



03068
UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO

Unidad Académica de los Ciclos Profesional y de Posgrado
del Colegio de Ciencias y Humanidades
CENTRO DE NEUROBIOLOGIA

DENSIDAD DE LAS CELULAS GABAérgicas EN LA
FORMACION HIPOCAMPICA DE LA RATA
DESNUTRIDA

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS FISIOLÓGICAS

P R E S E N T A:

ANGELICA GONZALEZ MACIEL



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.

El presente trabajo de tesis fue realizado bajo la dirección de los DRS. SOFÍA DÍAZ- CINTRA Y MIGUEL ANGEL MORALES MENDOZA, en los laboratorios de Morfometría (Centro de Neurobiología) y de Biología Celular del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM así como en el laboratorio de Microscopía Electrónica del Instituto Nacional de Pediatría de la S.S.

AGRADECIMIENTOS:

Mi más sincero agradecimiento a la Dra. Sofía Díaz-Cintra coordinadora del proyecto de maestría y doctorado en ciencias fisiológicas por su apoyo y asesoría en el desarrollo de esta tesis.

Al Dr. Miguel Ángel Morales M. por su asesoría y entusiasta participación en el desarrollo de este trabajo, así como por las críticas y la cuidadosa revisión del manuscrito.

**A los sinodales que revisaron esta tesis: Dr. Manuel Salas Alvarado
Dr. Raúl Mena López
Dr. Alfredo I. Feria Velasco**

INDICE

I.- RESUMEN	4
SUMMARY	5
II.- INTRODUCCIÓN	6
III.- HIPÓTESIS	9
IV.- MATERIAL Y MÉTODOS	10
Animales	10
Tratamiento nutricional	10
Dietas y condiciones de crianza	11
Reproducción	11
Formación de grupos	12
Perfusión y fijación	13
Proceso inmunohistoquímico	14
Parámetros celulares evaluados	16
Análisis estadístico	16
V.- RESULTADOS	17
Densidad de neuronas con inmunopositividad parecida a GAD en la condición control de nutrición (25/25%), a los 30 y 90 días de edad	17
Densidad de neuronas positivas a GAD en las diferentes condiciones experimentales de nutrición a los 30 y 90 días de edad	18
Desnutrición postnatal (25/6%)	21
Desnutrición prenatal y rehabilitación nutricional postnatal (6/25%)	23
Desnutrición pre y postnatal (6/6%)	25
Comparación de la densidad de células GABAérgicas en las diferentes condiciones de nutrición	28
Hipocampo	28
Giro dentado	30
VI.- DISCUSIÓN	32
Reducción de la densidad de células GABAérgicas por malnutrición proteínica	34
Aumento de la densidad de células GABAérgicas por malnutrición proteínica	35
Daño en la función hipocámpica por malnutrición proteínica	38
VII.- CONCLUSIONES	44
VIII.- APÉNDICE	45
Hipocampo	45
Estructura	45
Elementos neuronales	46
Aferencias, eferencias y circuito básico	49
Actividad eléctrica	54
Hipocampo y desnutrición	57
IX.- REFERENCIAS	62

I. RESUMEN

La imposición de una dieta hipoproteínica a ratas durante los periodos pre gestacional y gestacional, altera el desarrollo y los patrones de maduración de su cerebro, particularmente del hipocampo y el giro dentado. Se ha encontrado que además de inducir cambios en la citoarquitectura de estas estructuras, también afecta los sistemas de modulación de la excitabilidad de las células granulares del giro dentado, por aumento en los niveles de inhibición. Nosotros estudiamos el efecto de la malnutrición hipoproteínica, sobre la densidad de células GABAérgicas del hipocampo y del giro dentado de ratas de 30 y 90 días de edad, por medio de marcaje inmunocitoquímico de la enzima glutamato descarboxilasa (GAD). Mientras que las ratas control fueron alimentadas con una dieta con 25% de caseína, las experimentales fueron alimentadas con una dieta conteniendo 6% de caseína, desde 5 semanas antes del apareamiento, durante la gestación (desnutrición prenatal; 6/25) en los periodos pre y postnatal (desnutrición crónica; 6/6) y solo durante el periodo postnatal (25/6). A los 30 días de edad, el grupo malnutrido crónicamente (6/6) mostró una disminución significativa en la densidad de las células GABAérgicas, tanto en el hipocampo (31%; $p < 0.0008$) como en el giro dentado (39%; $p < 0.0001$). De manera contraria, a la misma edad, en el giro dentado del grupo 6/25 se encontró un aumento significativo ($p < 0.01$) del 27% en la densidad de éstas mismas células. A los 90 días de edad, la densidad de células GABAérgicas en los grupos 6/25 y 25/6, no mostraron diferencias significativas con respecto al grupo control, sin embargo, el grupo con desnutrición crónica presentó un aumento significativo ($p < 0.0001$) del 19% en la densidad de células inmunopositivas a GAD. Los resultados indican que la desnutrición afecta la densidad de las células GABAérgicas de manera diferente en las dos regiones estudiadas. El aumento o la disminución en la densidad encontrado a los 30 días de edad en los grupos 6/25 y 6/6 respectivamente, probablemente indican retraso en la integración neuronal del circuito inhibitorio hipocampal. El aumento en la densidad de células GABAérgicas encontrado en el grupo de desnutrición crónica a los 90 días de edad, probablemente indica efectos más severos e irreversibles. Los aumentos en la densidad antes mencionados podrían explicar al menos en parte, el aumento en la función inhibitoria del hipocampo encontrada en ratas malnutridas.

SUMMARY

The hippocampus and dentate gyrus development and their maturation patterns are altered by a low protein diet imposed on pre gestation and gestational periods in the rat. It is well known that protein malnutrition induces changes in the hippocampal neuroanatomy as well, in its excitability modulation system from the granule cells of the dentate gyrus. We studied in protein malnourished rats at 30 and 90 days old the density of GABAergic cells from hippocampus and fascia dentata, by immunocytochemical labeling of anti-glutamate decarboxylase (GAD). Female rats from all groups were fed five weeks prior to mating and during gestation with two isocaloric diets. Control group was fed with a 25% casein diet, and three malnourished groups with a 6% casein diet. Two malnourished groups were obtained by cross-foster between litters born from malnourished and control mothers. Thus, one group was rehabilitated at birth (prenatal malnutrition 6/25), and the other to produce postnatal malnutrition (25/6). The last group was maintained with their malnourished mother to produce, chronic malnutrition (6/6). This group shows significant reductions of GABAergic cell density in the hippocampus (31% $p < 0.0008$) and dentate gyrus (39% $p < 0.001$) at 30 days of age. Conversely, in this age, the 6/25 group showed a 27% significant ($p < 0.01$) increase in the dentate gyrus. No significant differences were found at 90 days of age in 6/25 or 25/6 groups. However, the 6/6 group showed a 19% significant ($p < 0.0001$) increase in the fascia dentata GABAergic cell density. These data suggest that malnutrition had differential effects on the hippocampal formation. The increase or decrease at 30 days in 6/25 and 6/6 groups may reflect a delay in the maturation of hippocampal formation inhibitory circuitry. The increase in GABAergic cell density found in 6/6 at 90 days of age may show irreversible and more severe effects. The increment in GABAergic cells could explain the increase of inhibition proposed as the substrate of either behavioral or electrophysiological alterations found in malnourished rats.

II. INTRODUCCIÓN

El desarrollo cerebral de los mamíferos es susceptible a daños por factores ambientales nocivos como la desnutrición, el alcoholismo y la drogadicción entre otros (Dyson y Jones 1976); ésto se debe a que durante el desarrollo cerebral ocurren cambios secuenciales de importancia, tales como la generación neuronal (neurogénesis y gliogénesis), la migración y la diferenciación neuronal, el crecimiento neuronal (de las arborizaciones dendríticas y de la extensión axonal), la mielinización, la sinaptogénesis y la formación de circuitos neurales (Angevine y Sidman, 1961; Altman y Das, 1965; Altman, 1966; Maxwell 1979; Díaz-Cintra y Ortega, 1991; Shatz 1992); por otra parte, también se origina la síntesis y la liberación de neurotransmisores y la muerte celular selectiva (apoptosis). Todos ellos, necesarios para la integración de las funciones neuronales, incluidas las superiores como el aprendizaje y la memoria.

Aunque estos procesos son regulados genéticamente, muestran sin embargo como ya se dijo, susceptibilidad a daños por factores ambientales nocivos como la desnutrición (Fish y Winick, 1969; West y Kemper, 1976; Morgane, La France, Bronzino, Tonkiss, Díaz-Cintra, Cintra, Kemper, Galler, 1993).

Se sabe que la desnutrición padecida durante distintas etapas del desarrollo de los individuos, produce diferentes alteraciones en el organismo en general y en el Sistema Nervioso Central (SNC) en particular. Además, de acuerdo a la naturaleza de la deficiencia (proteínica o no) y a la etapa durante el desarrollo en la cual ésta se produce en el organismo, las secuelas en su desarrollo conductual e intelectual serán de intensidad variable (Fish y Winick, 1969; Rodier, 1976; 1980; Dobbing, 1968a y b; 1970; 1972; 1979; 1990; Smart, 1990; 1991).

Puesto que la desnutrición afecta de manera permanente funciones como el aprendizaje y la memoria, una de las regiones del cerebro que ha sido estudiada con mayor interés debido a su relación con estas funciones es la formación hipocámpica. Los daños que produce la desnutrición en esta estructura cerebral se pueden detectar a nivel morfológico, electrofisiológico y conductual. Se sabe en general que induce cambios en la citoarquitectura de la formación hipocámpica, altera las características eléctricas del ritmo theta y de la potenciación a largo plazo (LTP) y afecta la integración de los procesos del aprendizaje y la memoria.

Varios estudios sobre las características del ritmo theta del EEG (Morgane y col., 1993) y sobre la capacidad de presentar y mantener LTP indican que la desnutrición ocurrida durante la gestación al parecer provoca un aumento significativo en los niveles de control inhibitorio ejercido sobre la actividad de las células granulares (Austin, Bronzino, Morgane, 1986; 1989; Austin, Beiswanger, Bronzino, Austin-LaFrance, Galler y Morgane, 1992; Bronzino, Abu-Hasaballah, Austin-LaFrance y Morgane, 1994). La excitabilidad de las neuronas granulares puede ser modulada por varios sistemas. Estos sistemas incluyen a las células GABAérgicas presentes en el hipocampo y el giro dentado y a los de proyección extrínseca como el serotoninérgico, que surge desde el rafe medio, el noradrenérgico que se origina en el locus coeruleus y los suministros colinérgicos y GABAérgicos desde el núcleo del septo medio. Además de modular a las células granulares, estos sistemas extrínsecos pueden regular la inhibición de la población intrínseca de células GABAérgicas del giro dentado (Morgane y col., 1993). Estos trabajos se describen en detalle en el apéndice.

Se ha mostrado que la activación de cada núcleo extrínseco modifica la actividad eléctrica de la población de las células granulares. De tal manera que se han desarrollado algunas hipótesis evaluables concernientes a la manera en que

una desnutrición gestacional podría provocar aumento de los niveles de inhibición a las células granulares y a las células GABAérgicas mismas: *i)* la desnutrición puede provocar un aumento en la sensibilidad a la inhibición tanto del suministro como de la retroalimentación de la población de células granulares; *ii)* puede dañar los mecanismos de recaptura de GABA, proporcionando así una inhibición efectiva de larga duración; *iii)* se puede dañar la actividad de sistemas moduladores extrínsecos, incluidos la proyección GABAérgica del septo medio, los sistemas serotoninérgicos o norepinefrínicos que surgen desde el tallo cerebral e inervan a las neuronas GABAérgicas locales, esta reducción de inhibición sobre células inhibitorias conduce a un mayor efecto inhibitorio final sobre las células granulares (Austin-La France y col. 1986; 1991; Morgane y col., 1993).

Con base en lo anterior, en este trabajo se realizó un estudio inmunohistoquímico y morfométrico de las células GABAérgicas de la formación hipocámpica (neuronas locales) en ratas desnutridas pre, posnatal o crónicamente, en las edades postnatales de 30 y 90 días, con la finalidad de determinar los daños ocurridos al sistema GABAérgico a causa de la desnutrición hipoproteínica. Debido a que las poblaciones celulares de la formación hipocámpica se originan a diferentes tiempos, y a que la distribución de las células GABAérgicas varía dentro de la estructura, las células se identificaron en dos regiones: en el Cornus Ammonis (CA) considerando CA1, CA3 y CA4, donde la neurogénesis ocurre en etapa prenatal y en el giro dentado (GD), en el que ocurre en periodo postnatal. Se analizó el efecto de tres diferentes esquemas de desnutrición; prenatal *i)* con (6/25) o *ii)* sin rehabilitación nutricional postnatal (6/6) y *iii)* con periodo prenatal normal y desnutrición postnatal (25/6). Comparándose con el grupo control (25/25).

En consideración de ser este un estudio morfológico del hipocampo y en función de no extender esta introducción, esta tesis lleva anexo un Apéndice en

donde se revisa en detalle la estructura, organización y función de esta estructura cerebral.

III. HIPÓTESIS

Según lo mencionado en la introducción se plantea la siguiente hipótesis:
Si consideramos que la desnutrición puede causar retardo en los procesos del desarrollo y maduración del hipocampo, y dado que las interneuronas GABAérgicas son las principales responsables del efecto inhibitorio hipocampal el cual se encuentra aumentado en animales desnutridos, es válido suponer que un aumento en la densidad poblacional de estas neuronas, pudiera explicar este aumento de inhibición.

IV. MATERIAL Y METODOS

Animales

Se utilizaron ratas de la variedad Sprague Dawley en etapa reproductiva (80-90 días de edad), 30 hembras y 10 machos, las cuales se mantuvieron bajo idénticas condiciones de luz oscuridad (12:12 hrs), temperatura (22-24 °C), humedad (40-50%) y con libre acceso al alimento (dieta para roedores con un contenido del 25% de caseína) y al agua.

Tratamiento nutricional

La desnutrición se realizó de acuerdo al método empleado previamente por Morgane y cols. (1978), mediante el uso de dos dietas, adquiridas de la compañía Teklad-Harlan de Madison, Wisconsin, EUA (Tabla I).

Tabla I. COMPOSICIÓN NUTRICIONAL DE LAS DIETAS*.

COMPONENTES	25% de caseína	6% de caseína
Proteínas (caseína)	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

*Complementadas con L-Metionina (0.4%) debido a la ausencia de este aminoácido esencial en la caseína. ** Se les adicionó con fosfato de calcio monobásico (0.6%) y carbonato de zinc (0.001%).

Diets y condiciones de crianza

El contenido de las dietas empleadas en el estudio se señala en la Tabla I, donde se pueden apreciar algunas de las características más sobresalientes: por ejemplo, la fuente de proteína para ambas dietas fue la caseína, una tuvo un contenido del 25% (grupo control) y la otra uno del 6% (grupo desnutrido). La dieta con menor porcentaje de caseína tuvo una mayor cantidad de carbohidratos para compensar la posible deficiencia en calorías, ambas dietas contienen mayor cantidad de grasa en relación a una dieta comercial y además debido al bajo contenido en aminoácidos sulfurados en la caseína la dieta fue suplementada con L-metionina.

