



03068
7
2.8

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

COLEGIO DE CIENCIAS Y HUMANIDADES
UNIDAD ACADÉMICA DE LOS CICLOS PROFESIONAL Y DE
POSGRADO
CENTRO DE NEUROBIOLOGÍA

EFFECTO DE LA MALNUTRICION HIPOPROTEINICA
PRENATAL SOBRE EL DESARROLLO DE LAS FIBRAS
MUSGOSAS DE LA FORMACION HIPOCAMPICA

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS FISIOLÓGICAS
P R E S E N T A :
BIOL. LETICIA GRANADOS ROJAS

DIRECTOR DE TESIS:
DR. LEON CINTRA McGLONE

MEXICO, D. F.

ABRIL 1995



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

**EFECTO DE LA MALNUTRICIÓN HIPOPROTEÍNICA
PRENATAL SOBRE EL DESARROLLO DE LAS FIBRAS
MUSGOSAS DE LA FORMACIÓN HIPOCÁMPICA.**

Biol. Leticia Granados Rojas.

**Centro de Neurobiología
Universidad Nacional Autónoma de México**

Y

**Departamento de Neuromorfometría
Unidad de Investigación en Salud Infantil
Instituto Nacional de Pediatría**

El presente trabajo de tesis fue realizado en el Centro de Neurobiología de la UNAM, bajo la dirección del Dr. León Cintra McGlone.

DEDICATORIA

Con profundo cariño y gratitud

a mis padres:

Eulalio Granados Sandoval y

Martha Rojas de Granados

por su apoyo y fortaleza.

A mis hermanos:

Martha

Alma

Francisco

Dalia y

Armida.

A mis amigos y compañeros.

AGRADECIMIENTOS

Un agradecimiento muy especial a los Dres. Sofia Díaz-Cintra y León Cintra por su dirección, asesoramiento, apoyo y facilidades brindadas para la realización del presente trabajo.

A los miembros del jurado: Dr. Manuel Salas Alvarado, Dra. Carolina Escobar Briones y M. en C. Viktor Romero Díaz, por las valiosas observaciones hechas al manuscrito y por sus acertadas sugerencias al presente trabajo.

A mis compañeros del Centro de Neurobiología de la U. N. A. M., Azucena, Pilar, Esther y Agustín por la ayuda proporcionada para la realización del presente trabajo.

A los integrantes del laboratorio de imágenes del Instituto de Instrumentos de la U. N. A. M., Dr. Gabriel Corkidi Blanco e Ing. Roberto Usísima por el apoyo técnico brindado en el manejo del sistema de imágenes digitalizadas.

Agradesco el apoyo brindado por mis compañeros del Instituto Nacional de Pediatría: Mary, Rosy, Gloria, Ara, Marco, Armando Julio y Eri.

RECONOCIMIENTO

A los Dres. Silvestre Frenk Freud e Ismael Lares del Instituto Nacional de Pediatría, con quienes estoy en deuda por permitir que el presente trabajo se llevara a cabo en colaboración con el Centro de Neurobiología de la U. N. A. M.

ÍNDICE

	Pág.
RESUMEN	3
SUMMARY	4
INTRODUCCIÓN	5
FORMACIÓN HIPOCÁMPICA	5
Localización	6
Citoarquitectura	6
Células granulares y fibras musgosas	8
Conexiones y circuito trisináptico hipocámpico	8
Desarrollo del hipocampo	10
Función	17
DESNUTRICIÓN Y MALNUTRICIÓN	17
Estudios sobre desnutrición y malnutrición	20
OBJETIVOS	24
HIPÓTESIS	25
MATERIAL Y MÉTODOS	26
Animales	26
Tratamiento nutricional	26
Reproducción	26
Asignación de sujetos a los grupos de estudio	28
Procedimiento histológico	28
Perfusión	28
Tinción	28
Análisis morfométrico	30

Análisis estadístico	31
RESULTADOS	32
Peso corporal y cerebral	32
Fibras musgosas	33
DISCUSIÓN	35
Fibras musgosas	35
Importancia de la malnutrición en el circuito trisináptico hipocámpico	44
CONCLUSIONES	48
REFERENCIAS	51

RESUMEN

En la formación hipocámpica se identifica un circuito trisináptico que juega un papel muy importante en procesos cognitivos como el aprendizaje y la memoria espacial en la rata. El primer eslabón de este circuito lo forman las proyecciones corticales entorrinales hacia las dendritas de las células granulares del giro dentado. Estas forman un plexo axonal conocido como fibras musgosas que hacen sinapsis con las dendritas (segundo eslabón) de las neuronas piramidales del *Cornu Ammonis* 3 (CA3) del hipocampo. El tercer eslabón del circuito lo forman las colaterales de Schaffer provenientes de estas células, que a su vez establecen sinapsis con las dendritas de las células piramidales del *stratum radiatum* del *Cornu Ammonis* 1 (CA1) de la formación hipocámpica.

Por otra parte, se sabe que la malnutrición prenatal afecta de manera importante la organización estructural de éste triple circuito, así estudios previos donde se ha aplicado el mismo paradigma de desnutrición usado en el presente trabajo, han mostrado alteraciones en el tamaño del soma, en la densidad de las espinas y de las ramas dendríticas (aférencias) de las células granulares del giro dentado y piramidales del propio hipocampo. Sin embargo, poco se sabe acerca de los efectos de la mala nutrición proteínica prenatal sobre las eferencias de las células granulares del giro dentado.

En el presente estudio se analizó el efecto de la mala nutrición proteínica prenatal y de la subsecuente rehabilitación nutricional postnatal, sobre las fibras musgosas mediante el empleo de un análisis morfométrico computarizado, con el propósito de cuantificar los cambios morfológicos en el área ocupada por este plexo.

Se administró una dieta hipoproteínica e isocalórica (6% de caseína) a ratas hembras de la cepa Sprague Dawley durante cinco semanas antes del apareamiento y la gestación. Al nacimiento, las crías fueron asignadas a madres nodrizas alimentadas con una dieta normal (25% de caseína), estableciendo, con ésto la rehabilitación nutricional postnatal (grupo 6/25). El grupo control fue alimentado con una dieta normal tanto prenatalmente como postnatalmente (grupo 25/25). Los animales machos se sacrificaron a los 15, 30, 90 y 220 días de edad. Se extrajeron los cerebros y se procesaron con la técnica de Timm que tiñe selectivamente los axones de las células granulares y evidencia la laminación de la formación hipocámpica. El análisis morfométrico se llevó a cabo en imágenes digitalizadas del plexo musgoso en cinco niveles; desde la porción rostral a la caudal del hipocampo, en el grupo control (25/25) y en el malnutrido prenatalmente (6/25).

Los resultados mostraron disminución significativa del área ocupada por las fibras musgosas en los animales malnutridos prenatalmente a los 15 días de edad en los niveles 2, 3 y 4. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la edad de 30 días. En los animales de 90 días solamente se presentó una reducción en el nivel 1, y en todos los niveles a los 220 días de edad.

Estos resultados son similares a los obtenidos en trabajos anteriores de las células granulares usando el mismo paradigma de desnutrición (Díaz-Cintra y col., 1991) en el sentido de que se observan sobre todo efectos a largo plazo en las células granulares, origen de las fibras musgosas. Además indican que la desnutrición afecta tanto a las aférencias como a las eferencias de las células granulares del giro dentado. Lo que sugiere probablemente deficiencias en la información transmitida a través de este circuito ya que las células granulares representan el primer elemento en la cadena y son componentes complementarios de la primera y segunda sinapsis del circuito trisináptico hipocámpico, circuito que se ha involucrado en los procesos de aprendizaje y memoria espacial en la rata.

SUMMARY

The hippocampal trisynaptic circuit is a substrate thought to play a critical role in learning and memory functions. The first limb of this circuit is represented by the entorhinal cortical projection to the granule cell dendrites of the dentate gyrus. The second limb is the granule cell axonal (mossy fiber) projection to the *stratum lucidum* of the CA3 pyramidal cells and the final limb the CA3 pyramidal cell (Schaffer collateral) projection to the *stratum radiatum* of the CA1 pyramidal cells.

Several studies have shown that prenatal protein malnutrition produces significant morphological alterations in cells size, complexity of spines and dendritic branching of the pyramidal and granule cells.

The present study was undertaken to investigate the effects of prenatal protein malnutrition and postnatal nutritional rehabilitation on development of the mossy fiber plexus, eferences of the granule cells in rats of 15, 30 90 and 220 days old.

Sprague Dawley female rats were fed either 6% or 25% casein diet 5 weeks before conception. Following delivery, litters born same day to 6% and 25% casein diet rats were randomly cross-fostered to 25% casein diet dams and maintained on that diet until sacrificed. The brains were removed and processed using a modification of the Timm's sulfide silver technique. The total area of the mossy fiber plexus was measured with a computer-assisted imaging technique, HISTO 2000 (Biocom, France), the results were expressed as their area in square millimeters.

The results show decrement of the mossy fiber plexus in the prenatally malnourished rats on postnatal day 15 at levels 2, 3, and 4, on day 90 at level 1, and on day 220 at all five levels.

Present findings are similar to that noted at the same four ages in prior studies of the granule cell dendrites in morphometric Golgi studies. In these studies were found marked effect of the diet on the granule cell dendrites in the outer two-thirds of the molecular layer of fascia dentata. This is the site of termination of the perforant pathway projection from the entorhinal cortex.

INTRODUCCIÓN

FORMACIÓN HIPOCÁMPICA

La formación hipocámpica (FH) como parte del Sistema Nervioso Central (SNC), fue estudiada por Ramón y Cajal desde 1892 y por Lorente de Nó en 1934, ambos hicieron descripciones anatómicas detalladas de la misma. Esta estructura forma parte del sistema límbico el cual se ha relacionado con la integración tanto de procesos afectivos como cognoscitivos. Su organización anatómica es única por lo que presenta ciertas ventajas para llevar a cabo diversos estudios histoquímicos, electrofisiológicos y anatómicos encaminados a entender los cambios funcionales que se presentan durante la desnutrición y la mala nutrición prenatal, así como en la rehabilitación nutricional en el SNC.

Dentro de estas ventajas se encuentran las siguientes: 1) su organización anatómica es relativamente simple lo cual facilita su análisis; 2) su neurofisiología básica está bien comprendida en varias especies de mamíferos; 3) la formación hipocámpica presenta un tipo neuronal característico en cada una de sus partes: así las células granulares son típicas en el giro dentado y las células piramidales lo son de los campos CA1 y CA3; 4) cada campo tiene una organización dendrítica simple que está caracterizada por aferencias que son segregadas en capas o láminas entre las dendritas de las neuronas de estas capas; 5) en los mamíferos, el hipocampo es una de las estructuras que se afectan más en su desarrollo ontogenético por factores ambientales como la desnutrición; 6) el hipocampo parece estar involucrado en procesos cognitivos como el aprendizaje y la memoria y 7) las neuronas del hipocampo en especies altriciales son generadas antes y después del nacimiento lo que permite realizar estudios del efecto de la desnutrición sobre los procesos ontogenéticos prenatales y postnatales.

LOCALIZACIÓN

En los roedores, la formación hipocámpica se encuentra inmersa en la corteza medial y basal del SNC. La estructura tridimensional de la formación hipocámpica, es relativamente compleja, a *grosso modo*, es una estructura elongada cuyo eje longitudinal se dobla en forma de "C" desde el núcleo septal rostro-dorsal al lóbulo temporal caudo-ventral. En los roedores, la formación hipocámpica ocupa la mayor parte de las paredes ventrolateral y posterior de la corteza cerebral (Amaral y Witter, 1989) (Fig. 1). El giro dentado o *fascia dentata*, es una banda delgada y estratificada que se encuentra rodeada por el resto de la formación hipocámpica, por lo que rostral y caudalmente el giro dentado sigue la forma curvada de la formación hipocámpica, toma el aspecto de "C" abierta y se continúa posteriormente con el giro supracallosa (Fig. 1).

CITOARQUITECTURA

La formación hipocámpica está formada por cuatro regiones relativamente simples que incluyen: 1) el giro dentado o *fascia dentata*; 2) el hipocampo propiamente dicho o *Cornu Ammonis* (CA), (Ramón y Cajal, 1911), el cual se compone de cuatro regiones: CA1, CA2, CA3 y CA4; 3) el complejo subicular (el cual también se divide en tres partes: subiculum, presubiculum y parasubiculum y 4) la corteza entorrinal que en los roedores se divide en medial y lateral (Amaral y Witter, 1989) (Fig. 2). Además, cada una de estas regiones se caracteriza por tener un tipo particular de neuronas: 1) piramidales en los campos CA1, CA2, CA3 y CA4 del propio hipocampo; 2) granulares que son exclusivas del giro dentado y que forman la capa granular de éste (Fig. 2); 3) células en cesta o gabaérgicas que se pueden encontrar en toda la formación hipocámpica y 4) células de la región hilar o polimorfas (Fig. 2).

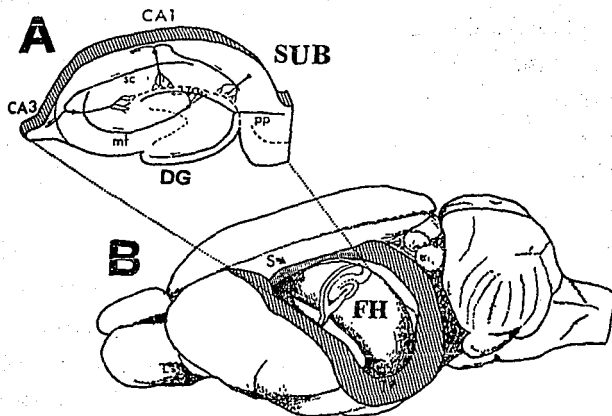
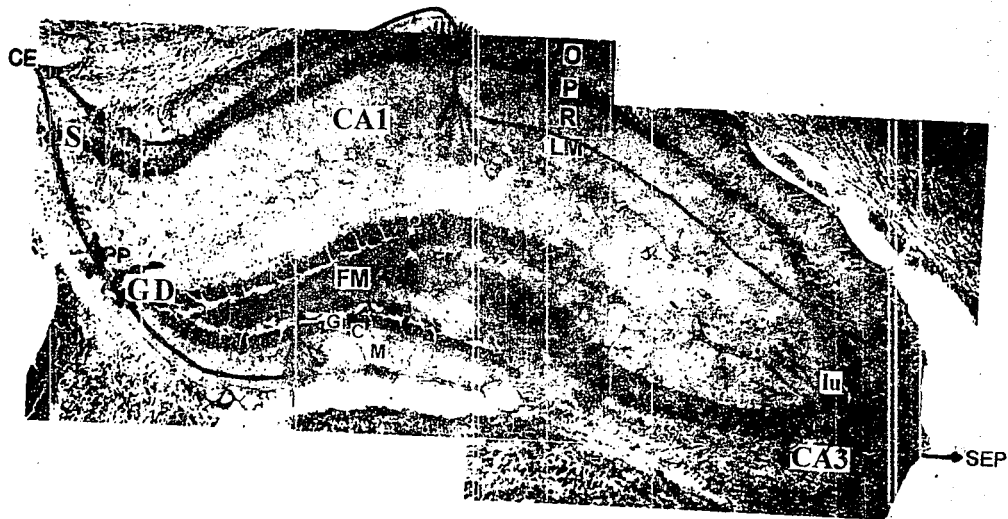


Figura 1. En B, se muestra el cerebro de la ratona en donde se ha separado la corteza para ubicar a la formación hipocámpica (FH). La figura muestra la FH elongada en forma de "C" con el eje mayor orientado de manera septo-temporal (corre desde el núcleo septal (S) rostralmente hacia la corteza temporal (T) ventrocaudalmente) y el eje menor orientado perpendicularmente al eje septo-temporal. Los campos principales de la formación hipocámpica (excepto para la corteza entorrinal se observan en la proyección superior de un corte hecho aproximadamente a la mitad del eje septo-temporal (A). GD, giro dentado; SUB Subiculum; pp; patrón perforante; SC; colaterales de Schaffer, mf, fibras musgosas, CA1 y CA3; *Cornu Ammonis* 1 y 3 respectivamente. (Tomado de Amaral y Witter, 1989).

