis se marcaron con un plumón indeleble en la sección de referencia, si las densidades postsinápticas se encontraban dentro del marco de conteo y no interceptaban los bordes de éste (Figura 14). Cuando dos o más densidades postsinápticas eran visibles en el mismo complejo de espinas, éstas se consideraron como una simple unión sináptica (sinapsis perforadas) a menos que pertenecieran a diferentes perfiles de fibras musgosas. Finalmente, solo aquellas sinapsis que tuvieron sus densidades postsinápticas en la sección de referencia, pero no en la sección de conteo fueron contadas en cada disector.

Para obtener la densidad numérica por unidad de volumen es necesario obtener el volumen del disector  $v(\text{dis})$  con la fórmula:

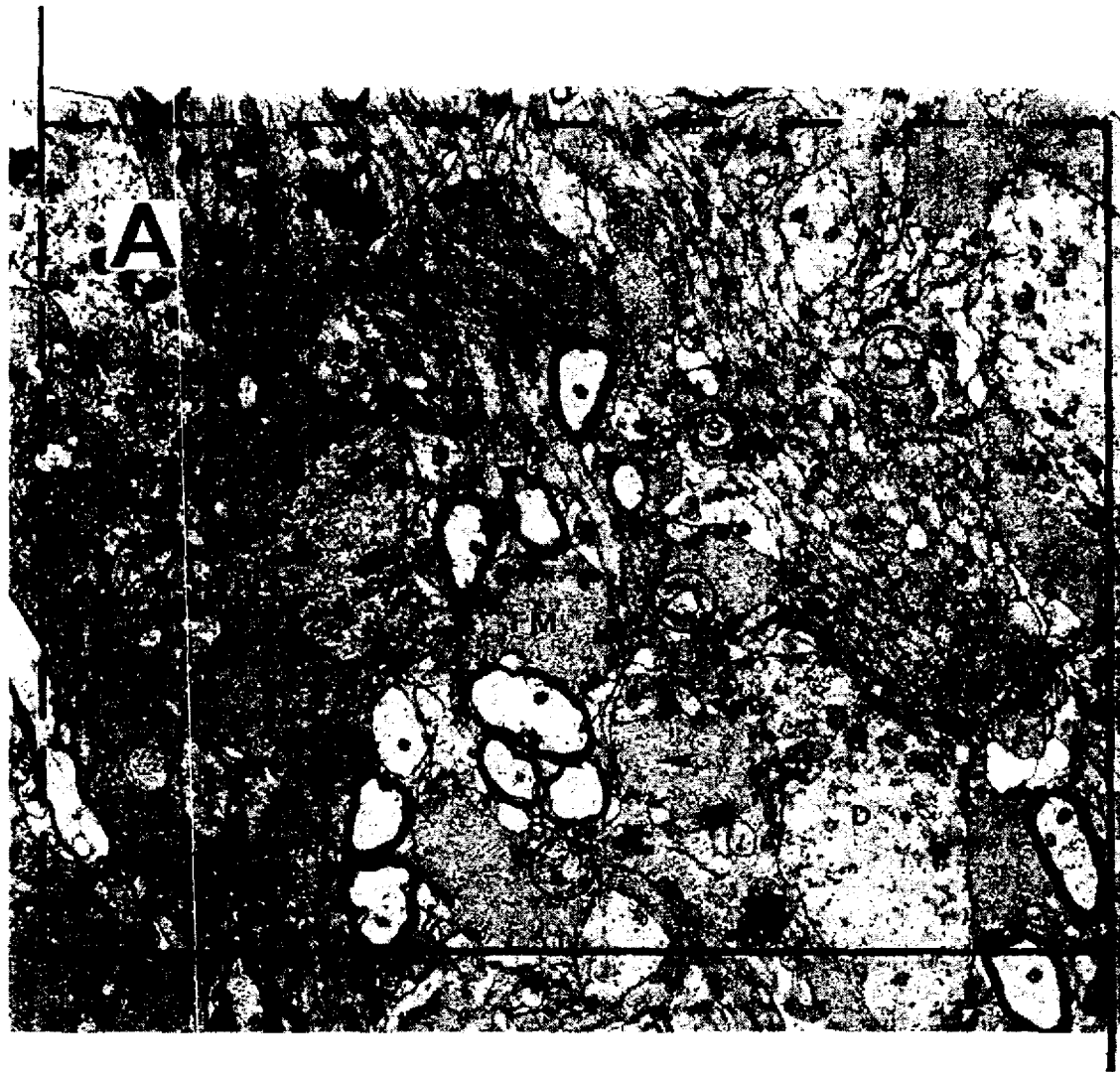
$$v(\text{dis}) = a(\text{fr}) \cdot h(\text{dis})$$

Donde  $a(\text{fr})$  es el área del marco de conteo, y  $h(\text{dis})$  es el grosor de los cortes ultrafinos. El grosor de los cortes se obtuvo con el método de Small (Elias y col., 1983). El promedio del grosor de los cortes ultrafinos de los dos grupos de estudio fue de 86 nm. El área del marco de conteo fue de  $115.2 \mu\text{m}^2$  (Figura 11), por lo que el promedio del volumen de los disectores fue de  $9.907 \mu\text{m}^3 \sim 10 \mu\text{m}^3$ .

Finalmente la densidad numérica de sinapsis por unidad de volumen ( $N_v$ ) fue calculada para cada animal con la fórmula:

$$N_v = Q/v(\text{dis})$$

En esta fórmula  $Q$  es el número promedio de sinapsis por disector y  $v(\text{dis})$  el volumen promedio del disector.



**Figura 14.** Dos micrografías electrónicas seriadas del *stratum lucidum* de la formación hipocámpica de una rata normal de 220 días de edad, ejemplificando un "disector físico". Las micrografías electrónicas fueron tomadas del mismo campo de secciones ultrafinas adyacentes paralelas. Las sinapsis se cuantificaron si aparecían en la sección A y estaban ausentes en la sección B. Los círculos en A, indican las sinapsis asimétricas FM-CA3 que se encuentran en esta sección y en B los círculos indican que estas sinapsis no se observan más. La cabeza de flecha en





ambas secciones indica una sinapsis que no se encuentra en A pero si en B. La flecha grande indica una sinapsis de tipo simétrico entre una dendrita y la terminal de una fibra musgosa. El marco indica el área en la cual se llevó a cabo el análisis estereológico, y tiene dimensiones de  $12 \mu\text{m} \times 9.6 \mu\text{m}$ , solo se contaron aquellas sinapsis que se encontraban totalmente dentro de este marco. Las micrografías electrónicas se tomaron a un aumento de  $6300\times$ . D = dendrita apical, FM = terminal de una fibra musgosa, s = espina dendrítica.

La densidad numérica de cada animal se obtuvo del promedio de todos los disectores en cada uno de los tres bloques seleccionados sistemáticamente a lo largo del eje septotemporal de la FH.

### **Estimación del número total de sinapsis asimétricas FM-CA3 en el haz suprapiramidal del sistema de fibras musgosas**

El número total de sinapsis asimétricas FM-CA3, N(sin) en el haz suprapiramidal del sistema de fibras musgosas fue calculado para cada animal con la fórmula:

$$N(\text{sin}) = (V(\text{ref}))(N_v)$$

Donde V(ref), es el volumen promedio del haz suprapiramidal y  $N_v$  es la densidad numérica de las sinapsis FM-CA3 por unidad de volumen o promedio del volumen del disector.

### **ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

El análisis estadístico de los puntajes obtenidos de los diferentes parámetros analizados en cada grupo se llevó a cabo usando el paquete estadístico para ciencias sociales SPSS (Statistical Package for Social Sciences) versión 3.0. La prueba aplicada fue la de análisis de varianza de una vía (one way ANOVA). Los niveles estadísticos de significancia fueron establecidos a un valor de  $p \leq 0.05$ .

## RESULTADOS

### PESO CEREBRAL

La tabla II muestra los hallazgos obtenidos del peso cerebral del grupo control y malnutrido prenatalmente. En esta tabla aparece el valor promedio, la desviación estándar, el porcentaje de cambio del grupo experimental respecto del grupo control y los valores significativos después de analizar los datos con la prueba estadística ANOVA de una vía. Como puede observarse no existen diferencias estadísticamente significativas en el peso cerebral entre animales malnutridos prenatalmente y controles de 220 días de edad.

### PESO CORPORAL

Por otro lado, los resultados del peso corporal de animales malnutridos prenatalmente y controles, tampoco indicaron diferencias estadísticamente significativas después de analizar los datos de este parámetro con la prueba estadística ANOVA de una vía (Tabla II).

**TABLA II**

Peso cerebral y corporal (g) del grupo control y malnutrido prenatalmente a los 220 días de edad.

GRUPO			
C	MP	% DE CAMBIO	SIGNIFICANCIA
<b>PESO CEREBRAL</b>			
1.72 ± 0.09	1.65 ± 0.05	- 4.06%	NS
<b>PESO CORPORAL</b>			
416.20 ± 32.70	432.70 ± 27.10	+ 3.96%	NS

Los valores representan el promedio ± la desviación estándar. NS = No significativo. Prueba estadística: ANOVA de una vía. C = grupo control. MP = grupo malnutrido prenatalmente.

## VOLUMEN TOTAL ESTIMADO DEL SISTEMA DE FIBRAS MUSGOSAS

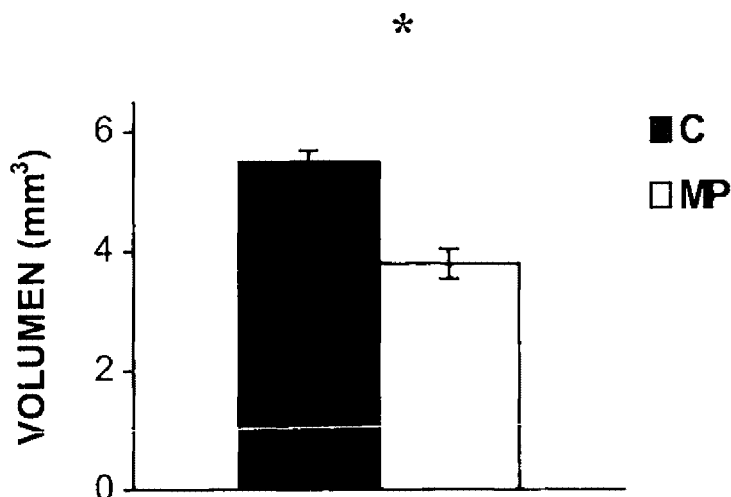
El volumen total estimado del sistema de FM se indica en la tabla III y figura 15. Se puede observar que a los 220 días de edad el valor promedio para este parámetro es de 5.5 mm<sup>3</sup> para el grupo de animales control en tanto que en el grupo de animales malnutridos prenatalmente es de 3.8 mm<sup>3</sup>. El análisis estadístico de los datos reveló que el volumen total estimado del sistema de FM fue significativamente menor en un 31% en el grupo de animales malnutridos prenatalmente respecto del grupo control.

**TABLA III**

Volumen total estimado (mm<sup>3</sup>) del sistema de fibras musgosas de ratas control y malnutridas prenatalmente de 220 días de edad.

GRUPO		% DE CAMBIO	VALOR DE F	p
C	MP			
5.5 ± 0.19	3.8 ± 0.25	↓30.9%	45.7	≤ 0.001

Prueba estadística: ANOVA de una vía. C = grupo control, MP = grupo malnutrido prenatalmente.



**Figura 15.** Volumen total estimado del sistema de fibras musgosas de la FH de animales controles y malnutridos prenatalmente de 220 días de edad. n = 5 animales en cada grupo. C = grupo control, MP = grupo malnutrido prenatalmente.

## VOLUMEN ESTIMADO DEL HAZ SUPRAPIRAMIDAL DEL SISTEMA DE FIBRAS MUSGOSAS

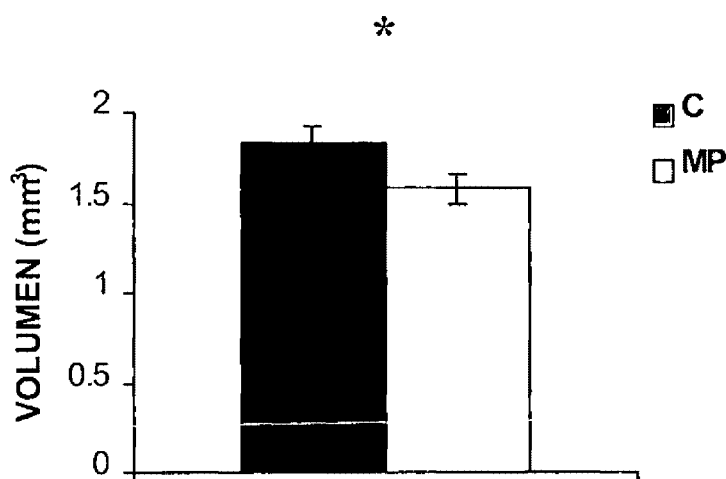
La tabla IV y figura 16 muestran el valor promedio del volumen del haz suprapiramidal del sistema de FM de la FH. En el grupo control el volumen de esta región fue de  $1.83 \text{ mm}^3$ , mientras que para el grupo malnutrido prenatalmente fue de  $1.58 \text{ mm}^3$ . El análisis estadístico de los datos indicó diferencias estadísticamente significativas, en este caso el volumen del grupo malnutrido prenatalmente es menor respecto del grupo control.

**TABLA IV**

Volumen estimado ( $\text{mm}^3$ ) del haz suprapiramidal del sistema de fibras musgosas de ratas control y malnutridas prenatalmente de 220 días de edad.

GRUPO		% DE CAMBIO	VALOR DE F	p
C	MP			
$1.83 \pm 0.10$	$1.58 \pm 0.09$	$\downarrow 13.6\%$	7.70	$\leq 0.05$

Prueba estadística. ANOVA de una vía. C = grupo control, MP = grupo malnutrido prenatalmente.



**Figura 16.** Volumen estimado del haz suprapiramidal del sistema de fibras musgosas de ratas control y malnutridas prenatalmente de 220 días de edad. n = 5 animales en cada grupo.

## DENSIDAD NUMÉRICA DE LAS SINAPSIS ASIMÉTRICAS FM-CA3 POR UNIDAD DE VOLUMEN

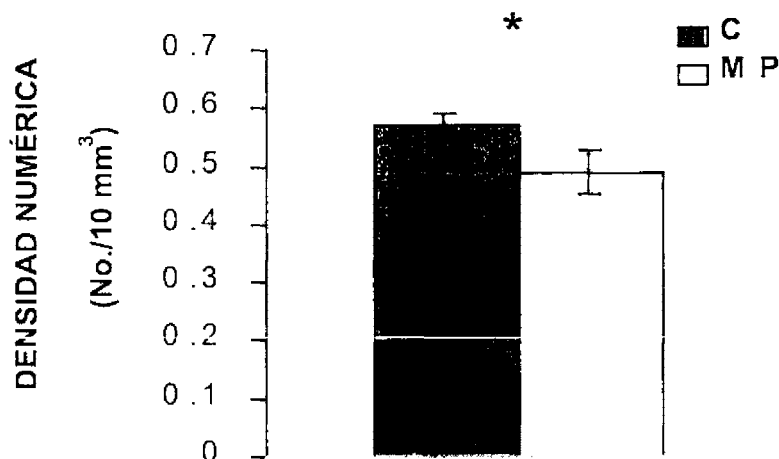
El valor promedio de la densidad numérica de las sinapsis asimétricas FM-CA3 por unidad de volumen o volumen promedio de disector ( $10 \mu\text{m}^3$ ), se muestra en la tabla V y figura 17. El valor de este parámetro para el grupo de animales control fue de 0.57 en tanto que para el grupo experimental fue de 0.49. El análisis estadístico de los datos indicó que a los 220 días de edad, existe reducción significativa del 14% de este parámetro en el grupo de ratas malnutridas prenatalmente respecto del grupo de ratas bien alimentadas.

**TABLA V**

Densidad de las sinapsis asimétricas FM-CA3 por unidad de volumen ( $10 \mu\text{m}^3$ ) de ratas control y malnutridas prenatalmente de 220 días de edad.

GRUPO		% DE CAMBIO	VALOR DE F	p
C	MP			
$0.57 \pm 0.02$	$0.49 \pm 0.04$	↓14.0%	15.73	$\leq 0.01$

Prueba estadística. ANOVA de una vía. C = grupo control, MP = grupo malnutrido prenatalmente.



**Figura 17.** Densidad numérica de las sinapsis asimétricas FM-CA3 por unidad de volumen de ratas control y malnutridas prenatalmente de 220 días de edad. n = 5 animales en cada grupo.

## NÚMERO TOTAL ESTIMADO DE SINAPSIS ASIMÉTRICAS FM-CA3 EN EL HAZ SUPRAPIRAMIDAL DEL SISTEMA DE FIBRAS MUSGOSAS

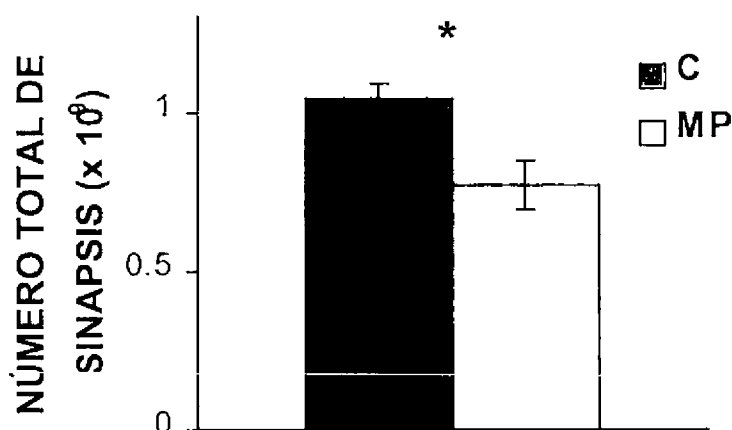
La estimación del número total de sinapsis asimétricas FM-CA3 en el grupo de animales control fue de  $1.04 \times 10^9$  y de  $0.77 \times 10^9$  para el grupo malnutrido prenatalmente (Tabla VI y Figura 18). Las comparaciones estadísticas indicaron reducción significativa de la estimación del número total de sinapsis asimétricas FM-CA3 en el haz suprapiramidal del sistema de FM en el grupo malnutrido prenatalmente respecto del grupo control.

**TABLA VI**

Número total estimado de sinapsis asimétricas FM-CA3 en el haz suprapiramidal del sistema de FM de ratas control y malnutridas prenatalmente.

GRUPO		% DE CAMBIO	VALOR DE F	p
C	MP			
$1.04 \times 10^9$ $\pm 0.05 \times 10^9$	$0.77 \times 10^9$ $\pm 0.08 \times 10^9$	↓26.0%	40.43	$\leq 0.001$

Prueba estadística: ANOVA de una vía. C = grupo control, MP grupo malnutrido prenatalmente. n = 5 animales en cada grupo.



**Figura 18.** Número total estimado de sinapsis asimétricas FM-CA3 en el haz suprapiramidal del sistema de fibras musgosas de ratas control y malnutridas prenatalmente de 220 días de edad. n = 5 animales en cada grupo.

**TABLA VII**

Resumen de los resultados obtenidos para los diferentes parámetros analizados de ratas de 220 días de edad control y malnutridas prenatalmente.

<b>GRUPO</b>	<b>VOLUMEN TOTAL DEL SFM (mm<sup>2</sup>)</b>	<b>VOLUMEN DEL HAZ SUPRAPIRAMIDAL</b>	<b>DENSIDAD NUMÉRICA (No./10μm<sup>3</sup> + D. S.)</b>	<b>NÚMERO TOTAL DE SINAPSIS (x 10<sup>9</sup> + D. S.)</b>
<b>CONTROL</b>	5.5 ± 0.19	1.83 ± 0.10	0.57 ± 0.02	1.04 ± 0.05
<b>MALNUTRIDO PRENATALMENTE</b>	3.8 ± 0.25 (↓30.9%)***	1.58 ± 0.09 (↓13.6%)*	0.49 ± 0.04 (↓14%)**	0.77 ± 0.08 (↓26%)***
<b>VALOR DE F</b>	45.7	7.70	15.73	40.43

Prueba estadística: ANOVA de una vía. \*  $p \leq 0.05$ , \*\*  $p \leq 0.01$ , \*\*\*  $p \leq 0.001$ . El número entre paréntesis indica el porcentaje de cambio del grupo experimental respecto del control.



## DISCUSIÓN

Los hallazgos del presente estudio muestran los siguientes efectos:

- 1) Reducción del volumen estimado total del sistema de fibras musgosas de la FH.
- 2) Reducción del volumen estimado del haz suprapiramidal del sistema de fibras musgosas.
- 3) Decremento de la densidad numérica estimada por unidad de volumen de las sinapsis asimétricas FM-CA3.
- 4) Disminución del número total estimado de las sinapsis asimétricas FM-CA3 en el haz suprapiramidal del sistema de fibras musgosas.

Estos resultados muestran que la malnutrición proteínica, restringida a la etapa de gestación induce efectos deletéreos a largo plazo sobre el número estimado de sinapsis asimétricas establecidas entre las fibras musgosas de las células granulares y las excrescencias torneadas de las células piramidales de la región CA3 del hipocampo. Las deficiencias en la conectividad sináptica en la FH de ratas adultas con malnutrición prenatal, podrían deberse a alteraciones en la sinaptogénesis y/o en la consolidación sináptica, fenómenos que determinan y especifican el número de conexiones neuronales (Jacobson, 1993).

Los resultados del presente trabajo indican que la compensación nutricional al momento del nacimiento no restablece los daños producidos por la malnutrición prenatal en el volumen del SFM y en el número de contactos sinápticos de la FH y además, aunados a los datos reportados previamente indican que las alteraciones en la FH por la malnutrición dependen en gran parte del tipo, inicio y duración de ésta. Así, los efectos producidos por la malnutrición hipoproteínica instalada durante la gestación son parecidos a los producidos por la malnutrición hipoproteínica aplicada de manera crónica (pre y posnatal) (Cintra y col., 1990; Díaz-Cintra y col., 1994) y más severos que aquellos producidos por la malnutrición durante la vida postnatal (Andrade y col., 1995b, 1996), además la rehabilitación nutricional al momento del nacimiento no permite expresar fenómenos de reorganización morfológica sináptica como la que se ha reportado en ratas rehabilitadas de la malnutrición proteínica postnatal. Una conclusión similar fue hecha en el estudio de Katz

y col. (1982), quienes usando diferentes periodos de desnutrición pre y/o postnatal, observaron reducción del grosor de la FH sólo en ratas en las cuales la desnutrición incluía el periodo de gestación. Recientemente, en un estudio donde se analizaron los efectos de diferentes programas de malnutrición hipoproteínica sobre el desarrollo de la topografía y somatotopía del sistema somatosensorial, Robles (2000) documentó que la malnutrición hipoproteínica prenatal afecta más a estos fenómenos, incluso que la malnutrición hipoproteínica aplicada de manera crónica.

La FH sufre menos daño por malnutrición prenatal en etapas tempranas del desarrollo entre 30 y 90 días de edad, hecho que se corrobora con los resultados de éste y otros trabajos (Morgane y col., 1993; Díaz-Cintra y col., 1994; Granados y col., 1995; Cintra y col., 1990, 1997). Esta última etapa corresponde a la vida reproductiva temprana de la rata. Por ejemplo, DeBassio y col. (1996) observaron aumento de la neurogénesis postnatal de las células granulares en animales de 30 días malnutridos durante el periodo prenatal, puede ser un mecanismo para proveer hasta donde sea posible un substrato neuronal normal durante este tiempo. Es también de interés notar que estas células se generan principalmente durante el periodo postnatal y, su aumento es en sí un posible mecanismo de adaptación que ocurre después del insulto nutricional. Esto sugiere que el daño producido durante el periodo prenatal es importante para la implementación de este programa adaptativo y que no es necesario que el insulto esté presente durante el tiempo de su ejecución. Además, parece que estos mecanismos adaptativos pueden ocurrir a expensas de las últimas etapas del desarrollo de las células granulares ya que se ha observado que las deficiencias son más marcadas a los 220 días de edad.

Durante el desarrollo del SNC, la integridad, ensamble y funcionamiento apropiados de un circuito neuronal depende de la proliferación, diferenciación, migración, y maduración de sus componentes neuronales coordinados tanto en tiempo como en espacio, además de la formación de las sinapsis (sinaptogénesis) y la consolidación de éstas. Así, la alteración en cualquiera de las etapas del desarrollo de sus elementos celulares y componentes sinápticos, repercute en la eficiencia funcional de un circuito dado. En este caso las alteraciones en algunas de las etapas del desarrollo de uno o ambos elementos neuronales de las sinapsis FM-CA3 (las células granulares del GD y las células piramidales

del CA3) pueden explicar los resultados del presente trabajo. También hay que tener en cuenta que estos dos tipos celulares despliegan diferentes características ontogenéticas, morfológicas y funcionales.

