



# UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias  
División de Ciencias Biológicas  
Departamento de Ciencias Ambientales  
**INSTITUTO DE NEUROCIENCIAS**

**Aprendizaje espacial, ansiedad, actividad locomotora y celularidad neuronal de hipocampo y corteza prefrontal de ratas, tras restricción de ácidos grasos esenciales durante el desarrollo**

Tesis

que para obtener el grado de

**MAESTRO EN CIENCIAS DEL COMPORTAMIENTO  
(OPCIÓN NEUROCIENCIAS)**

presenta

**Asucena Cárdenas Villalvazo**

Comité tutelar

**Dr. Joaquín García Estrada (Director)**

Dra. Sonia Luquín de Anda

Dr. Jorge Juárez González

## CREDITOS INSTITUCIONALES

El trabajo experimental se llevó a cabo en el Centro de Investigación Biomédica de Occidente, División de Neurociencias, IMSS. Y en el área de Análisis de Conducta de la División de Neurociencias, del Centro Universitario de Ciencias de la Salud, de la U de G. Financiamiento: Fondo de Fomento a la Investigación (FOFOI) del IMSS Clave: FP0038/1290, a partir del 11 de julio de 2000. Responsable principal, Dra en C. Alica Navarro Ruíz. Este protocolo fue aprobado por el comité de bioética del CIBO, que es parte del comité

## DEDICATORIAS

A May Yol Ix, mi hijo y mi mayor motivación, por su amor, por su fortaleza para vivir y crecer en soledad siempre a la espera de mi vuelta, y su comprensión para mis tantas horas de ausencia.

A mis padres, hermanas, hermanos y sobrinos que siempre me respaldan y ayudan con amor.

A mi hermano Javier, dónde esté, el único nexo con lo divino, para un atea.

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Doctor Joaquín García y la Doctora Sonia Luquín, por sus valiosas enseñanzas, su respaldo académico y material, su paciencia y amistad.

A la doctora Alicia Navarro, por contribuir a facilitarme los medios para la realización de este trabajo.

Al Doctor Jorge Juárez por su valiosa y atinada orientación.

Al Maestro Daniel Zarabozo por su gran apoyo en los momentos difíciles.

A mis profesores por todas sus enseñanzas.

A aquellas personas que de una u otra forma colaboraron en el alcance de este logro.

# INDICE

---

<b>CONTENIDO</b>	<b>página</b>
<b>Indice</b>	<b>i</b>
<b>Resumen</b>	<b>ii</b>
<b>Abstrac</b>	<b>iii</b>
<b>Introducción</b>	<b>1</b>
<b>Antecedentes</b>	<b>10</b>
<b>Planteamiento del Problema</b>	<b>20</b>
<b>Hipótesis</b>	<b>21</b>
<b>Objetivos</b>	<b>22</b>
<b>Materiales y Métodos</b>	<b>23</b>
<b>Resultados</b>	<b>37</b>
<b>Discusión</b>	<b>53</b>
<b>Conclusiones</b>	<b>66</b>
<b>Bibliografía</b>	<b>67</b>

## RESUMEN

---

Los componentes estructurales de las membranas neuronales ácido docosahexaenoico DHA (22:6n-3) y araquidónico ARA (20:4n-6), derivan de los ácidos grasos esenciales linolenico (n3) y linoleico (n6) aportados por la dieta. DHA provee de fluidez a las membranas y modula funciones celulares, entre ellas, la síntesis de enzimas reguladoras de los procesos del neurodesarrollo, así como de neurotransmisores y sus receptores.

La restricción dietaria de n3 causa la deficiencia de DHA, afecta la fluidez y funciones membranales, se asocia a defectos cognitivos y de la emotividad en niños y modelos animales; sugiriendo perturbaciones del neurodesarrollo aún no explorados. En este trabajo restringimos n3n6 en la dieta de ratas, desde la gestación (GLD), desde el nacimiento (LD) o desde el destete (D), todos hasta los 60 días de edad posnatal, evaluamos el número de neuronas y su madurez en hipocampo y corteza prefrontal, el aprendizaje espacial, ansiedad y actividad locomotora.

La restricción de n3n6 elevó el número de neuronas y redujo su madurez en hipocampo y corteza tras restricción en GLD, con distintos efectos en LD y D. Diferencias que confirman la distinta vulnerabilidad de la neurogénesis de las regiones y etapas del desarrollo. También observamos mayor latencia de escape, ansiedad y menor actividad locomotora tras restringir en GLD, con diferentes efectos en los grupos restringidos solo posnatalmente, esto podría relacionarse con los cambios morfológicos observados, y ambos, probablemente se deban a alteraciones histogénicas de los sistemas de neurotransmisores que regulan la supervivencia y organización neuronal de las regiones estudiadas.

## ABSTRAC

---

Polyunsaturated fatty acids docosahexaenoic acid DHA (22:6n-3) and arachidonic ARA (20:4n-6) derived from essential fatty acid precursors,  $\alpha$ -linolenic (18:3n-3) and linoleic (18:2n-6) respectively, which must be supplied from exogenous sources in mammals. DHA is component of membrane lipids in the central nervous system, enhanced the membrane fluidity and regulate their functions, likewise the cerebral development process and the synthesis of neurotransmitters. Decreased cerebral concentrations of DHA, resulting from dietary n-3 deficiency, affect phospholipid bilayer properties with fluidity lack and impaired cognitive function; also alter emotion and have been proposed neurodevelopment disorders.

In this study, the effects of low essential fatty acids diet during the cerebral development, upon number and maturity neurons on hippocampus and prefrontal cortex, likewise spatial learning, anxiety, and locomotor activity were analysis. Three experimental groups were formed, the GLD group, malnourishes since gestation, the LD group since birth, and the D group since weaning; all the groups malnourishes until 60 days of age.

Dietary n3n6 deficit in GLD group, enhanced number cell and reduced maturity in hippocampus and prefrontal cortex, likewise impairs spatial learning, increases anxiety and reduced the locomotor activity; bat other effects were observed in the LD and D groups, their was observed a relation in the morphological and behavioral alterations and confirm the specific vulnerability of development stages and brain regions. Their results suggest that n3n6 deficiency alters the neurogénesis and neuron survival, maybe related with a defective hystogenesis neurotransmitters systems.

## INTRODUCCION

---

### **Desnutrición durante el desarrollo**

La desnutrición afecta a más del 35% de los niños menores de 5 años en los países en desarrollo, retrasa su crecimiento corporal y altera su organización anatómica y fisiológica. Una infancia desnutrida resulta en múltiples desventajas físicas y cognitivas y predispone a enfermedades crónicas (Rosenzweig y Leiman, 1995; Smith y Haddad, 2000), al asociarse a otros factores causa el 50 % de la mortalidad infantil (FAO, 1994; UNICEF, 1993).