El hipocampo propiamente dicho o *Cornu Ammons* (CA) en sus cuatro campos presenta las siguientes capas o *strata*: *oriens*, *piramidal*, *radiatum*, *lacunosum moleculare*, y *lucido* en el campo CA3. Esta separado del giro dentado por la fisura hipocámpica. En el *stratum piramidale* se encuentran los cuerpos o somas de las neuronas piramidales, dentro del *stratum oriens* descienden las dendritas basales de estas neuronas. La gran región acelular superficial a la capa piramidal, donde se localizan las dendritas apicales de estas células, se divide en una parte profunda: el *stratum radiatum* y un *stratum* más superficial: el *lacunosum-moleculare*. En el CA3, la región justamente encima de la capa piramidal recibe a las fibras musgosas provenientes del giro dentado a la cual se le ha llamado el *stratum lucidum* (Fig. 2).

Existen varias nomenclaturas para las porciones del giro dentado (GD), designaremos a la porción adyacente a la fisura hipocámpica como sección suprapiramidal o dorsal del GD; a la porción opuesta como sección infrapiramidal o ventral del mismo. A la parte donde se conectan como cresta y a los axones de las células granulares se les denomina, fibras musgosas. La citoarquitectura del GD consta de tres capas o *strata* que son: 1) la molecular o plexiforme, 2) la granular y 3) la hilar o polimorfa. En la granular se encuentran los cuerpos o somas de las células granulares, la molecular o plexiforme contiene las dendritas terminales de las células granulares y la polimorfa o hilar consta de una población celular de morfología heterogénea cuyos axones proyectan al tercio interno de la capa molecular, también en esta capa se encuentran las fibras musgosas (FM) del GD que conectan con el primer tercio de las células piramidales del campo CA3 (área de excrescencias torneadas en el *stratum lucidum*) (Fig. 2).



CÉLULAS GRANULARES Y FIBRAS MUSGOSAS (FM)

Los axones de las células granulares conocidos como FM forman la proyección principal hacia las células piramidales en el *stratum lucidum* del CA3, y representan la vía principal aferente de tipo excitatoria intrínseca que conecta el GD con el hipocampo (Anderson y col., 1971). El plexo de FM esta compuesto de axones finos no mielinizados con botones terminales gigantes (Haug, 1967; West y col., 1982; Blackstad y Kjaerheim, 1961) por lo que Cajal los llamó "fibras musgosas" (Ramón y Cajal, 1968). Estas terminales sinápticas contienen niveles altos de zinc (Haug, 1967; Danscher y col., 1976; Frederickson y Danscher, 1990).

Este plexo es demostrado o evidenciado con la técnica histoquímica de sulfuro de plata o "Timm" (Swanson y col., 1978; West y col., 1981; West y Hodges-Savola, 1983). Este marcador es usado ampliamente en la detección de cambios en los sistemas aferentes principales de la formación hipocámpica debido al patrón de tinción característico que coincide con la distribución de la laminación terminal de estas aferencias. Las fibras musgosas terminan (vía el haz suprapiramidal) en el *stratum lucido* de la región inferior del hipocampo sobre las dendritas apicales de las células piramidales. Las fibras musgosas infrapiramidales en el hipocampo se extienden totalmente en la región inferior a una región celular piramidal designada por Lorente de Nó (1934) como subcampo CA3c (área de las excrescencias torneadas en el *stratum lucidum*) (Fig. 2).

CONEXIONES Y CIRCUITO TRISINÁPTICO HIPOCÁMPICO

Las conexiones básicas de la formación hipocámpica fueron determinadas desde los estudios clásicos de Ramón y Cajal (1892) y Lorente de Nó (1934), y forman un circuito intrínseco que se ha definido como el circuito trisináptico hipocámpico (Figs. 2 y 3). Se inicia con las neuronas piramidales en la corteza

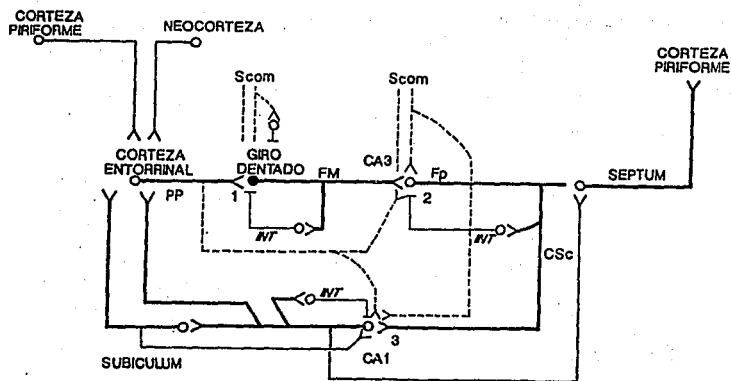


Figura 3. Esquema del circuito trisináptico hipocámpico y las principales conexiones de esta estructura. PP, patrón perforante; Scm, sistema comisural que conecta el hipocampo de los 2 hemisferios; FM, fibras musgosas; Fp, fornix precomisural; CSc, colaterales de Schaffer; INT, Circuitos locales inhibitorios recurrentes mediados por células gabaérgicas. Eslabones 1: células granulares, 2: células piramidales del CA3 y 3: células piramidales del CA1 del circuito trisináptico hipocámpico.

entorrinal que proyectan a la capa molecular del GD del hipocampo (vía el patrón perforante), estas fibras, continúan por la sustancia blanca y forman un paquete relativamente compacto, al que Ramón y Cajal llamó "haz angular". Las fibras de la vía perforante viajan dorsalmente y se doblan en el plano transversal, perforando la capa piramidal del subiculum a lo largo de su eje longitudinal y entran al GD, cruzan la fisura hipocámpica en la región de la cresta, se bifurcan y se extienden dentro de las láminas dorsal y ventral de la capa molecular del GD haciendo sinapsis con las dendritas apicales de las neuronas granulares de esta capa. Las ramas paralelas llegan al *stratum lacunosum-moleculare* del propio hipocampo (Steward, 1976; Amaral y Witter, 1989). Así, las células del GD son el receptor principal de las proyecciones de la vía perforante provenientes de la corteza entorrinal y constituyen el primer relevo en la entrada de información al circuito trisináptico del hipocampo. A su vez, las células granulares dentadas dan origen a axones conocidos como fibras musgosas, los cuales se ramifican ampliamente en la capa polimorfa antes de entrar al CA3 donde forman sinapsis *en passant* sobre las dendritas apicales (excrecencias torneadas) de las células piramidales, formando de esta manera las principales eferencias a la región CA3, integrando así el segundo relevo en el circuito trisináptico hipocámpico. A su vez las neuronas piramidales del CA3 presentan axones altamente ramificados conocidos como colaterales de Schaffer que terminan principalmente en el *stratum radiatum* del CA1 donde hacen sinapsis con las dendritas de las neuronas piramidales de este campo (tercer relevo sináptico), dando lugar a la principal proyección al CA1 (Fig. 3).

Las células piramidales de este campo proyectan de una manera columnar a la corteza subicular adyacente, además, otra pequeña proyección se dirige hacia las partes profundas de la corteza entorrinal. Por otro lado, las fibras del subiculum proyectan tanto a la corteza entorrinal como al pre y para subiculum,

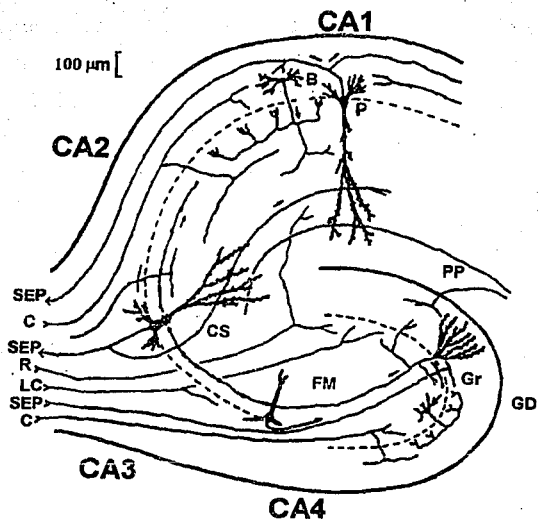


Figura 4. Esquema de un corte frontal de la formación hipocámpica en el que se muestran las vías aferentes y eferentes de esta estructura. CA1, CA2, CA3 y CA4 *Cornu ammonis* 1, 2 3 y 4 respectivamente; GD, giro dentado; PP, patrón perforante; FM, fibras musgosas; CS, colaterales de Schaffer; C, fibras comisurales; SEP, septum; LC, *Locus coeruleus*, R, *Raphe dorsalis*; S, núcleo septal; Gr, células granulares; P, células piramidales; B, células en cesta.

los que a su vez dan lugar a una proyección hacia las capas III y II respectivamente de la corteza entorrinal cerrando de esta forma el circuito de retroalimentación hacia las células de origen del patrón perforante. Las células de la capa polimórfica dan lugar a sistemas de asociación que terminan dentro del giro dentado (Amaral y Witter, 1989), (Figs. 2, 3 y 4).

DESARROLLO DEL HIPOCAMPO

Estudios previos han indicado que en el día embrionario (E) 14, el neuroepitelio en la pared dorsal del telencéfalo comienza a curvarse hacia el interior del ventrículo lateral. Esta curvatura se hace más pronunciada entre los días E15 y E16, y es un rasgo característico de la extensión cortical a la que se identifica como primordio hipocámpico del cual se formarán el subiculum, el *Cornu Ammonis* y el giro dentado (Altman y Bayer, 1990a).

Aunque el giro dentado es la última estructura en aparecer, su origen puede ser seguido desde estados tempranos del desarrollo. En el día E16 las células migran desde el neuroepitelio al área subpial en la concavidad formada por el neuroepitelio del *Cornu Ammonis* y el subiculum, este flujo migratorio es más evidente en el día E17. Durante los días E18 y E19, las células se acumulan en una masa subpial en forma de pelota formando el primordio dentado. Las células granulares que forman al GD, tienen un tiempo de generación muy largo, lo que es típico de poblaciones formadas por matrices germinales secundarias. Tempranamente en el hipocampo en desarrollo las células migran desde el neuroepitelio cercano a la región del crecimiento fimbrial dentro del primordio dentado y establece una nueva zona germinal, la cual permanece activa más allá del día 18 postnatal (P) hasta el periodo adulto (Altman, 1966; Bayer y Altman, 1974; Bayer, 1980b). El hecho de que la actividad mitótica postnatal de las células granulares continúa hasta el adulto fue reconocido primeramente por Altman, en

1963 y desde entonces, estos resultados han sido confirmados por Altman y Das (1965), Bayer (1982) y Bayer y Yackel (1982), entre otros.

Dentro de la formación hipocámpica las neuronas en cada región se originan superponiéndose, pero cada una tiene una curva de generación diferente. Así, la neurogénesis de la corteza entorrinal se lleva a cabo entre los días E15 al E17; la del para- y presubiculum entre los días E16 al E19; la del subiculum entre los días E16 al E18; la de las células gabaérgicas en los *estrata oriens, radiatum, lacunosum-moleculare* de los campos CA en los días E15 al E17; y las células piramidales entre los días E14 al E19. Las células piramidales del campo CA1 se generan después de aquellas localizadas en el campo CA3, colocándose en su posición final antes que las del campo CA3 (Altman y Bayer, 1990b). De acuerdo a Schlessinger y col. (1978) todas las neuronas de los campos se generan en el día E14 y las del CA4 se generan desde el día E14 al E17. Las de los campos CA 1, 2 y 3 se generan hasta el día E20. El pico de proliferación en los CA 2, 3 y 4 se lleva a cabo en el día E17 y en el CA1 existen dos picos, uno mayor al día E17 y uno pequeño al día E19, (Zimmer 1978). La generación de las células granulares se inicia en el día E14 (Schlessinger y Cowan, 1975) y del 15 al 20% se generan al momento del nacimiento y del 80-85% se generan postnatalmente, el 45% durante la primera semana, y sólo entre el 5 al 10% de las células se forman después del día P18. Así, el periodo de generación más activo es desde el nacimiento al día P15, con un extraordinario incremento entre el día P8 y el P15 (Altman y Dass, 1965; Bayer y Altman, 1974; Bayer 1980a) (Fig. 5). Las células gabaérgicas de la región hilar del GD y de la capa molecular dentada se generan entre los días E15 y el E19.

Los estudios autorradiográficos de la formación hipocámpica han mostrado la existencia de varios gradientes neurogenéticos y morfogenéticos:

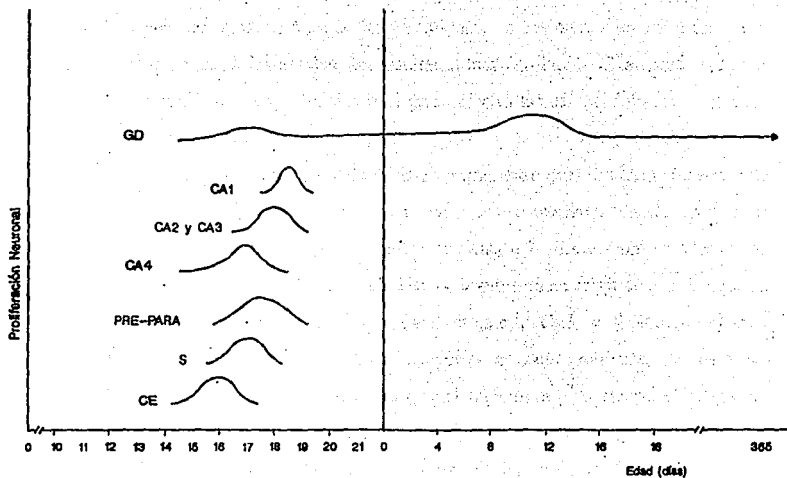


Figura 5. Curvas de generación de las diferentes estructuras que comprende la formación hipocámpica. CE, corteza entorrinal; PRE-PARA, pre y parasubiculum; S, subiculum; GD, giro dentado; CA1, 2 3 y 4, *Cornu Ammonis* 1, 2, 3 y 4, respectivamente.

1) Gradiente radial desde el interior al exterior (profundo-superficial) de la formación hipocámpica. Este gradiente se inicia con la generación de las células profundas seguidas de las superficiales, así las células localizadas en el *stratum oriens* son generadas antes que las piramidales en los diferentes campos. En el *stratum piramidale*, las células son generadas también intralaminarmente desde la parte profunda a la superficial. En el giro dentado las células hiliares se forman antes que las granulares.

2) Gradiente rinal a dentado. Existe un gradiente rinal-dentado con respecto al orden cronológico de generación entre las estructuras de la formación hipocámpica. Así, los grupos de células cercanas a la fisura rinal son formadas antes que las que se encuentran más lejanas, la primera en originarse es la corteza entorrinal, le sigue el subiculum, después el campo CA3, y finalmente el giro dentado. Dos estructuras son la excepción a este gradiente, el para- y presubiculum que se forman después que el subiculum y el campo CA1 que se forma después que el campo CA3.

3) Gradiente en "sandwich". Las últimas células en formarse son flanqueadas por células superficiales y profundas que se forman tempranamente. Así en la corteza entorrinal, las células de la capa III se originan después de las capas II y IV, y en los CA las células piramidales son flanqueadas por células que se forman tempranamente en los *estrata oriens, radiatum y lacunosum-moleculare*, de manera similar las células granulares en el giro dentado están rodeadas por células que se forman tempranamente en el hilio y en la capa molecular.

4) Gradiente eje temporal-septal. El parasubiculum y la capa granular tienen un gradiente desde el borde al centro donde la citogénesis en el nivel dorsal (septal) y ventral (temporal) precede a la de los niveles mediales (Bayer, 1980b).

Por otro lado, el examen de la localización final de las células granulares a diferentes estados revela tres gradientes distintos neurogenéticos en el giro dentado:

1) Las células en el labio dorsal del giro dentado tienden a ser formadas antes que las del labio ventral.

2) Las células en las porciones más caudales (polo temporal) del giro dentado son generadas antes que en regiones más rostrales (polo septal).