El total de ratas hembras fue dividido en dos lotes, cada uno con igual número de sujetos. Así, durante 5 semanas antes del apareamiento se alimentó a quince hembras con la dieta que contenía 6% de caseína, para obtener a las madres desnutridas y a 15 hembras con la dieta al 25%, para obtener a las madres controles (10) y nodrizas (5). Los machos se mantuvieron en las condiciones normales antes descritas .

Reproducción

Después de las cinco semanas con este régimen nutricional, las hembras de ambos grupos fueron apareadas con machos alimentados normalmente. Para ello se colocó en cajas familiares a 1 macho con 2 ó 3 hembras; se marcó con violeta de cresilo a 1 ó 2 de las hembras para llevar un registro individual. El día 1 de gestación se determinó por medio de la presencia de espermatozoides en frotis vaginales, los cuales se realizaron cada mañana. De acuerdo a los datos registrados, las hembras que presentaron frotis positivos se separaron en cajas de plástico (48 x 27 x 16 cm) de acuerdo a la dieta correspondiente. Durante el periodo de gestación los animales fueron mantenidos bajo las mismas condiciones descritas. Al momento del parto, las camadas nacidas en el mismo

día y de la misma condición nutricional fueron pesadas y sexadas, y se mezclaron entre sí con el fin de obtener camadas genéticamente heterogéneas. Cada camada se ajustó con 8 crías.

Formación de grupos

De las crías descendientes de madres desnutridas, unas fueron asignadas a madres nodrizas bien nutridas (dieta 25%) para obtener a los animales rehabilitados nutricionalmente (6/25%), y otras permanecieron con sus madres desnutridas para obtener a los animales desnutridos (6/6%).

En cuanto a los animales descendientes de hembras bien nutridas (25%), unos permanecieron en las mismas condiciones para así obtener a los animales control (25/25%) y otros fueron asignados a nodrizas desnutridas lo que proporcionó animales con desnutrición postnatal (25/6%).

De esta manera, se obtuvieron cuatro grupos de animales: bien nutridos 25/25% o control y tres grupos, desnutridos pre y posnatalmente o 6/6%, rehabilitados nutricionalmente al nacer o 6/25% y desnutridos al nacer o 25/6%. A los 21 días, después del destete, se colocó a 3 animales en cada caja considerando su sexo y condición nutricional (Fig. 1).

En el estudio se utilizaron animales macho de 30 y 90 días de edad, con la idea de obtener información de un estadio temprano (30 días) en el cual se sabe que ya está presente el 100% de las células GABAérgicas, e información de probables cambios en la población de estas células a un plazo mayor (90 días).

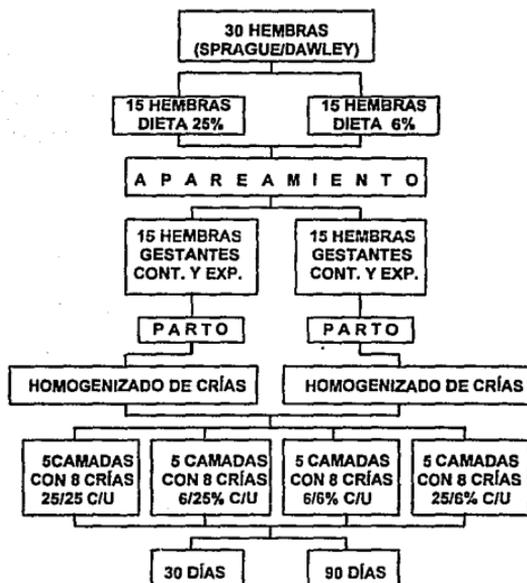


Fig. 1. Se muestra de manera resumida la obtención de los animales para el estudio (dietas, las condiciones de crianza, reproducción y formación de grupos).

Perfusión y fijación

Se utilizaron 3 animales en cada condición nutricional (6/6%, 6/25, 25/25% y 25/6%), y en cada edad (30 y 90 días), por lo tanto, el estudio se realizó con $3 \times 4 \times 2 = 24$ animales. Las ratas se perfundieron por vía intracardíaca con amortiguador de fosfatos (PB) 0.1M, pH 7.4; seguido de un fijador compuesto de paraformaldehído al 4% preparado en el mismo amortiguador. Al terminar la perfusión, se extrajeron los encéfalos de los animales para procesarlos por inmunohistoquímica. El tejido se colocó en el mismo fijador durante una hora; después de este tiempo se transfirió a PB con

sacarosa al 10% donde se mantuvo hasta que el tejido dejó de flotar y se fue al fondo del recipiente. Subsecuentemente y con el mismo criterio se colocó en sacarosa al 20 y al 30%.

En cada encéfalo se realizaron cortes seriados de 30 μm en dirección rostro-caudal de los cuales se recuperaron 4 uno cada 300 μm , representativos de los primeros 1320 μm de la formación hipocámpica (Fig. 2). Estos cortes corresponden aproximadamente a los campos 34, 36, 38 y 39 del atlas estereotáxico del cerebro de la rata de König y Klippel, 1967.

Proceso inmunohistoquímico

Para marcar a las células GABAérgicas se utilizó un anticuerpo policlonal de oveja anti -glutamato descarboxilasa (anti-GAD 1440, donado por el Dr. I. Kopin del N.I.H.). Este anticuerpo fue purificado parcialmente de cerebros de rata (preparación sinaptosomal) y se ha usado para detectar células GABAérgicas en cerebelo (Oertel y col. 1981), y aferentes GABAérgicas en sustancia nigra y de pituitaria después de cortar el tallo cerebral (Oertel y col. 1981; 1982).

El proceso inmunohistoquímico de los cortes de tejido se realizó por flotación y siempre dentro de una cámara húmeda. Los cortes se incubaron con el anticuerpo primario anti-GAD antes mencionado a una dilución de 1:500 durante 24 horas a 4°C, seguido de un anticuerpo secundario biotinilado contra oveja (1:100 durante 1 hora a temperatura ambiente) y del complejo avidina - biotina - peroxidasa (KIT ABC Vectastin). Al terminar el proceso inmunocitoquímico los cortes fueron adheridos a laminillas gelatinizadas, se deshidrataron en concentraciones crecientes de alcohol y luego de montarlas en resina sintética se observaron en un microscopio fotónico Nikon Optiphot, acoplado a un sistema digital procesador de imágenes .

Como control de los experimentos de inmunocitoquímica se utilizaron cortes en los que se siguió el mismo proceso pero substituyendo el anticuerpo primario con suero preinmune.

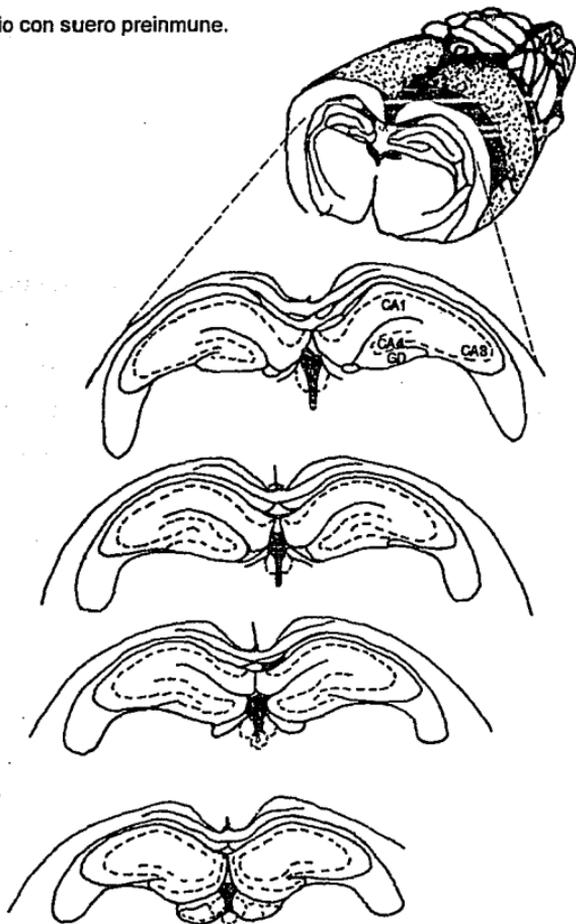


Fig. 2. Esquemas de cortes de hipocampo en dirección antero-posterior. Cada corte está separado 300 μm del otro, por tanto, representan las primeras 1320 μm de la región hipocámpica.

Parámetros celulares evaluados

Las mediciones se realizaron con el programa de procesamiento digital de imágenes Histo 2000. En cada corte se delimitó el área del hipocampo y del giro dentado, se marcaron las células inmunoreactivas a GAD y se calculó su densidad.

Análisis Estadístico

Se realizaron comparaciones estadísticas de la densidad de células inmunoreactivas en H y GD de los animales control y experimentales a la misma edad y entre las dos edades; para ello se aplicó el análisis de varianza anidado (Méndez, 1993). Con este análisis, el parámetro a medir es la densidad y las variables son el nivel del corte a lo largo del hipocampo, las condiciones nutricionales, la edad y la variabilidad intra-animal.

V. RESULTADOS

La inmunopositividad parecida a GAD se identificó como un precipitado café-rojizo en el soma y en algunos procesos proximales al soma. Las neuronas inmunopositivas a GAD se encontraron tanto en el hipocampo como en giro dentado de todos los animales estudiados (Fig. 3, 4). Según su morfología se distinguieron tres tipos: piramidal, multipolar y fusiforme.

Los cortes incubados con suero preinmune, fueron inmunonegativos.

Densidad de neuronas con inmunopositividad parecida a GAD en la condición control de nutrición (25/25%), a los 30 y 90 días de edad.

En el hipocampo de ratas de 30 y 90 días de edad, las neuronas GABAérgicas se encontraron distribuidas en todos sus estratos, es decir, en el polimórfico, piramidal y molecular de los campos CA1 al CA4 (Fig. 3, 4a). En el giro dentado, las neuronas positivas a GAD se distribuyeron en la capa de células granulares, en los estratos molecular dorsal y ventral y en la región hilar (Fig. 3, 4b).

En la Tabla II y las figuras 5, 6, 7 y 8 se presentan los datos correspondientes a la densidad de células inmunopositivas a GAD encontradas en el hipocampo y en el giro dentado en los cortes de los diferentes niveles del eje rostro-caudal de ratas de 30 y 90 días de edad del grupo control.

Se encontró una disminución estadísticamente significativa de la densidad de células GABAérgicas de los 30 a los 90 días de edad en los cortes del nivel 1 en el hipocampo y de los niveles 1 y 3 en el giro dentado ($p < 0.007$) y un aumento significativo en el corte del cuarto nivel del hipocampo ($p < 0.01$).

TABLA II. DENSIDAD ((cel/mm²) DE CÉLULAS GABAÉRGICAS EN CORTES SERIADOS+ DE HIPOCAMPO Y GIRO DENTADO DE RATAS DE 30 Y 90 DÍAS DE EDAD DE LA CONDICIÓN NUTRICIONAL CONTROL (25/25%).

Cortes+	Hipocampo			Giro dentado		
	30 d	90 d	% de cambio ++	30 d	90 d	% de cambio ++
1	42 ± 1	34 ± 2	-19 **	90 ± 22	72 ± 16	-20***
2	35 ± 3	33 ± 5	-6	84 ± 9	72 ± 6	-14
3	33 ± 5	29 ± 5	-12	77 ± 6	65 ± 7	-16***
4	22 ± 6	27 ± 5	+23**	59 ± 9	58 ± 7	-2
\bar{x} +++	33 ± 3	31 ± 2	-6	78 ± 5	67 ± 3	-14

Se expresan el promedio ± el error estándar (n=3)

+Los cortes son muestras de los primeros 1320 μm de la formación hipocámpica en dirección rostro caudal. ++como cambia la densidad en 90 días con respecto a 30 días. +++Promedio de los 12 cortes (n = 3, 4 cortes por rata). significancia estadística: ** p< 0.01, *** p< 0.007

Cuando se comparó el promedio de células GABAérgicas de los 30 días, contra la densidad a los 90 días de edad de los 4 cortes, tanto en hipocampo como en giro dentado (Tabla II), solo se encontró una tendencia de disminución no significativa (Fig. 9 y 10).

Densidad de neuronas positivas a GAD en las diferentes condiciones experimentales de nutrición, a los 30 y 90 días de edad.

La distribución general de las neuronas inmunopositivas a GAD para las diferentes condiciones de nutrición (25/6, 6/25 y 6/6%) fue semejante a la observada en el grupo 25/25. Así, en el hipocampo se encontraron distribuidas en los estratos polimórfico, piramidal y molecular de CA1 a CA4, tanto a los 30 como a los 90 días de edad; y en el giro dentado en la capa de células granulares, en el estrato molecular dorsal y ventral y en la región hilar.

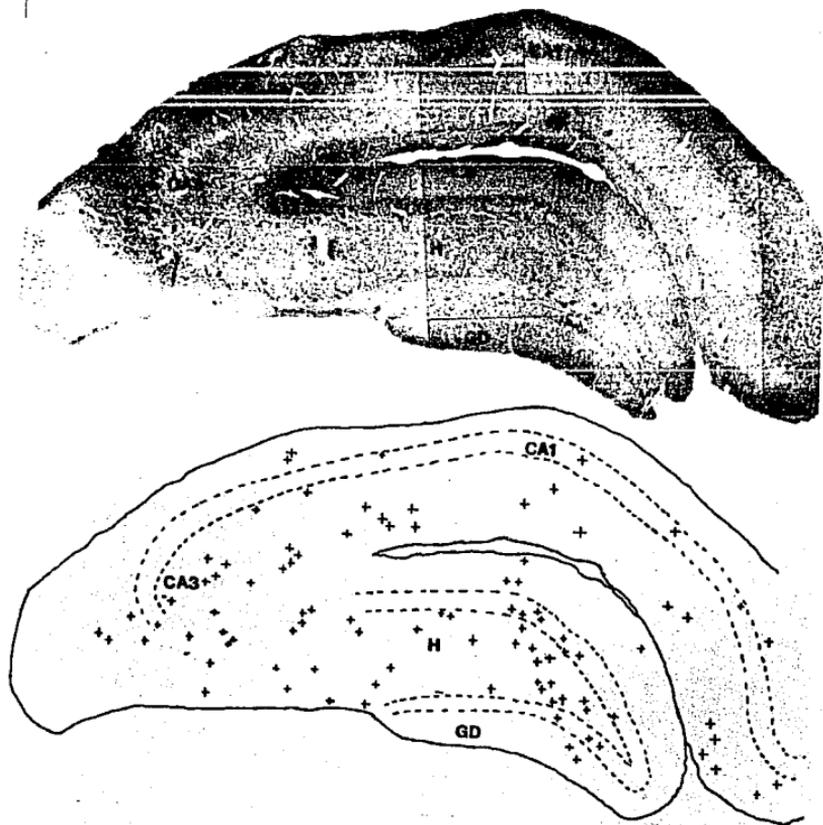


Fig. 3. Distribución de interneuronas con inmunopositividad parecida a GAD. Regiones CA1 y CA3 del hipocampo y en hilum (H), capa granular (CG) y lámina molecular (LM) del giro dentado (GD), 140X.

a) Fotomicrografía y b) Esquema realizado en el sistema procesador digital de imágenes, las cruces indican los somas inmunoreactivos a GAD.