Las consecuencias de la desnutrición pueden consistir en depleción de los depósitos corporales, lesiones bioquímicas o estructurales y alteraciones funcionales. En el sistema nervioso (SN) se puede alterar el número, morfología, organización y propiedades electrofisiológicas de las poblaciones neuronales según la vulnerabilidad de cada período crítico y de cada región nerviosa (Navarro, 1993). Los efectos a corto o largo plazo pueden ser cognitivos, emocionales o psicomotrices; y son reversibles o no, en dependencia del grado y duración de la desnutrición (Rosenzweig y Leiman, 1995). Tabla No. 1

### **Ácidos grasos esenciales y desnutrición**

La desnutrición primaria de tipo carencial se debe al consumo energético y/o proteico insuficiente o a la deficiencia de nutrientes esenciales. La deficiencia de ácidos grasos esenciales causa un estado de desnutrición al que se han atribuido efectos negativos sobre el aprendizaje espacial, la emotividad y la motricidad infantil (Bourre, 1989; Stordy, 2000). El tipo de ácidos grasos consumidos por la población varía en relación a la cultura alimentaria y a los perfiles productivos de la región que habitan, no se relaciona exclusivamente con la pobreza, así que esta malnutrición afecta a poblaciones mayores incluso en los países más desarrollados (Simopoulos, 2001).



Los ácidos grasos esenciales linoleico n6 (AL) y ácido alfa- linolénico n3 (AAL) son poli-insaturados de origen vegetal. Su síntesis “de novo” es imposible en el organismo animal, por lo que su ingreso depende en absoluto de la dieta (Champe y Harvey, 1994). El principal derivado de AAL, el ácido docosahexaenoico (DHA) forma fosfatidilserina, fosfatidiletanolamina y otros fosfolípidos que constituyen a las membranas neuronales, les confiere la fluidez y capacidad plástica requerida durante el neurodesarrollo y el aprendizaje (Bourre, 1989).

El análisis de los efectos de la deficiencia de AAL ha sido facilitado por el uso de modelos animales, los roedores son utilizados frecuentemente por ser susceptibles a la restricción lipídica (Bourre, 1989). En ratas y ratones se ha demostrado que la deficiencia crónica o en periodos cortos de n3, altera la composición de los fosfolípidos membranales y reduce la síntesis de fosfatidilserina en tejidos cerebrales de animales jóvenes y adultos. Los cambios lipídicos restan fluidez a las membranas y se asocian a alteraciones del aprendizaje, el estado psiconeural y la motricidad (Bourre, Bonneil, Clément, Dumont, Durand, Lafont, 1993; Connor y Neuringer, 1988), que se han atribuido a defectos del neurodesarrollo debidos a la deficiencia de n6 y/o n3 (Bourre 1989; Wainwright 1991; Yeh, Yeh, Lien, 1998; Yehuda, Ravinovitz, Carasso, Montofsky, 1998). Sin embargo, muchos reportes son contradictorios y no se han explicado claramente los efectos de esta malnutrición instalada durante el desarrollo, sobre las poblaciones neuronales, que podrían originar las fallas funcionales.

### **Etapas del Neurodesarrollo**

El neurodesarrollo consiste en una serie de eventos neurogénicos y gliogénicos. Inicia con la proliferación de células indiferenciadas, seguida de su migración, diferenciación y maduración. Durante el proceso, se reduce el número de células debido a un mecanismo apoptótico (Rosenzweig y Leiman, 1995).

El neurodesarrollo humano es similar al de otros mamíferos altriciales, la rata es un modelo útil para comprender los procesos de desarrollo y la

intrincada secuencia de organización nerviosa. La proliferación y migración de neuronas corticales inicia alrededor de 13 días después de la concepción y alcanza su tasa máxima al día 17. La mayoría de neuronas corticales nacen y migran en los 10 días previos al nacimiento, orientadas por procesos radiales de la glía y por neuronas tempranas. Según la hipótesis de la unidad radial, las neuronas originadas en la misma unidad proliferativa, migran y se sitúan verticalmente y tangencialmente en capas ascendentes de una misma columna; lo que da lugar a la citoarquitectura de la corteza cerebral. Durante la etapa perinatal, las neuronas que alcanzaron su sitio diana se diferencian en piramidales y no piramidales (Kolb y Tees, 1990).

El día del nacimiento inicia la fase de crecimiento cerebral rápido, finaliza el día 8 y es seguida por la fase transitoria que finaliza el día 17 y durante la cual se conectan y mielinizan las fibras intensivamente, continúa la fase madura que se prolonga hasta los 180 días de edad. La mayoría de contactos sinápticos se establecen entre los días 4 y 16 y entre los días 5 y 30 muere un alto porcentaje de neuronas. Entre los días 14 y 30 el volumen cortical alcanza el máximo, debido al gran crecimiento dendrítico ocurrido durante la maduración. A los 60 días de edad posnatal, la corteza de la rata alcanza el desarrollo correspondiente a la adultez y contiene unos 34 millones de neuronas (Kolb y Tees, 1990). El arreglo citoarquitectónico de las poblaciones neuronales es determinado principalmente por la procedencia de las aferencias que reciben, así varios sistemas de neurotransmisores modulan la organización de las distintas regiones del hipocampo y la corteza (Kolb y Tees, 1990; Kodas, Vancassel, Lejeune, Guilloteau, Chalon, 2002).

Durante la última semana de gestación y en la segunda semana posnatal se intensifica la incorporación de ácidos grasos poli-insaturados para satisfacer la intensa macroneurogénesis prenatal y la sinaptogénesis posnatal, estos periodos críticos en el desarrollo son más vulnerables (Green, 1998). Tabla No. 1

PERIODOS Y PROCESOS AFECTADOS	DURACION EN DIAS	EFFECTOS POSIBLES	TRASLAPE DE PROCESOS
CONCEPCIÓN	0	Fallas en la concepción	
IMPLANTACIÓN	0 a 8 días posconcepción	Fallas en la concepción o implantación (reabsorción)	
PERIODO EMBRIONARIO	9 a 21-22 días	Alteraciones de la forma y tamaño del cerebro.	
Organogénesis	posteriores a la concepción	Génesis alterada de macroneuronas y glia radial, alteraciones de la migración neuronal.	
PERIODO FETAL	(hasta el NACIMIENTO)	Histogénesis macroneural, gliogénesis temprana, migración celular y diferenciación temprana	
PERIODO DE LACTANCIA	0 a 21 días posteriores al nacimiento	Génesis alterada de microneuronas tempranas.  Diferenciación, sinaptogénesis, gliogénesis tardía y mielinización alteradas.	
Histogénesis microneural, gliogénesis tardía, migración y diferenciación microneural y oligodendroglial Mielinización y sinaptogénesis	( hasta el DESTETE)		
POSDESTETE	22 a 60 días posteriores al nacimiento	Génesis alterada de microneuronas, diferenciación, sinaptogénesis y Mielinización Alteradas	
Continúan la Histogénesis microneural, diferenciación, sinaptogénesis y Mielinización	(durante la MADURACION)		
MADUREZ	Posterior a los 60 días de edad postnatal	Esencialmente sin efectos permanentes aparentes  Probable Reducción de la Mielinización y cambios plásticos y morfológicos cerebrales por eventos lesivos crónicos.	
Microneurogénesis tardía y Mielinización tardía			