3) En todas las regiones de la capa granular las neuronas más superficiales en el estrato granuloso se forman antes que las de las partes profundas. Dentro de la capa de células granulares, las células formadas primeramente toman una posición superficial, las últimas células formadas son agregadas en la parte profunda de ésta (Altman y Das, 1965; Bayer y Altman, 1974; Schlessinger y Cowan, 1975; Zimmer, 1978).

La morfogénesis de la capa granular sigue el patrón de neurogénesis, aparece en el día E20 en los dos extremos del giro dentado y se completa en el día E22 (Bayer, 1980a). En el día E20, el labio dorsal (limbo ectal) de la capa granular aparece superficial al hilio en el giro dentado anterior y posterior pero no en las zonas intermedias horizontales y coronales. En los días E21 y E22, el limbo ectal de la capa granular se hace más aparente en el giro dentado, el labio ventral (limbo endal) es pequeño pero se desarrolla rápidamente en los primeros días después del nacimiento. La tasa de crecimiento más rápida (392%) de la capa granular ocurre entre los días E20-E21, sin embargo la tasa de crecimiento permanece alta en el periodo postnatal con el 50% y 21% de incremento volumétrico diario entre los días P21-P27, y P7-P21 respectivamente (Bayer, 1980b).

El desarrollo de los axones de las células granulares y de las fibras musgosas del hipocampo, han sido estudiadas con las tinciones de Golgi, y Timm así como

su ultraestructura. Las células granulares formadas tempranamente empiezan a formar fibras musgosas prenatalmente, ya sea durante el periodo largo relativo de migración a la capa granular o inmediatamente después de su arribo. Sin embargo, la mayoría de las células granulares son derivadas de un centro proliferativo secundario en el hilio y estas empiezan a producir fibras musgosas postnatalmente después de arrivar a la capa granular. Las fibras musgosas se producen en una secuencia que está relacionada a la posición final de las células de origen dentro de la capa granular. Esta secuencia también procede de una forma gradual desde un aspecto lateral a medial y de superficial a profundo de la capa granular. En el inicio, las fibras se elongan relativamente rápido. Alrededor del nacimiento la zona de fibras musgosas teñida con Timm ocupa la parte anterolateral del hilio y la parte adyacente suprapiramidal de la región inferior (Gaarskjaer, 1985). Con la tinción de Timm se identifican las fibras musgosas en el hilio del giro dentado y en el *stratum lucidum* incipiente del CA3 en el día P1 (Zimmer, 1978; Amaral y Dent, 1981). Dentro del hilio la tinción aparece tempranamente en la parte lateral y en los dos polos, temporal y septal (Zimmer y Haug, 1978; Zimmer, 1978). Después un incremento subsecuente en la densidad de la tinción, en el tamaño y en el número de partículas individuales (botones) y en el grosor de la capa, se observa entre los días P5 al P12. Con esta tinción en el día P18 el patrón de tinción maduro está en principio establecido. De acuerdo a Amaral y Dent (1981), este plexo es substancialmente maduro al día P21, pero continúa mostrando incrementos en el área y densidad de las partículas teñidas en el adulto. Hasta el día P420, aunque el tamaño de los botones de las fibras musgosas no parece incrementarse, su número, de acuerdo a la densidad de la tinción y una gran área cubierta por precipitados, parece haberse incrementado (Amaral y Dent, 1981).

La tinción de Timm muestra tres gradientes en el desarrollo de las fibras musgosas:

1) La porción suprapiramidal del hilio se tiñe antes que el hilio infrapiramidal. El hilio y el *stratum lucidum* del hipocampo temporal se tiñen antes que las mismas áreas a niveles más septales.

2) El *stratum lucidum* distal a el área dentada se tiñe intensamente antes que la porción proximal.

3) Las fibras musgosas intra e infrapiramidales se desarrollan después de las fibras musgosas suprapiramidales. Estos gradientes reflejan los gradientes de generación de las células granulares temporal a septal y suprapiramidal a infrapiramidal.

En el GD teñido con Golgi se confirma la presencia de fibras musgosas en el hilio al primer día postnatal. Los fascículos de fibras musgosas se observan en el *stratum lucidum* del hipocampo de 3 días y aunque estos axones inmaduros carecen de las grandes expansiones sinápticas estos tienen conos de crecimiento prominentes en sus terminales. Expansiones pequeñas a lo largo de la longitud de los axones aparecen primeramente en el día P7 y estos alcanzan aproximadamente el tamaño del adulto y una mayor complejidad alrededor del día P14. Sin embargo los componentes postsinápticos de las sinapsis de las fibras musgosas, es decir las excrescencias torneadas no empiezan a emerger de la porción proximal de las dendritas de las células piramidales sino hasta el día P9 y se prolongan hasta el día P21 en donde estas aparecen totalmente maduras.

Los eventos principales del desarrollo subsecuente de las células granulares del giro dentado estudiados con las tinción de Golgi muestran variación en su desarrollo dendrítico en las primeras semanas postnatales, coincidiendo con el tiempo de su neurogénesis más rápida. Seress y Pokorny (1981) y Zimmer (1978) notaron que las espinas dendríticas de las células granulares aparecen primeramente en el día P5 hasta el P7 y se desarrollan en el día P10 incrementándose en número hasta el día P25, además estas neuronas pueden tener

ramificaciones basales en la capa de células granulares durante su desarrollo. La forma del árbol dendrítico varía en relación a la profundidad de la localización del cuerpo celular en la capa granular (Green y Juraska, 1985). Las neuronas en el tercio superior de la capa granular tienen más material dendrítico que en los dos tercios inferiores que tienen un campo dendrítico más estrecho. La morfología de las espinas ha mostrado variaciones con la profundidad de las dendritas dentro de la capa molecular así como la densidad de espinas sobre las dendritas de las células granulares del nivel dorsal y ventral del giro dentado (Desmond y Levy, 1985). En relación con el pericarion y las dendritas proximales de las células granulares existe una terminal del plexo axonal derivada de las células en esta dentro del área inmediata de las células granulares.

Observaciones ultraestructurales de las fibras musgosas, indican que en el primer día postnatal, extensiones pequeñas e inmaduras de fibras musgosas presentan contactos sinápticos simétricos y asimétricos directamente con las dendritas apicales (Blackstad y Kjaerheim, 1961). Estos perfiles presentan la décima parte del tamaño de las expansiones maduras, crecen rápidamente entre los días postnatales del 1 al 9 e incrementan su área cinco veces. En el día 9, cuando las excrescencias torneadas emergen, las sinapsis asimétricas empiezan a asociarse con sus procesos espinosos. Basados en análisis cuantitativos de su patrón de ramificación en ratas adultas, Crair y col., (1973) en un estudio cuantitativo de microscopía electrónica del estrato molecular del giro dentado, encontraron menos del 1% del valor adulto de las sinapsis en el día P4, menos del 5% en el día P11 y cerca de los niveles adultos en el día P25. Finalmente, es claro que la mayor parte de fibras musgosas en animales de 21 días de edad, está en la mayor parte totalmente maduro, y un desarrollo más sutil está indicado por el incremento de área y densidad de las partículas teñidas en las preparaciones de Timm de animales adultos.

FUNCIÓN

En condiciones normales, la FH participa en el proceso de consolidación del aprendizaje y de la localización espacial (O'Keefe y Nadel, 1978; Barnes, 1988; Eichenbaum y Cohen, 1988; Eichenbaum y Otto, 1992). Se ha mostrado que cuando se lesionan las conexiones principales de la misma se ocasionan defectos en estos procesos, los cuales no pueden ser compensados, Olton y col. (1978) y Olton (1983).

Varios estudios han mostrado una correlación entre el tamaño de los campos terminales de las FM y el desarrollo conductual de animales en laberintos de agua y de habituación en un campo abierto y laberintos radiales (Crusio y Schwegler, 1987; Crusio y col., 1987). Estos estudios sugieren que las variaciones en el patrón normal de las FM puede influir sobre el procesamiento hipocámpico a través de alteraciones en el aprendizaje espacial (O'keefe y Nadel, 1978), memoria (Pico y Davis, 1984) y en la consolidación de la memoria (Teyler y DiScenna, 1986).

DESNUTRICIÓN Y 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 normal del SNC, depende de la interacción de éste con factores intrínsecos, regulados por un programa genético y de factores extrínsecos ambientales o epigenéticos (Cintra y Díaz-Cintra, 1985). Varios estudios han revelado que el SNC es altamente vulnerable a diversas alteraciones del medio ambiente, sobre todo cuando ocurren durante el periodo crítico o de rápido crecimiento neuronal (Dobbing y Sands, 1971, 1973). Por lo

que cualquier agente nocivo que se aplique durante este tiempo repercutirá negativamente en el desarrollo posterior del SNC.

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 sumamente diversas y complejas. Para describir los aspectos de este problema se han utilizado los términos de malnutrición o mala nutrición y subnutrición o desnutrición. Es importante distinguir entre subnutrición y malnutrición.

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, 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 vitaminas, sales y proteínas (Organización de las Naciones Unidas, 1985). Es el estado de desequilibrio, a nivel celular, entre el aporte de nutrimentos- por defecto o por exceso- y las necesidades del organismo para su mantenimiento, función, crecimiento y reproducción.

Es difícil determinar con precisión cuantas personas padecen de desnutrición en la actualidad. Las informaciones globales son incompletas, pero además los métodos para definir y medir la desnutrición varían entre sí. Según estimaciones de la FAO, a mitad de los años ochenta, en los países en desarrollo con economía de mercado sufrían una u otra forma de desnutrición unos 512 millones de personas, es decir, aproximadamente el 21% de su población. Más de la mitad de la población desnutrida vive en la región asiática (Organización de las Naciones Unidas, 1985).

La subalimentación en los países pobres es un problema grave de salud que afecta a grandes núcleos de población, se presenta en la forma de los complejos trastornos genéricamente conocidos como "desnutrición proteico-calórica" y constituye la principal causa (junto con las enfermedades infecciosas) de las tasas de morbi-mortalidad y escaso desarrollo físico y mental de millones de niños, perpetuando con ello la condición de "subdesarrollo" de los países pobres (Campuzano y col., 1990).

En México, al igual que en otros países, es insuficiente el consumo de proteínas de buena calidad y de otros nutrientes en general. En la encuesta nacional de alimentación (Campuzano y col., 1990), se estudiaron los aspectos propios de la nutrición principalmente en los niños. Los resultados preliminares de la encuesta permiten apreciar la grave situación que prevalece en el medio rural mexicano; situación que no se ha modificado en lo sustancial a lo largo de tres lustros. La prevalencia de la desnutrición en la población menor de 5 años, utilizando indicadores de peso para la edad y talla para la edad-perímetro mesobraquial, es del 50%. En las zonas del país con peores condiciones, la desnutrición se presenta en un 80% de los infantes. En cuanto al aspecto alimentario, se apreció una disminución notable en el consumo de proteínas de origen animal, así como la enorme desigualdad geográfica en el consumo de este tipo de alimentos (Campuzano y col., 1990)

Por otro lado, estudios en seres humanos han puesto en evidencia que la privación de algunos nutrientes ocasiona numerosas alteraciones en la estructura y por consiguiente en la función cerebral, observándose como consecuencia ciertas deficiencias en la capacidad mental de los individuos (Cravioto y Arrieta, 1985). Observaciones realizadas en niños recuperados del episodio agudo de la desnutrición avanzada, parecen confirmar los resultados obtenidos en la experimentación animal. Estos niños continúan presentando durante largo tiempo

estatura menor y desarrollo retardado, en comparación con niños de la misma edad y grupo étnico que no han sufrido desnutrición avanzada. Estos datos, ponen en claro que aún después de un periodo de varios meses los niños que han sido rehabilitados de la desnutrición severa y considerados como curados, mostraron defectos del desarrollo, no sólo en la conducta motora sino en otras áreas que incluyen audición y lenguaje, conducta personal social, habilidad para resolver problemas, coordinación ojo-mano y habilidades de categorización, de ahí que sea importante el estudio de la recuperación nutricional después de un periodo de malnutrición prenatal, para conocer cuales son las estructuras que están afectadas por una desnutrición prenatal y que permanecen alteradas a largo plazo.

Los estudios en animales de laboratorio han contribuido a la interpretación de diversos trastornos del desarrollo intelectual humano, y con el propósito de simular las condiciones tan complejas de la desnutrición a las cuales está sometida una gran proporción de la población humana. El uso de modelos experimentales de desnutrición en roedores ha permitido la determinación de ciertas alteraciones en el desarrollo cerebral en los mamíferos. Sin embargo, la secuencia y el momento en que se llevan a cabo las fases del desarrollo cerebral, 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 lo es el caso del ser humano y de la rata (Cintra y Díaz-Cintra, 1985).

ESTUDIOS SOBRE DESNUTRICIÓN Y MALNUTRICIÓN

Es bien conocido que la desnutrición en ratas durante el periodo perinatal trastorna el desarrollo del cerebro. De estudios llevados a cabo en los últimos años por varios autores, se ha mostrado que la desnutrición provoca cambios diversos

sobre la formación hipocámpica, los cuales incluyen cambios anatómicos (Fish y Winick, 1969; Stewart y col., 1974; West y Kemper, 1976; Katz y Davies, 1982, 1983; Katz y col., 1982; Ahmed y col., 1987; Paula-Barbosa y col., 1989; Morgane y col., 1993). La mayoría de estos estudios, se han realizado aplicando desnutrición pre y/o postnatal. Es así como Lewis y col. (1979), reportan retardo en la adquisición de células granulares del giro dentado en crías de ratas que se desnutrieron desde el día 6 de la gestación hasta la lactancia. Por otra parte, en este estudio también se midió el grosor de la capa granular y se encontró un decremento significativo de este parámetro. Ahmed y col. (1987) analizaron los efectos de la privación de alimento en ratas, la cual se instaló desde el día 18 de la gestación hasta el sacrificio, a los días 21, ó 75 ó 150 postnatales. En este paradigma, de desnutrición postnatal, el efecto de la dieta sobre las células granulares fue diferente para cada una de las edades. La densidad de sinapsis en la capa molecular se incrementó en el día P21, disminuyó en el día P27 y permaneció inalterada a los 150 días. También se encontró en ratas desnutridas y rehabilitadas desde los días P150 hasta los P250 de edad, un incremento significativo en el número de sinapsis en la capa molecular del giro dentado. West y Kemper (1976) y Morgane y col. (1978) encontraron que el grosor del hipocampo no se ve alterado por la desnutrición. Katz y col. (1982) y Katz y Davies (1982) midieron el espesor del hipocampo en ratas alimentadas con sólo la mitad de su dieta normal durante el periodo de gestación y lactancia, o durante el periodo de lactancia y el posdestete, observando decremento en el grosor del hipocampo solamente en ratas desnutridas durante la gestación y la lactancia. Este estudio enfatiza la importancia que la desnutrición ejerce en el desarrollo postnatal del hipocampo. En estudios posteriores Katz y Davies (1983) midieron el grosor de la formación hipocámpica, incluyendo al giro dentado y encontraron decrementos después de la desnutrición durante la lactancia. De acuerdo al

estudio de Paula-Barbosa y col. (1989) en ratas de 6, 12 y 18 meses de edad, el efecto de una dieta de caseína al 8% durante el periodo postnatal, produjo una disminución del grosor de la capa granular del giro dentado y de la del CA3 del hipocampo, además de un aumento en el empaquetamiento celular en ambas capas, concluyendo que la privación proteínica disminuye la densidad celular. Andrade y col. (1991) analizaron los efectos de una dieta al 8% de caseína en ratas macho durante 6, 12 y 18 meses, sobre la densidad sináptica de las neuronas piramidales del CA3, la cual encontraron reducida. Observaron además, una disminución de la fracción de membranas terminales de las fibras musgosas. Los autores infieren que el patrón de conectividad sináptica entre las terminales de las fibras musgosas y las dendritas de las neuronas piramidales del CA3, está alterado debido a la reducción en el número de contactos neuronales.