Los mecanismos que delinear los efectos a largo plazo de la restricción de proteínas en el período prenatal sobre el número de contactos sinápticos FM-CA3 y el volumen del sistema de fibras musgosas no son claros. Sin embargo, se pueden proponer varias explicaciones, no mutuamente excluyentes, mismas que se describen a continuación y que requieren ser planteadas desde diversos aspectos ya que la definición de estos hallazgos no puede por sí misma ser concluyente por lo que se requiere de su ubicación en un plazo más amplio:

- 1) Neurogénesis. El retardo en la neurogénesis de las células granulares puede llevar a la reducción de las sinapsis asimétricas FM-CA3. Lewis y col. (1975, 1979) han reportado que la desnutrición perinatal alarga el ciclo celular, lo que conlleva a la producción de un menor número de células granulares. Con el presente modelo de malnutrición prenatal se ha documentado que la neurogénesis de las células granulares se retarda desde el día embrionario (E) 20 hasta el día postnatal (P) 8, no se afecta en el día P15 y se encuentra incrementada al día P30 (DeBassio y col., 1994, 1996). No se tienen reportes de la neurogénesis en etapas adultas en animales bajo malnutrición prenatal, pero es probable que ésta se dañe, como se ha reportado, en ratas adultas bajo desnutrición desde el día E16 al día P30 (Bedi, 1991). Por otro lado, las células piramidales no presentan alteraciones en su generación en animales malnutridos prenatalmente (DeBassio y col., 1994).
- 2) Inducción. Alteraciones en los mecanismos de inducción podrían explicar en parte la reducción de sinapsis FM-CA3. Estudios previos han documentado que las fibras musgosas de las células granulares inducen el desarrollo de las excrescencias torneadas de las células piramidales del CA3 (Amaral y Dent, 1981; Frotscher, 1991). Esta conclusión se obtuvo de estudios en ratas sometidas a irradiación neonatal (con rayos  $\gamma$ ) que muestran pérdida de células granulares del GD (por consiguiente de fibras musgosas), y como consecuencia un pobre desarrollo de las excrescencias torneadas (Gaiarsa y col., 1992; Represa y col., 1991). Además Gaiarsa y col. (1992) reportaron que el desarrollo

final de los árboles dendríticos y la formación de espinas dendríticas, es concomitante con la maduración del sistema de fibras aferentes. Hecho apoyado por experimentos de cultivo de tejidos en donde se mostró que las neuronas exhiben pocas ramificaciones y sin espinas cuando crecen sin las fibras aferentes o contactos con neuronas vecinas. Se ha propuesto que las fibras musgosas liberan una señal inductiva para la formación de las excrescencias torneadas, y que esta señal activa un programa residente solo en algunas células blanco (células piramidales del CA3), además de presentar también una especificidad regional dentro de una misma célula ya que sólo las partes proximales de las dendritas de las células musgosas están cubiertas por excrescencias torneadas (Gaiarsa y col., 1992). Nuestros estudios de malnutrición prenatal sobre el área (Granados y col., 1995) y volumen de las fibras musgosas (resultados del presente trabajo) en conjunto con el estudio de las células piramidales del CA3 (Díaz-Cintra y col., 1994) apoyan esta idea ya que muestran una relación esperada entre estos elementos: menor número de axones o fibras musgosas y menor número de excrescencias torneadas en animales adultos malnutridos prenatalmente.

- 3) Maduración. Otra etapa del desarrollo que se altera en animales malnutridos prenatalmente es la maduración postnatal de los procesos neuronales (p. e. ramas y espinas dendríticas) de los elementos neuronales de la sinapsis FM-CA3. Así, en estudios morfométricos se ha reportado en animales adultos reducción del número de espinas y de la complejidad de ramas dendríticas de las neuronas granulares (Díaz-Cintra y col., 1991) y de las células piramidales (Díaz-Cintra y col., 1994). Se ha mostrado también que el área de distribución de los axones de las células granulares que integran el sistema de fibras musgosas se reduce significativamente (Granados y col., 1995). El presente trabajo muestra que el volumen de este plexo también se reduce. De acuerdo a estos datos, en general las células granulares del GD son el tipo celular más afectado por la malnutrición hipoproteínica prenatal.
- 4) Alteración de los factores tróficos. Aunado a la regulación de la proliferación, supervivencia y diferenciación neuronal, las sustancias neurotróficas (p. e. neurotrofinas) juegan un papel importante en la sinaptogénesis y en la consolidación sináptica (Loughlin y Fallon, 1993). Es probable que la malnutrición prenatal cause reducción de

la síntesis, disponibilidad y liberación de estas sustancias o altere la capacidad de las neuronas para reaccionar a estos factores y ésto conlleve a la reducción de la sinaptogénesis y/o de la consolidación sináptica de las sinapsis asimétricas FM-CA3. La FH de la rata adulta contiene los mayores niveles cerebrales de factores neurotróficos como el de crecimiento nervioso (FCN), factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) y neurotrofina-3. La reducción probable de los niveles de neurotrofinas en la FH puede inducir la muerte neuronal (Korsching, 1993). En apoyo a esta idea están los resultados que indican que las dendritas (que son los sitios de liberación de neurotrofinas dependientes de actividad (Thoenen, 1991)), se reducen también en la FH después de la privación proteínica prenatal (Cintra y col., 1990, 1997; Díaz-Cintra y col., 1991, 1994). Por otro lado, la malnutrición altera la concentración de algunos factores promotores del crecimiento en el organismo como el factor de crecimiento tipo insulina-I (IGF-I), la hormona del crecimiento-GH, la insulina etc. (Muaku y col., 1995a,b; Reis y col., 1996). El FCN en la FH se produce parcialmente por sus neuronas GABAérgicas (Lauterbon y col., 1993). Así, la reducción numérica de estas neuronas observada después de la privación proteínica postnatal (Andrade y Paula-Barbosa, 1996), puede potenciar la muerte neuronal. Para apoyar esta idea se cita el trabajo de Van der Zee y col. (1995) quienes mostraron que el FCN está involucrado en la sinaptogénesis de las fibras musgosas, ya que su administración intraventricular, aumenta la sinaptogénesis de las fibras musgosas en el *stratum oriens* del CA3 producida por el kindling amigdalino, y por el contrario, la administración intraventricular de anticuerpos a este factor trófico la bloquea.

- 5) Reducción del número de células granulares y/o piramidales. Varios estudios han mostrado que la malnutrición proteínica prenatal (DeBassio y col., 1994, 1996), perinatal (Bedi, 1991) y postnatal (Andrade y col., 1995a) provocan la reducción tanto del número de neuronas granulares del GD como de neuronas piramidales del hipocampo (Andrade y col., 1995a) y que aún la rehabilitación después de un periodo de malnutrición postnatal no restablece el número de células granulares y piramidales de la FH (Andrade y col., 1995a). No existen trabajos con malnutrición proteínica prenatal sobre la generación o cuantificación del número de células granulares y piramidales en etapas

adultas, sin embargo, Bedi (1991) estimó el número total de células en el GD en el día P70 y P212 en ratas a las que se les alimentó con 40% ó 60% de su dieta normal desde el día E16 al día P30. La malnutrición no alteró el número de células granulares en el día P70, pero sí causó reducción en los animales de 212 días de edad, muy cercana a la que se analizó en el presente estudio (220 días). Aunque en el presente trabajo, no se estimó el número de células granulares y piramidales, trabajos previos sugieren que la malnutrición proteínica prenatal reduce el número de células granulares y/o piramidales en animales adultos, indicado de manera indirecta por la reducción del área de la capa granular del GD en animales de 220 días de edad (datos no publicados de nuestro laboratorio). Así mismo, por la reducción del grosor del *stratum lucidum* en ratas de 220 días de edad (Díaz-Cintra y col., 1994), ya que se ha visto en diversos trabajos que la reducción del número de células en una estructura dada, conlleva a la reducción del área y/o volumen de ésta (Andrade col., 1995a,b, 1996).

- 6) Alteración en la actividad hipocámpica. Se conoce bien que los patrones de actividad neural provocada y espontánea promueven tanto la sinaptogénesis como la consolidación sináptica (Jacobson, 1993). Por lo que una posibilidad de gran interés es que las alteraciones en el ritmo theta (involucrado en procesos de atención) observadas en animales malnutridos prenatalmente (Morgane y col., 1990, 1993; Cintra y col., 1995), lleven a la deficiencia en la sinaptogénesis y/o en la consolidación sináptica de las sinapsis FM- CA3.
- 7) Retraso en la velocidad de la sinaptogénesis y del refinamiento de las conexiones sinápticas. Se sabe que la desnutrición retrasa o lentifica diferentes eventos del desarrollo en el SNC (Morgane y col., 1993). Por otro lado, la conectividad sináptica se genera y refina durante el desarrollo y maduración de acuerdo al grado y tipo de experiencia de un individuo (Jacobson, 1993). El retardo de este evento (refinamiento) podría ser la causa de la observación de menos sinapsis en etapas adultas del desarrollo. De la misma manera es probable que la velocidad de la sinaptogénesis del relevo sináptico FM-CA3 a lo largo de la vida del animal malnutrido también se retrase o lentifique.

Es claro que se requiere de otros trabajos que evalúen y validen cada una de estas propuestas y la posible interacción entre ellas.

Por otro lado el desarrollo y función neuronal requiere de la participación de proteínas membranales y citoplásmicas, además en el cerebro adulto la sinaptogénesis requiere la presencia de proteínas locales para la construcción de complejos neuronales (Steward, 1987) con alto contenido de proteínas, como por ejemplo, la densidad postsináptica que se encuentra en las sinapsis excitatorias y que es una zona especializada en recibir a los neurotransmisores y que además contiene moléculas para la transducción de señales para responder a estímulos sinápticos (Craven y col., 1999). Por otro lado, se ha documentado que la capacidad para sintetizar proteínas se encuentra reducida en los animales malnutridos (Yokogoshi y col., 1992), lo que podría producir reducción de la disponibilidad intraneuronal de los “bloques moleculares de construcción” (p. e. aminoácidos, tubulina etc.) y de la producción de las proteínas necesarias para activar el citoesqueleto y lograr la elaboración y crecimiento de procesos neuronales y sinápticos, en general, la modificación y consolidación sináptica (Steward, 1983, 1987, 1996; Steward y Falk, 1986). Se ha documentado que los inhibidores de la síntesis de proteínas pueden prevenir algunos de los cambios estructurales sinápticos observados después de tareas de aprendizaje en pollos (Rose, 1991).

Estudios recientes han mostrado que los neurotransmisores regulan la densidad sináptica (Matsukawa y col., 1997; Mazer y col., 1997), por ejemplo, la falta de serotonina y acetilcolina disminuyen el número de sinapsis en diferentes regiones del hipocampo incluyendo el CA3. Por otro lado se ha reportado que ratas adultas malnutridas prenatalmente de 220 días presentan reducción de la densidad de fibras serotoninérgicas y de sitios de recaptura a serotonina en el CA3 (Blatt y col., 1994). Así en concordancia con esta reducción, la respuesta encontrada en este trabajo de reducción de las sinapsis FM-CA3 puede ser debida a las alteraciones del sistema serotoninérgico observadas en animales adultos malnutridos en el periodo de gestación.

Se ha documentado que la noradrenalina es un regulador de eventos regresivos como la eliminación sináptica, por otro lado se ha observado que la malnutrición prenatal aumenta la concentración y liberación de noradrenalina (Soto-Moyano y col., 1998). Por lo

que es probable que el aumento de noradrenalina conlleve a mayor eliminación sináptica de FM-CA3 ya que el CA3 recibe aferencias noradrenérgicas. Además se ha reportado que alteraciones funcionales provocadas por la desnutrición prenatal se restablecen al adicionar en la dieta un inhibidor de la tirosina hidroxilasa, que restablece las concentraciones de noradrenalina en los animales malnutridos prenatalmente (Soto-Moyano y col., 1998).

La participación de las hormonas en el presente trabajo no debe descartarse dado que la FH es dependiente y sensible a cambios en los niveles de diferentes hormonas durante su desarrollo (Jacobson, 1993). No se han realizado aún investigaciones donde se analicen los niveles hormonales tanto de las madres como de las crías bajo malnutrición proteínica prenatal. Sin embargo, en un trabajo reciente se documentó que la privación de nutrimentos por 48 horas en la etapa de gestación, produce en los fetos machos de cobayos, aumento del cortisol y reducción tanto de la tiroxina como de los niveles de receptores a glucocorticoides en los campos CA1 y CA3 del hipocampo (Lingas y col., 1999). Es probable que al igual que en el trabajo mencionado los niveles hormonales en animales malnutridos se alteren, así, se sabe que el número de células granulares del GD se reduce por la ausencia de glucocorticoides (Sapolsky, 1987), por lo que la reducción de sinapsis FM-CA3 reportadas en el presente trabajo tal vez se deba a una acción indirecta de la posible reducción de glucocorticoides sobre las células granulares. La reducción de tiroxina en los fetos es un punto importante ya que en el cerebro la tiroxina es convertida a triiodotironina y como se conoce las hormonas tiroideas tienen efectos directos sobre el desarrollo estructural del cerebro fetal (Lingas y col., 1999). Así, se ha documentado que la deficiencia de hormonas tiroideas producen reducción del volumen de la capa piramidal del CA3 (Madeira y col., 1992) y del número de células granulares del GD (Madeira y col., 1991), además de causar retardo de la sinaptogénesis en la capa molecular del GD (Rami y Rabié, 1990). También se sabe que los estrógenos regulan la plasticidad sináptica y la fisiología de la FH así como el aprendizaje que es mediado por esta estructura (Weiland y col., 1997). La reducción probable de estrógenos en animales malnutridos prenatalmente puede contribuir a los resultados obtenidos ya que se ha reportado que sus receptores se encuentran principalmente en las interneuronas de la FH (Weiland y col., 1997), las cuales se reducen por la malnutrición posnatal (Andrade y Paula-Barbosa, 1996). Existe evidencia



de que los estrógenos incrementan la densidad de espinas dendríticas y las sinapsis en las células piramidales del CA1 (Weiland y col., 1997) además la supervivencia de las células granulares del GD dependen de esteroides gonadales (Gould, 1990).

Los resultados observados en el presente trabajo no pueden ser debidos en parte a los cambios estructurales de la FH debida a la edad. De acuerdo a la literatura se considera anciana a una rata de 27-28 meses de edad (810-840 días), rata adulta madura de 9-10 meses de edad (270-365 días) y rata adulta joven de 3-5 meses de edad (90-150 días) (Geinisman y col., 1986; Rapp y col., 1999). Las ratas usadas en el presente estudio se sacrificaron a los 220 días de edad (7.3 meses) por lo que se consideran como ratas adultas maduras (incluso aún más jóvenes). esta edad no equivalen al periodo de vejez donde pudieran existir trastornos del aprendizaje y memoria debidos a la edad. Rapp y col. (1999) han documentado que los daños en la memoria y aprendizaje de ratas evaluadas en laberintos de agua se presentan en ratas ancianas (27-28 meses de edad) en tanto que entre los grupos de ratas adultas maduras y adultas jóvenes no existen diferencias significativas. También reportan que algunas características morfológicas como son el número de células granulares y piramidales y el volumen de diferentes capas de la FH no son diferentes entre los dos últimos grupos. Por otro lado se conoce que el volumen del sistema de fibras musgosas aumenta conforme la edad avanza y que no existen diferencias significativas entre ratas adultas jóvenes, adultas maduras y ancianas (Rapp y cols., 1999). En cuanto al número de sinapsis en el hipocampo, se sabe que incrementan significativamente con la edad, aunque la última edad analizada fue de 150 días, en comparación con las sinapsis de otras regiones del sistema límbico como las de la corteza del cíngulo en donde se ha observado que a esta edad el número de sinapsis disminuye (Dilip y Desiraju, 1981). Estos trabajos sugieren sin embargo que la malnutrición prenatal acelera los procesos de envejecimiento ya que la pérdida de sinapsis semeja situaciones características de la vejez.

La adhesión de las membranas pre y postsinápticas es fundamental para el proceso de formación y mantenimiento de las sinapsis, este evento es mediado por diferentes moléculas como las integrinas, cadherinas, neuroliginas y neurexinas (Huntley y Benson 1999). Recientemente se ha mostrado que la N-cadherina se asocia exclusivamente con sinapsis excitatorias en el hipocampo (Benson y Tanaka, 1998). Por lo que probablemente

el menor número de sinapsis excitatorias reportadas en el presente trabajo sea un reflejo del daño en estas moléculas (se requieren observaciones más detalladas al respecto).

También se ha documentado que las moléculas de adhesión celular neuronal (NCAM), regulan el crecimiento y la sinaptogénesis de las fibras musgosas, lo cual se ha evidenciado por estudios en ratas epilépticas que muestran un desarrollo rápido y sinaptogénesis de las FM, los cuales coexisten con un aumento en la inmunoreactividad a las NCAM en las FM del CA3 (Niquet y col., 1993). Por lo que la reducción de contactos sinápticos del presente trabajo pudiera reflejar en parte alteraciones en estas moléculas en animales malnutridos prenatalmente.

Con relación a los estudios que utilizan la técnica de Timm, se sabe que esta marca claramente la zona terminal de las FM ricas en cine, sin embargo este método no provee información de la estructura fina y de la conectividad. De aquí la importancia de realizar estudios ultraestructurales para conocer el patrón de conectividad sináptica en animales tanto controles como malnutridos prenatalmente. En nuestro estudio la malnutrición prenatal causó el mismo efecto (reducción) en el volumen total del sistema de fibras musgosas y de su haz suprapiramidal. Sin embargo se conoce que las diferentes regiones que conforman el sistema de fibras musgosas responden de manera diferente a diversos programas de malnutrición (Andrade y col., 1996). Así se ha reportado que bajo malnutrición hipoproteínica postnatal, sólo se reduce el volumen del haz suprapiramidal, en tanto que el haz infrapiramidal así como la zona de fibras musgosas en el GD no se afectan.

Los botones de las FM contienen las más altas concentraciones de cine en el cerebro (Frederickson y Danscher, 1990), el cual es evidenciado por la técnica de Timm, por lo que el menor volumen observado de esta tinción sugiere varias interpretaciones:

a) Este metal es encontrado en las vesículas grandes de centro denso y es recapturado y liberado en los botones de las FM, por lo que probablemente una reducción en la tinción de Timm puede reflejar menor captura y menor liberación de cine en las sinapsis FM-CA3.

b) Escobar y col. (1997) documentaron que un aumento en la tinción de Timm puede indicar la transformación de sinapsis de las FM existentes de un estado rico en cine a uno deficiente y que este efecto puede revelar una transformación de sinapsis "silenciosas" en

sinapsis funcionales (con un alto contenido de cine). Lo cual implicaría que la reducción de sinapsis FM-CA3 observada en animales adultos refleje únicamente el número de sinapsis funcionales.

e) Debido a que la tinción de Timm evidencia la presencia de cine en las vesículas sinápticas es probable que exista reducción de este elemento, lo cual se manifiesta indirectamente por la reducción del volumen de tinción.

d) Una de las funciones del cine es la de estabilizar el almacenaje de proteínas dentro de las vesículas sinápticas, por lo que la probable desestabilización de las proteínas involucradas en generar cambios plásticos contribuyan a reducir el número de sinapsis.

e) También, de manera indirecta, estos datos indican que existen menos vesículas sinápticas en las terminales axónicas musgosas.

f) Los botones de las FM contienen dinorfinas y en menor grado encefalinas (McGinty y col., 1983), la reducción del número de vesículas sugiere menor cantidad de neurotransmisores por ejemplo, de péptidos opioides y/o glutamato. Los opioides endógenos están involucrados en la sinaptogénesis de otros sistemas sinápticos (Pérez-Navarro y col., 1993), en la regulación del desarrollo del SNC así como en la expresión y los niveles de factores neurotróficos (Hauser y col., 1989; Pérez-Navarro y col., 1993). Además los antagonistas a péptidos opioides ejercen influencia sobre el crecimiento del tejido neuronal que es dependiente de la duración del bloqueo de receptores a opioides (Meriney y col., 1991; Pérez-Navarro y col., 1993). Todo lo anterior sugiere que el número de sinapsis puede ser consecuencia de la reducción de péptidos opioides en el animal adulto malnutrido prenatalmente.

g) La reducción de la tinción de Timm también puede reflejar reducción del número de FM, lo cual aunado a la reducción en el número de sinapsis excitatorias implica que existe menor sustrato para producir fenómenos excitatorios como el kindling y la LTP.

h) Otra posibilidad es que se reduzca el volumen de los botones terminales individuales.

Es importante mencionar que en este estudio el volumen total del sistema de fibras musgosas se redujo 37% en animales malnutridos prenatalmente, en tanto que el volumen del haz suprapiramidal sólo se redujo en un 14%, lo cual indica que las alteraciones

principales en el volumen residen en el haz suprapiramidal y/o en la región hiliar. Este dato es importante debido a que se ha mostrado que la LTP en el hipocampo y en la amígdala así como el kindling hipocámpico en ratas machos adultos, producen sinaptogénesis en el *stratum oriens* del CA3 evidenciado por un volumen mayor en la tinción de Timm, por lo que la reducción de la tinción de Timm en el haz infrapiramidal sugiere menor sinaptogénesis en esta región (*stratum oriens*) lo cual daría evidencia en el sentido de que cambios anatómicos relacionados al paso de información semejante a la LTP en esta vía no son posibles, y esto explicaría en parte las alteraciones observadas en la LTP de animales malnutridos prenatalmente.

Estimar el número total de las sinapsis en una región o subregión del SNC es un parámetro de gran importancia cuando se trata de evaluar la capacidad de integración de una estructura. Las sinapsis representan los puntos de comunicación entre neuronas por lo que su número refleja la cantidad de información que cada neurona es capaz de procesar, por lo tanto, el nivel de alteración en cada relevo sináptico refleja un trastorno en el proceso de esta información. Junto con la información acerca del número de neuronas y de los procesos neuronales (p. e. ramas y espinas dendríticas), ellas proveen información del marco estructural en el cual se interpretan los cambios en la capacidad funcional de una estructura neuronal.

El papel fisiológico de la reducción de sinapsis FM-CA3 no puede ser concluyente con los datos del presente trabajo, sin embargo su localización debe tenerse en cuenta para correlacionarlo con implicaciones funcionales. Se sabe que las sinapsis FM-CA3 son de tipo excitatorio (Andersen y col., 1966) y su reducción puede influenciar la eficacia de la transmisión sináptica (Peters y Kaiserman-Abramof, 1970; Calverley y Jones, 1990). Esta idea también es apoyada por la reducción en la tinción de Timm que de manera indirecta refleja un menor número de vesículas sinápticas y por tanto de menor cantidad de neurotransmisores. Además la reducción de las sinapsis FM-CA3 refleja un menor número de sitios de liberación de neurotransmisores afectando de esta manera la transmisión sináptica en esta vía. Así, los cambios morfológicos observados en animales malnutridos prenatalmente pueden estar relacionados a la modificación en la eficacia sináptica (Ramirez-Amaya y col., 1999; Geinisman y col., 1996) y dado que la excitabilidad de las

células piramidales del CA3 es modulada principalmente a través de las fibras musgosas (Ben-Ari y Represa, 1990; Ramírez-Amaya y col., 1999), estos cambios morfológicos pueden representar un evento importante de alteración en la actividad de las células piramidales del CA3.

Para producir un impulso una neurona requiere la activación de muchas entradas sinápticas en concierto, una reducción del número de sinapsis excitatorias probablemente influya en los mecanismos de sumación temporal y espacial de los potenciales sinápticos y esto afecte finalmente la integración de la información en las neuronas piramidales del CA3 para dar una respuesta ya que probablemente no se alcance la suficiente corriente positiva para depolarizar a las neuronas piramidales del CA3. Aunque es importante mencionar que este mecanismo de integración incluye tanto a la excitación como a la inhibición. En este sentido es importante mencionar que las neuronas piramidales del CA3 además de las aferencias de las células granulares, también reciben aferencias directas de la corteza entorrinal, de fibras comisurales y de asociación, todas ellas de carácter excitatorio y entradas inhibitorias de las células GABAérgicas o interneuronas.

Es de esperarse que las alteraciones funcionales observadas en animales malnutridos no solo sean debidas a las alteraciones morfológicas observadas en el GD y en el propio hipocampo ya que la malnutrición prenatal, pudo haber alterado otras estructuras que funcionan de manera sinérgica como la corteza entorrinal y el complejo subicular. Esta idea se apoya por el trabajo de Andrade y col. (1998), quienes han indicado un efecto diferencial por la malnutrición postnatal sobre estas estructuras. Así, el *subiculum* se afecta por este paradigma no así la corteza entorrinal. Si bien las sinapsis asimétricas FM-CA3 representan el filtro de la información que pasa a través del circuito trisináptico, es necesario conocer las modificaciones en la estructura y el número de los relevos sinápticos restantes del circuito trisináptico hipocámpico para conocer que pasa con la sinapsis de entrada y salida del tricircuito.

Las sinapsis FM-CA3 son consideradas como un filtro de la información proveniente de la corteza entorrinal que es transmitida al propio hipocampo (Beck y col., 1992), además las neuronas piramidales de la región CA3 del hipocampo son importantes desde un punto de vista fisiológico debido a que pueden modificar la información que entra a través de las

conexiones que establecen unas con otras y transferir así el mensaje modificado a las neuronas del campo CA1 (Li y col., 1994). Por lo que la reducción del número de sinapsis FM-CA3 observada en animales malnutridos prenatalmente puede implicar menor activación fisiológica de la FH. Así estas alteraciones sumadas a las de otros trabajos sugieren que la información polisensorial proveniente de diversas cortezas de asociación que convergen en la FH, donde esta información se procesa y se filtra para luego proyectarse (divergir) de regreso y ser integrada en las diferentes cortezas de asociación, es diferente en los animales malnutridos prenatalmente.