**TABLA No.1 Períodos críticos y efectos potenciales de la desnutrición.**

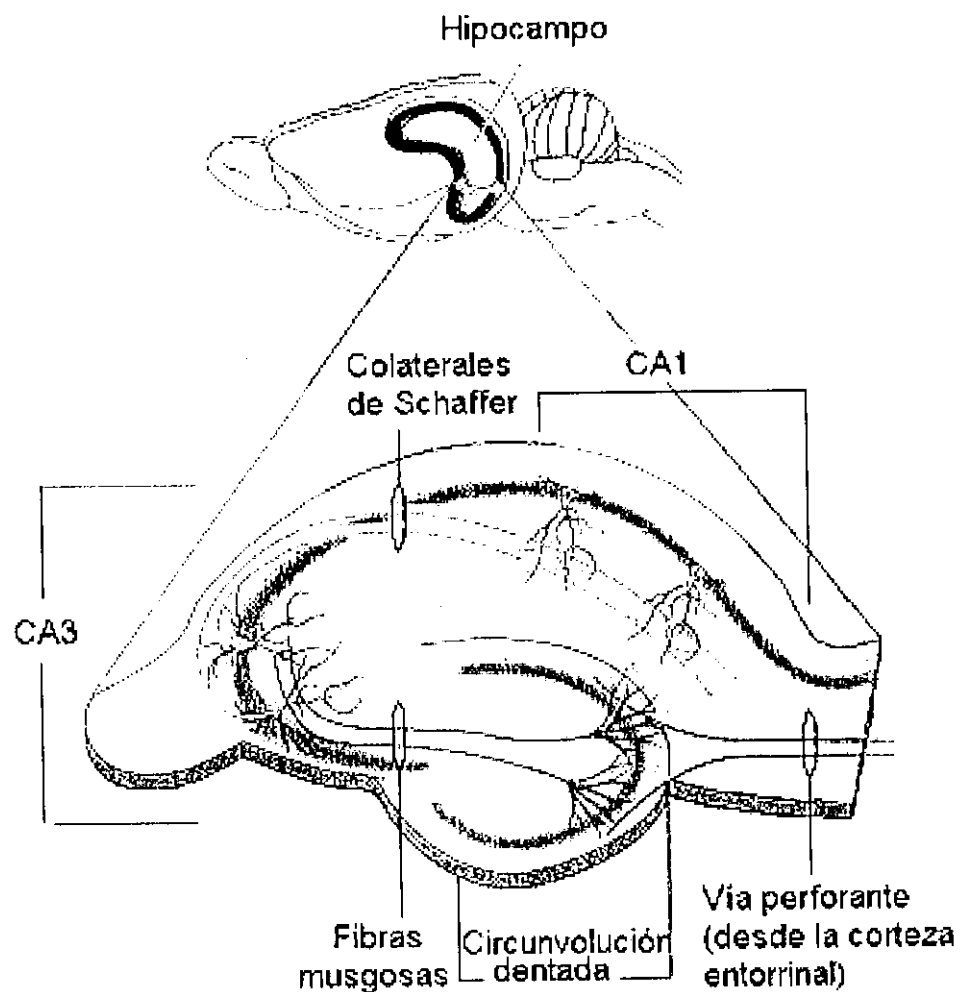
(Basado en Morgane Austin, Brinzino, Tonkiss, Díaz, Cintra, 1993).

Como se aprecia en la tabla 1, la neurogénesis puede ser afectada de diferente manera durante el desarrollo prenatal y posnatal (Morgane et al, 1993), las neuronas son la unidad estructural y funcional del SN, realizan la conducción eléctrica y la transmisión sináptica, en consecuencia, sus alteraciones dan lugar a defectos funcionales. La neurona típica presenta tres regiones: soma, dendritas y axón. El soma contiene organelos y un núcleo esférico prominente con uno o más nucleolos. El núcleo de las neuronas jóvenes está rodeado de abundante citoplasma, mientras que es escaso en las neuronas maduras. Las dendritas son especializaciones membranales receptoras, mientras que el axón es conductor y emisor, se ramifica y conecta con cientos de neuronas en distintas regiones (Barr y Kiernan, 1994).

Las regiones cerebrales se organizan en una porción central (encéfalo y médula espinal) y una periférica (nervios craneales y espinales). El encéfalo contiene al cerebro, cerebelo y tallo (Barr y Kiernan, 1994). En el cerebro, la corteza se divide funcionalmente en varias regiones, el hipocampo y la corteza prefrontal se relacionan funcionalmente con el aprendizaje espacial, la emotividad y la motricidad (Kolb y Tees, 1990) y son fácilmente afectadas por la desnutrición (Ikemoto Nitta, Furukawa, Ohishi, Nakamura, Fuji, 2000; Favreliere, Barrier, Durand, Chalion, Tallineau, 1989). Por ello las elegimos para analizar los efectos de la deficiencia de lípidos esenciales durante el desarrollo, sobre sus poblaciones neuronales, en espera de aportar información para comprender el origen anatomofuncional de los efectos cognitivos y conductuales atribuidos a este tipo de desnutrición.

### **Hipocampo y Corteza prefrontal: Aprendizaje, emociones y motricidad**

La formación hipocampal se desarrolla al continuar la expansión bilateral del borde medial del lóbulo temporal, incluye al Complejo subicular, al Cuerno de Amón (CA), al Giro dentado (Hilus, estrato granular y molecular) y al Giro parahipocampal. CA es el hipocampo propiamente y contiene 4 áreas formadas por filas de neuronas piramidales (CA 1, 2, 3 y 4) (Barr y Kiernan, 1994) Figura 1.