Por otro lado, Cintra y col. (1990) estudiaron el efecto de la malnutrición proteínica crónica ligera (aplicando una dieta al 8 % de caseína), sobre las células granulares del labio dorsal del giro dentado a los 30, 90 y 220 días de edad postnatal. Observaron en los animales malnutridos una reducción del eje mayor y menor del soma, así como del número de ramificaciones y espinas dendríticas en las tres edades estudiadas. En un estudio posterior Díaz-Cintra y col. (1991) reportaron que la privación proteínica prenatal del 6% de caseína sobre las células granulares del giro dentado a los 15, 30, 90 y 220 días, provoca efectos semejantes a los encontrados en el trabajo anterior aún después de la rehabilitación nutricional postnatal. Los resultados obtenidos con estos trabajos muestran que la desnutrición proteínica prenatal es suficiente para producir un efecto marcado sobre el tamaño del soma, ramificaciones y espinas dendríticas de las células granulares del giro dentado y que estos efectos persisten aún después de un periodo de rehabilitación nutricional postnatal, hasta los 220 días de edad. Si bien estos trabajos proporcionan información acerca de las vías de entrada de

información de las células granulares que forman el primer relevo dentro del circuito trisináptico hipocámpico, no existe información acerca del efecto de la malnutrición hipoproteínica prenatal y de la subsecuente rehabilitación nutricional sobre las eferencias de estas células que forman las fibras musgosas. Este plexo es de interés dado que varios estudios han mostrado que se altera su distribución por una variedad de agentes prenatales (West y Hodges-Savola, 1983) o neonatales (Lauder y Mugnani, 1980; West y Hamre, 1985; Cavazos y col., 1991; Represa y Ben Ari, 1992). Al mismo tiempo, es importante saber si estos efectos persisten aún después de la rehabilitación nutricional postnatal a corto y a largo plazo.

Aunque existe información sobre los efectos de la desnutrición en el hipocampo, es importante llevar a cabo estudios más detallados en relación a la anatomía y la función de esta estructura. Con este propósito y utilizando el modelo de la desnutrición prenatal seguida de la rehabilitación nutricional postnatal, se realizó un análisis morfométrico sobre las eferencias del giro dentado del hipocampo -las fibras musgosas- lo cual, aunado a hallazgos conductuales y electrofisiológicos previos, servirán para entender mejor la función de esta región del cerebro. Es importante mencionar que este estudio cubre una parte pequeña de un macroestudio que pretende valorar los efectos de la malnutrición prenatal sobre la morfología de los componentes del circuito trisináptico hipocámpico, que se ha involucrado en procesos de aprendizaje y memoria espacial (O'Keefe y Nadel, 1978; Barnes, 1988; Eichenbaum y Cohen, 1988; Eichenbaum y Otto, 1992).

OBJETIVOS

Determinar los efectos de la malnutrición proteínica prenatal y la subsecuente rehabilitación nutricional postnatal, sobre la morfología de las fibras musgosas utilizando la técnica de Timm (que hace evidente la laminación del giro dentado y de la formación hipocámpica), en particular, analizar los cambios en el área de distribución de las fibras musgosas de la formación hipocámpica.

Determinar si los efectos de la desnutrición prenatal sobre el peso corporal y cerebral pueden revertirse por la rehabilitación nutricional postnatal en diferentes edades (15, 30, 90 y 220 días).

HIPÓTESIS

Si la desnutrición hipoproteínica prenatal, produce retardo en los patrones de desarrollo neuronal de las células granulares del giro dentado cuyo desarrollo y diferenciación ocurren principalmente durante el periodo posnatal, este retardo se verá reflejado en la reducción del área de distribución de las fibras musgosas. Por otra parte, si los efectos permanecen a lo largo de la vida del animal desnutrido prenatalmente, éstos se podrán reconocer a los 15, 30, 90 y 220 días de edad.

MATERIAL Y MÉTODOS

ANIMALES

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

TRATAMIENTO NUTRICIONAL

Diez hembras se alimentaron con una dieta al 6% de caseína (futuras madres desnutridas) y 20 hembras con una dieta al 25% de caseína (futuras madres controles y nodrizas, 10 en cada grupo), durante cinco semanas antes del apareamiento (Ver Tabla I). Diez ratas macho fueron alimentados con una dieta al 25% o al 6% de caseína una semana antes del apareamiento.

REPRODUCCIÓN

Después de este periodo de malnutrición, se cruzaron 3 hembras con 1 macho expuestos a la misma dieta en una caja familiar (50 x 40 x 20). El inicio de la gestación se verificó con base en la presencia de espermatozoides en frotis vaginales (día 0 de gestación). Al día siguiente del parto, las camadas que nacieron el mismo día y de la misma dieta nutricional se sexaron y se mezclaron entre sí. Las crías descendientes de madres desnutridas se asignaron a madres nodrizas, las cuales se alimentaron con una dieta al 25% de caseína durante la gestación y lactancia, proveyendo con ésto la rehabilitación nutricional postnatal (6/25). A cada madre nodriza se le asignaron 4 hembras y 4 machos. Se procedió de la

misma forma con los animales control (25/25). El resto de las crías y las madres desnutridas se sacrificaron, de tal forma que se obtuvieron finalmente 10 madres nodrizas con 8 crías y 10 hembras control con 8 crías (Fig. 6). A los 21 días, se procedió al destete y se colocaron 4 animales en cada caja los cuales se separaron por sexos y por condición nutricional (Fig. 6). Los animales de ambos grupos se alimentaron con una dieta al 25% de caseína hasta el momento del sacrificio.

Para estudios histológicos del cerebro se seleccionó al azar 1 crío de cada camada a los 15, 30, 90 y 220 días de edad postnatal, tanto del grupo control como del experimental. Se registró el peso corporal de los críos en las edades anteriormente mencionadas.

TABLA I. COMPOSICIÓN NUTRICIONAL DE LAS DIETAS.

COMPONENTES	DIETAS	
	25 % de Caseína	6% de Caseína
Proteínas	21.8	5.3
Grasas	15.4	15.0
Carbohidratos	50.9	68.9
Sales minerales**	4.7	4.7
Vitaminas	1.0	1.0
Agua	2.2	1.2
Componentes no nutritivos	4.2	4.2
Kcal/g	4.3	4.3

Las dietas se suplementan con l-metionina (0.4 %) debido a la ausencia de este aminoácido esencial en la caseína. ** Se les adicionó fosfato de calcio monobásico y carbonato de zinc.

M E T O D O S

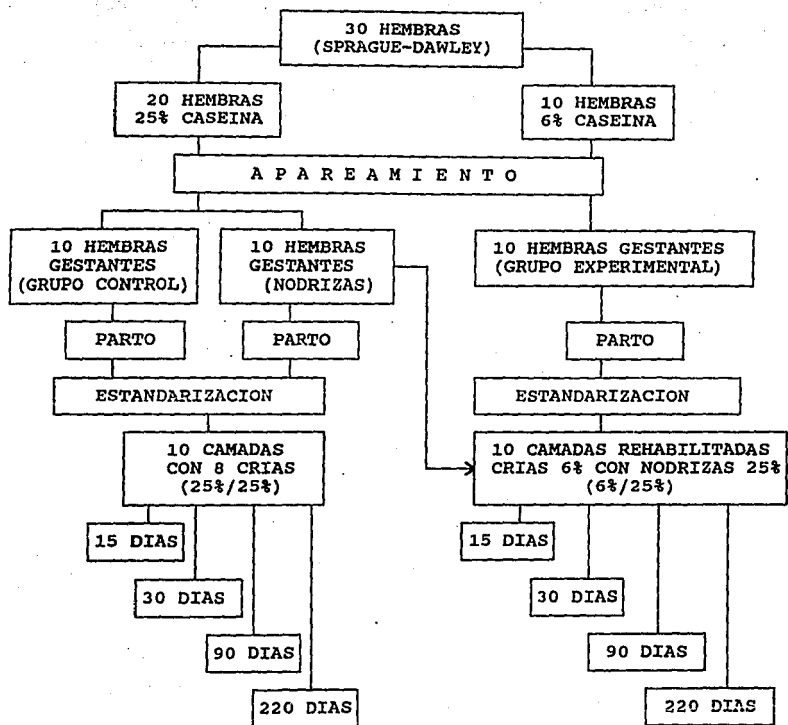


Figura 6. Material y métodos que se utilizaron para la realización del presente trabajo.

ASIGNACIÓN DE SUJETOS A LOS GRUPOS DE ESTUDIO

Ocho animales macho se utilizaron en cada condición experimental (6/25% y 25/25%) y en cada edad (15, 30, 90 y 220 días de edad), obteniendo un total de 64 animales para el estudio. Cumplida la edad requerida los animales escogidos al azar fueron procesados con la técnica de Timm.

PROCEDIMIENTO HISTOLÓGICO

PERFUSIÓN

Los animales de 15 días se anestesiaron con hidrato de cloral a una dosis de 35 gr/kg de peso y los de 30, 90 y 220 días con pentobarbital sódico.

La perfusión se llevó al cabo por vía intracardiaca iniciándose con una solución conteniendo sulfuro de sodio (5.85 gr) y fosfato de sodio monobásico (5.95) en 500 ml de agua destilada hasta que la dentina se observó oscura, la perfusión se continuó con el fijador "Karnowsky" (1.0% p/v de paraformaldehído y 1.25% v/v de glutaraldehído en 0.1 M de formol fosfatos pH 7.4) (West y col., 1981; West y Dewey, 1984). Después de 5 minutos de perfusión se extrajeron los encéfalos, se pesaron y se colocaron en frascos conteniendo una solución de glutaraldehído, paraformaldehído y sacarosa al 30%, se mantuvieron en el refrigerador durante 72 horas o hasta que el tejido se sumergiera en el fondo del frasco.

TINCIÓN

Posteriormente se procedió a cortar por congelación los bloques de tejido que contenían a la formación hipocámpica, los cortes obtenidos en un plano coronal se montaron en laminillas tratadas con sulfato de cromo y potasio siguiendo una estricta seriación. Se formaron cuatro series de cortes, las tres primeras de 40 micras y la cuarta de 120 micras. Estas secciones fueron

procesadas de acuerdo a una modificación de la técnica de Timm (sulfuro de plata) (West y col., 1981; West y Hodges-Savola, 1983). Las series 1 y 4 se deshidrataron y se montaron en resina sintética. Las series 2 y 3 se contrastaron con violeta de crecilo o teonina respectivamente (Fig. 2).

Este método fue introducido inicialmente por Timm en 1958 para la detección de metales pesados. El método histoquímico de sulfuro de plata demuestra un gran número de metales pesados transicionales y del grupo IIb, tiñe el neuropilo de la formación hipocámpica madura en láminas discretas correspondientes a los campos terminales de las vías aferentes (Haugh, 1974), así como el plexo axonal de fibras musgosas de las células granulares. Aunque con este método algunos sistemas de fibras no se tiñen como la vía perforante medial, debido a la distribución distintiva laminar de la mayoría de las vías aferentes a la región hipocámpica es útil para estudios del desarrollo normal de estas vías y para el análisis experimental de factores que influyen sobre el crecimiento y establecimiento de conexiones del SNC. El método de Timm es aplicado al tejido cerebral como sigue: El animal es perfundido con una solución de sulfuro de sodio, la cual genera metalosulfitos que se forman y precipitan en el tejido (precipitación endógena de metales pesados) que después son revelados físicamente para visualizar los metalosulfitos sobre los cuales la plata metálica se precipita, esto es debido a la presencia de un agente reductor (hidroquinona) y un estabilizador (goma arábiga). El método de Timm tiñe las vesículas sinápticas de los botones de las fibras musgosas y sus hendiduras sinápticas asociadas. Además tiñe de manera diferencial el sitio de la terminación de las vías perforantes medial y lateral y la vía de asociación en la capa molecular del giro dentado (Gaarskjaer, 1986) (Fig. 2).

ANÁLISIS MORFOMÉTRICO

Con el propósito de medir los cambios en la magnitud del área total de disyribución de las fibras musgosas de la formación hipocámpica, se usó un equipo de análisis de imágenes digitalizadas computarizado el cual convierte la imagen analógica que se observa en el microscopio óptico (objetivo 4x) en digital. Con la ayuda de una cámara de alta resolución la imagen pasa a un monitor de computadora y ésta es procesada con la ayuda del programa "histo 2000" de Biocom, France (Corkidi, 1989). Con este sistema se delimitó con un cursor el perímetro de las fibras musgosas sobre una pantalla de un monitor de computadora (Fig. 7) y los resultados del área fueron expresados en mm^2 . Se hicieron los dibujos o cartografías, así como impresiones en láser de las fibras musgosas (Fig. 8).

El análisis morfométrico fue llevado a cabo en 5 niveles coronales (de rostral a caudal) del giro dentado entero. En las ratas de 90 y 220 días de edad, los cinco niveles coronales de la formación hipocámpica fueron considerados con referencia a bregma, de acuerdo al atlas de Paxinos y Watson (1986), como sigue: nivel 1, -2.3 mm, nivel 2, -3.3 mm, nivel 3, -4.16, nivel 4, -5.6 mm y nivel 5, -6.3 mm. (Figs. 9-13). En ratas de 15 y 30 días de edad las siguientes coordenadas de bregma fueron usadas (de acuerdo al atlas de Sherwood y Timiras, 1970): a 30 días: nivel 1, A 3.5 mm, nivel 2, A 3.2mm, nivel 3, A 2.6 mm, nivel 4, A 2.0 mm y nivel 5, A 0.4 mm. Para 15 días el nivel 1, A 2.6 mm, el nivel 2, A 2.0 mm, nivel 3, A 1.6 mm, nivel 4, A 1.2 mm y nivel 5, A 0.0 mm.

El análisis morfométrico se llevó a cabo en cinco niveles con el objetivo de ver si la desnutrición prenatal tiene algún efecto sobre los diferentes gradientes de neurogénesis y morfogéneis del desarrollo del giro dentado que afectan

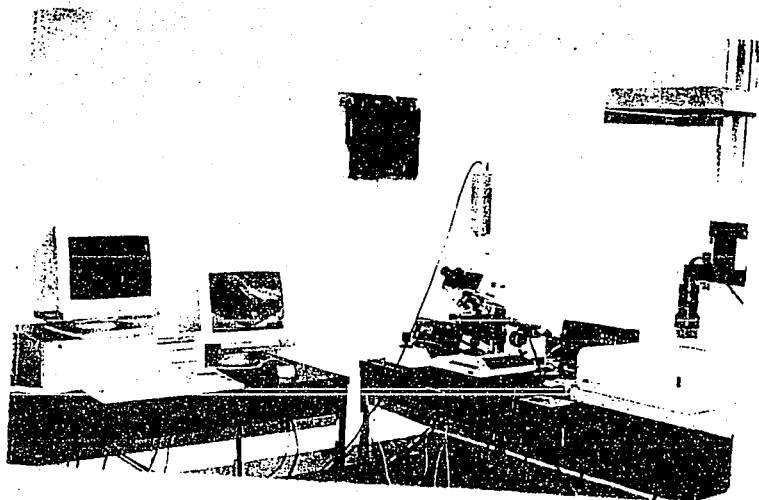


Figura 7. Sistema de análisis de imágenes digitalizadas de Biocom, Francia.

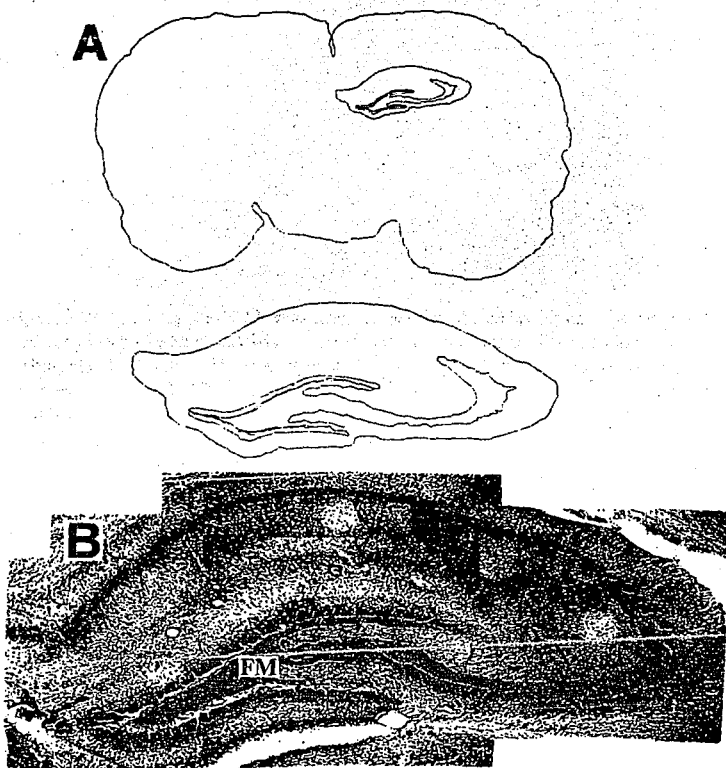


Figura 8. En A se muestran dos cartografías de cortes frontales del cerebro donde se observa la localización de la formación hipocámpica, se ha delimitado el área de la lámina dorsal y ventral de la capa granular del giro dentado y el de las fibras musgosas. En B se muestra una impresión en láser de la formación hipocámpica en donde se ha delimitado (línea en blanco) el área ocupada por las fibras musgosas (FM).