Las sinapsis de tipo I o simétrico son inhibitorias (Peters y col., 1976) y aunque no fueron cuantificadas en este trabajo, los resultados muestran reducción de las sinapsis excitatorias en el CA3 y sugieren que el mecanismo inhibitorio puede estar aumentado en esta región. Este es un parámetro que es importante analizar en un futuro ya que la respuesta de las neuronas piramidales del CA3 esta dada con base a la integración de la información de sinapsis excitatorias e inhibitorias.

La proporción de sinapsis asimétricas FM-CA3 varía en diferentes etapas a través de la vida de un organismo. Su proporción es menor en animales jóvenes y predominante en animales adultos (Amaral y Dent, 1981; DeGroot y col., 1995). Con base en ésto, la reducción del número de sinapsis en animales adultos malnutridos prenatalmente aquí reportadas, podría reflejar etapas anteriores del desarrollo.

Dado que la FH es una estructura polisensorial por excelencia, es importante tomar en cuenta el factor estimulación en la interpretación de la reducción de las sinapsis FM-CA3 ya que se conoce que este tipo de sinapsis aumenta bajo condiciones de estimulación (Shankaranarayana y col., 1999). En relación a este punto, se ha documentado que en nuestro modelo de malnutrición prenatal la interacción entre la madre y las crías y entre las crías mismas, se deteriora (Galler y Tonkiss, 1991; Tonkiss y col., 1993) aunque de una manera menos severa que en modelos de desnutrición postnatal (Salas y col., 1984), por lo que la reducción de sinapsis FM-CA3 puede estar también influenciada por este factor. En relación a ésto, Moser y col. (1994) encontraron que animales mantenidos en un medio ambiente complejo incrementan las ramificaciones dendríticas de las neuronas piramidales del CA1 y también hace a las ratas más eficientes en una tarea espacial. Los daños

observados en los animales malnutridos prenatalmente pueden indicar incapacidad o deficiencia de la recepción de diferentes estímulos.

En la rata, la FH es una estructura involucrada en procesos cognoscitivos como lo es el aprendizaje y la memoria espacial (Olton y col., 1978; Barnes, 1988; Eichenbaum y Cohen, 1988; Olton, 1989; Speakman y O'Keefe 1989; Eichenbaum y Otto, 1992). Se considera además que la potenciación a largo plazo generada en el hipocampo es un modelo de plasticidad sináptica y sustrato de un mecanismo celular que delinea la memoria. La LTP es un incremento sostenido (días o meses) de la eficacia sináptica debido a la activación repetitiva de sinapsis excitatorias en el hipocampo, además esta forma de plasticidad sináptica esta asociada a un aumento o remodelamiento estructural de la población sináptica activada (Chang y Greenough, 1984; Lee y col., 1980; Geinisman y col., 1991), por lo que la dificultad para inducir y mantener la LTP reportada en la vía patrón perforante-células granulares de ratas adultas malnutridas prenatalmente (Bronzino y col., 1991a,b, 1996; Morgane y col., 1992, 1993), probablemente se debe, al menos en parte, a que se reduce el número de sinapsis excitatorias como se ha reportado en el presente trabajo. Además Weeks y col. (1998) documentaron que el número de sinapsis excitatorias es un factor importante en el mantenimiento de la LTP del GD. Estos autores observaron una correlación positiva entre el número de sinapsis en la capa molecular del GD después de estimulación de la vía perforante, y los estudios electrofisiológicos en animales malnutridos prenatalmente, muestran que la fase de la LTP más dañada es precisamente la fase de mantenimiento.

Se ha observado sinaptogénesis en el campo CA3 de la FH después de estimulaciones de alta frecuencia suficientes para inducir LTP en fibras musgosas (Escobar y col., 1997) y de la vía perforante (Adams y col., 1997) en ratas machos adultos. Aún no se han realizado experimentos de LTP de la vía FM-CA3 en animales malnutridos y es posible como lo demuestran los estudios de LTP en el GD, que también la LTP en esta vía este alterada, por lo que sería muy importante en un futuro analizar este punto. La LTP en esta vía es dependiente de péptidos opioides por lo que es deseable que se analice este sistema de neurotransmisión y su probable alteración, en conjunto con la reducción del número de sinapsis FM-CA3.

Si la sinaptogénesis de la FH se altera por malnutrición prenatal y se refleja en la reducción de sinapsis asimétricas FM-CA3, también puede explicar en parte el hecho de que las ratas malnutridas prenatalmente requieran más sesiones de estimulación antes de desarrollar las convulsiones motoras generalizadas indicativas del estado de kindling hipocámpico (Bronzino y col., 1990). En este sentido se ha reportado que el kindling hipocámpico, está asociado con la formación de sinapsis de fibras musgosas en la región CA3 de la FH (Geinisman y col., 1992; Represa y Ben-Ari, 1992).

Es posible que las alteraciones en tareas cognitivas observadas en animales adultos malnutridos prenatalmente (Tonkiss y Galler, 1990; Tonkiss y col., 1990, 1991, 1993) se deban, al menos en parte, a la pérdida de contactos sinápticos FM-CA3, ya que se ha postulado desde la época de Ramón y Cajal (1899) que el crecimiento neuronal y la formación de nuevos contactos sinápticos es base para la función del aprendizaje y de la memoria (Horn y col., 1985; Van Reempts y col., 1992). Así, Ramírez-Amaya y col. (1999) en un estudio donde se relacionó la sinaptogénesis de las fibras musgosas y el desempeño de animales en el laberinto de Morris, observaron que animales sobre entrenados y por tanto más eficientes en esta tarea espacial, presentan fenómenos de sinaptogénesis en las FM en el área CA3. Los cambios ultraestructurales revelaron un incremento de la densidad de sinapsis asimétricas por unidad de volumen en el *stratum oriens* y del 15% en el *stratum lucidum*, aunque en esta última región la diferencia no fue significativa. Sin embargo, cabe mencionar que este trabajo no analiza el número total de sinapsis asimétricas ya que sólo se evaluó una región a lo largo del eje septotemporal del hipocampo, y además sólo se tomó la densidad sináptica por unidad de volumen sin tener en cuenta el volumen total del *stratum lucidum*, por lo que probablemente esta diferencia se incremente. Aún así, este trabajo muestra que mecanismos de memoria y aprendizaje están relacionados con aumento del número de sinapsis de las FM en el área CA3 del hipocampo, por lo que probablemente las deficiencias conductuales observadas en animales adultos malnutridos pueda deberse en parte a la reducción de sinapsis FM-CA3.

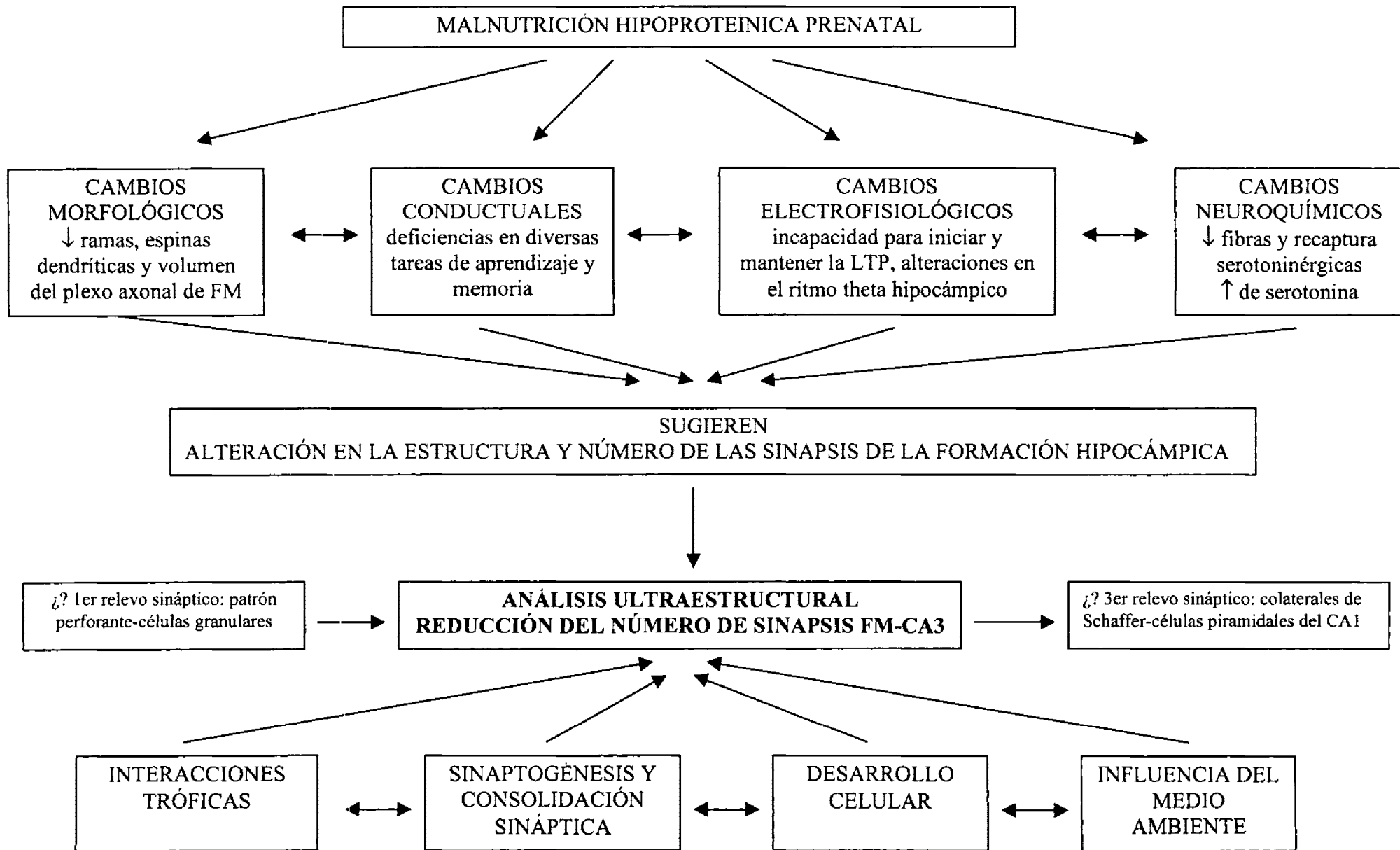
Por último las ratas adultas malnutridas prenatalmente pueden ser más vulnerables a agentes neurotóxicos xenobióticos y más susceptibles a desarrollar enfermedades neurodegenerativas, ya que se ha observado que el estado nutricional en humanos es un factor



muy importante en la enfermedad de Parkinson (Tarrats-Z. 1999). Alteraciones de la FH también han sido observadas en condiciones patológicas como en la epilepsia del lóbulo temporal y en la enfermedad de Alzheimer.

## CONCLUSIONES

- 1) La malnutrición hipoproteínica prenatal reduce a) el volumen total estimado del sistema de fibras musgosas, b) el volumen de su haz suprapiramidal, c) la densidad numérica por unidad de volumen y d) el número total estimado de sinapsis asimétricas entre las fibras musgosas de las células granulares del GD, y las excrescencias torneadas de las células piramidales del CA3 del hipocampo.
- 2) La malnutrición prenatal causa una deficiencia a largo plazo en la conectividad sináptica en la FH, probablemente debida a alteraciones en la sinaptogénesis y/o en la consolidación sináptica, fenómenos que determinan y regulan el número de conexiones neuronales.
- 3) La reducción en el número estimado de las sinapsis FM-CA3, podría explicar, al menos en parte, las alteraciones de la LTP, kindling y de tareas cognoscitivas descritas en ratas adultas bajo malnutrición prenatal.
- 4) La reducción del número de sinapsis FM-CA3 sugiere alteraciones en la transmisión sináptica en esta vía neuronal.
- 5) La modulación de la excitabilidad en las neuronas piramidales del CA3 puede ser probablemente menor en animales malnutridos prenatalmente.



**Figura 15.** Diagrama que muestra la aportación del presente trabajo en el contexto de los conocimientos reportados previamente.

## REFERENCIAS

- Adams B, Lee M, Fahnestock M, Racine RJ. Long-term potentiation trains induce mossy fiber sprouting. *Brain Res* 1997;775:193-197.
- Almeida SS, Tonkiss J, Galler JR. Prenatal protein malnutrition affects the social interactions of juvenile rats. *Physiol Behav* 1996;60:197-201.
- Amaral DG, Dent JA. Development of the mossy fibers on the dentate gyrus: I. A light and electron microscopic study of the mossy fibers and their expansions. *J Comp Neurol* 1981;195:51-86.
- Amaral DG, Witter MP. The three dimensional organization of the hippocampal formation: a review of anatomical data. *Neuroscience* 1989;31:571-591.
- Andersen P, Blackstad TW, Lomo T. Location and identification of excitatory synapses on hippocampal pyramidal cells. *Exp Brain Res* 1966;1:236-248.
- Andersen P, Bliss TVP, Skrede KK. Lamellar organization of hippocampal excitatory pathways. *Exp Brain Res* 1971;13:222-238.
- Andrade R, Malenka RC, Nicoll RA. A G protein couples serotonin and GABA<sub>B</sub> receptors to the same channels in hippocampus. *Science* 1986;234:1261-1265.
- Andrade JP, Madeira MD, Paula-Barbosa MM. Effects of long-term malnutrition and rehabilitation on the hippocampal formation of the adult rat. A morphometric study. *J Anat* 1995a;187:379-393.
- Andrade JP, Madeira MD, Paula-Barbosa MM. Evidence of reorganization in the hippocampal mossy fiber synapses of adult rats rehabilitated after prolonged undernutrition. *Exp Brain Res* 1995b;104:249-261.
- Andrade JP, Paula-Barbosa MM. Protein malnutrition alters the cholinergic and GABAergic systems of the hippocampal formation of the adult rat: an immunocytochemical study. *Neurosci Lett* 1996;211:211-215.
- Andrade JP, Castanheira-Vale AJ, Madeira MD. Time scale and extent of neural and synaptic loss in the hippocampal formation of malnourished adult rats. *Brain Res* 1996;718:1-12.
- Andrade JP, Madeira MD, Paula-Barbosa MM. Differential vulnerability of the subiculum and entorhinal cortex of the adult rat to prolonged protein deprivation. *Hippocampus* 1998;8:33-47.
- Austin K, Bronzino JD, Morgane PJ. Prenatal protein malnutrition affects synaptic potentiation in the dentate gyrus of rats in adulthood. *Dev Brain Res* 1986;29:267-273.
- Avila AC, Shamah LT, Chávez VA. 1995. Encuesta Urbana de Alimentación y Nutrición en la Zona Metropolitana de la Ciudad de México. pp 86. Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubirán: México.

Avila AC, Shamah LT, Chávez VA. 1996. Encuesta Nacional de Alimentación y Nutrición en el Medio Rural. pp 101. Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubirán: México.

Barnes CA. Spatial learning and memory processes: the search for their neurobiological mechanism in the rat. *Trends Neurosci* 1988;11:163-169.

Bedi KS. Effects of undernutrition during early life on granule cell numbers in the rat dentate gyrus. *J Comp Neurol* 1991;311:425-433.

Beck H, Ficker E, Heinemann U. Properties of two voltage-activated potassium currents in acutely isolated juvenile rat dentate gyrus granule cells. *J Neurophysiol* 1992;68:2086-2099.

Ben-Ari Y, Represa A. Brief seizure episodes induce long-term potentiation and mossy fibre sprouting in the hippocampus. *Trends Neurosci* 1990;13:312-318.

Benson DL, Tanaka H. N-cadherin redistribution during synaptogenesis in hippocampal neurons. *J Neurosci* 1998;18:6892-6904.

Blackstad TW, Kjaerheim A. Special axo-dendritic synapses in the hippocampal cortex: electron and light microscopic studies on the layer of mossy fibers. *J Comp Neurol* 1961;117:133-159.

Blatt GJ, Chen JC, Rosene DL, Volicic L, Galler JR. Prenatal protein malnutrition effects on the serotonergic system in the hippocampal formation: an immunocytochemical, ligand binding, and neurochemical study. *Brain Res Bull* 1994;34:507-518.

Bliss TVP, Lomo T. Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J Physiol* 1973;232:331-356.

Bliss TVP, Gardner-Medwin E. Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the unanaesthetized rabbit following stimulations of the perforant path. *J Physiol* 1973;232:357-374.

Boss BD, Peterson GM, Cowan WM. On the number of neurons in the dentate gyrus of the rat. *Brain Res* 1985;338:144-150.

Boss BD, Turlejski K, Stanfield BB, Cowan WM. On the number of neurons in fields CA1 and CA3 of the hippocampus of Sprague-Dawley and Wistar rats. *Brain Res* 1987;406:280-287.

Bronzino JD, Austin-LaFrance R, Morgane P. Effects of prenatal protein malnutrition on perforant path kindling in the rat. *Brain Res* 1990;515:45-50.

Bronzino JD, Austin-LaFrance RJ, Morgane PJ, Galler JR. Effects of prenatal protein malnutrition on kindling-induced alterations in dentate granule cell excitability. I. Synaptic transmission measures. *Exp Neurol* 1991a;112:206-215.

Bronzino JD, Austin-LaFrance RJ, Morgane PJ. Prenatal protein malnutrition alters dentate granule cell response to tetanic stimulation. *Soc Neurosci Abstr* 1991b;17:663.

- Bronzino JD, Austin-LaFrance RJ, Morgane PJ, Galler JR. Diet-induced alterations in the ontogeny of long-term potentiation. *Hippocampus* 1996;6:109-117.
- Brown TH, Zador AM. 1990. Hippocampus. En: *The synaptic organization of the brain*. Edwood RW, Ed:346-388. Oxford University Press: New York.
- Bush M, Leathwood PD. Effects of different regimens of early malnutrition on behavioral development and avoidance learning in Swiss white mice. *Br J Nutr* 1975;33:373-385.
- Cadete Leite A, Tavares MA, Pacheco MM, Volk B, Paula-Barbosa MM. Hippocampal mossy fiber-CA3 synapses after chronic alcohol consumption and withdrawal. *Alcohol* 1989;6:303-310.
- Calverley RKS, Jones DG. Contributions of dendritic spines and perforated synapses to synaptic plasticity. *Brain Res Rev* 1990;15:215-249.
- Chang FL, Greenough WT. Transient and enduring morphological correlates of synaptic activity and efficacy change in the rat hippocampal slice. *Brain Res* 1984;309:35-46.
- Chicurel ME, Harris KM. Three-dimensional analysis of the structure and composition of CA3 branched dendritic spines and their synaptic relationships with mossy fiber boutons in the rat hippocampus. *J Comp Neurol* 1992;325:169-182.
- Cintra L, Díaz-Cintra S. Efecto de la desnutrición proteínica en los núcleos *rafe dorsal*, *locus coeruleus* y en las células no piramidales de la corteza visual de la rata. *Rev Chil Nutr* 1985;13:76-82.
- Cintra L, Díaz-Cintra S, Galván A, Kemper T, Morgane PJ. Effects of protein undernutrition on the dentate gyrus in the rats of three age groups. *Brain Res* 1990;532:271-277.
- Cintra L, Galván A, Durán P, Díaz-Cintra S. EEG power spectra analysis before and after total sleep deprivation in prenatally malnourished rats of 60 days. *Sleep Res* 1995;24a:424.
- Cintra L, Aguilar A, Granados I, Galván A, Kemper T, DeBassio W, Galler J, Morgane P, Durán P, Díaz-Cintra S. Effects of prenatal protein malnutrition on hippocampal CA1 pyramidal cells in rats of four age groups. *Hippocampus* 1997;7:192-203.
- Claiborne BJ, Amaral DG, Cowan, WM. A light and electron microscopic analysis of the mossy fibers of the rat dentate gyrus. *J Comp Neurol* 1986;246:435-458.
- Cotman CW, Monaghan DT, Ganong AH. Excitatory amino acid neurotransmission, NMDA receptors and Hebb-type synaptic plasticity. *Ann Rev Neurosci* 1988;11:61-80.
- Craven SE, El-Husseini AE. Synaptic targeting of the postsynaptic density protein PSD-95 mediated by lipid and protein motifs. *Neuron* 1999;22:497-509.
- Cravioto J, Arrieta R. 1985. Desnutrición, desarrollo mental, conducta y aprendizaje. pp 191. *Impresiones modernas: México*.

- Crusio WE, Schwegler H. Hippocampal mossy fiber distribution covaries with open-field habituation in the mouse. *Behav Brain Res* 1987;26:153-158.
- Crusio WE, Schwegler H, Lipp HP. Radial-maze performance and structural variation of the hippocampus in mice: a correlation with mossy fibre distribution. *Brain Res* 1987;425:182-185.
- Danscher G, Fjerdingsstad EJ, Fjerdingsstad E, Fredens K. Heavy metal content in subdivisions of the rat hippocampus (cinc, lead and copper). *Brain Res* 1976;112:442-446.
- DeBassio WA, Kemper TL, Galler JR, Tonkiss J. Prenatal malnutrition effect on pyramidal and granule cell generation in the hippocampal formation. *Brain Res Bull* 1994;35:57-61.
- DeBassio WA, Kemper TL, Tonkiss J, Galler JR. Effect of prenatal protein deprivation on postnatal granule cell generation in the hippocampal dentate gyrus. *Brain Res Bull* 1996;41:379-383.
- DeGroot DMG, Bierman EPB, Bruijnzeel PLB, Woutersen RA. The "disector". A tool for quantitative assessment of synaptic plasticity an example on hippocampal synapses and synapse-perforations in aging rats. *Neuroscience* 1995;5:305-309.
- Derrick BE, Weinberger SB, Martínez JL Jr. Opioid receptors are involved in an NMDA receptor-independent mechanism of LTP induction at hippocampal mossy fiber-CA3 synapses. *Brain Res Bull* 1991;27:219-223.
- Derrick BE, Rodríguez SB, Lieberman DN, Martínez JL Jr. Mu opioid receptors are associated with the induction of hippocampal mossy fiber long-term potentiation. *J Pharmacol Exp Therap* 1992;263:725-733.
- Díaz-Cintra S, Cintra L, Galván A, Aguilar A, Kemper T, Morgane PJ. Effects of prenatal protein deprivation on postnatal development of granule cells in the fascia dentata. *J Comp Neurol* 1991;310:356-364.
- Díaz-Cintra S, García-Ruiz M, Corkidi G, Cintra L. Effects of prenatal malnutrition and postnatal nutritional rehabilitation on CA3 hippocampal pyramidal cells in rats of four ages. *Brain Res* 1994;662:117-126.
- Dilip MK, Desiraju T. Synapses in developing cingulate and hippocampal cortices in undernourished rats. *Neuro Report* 1991;2:433-436.
- Eichenbaum H, Cohen NJ. Representation in the hippocampus: what do hippocampal neurons code? *Trends Neurosci* 1988;11:244-248.
- Eichenbaum H, Otto T. The hippocampus-what does it do? *Behav Neur Biol* 1992;57:2-36.
- Elias H, Hyde DM, Scheaffer RL. 1983. A guide to practical stereology. pp 297. Karger:California.
- Escobar ML, Barea-Rodríguez EJ, Derrick BE, Reyes JA, Martínez JL. Opioid receptor modulation of mossy fiber synaptogenesis: independence from long-term potentiation. *Brain Res* 1997;751:330-335.

- Fernández DMF. 1998. Transmisión sináptica. En *Biología funcional de los animales*. Fanjul MI., Hiriart M y Fernández DMF, Eds:113-167. Siglo veintiuno:México.
- Frederickson CJ, Danscher G. Cine-containing neurons in hippocampus and related CNS structures. *Progr Brain Res* 1990; 83:71-84.
- Frotscher M. Target cell specificity of synaptic connections in the hippocampus. *Hippocampus* 1991;1:123-130.
- Gaarskjaer FB. Organization of the mossy fiber system of the rat studied in extended hippocampi. I. terminal area related to number of granule and pyramidal cells. *J Comp Neurol* 1978;178:49-72.
- Gaarskjaer FB. The organization and development of the hippocampal mossy fiber system. *Brain Res Rev* 1986;11:335-357.
- Gaiarsa JL, Beaudoin M, Ben-Ari Y. Effect of neonatal degranulation on the morphological development of rat CA3 pyramidal neurons: Inductive role of mossy fibers on the formation of thorny excrescences. *J Comp Neurol* 1992;321:612-625.
- Galler JR, Tonkiss J. Prenatal protein malnutrition and maternal behavior in Sprague-Dawley rats. *J Nutr* 1991;121:762-769.
- García-Ruiz M, Díaz-Cintra S, Cintra L, Corkidi G. Effect of protein malnutrition on CA3 hippocampal pyramidal cells in rats of three ages. *Brain Res* 1993;625:203-212.
- Geinisman Y, de Toledo-Morrell L, Morrell F. Aged rats need a preserved complement of perforated axospinous synapses per hippocampal neuron to maintain good spatial memory. *Brain Res* 1986;398:266-275.
- Geinisman Y, de Toledo-Morrell L, Morrell F. Induction of long-term potentiation is associated with an increase in the number of axospinous synapse with segmented postsynaptic densities. *Brain Res* 1991;566:77-88.
- Geinisman Y, Morrell F, de Toledo-Morrell L. Increase in the number of axospinous synapses with segmented postsynaptic densities following hippocampal kindling. *Brain Res* 1992;569:341-347.
- Geinisman Y, Gundersen HG, Vanderzee E, West MJ. Unbiased stereological estimation of the total number of synapses in a brain region. *J Neurocytol* 1996;25:805-819.
- Gould E, Woolley CS, McEwen BS. Short-term glucocorticoid manipulations affect neuronal morphology and survival in the adult dentate gyrus. *Neuroscience* 1990;37:367-375.
- Granados L, Cintra L, Aguilar A, Corkidi G, Kemper T, Morgane P, Díaz-Cintra S. Mossy fibers of the hippocampal formation in prenatal malnourished rats. *Bol Estud Med Biol Mex* 1995;43:3-11.
- Griffith WH, Brown TH, Johnston D. Voltage-clamp analysis of synaptic inhibition during long-term potentiation in hippocampus. *J Neurophysiol* 1986;55:767-775.