**FIGURA 1 CIRCUITO TRISINÁPTICO DEL HIPOCAMPO DE LA RATA**

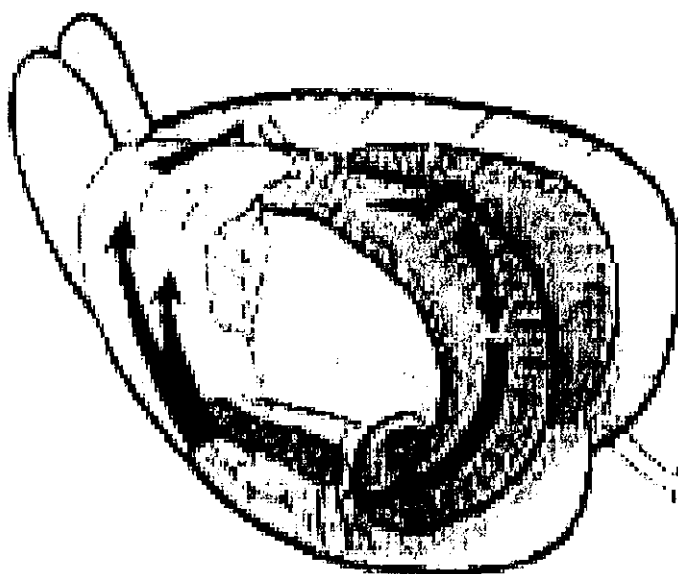
Varias regiones cerebrales envían información a la corteza entorrinal que la dirige a través de la vía perforante hacia las neuronas granulares del Hylus del giro dentado, estas la conducen a las neuronas piramidales de la región CA3, que conectan con las piramidales de CA1. Finalmente CA1 proyecta al subículo del giro parahipocampal que regresa a la corteza entorrinal y establece el circuito trisináptico, base de la función hipocampal (Modificado de Amaral y Witter, 1989). En el hipocampo se consolidan las diferentes modalidades de memoria para el aprendizaje asociativo, mediante el fenómeno de *Potenciación a Largo Plazo* descrito por Hebb (Kandel, Jessell, Scharz, 1997).

El hipocampo recibe información sensorial polimodal que refleja las características del entorno, elabora la representación abstracta del cuerpo y su localización en el espacio. La región CA1 es crucial en la adquisición de la memoria y el aprendizaje espacial, participa en los procesos de habituación a estímulos novedosos, regula la conducta exploratoria y la actividad locomotora (Lukoyanov y Andrade, 2000). Mediatiza los aspectos motivacionales de la conducta y la toma de decisiones en el "*conflicto de aproximación-retirada*" (Philip y Messier, 2000) y regula la expresión de la ansiedad, el miedo (Degroot, 2002; Menard, 1998).

La corteza prefrontal está ampliamente desarrollada, incluye las áreas medial, lateral y ventromedial (MO, LO, VMO) de la región orbital frontal, el área cingulada anterior, región anterior perirrinal y corteza infralímbica (Groenewegen, 1988; Kolb y Tees, 1990). Se conecta a la corteza motora y sensorial, así como a varios núcleos talámicos, al hipocampo, a la amígdala y el subículum mediante los circuitos hipocampales (Delatour y Witter, 2002). Figura 2.

Modula la discriminación visual, la selección, planeación y ejecución de respuestas motoras en tareas espaciales (Brewer Zhao, Desmond, Glover, 1998; Delatour y Witter, 2002), la memoria espacial y de trabajo (Ramnani, 2004). Participa en la integración emocional de los estímulos externos y mediatiza los estados de ánimo y la empatía; sus regiones medial y lateral modulan las respuestas de ansiedad (Lacroix, 2000), regula la espontaneidad, la variabilidad del comportamiento, las conductas persistentes y el cambio de estrategias. Aporta información continua al subículum para la generación de expectativas y su comparación con la información perceptual real (Ramnani, 2004).

Las alteraciones morfofuncionales del hipocampo y la corteza prefrontal pueden causar fallas en procesos cognitivos como el aprendizaje espacial, alteraciones de la actividad locomotora y alteraciones emocionales como la ansiedad (Lacroix, 2000; Morris, Schenk, Jarrand, 1990).



### FIGURA 2 HIPOCAMPO-CORTEZA PREFRONTAL DE LA RATA

La corteza prefrontal modula funciones cognitivas, contribuye con el hipocampo en la regulación de las conductas sexual, maternal, social y defensiva, manifiesta el estado psiconeural y emotivo al generar respuestas motoras (Kelley, 1993). El hipocampo y la corteza prefrontal se activan simultáneamente durante el procesamiento de la memoria y la consolidación del aprendizaje, así como durante la planeación y ejecución de respuestas motoras (Racik, 1992).

Ambas estructuras son parte del circuito límbico lateral y se vinculan a la integración de los estímulos externos y su connotación emocional. Las alteraciones de la corteza prefrontal y el hipocampo se hacen evidentes al analizar la conducta y el desempeño de animales en tareas específicas. El uso de modelos animales permite evaluar los cambios morfológicos que subyacen a las alteraciones funcionales y su dependencia de factores como la nutrición durante el desarrollo de dichas regiones, así mismo, ayudan a entender cómo finalmente, se determina su funcionalidad posterior y su manifestación a través de la conducta (Kandel, 1997; Kolb y Tees, 1990; Morris, 1982).

## Paradigmas y modelos animales

*Modelo de Ansiedad* El miedo a la altura y a los espacios abiertos son componentes comportamentales de la ansiedad en animales (miedo no condicionado). Las alteraciones del estado psiconeural como la ansiedad y las fobias pueden evidenciarse al agudizar el conflicto aproximación-retirada en circunstancias experimentales, una de las pruebas más confiables es el laberinto elevado en cruz (Treit, 1994), que enfrenta a las ratas a su miedo natural a la altura (Pellow, 1985), la rata ansiosa evita entrar a los brazos abiertos (evitación pasiva). Así mismo, en campo abierto la rata ansiosa evita cruzar por el centro de la arena, dado su miedo a los espacios abiertos, ambas pruebas son complementarias (Aguilar, 2002; Philip y Messier, 2000).

*Modelo de Actividad Locomotora:* Los ambientes novedosos estimulan una respuesta exploratoria natural en las ratas, pero su motivación a deambular depende también de su estado psiconeural y se manifiesta por cambios en la actividad locomotora, esta se aprecia según los cuadros recorridos (cm) en la arena del campo abierto y el número de cruces por el centro del laberinto elevado en cruz (Kelley, 1993; Ramos, Berton, Mormede, Chaouloff, 1997).

*Modelo de Aprendizaje espacial:* El papel del hipocampo y la corteza prefrontal en el aprendizaje espacial se ha demostrado en modelos animales con varios paradigmas. Uno de ellos es el laberinto acuático de Morris, que permite observar fallas en el proceso de aprendizaje espacial debidas a lesión hipocámpal, ya que en él, las ratas deben nadar hasta encontrar una plataforma oculta bajo la superficie y utilizar claves visuales externas para orientarse, deben elaborar un mapa con la posición de la plataforma de escape en relación al espacio circundante y a sí mismas. (Morris, 1984; Morris et al, 1990).