Figuras 9-13. Las figuras 8-13 muestran los niveles coronales hipocámpicos en los cuales se llevó a cabo el análisis morfométrico computarizado. Fig 9, indica el nivel 1 (bregma -2.56 mm), Fig. 10, el nivel 2 (bregma -3.30 mm), Fig. 11, el nivel 3 (bregma -4.16 mm), Fig. 12, el nivel 4 (bregma -5.6 mm) y 13, el nivel 5 (bregma -6.30 mm). En todas las figuras la A indica la fotomicrografía de cada corte teñido de acuerdo a la tinción de Timm contrastados con Nissl (excepto la figura 11). En B se muestran las cartografías de las áreas de las capas granular y molecular tanto en su porción dorsal como ventral así como el área de las fibras musgosas. En C, se indica el plano del corte de acuerdo al atlas de Paxinos y Watson. CA1 y CA3, *Cornu Ammonis* 1 y 3 respectivamente; FM, fibras musgosas; CGD, lamina dorsal de la capa granular; CGV, lámina ventral de la capa granular; CMD, lámina dorsal de la capa molecular; CGV, lámina ventral de la capa molecular; GD, giro dentado. La calibración corresponde a 160 μm^3 .

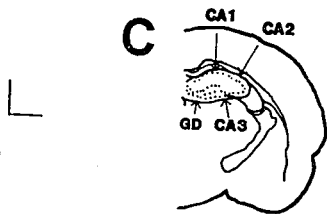
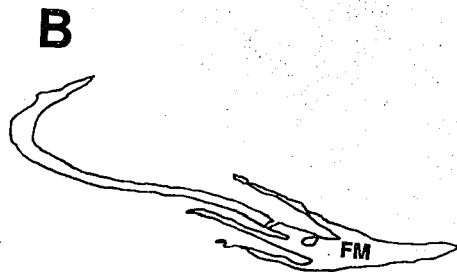
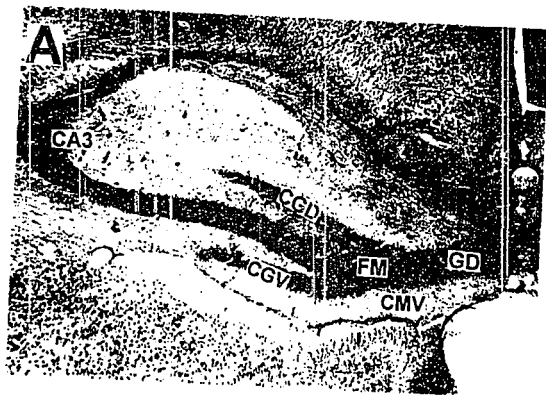


Figura 9. Nivel coronal hipocámpico 1.

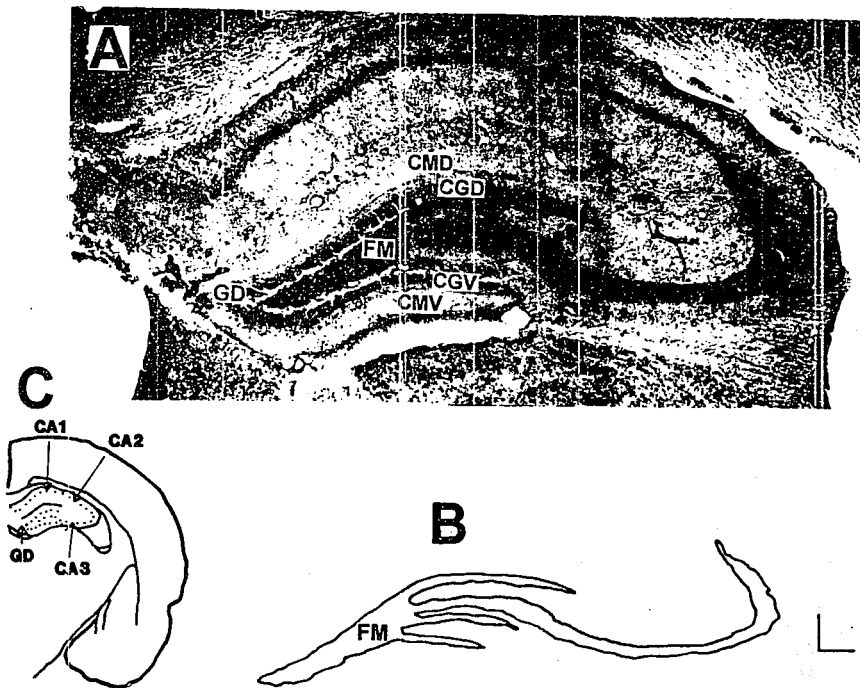
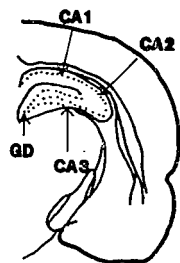
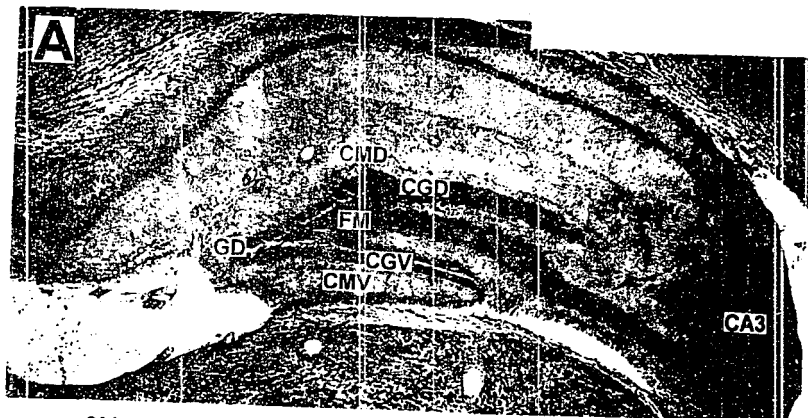


Figura 10. Nivel coronal hipocámpico 2.



C

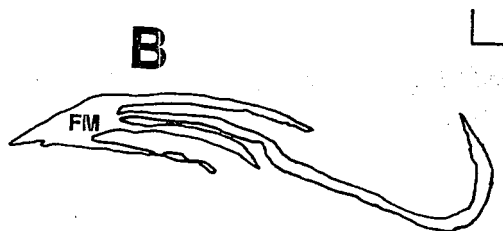


Figura 11. Nivel coronal hipocámpico 3.

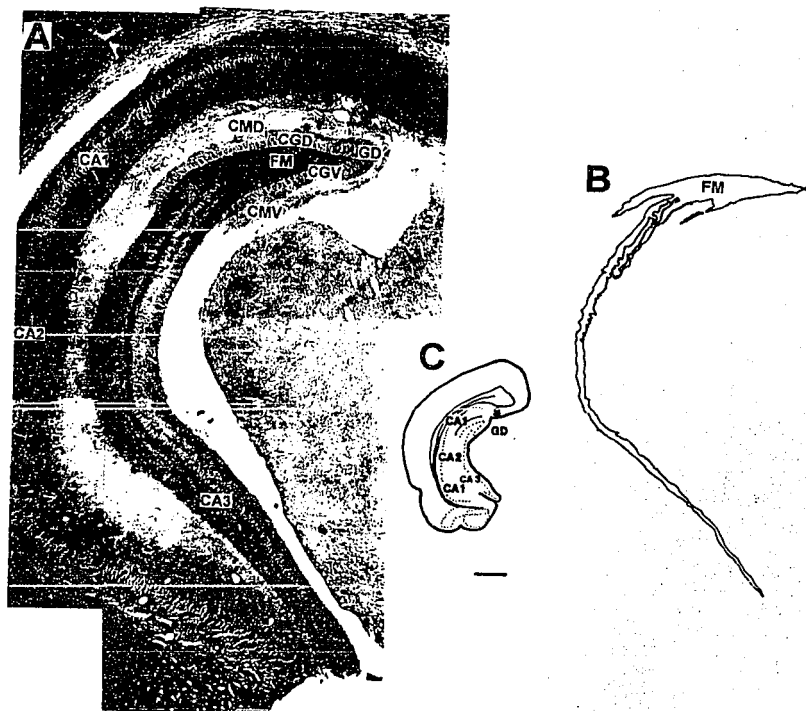


Figura 12. Nivel coronal hipocámpico 4.

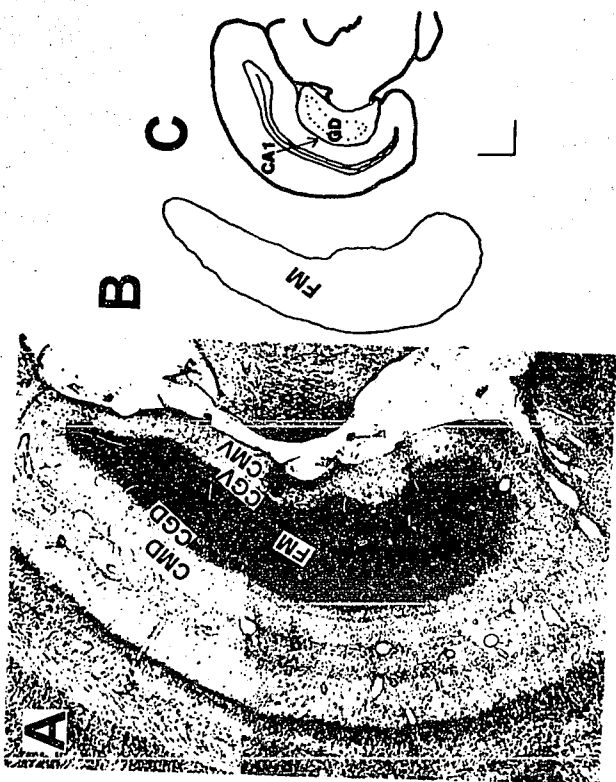


Figura 13. Nivel coronal hipocámpico 5.

finalmente la distribución de las aferencias y eferencias de la formación hipocámpica.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico de los datos obtenidos se llevó a cabo usando el paquete estadístico para las ciencias sociales versión 3.0, SPSS (Statistical Package for Social Studies). Las pruebas aplicadas fueron:

- Análisis de varianza de dos vías (ANOVA TWO-WAY) tomando el estado nutricional y la edad como los dos factores ($p < 0.05$, < 0.01 y < 0.001).
- Análisis de varianza de una vía seguido de la prueba de Tukey (ANOVA ONE-WAY/TUKEY) los niveles estadísticos de significancia fueron establecidos a un valor de $p < 0.05$.

RESULTADOS

PESO CORPORAL Y CEREBRAL

La prueba estadística ANOVA de dos vías (Tabla 2) no mostró efectos significativos por la dieta ni por la interacción de ésta con la edad. Sin embargo la edad mostró un efecto significativo sobre el peso corporal y cerebral.

En la Tabla 3 se muestran los valores obtenidos para el peso corporal y cerebral tanto del grupo control como rehabilitado en las cuatro edades analizadas. En ella aparecen el valor promedio, la desviación estándar, el porcentaje de cambio del grupo experimental respecto del control y los valores de "p" después de analizar los datos con las pruebas ANOVA de una vía y la de Tukey.

Se observó que a los 15, 30 y 90 días de edad los valores promedio del peso corporal del grupo experimental están por debajo del grupo control, mientras que a los 220 días éste es mayor, en ninguno de los casos se reportan diferencias estadísticamente significativas.

En cuanto al peso cerebral, se observó que a los 15 días los valores promedio de ambos grupos son semejantes y que a los 30, 90 y 220 días el grupo experimental es menor respecto del control sin ser significativamente diferentes en ninguna de las cuatro edades analizadas.

TABLA 2

Análisis estadístico ANOVA¹ del peso corporal y cerebral.

PESO	VALORES DE F		
	DIETA (gl 1,55)	EDAD (gl 3,56)	INTERACCION (gl 3,56)
CORPORAL	1.5 NS	520.7 ***	0.5 NS
CEREBRAL	4.1 NS	187.6***	1.8 NS

¹Análisis de varianza de dos vías, con el estado nutricional y la edad como los dos factores. gl = grados de libertad. NS = no significativo.

* p<0.05, ** p <0.01 y *** p <0.001

TABLA 3

Efectos de la malnutrición proteínica prenatal sobre el peso corporal y cerebral (gr) del grupo control 25/25 y rehabilitado 6/25¹.

EDAD (días)	DIETA		% DE CAMBIO	SIGN.
	25/25	6/25		
PESO CORPORAL				
15	33.7 ± 2.2	31.7 ± .3.5	- 5.9	NS
30	125.9 ± 9.6	125.1 ± 0.6	- 0.6	NS
90	545.5 ± 42.0	497.5 ± .8.1	- 8.7	NS
220	725.9 ± 141,8	764.1 ± 108.2	+ 5.2	NS
PESO CEREBRAL				
15	1.2 ± 0.0	1.2 ± 0.0	0.0	NS
30	1.4 ± 0.0	1.3 ± 0.1	- 7.1	NS
90	2.2 ± 0.1	2.1 ± 0.1	- 4.5	NS
220	2.4 ± 0.3	2.2 ± 0.2	- 8.3	NS

¹Los valores representan el promedio ± la desviación estándar.

SIGN. = significancia. NS = No significativo. (ANOVA DE UNA VIA/TUKEY)

* p <0.05

FIBRAS MUSGOSAS

La prueba estadística ANOVA de dos vías (tabla 4) mostró un efecto significativo por la dieta en los niveles 1, 2, 3 y 4 pero no en el nivel 5, asimismo un efecto significativo por la edad y la interacción de ambos factores en todos los niveles coronales hipocámpicos analizados.

TABLA 4

Análisis estadístico ANOVA¹ del área de las fibras musgosas de la formación hipocámpica a los 15, 30, 90 y 220 días.

NIVEL CORONAL HIPOCÁMPICO	VALORES DE F		
	DIETA (gl 1,56)	EDAD (gl 3,56)	INTERACCION (gl 3,56)
1	50.75 ***	180.14 ***	3.13 *
2	25.72 ***	533.02 ***	34.25 ***
3	10.88 **	266.73 ***	23.45 ***
4	46.55 ***	224.13 ***	11.05 **
5	1.55 NS	51.22 ***	5.64 *

¹Análisis de varianza de dos vías, con el estado nutricional y la edad como los dos factores. gl = grados de libertad. NS = no significativo.
* p<0.05, ** p <0.01 y *** p <0.001

Los valores promedio (+ la desviación estándar), porcentaje de cambio del grupo experimental respecto del grupo control y nivel de significancia entre las comparaciones para el área de distribución del plexo de fibras musgosas para cada nivel coronal hipocámpico, edad y para ambos grupos de dieta se indican en la Tabla 5. Los valores promedio y el error estándar se graficaron en la figura 13. Las ratas privadas de proteína prenatalmente muestran reducción significativa del área de distribución del plexo de fibras musgosas a los 15 días en los niveles coronales 2, 3 y 4 (-18.6%, -23.9% y -28.6%, respectivamente) a los 90 días en el primer nivel (-18.4%) y en todos los niveles a los 220 días (-18.3%, -22.9%, -24.3%, -28.5% y, -18.1% respectivamente).