Gundersen HJG. Stereology of arbitrary particles. A review of unbiased number and size estimators and the presentation of some new ones, in memory of William R Thompson. *J Microsc* 1986;143:3-45.

Gundersen HJG, Jensen EB. The efficiency of systematic sampling in stereology and its prediction. *J Microsc* 1987;147:229-263.

Harris EW, Cotman CW. Long-term potentiation of guinea pig mossy fiber responses is not blocked by N-methyl-D-aspartate antagonists. *Neurosci Lett* 1986;70:132-137.

Haug EMS. Electron microscopical localization of the cine in hippocampal mossy fibre synapses by a modified sulfide silver procedure. *Histochemie* 1967;8:355-368.

Hauser KF, McLaughlin PJ, Zagon IS. Endogenous opioid systems and the regulation of dendritic growth and spine formation. *J Comp Neurol* 1989;281:13-22.

Heit G, Smith M, Halgren E. Neural encoding of individual words and faces by the human hippocampus and amygdala. *Nature* 1988;333:773-775.

Hirsch R. The hippocampus, condition operations, and cognition. *Physiol Psychol* 1980;8:175-182.

Hoff SF. Lesion-induced transneuronal plasticity in the adult rat hippocampus. *Neuroscience* 1986;19:1227-1233.

Hoffman DW, Zamir N. Localization and quantitation of dynorphin B in the rat hippocampus. *Brain Res* 1984;324:354-357.

Hopkins WF, Johnston D. Noradrenergic enhancement of long-term potentiation at mossy fiber synapses in the hippocampus. *J Neurophysiol* 1988;59:667-687.

Horn G, Bradley P, McCabe BJ. Changes in the structure of synapses associated with learning. *J Neurosci* 1985;5:3161-3168.

Huntley FW, Benson DI. Neural (N)-cadherin at developing thalamocortical synapses provide an adhesion mechanism for the formation of somatotopically organized connections. *J Comp Neurol* 1999;407:453-471.

Jacobson M. 1993. *Developmental Neurobiology*. pp 776. Plenum Press:New York.

Janigro D, Schwartzkroin PA. Effects of GABA on CA3 pyramidal cell dendrites in rabbit hippocampal slices. *Brain Res* 1988;453:265-274.

Johnston D, Brown TH. Giant synaptic potential hypothesis for epileptiform activity. *Science* 1981;211:294-297.

Jordan TC, Cane SE, Howells KF. Deficits in spatial memory performance induced by early undernutrition. *Dev Psychobiol* 1981;14:317-325.

- Kandel ER, Schwartz TM, Jessell M. 1991. Principles of Neuronal Science. pp 1135. Appleton y Lange:Connecticut.
- Katz HB, Davies CA, Dobbing J. Effects of undernutrition at different ages early in life and later environmental complexity on parameters of the cerebrum and hippocampus in rats. J Nutr 1982;112:1362-1368.
- Köhler C. Intrinsic connections of the retrohippocampal region in the rat brain. II. The medial entorhinal area. J Comp Neurol 1986;246:149-169.
- Korsching S. The neurotrophic factor concept: A reexamination. J Neurosci 1993;13:2739-2748.
- Laatsch RH, Cowan WM. Electron microscopic studies of the dentate gyrus of the rat. I. Normal structure with special reference to synaptic organization. J Comp Neurol 1966;128:359-396.
- Laurberg S, Sorensen KE. Associational and commissural collaterals of neurons in the hippocampal formation (hilus, fasciae dentatae and subfield CA3). Brain Res 1981;212:287-300.
- Lauterborn JC, Tran TMD, Isackson PJ, Gall CM. Nerve growth factor mRNA is expressed by GABAergic neurons in rat hippocampus. NeuroReport 1993;5:273-276.
- Lee KS, Schottler F, Oliver M, Lynch G. Brief trends of high-frequency stimulation produce two types of synaptic change in rat hippocampus. J Neurophysiol 1980;44:216-218.
- Lewis PD, Balázs R, Patel AJ, Johnson AL. The effect of undernutrition in early life on cell generation in the rat brain. Brain Res 1975;83:235-247.
- Lewis PD, Patel AJ, Balázs R. Effect of undernutrition on cell generation in the rat hippocampus. Brain Res 1979;168:186-189.
- Li XG, Somogyi P, Ylinen A, Buzsáki. The hippocampal CA3 network: an *in vivo* intracellular labeling study. J Comp Neurol 1994;339:181-208.
- Lingas R, Dean F, Matthews. Maternal nutrient restriction (48 h) modifies brain corticosteroid receptor expression and endocrine function in the fetal guinea pig. Brain Res 1999;846:236-242.
- Lorente de Nó, R. Studies on the structure of the cerebral cortex. II continuation of the study of the ammonic system. J Psychol Neurol 1934;46:113-177.
- Loughlin SA, Fallon JH. 1993. Neurotrophic Factors. pp 250. Academic Press:San Diego.
- Loy R, Koziell DA, Lindsey JD, Moore RY. Noradrenergic innervation of the adult rat hippocampal formation. J Comp Neurol 1980;189:699-710.
- Madeira MD, Cadete-Leite A, Andrade JP, Paula-Barbosa MM. Effects of hypothyroidism upon the granular layer of the dentate gyrus in male and female adults rats: a morphometric study. J Comp Neurol 1991;314:171-186.

Madeira MD, Sousa N, Lima-Andrade MT, Calheiros F, Cadete-Leite A, Paula-Barbosa MM. Selective vulnerability of the hippocampal pyramidal neurons to hypothyroidism in male and female rats. *J Comp Neurol* 1992;322:501-518.

Matsukawa M, Ogawa M, Nakadate K, Maeshima T, Ichitani Y, Kawai N, Okado N. Serotonin and acetylcholine are crucial to maintain hippocampal synapses and memory acquisition in rats. *Neurosci Lett* 1997;230:13-16.

Mazer C, Muneyyirci J, Tahhony K, Raio N, Borella A, Whitaker-Azmitia P. Serotonin depletion during synaptogenesis leads to decreased synaptic density and learning deficits in the adult rat: a possible model of neurodevelopment disorders with cognitive deficits. *Brain Res* 1997;760:68-73.

McGinty JF, Henriksen SJ, Goldstein A, Terenius L, Bloom FE. Dynorphin is contained within hippocampal mossy fibers: Immunochemical alterations after kainic acid administration and colchicine-induced neurotoxicity. *Proc Natl Acad Sci* 1983;80:589-593.

Meriney SD, Ford MJ, Oliva D, Pilar G. Endogenous opioids modulate neuronal survival in the developing avian ciliary ganglion. *J Neurosci* 1991;11:3705-3717.

Michel RP, Cruz-Orive LM. Application of the Cavalieri principle and vertical sections method to lung: estimation of volume and pleural surface area. *J Microsc* 1988;150:117-136.

Miles R, Wong RKS. Unitary inhibitory synaptic potentials in the guinea-pig hippocampus in vitro. *J Physiol* 1984;356:97-113.

Miles R, Wong RKS. Excitatory synaptic interactions between CA3 neurones in the guinea-pig hippocampus. *J Physiol* 1986;373:397-418.

Miles R, Wong RKS. Inhibitory control of local excitatory circuits in the guinea-pig hippocampus. *J Physiol* 1987;388:611-629.

Moore RY, Bloom FE. Central catecholamine neuron systems: Anatomy and physiology of the norepinephrine and epinephrine systems. *Ann Rev Neurosci* 1979;2:113-168.

Morgane PJ, Austin KB, Palmer SJ, Austin La-France RJ, Bronzino JD. Prenatal protein malnutrition results in the loss of behavior-mediated theta frequency shifting. *Soc Neurosci Abstr* 1990;16:35.

Morgane PJ, Austin La-France RJ, Bronzino JD. Impact of prenatal protein malnutrition on long-term potentiation in juvenile rats. *Soc Neurosci Abstr* 1992;18:1301.

Morgane PJ, Austin-LaFrance R, Bronzino J, Tonkiss J, Diaz-Cintra S, Cintra L, Kemper T, Galler JR. Prenatal malnutrition and development of the brain. *Neurosci Biobehav Rev* 1993;17:91-128.

Moser M, Trommald M, Andersen P. An increase in dendritic spine density on hippocampal CA1 pyramidal cells following spatial learning in adult rats suggest the formation of new synapses. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:12673-12675.

Muaku SM, Beauloye V, Thissen JP, Underwood LE, Ketelslegers JM, Maiter D. Effects of maternal protein malnutrition on fetal growth, plasma insuline-like growth factors, insuline-like growth factor binding proteins, and liver insulin-like growth factor gene expression in the rat. *Pediat Res* 1995a;37:334-342.

Muaku SM, Underwood LE, Selvais PI, Ketelslegers JM, Maiter D. Maternal protein restriction early or late in rat pregnancy has differential effects on fetal growth, plasma insuline-like growth factor-I (IGF-I) and liver IGF-I gene expression. *Growth Regulat* 1995b;5:125-132.

Niquet J, Jorquera I, Ben-Ari Y, Represa A. NCAM immunoreactivity on mossy fibers and reactive astrocytes in the hippocampus of epileptic rats. *Brain Res* 1993; 626:106-116.

Olton DS, Walker JA, Gage FH. Hippocampal connections and spatial discrimination. *Brain Res* 1978;139:295-308.

Olton DS. 1989. Mnemonic functions of the hippocampus: single unit analyses in rats. In: *The Hippocampus*. New Vistas. Chan-Palay V, Köhler C, Eds:411-424. Liss AR, Inc: New York.

Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. 1985. El hambre en el mundo. pp 22. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación: Roma.

Pérez-Navarro E, Alberch J, Arenas E, Marsal J. Nerve growth factor and its receptor are differentially modified by chronic naltrexone treatment during rat brain development. *Neurosci Lett* 1993;149:47-50.

Peters A, Palay SL, Webster HF. 1976. The fine structure of the Nervous System. pp 406. WB Saunders Company:Philladelphia.

Peters A, Kaiserman-Abramof. The small pyramidal neuron of the rat cerebral cortex. The perikaryon, dendrites and spines. *J Anat* 1970;127:321-355.

Petukhov VV, Popov VI. Quantitative analysis of ultrastructural changes in synapses of the rat hippocampal field CA3 *in vitro* in different functional states. *Neuroscience* 1986;18:823-835.

Rami A, Rabić A. Delayed synaptogenesis in the dentate gyrus of the thyroid-deficient developing rat. *Dev Neurosci* 1990;12:398-405.

Ramírez-Amaya V, Escobar ML, Chao V, Bermúdez-Rattoni. Synaptogenesis of mossy fibers induced by spatial water maze overtraining. *Hippocampus* 1999;9:631-636.

Ramón y Cajal S. 1899. *Histología del sistema nervioso del hombre y de los vertebrados*. pp 1209. Moya:Madrid.

Rapp PR, Stack EC, Gallagher M. Morphometric studies of the aged hippocampus: I. Volumetric analysis in behaviorally characterized rats. *J Comp Neurol* 1999;403:459-470.

Reis MAB, Carneiro EM, Mello MAR, Boschero AC, Saad MJA, Velloso LA. Glucose-induced insulin secretion is impaired and insulin-induced phosphorylation of the insulin receptor and insulin receptor substrate-1 are increased in protein-deficient rats. *J Nutr* 1996;127:403-410.

Represa A, Dessi F, Beaudoin M, Ben-Ari Y. Effects of neonatal  $\gamma$ -ray irradiation on rat hippocampus. I. Postnatal maturation of hippocampal cells. *Neuroscience* 1991;42:137-150.

Represa A, Ben-Ari Y. Kindling is associated with the formation of novel mossy fibre synapses in the CA3 region. *Exp Brain Res* 1992;92:69-78.

Robles S. Efectos de diferentes tipos de malnutrición sobre los tiempos de especificación de la corteza somatosensorial en la rata. Tesis de licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México. Querétaro, México. 2000.

Rolls ET. A theory of hippocampal function in memory. *Hippocampus* 1996;6:601-620.

Rose S. How chicks make memories: The cellular cascade from c-fos to dendritic remodelling. *Trends Neurosci* 1991;14:390-397.

Rovira C, Ben-Ari Y, Cherubini E. Dual cholinergic modulation of hippocampal somatic and dendritic field potentials by the septo-hippocampal pathway. *Exp Brain Res* 1983;49:151-155.

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

Shankaranarayana Rao BS, Raju TR, Meti BL. Increased numerical density of synapses in CA3 region of hippocampus and molecular layer of motor cortex after self-stimulation rewarding experience. *Neuroscience* 1999;91:799-803.

Sapolsky RM. Glucocorticoids and hippocampal damage. *TINS* 1987;10:346-349.

Sandler R, Smith DA. Coexistence of GABA and glutamate in mossy fiber terminals of the primate hippocampus: An ultrastructural study. *J Comp Neurol* 1991;303:177-192.

Soto-Moyano R, Alarcon S, Hernández A, Pérez H, Ruiz S, Carreño P, Kusch C, Belmar J. Prenatal malnutrition-induced functional alterations in callosal connections and in interhemispheric asymmetry in rats are prevented by reduction of noradrenaline synthesis during gestation. *J Nutr* 1998;128:1224-1231.

Speakman A, O'Keefe J. 1989. Hippocampal place cells and hippocampal Theories. En: *The Hippocampus*. New Vistas. Chan-Palay V, Köhler C. Eds:425-441. Liss AR, Inc: New York.

Squire L. Memory and the hippocampus: a synthesis from findings with rats, monkeys, and human. *Psychol Rev* 1992;99:195-231.

Stelzer A, Wong RKS. GABA<sub>A</sub> responses in hippocampal neurons are potentiated by glutamate. *Nature* 1989;337:170-173.

Sterio DC. The unbiased estimation of number and sizes of arbitrary particles using the disector. *J Microsc* 1984;134:127-136.

Steward O. Topographic organization of the projections from the entorhinal area to the hippocampal formation of the rat. *J Comp Neurol* 1976;167:285-314.

Steward O. Alterations in polyribosomes associated with dendritic spines during the reinnervation of the dentate gyrus of the adult rat. *J Neurosci* 1983;3:177-188.

Steward O, Falk PM. Protein-synthetic machinery at post-synaptic site during synaptogenesis: A quantitative study of the association between polyribosomes and developing synapses. *J Neurosci* 1986;6:412-423.

Steward O. Regulation of synaptogenesis through the local synthesis of proteins at the postsynaptic site. *Prog Brain Res* 1987;71:267-279.

Steward O. Ultrastructural basis for gene expression at the synapse: synapse-associated polyribosome complexes. *J Neurocytol* 1996;25:717-734.

Storm-Mathisen J. Localization of transmitter candidates in the brain: the hippocampal formation as a model. *Prog Neurobiol* 1977;8:119-181.

Storm-Mathisen J, Leknes AK, Bore AT, Vaaland JL, Edminson P, Haug FMS, Ottersen OP. First visualization of glutamate and GABA in neurons by immunocytochemistry. *Nature* 1983;301:517-520.

Struble RG, Desmond NL, Levy LB. Anatomical evidence for interlamellar inhibition in the fascia dentata. *Brain Res* 1978;152:580-585.

Swanson LW, Cowan WM. An autoradiographic study of the organization of the efferent connections of the hippocampal formation in the rat. *J Comp Neurol* 1977;172:49-84.

Swanson LW, Wyss JM, Cowan WM. An autoradiographic study of the organization of intrahippocampal association pathways in the rat. *J Comp Neurol* 1978;181:681-716.

Swanson LW. 1983. The hippocampus and the concept of the limbic system. En: *Neurobiology of the Hippocampus*. Seifert W, Ed:3-19. Academic Press: London.

Tarrats-Z.M. Nutrición y enfermedad de Parkinson. *Arch Neurocién (Mex)* 1999;4:139-146.

Terrian DM, Johnston D, Clairborne BJ, Ansah-Yiadom R, Strittmatter WJ, Rea MA. Glutamate and dynorphin release from a subcellular fraction enriched in hippocampal mossy fiber synaptosomes. *Brain Res Bull* 1988;21:343-351.

Terrian DM, Hernández PG, Rea MA, Peters RI. ATP release, adenosine formation, and modulation of dynorphin and glutamic acid release by adenosine analogues in rat hippocampal mossy fiber synaptosomes. *J Neurochem* 1989;53:1390-1399.

Terrian DM, Gannon RL, Rea MA. Glutamate is the endogenous amino acid selectively released by rat hippocampal mossy fiber synaptosomes concomitantly with prodynorphin-derived peptides. *Neurochem Res* 1990;15:1-5.

- Thoenen H. The changing scene of neurotrophic factors. *Trends Neurosci* 1991;14:165-170.
- Tonkiss J, Galler JR. Prenatal protein malnutrition and working memory performance in adult rats. *Behav Brain Res* 1990;40:95-107.
- Tonkiss J, Galler JR, Formica RN, Shukitt-Hale B, Timm RR. Fetal Protein malnutrition impairs acquisition of a DRL task in adult rats. *Physiol Behav* 1990;48:73-77.
- Tonkiss J, Galler JR, Shukitt-Hale B, Rocco FJ. Prenatal protein malnutrition impairs visual discrimination learning in adult rats. *Psychobiol* 1991;19:247-250.
- Tonkiss J, Galler J, Morgane PJ, Bronzino JD, Austin-LaFrance J. 1993. Prenatal protein malnutrition and postnatal brain function. En: *Maternal nutrition and pregnancy outcome*. Keen CL, Bendich A, Willhite CC, Eds:215-227. *Annals of the New York Academy of Sciences*. New York.
- Van der Zee CEEM, Rashid K, Le K, Moore KA, Stanis J, Diamond J, Racine RJ, Fahnstock M. Intraventricular administration of antibodies to nerve growth factor retards kindling and blocks mossy fiber sprouting in adult rats. *J Neurosci* 1995;15:5316-5323.
- Van Reempts J, Dikova M, Werbrouck L, Clineke G, Borgers M. Synaptic plasticity in rat hippocampus associated with learning. *Behav Brain Res* 1992;51:179-183.
- Vanderwolf CH, Kramis R, Gillespie LA, Bland BH. 1975. Hippocampal rhythmic slow activity and neocortical low voltage fast activity: Relations to behaviour. En: *The hippocampus*. Isaacson RL, Pribram KL, Eds: 102-128. *Plenum Press*: New York.
- Vertes RP. Brain stem generation of the hippocampal EEG. *Prog Neurobiol* 1982;19:159-186.
- Vinogradova OS. Expression, control, and probable functional significance of the neuronal theta-rhythm. *Prog Neurobiol* 1995;45:523-583.
- Weeks ACW, Ivanko TL, LeBoutillier JC, Racine RJ, Petit TL. The degree of potentiation is associated with synaptic number during the maintenance of long-term potentiation in the rat dentate gyrus. *Brain Res* 1998; 798:211-216.
- Weiland NG, Orikasa C, Hayashi S, McEwen BS. Distribution and hormone regulation of estrogen receptor immunoreactive cells in the hippocampus of male and female rats. *J Comp Neurol* 1997 ;388 :603-612.
- West JR, Dewey SI.. Mossy fiber sprouting in the fascia dentata after unilateral entorhinal lesions: quantitative analysis using computer-assisted image processing. *Neuroscience* 1984;13:377-384.
- West JR, Hodges-Savola CA. Permanent hippocampal mossy fiber hyperdevelopment following prenatal ethanol exposure. *Neurobehav Toxicol Teratol* 1983;5:139-150.
- West JR, Hodges CA, Black AC Jr. Distal infrapyramidal granule cell axons possess typical mossy fiber morphology. *Brain Res Bull* 1981;6:119-124.

Winson J. Hippocampal theta rhythm. II. Depth profiles in the freely moving rabbit. *Brain Res* 1976;103:71-79.

Winson J, Abzug C. Neuronal transmission through hippocampal pathways dependent on behavior. *J Neurophysiol* 1978;41:716-732.

Yokogoshi H, Hayase K, Yoshida A. The quality and quantity of dietary protein affect brain protein synthesis in rats. *J Nutr* 1992;122:2210-2217.



# Effects of Prenatal Protein Malnutrition on Mossy Fibers of the Hippocampal Formation in Rats of Four Age Groups

León Cintra,<sup>1</sup> Leticia Granados,<sup>2</sup> Azucena Aguilar,<sup>1</sup> Thomas Kemper,<sup>3\*</sup> William DeBassio,<sup>3</sup> Janina Galler,<sup>4</sup> Peter Morgane,<sup>4,5</sup> Pilar Durán,<sup>1</sup> and Sofía Díaz-Cintra<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Centro de Neurobiología, UNAM, Ciudad Universitaria, México, D.F. México

<sup>2</sup>Unidad de Investigación en Salud Infantil del Instituto Nacional de Pediatría, SSA, D.F. México

<sup>3</sup>Neurological Unit, Boston City Hospital, Boston, Massachusetts

<sup>4</sup>Center for Behavioral Development and Mental Retardation, Boston University School of Medicine, Boston, Massachusetts

<sup>5</sup>University of New England, Biddeford, Maine

**ABSTRACT:** The present study was undertaken to investigate the effect of prenatal protein deprivation on the postnatal development of the mossy fiber plexus of the hippocampal formation on postnatal (P) days 15, 30, 90, and 220. Although there is extensive information about the effects of malnutrition on cell body and dendrite morphology, little attention has been paid to axons or axon plexuses. The mossy fiber plexus represents the dentate gyrus granule cell axonal projection to areas CA4 and CA3 of the hippocampal formation and is readily demonstrated with Timm's heavy metal stain. With the use of this stain, the plexus was measured at 13 levels throughout the hippocampal complex. There was no effect of the diet on the anatomical distribution of the plexus. The current study, however, does show significant effects of prenatal protein malnutrition on postnatal development of the mossy fiber plexus that are age dependent. The prenatally malnourished rats show significant deficits in the total rostro-caudal extent and volume of the plexus on P15, P90, and P220, with the most marked dietary effect on P220. There was no significant diet effect on P30 in either extent or volume. *Hippocampus* 7:184-191, 1997. © 1997 Wiley-Liss, Inc.

**KEY WORDS:** morphometric Timm study; dentate gyrus; dentate granule cells; computer-assisted image analysis

## INTRODUCTION

Nutritional deprivation has produced marked effects on the anatomical development of the hippocampal formation (Fish and Winick, 1969;

Stewart et al., 1974; West and Kemper, 1976; Morgane et al., 1978, 1992, 1993; Lewis et al., 1979; Katz and Davies, 1982, 1983; Katz et al., 1982; Ahmed et al., 1987; Paula-Barbosa et al., 1989; Cintra et al., 1990, 1997; Andrade et al., 1991; Díaz-Cintra et al., 1991, 1994; Bedi, 1991; García-Ruiz et al., 1993; DeBassio et al., 1994, 1996), with several of these studies emphasizing the importance of prenatal malnutrition on the postnatal development of the hippocampal formation. In rats provided one-half their usual food intake from E6 until sacrifice, Lewis et al. (1979) found the cell cycle time of dentate gyrus granule cell neuroblasts was prolonged on postnatal days 1, 6, and 12. In the same paradigm of prenatal protein deprivation used in the current study, DeBassio et al. (1994) found a decreased prenatal neurogenesis of dentate granule cells in the hippocampal formation. Katz and Davies (1983) observed a significantly decreased width of the hippocampus only in rats in which undernutrition included the period of gestation. In morphometric Golgi studies of the granule cells in the dentate gyrus, Díaz-Cintra et al. (1991) found that the effect of prenatal protein restriction was similar to that noted by Cintra et al. (1990) for both pre- and postnatal protein deprivation. There were significant reductions in cell size, decreased number of synaptic spines throughout their dendritic extent, and reduced complexity of dendritic branching in the outer two-thirds of the molecular layer. With prenatal protein deprivation, Díaz-Cintra et al. (1994) found on CA3 pyramidal cells a significant diet effect on the density of synaptic spines and complexity of apical dendritic

Contract grant sponsor: NIH; Contract grant number HD-22539; Contract grant sponsor: DGAPA-UNAM; Contract grant numbers IN-202891, IN-204892, IN-204093, IN-208494, and IN-209195.

\*Correspondence to: Dr. Thomas Kemper, Neurological Unit, Boston City Hospital, 818 Harrison Avenue, Boston, MA 02118.

Accepted for publication 18 December 1996

waning; in a later paper (Cintra et al., 1997) these same investigators showed significant effects on CA1 hippocampal pyramidal cells as well.