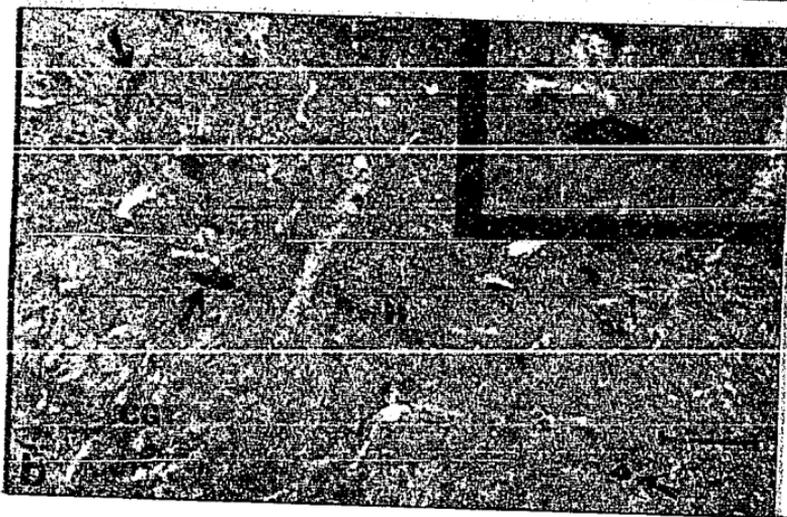
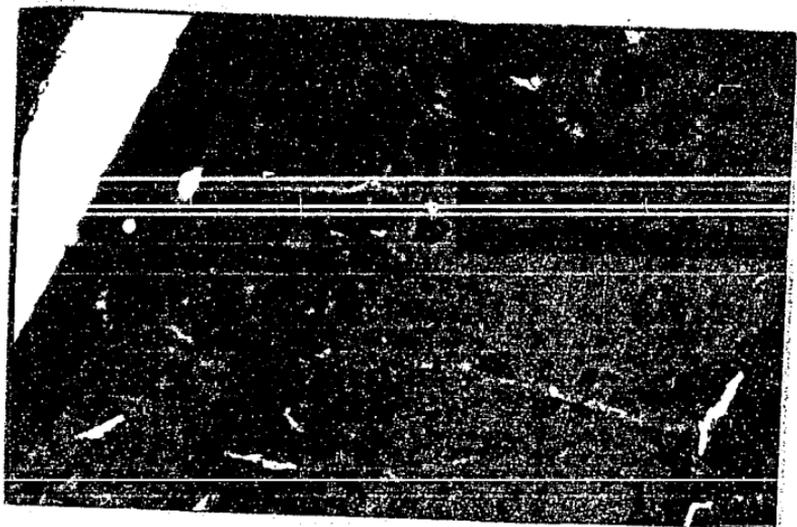


Fig. 4 Microfotografías de cortes de 30 μm de la formación hipocámpica mostrando células inmunopositivas a GAD. a) Células positivas a GAD en CA1 del Cornu Ammonis (flechas). En el inset se muestra la ampliación de unas de las células inmunopositivas b) Células inmunopositivas en el giro dentado (flechas). CG, capa granular; H, región hilar. En el inset se muestra la ampliación de una de éstas células. Calibración de la barra=25 μm , inset 10 μm .

Desnutrición postnatal (25/6%)

En la Tabla III y las figuras 5, 6, 7 y 8 se presentan los datos de la densidad promedio y el error estándar, de las células inmunopositivas a GAD encontradas en hipocampo y giro dentado de ratas de 30 y 90 días de edad, del grupo con desnutrición postnatal (25/6%).

TABLA III. DENSIDAD (cel/mm²) DE CÉLULAS GABAÉRGICAS EN CORTES SERIADOS+ DE HIPOCAMPO Y GIRO DENTADO DE RATAS DE 30 Y 90 DÍAS DE EDAD DE LA CONDICIÓN DE DESNUTRICIÓN POSTNATAL (25/6%).

Cortes+	Hipocampo			Giro dentado		
	30 d	90 d	% de cambio++	30 d	90 d	% de cambio++
1	33 ± 2	39 ± 7	+18**	94 ± 5	79 ± 7	-16**
2	29 ± 7	32 ± 5	+10	96 ± 8	73 ± 9	-24**
3	26 ± 5	26 ± 8	0	88 ± 14	71 ± 14	-19**
4	20 ± 3	22 ± 7	+10	80 ± 10	69 ± 7	-14**
\bar{X}^{+++}	27 ± 2	30 ± 3	+11	90 ± 5	73 ± 3	-19**

Se expresan el promedio ± el error estándar (n=3)

+Los cortes son muestras de los primeros 1320 μm de la formación hipocámpica en dirección rostro caudal. ++como cambia la densidad en 90 días con respecto a 30 días. +++Promedio de los 12 cortes (n = 3, 4 cortes por rata); significancia estadística: ** p<0.05

Como puede observarse, los cambios en la densidad en las diferentes edades fue opuesto entre giro dentado e hipocampo. Al comparar el grupo de 30 días con el de 90, la densidad de células GABAérgicas se encontró disminuída significativamente (p<0.05), en todos los niveles de corte evaluados en giro dentado; en el hipocampo sin embargo, la densidad aumentó en tres de los 4 niveles estudiados, con significancia estadística solo en el primer nivel.

En cuanto a la densidad promedio de células inmunopositivas a GAD en hipocampo, considerando los 4 niveles a los 30 y 90 días no se encontró cambio significativo. De manera contraria en el giro dentado se encontró disminución significativa de la densidad celular (Tabla III).

HIPOCAMPO

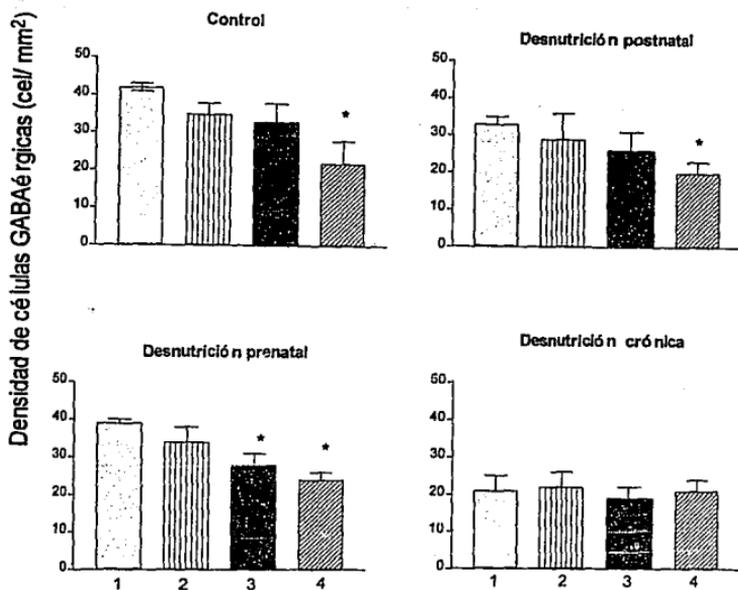


Fig. 5.- Densidad promedio de neuronas inmunopositivas a GAD en cortes seriados (1-4) frontales en dirección rostro caudal, de hipocampo de ratas de 30 días de edad que fueron sometidas a diferentes condiciones de nutrición. *diferencia significativa con $p < 0.05$.

Desnutrición prenatal y rehabilitación nutricional postnatal (6/25%).

En la Tabla IV y las figuras 5, 6, 7 y 8 se presentan los datos de la densidad de las células inmunopositivas a GAD encontradas en los cuatro niveles de corte en el hipocampo y en el giro dentado de ratas de 30 y 90 días de edad, del grupo desnutrido prenatalmente y rehabilitado nutricionalmente en el primer día de nacimiento (6/25%).

En esta condición se encontró algo similar que en el grupo anterior (25/6%) ya que en el giro dentado ocurrió una disminución significativa ($p < 0.05$) de la densidad de células GABAérgicas, de los 30 a los 90 días de edad en todos los niveles de corte evaluados, mientras que en hipocampo la densidad fue semejante de los 30 a los 90 días en tres de los niveles, presentándose aumento significativo solo en el cuarto nivel.

En cuanto a la densidad promedio de células inmunopositivas a GAD en el hipocampo, considerando los 4 niveles de corte de los 30 y 90 días, no se encontró disminución significativa en el hipocampo, y sí en el giro dentado.

TABLA IV. DENSIDAD DE CÉLULAS GABAÉRGICAS (cel/mm²) EN CORTES SERIADOS DE HIPOCAMPO Y GIRO DENTADO DE RATAS DE 30 Y 90 DÍAS DE EDAD DE LA CONDICIÓN DE DESNUTRICIÓN PRENATAL, CON REHABILITACIÓN NUTRICIONAL AL NACER (6/25%).

Cortes+	Hipocampo			Giro dentado		
	30 d	90 d	% de cambio++	30 d	90 d	% de cambio++
1	39 ± 1	40 ± 1	+2	132 ± 43	66 ± 6	-50**
2	34 ± 4	33 ± 2	-3	92 ± 25	65 ± 6	-29**
3	28 ± 3	29 ± 5	+3	104 ± 31	60 ± 2	-42**
4	24 ± 2	28 ± 2	+16**	75 ± 7	57 ± 4	-24**
χ+++	32 ± 2	33 ± 2	+3	99 ± 10	62 ± 2.4	-37**

Se expresan el promedio ± el error estándar (n=3)

+Los cortes son muestras de los primeros 1320 μm de la formación hipocámpica en dirección rostro caudal. ++como cambia la densidad en 90 días con respecto a 30 días. +++Promedio de los 12 cortes (n = 3, 4, cortes por rata); significancia estadística: ** p < 0.05.

HIPOCAMPO

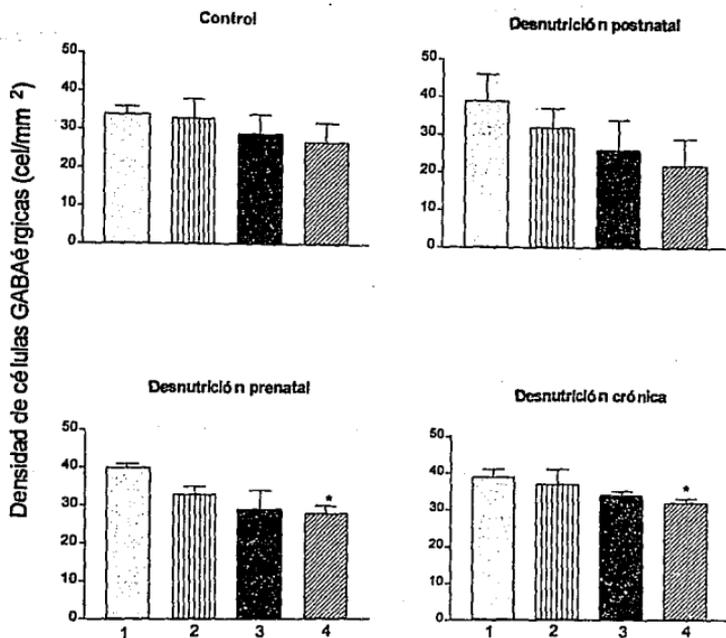


Fig. 6- Densidad promedio de neuronas inmunopositivas a GAD en cortes seriados (1-4) frontales en dirección rostro caudal, de hipocampo de ratas de 90 días de edad que fueron sometidas a diferentes condiciones de nutrición. *diferencia significativa con $p < 0.05$.

Desnutrición pre y postnatal (6/6%).

En la Tabla V y las figuras 5, 6, 7 y 8 se presentan los datos de la densidad promedio y su error estándar, de las células inmunopositivas a GAD encontradas en hipocampo y giro dentado de ratas de 30 y 90 días de edad, del grupo desnutrido prenatal y postnatalmente (6/6%).

En esta condición a diferencia de las dos anteriores, se encontró un aumento significativo ($p < 0.05$) tanto en hipocampo como en giro dentado de la densidad de células GABAérgicas, de los 30 a los 90 días de edad en todos los niveles de corte evaluados.

En consecuencia, también se encontró aumento en la densidad promedio de células inmunopositivas a GAD en el hipocampo y en el giro dentado, cuando se consideraron los 4 niveles de corte a los 30 y 90 días de edad.

TABLA V. DENSIDAD DE CÉLULAS GABAÉRGICAS ($cell/mm^2$) EN CORTES SERIADOS+ DE HIPOCAMPO Y GIRO DENTADO DE RATAS DE 30 Y 90 DÍAS DE EDAD DE LA CONDICIÓN DE DESNUTRICIÓN CRÓNICA (6/6%).

Cortes+	Hipocampo			Giro dentado		
	30 d	90 d	% de cambio++	30 d	90 d	% de cambio++
1	21 ± 4	39 ± 2	+86**	46 ± 9	77 ± 6	+ 67**
2	22 ± 4	37 ± 4	+68**	57 ± 8	75 ± 3	+ 32**
3	19 ± 3	34 ± 1	+79**	40 ± 7	85 ± 5	+ 112 **
4	21 ± 3	32 ± 1	+52**	56 ± 9	84 ± 4	+ 50**
X+++	22 ± 1	34 ± 1	+54**	48 ± 3	80 ± 2	+ 67**

Se expresan el promedio ± el error estándar (n=3)

+Los cortes son muestras de los primeros 1320 μm de la formación hipocámpica en dirección rostro caudal. ++como cambia la densidad en 90 días con respecto a 30 días. +++Promedio de los 12 cortes (n = 3, 4 cortes por rata); significancia estadística: ** $p < 0.05$.

GIRO DENTADO

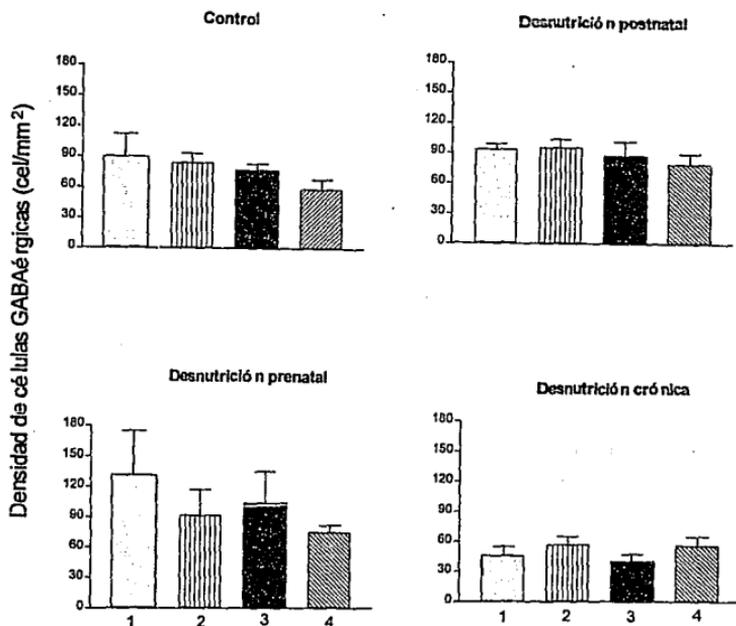


Fig. 7.- Densidad promedio de neuronas inmunopositivas a GAD en cortes seriados frontales (1-4) en dirección rostro caudal, de giro dentado de ratas de 30 días de edad que fueron sometidas a diferentes condiciones de nutrición.