## ANTECEDENTES

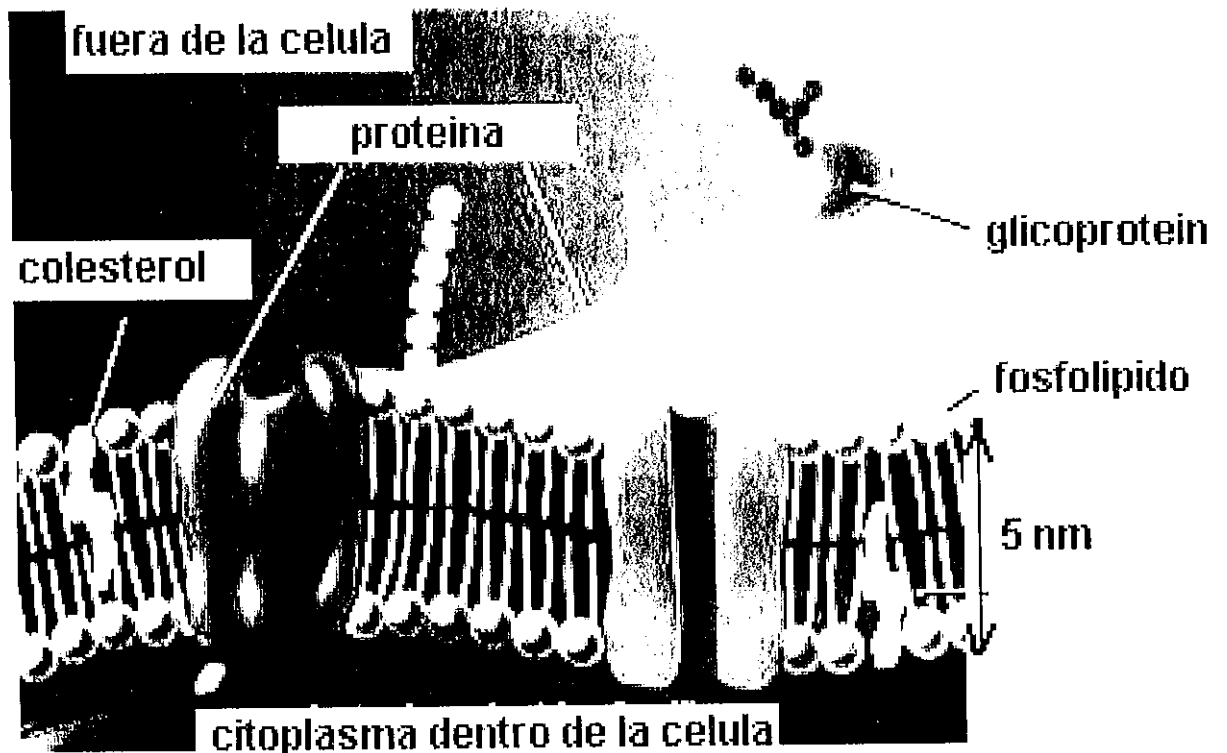
---

### **Función de los ácidos grasos poli-insaturados en el SN**

Los ácidos grasos esenciales linoleico (AL  $n6$ ) y linolénico (AAL  $n3$ ) son de origen vegetal, al ingresar al cuerpo animal derivan en poli-insaturados largos por acción de enzimas desaturasas y elongasas. AL contiene 18 carbonos y 2 enlaces dobles ( $18:2$ ) ubicados en los carbonos  $9^{\circ}$  y  $12^{\circ}$ , es precursor de los poli-insaturados largos araquidónico (ARA,  $20:4n-6$ ) y adrenico ( $22:4n-6$ ). Todos ellos contienen el último doble enlace ubicado seis carbonos antes de  $\omega$  (familia  $\omega6$ ). De ARA se derivan prostaglandinas, leucotrienos y tromboxanos. Por su parte, AAL contiene 18 carbonos y 3 enlaces dobles ( $18:3n-3$ ), ubicados en los carbonos  $9^{\circ}$ ,  $12^{\circ}$  y  $15^{\circ}$ , es precursor del ácido graso docosahexaenoico (DHA,  $22:6n-3$ ), docosapentaenoico (DPA,  $22:5n-3$ ) y eicosapentaenoico (EPA,  $20:5n-3$ ), familia  $\omega3$ . En condiciones nutricias adecuadas los tejidos animales contienen DHA y ARA en proporción de 1:4 incorporados a las membranas celulares (Champe y Harvey, 1994). Figuras 3 y 4

Los poli-insaturados DHA y ARA forman los fosfolípidos (fosfatidilserina, fosfatidiletanolamina y otros, aportan fluidez a las membranas neuronales, facilitan la actividad de canales, receptores Gm3 y otros segundos mensajeros, enzimas ligando de superficie, regulan la señalización por proteínas G, modulan los procesos de proliferación y diferenciación neuronal durante el desarrollo, así como la sinaptogénesis (Champe y Harvey 1994; Clandinin, 1997; Innis y De la Prensa, 2001). Participan en la regulación enzimática de la síntesis de proteínas constituyentes de mielina (proteolipina y proteína básica de mielina) y modulan la mielinización (Bourre, 1992; Dewille y Farmer, 1992). Forman gangliósidos promotores del crecimiento y desarrollo neural, regulan el metabolismo energético neuronal al mediar la actividad de los transportadores de glucosa y son protectores antioxidantes (Lapillone et al, 2004). DHA y ARA regulan la síntesis molecular en células hipocampales (Berger, Mutch, Jerman, Roberts, 2002).





#### FIGURA 4 COMPOSICIÓN DE LAS MEMBRANAS BIOLÓGICAS

Las membranas celulares están constituidas por una bicapa lipídica anfipática formada por fosfolípidos (fosfatidilserina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilcolina, fosfatidilinositol), cada uno contiene dos cadenas hidrófobas de ácidos grasos poli-insaturados de cadenas largas, estos se orientan hacia el interior de la bicapa, mientras que el componente hidrófilo unido a fosfato se mantiene en contacto con los líquidos intracelular y extracelular, a uno y otro lado. (Champe y Harvey, 1994; Irritan, Matsumura, Fukuda, 1988).

DHA modula la acción de las neurotrofinas, aumenta la síntesis de fosfolípidos (en especial fosfatidilserina) en el hipocampo durante el curso de la diferenciación celular inducida por el Factor de crecimiento nervioso (Ikemoto et al, 2000) e inhibe la apoptosis vía fosfatidilinositol (Kim et al, 2003). n3 y n6 forman ceramida, glucoesfingolípidos y galactosilceramida, estos componen la cubierta celular y regulan las interacciones de la célula con su ambiente (Murray, Peter, Daryl, Granner, Rodwell, 1997). Modulan la síntesis de hormonas, péptidos y neurotransmisores (Yehuda et al, 1998), regulan la expresión de mRNA de síntesis del transportador de monoamina vesicular, requerido durante la fusión vesicular y exocitosis presináptica en la transmisión dopaminérgica de las vías mesolímbica y mesocortical, así mismo modulan la transcripción y traducción en la síntesis de receptores dopaminérgicos de varias zonas cerebrales (Kodas et al, 2002; Zimmer, Vancassel, Cantagrel, 2002). De manera similar regulan los niveles de serotonina y sus receptores contribuyendo (Chalión, 1998; Delion, 1996), también modulan la función de los transportadores de glutamato (Berry, 2005).