The current study was undertaken to investigate the effect of prenatal protein malnutrition on the postnatal development of the mossy fiber plexus. This plexus, which is the dentate gyrus granule cell axonal projection to hippocampal areas CA4 and CA3, is readily demonstrated with the Timm's heavy metal stain. It is composed of thin, unmyelinated axons with giant terminal bouton swellings (Blackstad and Kjaerheim, 1961; Haug, 1967; West et al., 1982) that are rich in zinc (Haug, 1967; Danscher et al., 1976; Frederickson and Danscher, 1990). Several studies have shown that its distribution can be altered by a variety of insults including prenatal ethanol exposure (West and Hodges-Savola, 1983), postnatal ethanol exposure (West and Hamre, 1985), hyperthyroidism (Lauder and Mugnaini, 1980), and epilepsy (Sutula et al., 1989; Cavazos et al., 1991; Represa and Ben-Ari, 1992).

The present study is the last of four studies on the dentate gyrus granule cells using the same paradigm of prenatal protein deprivation. It extends previous information on the effect of prenatal malnutrition on an axonal plexus (Granados et al., 1995); to our knowledge, these are the only two studies that have explored the effect of malnutrition on an axonal plexus. Our prior studies with the same dietary paradigm demonstrated an effect of the low protein diet on neurogenesis of granule cells (DeBassio et al., 1994, 1996) and, at the same four ages used in the present study, on postnatal development of granule cell size, dendritic number, and synaptic spine density (Diaz-Cintra et al., 1991). The results of the present study will be analyzed in relationship to these and other studies.

## MATERIALS AND METHODS

Thirty female and ten male Sprague-Dawley VAF plus (virus and antibody free) rats were used for breeding. A more detailed description of the nutritional, mating, and fostering procedure is given in a previous article (Galler and Tonkiss, 1991). The female rats weighed between 175 and 200 g on arrival at 80–90 days of age. All rats were maintained under identical conditions of the light-dark cycle (12:12 h), temperature (22–24°C), and humidity (40–50%), with free access to food and water. Five weeks prior to breeding, 10 female rats were fed a 6% casein diet and 20 females a 25% casein diet. Males were placed on either a 6 or 25% casein diet 1 week prior to breeding with their respective diet-fed females. For breeding, one male rat was placed in a cage containing three females. Vaginal smears were obtained each morning to determine the onset of pregnancy. One week prior to expected parturition, all sperm-positive females were placed in nesting cages (48 × 27 × 16 cm) with adequate, clean nesting material. The pups from each diet group that were born the same day were weighed and sexed, with four males and four females fostered as whole litters to dams fed a 25% casein diet,

giving a total of ten litters of cross-fostered control and protein-deprived rats. The cross-fostered protein-deprived rats are referred to as the 6/25 diet group rats and the control as the 25/25 diet group rats. After weaning, the rats were housed in groups of four in same-sex colony cages.

At 15, 30, 90, and 220 days of age one male pup per litter was randomly selected from both diet groups for histological study. Eight pups per diet group were studied at each age, for a total of 64 pups in the control and experimental groups. The rats were anesthetized with pentobarbital, perfused through the heart with a solution containing 5.85 g of sodium sulfide and 5.95 g of monobasic sodium monohydrate in 500 ml of distilled water until the teeth were observed to be dark, followed by 1.0% (w/v) paraformaldehyde and 1.25% (v/v) glutaraldehyde in 0.1 M phosphate buffer (pH 7.4) (West and Hodges-Savola, 1983; West and Dewey, 1984). The brains were removed and post-fixed in the same mixed aldehyde fixative to which 30% sucrose (w/v) was added. They remained in this solution until they sank to the bottom of the container. The hippocampal formation was then blocked and cut in frozen section in the coronal plane. At every 240  $\mu$ m interval, three consecutive sections were cut at a thickness of 40  $\mu$ m. All sections were processed using a modification of Timm's sulfide silver technique according to the method of West et al. (1981) and West and Hodges-Savola (1983). Series 1 was Timm's stained alone, and series 2 and 3 were counter-stained with either cresyl violet or thionin stain to facilitate correlation with cytoarchitecture. Figure 1 shows examples of these stains. The Timm's stained section without counter-stain was used for the measurements of the mossy fiber plexus. Each slide was assigned a random number to ensure that the observations were blind with respect to diet and age.

From each histological section, the area of the mossy fiber plexus of the hippocampal formation was measured on one side of the brain with a computer-assisted imaging technique (Histo 2000). The main features of this system are that each microscopic field is stored in computer memory and that any analyzed field can be extended to include adjacent fields. The measurements are performed using a system of X, Y optoelectric sensors (Heidenhain VRS 720B) that are mounted on the microscope stage with an accuracy of 1  $\mu$ m. The extent of the mossy fiber plexus was delineated according to the method of West et al. (1978). For each animal comparable anatomical levels were selected from the total rostro-caudal extent of the hippocampal formation for analysis. The first level selected was 80  $\mu$ m from the rostral pole of the mossy fiber plexus. The distances between the next 12 levels are shown for each age and diet group in Table 1. In all brains the supra- and infrapyramidal blades of the dentate gyrus were continuous at levels 1–6, as shown in Figure 1A. The total volume of the mossy fiber plexus was calculated according to the formula of West et al. (1978).

Statistical analysis was performed using the Statistical Package for Social Studies (SPSS) version 3.3. The test used was a two-way ANOVA (Age × Diet). When a significant interaction effect was found, the post-hoc Tukey test was done. Statistical significance was accepted if  $P < 0.05$ .

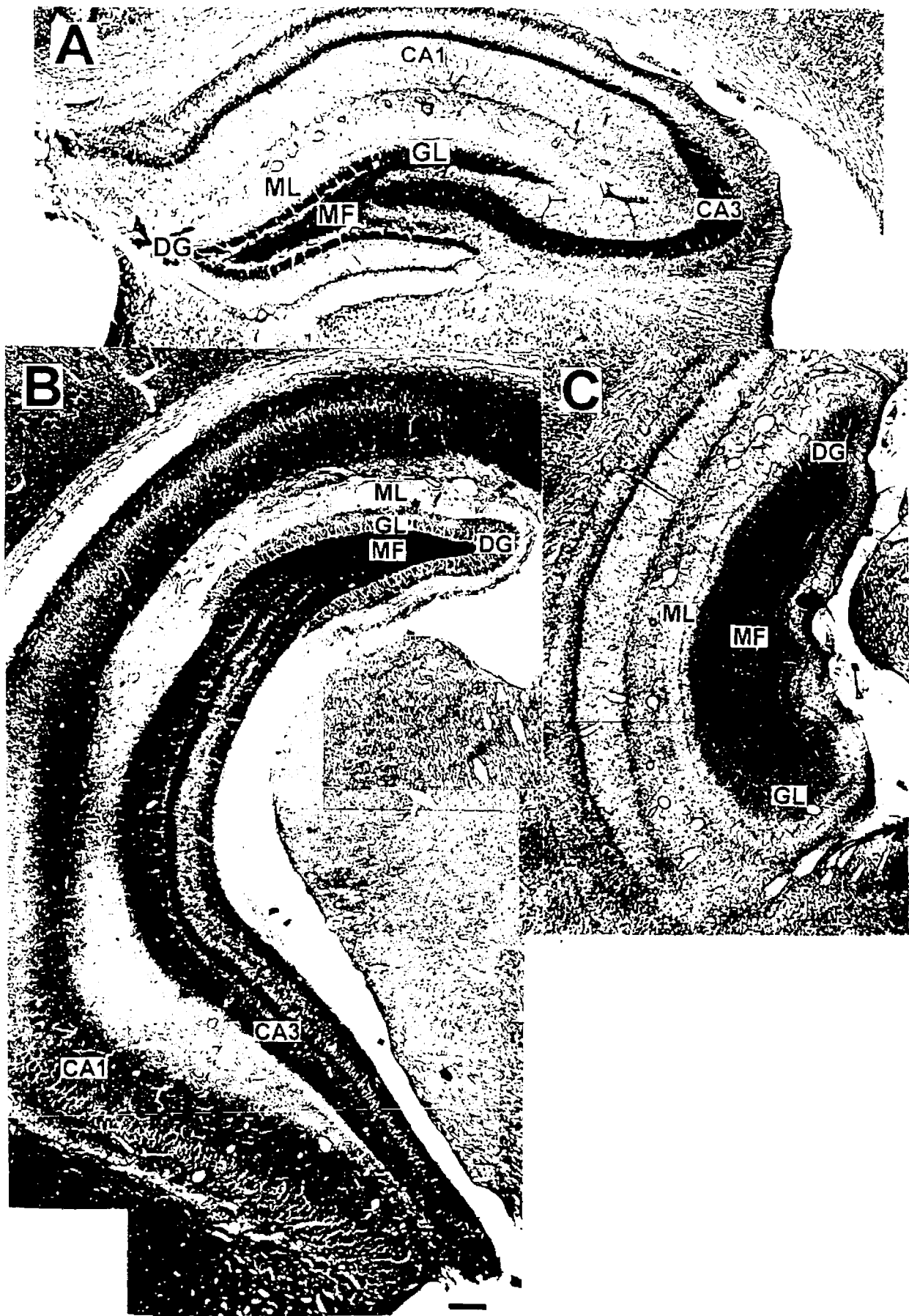


FIGURE 1. Examples of Timm's stained sections at three different levels in a control rat at 30 days of age. A: Section counterstained with thionin at level 4. B: Section at level 8 without counterstain. C:

Section counterstained with cresyl violet at level 11. DG, dentate gyrus; GL, granular layer; MF, mossy fiber plexus; ML, molecular layer. Bar = 360  $\mu$ m.

TABLE 1.

Distance ( $\mu\text{m}$ ) of Comparable Anatomical Levels From the Rostral Pole of the Hippocampus at Each Age<sup>1</sup>

Level	P15		P30		P90		P220	
	25/25	6/25	25/25	6/25	25/25	6/25	25/25	6/25
1	80	80	80	80	80	80	80	80
2	360	350	360	350	380	370	450	400
3	760	720	760	700	780	760	850	820
4	1,220	1,200	1,200	1,200	1,300	1,290	1,400	1,350
5	1,710	1,680	1,700	1,650	1,840	1,820	2,000	1,880
6	2,360	2,270	2,440	2,370	2,520	2,470	2,740	2,560
7	3,020	2,860	3,180	3,100	3,210	3,110	3,490	3,110
8	3,340	3,210	3,650	3,510	3,730	3,570	4,170	3,770
9	3,650	3,560	4,130	3,930	4,250	4,030	4,810	4,430
10	3,840	3,760	4,280	4,130	4,570	4,420	5,220	4,830
11	4,040	3,840	4,420	4,330	4,900	4,820	5,660	5,270
12	4,180	3,880	4,670	4,470	5,290	4,870	6,150	5,570
13	4,250	3,920	4,840	4,540	5,450	4,930	6,540	5,970
Total extent	4,330	3,960	4,920	4,620	5,690	5,010	6,840	6,030

<sup>1</sup>Each data point is the mean of the eight animals.

**RESULTS**

The results of the ANOVA are shown in Table 2 and age-related changes in Tables 3 and 4. Comparisons between the two diet groups at each age are shown in Figure 2, with significant differences between the two diet groups indicated by an asterisk.

With this dietary model at the ages studied in this experiment, there were no significant effects of the prenatal low protein diet on brain or body weight at 15, 30, 90, and 220 days of age (Cintra et al., 1997).

The distribution pattern of the mossy fiber plexus was not affected by the diet. The two-way ANOVA showed significant age

( $P < 0.001$ ), diet ( $P < 0.001$ ), and interaction effects ( $P < 0.01$ ) on the rostro-caudal extent of the mossy fiber plexus, and significant age ( $P < 0.001$ ), diet ( $P < 0.001$ ), and interaction effects ( $P < 0.001$ ) on the volume of the mossy fibers plexus (Table 2). The rostro-caudal extent of the mossy fiber plexus in 25/25 and 6/25 groups increased significantly from P15 to P30 ( $P < 0.05$ ), from P15 to P90 ( $P < 0.05$ ) and from P15 to P220 ( $P < 0.05$ ), as well as from P30 to P90 ( $P < 0.05$ ) and from P30 to P220 ( $P < 0.05$ ) and from P90 to P220 ( $P < 0.05$ ) (Table 3). The 6/25 rats showed a significant reduction in the rostro-caudal extent of the mossy fiber plexus compared with the 25/25 rats on P15 by 6% ( $P < 0.05$ ), on P90 by 12% ( $P < 0.05$ ), and on P220 by 12% ( $P < 0.05$ ), with no significant change noted on P30 (Fig. 2).

TABLE 2.

Analysis of the Mossy Fiber Plexus Rostro-Caudal Extent and Volume<sup>1</sup>

	F value		
	Diet (df <sup>2</sup> 1,56)	Age (df 3,56)	Interactions (df 3,56)
Extent	101.1***	326.0***	5.0**
Volume	205.5***	1802.7***	184.7***

<sup>1</sup>Two-way ANOVA with Diet and Age.

df, degrees of freedom

\*\* $P \leq 0.01$ .

\*\*\* $P \leq 0.001$

TABLE 3.

Age-Related Changes (%) in Rostro-Caudal Extent of the Mossy Fiber Plexus<sup>1</sup>

	P15 vs.		P30 vs.		P90 vs.
	P30	P90	P90	P220	P220
	+13.6*	+31.3*	+15.6* <sup>2</sup>	+38.9*	-20.1*
	+16.6*	+26.5*	-8.4* <sup>3</sup>	+30.6*	-20.4*

<sup>1</sup>ANOVA post hoc Tukey analysis

<sup>2</sup>25/25 diet group.

<sup>3</sup>6/25 diet group.

\* $P \leq 0.05$ .

TABLE 4. Age-Related Changes (%) in Volume of the Mossy Fiber Plexus<sup>1</sup>

	P15 vs.		P30 vs.		P90 vs.
	P90	P220	P90	P220	P220
25/25 diet group	-114.2*	-292.8*	+33.3* <sup>2</sup>	+83.3*	+37.5*
6/25 diet group	-180*	-270*	+25.0* <sup>3</sup>	-32.1*	+5.7

<sup>1</sup>ANOVA post hoc Tukey analysis

<sup>2</sup>25/25 diet group

<sup>3</sup>6/25 diet group

\* $P \leq 0.05$

The volume of the mossy fiber plexus in 25/25 and 6/25 diet groups increased significantly from P15 to P30 ( $P < 0.05$ ), from P15 to P90 ( $P < 0.05$ ), and from P15 to P220 ( $P < 0.05$ ), as well as from P30 to P90 ( $P < 0.05$ ) and from P30 to P220 ( $P < 0.05$ ) (Table 4). In the 25/25 rats the volume of the mossy fiber plexus continued to increase significantly from P90 to P220, whereas in the 6/25 animals there was no significant increase between these two time periods (Table 4). The 6/25 rats showed a significant reduction in the volume of the mossy fiber plexus compared with the 25/25 rats on P15 by 28% ( $P < 0.05$ ), on P90 by 13% ( $P < 0.05$ ), and on P220 by 33% ( $P < 0.05$ ), with no significant diet effect on P30 (Fig. 2).

## DISCUSSION

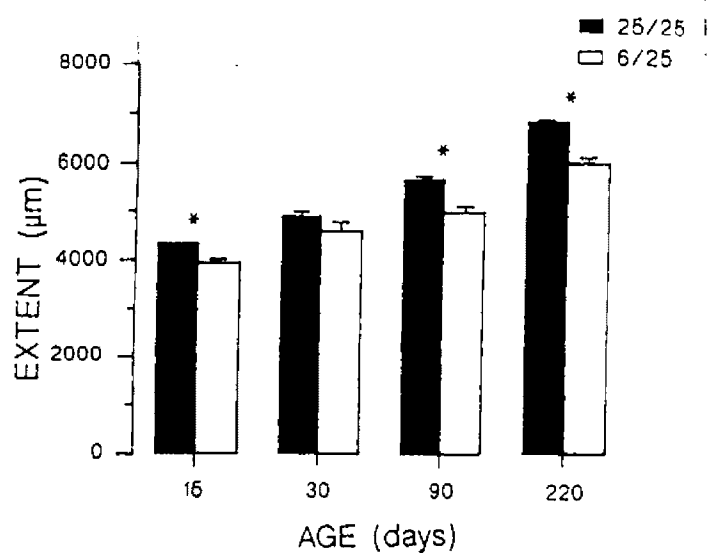
In normal development, the mossy fiber plexus is first identified in the dentate gyrus with both the Golgi stain (Amaral and Dent, 1981) and with the Timm's stain (Zimmer, 1978) on P1; with the Golgi stain, mossy fibers are first noted in the stratum lucidum of area CA3 on P3 (Amaral and Dent, 1981). According to Zimmer (1978) and Zimmer and Haug (1978), the mossy fiber plexus appears to be fully mature in Timm's stained sections on P18. Amaral and Dent (1981) and Coleman et al. (1987), however, have noted that the Timm's stained plexus continues to increase in size into adulthood. The results of the present study are consistent with this continued increase in size of the plexus. Both the 25/25 and 6/25 rats showed a significant, progressive age-related increase in total extent and volume of the mossy fiber plexus from P15 to P220.

The prenatally malnourished rats showed significant deficits in the total surface extent and volume of the mossy fiber plexus on P15, P90, and P220. The lack of a deficit in the volume and extent of the plexus on P30 was associated with a significant age-related increase in the rostro-caudal extent and volume of the plexus from P15 to P30 in both diet groups that was greater in magnitude in the prenatally malnourished rats. From P30 to P220, the age-related increase in extent and volume of the plexus was now greater in magnitude in the control rats with resultant

significant deficits in the size of the plexus in the malnourished rats on P90 and P220 (most marked on P220).

The mossy fiber plexus is composed of the axons of the hippocampal granule cells. In normally nourished rats only 15% of granule cell neurogenesis occurs prenatally, with the majority of the cells generated within the first 2 postnatal weeks, followed by a persistent neurogenesis at lower levels throughout the life span of

## ROSTRO-CAUDAL EXTENT



## VOLUME

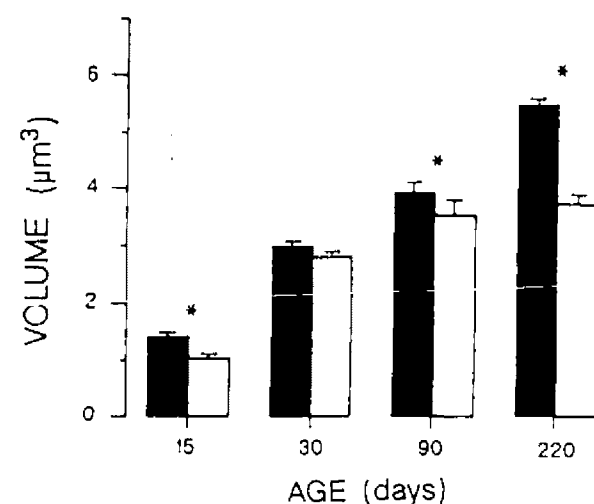


FIGURE 2. Bar graphs showing the effect of the low protein diet at each age on the rostro-caudal extent and volume of the mossy fiber plexus. Significant differences between the two diet groups at each age are indicated by an asterisk. \* $P < 0.05$ .

the animal (Altman and Das, 1965; Bayer and Altman, 1974; Schlessinger et al., 1975; Bayer, 1980a,b; Bayer et al., 1982). One explanation for the lack of a diet effect on the extent and volume of the mossy fiber plexus in the malnourished rats on P30 could be enhanced postnatal neurogenesis of dentate granule cells in the malnourished rats. This appears to be the case. DeBassio et al. (1994, 1996) have shown, with the present dietary paradigm of prenatal malnutrition, that granule cell neurogenesis is delayed on E20 and P8, is unaffected by P15, and by P30, the last injection time, it is increased in the prenatally malnourished animals. An explanation for the later diet effect on the size of the mossy fiber plexus seen on P90 and P220 is more difficult. Bedi (1991) estimated the total number of cells in the dentate gyrus at P70 and P212 in rats provided either 40 or 60% of their usual diet from E16 to P30. The number of granule cells was decreased in the malnourished rats at P212, but not at P70, suggesting that in the malnourished rats there is either an enhanced programmed cell death or decreased rate of neurogenesis at later stages of development.

With the same dietary paradigm used in the present study, the effect of prenatal malnutrition on the dendrites of the fascia dentata granule cell was also studied on P15, P30, P90, and P220 by Diaz-Cintra et al. (1991). The granule cells in the malnourished rats showed a deficit in the number of dendrites intersecting concentric circles that was confined to the outer two-thirds of the molecular layer. Like the effect of the diet on the size of mossy fiber plexus, this deficit was least in the malnourished rats on P30, with the most marked effect on P90 and P220. Also in agreement with the effect of the diet on the size of the mossy fiber plexus, the deficit in the number of dendritic intersections was greater on P220 than on P90 for the majority of the intersections. A deficit in synaptic spines on these granule cell dendrites was present at all ages, but was less marked on P90, rather than on P30. This "catchup" development in these dendritic measures may also be associated with the enhanced late postnatal generation of granule cells in the prenatally malnourished rats. When viewed in this way, the enhanced late postnatal neurogenesis of fascia dentata granule cells appears to play a significant role in the postnatal adaptation of these cells to prenatal malnutrition. The postnatal ages with the least diet effect, P30 to P90, correspond to the early reproductive life of the rat. The enhanced postnatal neurogenesis of granule cells may thus be a mechanism for providing as nearly normal a neuronal substrate as possible during this time. It is also of interest to note that these cells are generated primarily during the postnatal period and are thus a mechanism of adaptation that occurs after the insult. This suggests that the insult is important for the implementation of this adaptive program and that it is not necessary for the insult to be present during the time of its execution. Furthermore, it appears that this adaptive mechanism may occur at the "expense" of later stages of granule cell development, as the deficits that were noted in the malnourished rats on P90 were frequently more marked on P220.

It is also interesting to note that the effect of prenatal protein deprivation on the granule cells of the fascia dentata is more marked than that seen in the CA3 and CA1 pyramidal cells. Diaz-Cintra et al. (1994), with the present model of prenatal

malnutrition, found in the CA3 pyramidal cell that of 25 different morphometric measurements, only 4 showed a significant diet effect on P15, 3 on P30, 6 on P90, and 7 on P220. The number of thorny excrescences, the site of synapse of the mossy fibers, failed to show a significant diet effect at any of the four ages. Amaral and Dent (1981) had suggested in a combined Golgi and electron microscopic study of mossy fibers and their extensions that the CA3 thorny excrescences were induced in their development by the mossy fibers. The current study combined with the CA3 study did not show an expected relationship between these measures. It may be that the Golgi measurements were not sensitive enough to detect differences, or that the thorny excrescences did not require a full complement of mossy fiber input to develop properly. Further studies would be required to answer this question. Of the changes seen in CA3 pyramidal cells, there was no predictable relationship to the mossy fiber changes, except that the most profound changes occurred at P220. In the CA1 pyramidal cells, Cintra et al. (1997) found at these same ages and with the same dietary paradigm that only 1 of 12 morphometric measurements showed a significant diet effect on P15 and on P90, with 5 showing significant diet effects on P30 and 7 on P220. Empirically, one might expect that the maximum effect of prenatal protein deprivation would be seen on hippocampal pyramidal cells generated during the dietary insult (Bayer, 1980a). That does not appear to be the case. Not only are the various parameters of their postnatal development less affected by prenatal malnutrition, but their neurogenesis appears to be unaffected by the protein deprivation during their period of neurogenesis (DeBassio et al., 1994). These observations on the hippocampal pyramidal cells strengthen the argument that postnatally generated granule cells play a major role in the postnatal adaptation of the hippocampal complex to prenatal malnutrition.

In summary, there is a deficit in virtually all measured parameters of granule cell development in the prenatally malnourished rats on P15, with a narrowing of this deficit on P30 or P90, and then a widening of the deficit in several of the parameters on P220. The timing of the narrowing of the deficit may correspond to a period of enhanced neurogenesis of dentate gyrus granule cells in the malnourished rats. The narrowing of the deficits on P30 noted in the present study would provide a neuronal substrate that is nearly normal during the early reproductive age of the rat. The widening of the deficits on P220 suggests that this narrowing occurs at the expense of the later stages of neuronal proliferation and development. This adaptation to malnutrition, with a narrowing of deficits in morphometric measurements during early adult life, would provide a mechanism for the enhanced survival of the species during its early reproductive period. This observation is also in accord with that of Altman (1987), who suggested that hippocampal microneurons (granule cells) are more likely than macroneurons (pyramidal cells) to be affected by environmental stress.

### Acknowledgments

This study was supported by NIH (HD-22539) and DGAPA-UNAM (IN-202891, IN-204892, IN-204093, IN-208494, and

IN-209195) grants. We are grateful to A. Galván and Isabel Pérez Montfort for assistance.