Los cambios asociados con la edad en cada nivel para ambos grupos de dietas se muestran en la Tabla 6. El total de comparaciones del grupo control se inicia a los 15 días con las de los grupos control de 30, 90 y 220 e indican aumentos significativos del área de distribución del plexo de fibras musgosas en todos los niveles; entre 30 y 90 días en los niveles 1, 2 y 3. En los niveles coronales 1 a 4 entre las edades de 30 y 220 días y en los niveles 2, 3 y 5 entre 90 y 220 días. Para las comparaciones entre los grupos rehabilitados se observa aumento significativo del área del plexo de fibras musgosas en todos los niveles coronales hipocámpicos entre las comparaciones de los grupos de 15 días y los grupos de 30, 90 y 220 días. Entre las edades de 30 y 90 días en los niveles 2 y 3 y reducción significativa del área en los niveles coronales hipocámpicos 2, 3 y 4 entre las edades de 90 y 220 días.

TABLA 5

Área (mm²) del plexo de fibras musgosas de la formación hipocámpica¹.

DIETA				
EDAD (días)	25/25	6/25	% DE CAMBIO	SIGN.
NIVELES CORONALES HIPOCÁMPICOS				
1				
15	.238 ± .014	.200 ± .030	- 15.9	NS
30	.448 ± .033	.406 ± .045	- 9.3	NS
90	.553 ± .067	.451 ± .056	- 18.4	*
220	.555 ± .022	.453 ± .009	- 18.3	*
2				
15	.236 ± .014	.192 ± .016	- 18.6	*
30	.471 ± .043	.508 ± .022	+ 7.8	NS
90	.540 ± .037	.558 ± .027	+ 3.3	NS
220	.653 ± .024	.503 ± .029	- 22.9	*
3				
15	.221 ± .006	.168 ± .003	- 23.9	*
30	.419 ± .011	.447 ± .021	+ 6.6	NS
90	.480 ± .027	.535 ± .041	+ 11.4	NS
220	.579 ± .014	.438 ± .026	- 24.3	*
4				
15	.300 ± .011	.214 ± .013	- 28.6	*
30	.646 ± .043	.607 ± .023	- 6.0	NS
90	.694 ± .053	.680 ± .065	- 2.1	NS
220	.750 ± .050	.536 ± .099	- 28.5	*
5				
15	.473 ± .053	.533 ± .059	+ 12.6	NS
30	.815 ± .078	.787 ± .038	- 3.4	NS
90	.767 ± .055	.795 ± .189	+ 3.6	NS
220	.898 ± .042	.735 ± .023	- 18.1	*

¹Los valores representan el promedio ± la desviación estándar del área del plexo de fibras musgosas. SIGN. = significancia. NS = No significativo. (ANOVA DE UNA VÍA/TUKEY) * p < 0.05

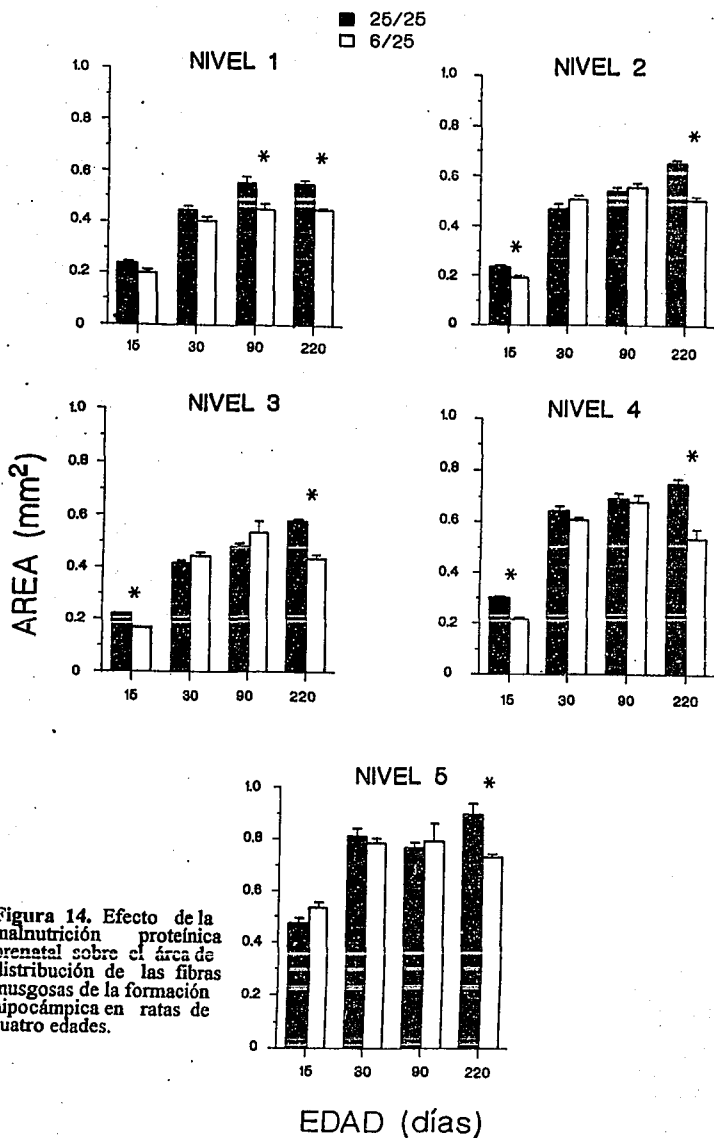


Figura 14. Efecto de la malnutrición proteínica prenatal sobre el área de distribución de las fibras musgosas de la formación hipocámpica en ratas de cuatro edades.

TABLA 6

Cambios relacionados con la edad del plexo de fibras musgosas del grupo control y rehabilitado¹.

NCH	15 días vs			30 días vs		90 días vs
	30 días	90 días	220 días	90 días	20 días	220 días
CONTROL						
1	+87.9%*	+131.9%*	+132.4%*	+23.9%*	+23.6%*	NS
2	+99.1%*	+128.1%*	+175.8%*	+14.6%*	+38.5%*	+20.8%*
3	+89.1%*	+116.9%*	+161.2%*	+116.9%*	+38.1%*	-20.4%*
4	+115.4%*	+131.5%*	+150.0%*	NS	+16.0%*	NS
5	+72.0%*	+62.0%*	+89.7%*	NS	NS	+17.1%*
REHABILITADO						
1	+103.1%*	+125.6%*	+126.8%*	NS	NS	NS
2	+164.9%*	+190.7%*	+162.1%*	+9.7%*	NS	-9.8%*
3	+165.8%*	+217.9%*	+160.4%*	+19.6%*	NS	-18.1%*
4	+183.3%*	+217.3%*	+150.2%*	NS	NS	-21.1%*
5	+47.5%*	+48.9%*	+37.7%*	NS	NS	NS

¹Los valores indican la significancia y el porcentaje de aumento entre los grupos (ANOVA DE UNA VIA/TUKEY). NCH = Nivel coronal hipocámpico. NS = No significativo. * p<0.05

DISCUSIÓN

FIBRAS MUSGOSAS

En el desarrollo normal del las fibras musgosas, este plexo es identificado con la tinción de Timm al día P1 (Zimmer, 1978; Amaral y Dent, 1981) y de acuerdo a Zimmer (1978), Zimmer y Haug (1978) y Amaral y Dent (1981) este plexo comienza a madurar al día P18 y es substancialmente maduro a los 21 días de edad postnatal, pero continúa incrementándose su tamaño en etapas adultas (Amaral y Dent, 1981; Coleman y col., 1987). Los resultados de este estudio son consistentes con el incremento del tamaño del plexo en ratas adultas. Las ratas control mostraron un incremento progresivo relacionado con la edad en el área de distribución de este plexo desde el día P15 al P220. Con la malnutrición prenatal el área de distribución de estas fibras se afectó en los cinco niveles analizados, esta disminuyó en las ratas desnutridas al día P15 en tres de los cinco niveles (2, 3 y 4), al día P90 en el primer nivel y al día P220 en todos los niveles. Cuando se efectuaron las comparaciones entre las edades, tanto los animales control como los desnutridos mostraron un aumento progresivo por la edad, en el área total de distribución de las fibras musgosas. Así, en los cinco niveles estudiados encontramos aumento entre los días P15 y P30. Sin embargo, los efectos significativos por la dieta sobre el tamaño del plexo en las ratas malnutridas prenatalmente encontrados a los 15 días no fue evidente en el día P30, esto es debido a un retraso en el patrón de maduración del plexo de fibras musgosas que se indica en la figura 14. Se observa que la curva descrita por los animales malnutridos prenatalmente está *desfasada* o retrazada con respecto a la del grupo control sobre todo en el nivel 1, 4 y 5. Entre los días P30 al día P90 se encontró un incremento significativo relacionado a la edad en el área en tres de los

cinco niveles en el grupo control (1, 2 y 3) y en dos niveles en el grupo experimental (2 y 3), esta falta de incremento en el área del grupo 6/25 en el primer nivel da como resultado la única diferencia significativa entre los dos grupos en el nivel 1 en el día P90. Las reducciones en el área de distribución de las fibras musgosas de las ratas desnutridas en el día P220 se asociaron con los incrementos en el tamaño del plexo desde el día P90 al día P220 en las ratas control que fue estadísticamente significativo en tres de los cinco niveles analizados (2, 3 y 5) y decrementos significativos del plexo en las ratas desnutridas en tres niveles (2, 3 y 4). Así todos los cambios significativos relacionados con la edad entre los días P15 y P30 y los días P30 y P90 en ambos grupos de dietas fueron asociados con incrementos en el área del plexo y entre los días P90 y P220 a un incremento sólo en el grupo control y decrementos en el grupo experimental.

Con una simple excepción, todas las reducciones fueron estadísticamente significativas en los 15 y 220 días de edad sugiriendo un efecto a corto y largo plazo. La excepción fue localizada a los 90 días en el nivel uno. Los resultados parecerían indicar que después de 15 días, la plasticidad en los animales desnutridos es capaz de compensar los efectos provocados por la desnutrición prenatal, pero que a largo plazo el metabolismo o plasticidad es abatida, tal vez porque en estos momentos se suman los efectos por la edad, lo cual es apoyado por los resultados de la prueba estadística ANOVA de dos vías (Tabla 4) que indica que la interacción de la desnutrición y la edad tienen efectos significativos sobre el área del plexo. Es importante señalar que en un estudio donde se aplicó el mismo paradigma de desnutrición usado en el presente trabajo, se encontró reducción en la densidad de fibras serotoninérgicas en el giro dentado principalmente a los 220 días de edad (Blatt y col., 1994).

El incremento observado en las fibras musgosas en los animales control esta de acuerdo con los resultados de Coleman y col. (1987) y Amaral y Dent (1981) en el sentido de que aún en etapas avanzadas de la vida postnatal (4-12 meses y 1-420 días respectivamente) el área y volumen de este plexo continúa incrementándose. Puesto que Coleman encuentra aumento de fibras de 4-12 meses de edad, es probable que los resultados del presente trabajo estén relacionados a cambios en la maduración, antes que a cambios en la edad.

Para todas las edades en ambos grupos de dietas el área de distribución mayor del plexo de fibras musgosas se localizó en los niveles 4 y 5 siendo mayor entre estos el nivel 5. Estos resultados indican que el área ocupada por las fibras es mayor en niveles mas temporales y menor a niveles septales de la formación hipocámpica (Schlessinger y Cowan, 1975; Amaral y Dent, 1981). Por otro lado, los resultados indican que el plexo de fibras musgosas se afectó principalmente en los niveles mediales a los 15 días, mientras que a los 220 días este efecto fue uniforme puesto que todos los niveles presentaron reducciones significativas.

Dado que las fibras musgosas son axones de las células granulares que hacen sinapsis con las espinas de las dendritas apicales de las células piramidales del campo CA3 localizadas en la zona de excrescencias torneadas (Fig. 2), es importante tomar en cuenta no sólo a la estructura presináptica sino también a la postsináptica en conjunto con el fin de discutir las posibles causas de las alteraciones en las fibras musgosas de los animales malnutridos, ya que la funcionalidad del circuito neuronal depende de la integridad de sus componentes que se da tanto en tiempo como en espacio. Durante el periodo de exposición a la malnutrición, las células piramidales del campo CA3 (las células blanco para los axones de las fibras musgosas) se han generado totalmente y han migrado a su posición final (Bayer, 1980a) por lo que es posible que estas células sean dañadas por la desnutrición prenatal y por tanto esto afecte el desarrollo de las fibras

musgosas. Por otro lado, la mayoría de las células granulares se forman postnatalmente en la rata, (Schlessinger y Cowan, 1975; Bayer y Altman 1974; Bayer, 1980a; Bayer y Yackel, 1982) por lo que sólo una minoría de estas células han sido sometidas a la desnutrición prenatal. Esto indicaría que el efecto nutricional sobre estas neuronas no sólo es efecto directo de la privación nutricional prenatal en sí, sino también sobre los procesos de generación, proliferación, migración etc. de las células piramidales y de las granulares. Aunque los mecanismos precisos para explicar estos efectos se desconocen, se propone que la disminución del área de las fibras musgosas podría deberse a diversas causas:

1) En primer término, a la disminución o pérdida de células granulares, lo cual provocaría disminución de fibras musgosas. Se sabe que la desnutrición provoca disminución en las dimensiones cerebrales como consecuencia de un menor número de células nerviosas (Winick y Noble, 1966; Dobbing y Sands, 1971). Esto ocurre también en las células granulares del giro dentado cuando la malnutrición ocurre en los periodos pre y/o postnatal. Respecto a este punto, se ha reportado que esta disminución en su cantidad, se debe a que hay disminución del periodo de proliferación celular (hipoplasia), debido a que la duración del ciclo celular de las neuronas del giro dentado esta incrementado y que tal incremento puede resultar en la producción de pocas neuronas en un determinado periodo y en una deficiencia substancial del número celular total Lewis y col. (1979). Así, las alteraciones en el proceso de proliferación celular se deben a que la deficiencia nutricional provoca un alargamiento del ciclo de reproducción en las células de la capas germinales, lo cual lentifica todo el proceso de producción celular (Lewis y col., 1975). Por otro lado, Bedi (1991) utilizó un paradigma de desnutrición pre y postnatal donde el periodo de desnutrición abarca desde el día 16 de gestación hasta el día 30 postnatal. Se realizó un análisis morfométrico a los 70 y 212 días

de edad y se estimó el número de células granulares en cada edad existentes en el giro dentado del hipocampo. Los resultados indicaron que el número de células granulares del grupo desnutrido se encuentra disminuido en un 16%, en relación al grupo control (260,000 y 302,000 células granulares respectivamente) en la edad de 70 días. Incrementándose esta deficiencia (-33%) en los animales desnutridos de 212 días de edad (834,000 del grupo control y 515,000-595,000 del grupo desnutrido). Este experimento indica que la desnutrición en las etapas tempranas de la vida causa una deficiencia en el número total de células granulares del giro dentado y que a largo plazo incluso esta deficiencia se incrementa con la edad sugiriendo que la desnutrición temprana resulta en un cambio permanente en la duración del ciclo celular de estas neuronas del giro dentado. Otro trabajo que apoya este razonamiento es el estudio a largo plazo de desnutrición de Paula-Barbosa y col. (1989) que muestra decrementos del grosor del giro dentado y de la densidad de empaquetamiento celular. De Bassio y col. (1994), en un estudio donde se utilizó el mismo paradigma de desnutrición (6/25), analizaron el efecto de la malnutrición prenatal sobre la generación de las células granulares del giro dentado del hipocampo, los resultados indicaron que las ratas desnutridas presentan reducción del número de células granulares en el día E20. Estas observaciones coinciden con aquellas de la extensión de la capa granular en que en los animales malnutridos prenatalmente es de 0.153 mm^2 mientras que en los controles es de 0.167 mm^2 , indicando con ésto una reducción del 9% de la capa granular en el grupo rehabilitado a los 30 días de edad. El estudio de DeBassio (1994), indica que la malnutrición prenatal es suficiente para producir y mantener una reducción del número de células granulares lo que a su vez afecta el desarrollo postnatal del giro dentado. Jordan y col. (1982) en un estudio autorradiográfico también encontraron decremento de la densidad de las células granulares del giro dentado de los 4 a 5 meses de edad de los animales desnutridos

además de un decremento en la densidad de empaquetamiento celular en los campos CA3, CA1 y en el subiculum. Los estudios de Fish y Winick (1969) sugieren que el efecto de la desnutrición sobre el complejo hipocámpico como unidad, puede ser menor que el efecto sobre sus células granulares dentadas. Ellos notaron que en camadas de ratas desnutridas por el aumento en el número de crías (18), existen deficiencias en el contenido del DNA en el hipocampo en el día P17. La disminución de células por la desnutrición no es exclusiva del giro dentado, se han reportado resultados semejantes en otras poblaciones celulares del cerebro y cerebelo. Efectos similares se han encontrado en animales desnutridos en diferentes periodos del crecimiento. Así, los estudios de Katz y col. (1982) mostraron decremento del grosor de la formación hipocámpica sólo en ratas en las cuales la desnutrición incluía el periodo de gestación. Otro trabajo que apoya este razonamiento es el de Gaarskjaer (1978) quién demostró que el área de los campos terminales de las fibras musgosas es dependiente del número de neuronas granulares, por lo que una pérdida de neuronas granulares conlleva a una disminución del número de fibras musgosas. Un estudio más que apoya este hecho es el de Gaiarsa y col., (1992) en el que se irradió a las células granulares, los resultados indican que el número de fibras musgosas disminuyó, sugiriendo que el plexo musgoso es directamente proporcional al número de células granulares.