GIRO DENTADO

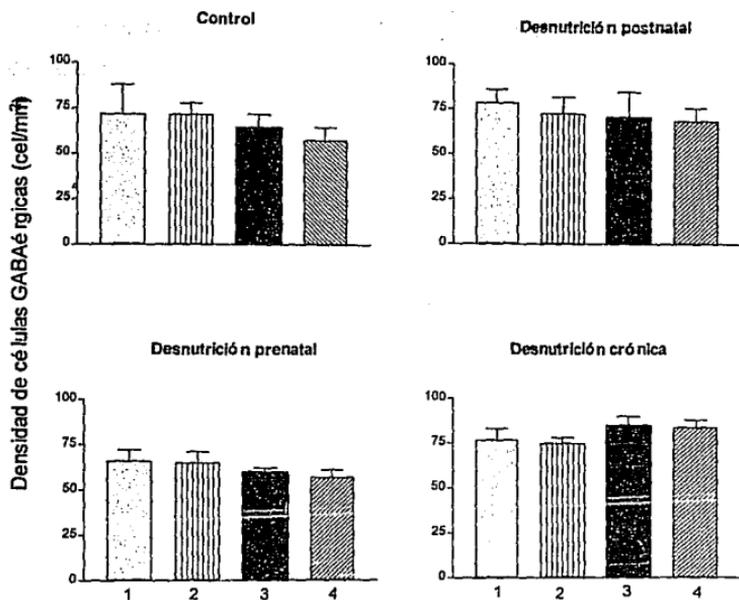


Fig. 8.- Densidad promedio de neuronas inmunopositivas a GAD en cortes seriados frontales (1-4) en dirección rostro caudal, de giro dentado de ratas de 90 días de edad que fueron sometidas a diferentes condiciones de nutrición.

Comparación de la densidad de células GABAérgicas en las diferentes condiciones de nutrición

Hipocampo

La comparación de la densidad entre el grupo control y los experimentales a los 30 días de edad, indica una disminución significativa ($p < 0.0008$) en el grupo desnutrido crónicamente (6/6%) (Fig. 9). A los 90 días en cambio no se encontraron diferencias significativas de los tres grupos experimentales con el control (Tabla VI).

TABLA VI. DENSIDAD PROMEDIO DE CÉLULAS INMUNOPOSITIVAS A GAD EN HIPOCAMPO DE RATAS DE 30 Y 90 DÍAS DE EDAD SOMETIDAS A DIFERENTES CONDICIONES DE NUTRICIÓN.

Condiciones de nutrición	30 d	% de cambio	90 d	% de cambio
25/25%	32 ± 2		31 ± 2	
25/6%	27 ± 2	-16	32 ± 3	+3
6/25%	32 ± 2	0	33 ± 2	+6
6/6%	22 ± 1	-31 *	35 ± 1	+12

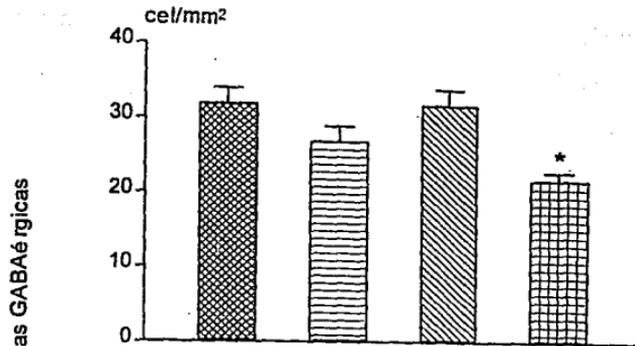
Se expresan el promedio ± el error estándar (n=3)

EL % DE CAMBIO ES EN RELACIÓN AL GRUPO CONTROL (25/25).

* disminución significativa con una $p < 0.0008$.

En general, se puede decir que a excepción del grupo 6/6% en el que se encontró una disminución del 31% en la densidad solo a los 30 días, la densidad de células GABAérgicas en hipocampo es semejante a la edad de 90 días en los animales de las diferentes condiciones nutricionales (25/25%, 6/25%, 25/6% y 6/6%). Con base en lo anterior podría decirse que a los 30 días sólo con desnutrición crónica se encuentran cambios mientras que a los 90 días la densidad de células inmunopositivas a GAD en esta estructura no se ve afectada por la desnutrición establecida prenatalmente, postnatalmente o bien de manera crónica.

HIPOCAMPO 30d



90d

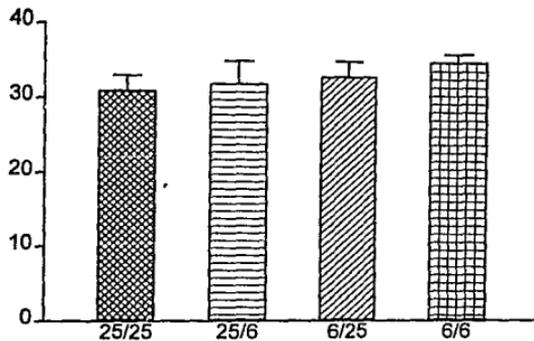


Fig.9.- Densidad promedio de neuronas GABAérgicas en hipocampo de ratas de 30 y 90 días de edad sometidas a diferentes condiciones de nutrición. * diferencia significativa con $p < 0.008$.

Giro dentado

La densidad de células GABAérgicas en los animales de 30 días presentó cambios significativos en los grupos desnutridos, así, el grupo 6/25 aumentó en 27% en tanto que el grupo 6/6, disminuyó en un 39% (Tabla VII y Fig. 10).

En los animales de 90 días de edad la densidad de células inmunopositivas a GAD de los grupos 25/25, 25/6 y 6/25% no presentó diferencia significativa, por el contrario en la condición 6/6% se encontró un aumento significativo del 19% (Tabla VII y Fig. 10).

TABLA VII . DENSIDAD PROMEDIO DE CÉLULAS INMUNOREACTIVAS A GAD EN GIRO DENTADO DE RATAS DE 30 Y 90 DÍAS DE EDAD SOMETIDAS A DIFERENTES CONDICIONES DE NUTRICIÓN.

Condiciones de nutrición	30 d		90 d	
		% de cambio		% de cambio
25/25%	78 ± 5		67 ± 3	
25/6%	90 ± 5	+14	73 ± 3	+9
6/25%	99 ± 11	+27**	62 ± 2	-7
6/6%	48 ± 3	-39*	80 ± 2	+19**

Se expresan el promedio ± el error estándar (n=3)

EL % DE CAMBIO ES EN RELACIÓN AL GRUPO CONTROL (25/25).

* disminución significativa con una $p < 0.001$

** aumento significativo $p < 0.01$

El giro dentado presentó el mayor número de cambios en la densidad de células GABAérgicas en los animales de 30 días. Por otra parte, las dos edades en los grupos desnutridos de 25/6 y 6/25, no registró diferencias significativas entre estos grupos y el control (25/25%); a los 90 días, lo anterior no se cumplió para el grupo 6/6, en el cual se encontró disminución a los 30 y aumento a los 90 días de edad (Tabla VII; Fig. 10).

GIRO DENTADO

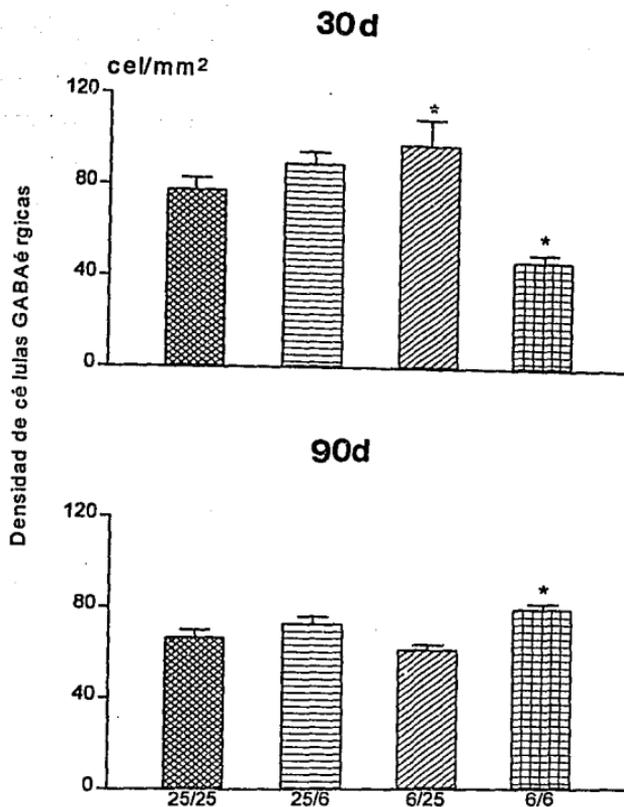


Fig. 10.- Densidad promedio de neuronas GABAérgicas en giro dentado de ratas de 30 y 90 días de edad sometidas a diferentes condiciones de nutrición. * La disminución ($p < 0.001$) o el aumento ($p < 0.01$) es con respecto al grupo control.

VI. DISCUSIÓN

Se encontraron células inmunoreactivas a GAD tanto en el hipocampo como en el giro dentado de las ratas sometidas a malnutrición proteínica durante la etapa pre o postnatal, así como con o sin rehabilitación nutricional a partir del primer día del nacimiento. La densidad de células inmunopositivas a GAD fue de casi un 50% mayor en el giro dentado que en el hipocampo, en las dos edades estudiadas (30 y 90 días).

La especificidad de la marca obtenida indica, por lo tanto, la presencia de células productoras del GABA en estas regiones. Las células marcadas se encontraron en todos los niveles del hipocampo y giro dentado explorados, en algunos casos la marca permitió realizar además del análisis cuantitativo de densidades, observaciones de la morfología y localización de estas neuronas. Las células inmunopositivas a GAD encontradas en la región hilar, así como en el borde de la capa de células granulares o bien incluidas en ésta, corresponden a los tipos descritos por Seress y Ribak (1983; 1988) y Ribak y Seress (1983).

Las comparaciones realizadas en cuanto a la densidad de células positivas a GAD, entre el grupo control y las tres condiciones experimentales de nutrición, mostraron diferencias entre el hipocampo y el giro dentado, lo cual indica que la desnutrición afecta a la densidad de células GABAérgicas de manera diferente en las dos regiones estudiadas.

A los 30 días de edad, en el hipocampo se encontró una tendencia de reducción en la densidad de células positivas a GAD en los grupos experimentales en relación al grupo 25/25%. En el grupo 25/6%, la disminución fue de un 18%, y en el grupo 6/25% del 3%, lo que indicaría cierta reversibilidad del efecto, de tal manera que parece haber una recuperación casi completa en la densidad celular, con respecto al grupo bien nutrido, sin embargo, la única

diferencia significativa se encontró en el caso más severo de desnutrición, es decir, en el grupo 6/6%, en este caso la reducción fue de un 31%. Estos cambios encontrados a los 30 días se perdieron en los animales de 90 días; al parecer hasta esa edad se recupera la población de células GABAérgicas del hipocampo.

En el giro dentado se encontró una combinación de efectos; hubo tanto aumento como disminución de la densidad. A los 30 días de edad en la condición en la cual se combinó buena nutrición con el establecimiento de la desnutrición en etapa prenatal (6/25%), se observó un aumento significativo con respecto al grupo control, en la densidad de células GABAérgicas. La reducción significativa de la densidad, se observó al igual que en el hipocampo, en el grupo en el cual la desnutrición abarcó las etapas pre y postnatal. A los 90 días de edad de manera parecida a lo encontrado en hipocampo la condición de desnutrición 6/25% se recuperó pero no así en la desnutrición crónica (6/6%) en la que se encontró un aumento significativo.

La interpretación de los resultados en cuanto al efecto de las diferentes condiciones de nutrición sobre la densidad de células GABAérgicas en el hipocampo y en el giro dentado, debe realizarse teniendo en mente que el desarrollo y maduración del cerebro depende de tres factores esenciales: el genético, los estímulos o complejidad del medio ambiente y el consumo adecuado de nutrimentos.

Reducción de la densidad de células GABAérgicas por malnutrición proteínica.

Con respecto al consumo de nutrimentos, es necesario tomar en cuenta principalmente 4 factores para evaluar los efectos de la mala nutrición. El primer factor es el tipo de desnutrición, esto es, si la privación es de proteínas, calorías, vitaminas, elementos traza, etc., o es una combinación de éstos. El segundo aspecto es el tiempo en el cual se establece la desnutrición, esto es, el tiempo en el que el organismo se desarrolla, ya sea durante el periodo gestacional, postnatal o ambos. El tercer factor es la duración del periodo de desnutrición y el cuarto la severidad de ésta (Morgane y col., 1993). Si se considera lo anterior es posible realizar propuestas para explicar los resultados obtenidos en este estudio.

Las células piramidales del hipocampo, entre las que se cuentan las GABAérgicas, se originan antes del nacimiento. Así, la disminución de la densidad de células GABAérgicas encontrada en hipocampo y giro dentado a los 30 días de edad, en el grupo desnutrido crónicamente ocurrió probablemente debido a la falta de proteínas ("elementos de construcción"), durante la etapa prenatal, afectándose así la neurogénesis y quizás todos los eventos que se realizan durante el desarrollo y maduración del cerebro (Morgane y col., 1993). Se sabe por otra parte que la desnutrición materna incluye insuficiencia placentaria, la cual, al parecer es uno de los principales factores que perturban el desarrollo del cerebro del feto, ya que se requiere de un suministro apropiado de nutrimentos para mantener el crecimiento. Considerando a éste, no sólo como el aumento de la medida o el peso, sino considerando además aspectos interdependientes del desarrollo, tales como la proliferación localizada de células en las diferentes regiones cerebrales, la migración de células desde la región

donde se generan hasta los lugares donde finalmente residen, la agregación de células para formar las partes identificables del cerebro, la diferenciación de las neuronas inmaduras, la formación de conexiones con otras neuronas, la muerte selectiva de ciertas células y la eliminación de algunas de las conexiones formadas inicialmente y la estabilización de otras, todos ellos programados genéticamente y que conducen finalmente al desarrollo normal de todas las funciones neuronales (Maxwell, 1979; Shatz, 1992). Lo anterior es apoyado, por estudios previos en los que se ha mostrado que la desnutrición durante la preñez, puede afectar gran variedad de procesos celulares. En estos se incluye la reducción del número de células formadas, debido a que la desnutrición perturba y/o desincroniza la migración celular desde las zonas de origen hacia su zona blanco; de tal manera que las neuronas no reciben las señales necesarias para su crecimiento y diferenciación, y por lo tanto estos procesos pueden ser bloqueados o retardados provocándose así un aumento de la muerte celular (Morgane y col., 1993). Se ha mostrado que en el giro dentado de ratas desnutridas aumenta la duración del ciclo celular, por prolongación de la fase de síntesis de ADN, produciendo además una marcada reducción de la fase G1 del ciclo y del grado mitótico, lo que provoca finalmente una severa disminución del número de células granulares (Leuba y Rabinowicz, 1979; Lewis, Patel y Balazs, 1979; Bedi, 1987).