### **Requerimientos de n3 y n6**

La primera estimación del requerimiento de n6 se hizo en base a la tasa de crecimiento y condiciones de la piel, los requerimientos de las hembras en lactación se determinaron en consideración del número de crías vivas al nacer, al destete y la tasa de crecimiento neonatal, así se estimaron en 1,500 a 2,000 mg/100 g de dieta. También se consideró el contenido de ARA en los tejidos como criterio para determinar la necesidad mínima durante el desarrollo y se fijó entre 1,200 y 1,500 mg/100 g de dieta para hembras y machos (Bourré, Piciotti, Dumont, Pascal, 1990). Estos valores varían en relación al contenido dietario de otros lípidos; se requiere más n6 al subir el contenido dietario de ácido oleico y colesterol (Lowry y Tinsley, 1966).

Los requerimientos de n3 se determinaron en función del mantenimiento de un nivel mínimo de sus derivados poli-insaturados en los tejidos, particularmente DHA (Bourré, 1989). Las ratas en desarrollo y las hembras en

lactancia requieren de 200 a 400 mg/100 g de dieta (0.4 % EM), mientras que las hembras gestantes requieren de 400 a 800 mg/100 g de dieta. El DHA es el derivado al que se atribuyen las mejores propiedades funcionales, y su requerimiento durante el desarrollo se ha estimado en 800 a 1,100 mg/100 g de dieta (Bourre, Dumont, Pascal, Durand, 1993). Después de varios años de investigación, se concluyó que no solo la cantidad de n6 y n3 son importantes nutricionalmente, si no, que la proporción dietaria entre ellos es determinante, la ideal se calculó entre 4:1 y 7:1 (Bourre et al, 1990).

### **Incorporación de ácidos grasos al cerebro en desarrollo.**

Los procesos de biosíntesis durante el desarrollo exigen un aporte de nutrientes superior a los de adultos. Hasta hace un tiempo se daba por hecho que la madre proveía al producto de todos los nutrientes durante la gestación, independientemente de la calidad y cantidad de la dieta consumida (Dobbing et al, 1971). Actualmente se sabe que la madre y sus productos compiten por los nutrientes, en especial por los esenciales. Por ello se requiere de un aporte nutricional adecuado durante la gestación (Morgane et al, 1993). Durante el desarrollo prenatal se intensifica el consumo cerebral de ácidos grasos, estos proceden de la sangre materna casi en su totalidad, ya que el tejido embrionario o fetal no sintetiza los suficientes (Lutz, 1998). Los n3 y n6 ingeridos por la madre se distribuyen en los tejidos maternos y alcanzan los tejidos fetales vía placentaria (Crawford, 2000).

Durante la última semana de gestación el cerebro fetal incorpora abundante DHA, cuyo transporte placentario es facilitado por proteínas acarreadoras y su incorporación predomina sobre el resto de poli-insaturados. Así mismo, una escasa cantidad de DHA es sintetizado "de novo" en los tejidos fetales, a partir del AAL disponible (Green y Yavin, 1993). En esta fase el cerebro en desarrollo es particularmente susceptible al cambio del contenido lipídico de la dieta materna, la composición lipídica del tejido nervioso de fetos de 17 a 20 días cambia antes de 48 h de la modificación alimentaria (Schiefermeier y Llavín,

2002). Después del nacimiento, las crías obtienen todos los nutrientes de la leche, hasta el 60 % de las grasas presentes en la leche son incorporadas de la sangre materna, especialmente los n3, su composición lipídica varía en cada especie y tiene una estrecha relación con la dieta materna (Mather y Keenan, 1998). El porcentaje restante de lípidos lácteos no esenciales derivan de la síntesis de "novo" en el tejido mamario. La composición lipídica de la leche de ratas, varía en proporción directa al cambio del contenido lipídico de la dieta materna 24 h posteriores a la modificación (Crawford, 1993; Larqué Samora, Gif, 2000). Durante el período de crecimiento cerebral rápido y en la segunda semana (fase transitoria y 2ª etapa de incorporación intensa), los ácidos grasos lácteos se incorporan al tejido nervioso neonatal dentro de las primeras 3 h después de haberse ingerido (Bourre, 1989; Menard, Goodman, Corso, Brenna, Cunnane, 1998).

En esta etapa, el tejido nervioso es altamente susceptible al cambio dietario y la composición lipídica membranal es directamente proporcional al contenido de n-3 y n-6 de la dieta materna y de la leche consumida (Bourre, 1989; Yeh et al, 1998). Una pequeña proporción de lípidos cerebrales son neonatales, en su mayoría son cortos o medianos, saturados o monoinsaturados, pero también alarga y desatura AL y AAL aportados por la leche materna (Green y Llavín, 1998).

A partir del día 21 posnatal, las crías ya no dependen de la leche materna, al destetarse la incorporación lipídica continúa y aún se aprecia que la composición lipídica de sus tejidos varía en relación al contenido de la dieta que consumen (Bourre, 1989; Iritani et al, 1993). Incluso se ha observado un efecto tardío del contenido lipídico de la leche materna, sobre la composición lipídica tisular de las crías destetadas (Hausman, McCloskey, Martin, 1991).

## Efectos de la deficiencia de ácidos grasos esenciales

Los efectos de la deficiencia de  $n_3$  y  $n_6$  sobre las funciones del SNC también fueron reportados en niños, se han detectado casos de deficiencia de poli-insaturados en niños prematuros asociadas con sistemas enzimáticos inmaduros o niños a término con limitación genética para la síntesis de enzimas desaturasas y elongasas de AL y AAL. En ellos se analizó el contenido lipídico de las membranas de los eritrocitos y reveló bajos niveles de poli-insaturados, en particular DHA (Connor, Zhu, Anderson, 2000; Stordy, 1988). En muchos de ellos se observaron signos generales de malnutrición lipídica, como dermatitis, pelo seco escaso y débil, y mayor predisposición a enfermedades respiratorias. (Stordy, 1988; Dagach y Mena, 1995). Así mismo, presentaron mayor predisposición a sufrir desórdenes del neurodesarrollo, con posteriores dificultades del aprendizaje, en particular del aprendizaje espacial, dislexia, dispraxia y bajo rendimiento en pruebas de habilidad motora (Anderson, 1990; Connor y Neuringer, 1988; Stevens, et al 1995; Stordy, 1988) además de asociarlo al desorden de hiperactividad y déficit de atención (Mitchell, Aman, Turbott, Manku, 1987; Richardson y Puri, 2002). En muchos casos se suplementó la dieta con una mezcla de ácidos grasos esenciales precursores y derivados, lo que mejoró las destrezas manuales, el balance dinámico y estático, el desarrollo, el aprendizaje y el comportamiento general (Richardson y Puri, 2002; Stordy, 1998).