2) La disminución de células piramidales en el campo CA3 del hipocampo también podría causar disminución del número de fibras musgosas en el giro dentado. Respecto a este punto Paula-Barbosa y col., (1989) han mostrado que la malnutrición con una dieta baja en proteína (8% de caseína) provoca decremento del área y densidad celular del campo CA3 y por tanto de dendritas apicales traduciéndose esto en menos sitios de contacto sinápticos para las fibras musgosas por lo que al arribar al *stratum lucidum* y no encontrar sus respectivos complementos sinápticos, degeneren. En otro estudio se mostró que la inyección

intraventricular de ácido kaínico destruye las células piramidales del CA3 y como consecuencia la densidad de fibras musgosas se reduce en un 50%, debido probablemente a la fragilidad de estas estructuras cuando son privadas del soporte mecánico proporcionado por las células piramidales del CA3 (Nadler y col., 1981).

3) Otra posible explicación podría ser que la secuencia normal de migración de las células piramidales hacia el CA3 no se haya llevado a cabo totalmente o se haya retrasado. Se conoce que el periodo de migración de las células piramidales es básicamente prenatal. Una posible hipótesis que explicaría los resultados obtenidos en el presente trabajo es aquella que considera un retraso en la migración de estas células que retardan el momento de alcanzar su posición normal en la respectiva capa piramidal. La secuencia normal de migración pudo haber sido alterada por la malnutrición prenatal ya que se sabe que las células piramidales del campo CA3 se generan antes que las del CA1, sin embargo las del campo CA1 alcanzan su posición final dentro de la capa piramidal respectiva antes que las del campo CA3, ya que éstas permanecen estacionadas en la zona intermedia del epitelio germinativo esperando a que algunas células granulares (la fuente de sus eferencias) se hayan establecido en la respectiva capa granular aproximadamente en el día E21 al E22 (Altman y Bayer, 1990b), por lo que probablemente una migración incompleta o retrasada causada por una permanencia mayor en la zona intermedia de como resultado reducción del número de fibras musgosas; incluso la migración retrasada de las propias células piramidales puede provocar este efecto. Respecto a este punto también se ha reportado que en ratas desnutridas persisten las capas germinales del cerebelo y las periventriculares unos días más después de que hayan desaparecido en los animales controles además de se que lentifica la migración de las células

4) Al aplicar un paradigma de malnutrición crónica (6/6) y analizar los cambios morfológicos producidos en las células piramidales del campo CA3 se mostró reducción de espinas en sitios proximales al cuerpo neuronal y del área de la zona de excrecencias torneadas en animales desnutridos, sitios en donde arriban las fibras musgosas provenientes de la capa granular del giro dentado (García-Ruiz y col., 1993). En un trabajo posterior (Díaz-Cintra y col., 1994) donde se aplicó el mismo paradigma de malnutrición usado en el presente trabajo (6/25), se reportó reducción del número total de espinas en la zona de excrecencias torneadas en las cuatro edades analizadas (15, 30, 90 y 220 días). También estos daños se ven reflejados en la reducción del soma neuronal, en la longitud de la dendrita apical, y el número de intersecciones dendríticas apicales y basales. Estos dos estudios muestran que la rehabilitación nutricional al momento del nacimiento no revierte totalmente los daños producidos por la malnutrición crónica. Por lo que otra posible causa de la reducción del plexo musgoso es precisamente una falla o retraso en el desarrollo de las dendritas apicales de las células piramidales lo que puede resultar en menos espinas sobre las dendritas y de las propias dendritas lo que se traduce en menos formación de sinapsis. Es posible que al momento del arribo de los axones de las células granulares al *stratum lucidum* del campo CA3, éstas degeneren al no encontrar su complemento sináptico y esto conlleva a la disminución del área del plexo de fibras musgosas. Por otro lado se ha propuesto que las fibras musgosas juegan un papel inductor en el desarrollo de las excrecencias torneadas (Gaiarsa, 1992), ya que si se destruyen, se reduce su desarrollo, además se propone por este estudio que la disminución en la densidad de las fibras musgosas reduce la densidad de las espinas dendríticas en la zona de excrecencias torneadas en la dendrita apical de las células piramidales del campo CA3 (Díaz-Cintra, 1994).

5) La reducción del área de fibras musgosas de las células granulares y de espinas dendríticas en la zona de excrescencias torneadas de las células piramidales del campo CA3 proveen evidencias indirectas de una probable disminución de la formación de sinapsis entre estos dos componentes: fibras musgosas y células piramidales del CA3 (FM-CA3). Respecto a este punto, Andrade y col. (1991), mostraron una pérdida significativa de FM-CA3 después de una dieta baja en proteínas. En este trabajo los animales malnutridos mostraron reducción en el número de sinapsis después de 6, 12 y 18 meses de tratamiento. El porcentaje de plasmalema terminal de las fibras musgosas con zonas sinápticas activas fue menor en las tres edades; se encontró también disminución de células granulares y piramidales del campo CA3 (Paula-Barbosa, 1989), lo que confirmaría aún más esta idea. Estos estudios en conjunto indican que las sinapsis entre estos dos componentes (FM-CA3), segunda sinapsis del circuito trisináptico hipocámpico, se encuentra dañada después de la malnutrición prenatal.

Los resultados encontrados en el presente estudio son similares a las alteraciones encontradas en formación hipocámpica cuando se aplican otro tipo de insultos como alcoholismo (West y Hodges-Savola, 1983; West y Pierce, 1984; West y Hamre, 1985), lesiones unilaterales entorrinales (West y Dewey, 1984), hipertiroidismo (Lauder y Mugnani, 1977, 1980), kindling (Sutula y col., 1988) y estimulación eléctrica de la vía perforante (Sloviter, 1985).

Los diversos estudios de desnutrición han indicado que el daño provocado por la desnutrición en el sistema nervioso central no es un fenómeno regional sino amplio en el cerebro afectando estructuras que despliegan diferentes características morfológicas y funcionales como lo son el *Locus coeruleus* (Díaz-Cintra y col., 1984), *Raphe dorsalis* (Díaz-Cintra, 1981a, b), cerebelo (Sharma y col., 1987), corteza visual (Díaz-Cintra y col., 1990). Sin embargo, de las estructuras más dañadas por la desnutrición se encuentra la formación

hipocámpica, estructura que está relacionada con procesos de aprendizaje y memoria espacial en la rata.

IMPORTANCIA DE LA DESNUTRICIÓN EN EL CIRCUITO TRISINÁPTICO HIPOCAMPAL

Hasta la fecha los estudios realizados aplicando el paradigma de malnutrición prenatal se han realizado en los tres componentes celulares que constituyen el circuito trisináptico de la formación hipocámpica, es por ello que estos estudios sumados a los resultados del presente trabajo, muestran que los componentes del circuito trisináptico hipocámpico permanecen alterados aún después de la rehabilitación nutricional al momento del nacimiento. Así el estudio de Díaz-Cintra y col. (1991) indica que las neuronas granulares presentan alteraciones semejantes a las encontradas al aplicar una dieta baja en proteínas de manera crónica (Cintra, y col., 1990). El presente trabajo indica que el área de distribución de las fibras musgosas -eferencias de las células granulares- también se encuentran dañadas. El estudio de Díaz-Cintra y col. (1994) ha mostrado que la desnutrición proteínica prenatal altera la morfología de las células piramidales del campo CA3 del hipocampo, estos daños se ven reflejados en la reducción del soma neuronal, longitud de la dendrita apical, reducción y aumento del número de ramas de las dendritas apicales y basales respectivamente así como del total de espinas localizadas en la zona de excrescencias torneadas en el *stratum lucidum*, es decir la zona a la que arriban las fibras musgosas desde el giro dentado. Por último, otro trabajo (Aguilar, 1995) mostró que las células piramidales del CA1 también son alteradas por este tipo de malnutrición, indicando que el último eslabón del circuito también se encuentra dañado, aunque de manera menos

marcada que el encontrado en las dendritas de las células granulares del giro dentado que representan el eslabón inicial del circuito.

Es importante mencionar que la corteza entorrinal es una estructura que aumenta de tamaño a medida que el hipocampo se desplaza rostro-caudalmente por lo que la contribución del patrón perforante es mayor en la parte caudal. Tomando en conjunto los resultados anteriores cabe destacarse que varias de las alteraciones producidas por la malnutrición prenatal se encuentran en el propio hipocampo o *Cornu ammonis* que también aumenta de tamaño a medida que se desplaza desde la parte rostral a caudal del encéfalo, por lo que se sugiere que el patrón perforante también se encuentra alterado, sobre todo en la parte caudal.

Sólo se han realizado dos trabajos aplicando el paradigma de desnutrición postnatal (25/6) en el circuito trisináptico hipocámpico, en uno de ellos (Parra, 1995) se ha mostrado reducción del soma, de espinas y ramificaciones basales y de la dendrita apical en células piramidales del campo CA3 del hipocampo, estas alteraciones son mayores a las reportadas en animales desnutridos prenatalmente y parecidas a los resultados de animales con desnutrición crónica severa. En otro estudio (Díaz, 1995), se realizó un análisis morfométrico en las células granulares del giro dentado en el cual también se ha encontrado reducción del número de aferencias celulares, indicando que los dos primeros componentes del circuito se encuentran dañados por la desnutrición postnatal.

La integración y el funcionamiento adecuados de un circuito neuronal depende de la proliferación, diferenciación, migración y maduración de sus células coordinadas tanto en tiempo como en espacio. Así, la alteración en cualquiera de estos estadios de desarrollo de sus componentes celulares, puede alterar el funcionamiento del circuito. Las reducciones morfológicas de los componentes sinápticos probablemente afecten el flujo de información en la

formación hipocámpica y esto conlleva a un deterioro de la función implicada con procesos cognitivos (Olton, 1983; Barnes y col., 1966).

Los trabajos de Morgane y col. (1992) y Bronzino y col. (1993) indican que el establecimiento y mantenimiento de la potenciación a largo plazo en las células granulares, está alterada en ratas sometidas a desnutrición prenatal, sugiriendo posibles consecuencias para los procesos de aprendizaje y memoria. Las deficiencias mostradas por los animales desnutridos en la memoria espacial y en el aprendizaje, probablemente sean debidos a alteraciones en la eficacia sináptica.

Los cambios fisiológicos observados en la formación hipocámpica bajo el presente paradigma de desnutrición (6/25), incluye la ontogenia alterada de la frecuencia theta e incapacidad para establecer y mantener potenciación a largo plazo (Bronzino y col., 1991 a, b). Otros trabajos indican disminución en la capacidad para potenciar los componentes sinápticos en la potenciación a largo plazo (Austin y col., 1986).

En varios estudios conductuales bajo el presente paradigma de desnutrición (6/25) se ha encontrado adquisición más lenta de las tareas analizadas (Tonkiss y col., 1990a) también los animales desnutridos adultos presentan una mayor motivación a la recompensa apetitiva que los controles (Tonkiss y col., 1990b), así como una resistencia mayor a la extinción en un paradigma de alternancia espacial en un laberinto en "T" (Tonkiss y Galler, 1990). Más aún la desnutrición hipoproteínica prenatal deteriora el aprendizaje de discriminación visual en animales adultos aún después de su rehabilitación nutricional al nacimiento (Tonkiss y col., 1991).

Aunque los mecanismos por los que la desnutrición produce daños morfológicos (Fish y Winick, 1969; Stewart y col., 1974; West y Kemper, 1976; Katz y Davies, 1982, 1983; Ahmed y col., 1987; Paula-Barbosa y col., 1989; Morgane y col., 1993), fisiológicos (Austin y col., 1986; Bronzino y col., 1991 a,

b; Morgane y col., 1992; Bronzino y col., 1993) y conductuales (Tonkiss y col., 1990 a, b; Tonkiss y Galler, 1990; Tonkiss y col., 1991) no están bien comprendidos, este estudio podría ayudar a entender que las alteraciones morfológicas en el sustrato neuronal, se manifiestan en alteraciones fisiológicas y conductuales observadas en animales desnutridos prenatalmente. El presente trabajo de tesis aunado a los anteriores, pueden ser un comienzo para entender mejor los efectos de la desnutrición sobre las funciones cerebrales de los animales desnutridos.

CONCLUSIONES

La privación proteínica prenatal, provoca alteraciones morfológicas selectivas en el desarrollo postnatal del plexo de fibras musgosas de la formación hipocámpica, estas alteraciones se ven reflejadas en reducciones del área ocupada por este plexo.

Los principales hallazgos morfológicos del presente trabajo son: Reducción del área de distribución de las fibras musgosas a los 15 días en los niveles 2, 3 y 4, a los 90 días en el nivel 1 y a los 220 días en todos los niveles.

Los decrementos producidos por la exposición prenatal a una dieta baja en proteínas conteniendo 6% de caseína, produce decremento del área de distribución ocupada por el plexo de fibras musgosas a corto plazo ya que existen reducciones significativas a los 15 días de edad en los niveles mediales (2, 3 y 4) y también a largo plazo, lo cual es indicado por la reducción del área de distribución del plexo en todos los niveles a los 220 días.

A los 30 días el sistema parece ser lo suficientemente plástico como para revertir los daños que se observan a los 15 días, ya que a los 30 días prácticamente no se presentaron alteraciones. Esta plasticidad no puede ser mantenida a largo plazo tal vez debido a que los efectos por la edad se suman a los causados por la mala nutrición prenatal.

El presente estudio aunado a previos trabajos (Díaz-Cintra y col., 1991), muestran que después de un periodo de desnutrición prenatal con una dieta baja en proteínas, no sólo las aferencias de las células granulares se encuentran dañadas sino también las eferencias de estas células que representan el principal eslabón receptor en la entrada de la información exterior al circuito trisináptico hipocámpico proveniente de la corteza entorrinal.

Los resultados indican que la segunda sinapsis del circuito trisináptico, que está formada por las fibras musgosas y las dendritas en la zona de excrecencias torneadas de las células piramidales del campo CA3 del hipocampo, se encuentra dañada al menos desde un punto de vista neuroanatómico.

De acuerdo a trabajos reportados en la literatura, la desnutrición implica disminución de células granulares probable causa de la reducción del número de fibras musgosas, que se ve reflejada en el decremento del área de distribución de este plexo axonal. Una consecuencia de la reducción del número de fibras musgosas conlleva a alteraciones en las espinas dendríticas de las células piramidales del campo CA3, su complemento sináptico (Díaz-Cintra y col., 1994). Esto es debido a que las células granulares juegan un papel inductor para el desarrollo de espinas sobre la dendrita apical de las células piramidales del campo CA3.

El daño anatómico ocurrido en estas células que representan el primer relevo del circuito trisináptico, indica que la información que llega a este circuito, desde la corteza entorrinal se encuentra alterada.