Aumento de la densidad de células GABAérgicas por malnutrición proteínica

Otro de nuestros datos relevantes es el aumento en la densidad de células GABAérgicas encontrado a los 90 días de edad en el grupo 6/6. Puesto que a estos animales no se les sometió a ningún periodo de rehabilitación resulta

difícil entender esta recuperación, sin embargo, una posible explicación puede ser que el aumento en la densidad solo sea aparente.

Se sabe que el desarrollo normal del cerebro incluye una fase de crecimiento rápido, en el que ocurre la generación y diferenciación de la oligodendroglia y la mielinización (Díaz y col. 1991; Morgane y col., 1993), ambas involucrados directamente con el crecimiento cerebral, después de este periodo aunque existe crecimiento del cerebro, éste se da en menor grado.

En este estudio se comprobó este crecimiento en todas las condiciones de nutrición porque el área a los 90 días de edad fue mayor que a los 30, sin embargo es importante mencionar que en el grupo con desnutrición crónica se encontró aunque sin significado estadístico, una disminución del área a los 90 días de edad, la cual puede haber influido en algo para el aumento en la densidad de células GABAérgicas en este grupo.

Por otro lado, el aumento en la densidad de células GABAérgicas encontrado a los 30 días en el giro dentado, de los grupos en los que se combinaron periodos de buena nutrición con desnutrición establecida prenatalmente (6/25), puede ser debido a una combinación de retrasos, tanto de los eventos del desarrollo como los de la maduración del cerebro, ambos programados genéticamente. En años recientes se ha propuesto que la desnutrición puede retardar la maduración del cerebro o impedir permanentemente su desarrollo. En relación al término retardo, se ha sugerido que éste puede ser engañoso, puesto que sugiere una patología en un proceso que continúa pero de manera lenta y que de este modo, el desarrollo puede ser tardío pero normal, en este sentido se sugiere que existe un potencial de recuperación ("catch-up") (Morgane y col., 1993). Así, un proceso que se detiene y a cierta edad es deficiente, quizás a otra edad puede llegar a ser

normal. Con base en lo anterior podríamos pensar que aunque la dieta hipoproteínica suministrada durante la gestación retardó los eventos de generación y maduración neuronal (igual que en el grupo 6/6), el suministro de una dieta adecuada al nacer puede haberlos reactivado de tal manera que el aumento de células GABAérgicas encontrado a los 30 días en este grupo, probablemente es el resultado tanto de la continuación de los eventos de neurogénesis lentificados por la dieta hipoproteínica como del retraso en la muerte de neuronas como consecuencia de lo mismo. El retraso en la muerte natural de neuronas se sugiere debido a que el número de neuronas GABAérgicas a los 30 días es mayor al encontrado a los 90 días de edad. Posteriormente la disminución natural de neuronas, aunada a la disminución en el área de la formación hipocámpica en éstos grupos (aunque sin significancia estadística), puede haber dado como resultado la semejanza en la densidad de células GABAérgicas, con respecto al grupo control, encontrada en estos grupos a los 90 días.

Los hallazgos antes mencionados concuerdan con la propuesta de la existencia de un potencial de recuperación (6/25). Sin embargo no debemos olvidar que también existe la idea de que la desnutrición prenatal puede ser de mayor importancia para la función cerebral subsecuente debido a que en ésta etapa de manera heterocrónica en cada una de las estructuras cerebrales, ocurren los periodos de neurogénesis máxima, así como los periodos de migración neuronal (Herschkowitz, 1972; Rodier, 1976; 1980; Scott, 1979; Colombo, 1982; Smart, 1991; Morgane y col., 1993).

Daño en la función hipocámpica por malnutrición proteínica

Con base en lo que se conoce acerca del desarrollo normal del cerebro, se han dado diversas explicaciones para la variación en la densidad encontradas a causa de la desnutrición hipoproteínica. En lo que sigue se tratará de analizar como la disminución (en el grupo 6/6), el aumento (en los grupos 6/6, 25/6 y 6/25), así como la aparente recuperación en la densidad de células GABAérgicas pueden afectar la integridad funcional del hipocampo en las dos edades estudiadas.

Con respecto a la conectividad neuronal y circuitería, es difícil imaginar que éstas pudieran ser normales cuando la población de células GABAérgicas de la formación hipocámpica ha disminuído o bien ha aumentado, a causa de un retraso en los procesos de su desarrollo y maduración programados genéticamente. Con base en lo anterior se puede suponer que además de existir un retraso en la maduración funcional de la estructura, pueden también haber ocurrido cambios en las relaciones normales de aferencias y eferencias de la estructura, alterando así su funcionalidad. Un ejemplo de esto se muestra en los estudios electrofisiológicos realizados en ratas desnutridas, con el esquema de desnutrición utilizado en este trabajo (Austin y col, 1986;1989; 1992; Morgane y col., 1993; Bronzino y col. 1994).

En esos estudios se evaluó la capacidad de las ratas desnutridas prenatalmente (6/25) para establecer y mantener la potenciación a largo plazo (LTP) de la sinapsis de la vía perforante hacia el giro dentado, se encontró que si bien ocurrió fortalecimiento del componente de los potenciales postsinápticos excitatorios (EPSP) del potencial de campo, no ocurrió sin embargo un aumento en la descarga de las células granulares como lo indicó el registro de la población de espigas. Es decir, el sistema mostró aumento de la actividad sináptica como lo

indicó la potenciación del componente EPSP sin aumento subsecuente de la descarga de las células granulares, lo cual sugiere una hiperpolarización basal de las células granulares.

Se sabe que aunque las interneuronas GABAérgicas representan solo de un 5 a un 11% de la población neuronal total del Asta de Ammon y el giro dentado, ellas son capaces de controlar el disparo de la población de células principales de estas regiones (neuronas piramidales y granulares), gracias a sus extensas arborizaciones axonales (Freund y Antal, 1988; Freund, 1992). Estas interneuronas hacen conexiones sinápticas con los somas, los segmentos axonales iniciales y las dendritas de las células granulares, de tal modo que si se toma como base que la glutamato descarboxilasa así como el GABA están presentes a los niveles encontrados en los adultos desde los 18 días de edad, se puede suponer que las neuronas GABAérgicas de los animales de 30 días denutridos pre o postnatalmente son capaces de liberar GABA a esta edad, así que el aumento en la densidad de estas células en los grupos 25/6 y 6/25 podría explicar, al menos en parte, la hiperpolarización encontrada en los estudios electrofisiológicos. Por otro lado, deben considerarse dos hechos importantes: uno, que el umbral de las interneuronas GABAérgicas es menor que el de descarga de las células granulares (Austin y col., 1986; 1989; 1992; Morgane y col., 1993) y otro, que en estudios del desarrollo postnatal de la inhibición sináptica mediada por GABA en el hipocampo de la rata, se ha encontrado por un lado, que la maduración del sistema inhibitorio ocurre a diferentes tiempos postnatales en las diferentes regiones del hipocampo, y por otro que entre los 10 y 11 días de edad ocurre un aumento significativo de la inhibición (Swann, Brady y Martin, 1989). Aunque hasta el momento no se conoce la causa del aumento de la eficacia sináptica de las interneuronas en edades postnatales tempranas, podría

pensarse que quizás este evento puede aún estar presente en las ratas desnutridas también por retraso, de tal manera que un estímulo pudiera ser capaz de afectar en mayor grado la excitabilidad de las interneuronas GABAérgicas que la de las células granulares, explicándose de esta manera también el aumento de inhibición.

Así mismo, no debe descartarse que en general la desnutrición pudo haber variado las relaciones normales de aferencias y eferencias de la estructura hipocámpica, alterando así su funcionalidad, de tal manera que la semejanza en la densidad de células GABAérgicas encontrada en las diferentes condiciones de nutrición a los 90 días de edad, tanto en hipocampo como giro dentado de las ratas desnutridas, no garantizan una función adecuada, como lo muestran también los estudios electrofisiológicos de la LTP y actividad theta hipocampal estudiados en animales de 90 días de edad (Morgane y col., 1993).

Es importante mencionar que aunque los resultados encontrados en este estudio confirman la propuesta de daño en el sistema GABAérgico modulador de la formación hipocámpica, sugerida a partir de estudios electrofisiológicos, no se debe descartar que la malnutrición proteínica también puede haber afectado a los suministros inhibitorios extrínsecos GABAérgicos (Freund y Antal, 1988), serotoninérgicos (Freund, 1992), colinérgicos y noradrenérgicos (Shephred, 1990) provenientes del septo medio y del tallo cerebral (ver apéndice).

Las aferentes GABAérgicas hacia el hipocampo que se originan de neuronas de proyección en el septo medio, terminan predominantemente sobre interneuronas GABAérgicas en CA3 y en el giro dentado. Se ha sugerido que la activación de este sistema GABAérgico desde el septo, puede conducir a desinhibición de las células granulares del giro dentado por inhibición de las interneuronas GABAérgicas. Se cree que la desinhibición de las células

granulares por éste medio, puede ser crucial en la inducción de los patrones de actividad hipocámpal tales como la sincronización rítmica de las neuronas durante la actividad theta (Freund y Antal, 1988).

En estudios de análisis de saturación de los sitios de unión a GABA utilizando [^3H] -GABA en homogenados de la corteza cerebral y la formación hipocámpica, se encontró que aunque las ratas adultas normales como las malnutridas, presentan receptores de alta y baja afinidad a GABA, las ratas malnutridas presentan sin embargo, un aumento significativo de sitios de baja afinidad. Por otro lado, debido a que los sitios de alta afinidad pudieron ser detectados solo después de tratar a las membranas con detergentes, se ha sugerido que éstos sitios de manera normal, son ocupados por inhibidores endógenos. (Bonanno y Raiteri, 1987). Se ha sugerido que de las vías por la que la malnutrición puede haber modificado la transmisión sináptica mediada por GABA, una puede ser por reducción del contenido de inhibidores endógenos que se unen a los sitios de alta afinidad y otra por modificación de las características de los receptores a GABA (Telang, Fuller, Wiiggins, Enna, 1984). Si consideramos lo anterior podríamos sugerir que aún cuando la población de células GABAérgicas del septo medio no sufra cambios a causa de la malnutrición, su transmisión hacia las células inhibitorias de la formación hipocámpica puede modificarse.

Otros sistemas inhibitorios hacia el hipocampo son las aferentes serotoninérgicas (5-HT) que se originan en el núcleo rafe medio y las noradrenérgicas desde el locus coeruleus (Lidow, Goldman-Rakie, Gallager, Rakie, 1989).

En estudios recientes se ha encontrado que en ratas malnutridas prenatalmente y rehabilitadas nutricionalmente al nacer existe una disminución del

plexo de aferentes a 5-HT en el giro dentado, una disminución del 15 al 25% de sitios de captura de 5-HT en el subcampo CA3, y una disminución del 20% de receptores a 5-HT en CA1. Lo anterior puede resultar en una disminución de la inhibición (esto es desinhibición) sobre las interneuronas GABAérgicas del circuito local del hipocampo (Blatt, Chen, Rosene, Volicer y Galler, 1994).

Como una respuesta a denervación de la fimbria-fornix se ha demostrado crecimiento de axones colaterales tanto colinérgicos como noradrenérgicos extrínsecos en el hipocampo, (Blatt, Rosene, Rhodes y Virga, 1991). Aunque no se ha realizado nada al respecto en animales malnutridos, si consideramos lo anterior se podría suponer que dado que existe disminución del plexo serotoninérgico en ratas malnutridas, semejando tal vez la denervación, podríamos encontrar entonces una alteración en la densidad de fibras y terminales inmunoreactivas a acetilcolina transferasa (CHAT) en el giro dentado u otras partes de la formación hipocámpica en ratas malnutridas como compensación a la disminución del plexo serotoninérgico. Si lo anterior es cierto, podría ayudar a explicar las variaciones en la actividad theta encontradas en ratas malnutridas proteínicamente (Bilkey y Goddard, 1985; 1987; Morgane y col., 1993).

Por otra parte y en relación al EEG se ha propuesto que la primera aparición del ritmo theta en la rata está altamente correlacionada con la iniciación del comportamiento exploratorio básico y la apertura de los ojos, lo que sugiere que la actividad theta juega un papel crítico en el ingreso de información medioambiental en una etapa muy temprana del desarrollo. Se ha propuesto que el ritmo theta hipocámpal podría ser considerado una señal de atención en estados de vigilia, enfocando así la atención del animal en estímulos biológicamente relevantes dentro del medio ambiente y que durante estados de sueño (MOR) puede estar ingresando información a través del tricircuito

hipocámpal el cual probablemente juega un papel en la consolidación de la memoria (Morgane, 1993). En estudios del EEG en ratas malnutridas pre y postnatalmente (desnutrición crónica) así como solo prenatalmente (rehabilitadas nutricionalmente desde el primer día de nacimiento) a los 14, 18, 22 y 30 días de edad se ha encontrado retardo de la maduración funcional de los sistemas involucrados en la generación y o modulación de la actividad theta hipocámpal (Morgane y col. 1993).

En cuanto al suministro noradrenérgico, en ratas malnutridas prenatalmente se encontró una elevación significativa tanto de norepinefrina como de fenilalanina, en el tallo cerebral y otras regiones del cerebro. También se encontró que aunque tanto la fenilalanina como la tirosina son utilizadas para la síntesis de norepinefrina, esta última no mostró aumento (Morgane, 1993). Aunque en hipocampo de ratas malnutridas no se han realizado determinaciones como las anteriores, podríamos considerar que si el sistema norepinefrínico responde a la malnutrición igual que el sistema 5-HT, se podría esperar entonces, una disminución en el plexo norepinefrínico hacia la formación hipocámpica. De este modo, si se sabe que uno de los efectos de la norepinefrina en el hipocampo es un efecto inhibitorio sobre las interneuronas inhibitorias de la formación hipocámpica (Madison y Nicoll, 1988), esto podría explicar también el aumento en la inhibición encontrada en ratas malnutridas.

Finalmente, los cambios encontrados en la desnutrición pudieran explicarse por variaciones bioquímicas o por alteraciones de posibles efectos neuromoduladores, como los que ejercen los diversos péptidos que se han encontrado colocalizados en diferentes terminaciones inhibitorias extrínsecas (Schwerdtfeger, 1986; Leranthy y Frotscher, 1987; Freund y Antal, 1988; Gulyas, Gorcs y Freund, 1990).

VII.CONCLUSIONES

- 1. Existen neuronas GABAérgicas en el hipocampo y el giro dentado de la rata, que pueden ser detectadas inmunoreactivamente utilizando anticuerpos contra la enzima glutamato descarboxilasa.**
- 2. La desnutrición hipoprotéica afecta la densidad de estas células, de manera diferente en las dos regiones del hipocampo.**
- 3. El daño es evidente cuando la denutrición abarca el periodo pre y postnatal.**
- 4. Existe la posibilidad de que al suministrar los nutrimentos adecuados después del periodo prenatal de desnutrición, el organismo sea capaz de revertir el daño causado por ésta, al menos en cuanto a la población de células GABAérgicas .**
- 5.- El aumento en la densidad de células GABAérgicas encontrado en este estudio explica al menos en parte, el aumento en la inhibición encontrado en los estudios electrofisiológicos.**

VIII. APENDICE

Hipocampo

Estructura

El hipocampo es una estructura cilíndrica curvada cuyo eje ventro-dorsal forma un semicírculo alrededor del tálamo; forma parte del sistema límbico y su estudio se considera de importancia por ser uno de los probables sitios de asiento de la memoria (Mc. Naughton y Morris, 1987; Wyss y Groen, 1989). La ontogenia del hipocampo es particular debido a que sus poblaciones celulares presentan heterocronía, es decir, las células son generadas en distintos momentos del desarrollo, por lo que resulta un modelo ideal para demostrar los efectos de la desnutrición y de la rehabilitación nutricional sobre estas poblaciones celulares.