## REFERENCES

- Ahmed MGE, Bedi KS, Warren MA, Kamel MM (1987) Effects of a lengthy period of undernutrition from birth and subsequent nutritional rehabilitation on the synapse: granule cell neuron ratio in the rat dentate gyrus. *J Comp Neurol* 263:146-158.
- Altman J (1987) Morphological and behavioral markers of environmentally induced retardation of brain development: an animal model. *Environ Health Perspect* 74:153-168.
- Altman J, Das GD (1965) Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. *J Comp Neurol* 124:319-336.
- Amaral DG, Dent JA (1981) Development of the mossy fibers of the dentate gyrus: I. A light and electron microscopic study of the mossy fibers and their expansions. *J Comp Neurol* 195:51-86.
- Andrade PJ, Cadere-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.
- Bayer SA (1980a) Development of the hippocampal region in the rat I. Neurogenesis examined with <sup>3</sup>H-thymidine autoradiography. *J Comp Neurol* 190:87-114.
- Bayer SA (1980b) Development of the hippocampal region in the rat II. Morphogenesis during embryonic and early postnatal life. *J Comp Neurol* 190:115-134.
- Bayer SA, Altman J (1974) Hippocampal development in the rat: cytogenesis and morphogenesis examined with autoradiography and low-level X-irradiation. *J Comp Neurol* 158:50-80.
- Bayer SA, Yackel JW, Puri PS (1982) Neurons in the rat dentate gyrus granule layer substantially increase during juvenile and adult life. *Science* 216:890-892.
- Bedi MF (1991) Effects of undernutrition during early life on granule cell numbers in the rat dentate gyrus. *J Comp Neurol* 311:425-433.
- Blackstad TW, Kjaerheim A (1961) Special axo-dendritic synapses in the hippocampal cortex: electron and light microscopic studies on the layer of mossy fibers. *J Comp Neurol* 117:133-159.
- Cavazos JE, Golaral G, Surula TP (1991) Mossy fiber synaptic reorganization induced by kindling: time course of development, progression, and permanence. *J Neurosci* 11:2795-2603.
- Cintra L, Diaz-Cintra S, Galván A, Kemper TL, Morgane PJ (1990) Effect of protein undernutrition on the dentate gyrus in the rat of three age groups. *Brain Res* 532:271-277.
- Cintra L, Aguilar A, Diaz-Cintra S, Galván A, Kemper TL, Galler JR, Morgane PJ, Vuran P, Diaz-Cintra S (1997) Effect of prenatal protein malnutrition on CA1 pyramidal hippocampal cells in rats of four ages. *Hippocampus* 7:192-203.
- Coleman PD, Flood DG, West MJ (1987) Volumes of the components of the hippocampus of the aging F344 rats. *J Comp Neurol* 266:300-306.
- Danschel G, Fjerdingstad EJ, Fjerdingstad E, Fredens K (1976) Heavy metal content in subdivisions of the rat hippocampus (zinc, lead and copper). *Brain Res* 112:442-446.
- DeBassio WA, Kemper TL, Galler JR, Tonkiss J (1994) Prenatal malnutrition effect on pyramidal and granule cell generation in the hippocampal formation. *Brain Res Bull* 35:57-61.
- DeBassio WA, Kemper TL, Galler JR, Tonkiss J (1996) Effect of prenatal protein deprivation on postnatal granule cell generation in the hippocampal dentate gyrus. *Brain Res Bull* 41:379-383.
- Diaz-Cintra S, Cintra L, Galván A, Aguilar A, Kemper TL, Morgane PJ (1991) Effects of prenatal protein deprivation on postnatal development of granule cells in the fascia dentata. *J Comp Neurol* 312:356-364.
- Diaz-Cintra S, Garcia-Ruiz M, Corkidi G, Cintra L (1994) Effects of prenatal malnutrition and postnatal nutritional rehabilitation on CA3 hippocampal pyramidal cells in rats of four ages. *Brain Res* 662:117-126.
- Fish I, Winick M (1969) Effect of malnutrition on regional growth of the developing rat brain. *Exp Neurol* 25:534-540.
- Frederickson CJ, Danscher G (1990) Zinc-containing neurons in hippocampus and related CNS structures. *Prog Brain Res* 83:71-84.
- Galler JR, Tonkiss J (1991) Prenatal protein malnutrition and maternal behavior in Sprague-Dawley rats. *J Nutr* 121:173-179.
- Garcia-Ruiz M, Diaz-Cintra S, Cintra L, Corkidi G (1993) Effect of protein malnutrition on CA3 hippocampal pyramidal cells in rats of three ages. *Brain Res* 625:203-212.
- Granados L, Cintra L, Aguilar A, Corkidi G, Kemper TL, Morgane PJ, Diaz-Cintra S (1995) Mossy fibers of the hippocampal formation in prenatal malnourished rats. *Boi Estud Med Biol Mex* 43:3-11.
- Haug FMS (1967) Electron microscopic localization of the zinc in hippocampal mossy fiber synapses. *Histochemie* 8:355-368.
- Katz HB, Davies CA (1982) The effects of early-life undernutrition and subsequent environmental complexity at different ages on cerebral measures in rats. *Dev Brain Res* 5:53-64.
- Katz HB, Davies CA (1983) The separate and combined effects on early undernutrition and environmental complexity at different ages on cerebral measure in rats. *Dev Psychobiol* 16:47-58.
- Katz HB, Davies CA, Dobbing J (1982) Effects of undernutrition at different ages early in life and later environmental complexity on parameters of the cerebrum and hippocampus in rats. *J Nutr* 112:1362-1368.
- Lauder JM, Mugnaini E (1980) Infrapyramidal mossy fibers in the hippocampus of the hyperthyroid rat. *Dev Neurosci* 3:248-265.
- Lewis PD, Patel AJ, Beláns R (1979) Effect of undernutrition on cell generation in the rat hippocampus. *Brain Res* 168:186-189.
- Morgane PJ, Miller M, Kemper TL, Stern W, Forbes W, Hall R, Bronzino J, Kissane J, Hawrylewicz E, Resnick O (1978) The effects of protein malnutrition on the development of the developing central nervous system in the rat. *Neurosci Biobehav Rev* 2:137-230.
- Morgane PJ, Austin-LaFrance RJ, Bronzino JD, Tonkiss J, Galler JR (1992) Malnutrition and the developing central nervous system. In: *The vulnerable brain and environmental risks*, Vol. 1. Malnutrition and hazard assessment. (Isaacson R, Jensen K, eds), pp 3-44. New York: Plenum Press.
- Morgane PJ, Austin-LaFrance RJ, Bronzino JD, Tonkiss J, Diaz-Cintra S, Cintra L, Kemper TL, Galler JR (1993) Prenatal malnutrition and development of the brain. *Neurosci Biobehav Rev* 17:91-128.
- Paula-Barbosa MM, Andrade PJ, Castedo JL, Azevedo FP, Camoes I, Volk B, Tavares MA (1989) Cell loss in the cerebellum and hippocampal formation of adult rats after long-term low-protein diet. *Exp Neurol* 103:186-193.
- Repra A, Ben-Ari Y (1992) Kindling associated with the formation of novel fiber synapses in the CA3 region. *Exp Brain Res* 92:69-78.
- Schlessinger AR, Cowan WM, Gottlieb DI (1975) An autoradiographic study of the time of origin and the pattern of granule cell migration in the dentate gyrus of the rat. *J Comp Neurol* 159:149-176.
- Stewart RJC, Merat A, Dickerson JWT (1974) Effect of a low protein diet on mother rats on the structure of the brains of the offspring. *Biol Neonate* 25:125-134.
- Surula T, Casino G, Cavazos J, Parada I, Ramirez L (1989) Mossy fiber synaptic reorganization in the epileptic human temporal lobe. *Ann Neurol* 26:321-330.
- West CD, Kemper TL (1976) The effect of a low protein diet on the anatomical development of the rat brain. *Brain Res* 107:211-237.
- West JR, Dewey SL (1984) Mossy fiber sprouting in the fascia dentata

after unilateral entorhinal lesions: quantitative analysis using computer-assisted image processing. *Neuroscience* 13:357-364.

West JR, Hamre KM. 1985. Effects of alcohol exposure during different periods of development: changes in hippocampal mossy fibers. *Dev Brain Res* 17:250-254.

West JR, Hooges-Savola CA. 1983. Permanent hippocampal mossy fiber hyperdevelopment following prenatal ethanol exposure. *Neurobehav Toxicol Teratol* 5:139-150.

West JR, Hodges CA, Black AC. 1981. Distal, intrapyramidal granule cell axons possess typical fiber morphology. *Brain Res Bull* 6:119-124.

West JR, Van Hoesen GW, Kosel KC. 1982. A demonstration of

hippocampal mossy fiber axon morphology using the anterograde transport of horseradish peroxidase. *Exp Brain Res* 48:209-216.

West MJ, Danscher G, Gundersen H. 1978. A determination of the volumes of the layers of the rat hippocampal region. *Cell Tissue Res* 188:345-359.

Zimmer J. 1978. Development of the hippocampus and fascia dentata: morphological and histochemical aspects. *Prog Brain Res* 48:171-190.

Zimmer J, Haug EM. 1978. Laminar differentiation of the hippocampus fascia dentata and subiculum in developing rats: observations with the Timm sulfide silver method. *J Comp Neurol* 179:581-617.



# Effects of Prenatal Protein Malnutrition on Hippocampal CA1 Pyramidal Cells in Rats of Four Age Groups

León Cintra,<sup>1</sup> Azucena Aguilar,<sup>1</sup> Leticia Granados,<sup>2</sup> Agustín Galván,<sup>1</sup> Thomas Kemper,<sup>3\*</sup> William DeBassio,<sup>3</sup> Janina Galler,<sup>4</sup> Peter Morgane,<sup>4,5</sup> Pilar Durán,<sup>1</sup> and Sofía Díaz-Cintra<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Centro de Neurobiología, UNAM, Ciudad Universitaria, México, D.F. México

<sup>2</sup>Unidad de Investigación en Salud Infantil del Instituto Nacional de Pediatría, SSA, D.F. México

<sup>3</sup>Neurological Unit, Boston City Hospital, Boston, Massachusetts

<sup>4</sup>Center for Behavioral Development and Mental Retardation, Boston University School of Medicine, Boston, Massachusetts

<sup>5</sup>University of New England, Biddeford, Maine

**ABSTRACT:** The present study was undertaken to investigate the effect of prenatal protein deprivation on area CA1 hippocampal pyramidal cells on postnatal (P) days 15, 30, 90 and 220 using Golgi techniques. Age related changes in both groups and diet related changes between groups were assessed. There were significant diet effects at all four ages, with one of 12 different measurements showing a significant diet effect on P15, five on P30, one on P90, and seven on P220. The most marked effect of the diet was on pyramidal cell dendrite spine density in the stratum moleculare and stratum radiatum, with a different pattern of diet effects in the two strata. In pyramidal cell dendrites in the stratum moleculare, there was a deficit in spine density that was significant at three of the four ages and there were similar age-related changes in the two diet groups. Spines on pyramidal cell dendrites in the stratum radiatum showed a lack of synchrony of age-related changes in the two diet groups, with an increased spine density in the malnourished rats on P30 and a widening deficit in this parameter on P90 and P220. The bimodal distribution to these changes, with most marked deficits occurring on P30 and P220, with an intervening period of apparent "catch-up" on P90, is of interest and may be a significant brain adaptation to malnutrition.

The present study is the final of three morphometric studies on the effect of prenatal protein restriction on three key neurons in the hippocampal trisynaptic circuit. When compared to our previous studies on the dentate granule cell and the CA3 pyramidal cell, it is noted that there is an effect of the low protein diet on all these neurons, with the most marked effect on the predominantly postnatally generated dentate granule cells. *Hippocampus* 7:192-203, 1997. © 1997 Wiley-Liss, Inc.

**KEY WORDS:** morphometric Golgi study; hippocampal formation; computer-assisted image analysis

Contract grant sponsor: NIH; Contract grant numbers HD-22539; Contract grant sponsor: DGAPA-UNAM; Contract grant numbers IN-202891, IN-204892, IN-204093, IN-208494, and IN-209195.

\*Correspondence to: Dr. Thomas Kemper, Neurological Unit, Boston City Hospital, 818 Harrison Avenue, Boston, MA 02118.

Accepted for publication 18 December 1996

## INTRODUCTION

Nutrition represents an important influence on the growing organism, with adequate intake of protein being essential for maturation of neurological structure and function (Morgane et al., 1992, 1993). In the rat, the effect of malnutrition on memory and other functions attributed to the hippocampal formation has been well documented. With pre- and postnatal protein deprivation, altered spatial memory (Goodlett et al., 1986; Jordan et al., 1982) has been found; with the present model of prenatal protein deprivation, an impaired acquisition of a differential reinforcement of low rate operant schedule (Tonkiss et al., 1990) and an increased resistance to extinction during reversal of a previously learned alternation response on a T-maze (Tonkiss and Galler, 1990) have been seen. Neurophysiological studies in rats raised with our current model of prenatal protein malnutrition have provided evidence of significant alterations to local circuit modulation of granule cell excitability (Bronzino et al., 1991a,b, 1995; Austin et al., 1992) as well as a significantly reduced seizure susceptibility to perforant pathway stimulation (Austin-LaFrance et al., 1991).

The hippocampal formation has been the subject of extensive studies of malnutrition on its anatomical development (Fish and Winick, 1969; Stewart et al., 1974; West and Kemper, 1976; Morgane et al., 1978, 1992, 1993; Lewis et al., 1979; Katz and Davies, 1982, 1983; Katz et al., 1982; Ahmed et al., 1987; Paula-Barbosa et al., 1989; Cintra et al., 1990, 1997; Díaz-Cintra et al., 1991, 1994;

Bedi, 1991; Garcia-Ruiz et al., 1993a,b; DeBassio et al., 1994, 1996). With predominantly postnatal malnutrition, Ahmed et al. (1987) have found an altered synapse/dentate granule cell ratio in the molecular layer of the dentate gyrus. This ratio was not statistically different from controls at P21 but was significantly decreased on P75 and significantly increased on P150. Paula-Barbosa et al. (1989) studied the effect of an 8% casein diet from the eight postnatal week until the 6th, 12th, and 18th postnatal month. At all three ages there was a significant decrease in the width of the dentate gyrus granule cell layer and in the width of the CA3 pyramidal layer, and there was a significant decrease in cell packing density in the dentate granule cell layer and in pyramidal cells in area CA3. They interpreted this decreased neuronal density as evidence of cell loss in the protein-deprived rats. Several studies have emphasized the importance of prenatal malnutrition on the anatomical development of the hippocampal formation. In rats provided with one-half their usual food intake from E6, Lewis et al. (1979) studied cell cycle time in the germinal zone of the dentate granule cells on P1, P6, and P12. These authors found that the cell cycle time was prolonged at all three postnatal ages, with the most marked effect occurring on P12. Based on the labeling index and cell cycle time, they concluded that undernutrition markedly diminished the rate of dentate granule cell acquisition. Katz and Davies (1983) measured the width of the hippocampus in rats fed one-half their usual diet during the period of gestation and lactation, during lactation alone, or during lactation and the post-weaning period. They observed a significant decrease in width only in rats in which undernutrition included the period of gestation.

Several of the studies on the effect of the prenatal malnutrition on hippocampal neurons have used the same paradigm of prenatal protein deprivation used in the present study. DeBassio et al. (1994) have shown with prenatal malnutrition alone that there is a decrease in dentate granule cell neurogenesis at birth, with no significant effect on pyramidal cell neurogenesis. This decrease in granule cell genesis persists in the postnatal period despite rehabilitation at birth up to P8, is not present at P15, and by P30 is replaced by increased neurogenesis (DeBassio et al., 1996). In a morphometric Golgi study of dentate gyrus granule cells on P15, P30, P90, and P220, Diaz-Cintra et al. (1991) showed that prenatal protein deprivation affected the complexity of dendritic branching and the spine density in the outer two-thirds of the molecular layer at all four ages. The mossy fiber plexus, the axonal plexus of the dentate gyrus granule cells, was found by Cintra et al. (1997) to be decreased in the prenatally malnourished rats in both its rostrocaudal extent and volume on P15, P90, and P220, without a significant diet effect on P30. CA3 pyramidal cells have shown significant effects of prenatal protein restriction on cell size, dendritic branching, and spine density (Diaz-Cintra et al., 1994). These two cells, the granule cell of the dentate gyrus and the CA3 pyramidal cell, are key neurons in the hippocampal trisynaptic circuit, a circuit thought to play a critical role in memory function (Barnes 1983; Eichenbaum and Cohen 1988; Lynch et al., 1988; Teyler and Discenna 1984).

The present study was undertaken to determine the effect of prenatal protein deprivation on the postnatal development of the hippocampal CA1 pyramidal cell, the last of the three key neurons

in the hippocampal trisynaptic circuit, and to compare these effects with the previously determined changes in the other two cells in the hippocampal trisynaptic circuit.

## MATERIALS AND METHODS

Thirty female and ten male Sprague-Dawley VAF plus (viral and antibody free) rats were used for breeding. The female rats weighed between 175 and 200 g on arrival at 80–90 days of age. All rats were maintained under identical conditions of the light-dark cycle (12:12 h), temperature (22–24°C), and humidity (40–50%), with free access to food and water.

Five weeks prior to mating ten female rats were fed a 6% casein diet and 20 females a 25% casein diet. The 5 week pretreatment allows the female time to establish metabolic adaptation to the diet before mating (Allison and Wannemacher, 1965; Philbrick and Hill, 1974). A detailed description of the nutritional, mating, and fostering procedures is given in a previous article (Gailer and Tonkiss, 1991). Males were placed on either a 6 or 25% casein diet 1 week prior to breeding with their respective diet-fed females. For breeding, one male rat was placed in a cage containing three females. Vaginal smears were obtained each morning to determine the onset of pregnancy. One week prior to the expected parturition, all sperm-positive females were placed in plastic nesting cages (48 × 27 × 16 cm) with adequate clean nesting material. The pups from each diet group that were born the same day were weighed and sexed, with four males and four females fostered as whole litters to dams fed a 25% casein diet, giving a total of eight litters each of cross-fostered control and protein-deprived rats. The cross-fostered protein-deprived rats will be referred to as the 6/25 rats and the controls as the 25/25 rats. After weaning the rats were continued on the 25% casein diet and housed in groups of four in same-sex colony cages. The body weights of pups from both diet groups were measured on the day of delivery, and brain and body weights were measured in both groups on P15, P30, P90, and P220.

At 15, 30, 90, and 220 days of age one male pup per litter was randomly selected from both diet groups for histological study. Six pups per diet group were used at each age, for a total of 48 pups. The rats were anesthetized with pentobarbital and perfused through the heart with 10% neutral buffered formalin. From each brain a 4 mm wide block, containing the hippocampal formation at the midpoint of its septo-temporal extent, was removed and impregnated with the rapid-Golgi method following the modifications of Diaz-Cintra et al. (1991). The blocks were embedded in low-viscosity nitrocellulose, and six sections were cut serially and mounted in the frontal plane at a thickness of 120 μm. Each slide was assigned a random number to ensure that observations were blind with respect to diet and age.

A total of 288 well-impregnated CA1 pyramidal cells from both groups were selected for study. From each histological section, the first completely impregnated cell was selected from the deep part of the pyramidal cell layer at the mid-part of area CA1.

orphometric analysis was performed using a computer-assisted imaging system (Histo 2000, Biocom, Corkidi, 1989) as described elsewhere (García-Ruiz et al., 1993a). For each cell, the following measurements were made:

The area and the major and minor axis of the cell body at their maximum extent (Fig. 1A).

The length of the apical dendrite from cell body to the surface of the stratum radiatum and stratum moleculare (Fig. 1B).

The width of the stratum radiatum from the interface of the stratum radiatum with the stratum radiatum to the interface between the stratum radiatum and stratum moleculare (Fig. 1B).

The width of the stratum moleculare from the interface of the stratum radiatum and stratum moleculare to the hippocampal fissure (Fig. 1B).

The number of apical dendrites crossing ten equally spaced concentric rings 38  $\mu\text{m}$  apart according to the method of Sholl (1953) and Díaz-Cintra et al. (1991) (Fig. 1C). To ensure sampling of the major part of each dendritic tree, only cells with less than 20% of its dendrites transected by the microtome were used for this analysis. In both diet groups the length of the apical dendrite was less at P15 than at P30, P90, and P220. Because of this difference in dendritic length at P15, to compare apical dendritic density and spine number on P15 with P30, P90, or P220, four rings were selected at the same anatomical level relative to the stratum radiatum and stratum moleculare in the P15 group and the three older groups. Therefore, in the stratum radiatum, rings 4 and 5 on P15 were considered to be comparable to rings 6 and 7 on P30, P90, and P220; in the stratum moleculare, rings 6 and 7 on P15 were considered comparable to rings 9 and 10 on P30, P90, and P220.

The apical dendritic spines per 50  $\mu\text{m}$  were counted from the middle part of the stratum radiatum and from the middle part of the stratum moleculare. For these measurements the largest diameter dendrite parallel to the plane of section was selected (Fig. 1B). Correction factors for the effect of differences in dendritic diameter on spine counts were made for the thicker apical dendrites in the stratum radiatum according to the method of Feldman and Peters (1979). For these corrections the length of the spines and the thickness of the dendritic segments were measured at 1,000 $\times$  with an ocular reticle calibrated to a stage micrometer.

Two-way analysis of variance (ANOVA) was applied to the data (Age  $\times$  Diet group). When significant interactions were found, post hoc analysis with the Tukey test was used. Statistical significance was accepted if  $P < 0.05$ .

## RESULTS

### Brain and Body Weights

Body weights at birth and body and brain weights at P15, P30, P90, and P220 are shown in Table 1 for both diet groups. Two way ANOVA (Age  $\times$  Diet) for this information is shown in Table 2. Because the brain and body weights for the same animals were not available at birth, a Student's  $t$  test was used for birth body weight

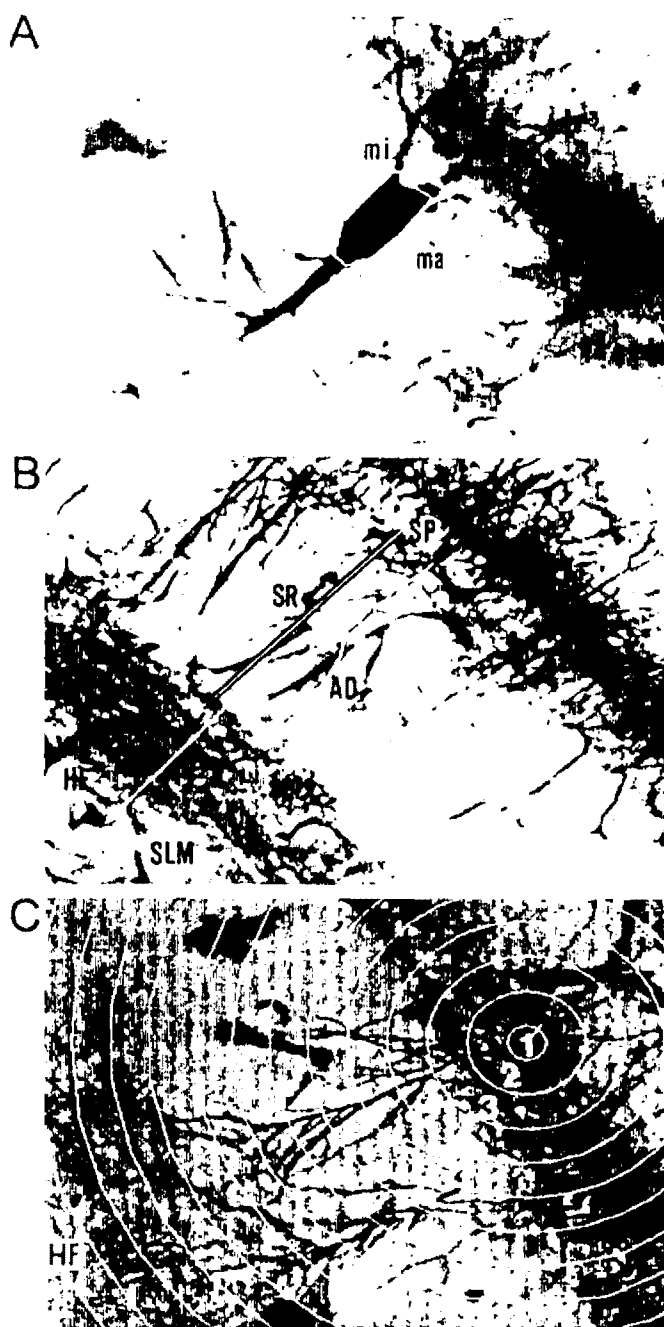


FIGURE 1. Diagram showing the parameters analyzed for each CA1 pyramidal cell. A: Surface area (outlined) and major (ma) and minor (mi) axes ( $\times 400$ ). B: Apical dendritic length (AD), width of the stratum radiatum (SR), stratum lacunosum moleculare (SLM), and stratum pyramidale (SP), and hippocampal fissure (HF) ( $\times 100$ ). C: Mask with ten concentric rings in which dendritic intersections were counted in apical dendritic fields ( $\times 100$ ).  $\times$  = original magnification.

comparison, and there was no difference between the diet groups. There were age-related but no diet-related significant differences in body weights or brain weights at any age.