Tomando en conjunto los trabajos realizados sobre la formación hipocámpica y los resultados del presente trabajo, después de aplicar una dieta hipoproteínica prenatal se puede concluir que el circuito hipocámpico está alterado por pérdida significativa de estructuras neuronales como las espinas, ramificaciones dendríticas y tamaño del soma neuronal de células granulares y piramidales de los campos CA3 y CA1 y del área de distribución del plexo de fibras musgosa que une al giro dentado con el *Cornu Ammonis*.

La desnutrición prenatal no sólo altera estructuras de generación prenatal, sino también altera drásticamente estructuras que se generan principalmente postnatalmente aún cuando se permita una rehabilitación nutricional.

El peso corporal y cerebral de los animales malnutridos prenatalmente no presento cambios estadísticamente significativos en ninguna de las cuatro edades analizadas, lo que permite concluir que la rehabilitación nutricional postnatal revierte los daños producidos por la malnutrición crónica sobre el peso corporal y cerebral, sin embargo los daños en la anatomía fina persisten sobre todo a largo plazo.

REFERENCIAS

Aguilar, A. Efecto de la mala nutrición proteínica prenatal y la rehabilitación nutricional sobre las neuronas piramidales del campo CA1 del hipocampo. Tesis de maestría. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D. F. 1995.

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

Altman, J. (1963) Autoradiographic investigation of cell proliferation in the brains of the rats and cats. *Anat. Rec.* 145:573-592.

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

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

Altman, J. y S. A. Bayer (1990a) Mosaic organization of the hippocampal neuroepithelium and the multiple germinal sources of dentate granule cells. *J. Comp. Neurol.* 301:325-342.

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

Amaral, D. G. y J. A. Dent (1981) Development of the mossy fibers on the dentate gyrus: I. A light and electron microscopic study of the mossy fibers and their expansions. *J. Comp. Neurol.* 195:51-86.

Amaral, D. G. y M. P. Witter (1989) The three dimensional organization of the hippocampal formation: a review of anatomical data. *Neurosci.* 31:571-591.

Anderson, P., T. V. P. Bliss y K. K. Skrede (1971) Lamellar organization of hippocampal excitatory pathways. *Exp. Brain Res.* 13:222-238.

Andrade, J. P., A. Cadete-Leite, M. D. Madeira y M. M. Paula-Barbosa (1991) Long-term low-protein diet reduces the number of hippocampal mossy fiber synapses. *Exp. Neurol.* 112:119-124.

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

- Barnes, C. A. (1988) Spatial learning and memory processes: the search for their neurobiological mechanism in the rat. *Trends Neurosci.* 11:163-169.
- Barnes, D. y J. Altman (1973) Effects of different schedules of early undernutrition on the preweaning growth of the rat cerebellum. *Exp. Neurol.* 38:406-419.
- Barnes, R. H., S. R. Cunnold, R. R. Zimmerman, H. Simmons, R. B. MacLeod y L. Krook (1966) Influence of nutritional deprivation in early life on learning behavior of rats as measured by performance in a water maze. *J. Nutrition.* 89:399-410.
- Bayer, S. A. (1980a) Development of the hippocampal region in the rat I. Neurogenesis examined with ³H-thymidine autoradiography. *J. Comp. Neurol.* 190: 87-114.
- Bayer, S. A. (1980b) Development of the hippocampal region in the rat II. Morphogenesis during embryonic and early postnatal life. *J. Comp. Neurol.* 190: 115-134.
- Bayer, S. A. (1982) Changes in the total number of dentate granule cells in juvenile and adult rats: a correlated volumetric and ³H-Thymidine autoradiographic study. *Exp. Brain. Res.* 46:315-323.
- Bayer, S. A. y J. Altman (1974) Hippocampal development in the rat: cytogenesis and morphogenesis examined with autoradiography and low-level x-irradiation. *J. Comp. Neurol.* 158:55-80.
- Bayer, S. A. y J. M. Yackel (1982) Neurons in the rat dentate gyrus granular layer substantially increase during juvenile and adult life. *Science* 216:890-892.
- Bedi, K. S. (1991) Effects of undernutrition during early life on granule cell numbers in the rat dentate gyrus. *J. Comp. Neurol.* 311:425-433.
- Blackstad, T. W. y A. Kjaerheim (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.
- Blatt, G., J. Chen, D. Rosene, L. Volicer y J. Galler (1994) Prenatal protein malnutrition effects on the serotonergic system in the hippocampal formation: an immunocytochemical, ligand binding, and neurochemical study. *Brain res. Bull.* 34:507-518.
- Bronzino, J. D., R. J. Austin-LaFrance, P. J. Morgane y J. R. Galler (1991a) Effects of prenatal protein malnutrition on kindling-induced alterations in dentate granule cell excitability. I. Synaptic transmission measures. *Exp. Neurol.* 112:206-215.
- Bronzino, J. D., R. J. Austin-LaFrance, P. J. Morgane y J. R. Galler (1991b) Effects of prenatal protein malnutrition on kindling-induced alterations in dentate granule cell excitability. II. Paired-pulse measures. *Exp. Neurol.* 112:216-223.

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

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

Cavazos, J. E., G. Golari y T. S. Sutula (1991) Mossy fiber synaptic reorganization induced by kindling: time course of development, progression, and performance. J. Neurosci. 11:2795-2803.

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

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

Crain, B., C. Cotman, D. Taylor y G. Lynch (1973) A quantitative electron microscopic study of synaptogenesis in the dentate gyrus. Brain Res. 63:195-204.

Cravioto, J. y R. Arrieta. Desnutrición, desarrollo mental, conducta y aprendizaje. Impresiones modernas. Mexico, D.F. 1985, 191 pp.

Coleman, P. D., D. G. Flood y M. J. West (1987) Volumes of the components of the hippocampus in the aging F344 rat. J. Comp. Neurol. 266:300-306.

Corkidi, G. Système d'analyse de préparations histologiques par imagerie numérique: Histo 2000. Application a l'étude physiopathologique de la maladie de Parkinson. These de doctoral, Université Paris, Val de Marne, France. 1989.

Crusio, W. E., H. Schwegler (1987) Hippocampal mossy fiber distribution covaries with open-field habituation in the mouse. Behav. Brain Res. 26:153-158.

Crusio, W. E., H. Schwegler y H. P. Lipp (1987) Radial-maze performance and structural variation of the hippocampus in mice: a correlation with mossy fibre distribution. Brain Res. 425:182-185.

Danscher, E., E. J. Fjerdingsstad, E. Fjerdingsstad y K. Fredens (1976) Heavy metal content in subdivisions of the rat hippocampus (zinc, lead and copper). Brain Res. 112:442-446.

DeBassio, W. A., T. L. Kemper, J. R. Galler y J. Tonkiss (1994) Prenatal malnutrition effect on pyramidal and granule cells generation in the hippocampal formation. Brain Res. Bull. 35:57-61.

Desmond, N. L. y W. B. Levy (1985) Anatomy of associative long-term synaptic modification. En P. W. Landfield and S. A. Deadwley (Eds.). Long-term potentiation: from biophysics to behavior, Alan R. Liss, New York, NY, 1987, pp. 265-305.

Díaz, A. Desarrollo y maduración de las células granulares del giro dentado de la rata desnutrida. Tesis de licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D. F. 1995.

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

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

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

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

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

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

Dobbing, J. y J. Sands (1973) Quantitative growth and development of human brain. *Arch. Dis. Childh.* 48: 757-767.

Eichenbaum, H. y N. J. Cohen (1988) Representation in the hippocampus: what do hippocampal neurons code? *Trends Neurosci.* 11:244-248.

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

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

Frederickson, C. J. y G. Danscher (1990) Zinc-containing neurons in hippocampus and related CNS structures. *Progr. Brain Res.* 83:71-84.

Gaarskjaer, F. B. (1978) 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.* 178:49-72.

Gaarskjaer, F. B. (1985) The development of the dentate area and the hippocampal mossy fiber projection of the rat. *J. Comp. Neurol.* 241:154-170.

Gaarskjaer, F. B (1986) The organization and development of the hippocampal mossy fiber system. *Brain Res.* 15: 280-282.

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

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

Green, E. J. y J. M. Juraska (1985) The dendritic morphology of hippocampal dentate granule cells varies with their position in the granule cell layer: A quantitative study. *Exp. Brain Res.* 59:582-586.

Haug, F. M. S. (1967) Electron microscopical localization of the zinc in hippocampal mossy fiber synapses. *Histochemie.* 8:355-368.

Haug F. M. S. (1974) Light microscopical mapping of the hippocampal region, the pyriform cortex and the corticomедial amygdaloid nuclei of the rat with Timm's sulphide silver method. Area dentata, hippocampus and subiculum. *Z. Anat. Entwickl. Gesch.* 145:1-27.

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

Katz, H. B., y C. A. Davies (1982) The effect of early-life undernutrition and subsequent environment on morphological parameters of the rat brain. *Behav. Brain Res.* 5:53-64.

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

Katz, H. B., C. A. Davies y J. Dobbing (1982) Effects of undernutrition at different ages early in life and later environmental complexity on parameters of the cerebrum and hippocampus in rats. *J. Nutr.* 112:1362-1368.

Lauder, J. M. y E. Mugnani (1977) Early hyperthyroidism alters the distribution of mossy fibers in the rat hippocampus. *Nature.* 268:335-337.

Lauder, J. M. y E. Mugnani (1980) Infrapyramidal mossy fibers in the hippocampus of the hyperthyroid rat. *Dev. Neurosci.* 3:248-265.

Lewis, P. D., R. Baláz, A. Patell y A. Johnson (1975) The effect of undernutrition in early life on cell generation in the rat brain. *Brain Res.* 83:235-247.

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

Lorente de Nó, R. (1934) Studies on the structure of the cerebral cortex. II continuation of the study of the ammonic system. *J. Psychol. Neurol.* 46:113-177.

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

Morgane, P. J., R. J. Austin-LaFrance, J. D. Bronzino, J. Tonkiss y J. R. Galler (1992) Malnutrition y the developing central nervous system. En: Isaacson, R., K. Jensen., eds. *The vulnerable brain and environmental risks. vol. 1. Malnutrition and hazard assessment.* New York: Plenum Press; 3-44.

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

Nadler, J. V., B. W. Perry, C. Gentry y C. Cotman (1981) Fate of the hippocampal mossy fiber projection after destruction of its postsynaptic targets with intraventricular kainic acid. *J. Comp. Neurol.* 196:549-569.

O'Keefe, J y L. Nadel (1978) *The hippocampus as a cognitive map*, Oxford Univ. Press. pp 145.

Olton, D. S., J. A. Walker y F. H. Gage (1978) Hippocampal connections and spatial discrimination. *Brain Res.* 139:295-308.

Olton, D. S. (1983) Memory functions of the hippocampus, in: *Neurobiology of the hippocampus* (W. Seifert), Academic Press, London, pp. 335-373.

Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. El hambre en el mundo. Folleto de la Secretaría del día mundial de la alimentación de la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Roma, Italia. 1985, 20 pp.

Parra, L. Alteraciones neuroanatómicas del hipocampo y de algunos procesos cognitivos en ratas sometidas a una dieta hipoproteínica prenatal. Tesis de maestría. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D. F. 1995.

Patel, A. (1983) Undernutrition and brain development. *Trends in Neurosci.* 6:151-154.

Paula-Barbosa, M. M., J. P. Andrade, J. L. Castedo, F. P. Azevedo, I. Camoes, B. Volk y M. A. Tavares (1989) Cell loss in the cerebellum and hippocampal formation of adult rats after long-term low-protein diet. *Exp. Neurol.* 103:186-193.

Paxinos, G. y G. H. Watson (1986) *The brain in stereotaxic coordinates.* Academic Press, Sydney. pp 260.

Pico, R. M. y J. L. Davis (1984) The radial maze performance of mice: assessing the dimensional requirements for serial order memory in animals. *Behav. Neural Biol.* 40:5-26.

Ramón y Cajal, S. (1982) Estructura del asta de Ammon y fascia dentata. *Ann. Soc. Esp. Hist. Nat.* 22.

Ramón y Cajal, S. *Histologie du système nerveux de l'homme et des vertèbres.* Trans. by L. Azoulay. Consejo superior de Investigaciones Científicas. Instituto Ramon y Cajal. Madrid. Vol. 2 1911. pp 986-993.

Ramón y Cajal, S. (1968) The structure of Ammon's horn. L. M. Craft (trans.). Springfield: Charles C. Thomas. pp 78.

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

Schlessinger, A. R. y Cowan, W. M (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.

Schlessinger, A. R., W. M. Cowan y L. S. Swanson (1978) The time of origin of neurons in Ammons horn and the associated retrohipocampal fields. *Anat. Embryol.* 154:153-173.

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

Sharma, S. K., V. Nayar, M. C. Maheshwari y B. Singh (1987) Effect of undernutrition on developing rat cerebellum: Some electrophysiological and neuromorphological correlates. *J. neurol. Sci.* 78:261-272.

Sherwood, N. M. y P. S. Timiras (1970) A stereotaxic atlas of the developing brain. University of Cal. Press, Berkeley. pp209.

Sloviter, R. S. (1985) A selective loss of hippocampal mossy fiber Timm stain accompanies granule cell seizure activity induced by perforant path stimulation. *Brain Res.* 330: 150-153.

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

Stewart, R. J. C., A. Merat y J. W. T. Dickerson (1974) Effect of a low protein diet in mother rats on the structure of the brains of the offspring. *Biol. Neonat.* 25:125-134.

Sutula, T., H. Xiao-Xian, J. Cavazos y G. Scott (1988) Synaptic reorganization in the hippocampus induced by abnormal functional activity. *Science.* 239:1147-1150.

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

Teyler, T. J. y P., DiScenna (1986) The hippocampal memory indexing theory. *Behav. Neurosci.*, 100:147-154.

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

Tonkiss, J., J. R. Galler, R. N. Formica, B. Shukitt-Hale y R. R. Timm (1990a) Fetal protein malnutrition impairs acquisition of a DRL task in adult rats. *Physiol. Behav.* 48:73-77.

Tonkiss, J., B. Shukitt-Hale, R. N. Formica, F. J. Rocco y J. R. Galler (1990b) Prenatal protein malnutrition alters response to reward in adult rats. *Physiol. Behav.* 48:675-680.

Tonkiss, J., G. A. Foster y J. R. Galler (1991) Prenatal protein malnutrition and hippocampal function: partial reinforcement extinction effect. *Brain Res. Bull.* 27:809-813.

Timm, F. (1958) Zur Histochemie des Ammonshorngebiets. *Z. Zellforsch.* 48:548-555.

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

West, J. R., C. A. Hodges y A. C. Black (1981) Distal infrapyramidal granule cell axons possess typical mossy fiber morphology. *Brain Res. Bull.* 6:119-124.

West, J. R., G. W. Van Hoesen y K. C. Kosel (1982) A demonstration of hippocampal mossy fibers axon morphology using the anterograde transport of horseradish peroxidase. *Exp. Brain Res.* 48:209-216.

West, J. R. y C. A. Hodges-Savola (1983) Permanent hippocampal mossy fiber hyperdevelopment following prenatal ethanol exposure. *Neurobehav. Toxicol. Teratol.* 5:139-150.

West, J. y D. Pierce (1984) The effect of in utero ethanol exposure on hippocampal mossy fibers: an HRP study. *Dev. Brain Res.* 15:275-279.

West, J. R. y S. L. Dewey (1984) Mossy fiber sprouting in the fascia dentata after unilateral entorhinal lesions: quantitative analysis using computer-assisted image processing. *Neurosci.* 13:377-384.

West, J. R. y K. M. Hamre (1985) Effects of alcohol exposure during different periods of development: changes in hippocampal mossy fibers. *Dev. Brain Res.* 17:280-284.

Winick, M. y A. Noble (1966) Cellular response in rats during maturation at various ages. *J. Nutr.* 89:300-306.

Zimmer, J. (1978) Development of the hippocampus and fascia dentata: morphological and histochemical aspects. *Prog. Brain Res.* 48:171-189.

Zimmer, J. y Haug, F. S. (1978) Laminar differentiation of the hippocampus, fascia dentata and subiculum in developing rats, observed with the Timm sulphide silver method. *J. Comp. Neurol.* 179:581-618.