Desde las descripciones de Cajal, el hipocampo se divide en cuatro regiones (Fig. A.1), que han sido designadas tradicionalmente como CA1 - CA4 (del latín Cornu Ammon, o Ammon's horn). Las regiones del giro dentado (GD), el subículo (S) y la corteza entorrinal (CE) completan la región conocida como hipocámpica. El hipocampo está formado básicamente por las regiones CA1, CA3 y CA4. En los roedores, la región CA2 es pequeña e indistinta por lo que frecuentemente es ignorada; la CA4 también es llamada de células polimórficas. El área entre el giro dentado y el *stratum granulosum* de la región CA3 se denomina región polimórfica o hilar o simplemente hilum (Shephred, 1990; Bravo, 1991). Toda la región hipocámpica está formada por tres capas o láminas, estas son: la polimórfica (*el stratum oriens*), la piramidal (*el stratum pyramidale*), y la molecular, (*el stratum radiatum* y *stratum lacunosum-moleculare*). En el GD se distinguen estas tres capas, polimórfica (*el hilus*), granular (*stratum granulosum*), y la molecular (CM), (*stratum moleculare*), que a su vez se divide en dorsal y ventral (Shephred, 1990).

Elementos neuronales

Los tipos celulares en la formación hipocámpica son básicamente tres: las células piramidales, las granulares (Fig. A.1) y las interneuronas.

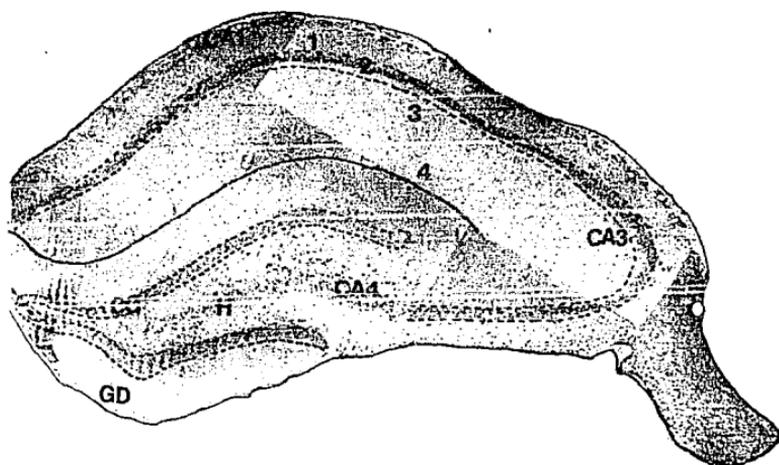


Fig. A.1. Regiones principales de la formación hipocámpica de la rata. Giro dentado (GD) e hipocampo. En el giro dentado (GD) se muestra la capa de células granulares (CG) y la región hilar (H). Del hipocampo se muestran las zonas CA1, CA3 y CA4, así como las capas que las forman: *stratum oriens* (1), *stratum pyramidale* (2), *stratum radiatum* (3) y *stratum lacunosum-moleculare* (4). 1200X.

Las células piramidales en la rata se generan prenatalmente entre los días embrionarios 14 al 19 (Altman y Bayer 1990); forman una franja entre los campos del 1 al 4 del *Cornu Ammonis* (CA1 a CA4) del hipocampo. Tienen somas en forma de pirámides con base de 20 a 40 μm y de 40 a 60 μm de altura; se identifican 2 tipos: a) neuronas de árbol dendrítico corto que tienden a ubicarse en la parte superior de la capa, con una dendrita apical corta, un gran número de espinas dendríticas y arborización apical y basal muy ramificada y b) neuronas de árbol dendrítico largo, ubicadas en la parte inferior de la capa, con una dendrita apical larga, un número pequeño de espinas y arborización apical y basal menos ramificada (Shephred, 1990).

Las células granulares (CG) forman la principal población del giro dentado. En la rata, se generan principalmente en el periodo postnatal (P) entre el día P0 al P18. De cada célula surgen una o varias dendritas; sus axones forman haces denominados fibras musgosas (Shephred, 1990) y el tamaño del soma se encuentra entre 10 -15 μm .

Las interneuronas se encuentran diseminadas por toda la formación hipocámpica; se han descrito varios tipos: Cajal en 1911 y Lorente de Nó en 1934 describieron dos tipos de células en cesta en el giro dentado. Sus somas se encuentran al margen de la región hilar con la capa de células granulares (células en cesta fusiformes) o bien incluidos en esta última (células piramidales), miden de 15 a 30 μm , tienen dendritas cortas de 3 a 6 μm y con pocas espinas; ambas envían sus axones dentro de la capa de células granulares para formar un plexo en cesta con los somas de estas células; además, tienen una dendrita apical que asciende hacia la capa de CG y dendritas basales que corren a lo largo del borde hilar o penetran al *hilum*. Existen otros tipos de interneuronas que forman circuitos locales en el giro dentado (Shephred, 1990) con somas dentro de la capa de CG y el tercero con

sus somas en la capa molecular. Este último tipo de células se encuentra en la región dorsal y ventral de la capa molecular, adyacente a la capa de CG y tiene un campo dendrítico multipolar. Las interneuronas GABAérgicas de la región hilar del GD y de la capa molecular dentada, se generan en la etapa embrionaria entre los días 15 al 19 (Shepehred, 1990).

El hilum tiene un circuito local complejo, con aproximadamente 21 tipos diferentes de interneuronas incluyendo los tipos morfológicamente distinguibles de células en cesta antes mencionados (Ribak y Seress, 1983; Seress y Ribak, 1983; 1988; Shepehred, 1990). Por estudios de inmunohistoquímica se sabe que muchas de las interneuronas son inmunopositivas a glutamato descarboxilasa (GAD), la enzima que cataliza el único paso de síntesis del ácido gamma-aminobutírico (GABA), el mayor neurotransmisor inhibitor del SNC de mamíferos; por tal razón, a estas células se les puede considerar GABAérgicas.

Aunque las células GABAérgicas están diseminadas por toda la formación hipocámpica, su densidad es mayor en el GD, donde se localizan subyacentes o dentro de la capa de células granulares y en la región molecular dorsal. En el hilum, el 60% de neuronas polimorfas son positivas a GAD (Seress y Ribak, 1983). En el GD, las terminales de las diferentes clases de interneuronas GABAérgicas hacen sinápsis de tipo inhibitorio sobre los somas y dendritas de las células granulares (Seress y Ribak, 1983; Kosaka, Hama y Yen Wu, 1984; Seress y Ribak, 1988; Ammassari - Teule, Pavone, Castellano y McGaugh, 1991).

Como ya se indicó, las células piramidales del hipocampo se originan antes del nacimiento, y cerca del 85% de las células granulares lo hacen (en la rata) durante el periodo postnatal, e inclusive se ha encontrado que estas células continúan produciéndose en el giro dentado de la rata durante toda su vida (Wyss y Groen, 1989; Díaz- Cintra y Ortega., 1991). Las neuronas GABAérgicas

de la formación hipocámpica de la rata al igual que las piramidales se generan prenatalmente. Por métodos bioquímicos se ha medido la actividad de la GAD necesaria para la síntesis de GABA y el contenido de GABA al nacer. Así, se ha determinado que en esta etapa se encuentra el 50% de GABA y 10% de GAD en relación a la cantidad encontrada en adultos (Seress y Riibak, 1983; 1988; Shephred, 1990).

Como un medio para obtener datos sobre el desarrollo de las neuronas GABAérgicas, se ha determinado por medio de técnicas inmunocitoquímicas la aparición de neuronas con inmunoreactividad positiva parecida a GABA y a GAD; se ha encontrado que estas neuronas aparecen en el día 4 y 6 postnatal, respectivamente. Durante los periodos postnatales P4-P8 y P12-P16, se produce un gran aumento en el número de neuronas positivas a GAD y GABA y antes del día postnatal P18 alcanzan el 90% del número total de neuronas que presentan la inmunoreactividad-positiva, encontrada en adultos (Kosaka y col., 1984; Shephred, 1990).

Aferencias, eferencias y circuito básico

La formación hipocámpica es un componente clave de los circuitos telencefálicos ya que conecta formaciones neocorticales con áreas bajas del sistema cerebral, por lo que su localización resulta estratégica para procesar y redistribuir información derivada de la asociación de áreas polimodales, incluyendo, la neocortical y las subcorticales. Las principales aferencias hacia el hipocampo y el GD surgen desde la corteza entorrinal, la región septal y el hipocampo contralateral. También hay aferencias importantes pero con proyecciones menos numerosas desde algunas otras regiones, incluyendo el hipotálamo, el tálamo y la amígdala. Sin embargo, la corteza entorrinal proporciona el mayor componente de las aferencias sensoriales hacia el

...del patrón perforante, llegando así al giro dentado y al subiculum (Shephred, 1990; Bravo, 1991).

El circuito interno primario (circuito trisináptico) esta formado por una vía monosináptica excitatoria que va de la corteza entorrinal a las células granulares del GD (primera sinapsis); estas células además forman un circuito de inhibición recurrente (Morgane y col., 1993; Bravo, 1991) con las interneuronas inhibitorias. A su vez, las fibras musgosas de las células granulares del GD son una eferencia importante hacia la región CA3 del hipocampo, en donde forman sinapsis excitatorias con las dendritas proximales de las células piramidales (segunda sinapsis). Los axones de éstas contribuyen a las proyecciones de asociación en el mismo campo CA3 pero además de éste salen fibras que son la mayor eferencia hacia las neuronas piramidales de CA1 (tercera sinapsis), las llamadas colaterales de Schaffer (Seress y Ribak, 1983; 1988; Kosaka y col., 1984; Shephred, 1990; Ammassari - Teule y col., 1991), (Fig. A.2).

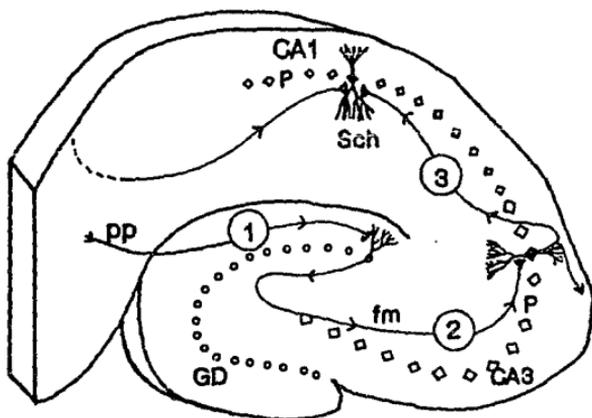


Fig. A.2. Circuito trisináptico de la formación hipocámpica. La secuencia trisináptica es como sigue: las fibras del patrón perforante (pp) terminan sobre las células granulares del giro dentado (GD), formando así la primer sinapsis (1); la segunda sinapsis (2) se forma entre los axones de las células granulares o fibras musgosas (fm) y las neuronas piramidales (P) de la región CA3; y la tercera (3) entre los axones de las células piramidales de CA3, también llamadas colaterales de Schaffer (Sch) y las neuronas piramidales (P) de la región CA1.

La actividad del circuito interno de la formación hipocámpica está bajo la modulación de neuronas inhibitorias locales y de proyección, en su mayor parte a través de fibras GABAérgicas y colinérgicas desde el septo medio, por fibras monoaminérgicas desde el rafe medio y vías noradrenérgicas desde el locus coeruleus. En el esquema de la Fig. A.3 se muestran estas vías de suministro.

Existen proyecciones de neuronas GABAérgicas y colinérgicas desde el área del septo medio que hacen sinapsis directas sobre las interneuronas inhibitorias del GD, de las cuales se sabe son el mayor modulador de la actividad theta hipocampal. Este complejo interneuronal junto con la actividad celular de modulación de monoaminas, es un factor integral en el mecanismo por el que la formación hipocampal puede recibir y procesar estímulos (Morgane y col., 1993). En el hipocampo se han encontrado un gran número de neurotransmisores y neuromoduladores. El GABA, es el principal neurotransmisor inhibitorio y los neuromoduladores como la noradrenalina y la acetilcolina se distribuyen de un modo amplio; el glutamato por su parte es el neurotransmisor excitador más importante en la región (Shephred, 1990).

Un neurotransmisor ejerce un efecto inhibitorio cuando es capaz de deprimir la excitabilidad neuronal. La inhibición se ha conceptualizado como el proceso fisiológico que tiende a disminuir la probabilidad de que una neurona genere señales eléctricas. En el hipocampo, el GABA liberado por las interneuronas inhibitorias actúa sobre el soma y dendritas de las neuronas piramidales y

granulares donde puede ejercer su acción sobre los dos principales grupos receptores que reconocen al GABA, los tipo-A ($GABA_A$) y los tipo-B ($GABA_B$).

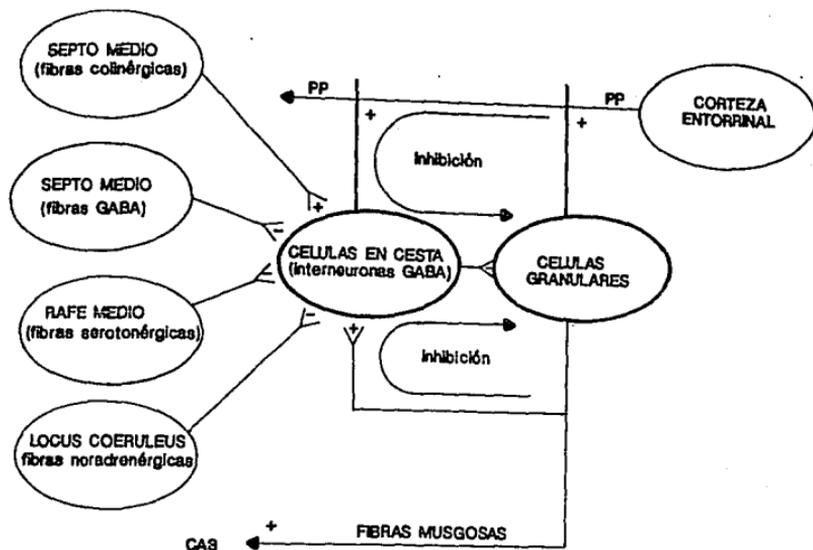


Fig. A3. Esquema del circuito básico del giro dentado. Se muestran las principales vías de suministro (a través del patrón perforante) desde la corteza entorrinal hacia la capa molecular del giro dentado, donde forman sinapsis en "passage" sobre las dendritas apicales de las células granulares y las dendritas de las células en cesta (interneuronas GABAérgicas). Se indican los circuitos de inhibición feed-forward y de feed-back. La actividad de las interneuronas GABAérgicas es modulada por suministros extrínsecos desde el septo medio, rafe medio y locus coeruleus (tomado de Morgane, 1993).