### Histological Measurements

The results of the two-way ANOVA (Age  $\times$  Diet) for the histological measures are shown in Table 3, the age-related

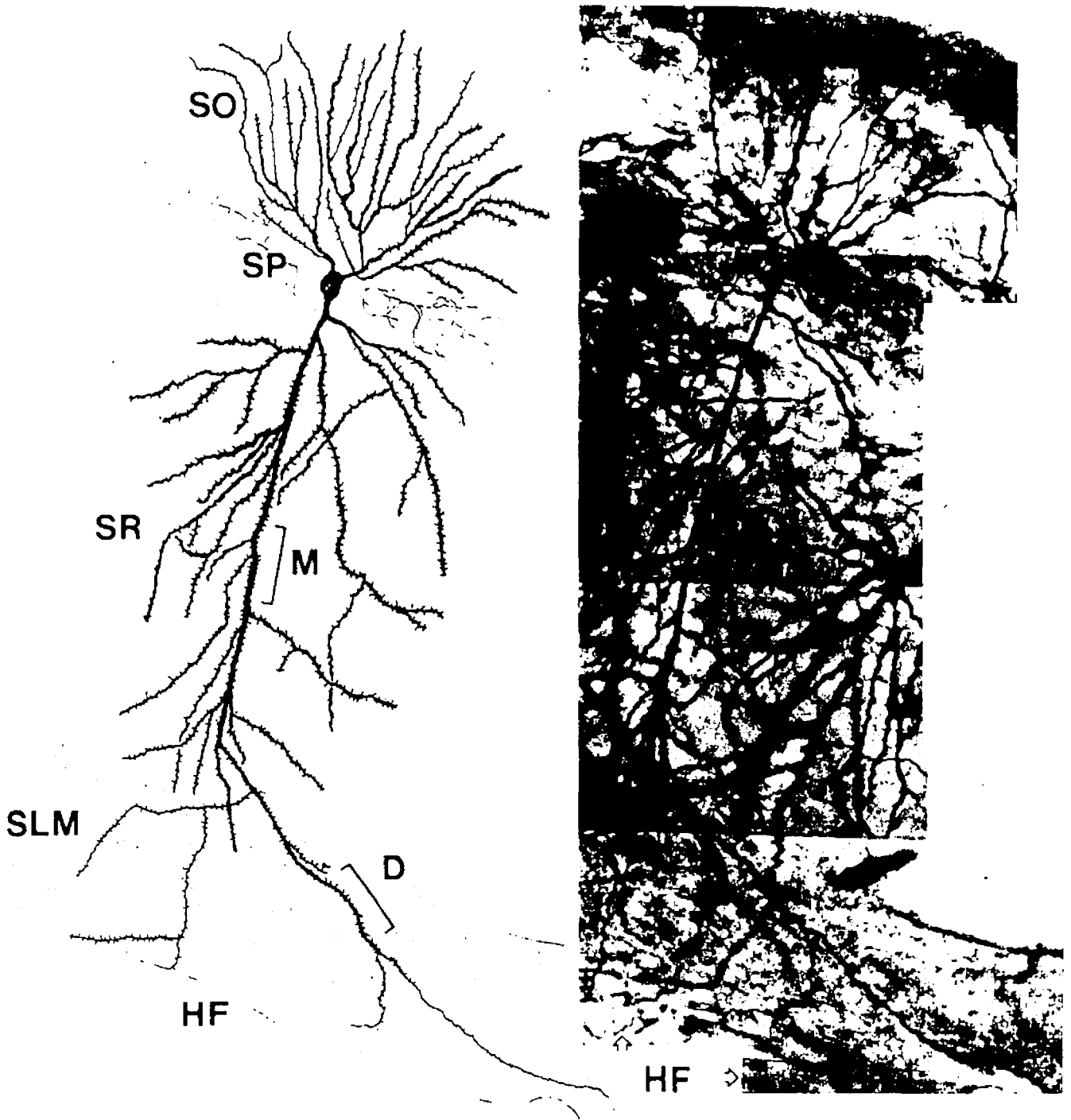


FIGURE 2. Right: photomicrograph showing a CA1 pyramidal cell impregnated by the rapid-Golgi technique. Left: camera lucida drawing from the same pyramidal cell showing the dendritic seg-

ments in which numbers of spines were counted. M, middle and D, distal segments. SO, stratum oriens; SR, stratum radiatum; SLM, stratum lacunosum moleculare; HF, hippocampal fissure.

changes are shown in Table 4, and the data and significant differences at each age between diet groups are indicated by an asterisk in Figures 3 to 6.

**Cell size**

The cell body showed significant age effects on the surface area and major axis ( $P < 0.01$ ) and on the minor axis ( $P < 0.001$ ) and

significant interaction effects on the surface area and minor axis ( $P < 0.001$ ) and on the major axis ( $P < 0.01$ ). ANOVA indicated significant Age  $\times$  Diet interactions, and post hoc analysis showed significant diet effects only on P220, with the 25/25 animals showing a larger cell surface area and a longer major axis compared with the 6/25 animals. The 25/25 rats also showed a significant age-related decrease in surface area from P15 to P30

TABLE 1.

Body and Brain Weights (Mean  $\pm$  SE) at Different Ages in Both Diet Groups in Grams ( $n = 8$ )

	25/25	6/25
Body		
Birth	7.02 $\pm$ 0.14	5.61 $\pm$ 0.95
P15	34.03 $\pm$ 1.61	34.66 $\pm$ 0.31
P30	126.35 $\pm$ 2.65	130.47 $\pm$ 4.84
P90	586.42 $\pm$ 18.35	551.94 $\pm$ 15.01
P220	877.50 $\pm$ 23.70	802.38 $\pm$ 17.16
Brain		
P15	1.27 $\pm$ 0.06	1.23 $\pm$ 0.04
P30	1.47 $\pm$ 0.08	1.38 $\pm$ 0.14
P90	2.28 $\pm$ 0.12	2.17 $\pm$ 0.13
P220	2.40 $\pm$ 0.31	2.20 $\pm$ 0.20

and P15 to P220 and in the 6/25 rats a significant decrease in the minor axis from P15 to P30 and P90 to P220. There were significant increases in the length of the minor axis in the 25/25 rats from P15 to P30 and P15 to P220 and in the 6/25 rats from P30 to P220.

#### Apical dendritic length and width of the stratum radiatum and moleculare

The length of the apical dendrite and width of the stratum radiatum both showed significant diet ( $P < 0.001$ ), age ( $P < 0.001$ ), and interaction effects ( $P < 0.001$ ), and the width of the stratum moleculare showed significant diet ( $P < 0.001$ ) and interaction effects ( $P < 0.01$ ). With post hoc analysis, significant deficits were seen in the apical dendritic length on P30 and P220, in the width of the stratum radiatum on P30 and P220, and in the width of the stratum moleculare on P30 and P220 in the 6/25 rats compared with the 25/25 rats. The length of the apical dendrite in both diet groups showed significant increases from P15 to P30, P15 to P90, and P15 to P220. The width of the stratum radiatum in both diet groups showed significant increases from P15 to P30 and P15 to P90, and in the 25/25 rats, but not the 6/25 rats, from P15 to P220. There were no significant age-related changes in either diet group in the stratum moleculare.

TABLE 2.

Statistical Analysis of Brain and Body Weights<sup>1</sup>

	F value		
	Diet (df <sup>2</sup> 1,61)	Age (df 3,61)	Interaction (df 3,61)
Brain	1.10	187.6***	1.8
Body	1.54	913.3***	457.4***

<sup>1</sup>Two-way ANOVA with Diet  $\times$  Age.

<sup>2</sup>df, degrees of freedom.

\*\*\* $P < 0.001$ .

TABLE 3.

Statistical Analysis of Effect of Prenatal Protein Malnutrition on CA1 Pyramidal Cells<sup>1</sup>

	F values		
	Diet (df 1,286)	Age (df 3,284)	Interaction (df 3,284)
Perikarya			
Area ( $\mu\text{m}^2$ )	0.69 NS	4.09**	8.60***
Major axis ( $\mu\text{m}$ )	0.78 NS	4.15**	4.54**
Minor axis ( $\mu\text{m}$ )	0.26 NS	9.95***	4.81***
Length of apical dendrite ( $\mu\text{m}$ )	21.30***	190.18***	8.62***
Stratum radiatum width ( $\mu\text{m}$ )	24.14***	214.09***	9.22***
Stratum moleculare width ( $\mu\text{m}$ )	26.37***	0.41 NS	3.47**
Spine/50 ( $\mu\text{m}$ )			
Stratum radiatum	36.76***	31.84***	67.89***
Stratum moleculare	92.52***	108.37***	6.14***
Intersections <sup>2</sup>			
Stratum radiatum			
152 $\mu\text{m}$ (P15)	0.23 NS	3.87**	1.05 NS
228 $\mu\text{m}$ (P30, 90, 220)			
190 $\mu\text{m}$ (P15)	0.04 NS	7.34***	0.19 NS
266 $\mu\text{m}$ (P30, 90, 220)			
Stratum moleculare			
228 $\mu\text{m}$ (P15)	0.29 NS	17.60***	1.54 NS
342 $\mu\text{m}$ (P30, 90, 220)			
266 $\mu\text{m}$ (P15)	1.27 NS	12.89***	1.32 NS
380 $\mu\text{m}$ (P30, 90, 220)			

<sup>1</sup>Two-way analysis of variance (ANOVA) with nutritional status and age as the two factors. df, degrees of freedom.

<sup>2</sup>Comparison between comparable locations in the stratum radiatum and moleculare (see text).

\*\* $P < 0.01$ .

\*\*\* $P < 0.001$ .

#### Spine density

The density of spines on dendrites in the stratum radiatum and in the stratum moleculare both showed significant diet ( $P < 0.001$ ), age ( $P < 0.001$ ), and interaction ( $P < 0.001$ ) effects. With post hoc analysis, in the stratum radiatum 6/25 vs 25/25 rats showed a significant increase in density of spines on P30 followed by significant deficits on P90 and P220. In the stratum moleculare, 6/25 vs. 25/25 rats showed significant deficit in spine density on P15, P30, and P220. In the stratum radiatum the control rats showed significant age-related increases in spine density from P15 to P90, P15 to P220, P30 to P90, P30 to P220 and P90 to P220. Prenatally malnourished rats showed a significant age-related increase in spine density from P15 to P30 followed by significant decreases from P30 to P90 and P30 to P220. In the stratum moleculare, both control and prenatally protein-deprived rats showed a significant increase in spine density from P15 to P90, P30 to P90, and P30 to P220, followed by a significant decrease from P90 to P220. Control rats also showed a significant increase in spine density from P15 to P220.

TABLE 4.

Age-Related Changes (%) in CA1 Pyramidal Cells

	P15 vs.						P30 vs.				P90 vs.	
	P30		P90		P220		P90		P220		P220	
	25/25	6/25	25/25	6/25	25/25	6/25	25/25	6/25	25/25	6/25	25/25	6/25
<b>Perikarya</b>												
Area ( $\mu\text{m}^2$ )	NS	-12*	NS	NS	+16*	-12	NS	NS	+14*	NS	+16*	NS
Major axis ( $\mu\text{m}$ )	NS	-9*	NS	-9*	NS	-11*	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Minor axis ( $\mu\text{m}$ )	+8*	NS	NS	NS	+14*	NS	NS	NS	NS	-10*	NS	NS
Length of apical dendrites ( $\mu\text{m}$ )	+33*	+31*	+50*	+38*	+51*	+31*	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Stratum radiatum width ( $\mu\text{m}$ )	-33*	-35*	+44*	-32*	+36*	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Stratum moleculare width ( $\mu\text{m}$ )	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
<b>Spines/50 <math>\mu\text{m}</math></b>												
Stratum radiatum	NS	+19*	+17*	NS	+40*	NS	+17*	-12*	+40*	-16*	+20*	NS
Stratum moleculare	NS	NS	+25*	+32*	+16*	NS	+30*	+39*	+21*	+10*	-7*	-20*
<b>Intersections<sup>2</sup></b>												
<b>Stratum radiatum</b>												
152 $\mu\text{m}$ (P15)	-17*	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
228 $\mu\text{m}$ (P30, 90, 220)												
190 $\mu\text{m}$ (P15)	NS	NS	-16*	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
266 $\mu\text{m}$ (P30, 90, 220)												
<b>Stratum moleculare</b>												
228 $\mu\text{m}$ (P15)	-22*	NS	-28*	-20*	-22*	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
342 $\mu\text{m}$ (P30, 90, 220)												
266 $\mu\text{m}$ (P15)	-24*	NS	-28*	-18*	-17*	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
380 $\mu\text{m}$ (P30, 90, 220)												

<sup>1</sup>Morphometric analyses were carried out on 288 neurons. ANOVA/Tukey ranges. \* $P < 0.05$

<sup>2</sup>Comparisons between comparable locations in the stratum radiatum and moleculare (see text)

**Apical dendritic intersections**

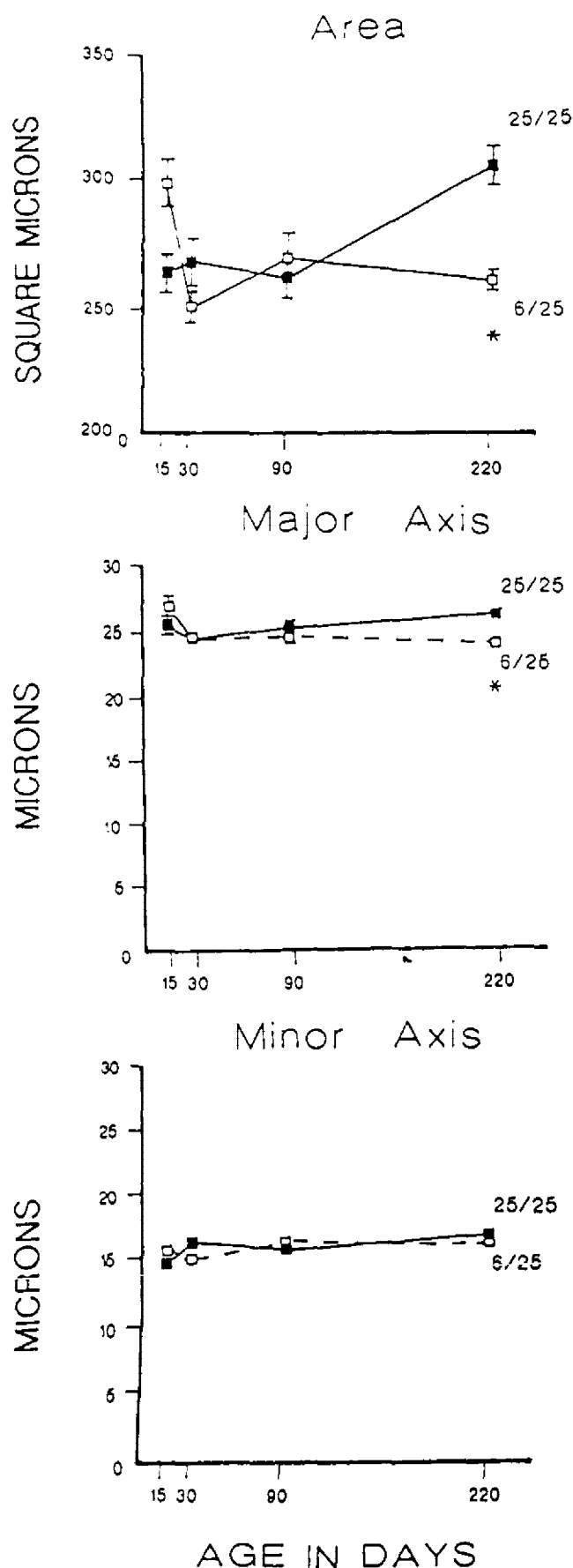
The density of dendritic intersections at comparable levels of the stratum radiatum and stratum moleculare showed a significant age effect ( $P < 0.01$  to  $P < 0.001$ ), without significant diet or interaction effects. With post hoc analysis, the number of dendritic intersections in the stratum radiatum of control rats showed a significant decrease from P15 to P30 in one set of rings and from P15 to P90 in the other set of rings. In the stratum moleculare of control rats, both sets of comparable rings showed a significant decrease in number of intersections from P15 to P30, P15 to P90, and P15 to P220. Prenatally protein-deprived rats showed a significant decrease in number of intersections from P15 to P90 in the stratum moleculare in both sets of comparable rings.

**DISCUSSION**

There was a difference in body weights at birth of 20% between the 25/25 and 6/25 rats. Although this was not statistically significant, it was of the same order as observed in previous

experiments using the same experimental paradigm in which the difference did achieve statistical significance (Tonkiss et al., 1990). There was no significant difference between diet groups in brain or body weight at P15, P30, P90, or P220.

In control rats, the stratum radiatum showed significant increases in width from P15 to P30 and in spine density from P30 to P220 and the stratum moleculare showed no age-related change in width and a significant increase in spine density from P30 to P90 followed by a significant decrease in density from P90 to P220. This more prolonged period of growth and maturation in the stratum radiatum than in the stratum moleculare in the control rats is in agreement with the study of Pokorny and Yamamoto (1981). In their quantitative electron microscopy (EM) study of normal ontogeny from P5 to P90 in the Wistar rat, they found an adult density of axon terminals in the stratum radiatum on P24 and of axodendritic spines on P48. The comparable times for the stratum moleculare were P15 and P24. They also reported a decrease in spine density in the stratum moleculare from P48 to P90. The differences in the time course of synaptic development between the EM and the Golgi studies may be related to a difference in techniques used, to the timing of the age-related changes, or to the use of different strains of rats. Also in



agreement with the present study is the finding of Steward and Faik (1991) in the Sprague-Dawley rat of an increase in the combined width of the stratum radiatum and moleculare from P15 to P28, followed by little change in width. This measurement is basically the same as our measurement of the extent of the apical dendrite.

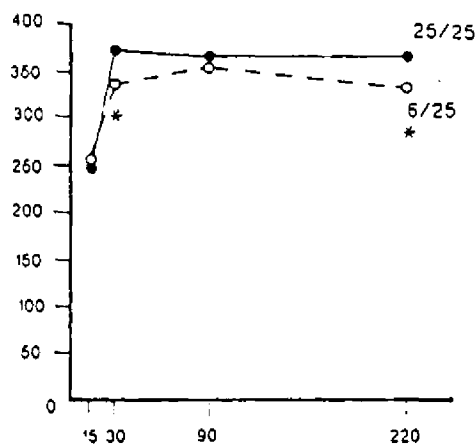
There was no diet effect on the number of dendritic intersections at any age, and cell size was affected only on P220. The remaining five morphometric parameters were affected at two or more ages with a bimodal distribution of effect, with the most marked differences occurring on P30 and P220. On P15 there was a significant decrease in number of apical dendritic spines in the stratum moleculare. On P30 apical dendritic length, width of the stratum radiatum and stratum moleculare, and number of apical dendritic spines in the stratum moleculare were all significantly decreased, and the number of spines in the stratum radiatum was increased. On P90 there was a decreased number of spines on apical dendrites in the stratum radiatum. On P220 there was a decrease in width of the stratum radiatum and the stratum moleculare and in the number of spines on apical dendrites in the stratum radiatum and stratum moleculare. Synaptic spine density in the stratum radiatum and moleculare showed the most marked diet effect, with significant diet effects noted in both at three of the four ages. In the stratum radiatum, spines were unchanged on P15, significantly increased on P30, and significantly decreased on P90 and P220. In the stratum moleculare, spines were significantly decreased on P15 and P30, unchanged on P90, and significantly decreased on P220.

In addition to this study on CA1 pyramidal cells, the current experimental paradigm of prenatal protein malnutrition and postnatal rehabilitation has also been used to assess diet effects on the granule cells of the fascia dentata and CA3 pyramidal cells. It would be useful to compare the present study with these other studies. All these studies are of particular interest since these cells are key components in the hippocampal trisynaptic circuit, which is thought to play a major role in memory function (Barnes, 1988; Eichenbaum and Cohen, 1988; Lynch et al., 1988; Teyler and Discenna, 1984). The initial limb of the circuit is the entorhinal cortical projection to the outer two-thirds of the molecular layer of the fascia dentata. The intermediate limb is the fascia dentata granule cell mossy fiber axonal projection to the thorny excrescences on the apical dendrites of CA3 pyramidal cells in the stratum lucidum. The final limb of the circuit is the CA3 pyramidal cell Schaffer collateral axonal projection to the stratum radiatum of the CA1 pyramids. The effect of prenatal malnutrition on the neurons in the entorhinal cortex and its afferent plexus to the hippocampal complex is unknown. However, the diet effects on granule cell dendrites and axons, CA3 pyramidal cells, and the area of CA3 projection via Schaffer collaterals to CA1 dendrites in stratum radiatum have all been studied.

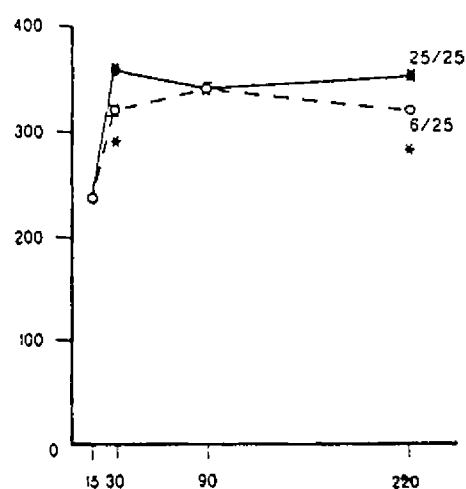
The entorhinal cortical projection to the hippocampal complex is to the stratum moleculare of all hippocampal areas, including

FIGURE 3. Effect of prenatal protein deprivation on cell size. Bars = mean  $\pm$  std error. \*,  $P < 0.05$ .

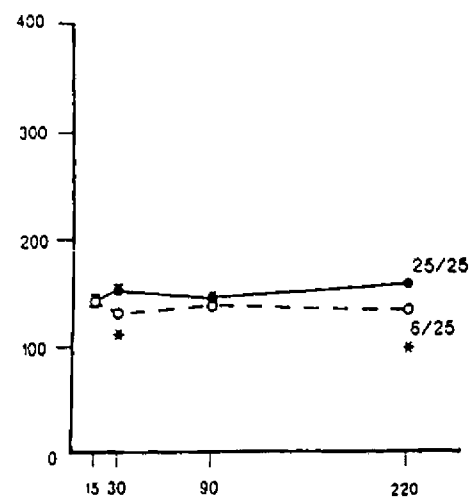
Apical Dendritic Length



Width of *Stratum radiatum*



Width of *Stratum moleculare*



AGE IN DAYS

CA3, CA1, and the outer two-thirds of the molecular layer in the fascia dentata (Rosene and Van Hoesen, 1987). In the stratum moleculare of the CA1 pyramidal cells, the apical dendritic spine density increased with age in both diet groups, but the 6/25 animals compared with the 25/25 animals had significantly decreased spine densities on P15, P30, and P220. These deficits were associated with significant decreases in stratum moleculare width on P30 and P220. Dendritic number was not affected by the diet. Taken together, these observations suggest a persistent curtailment of normal stratum moleculare development in area CA1 in the prenatally malnourished rats.

The effects of prenatal malnutrition on the dendrites in the molecular layer of CA3 pyramidal cells and on granule cell dendrites in the outer two-thirds of the molecular layer of the fascia dentata have also been documented on P15, P30, P90, and P220. The CA3 pyramidal cells, like the CA1 pyramids, have also failed to show a significant diet effect on the number of dendritic intersections (Díaz-Cintra et al., 1994). In this study, dendritic spines in this zone were not measured. The effect of the diet on granule cell dendrites in the molecular layer of the fascia dentata (Díaz-Cintra et al., 1991) was different from that seen in CA1 and CA3 pyramidal cells. In the outer two-thirds of the molecular layer, the dendrites of granule cells have shown deficits in dendritic number and in synaptic spines on these dendrites. The former was least evident on P30 and the latter on P90. These deficits on granule cell dendrites were most marked on P220.

The size of the mossy fiber plexus (Cintra et al., 1997), the plexus of the granule cell axons, showed a pattern of diet effect from prenatal malnutrition similar to that shown by the granule cell dendrites (Díaz-Cintra et al., 1991). The volume and extent of this plexus was significantly decreased on P15, P90, and P220, without a significant diet effect on P30. These diet effects in the morphometric measurements on the granule cells are associated with a delayed postnatal neurogenesis of the granule cells in the prenatally malnourished rats (DeBassio et al., 1994, 1996), a delay not seen in pyramidal cell neurogenesis (DeBassio et al., 1994). For granule cell development, some of the effect of diet may be attributable to their delayed neurogenesis.

The diet effects in the stratum radiatum of the CA1 pyramidal cells found in the current study showed a different pattern of age- and diet-related changes than that seen in the dendrites of granule cells in the outer two-thirds of the stratum moleculare of the fascia dentata. The apical dendritic branches of CA1 pyramidal cells in the stratum radiatum in the control rats showed a significant increase in spine density between P30 and P220, and the malnourished rats showed a significant increase in spine density between P15 and P30. However, the malnourished rats failed to maintain the increase seen in controls between P30 and P90; this manifested as a significant decrease in density from P30 to P90. In association with these differing age-related changes in the two diet groups, the malnourished rats showed a significantly increased

FIGURE 4. Effect of prenatal protein deprivation on the apical dendritic length and width of the stratum radiatum and stratum moleculare. Bars = mean  $\pm$  std error. \*,  $P < 0.05$ .