Con relación a los receptores $GABA_A$ se ha demostrado que cuando el GABA interactúa con ellos, se acumulan iones con carga negativa en la cara interna de la membrana neuronal. Este fenómeno se debe a que dicho receptor

está acoplado a un canal que permite el paso de iones cloro (Cl^-) hacia el interior de las células. Debido a que los iones Cl^- se encuentran mucho más concentrados en el medio extracelular que en el interior de las células, una vez que se abren los canales que están acoplados a este receptor se desencadena la entrada de Cl^- y las neuronas se hiperpolarizan (García-Ugalde y Brailowsky, 1993).

El GABA puede activar a dos subtipos de receptores GABA_B : uno de ellos reduce el paso del calcio (Ca^{2+}) hacia el medio intracelular debido a que inhibe a los canales específicos para este catión. Los canales de Ca^{2+} que están acoplados a este receptor se encuentran presentes en varios tipos de neuronas como las del ganglio de la raíz dorsal y en las células bipolares de la retina. Este grupo de receptores se localiza subcelularmente en terminales presinápticas de la médula espinal así como la retina; por esta ubicación se ha encontrado que tienen la capacidad de modular la liberación de neurotransmisores que es dependiente de Ca^{2+} . El segundo subtipo de este receptor activa una corriente saliente de potasio (K^+) en neuronas de estructuras cerebrales como el hipocampo. Dicho evento, dependiente de K^+ , da origen a los potenciales postsinápticos inhibitorios tardíos que son bloqueados por el antagonista específico del receptor GABA_B , el baclofen; estos receptores GABA_B se localizan en la postsinapsis en áreas como el hipocampo y la neocorteza y se encargan de hiperpolarizar a las células nerviosas susceptibles (García-Ugalde y Brailowsky, 1993). En el hipocampo, las neuronas tienen receptores con distribuciones espaciales diferentes, el GABA_A se encuentra en somas y el GABA_B en dendritas (Shephred, 1990).

En el hipocampo, el GABA puede interactuar con otros neurotransmisores o con sustancias neuromoduladoras, por ejemplo, se sabe que el glutamato aumenta la respuesta de los receptores GABA_A y que los receptores GABA_B y la serotonina, pueden interactuar por medio de canales de potasio acoplados a la misma proteína G. Además, los potenciales postsinápticos inhibitorios (IPSPs)

provocados por los receptores GABA_A y GABA_B pueden ser bloqueados por un análogo de la encefalina, aunque estos efectos pueden ser mediados por interneuronas inhibitorias. El significado fisiológico de las interacciones antes mencionadas no se conoce aún (Shepehred, 1990).

En el hipocampo, la acetilcolina (ACh) ejerce efectos neuromoduladores sobre las células piramidales en lugares distales al soma. El 50% del suministro colinérgico hacia el hipocampo se origina primariamente en el septo medio y en la banda diagonal de Broca (Shepehred, 1990).

Las proyecciones noradrenérgicas hacia el hipocampo provienen del locus coeruleus. La densidad de estos suministros hacia el hipocampo difieren en sus diferentes regiones, de tal manera que son más densos en el hilum del GD y en el *stratum lucidum* de la región CA3, y menos densos en el *stratum radiatum* de la región CA1. Probablemente a causa de la distribución diferencial de estos suministros norepinefrínicos se ha encontrado que el sistema noradrenérgico ejerce efectos inhibitorios por separado sobre las diferentes regiones del hipocampo. La norepinefrina (NE) aplicada a la región CA1 puede disminuir la inhibición de las células piramidales de manera directa o bien puede disminuirla a través de las interneuronas inhibitorias (Shepehred, 1990).

Actividad eléctrica

El hipocampo procesa y almacena por un periodo de semanas o meses la información recién adquirida y después la transfiere a áreas de la corteza cerebral para un almacenamiento más prolongado (Shatz, 1992).

La actividad eléctrica del hipocampo se analiza tanto con registros intracelulares como poblacionales en el EEG. En estudios de registro intracelular, ya sea de las células granulares o piramidales, el incremento sináptico se mide tanto por el aumento en la amplitud del potencial postsináptico

excitatorio (EPSP), o de la corriente postsináptica excitatoria, que aparece después de estimular con un solo pulso así como por los potenciales en espiga (SP) (Bravo, 1991).

La actividad hipocámpal se identifica en el EEG como un ritmo lento o ritmo theta, que consiste en ondas sinusoidales de 5 - 12 Hz. Se ha mostrado que esta actividad eléctrica se genera tanto en la lámina polimórfica de la formación hipocámpica como en la molecular del giro dentado (Buzsáki, Czopf, Kondakor y Kellényi, 1986; Konopacki, MacLver, Bland y Roth, 1987; Sainsbury, Heynen y Montoya, 1987; Suzuki, Nishimura y Tonoue, 1991).

El análisis electroencefalográfico cuantitativo ha revelado que en realidad se producen dos clases de ritmo theta que se definen con base en la frecuencia dominante. Se ha observado que durante el comportamiento exploratorio (locomoción), se produce espontáneamente un ritmo theta que tiene un rango de frecuencia de 6-8 Hz, conocido como componente tónico; en contraste, un segundo ritmo o componente fásico, con frecuencias en el rango de 8-12 Hz puede ser producido por estimulación eléctrica del hipotálamo dorsomedial (Destrade y Ott, 1982; Buzsáki y col., 1986; Konopacki y col., 1987; Sainsbury y col., 1987; Suzuki y col., 1991).

Por medio de manipulación farmacológica se ha mostrado que la actividad de los componentes tónico y fásico de este ritmo theta hipocámpal, dependen de diferentes neurotransmisores. El componente tónico o lento en el adulto, está asociado con el sueño MOR, y se caracteriza por un pico de frecuencia fija, modulado por inervación colinérgica de axones de células que surgen desde del septo medio. La frecuencia pico del componente fásico de la actividad theta, relacionado con la movilidad, es variable dependiendo del comportamiento específico y es como ya se dijo de más alta frecuencia que el componente tónico, no es colinérgico como lo ha indicado su resistencia a la atropina y existe

evidencia que indica que esta porción del ritmo theta es GABAérgica, también de origen septal.

A un nivel mecanicista, una de las funciones conceptuales más interesantes sugeridas para la actividad theta, es que sirve para ingresar la información a través del flujo hipocampal. De esta manera, el ritmo theta podría ser considerado como una señal de atención, en estados de vigilia, enfocando así la atención del animal a estímulos biológicamente relevantes dentro del medio ambiente y durante el sueño (MOR), ingresando información al flujo de ésta a través de los sistemas neurales hipocampales que juegan un papel en la consolidación de la memoria (Morgane 1993).

En el hipocampo ocurre también un fenómeno relacionado con el aprendizaje y la memoria conocido como potenciación a largo plazo (LTP, por su nombre en inglés long-term potentiation). La LTP consiste en un aumento persistente en la magnitud de la respuesta postsináptica, provocada por una estimulación de frecuencia alta (400Hz) en la vía aferente. El aumento o potenciación es inducido por un estímulo breve (8 - 10 segundos) y se mantiene por un tiempo prolongado (hasta meses). La LTP se produce en el hipocampo, en las tres sinápsis del circuito del hipocampo (Goodlett, 1986; Shephred, 1990; Bravo, 1991).

Un buen número de estudios realizados en la preparación in vitro de rebanadas de hipocampo han encontrado que en el CA1 la inducción de LTP es óptima cuando el intervalo entre estímulos es de 200 ms. Este intervalo corresponde a la frecuencia en la que de manera natural ocurre el ritmo theta hipocampal (aproximadamente 5Hz), sugiriendo una posible relación entre la LTP y este ritmo (Smytthe, Colom, Bland, 1992).

Hipocampo y desnutrición

La desnutrición en el hipocampo produce alteraciones anatómicas, electrofisiológicas y conductuales (Morgane y col., 1993; Leuba y Rabinowicz, 1979). De las anatómicas se ha encontrado una reducción en el grosor de la capa de células granulares del giro dentado y un aumento en la duración del ciclo celular por prolongación de la fase de síntesis del DNA (Bedi, 1987). La desnutrición produce además una marcada reducción de la fase G1 del ciclo celular (Leuba y Rabinowicz, 1979). El grado mitótico en el giro dentado está reducido, lo que resulta en una severa disminución del número de células granulares para la segunda semana postnatal (Leuba y Rabinowicz, 1979; Lewis y col., 1979; Bedi, 1987). En estudios donde se ha restringido la comida a ratas desde el día 16 de la gestación, durante la lactancia y dentro del periodo post-destete temprano, se ha observado en el GD una reducción significativa en el número de células granulares, además de una disminución significativa del grosor y área de las capas molecular, granular y polimorfa (Lewis y Rabinowicz, 1979). Se ha encontrado también que existe reducción significativa del tamaño celular, la densidad sináptica, el número de espinas y ramificaciones dendríticas (Cintra, Díaz-Cintra, Galvan, Kemper y Morgane, 1990; Díaz-Cintra y Ortega, 1991). En estudios de conducta realizados para evaluar el aprendizaje y la memoria de animales desnutridos, se ha encontrado que éstos presentan deficiencia tanto de la memoria espacial como de la capacidad de aprendizaje (Mc Naughton y Morris 1987; ; Morgane y col., 1993).

Como se mencionó, en estudios electrofisiológicos realizados en animales desnutridos prenatalmente, se han encontrado cambios en la actividad hipocámpal, y en la ontogenia del EEG, en particular en aspectos de maduración del ritmo theta (Morgane, 1993) así como en el desarrollo y mantenimiento de la potenciación a largo plazo, entre otras.

Con respecto a la actividad theta, se ha encontrado que la desnutrición proteínica concurrente (combinación de desnutrición proteínica pre y postnatal) en la que se emplea una dieta con un contenido de caseína del 8 ó 6%, provoca retraso en el patrón de maduración de los sistemas involucrados en la generación y/o modulación de la actividad theta hipocampal generada en CA1 y en GD registrada durante el sueño MOR, y que la duración de este retraso es dependiente de la severidad de la agresión nutricional (6 u 8% de caseína). Por otro lado, ratas que fueron desnutridas en la etapa prenatal con una dieta conteniendo el 6% de caseína, y rehabilitadas nutricionalmente al nacer (por ser dadas para su crianza a ratas nodrizas alimentadas con una dieta con un contenido normal del proteína 25% de proteína), fueron similares a los descritos anteriormente. Lo anterior sugiere que el daño producido por la denutrición hipoproteínica sobre la actividad theta, ocurre en etapa prenatal y no es susceptible de rehabilitación (Morgane y col., 1993).

En la rata, la primera aparición del ritmo theta está correlacionado con la iniciación del comportamiento exploratorio básico y la apertura de los ojos, lo que sugiere que la actividad theta juega algún papel crítico en el ingreso de información medioambiental en una etapa muy temprana del desarrollo; de tal manera que aunque la medida de la frecuencia del pico theta en desnutridos, alcanza valores equivalentes al de los controles a los 45 días de edad, el cambio en el desarrollo sincrónico entre la actividad theta, la experiencia temprana del animal y la interacción con el medio ambiente durante este estado crítico formativo puede ser de considerable consecuencia para la manera en que el animal interactúa con el medio ambiente en etapa adulta, y quizás el retraso inducido nutricionalmente en la maduración de la frecuencia de la actividad theta MOR puede provocar cambios en la función de ingresar la información ya sea

interrumpiendo o alterando significativamente el procesamiento de información durante periodos críticos del desarrollo.

En animales nutridos normalmente el componente pico de frecuencia de esta actividad theta está correlacionado con el estado de comportamiento específico y muestra un cambio de frecuencia distintiva entre comportamientos activos y sueño MOR. En contraste, el componente pico de frecuencia theta relacionado con movilidad registrado en desnutridas proteínicamente difiere significativamente del observado durante el sueño MOR, esto es, no hay cambio de frecuencia lenta a rápida (Morgane y col., 1993). Estos resultados sugieren que la agresión de la dieta prenatal, puede provocar alteraciones hacia los mecanismos no colinérgicos que están generando el ritmo theta, asociado con movimientos voluntarios. Tales comportamientos necesariamente requieren que el animal adquiera y procese información acerca de su interacción con el medio ambiente inmediato. El hecho de que estos resultados fueron obtenidos en animales adultos después de un periodo de rehabilitación proteínica indican un impacto de larga duración por la desnutrición durante el periodo prenatal.

Por otro lado, se sabe que la transmisión a través de toda la formación hipocampal depende del estado de vigilia del animal; encontrándose elevada durante el sueño de ondas lentas y disminuída durante la vigilia (Winson y Abzug, 1978). Tales hallazgos, han proporcionado las bases para las investigaciones acerca del flujo de información mediado por el comportamiento a través de los diferentes componentes del circuito trisináptico en animales desnutridos.

En investigaciones en las que se utilizó estimulación de pulsos pareados de la vía perforante para elucidar los efectos de las influencias modulatorias netas sobre el nivel de excitabilidad de las células granulares, se encontró un aumento significativo en la magnitud y duración de la fase inhibitoria temprana de las células granulares (Austin y col., 1989, 1992). Estos estudios han revelado niveles

elevados de control inhibitorio de la actividad de las células granulares durante los comportamientos theta de despertar activo y sueño MOR. Lo anterior indica otra vez, la vulnerabilidad de sistemas involucrados en la generación de la actividad theta hipocampal, a las agresiones nutricionales.

El primer estudio de los efectos de la desnutrición sobre la LTP se realizó por restricción de la dieta en un 50% a ratas durante la preñez y la lactancia (Jordan y Clark, 1983; Morgane y col., 1993). En estos trabajos se encontró que los animales adultos desnutridos fueron capaces de establecer potenciación del componente de potenciales de espigas, sin embargo, la potenciación decayó a los niveles de prepotenciación en 6 horas, mientras que los animales control la mantuvieron más allá de este periodo. En un estudio realizado con animales adultos desnutridos prenatalmente y rehabilitados nutricionalmente desde el primer día de su nacimiento (6/25) se encontró que aunque la medida del potencial de campo del giro dentado mostró respuesta a la tetanización de la vía perforante con un aumento significativo tanto de la población de EPSP y del componente potenciales de espigas, el componente EPSP de los animales desnutridos estuvo por abajo del de los controles, en todos los periodos de tiempo investigados esta medida decayó a su nivel basal en los animales desnutridos en comparación con sus controles (Austin-La France y col. 1986; 1992). En otros estudios se ha examinado la capacidad de sostener la LTP de ratas desnutridas y durante su desarrollo. En estos estudios se aplicaron trenes tetanizantes hacia el patron perforante y los potenciales de campo se registraron desde la lámina dorsal del giro dentado ipsilateral al nivel del soma de las células granulares. Se encontró que a los 30 días de edad, los animales desnutridos mostraron un aumento significativo de la población de EPSP acompañado de una reducción en la medida de los potenciales de espigas, que fué mantenida por 24 horas. En los animales de 90 días la medida de la pendiente de EPSP estuvo aumentada significativamente

en el grupo desnutrido, mientras que el aumento en los potenciales de espigas se retardó por algunas horas y permaneció por abajo de los niveles de los controles. El aumento retardado (en los animales de 90 días) y la reducción (en los de 30 días) de la medida de la población de espigas obtenida de los animales desnutridos prenatalmente y el aumento significativo de los EPSP, sugirió que los sistemas moduladores de la excitabilidad de las células granulares pueden estar afectadas por la desnutrición de un modo diferencial (Austin-La France y col. 1986; 1992; Morgane y col., 1993; Bronzino y col. 1994).