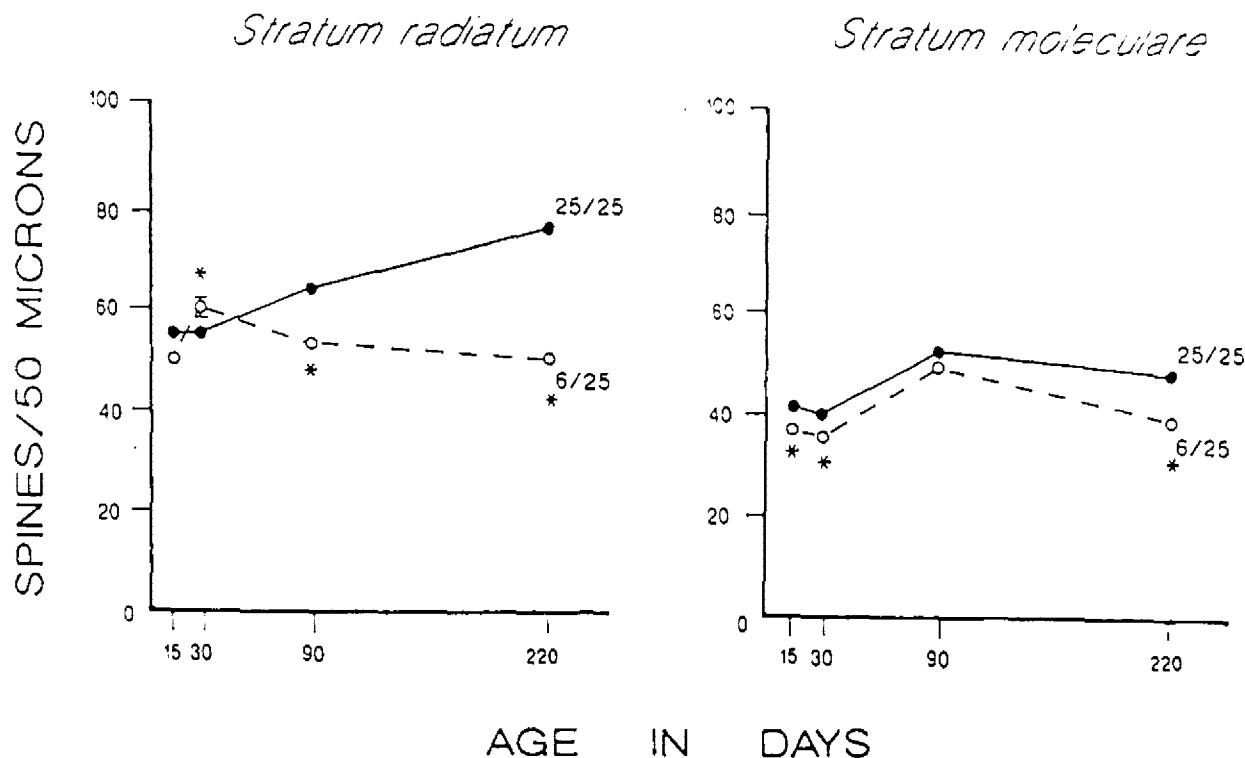


FIGURE 5. Effect of prenatal protein deprivation on the spine density in stratum radiatum and stratum moleculare. Bars = mean  $\pm$  std error. \*,  $P < 0.05$ .

spine density on P30, followed by a decreased density on P90 and P220. Deficits were present in the width of the stratum radiatum in the malnourished rats on P30 and P220. In contrast to these diet effects on the stratum radiatum of the CA1 pyramidal cells, Diaz-Cintra et al. (1994) found no effect of prenatal protein deprivation on the area of the thorny excrescences on the CA3 pyramidal cells at P15, P30, P90, or P220. Thus, in these morphometric Golgi studies, dietary deficits in multiple parameters of granule cell morphology are not reflected in a diet effect on the development of CA3 pyramidal cell thorny excrescences. In normal development, the thorny excrescences are first noted with the Golgi stain on P9 (Amaral and Dent, 1981). Amaral and Dent (1981) felt that the thorny excrescences might be induced by the mossy fiber input and wondered whether the thorny excrescences would develop properly if deprived of mossy fiber input. One might anticipate from this that the decreased size of the mossy fiber plexus on P15 in the malnourished rats would be associated with a delay in the formation of these thorny excrescences in the malnourished rats. This was not seen. It is possible that the Golgi measurements are not precise enough to reflect the mossy fiber deficits as delays in thorny excrescence development. Alternatively, the amount of mossy fiber input to maintain thorny excrescence development may not be a precise function of mossy fiber plexus size.

It is possible that the deficits in the stratum radiatum of the CA1 pyramidal cells are related to the diet effect on the granule cell, and that the measurement of the intermediary part of the circuit in the thorny excrescences is not sufficiently precise to

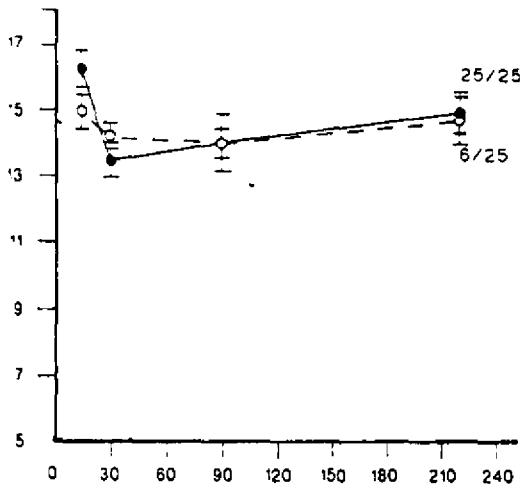
reflect the diet effect of the mossy fiber plexus. This also seems unlikely since there were deficits in many different morphometric parameters of granule cell development on P15 without a single deficit noted on CA1 cells in the stratum radiatum at this time. The only significant diet effect on CA1 pyramidal cells on P15 was a decrease in synaptic spine density in the stratum moleculare.

It can be seen from this analysis of the effects of malnutrition on the various components of the trisynaptic circuit that there are no straightforward predictable relationships between diet effects on granule cells and diet effects on CA3 and CA1 pyramidal cells. It seems likely that postnatal development of the CA1, CA3, and hippocampal granule cells depends on multiple factors that were not analyzed in the current Golgi studies. In this regard, Steward and Falk (1991) suggested that cell development as measured by synaptogenesis is determined by the state of readiness of the postsynaptic neurons and the availability of presynaptic input. Furthermore, Eckenhoff and Rakic (1991) argued that in the prenatal period synaptogenesis may depend on an intrinsic cytochemical specificity rather than on afferent input.

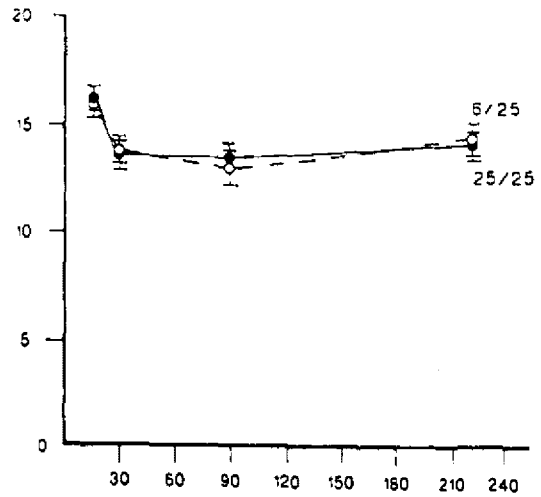
Although a way can not be found to link the diet effects on the granule cell with the hippocampal pyramidal cell components of the hippocampal trisynaptic circuit, it is clear that there is a pervasive effect of prenatal protein deprivation on this circuit and that this effect is most marked on the granule cells in the fascia dentata. Alterations in the trisynaptic circuit, which is thought to play a major role in memory function, could play a significant role in the development of the behavioral deficits found in human malnutrition. In human infants the effects of early concurrent

NUMBER OF DENDRITIC INTERSECTIONS

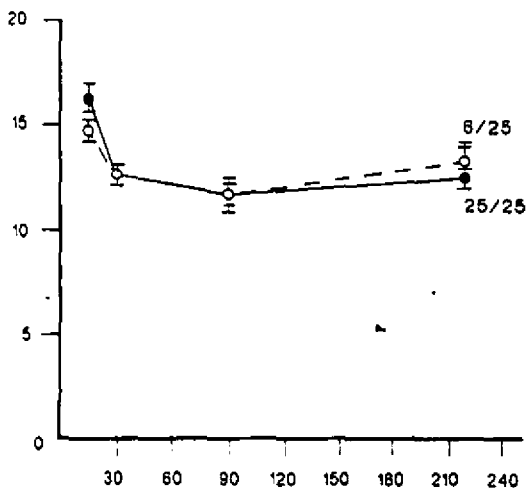
COMPARISON OF RING 4 (152 microns) AT P15 WITH RING 6 (228 microns) AT P30, 90, 220



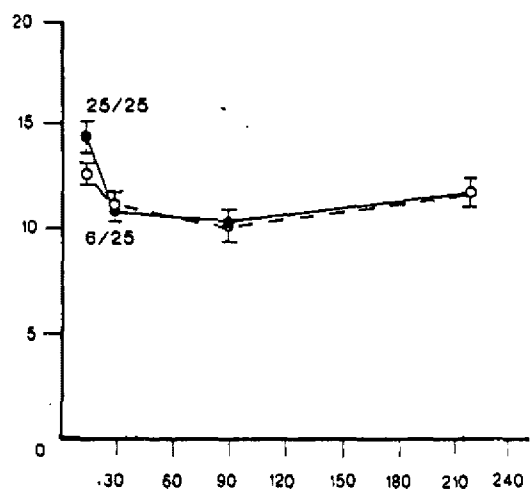
COMPARISON OF RING 5 (190 microns) AT P15 WITH RING 7 (288 microns) AT P30, 90, 220



COMPARISON OF RING 6 (228 microns) AT P15 WITH RING 9 (324 microns) AT P30, 90, 220



COMPARISON OF RING 7 (266 microns) AT P15 WITH RING 10 (380 microns) AT P30, 90, 220



AGE IN DAYS

FIGURE 6. Effect of prenatal protein deprivation on the number of dendritic intersections on comparable rings at P15, P30, P90, and P220. Bars = mean  $\pm$  std error.

malnutrition include apathy, altered mother-infant interactions, delays in language acquisition, and abnormal crying patterns. Long-term sequela of early childhood malnutrition include decreased IQ scores, impaired intersensory integration, poor school performance, low self-esteem, and a major increase in attention deficit disorder in adolescence and early adulthood (Galler et al., 1983, 1990; Galler and Ross, 1993). The more marked effect of the low protein diet on the granule cells is in accord with Altman (1987), who suggested that the response of hippocampal dentate granule cells to environmental stresses may

be a significant factor in the development of postnatal disabilities. Our anatomical studies show that prenatal protein malnutrition also has a marked effect on postnatal hippocampal development of CA1 and CA3 pyramidal cells, and this effect is also likely to play a role in developmental disabilities.

**Acknowledgments**

This study was supported by NIH (HD-22539) and DGAPA-UNAM (IN-202891, IN-204892, IN-204093, IN-208494, and

IN-209195) grants. We are grateful to A. Galván for technical assistance and to Isabel Pérez Monfort for her inestimable help with early revisions.

## REFERENCES

- Ahmed MGE, Bedi KS, Warren MA, Kamel MM (1987) Effects of a lengthy period of undernutrition from birth and subsequent nutritional rehabilitation on the synapse: granule cell neuron ratio in the rat dentate gyrus. *J Comp Neurol* 263:146-158.
- Allison JB, Wannemacher RW (1965) The concept and significance of labile and overall protein reserves of the body. *Am J Clin Nutr* 16:445-452.
- Altman J (1987) Morphological and behavioral markers of environmentally induced retardation of brain development: an animal model. *Environ Health Perspect* 74:153-168.
- Amaral DG, Dent JA (1981) Development of the mossy fibers of the dentate gyrus. I. A light and electron microscopic study of the mossy fibers and their expansions. *J. Comp. Neurol.* 195:51-86.
- Austin KB, Beiswanger C, Bronzino JD, Austin-LaFrance RJ, Galler JR, Morgane PJ (1992) Prenatal protein malnutrition alters behavioral state modulation of inhibition and facilitation in the dentate gyrus. *Brain Res Bull* 28:245-255.
- Austin-LaFrance RJ, Morgane PJ, Bronzino JD (1991) Prenatal malnutrition and hippocampal function: rapid kindling. *Brain Res Bull* 27:15-18.
- Barnes CA (1983) The physiology of the senescent hippocampus. In: *Neurobiology of the hippocampus* (Seifert W, ed), pp 87-108. London: Academic Press.
- Bedi MF (1991) Effects of undernutrition during early life on granule cell numbers in the rat dentate gyrus. *J Comp Neurol* 311:425-433.
- Bronzino JD, Austin-LaFrance RJ, Morgane PJ, Galler JR (1991a) Effects of prenatal protein malnutrition on kindling-induced alterations in dentate gyrus granule cell excitability. I. Synaptic transmission measures. *Exp Neurol* 112:206-215.
- Bronzino JD, Austin-LaFrance RJ, Morgane PJ, Galler JR (1991b) Effects of prenatal protein malnutrition on kindling-induced alterations in dentate gyrus granule cell excitability. II. Paired pulse measures. *Exp Neurol* 112:216-223.
- Bronzino JD, Abu-Hasaballah K, Austin-LaFrance RJ, Morgane PJ (1995) Quantitative analysis of long-term potentiation in the hippocampal dentate gyrus of the freely-moving 15-day-old rat. *Brain Res Bull* 36:321-324.
- Cintra L, Diaz-Cintra S, Galván A, Kemper TL, Morgane PJ (1990) Effect of protein undernutrition on the dentate gyrus in the rat of three age groups. *Brain Res* 532:271-277.
- Cintra L, Granados L, Aquilar A, Diaz-Cintra S, Kemper T, DeBassio W, Galler J, Morgane PJ, Diaz-Cintra S (1997) Effects of prenatal protein malnutrition on mossy fibers of the hippocampal formation in rats of four age groups. *Hippocampus* 7:184-191.
- DeBassio WA, Kemper TL, Galler JR, Tonkiss J (1994) Prenatal effect of protein deprivation on pyramidal and granule cell generation in the hippocampal formation. *Brain Res Bull* 35:57-61.
- DeBassio WA, Kemper TL, Galler JR, Tonkiss J (1996) Effect of prenatal protein deprivation on postnatal granule cell generation in the hippocampal dentate gyrus. *Brain Res Bull* 41:379-383.
- Díaz-Cintra S, Cintra L, Galván A, Aguilar A, Kemper TL, Morgane PJ (1991) Effects of prenatal protein deprivation on postnatal development of granule cells in the fascia dentata. *J Comp Neurol* 310:356-364.
- Díaz-Cintra S, García-Ruiz M, Corkidi G, Cintra L (1994) Effects of prenatal malnutrition and postnatal nutritional rehabilitation on CA3 hippocampal pyramidal cells in rats of four ages. *Brain Res* 662:117-126.
- Eckenhoff MF, Rakic P (1991) A quantitative analysis of synaptogenesis in the molecular layer of the dentate gyrus in the rhesus monkey. *Dev Brain Res* 64:129-135.
- Eichenbaum H, Cohen NJ (1988) Representation in the hippocampus: what do hippocampal neurons code? *Trends Neurosci* 11:244-248.
- Feldman ML, Peters A (1979) A technique for estimating total spine numbers on Golgi-impregnated dendrites. *J Comp Neurol* 188:527-542.
- Fish I, Winick M (1969) Effect of malnutrition on regional growth of the developing rat brain. *Exp Neurol* 25:534-540.
- Galler JR, Ross R (1993) Malnutrition and mental development. In: *Textbook of pediatric nutrition* (Suskind R, Lewinter-Suskind L, eds), pp 173-179. New York: Raven Press.
- Galler JR, Tonkiss J (1991) Prenatal protein malnutrition and maternal behavior in Sprague-Dawley rats. *J Nutr* 121:762-769.
- Galler JR, Ramsey F, Solimano G, Lowell WE (1983) The influence of early malnutrition on subsequent behavioral development II. Classroom behavior. *J Child Psychiatry* 22:16-22.
- Galler JR, Ramsey F, Morley DS, Archer E (1990) The long term effects of early kwashiorkor compared with marasmus. IV. Performance on the national high school entrance examination. *Pediatr Res* 28:235-239.
- García-Ruiz M, Diaz-Cintra S, Cintra L, Corkidi G (1993a) Effect of protein malnutrition on CA3 hippocampal pyramidal cells in rats of three ages. *Brain Res* 625:203-212.
- García-Ruiz M, Parra L, Corkidi G, Cintra L, Diaz-Cintra S (1993b) Effect of prenatal malnutrition and postnatal nutritional rehabilitation on spine density of CA3 hippocampal pyramidal cells in rats. *Abstr Soc Neurosci* 19:1734.
- Goodlett CR, Valentino ML, Morgane PJ, Resnick O (1986) Spatial cue utilization in chronically malnourished rats: task-specific learning deficits. *Dev Psychobiol* 19:1-15.
- Jordan TC, Howell KE, McNaughton N, Heatlie PL (1982) Effects of early undernutrition on hippocampal development and function. *Res Exp Med* 180:201-207.
- Katz HB, Davies CA (1982) The effects of early-life undernutrition and subsequent environmental complexity at different ages on cerebral measures in rats. *Dev Brain Res* 5:53-64.
- Katz HB, Davies CA (1983) The separate and combined effects on early undernutrition and environmental complexity at different ages on cerebral measure in rats. *Dev Psychobiol* 16:47-58.
- Katz HB, Davies CA, Dobbing J (1982) Effects of undernutrition at different ages early in life and later environmental complexity on parameters of the cerebrum and hippocampus in rats. *J Nutr* 112:1362-1368.
- Lewis PD, Patel AJ, Belázy R (1979) Effect of undernutrition on cell generation in the rat hippocampus. *Brain Res* 168:186-189.
- Lynch G, Muller D, Seubert P, Larson L (1988) Long-term potentiation: persisting problems and recent results. *Brain Res Bull* 21:363-372.
- Morgane PJ, Miller M, Kemper TL, Stern W, Forbes W, Hall R, Bronzino J, Kissane J, Hawrylewicz E, Resnick O (1978) The effects of protein malnutrition on the development of the developing central nervous system in the rat. *Neurosci Biobehav Rev* 2:137-230.
- Morgane PJ, Austin-LaFrance RJ, Bronzino JD, Tonkiss J, Galler JR (1992) Malnutrition and the developing central nervous system. In: *The vulnerable brain and environmental risks. Vol. 1. Malnutrition and hazard assessment* (Isaacson R, Jensen K, eds), pp 3-44. New York: Plenum Press.
- Morgane PJ, Austin-LaFrance RJ, Bronzino JD, Tonkiss J, Diaz-Cintra S, Cintra L, Kemper TL, Galler JR (1993) Prenatal malnutrition and development of the brain. *Neurosci Biobehav Rev* 17:91-128.
- Paula-Barbosa MM, Andrade PJ, Castedo JL, Azevedo FR, Camoes I, Volk B, Tavares MA (1989) Cell loss in the cerebellum and hippocampal formation of adult rats after long-term low-protein diet. *Exp Neurol* 103:186-193.

- Philbrick DJ, Hill DC (1974) Development of malnutrition in rats. *Am J Clin Nutr* 27:813-818.
- Pokorny J, Yamamoto T (1981) Postnatal ontogenesis of hippocampal CA1 area in rats. II. Development of ultrastructure in stratum lacunosum and moleculare. *Brain Res Bull* 7:121-130.
- Rosene DL, Van Hoesen GW (1987) The hippocampal formation of the primate brain. A review of some comparative aspects of cytoarchitecture and connections. In: *Cerebral cortex*, Vol. 6 (Jones EG, Peters A, eds), pp 345-456. New York: Plenum Press.
- Sholl DA (1953) Dendritic organization of the neurons of the visual and motor cortices of the cat. *J Anat* 87:387-406.
- Steward O, Falk PM (1991) Selective localization of polyribosomes beneath developing synapses: a quantitative analysis of the relationships between polyribosomes and developing synapses in the hippocampus and dentate gyrus. *J Comp Neurol* 314:545-557.
- Stewart RJC, Merat A, Dickerson JWT (1974) Effect of a low protein diet on mother rats on the structure of the brains of the offspring. *Biol Neonate* 25:125-134.
- Tevier TJ, Discenna P (1984) The topographical anatomy of the hippocampus: a clue to its function. *Brain Res Bull* 12:711-719.
- Tonkiss J, Galler JR (1990) Prenatal protein malnutrition and working memory performance in adult rats. *Behav Brain Res* 40:95-107.
- Tonkiss J, Galler JR, Formica RN, Shukitt-Hale B, Timm RR (1990) Fetal protein malnutrition impairs acquisition of a DRL task in adult rats. *Physiol Behav* 48:73-77.
- West CD, Kemper TL (1976) The effect of a low protein diet on the anatomical development of the rat brain. *Brain Res* 107:211-237.

## Effects of prenatal protein malnutrition in the total number of synapses in the CA3 hippocampal formation

L. Granados<sup>1,2</sup>, S. Díaz-Cintra<sup>2</sup>, L. Cintra<sup>2</sup>, G. Gutiérrez-Ospina<sup>2</sup>, A. Rondán<sup>3</sup>, A. Aguilar<sup>2</sup>, y J. Larriva-Sahd<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Unidad de Investigación en Salud Infantil, Instituto Nacional de Pediatría S.A. 04530, México

<sup>2</sup>Centro de Neurobiología, Universidad Nacional Autónoma de México, 76230, México

<sup>3</sup>Biología Cel y Tis., Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, 76230, México

### 1. Introduction

The quantification of synaptic ultrastructural features is of vital importance in neurobiology. It is generally accepted that synaptic contact zones are dynamic structures able to modify their morphological, chemical, physiological and functional properties throughout the animal's lifespan. Such changes are also accompanied by alterations in the number of synapses. The hippocampal formation is a structure thought to play a critical role in spatial memory and learning abilities (1). These behavioral features are altered in malnourished rats. Thus this study goal was to quantify the number of synapses established between the granule cells axons (i.e., mossy fibers) and the CA3 pyramidal cells dendritic excrescences (MF-CA3 synapses) in adult rats (220 days old) following prenatal malnutrition. We have selected this relay because it is a major link in the hippocampal trisynaptic circuit and it displays noticeable plastic capabilities under different experimental conditions.

### 2. Materials and methods

Sprague Dawley female rats were fed either with 6% or 25% casein diets 5 weeks before conception. Following delivery, litters born from 6% and 25% casein fed rats were randomly cross-fostered with 25% casein diet fed dams and maintained on this diet until sacrificed (220 days old). To estimate the total number of MF-CA3 synapses in the hippocampal formation *stratum lucidum* of control and prenatal malnourished rats, we carried out a two stage morphological analysis. In the first stage the reference volume ( $V(\text{ref})$ ) was estimated at the light microscope level using Timm-stained material. In the second stage, the numerical density ( $N_v$ ) of MF-CA3 synapses was estimated at the electron microscopic level. Blocks of tissue containing the hippocampal formation *stratum lucidum*, were thus processed for electron microscopy according to standard procedures and epon embedded. 10-12 serial ultrathin sections were cut and collected on Formvar-

coated grids for each block. Micrographs were then obtained of the same area from each set of serial ultrathin sections. Pairs of micrographs taken from adjacent sections were compared to quantify the MF-CA3 synapses using the physical disector method (2). The total number of MF-CA3 synapses ( $N(\text{syn})$ ) was calculated as the product of the total reference volume of hippocampal formation *stratum lucidum* and the numerical density per unit volume  $N(\text{syn}) = V(\text{ref}) \cdot N_v$ . Statistical significance ( $p < 0.05$ ) was determined using Student's *t* tests.

### 3. Results

**Qualitative observations.** In accord to previous studies (3), the basic organization pattern of the MF-CA3 synapses in the hippocampal formation *stratum lucidum*, was unaffected by the diet since it was similar in control and prenatal malnourished rats.

**Quantitative observations.** The total reference volume of the hippocampal formation *stratum lucidum*, in the Timm-stained material showed that prenatal protein malnutrition does not produce any significant effect on this parameter. The numerical density per unit volume of MF-CA3 synapses in the structural study was however significantly reduced in prenatal malnourished rats when compared to control littermates ( $p < 0.001$ ). Similarly, the absolute total number of MF-CA3 was significantly diminished in malnourished rats as compared to control animals ( $p < 0.001$ ).

### 4. Comments

Previous neuroanatomical studies conducted in malnourished rats have revealed significant alterations in the CA3 pyramidal cells dendritic excrescences (4), as well as in the granule cell mossy fibers terminal plexus (5). In the present study we have demonstrated, using electron microscopy and unbiased stereological method, a long-term decrease in the total number of MF-CA3 synapses in prenatal malnourished rats. These results might explain the functional impairments observed in the neuronal trisynaptic circuit of the hippocampal formation, explaining thus the learning and memory changes documented in prenatal malnourished rats.

### 5. References

1. Eichenbaum H., and Cohen N. J., *Trends Neurosci*, 11 (1988) 224.
2. West M. J. et al. *Neurocitology* (1997).
3. Amaral D. J. and Dent J. A. *J Comp Neurol*, 195 (1981) 51.
4. Cintra et al., *Hippocampus*, 7 (1997) 184.
5. Cintra et al., *Hippocampus*, 7 (1997) 192.