IX. REFERENCIAS

- 1.- Altman J. y Das G. D. 1965. Autorradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. **J. Comp. Neurol.** **124:** 319-336.
- 2.- Altman J. 1966. Autorradiographic and histological studies of postnatal neurogenesis. II. A longitudinal investigation of kinetics, migration and transformation the cells incorporating tritiated thymidine in infants rats, with special reference to postnatal neurogenesis in some brain region. **J. Comp. Neurol.** **128:**431-474.
- 3.- Altman J. y Bayer S.A. 1990. Mosaic organization of the hippocampal neuroepithelium and the multiple germinal sources of dentate granule cells. **J. Comp. Neurol.** **301:** 325-342.
- 4.- Ammassari-Teule M., Pavone F., Castellano C. y McGaugh L. J. 1991. Amygdala and dorsal hippocampus lesions block the effects of GABAergic drugs on memory storage. **Brain Res.**, **551:**104-109.
- 5.- Angevine J. B. y Sidman R. L. 1961. Autorradiographic study of cell migration during histogenesis of cerebral cortex in the mouse. **Nature (London)** **192:**766-768.
- 6.- Austin K. B., Bronzino J. D., y Morgane P. J. 1986. Prenatal protein malnutrition affects synaptic potentiation in the dentate gyrus of rats in adulthood. **Dev. Brain Res.**, **29:** 267-273.

- 7.- Austin K. B., Bronzino J. D., y Morgane P. J. 1989. Paired-pulse facilitation and inhibition in the dentate gyrus is dependent on behavioral state, **Exp. Brain Res.** **77: 594-604.**
- 8.- Austin K. B., Beiswanger C., Bronzino J. D., Austin-LaFrance R. J., Galler J. R., y Morgane P.J. 1992. Prenatal protein malnutrition alters behavioral state modulation of inhibition and facilitation in the dentate gyrus. **Brain Res. Bull.** **28:245-255.**
- 9.- Bedi K. S. 1987. Lasting neuroanatomical changes following undernutrition during early life. En: J. Dobbing (Ed). **Early Nutrition and Later Achievement**, Academic Press, London, pp 1-49.
- 10.- Bilkey D. K. y Goddard G. V. 1985. Medial septal facilitation of hippocampal granule cell activity is mediated by inhibition of inhibitory interneurons. **Brain Res.** **361: 99-106.**
- 11.- Bilkey D. K. y Goddard G. V. 1987. Septohippocampal and commissural pathways antagonistically control inhibitory interneurons in the dentate gyrus. **Brain Res.** **405: 320-325.**
- 12.- Blatt G. J., Chen C. J., Rosene D. L., Volicer I., y Galler J. R. 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.**

- 13.- Blatt G. J., Rosene D. L. Rhodes K. J. y Virga A. 1991. Prenatal protein malnutrition effects on the cholinergic system of the rat hippocampal formation. **Soc. Neurosci. Abstr.** 17: 663.
- 14.- Bonanno G. y Raiteri M. 1987. Presence of a γ -aminobutyric acid (GABA) uptake system on cholinergic terminals of rat hippocampus: evidence for neuronal coexistence of acetylcholine and GABA?. **J. Pharmacology and Experimental Therapeutics.** 240: 294-297.
- 15.- Bravo M. J. 1991. Modificación de la inhibición recurrente por la estimulación eléctrica iterativa o por la administración de fármacos convulsionantes. Tesis de maestría en Ciencias Biomédicas. UNAM. pags.50-57.
- 16.- Bronzino J. D., Abu-Hasaballah K., Austin-LaFrance J. R., y Morgane P.J. 1994. Quantitative analysis of long-term potentiation in the hippocampal dentate gyrus of the freely-moving 15-day-old rat. **Brain Res. Bull.** 36:321-324.
- 17.- Buzsáki G., Czopf J. Kondakor I. y Kellényi.T. 1986. Laminar distribution of hippocampal rhythmic slow activity (RSA) in the behaving rat: current-source density analysis effects of urethane and atropine. **Brain Res.** 365: 125-137.
- 18.- Cajal S. R. 1911. **Histologie du système nerveux de l'homme et des vertébrés.** 11, 2a. Imp. C. S. I. C. Madrid (1952) 127pp.
- 19.- Cintra L., Díaz-Cintra S., Galván A., Kemper y Morgane P. J. 1990. Effects of protein undernutrition on the dentate gyrus in rats of three age group. **Brain Res.** 532:271-277.

- 20.- Colombo P. 1982. The critical periods concept: Research, methodology, and theatrical issues. **Psychol. Bull.** 91: 269-275.
- 21.- Destrade C. y Ott T. 1982. Is a retrosplenial (cingulate) pathway involved in the mediation of high frequency hippocampal rhythmical slow activity (theta)? **Brain Res.**, 252: 29-37.
- 22.- Díaz-Cintra S. y Ortega N. A. 1991. **Desarrollo Cerebral e Influencias Ambientales durante la Ontogenia Nerviosa**. Sociedad Mexicana de Ciencias Fisiológicas. Editor del Volumen M. Salas, México, pags: 129-146.
- 23.- Dobbing J. 1968. Vulnerable periods in developing brain. **Applied Neurochemistry**. A. N. Davison and J. Dobbing (Eds.), Blackwell, Oxford. p. p. 287-316.
- 24.- Dobbing J. 1968. Effects of experimental undernutrition on development of the nervous system; **Malnutrition, Learning, and Behavior**. N. S. Scrimshaw and J. Gordon (Eds.), MIT PRESS, Cambridge.
- 25.- Dobbing J. 1970. Undernutrition and developing brain. **Developmental Neurobiology**. W. Himwich (Ed.), C.C Thomas, Springfield. p. p. 241-261.
- 26.- Dobbing J. 1972. Vulnerable periods of brain development. CIBA Foundation Symposium, Eds., **Lipids, Malnutrition and Developing Brain**, Elsevier, Amsterdam. pp. 9-29.
- 27.- Dobbing J. y Sands, S. 1979. Comparative aspects of the brain growth spurt. **Early Hum. Dev.** 3: 79-83.

- 28.- Dobbing J. 1990. Early nutrition and later achievement. **Proc. Nutr. Soc.** **49:** 103-118.
- 29.- Dyson S. E. y Jones, D. G. 1976. Some effects of undernutrition on synaptic development. A quantitative ultrastructural study. **Brain Res.** **114:** 365-378.
- 30.- Fish I. y Winick M. 1969. Effect of malnutrition on regional growth of the developing rat brain. **Exp. Neurol.** **25:**534-540.
- 31.- Freund T. F. 1992. GABAergic septal and serotonergic median raphe afferents preferentially innervate inhibitory interneurons in the hippocampus and dentate gyrus. Elsevier Science Publishers B. V. **The Dentate Gyrus and Its Role in Seizures (Epilepsy Res. Suppl. 7)** C. E. Ribak, C. M. Gall y Y. Mody (Eds.).
- 32.- Freund T. F. y Antal M. 1988. GABA-containing neurons in the septum control inhibitory interneurons in the hippocampus. **Nature.** **336::** 170-173.
- 33.- García-Ugalde G. y Brailowsky S. 1993. Los receptores del GABA: De la electrofisiología a la Biología Molecular. **Ciencia.** **44:**279-289.
- 34.- Goodlett R. Ch. 1986. Spatial cue utilization in chronically malnourished rats: task-specific learning deficits. **Dev. Psych.** **19:** 1-15.
- 35.- Gulyas A. Y., Gorcs T. J. y Freund T. F. 1990. Innervation of different peptide-containing neurons in the hippocampus by GABAergic septal afferents. **Neurosci.** **37:** 31-44.

- 36.- Herschkowitz H. y Rossi, E. 1972. Critical periods in brain development. **Lipids, Malnutrition and the Developing Brain**. CIBA Foundation Symposium (Rds.), Elsevier, Amsterdam. p.p. 107-119.
- 37.- Jordan T.C. y Clark, G. A. 1983. Early undernutrition impairs hippocampal long-term potentiation in adult rats. **Behav. Neurosci.** **97: 319-322.**
- 38.- König R. F. J. y Klippel A. R. 1967. The rat brain . **A stereotaxic atlas of the forebrain and lower parts of the brain stem**. Robert E. Krieger Publishing Co. Inc. New York. 135 pp.
- 39.- Konopacki J., MacLver M. B., Bland H. B. y Roth S.H. 1987. Carbachol-induced EEG "theta" activity in hippocampal brain slices. **Brain Res.** **405: 196-198.**
- 40.- Kosaka T., Hama K. y Yen Wu J. 1984. GABAergic synaptic boutons in the granule cell layer of rat dentate gyrus. **Brain Res.** **293:353-359.**
- 41.- Leranath C. y Frotscher M. 1987. GABAergic input of cholecystokinin-immunoreactive neurons in the hilar region of the rat hippocampus. **Histochem.** **86: 287-290.**
- 42.- Leuba G. y Rabinowicz T. H. 1979. Long-term effects of postnatal undernutrition and maternal malnutrition on mouse cerebral cortex (I). **Exp. Brain Res.** **37: 283-298.**
- 43.- Lewis P. D., A. J. Patel y Balazs. 1979. Effect of undernutrition on cell generation in the rat hippocampus. **Brain Res.** **168:186-189.**

- 44.- Lidow M. S., Goldman-Rakie P. S., Gallager D. W. y Rakie P. 1989. Quantitative autorradiographic mapping of serotonin 5-HT₁ y 5-HT₂ receptors and uptake sites in the neocortex of the rhesus monkey. **J. Comp. Neurol.** **280:** 37-42.
- 45.- Lorente de Nó R. 1949. Cerebral cortex, architecture, intracortical connections motor projections. **Physiology of the nervous system.** J. Fulton. De. Oxford Univ. Press, pp 288-330.
- 46.- Madison D. V. y Nicoll R. A. 1988. Norepinephrine decreases synaptic inhibition in the rat hippocampus. **Brain Res.** **442:** 131-138.
- 47.- Maxwell, C. W. 1979. Desarrollo del cerebro. **Investigación y Ciencia.** **38:** 54-71.
- 48.- Mc Naughton B. L. y Morris R. G. M. 1987. Hippocampal synaptic enhancement and information storage within a distributed memory system. **TINS, Elsevier Publications, Cambridge.** **10:**408-415.
- 49.- Méndez I. 1993. El error de restricción en el diseño y análisis de experimentos y pseudoexperimentos. **Instituto de Investigaciones en Matemáticas Aplicadas y en Sistemas.** UNAM. 3, 11: 1-28.
- 50.- Morgane P. J., Miller M., Kemper T., Stern W., Forbes W., Hall R., Bronzino J., Kissane J., Hawrylewicz E. y Resnick O. 1978. The effects of protein malnutrition on the developing central nervous system in the rat. **Neurosci. Biobehav. Revs.** **2:**137-230.

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

- 51.-Morgane P. J. , La France R. A. , Bronzino J. , Tonkiss J. , Díaz-Cintra S., Cintra L. , Kemper T. y Galler J. R. 1993. Prenatal Malnutrition and Development of the Brain. **Neurosci. Biobehav. Revs.** p. p. 91-128.
- 52.- Oertel W. H., Schmechel D. E., Tappaz M. L. y Kopin I.J. 1981. Production of a specific antiserum to rat brain glutamic acid decarboxylase by injection of an antigen-antibody complex. **Neurosci.** 6: 2689- 2700.
- 53.- Oertel W. H., Schmechel D. E., Mugnaini E., Tappaz M. L. y Kopin I. J. 1982. Immunocytochemical localization of glutamate decarboxylase in rat cerebellum with a new antiserum. **Neurosci.** 12: 2715 - 2735.
- 54.- Ribak C. E. y Seress L. 1983. Five Types of basket cell in the hippocampal dentate gyrus: a combined Golgi and electron microscopic study. **J. Neurocytol.** 12: 577-597.
- 55.- Rodier P. 1976. Critical periods for behavioral anomalies in mice. **Environm. Health Perspect.** 18: 79-83.
- 56.- Rodier P. 1980. Chronology of neuron development: Animal studies and their clinical implications. **Dev. Med. Child Neuron.** 22: 525-545.
- 57.- Sainsbury S. R., Heynen A. y Montoya P. Ch. 1987. Behavioral correlates of hippocampal type 2 theta in the rat. **Physiol. Behav.** 39: 513-519.
- 58.- Scott J. P. 1979. Critical periods in organizational processes. **Human Growth: Neurobiology and Nutrition.** F. Falkner y J. Tanner (Eds.), Plenum Press, New York. p. p. 223-241.

- 59.- Schwerdtfeger W. K. 1986. Afferent fibers from the septum terminate on gamma-aminobutyric acid (GABA) interneurons and granule cells in the area dentata of the rat. **Experientia**. **42: 392-394**.
- 60.- Seress L. y Ribak C. E. 1983. GABAergic cells in the dentate gyrus appear to be local circuit and projection neurons. **Exp. Brain Res.** **50:173-182**.
- 61.- Seress L. y Ribak C. E. 1988. The development of GABAergic neurons in the rat hippocampal formation. An Immunocytochemical study. **Dev. Brain Res.** **44:197-209**.
- 62.- Shatz J. C. 1992. Desarrollo cerebral. **Investigación y Ciencia**. **194: 16-25**.
- 63.- Shephered G. M. 1990. **The synaptic organization of the brain**. Shephered (Ed.), Oxford University Press, 561 pp.
- 64.- Smart J. L. 1990. Vulnerability of developing brain to undernutrition. **Uppsala J. Med. Sci. Suppl.** **48: 21-41**.
- 65.- Smart J. L. 1991. Critical periods in brain development. **Childhood Environment and Adult Disease**. CIBA Found. Symp. (Eds.), Wiley, Chichester. p. p. 109-128.
- 66.- Smythe J. W., Colom I.V. y Bland B. H. 1992. The extrinsic modulation of hippocampal theta depends on the coactivation of cholinergic and GABA-ergic medial septal inputs. **Neurosci. Biobehav. Revs.**, **16: 289-308**.

- 67.- Suzuki T., Nishimura Y. y Tonoue T. 1991. Three-dimensional trajectories of the hippocampal rhythmic slow activity in the behaving rat. **Behav. Brain Res. 44: 35-41.**
- 68.- Swann J. W., Brady, R. J. y Martin D. L. 1989. Postnatal development of GABA-mediated synaptic inhibition in rat hippocampus. **Neurosci. 28:3, 551-561.**
- 69.- Telang S., Fuller G., Wiggins R. y Enna S. J. 1984. Early undernutrition and 3H- aminobutyric acid binding in rat brain. **J. Neurochem. 43: 640-645.**
- 70.- West C. D. y Kemper T. L. 1976. The effect of a low protein diet on the anatomical development on the brain. **Brain Res, 107:221-237.**
- 71.- Winson J. y Abzug, C. 1978. Neuronal transmission through hippocampal pathways dependent on behavior. **J. Neurophysiol. 41:716-732.**
- 72.- Wyss J. M. y Groen T. V. 1989. Development of the Hippocampal Formation. **The Hippocampus New Vistas.** pages 1-16. Alan R. Riss, Inc. New York.