El consumo de grasas saturadas y mono insaturadas es distinta en cada región del mundo, en algunos países supera al consumo de grasas poli-insaturadas debido a un alto consumo de grasas de origen animal y aceites de maíz y girasol, -contra un escaso consumo de aceite de soya, canola y pescado (Hunter, 1990). En estudios poblacionales se han identificado grupos susceptibles con escaso consumo de fuentes de AAL y DHA, debido a su cultura y hábitos alimentarios (Simopoulos, 2001) y se considera como una población predispuesta al desarrollo de depresión, ansiedad y otros desórdenes mentales (Silvers y Scout, 2002). Estas condiciones alimentarias presuponen que la población

humana afectada por este tipo de desnutrición, cuyos efectos son menos evidentes físicamente, es mucho mayor que la estimada para desnutrición por carencias de proteínas o consumos energéticos escasos, y las consecuencias sobre las habilidades cognitivas, emocionales y psicomotrices no han sido lo suficientemente exploradas.

La investigación sobre los efectos bioquímicos de la malnutrición por restricción de lípidos es abundante en modelos animales, la mayoría han medido los efectos de la restricción de lípidos sobre la composición tisular, principalmente en mielina y en membranas neuronales, confirmando cambios conformacionales en los fosfolípidos de la bicapa, especialmente en la fosfatidilserina, y han evidenciado efectos adversos sobre la estructura de las membranas nerviosas (Ikemoto, et al 2000; Bourre, 1989; Favreliere et al, 1998; Jenssen, 1996). Las membranas de las neuronas localizadas en la corteza prefrontal y en el hipocampo, han resultado especialmente susceptibles al cambio dietario (Ikemoto et al, 2000; Bourre, 1989). Los cambios más agudos sobre la composición lipídica del tejido nervioso se observan tras restricción del ácido linolénico y/o su derivado DHA, o bien; al suministrar dietas con una proporción mayor a 20:1 de ácido linoléico/linolénico (Bourre et al, 1990; Connor y Neuringer, 1988; Dewille y Farmer, 1992).

El DHA es más eficiente que el resto de ácidos poli-insaturados, cuando no está disponible es substituido por otros derivados como ARA, EPA o DPA. Estos alteran la simetría de la bicapa y reducen la fluidez y plasticidad de las membranas (Bourre1989; Wainwright, Huang, Coscina, Lèvesque, 1994), además de alterar la cognición, la emotividad y la psicomotricidad (Bourre et al, 1993). En algunos trabajos se ha sugerido que esta deficiencia afecta al neurodesarrollo, se asegura que la restricción de n3 durante dos generaciones retrasa los procesos de mielinización y sinaptogénesis, limita el crecimiento de conos axónicos, demora el crecimiento de las neuritas y el establecimiento de sinapsis (Anderson, 1994; Innis y De la Prensa, 2001), así mismo, se afecta la síntesis de



factores de crecimiento nervioso y se reduce la supervivencia neuronal (Bourre, 1993). También se afirman efectos sobre la neurogénesis y gliogénesis (Dewille y Farmer, 1988; Voss, Reinhart, Sankarappa, Sprecher, 1991). Y se ha reportado la reducción del tamaño de las neuronas en la zona CA1 del hipocampo, sin cambios en la densidad neuronal (Ahmad et al, 2002). Estos efectos podrían alterar la citoarquitectura de las poblaciones neuronales, al afectar procesos dependientes de la sinaptogénesis como la apoptosis y la supervivencia neuronal, por lo que puede esperarse que se altere el número de neuronas; sin embargo, esto no ha sido reportado.

Numerosos experimentos han aplicado la restricción dietaria transgeneracionalmente, sin embargo existen evidencias de que bastan 3 días de cambio lipídico dietario, para apreciar cambios en la constitución lipídica tisular. (Anderson, 1994; Kuresh, Martin, Joseph, 2000; Wainwright, Huang, Bulman, Mills, Redden, McCutcheon, 1991), así que; es de esperar que se aprecien efectos morfológicos y conductuales tras períodos cortos de restricción. Escasos trabajos han aplicado el modelo de malnutrición por ácidos grasos en períodos concretos del desarrollo para estudios morfológicos y/o conductuales, por lo que resulta necesario realizar otros estudios sobre este mismo fenómeno.

En la investigación con modelos animales se han observado efectos en el aprendizaje espacial tras períodos prolongados de malnutrición en adultos y jóvenes (Wainwright et al, 1994; Frances, Drai, Smirnova, Debray, Bourre, 2000; Greiner et al, 1999; Salem, 1989). Otros trabajos han reportado efectos sobre el estado psiconeural, con reactividad emocional (Wainwright, 1994) y ansiedad (Bourre, 1993). Posteriormente se reportó mejoría en tareas de aprendizaje espacial luego de suplementar la dieta de ratas madres y/o crías con ácidos grasos esenciales (Kuresh, 2000). Varios autores reportaron trastornos en otras modalidades de aprendizaje, como consecuencia del mismo tipo de malnutrición en ratas; tales como aprendizaje reverso y por evitación, retención (Ruthrich, Hoffmann, Marthies, Forster, 1984), memoria de referencia, de trabajo y

espacial (Gamoh, Hashimoto, Shadat, Hata, Misawa, Masumura, 1999), así como de la atención y simultáneamente, de la emotividad; manifestada como aumento del nivel de ansiedad (Belzung, Lequisquet, Barreau, Delion, 1998; Bourre, 1989; Yamamoto, 1988).

Para provocar la malnutrición lipídica se han utilizado aceites de maíz y girasol, ricos en AL pero pobres en AAL, y dietas control con mezclas de aceite de lino, soya y canola, ricos en AAL, que poseen una proporción adecuada de  $n6/n3$ , o se utilizan aceites ricos en DHA, provenientes de varias especies de pescado. En algunos casos se ha suplementado la dieta con ingredientes semisintéticos o purificados (DHA, ARA, ácido alfa-linolenico, linoleato, etc.), mezclas de aceites vegetales y de pescado para revertir los efectos de la deficiencia en humanos y ratas, habiéndose obtenido resultados diversos. El contenido lipídico de las dietas utilizadas varía entre cada experimento, al igual que el tiempo de aplicación de la restricción y la edad de restricción y de evaluación de los efectos (Bourre1990; Hunter, 1990; Frances et al 2000; Greiner et al 1999; Salem, 1989; Wainwright et al, 1994).

Así como varían las formulaciones de las dietas aplicadas en cada experimento, varían los resultados. Aún se precisa de investigación que aporte información para establecer vínculos relacionales entre las alteraciones bioquímicas y los procesos del neurodesarrollo, que podrían explicar el origen anatomofuncional de los trastornos atribuidos a este tipo de desnutrición, además de contribuir a la comprensión de la vulnerabilidad de las etapas del neurodesarrollo.

## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

---

Los ácidos grasos esenciales n6 y n3 aportados por la dieta derivan en poli-insaturados largos que se incorporan a los fosfolípidos de las membranas neuronales, aportan fluidez y regulan procesos de síntesis de enzimas, neurotransmisores, receptores y diversas proteínas de membrana. Se les atribuyen efectos moduladores del neurodesarrollo y el aprendizaje. Su deficiencia causa un estado de malnutrición infantil que se ha asociado a bajo desempeño en tareas de aprendizaje espacial y a alteraciones de la psicomotricidad y de la emotividad. La investigación en modelos animales ha evidenciado cambios en la composición lipídica y la fluidez de las membranas del hipocampo y la corteza prefrontal en adultos y crías, con efectos neuroquímicos que se asocian a alteraciones del aprendizaje espacial, la emotividad y la motricidad. Sin embargo, los resultados son contradictorios y han contribuido solo parcialmente a explicar el origen anatomofisiopatológico de tales efectos. Al respecto, se han sugerido efectos morfológicos en las poblaciones neuronales debidas a la malnutrición instalada durante el desarrollo, pero la investigación al respecto es escasa y contradictoria, no se ha determinado la vulnerabilidad a la malnutrición en períodos cortos y específicos sobre el neurodesarrollo, ya que en su mayoría se ha aplicado el modelo transgeneracionalmente y el análisis sobre las poblaciones celulares es incipiente.

Por ello, en este trabajo, nos propusimos determinar el efecto de la restricción dietaria de n3 y n6 en tres períodos de duración, durante el desarrollo pre y posnatal, o solo posnatal; sobre aprendizaje espacial, ansiedad y actividad locomotora, así como sobre el número de neuronas y su madurez en el hipocampo y la corteza prefrontal de ratas. Los resultados de este estudio contribuirán a explicar el origen morfofuncional de las alteraciones atribuidas a la malnutrición lipídica y a dilucidar sobre la vulnerabilidad de los períodos críticos del desarrollo nervioso, ante este tipo de malnutrición.

## HIPÓTESIS

---

La restricción dietaria de ácidos grasos esenciales linoleico y linolenico, modificará de distinta manera la celularidad neuronal del hipocampo y la corteza prefrontal, según el tiempo de duración de la restricción y los períodos de desarrollo afectados, y estos efectos se acompañarán de alteraciones en el aprendizaje espacial, el nivel de ansiedad y la actividad locomotora.

## OBJETIVOS

---

### OBJETIVO GENERAL

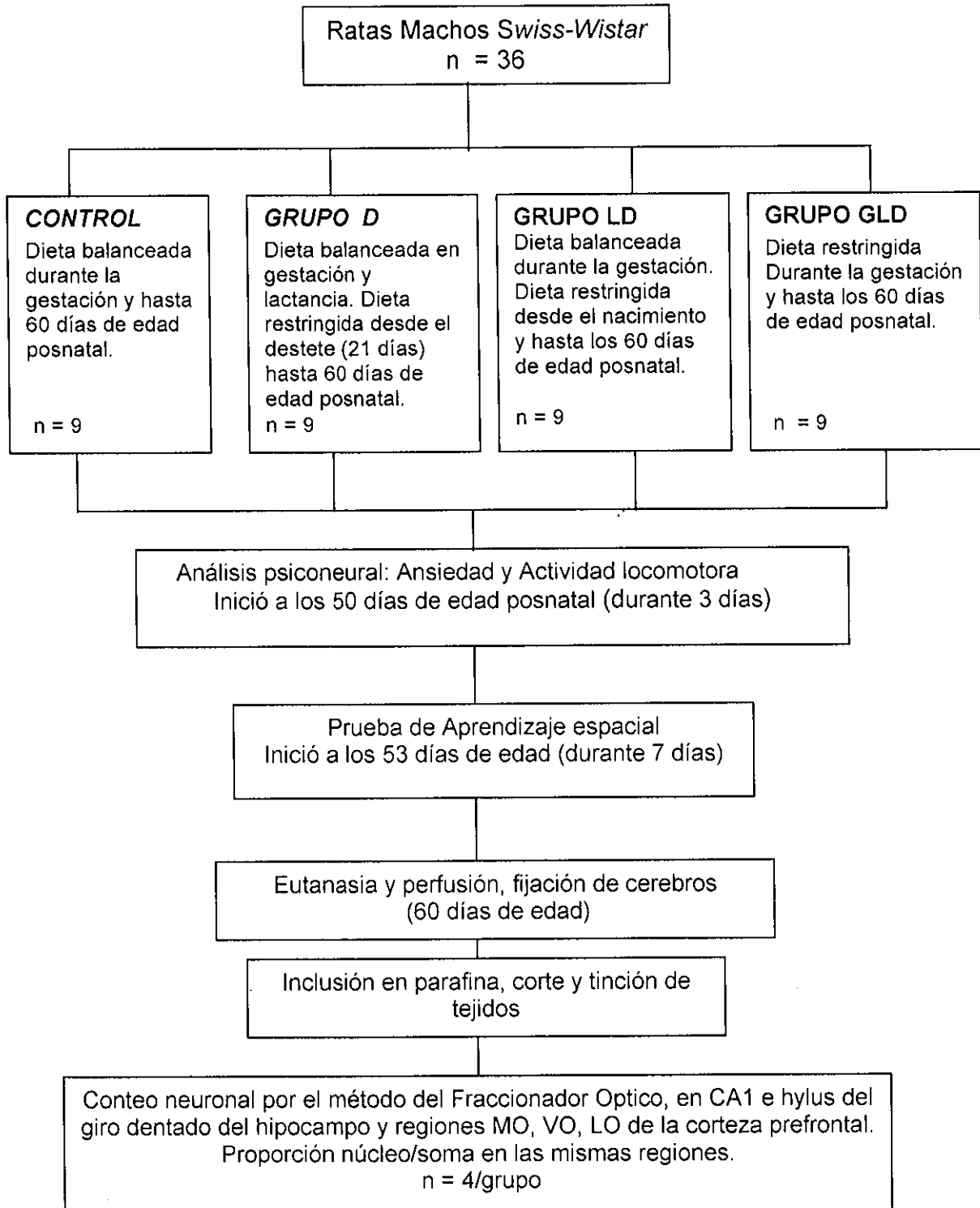
Determinar el efecto de la restricción de ácidos grasos linoleico y linolénico en tres períodos durante el desarrollo prenatal y posnatal o solo posnatal, sobre aprendizaje espacial, ansiedad, actividad locomotora y celularidad neuronal del hipocampo y la corteza prefrontal de ratas.

### OBJETIVOS PARTICULARES

1. Determinar el efecto de la restricción de ácidos grasos esenciales en el desarrollo prenatal y posnatal o solo posnatal, sobre el aprendizaje espacial.
2. Medir el nivel de ansiedad, tras la restricción de ácidos grasos esenciales en el desarrollo prenatal y posnatal o solo posnatal.
3. Determinar el efecto de la restricción de ácidos grasos esenciales en el desarrollo prenatal y posnatal o solo posnatal, sobre el número de neuronas de las regiones de CA1 e hilus del giro dentado del hipocampo, y las áreas MO, VO, LO, de la corteza prefrontal.
4. Determinar el efecto de la restricción de ácidos grasos esenciales en el desarrollo prenatal y posnatal o solo posnatal, sobre el índice de maduración neuronal de las regiones CA1 e hilus del giro dentado del hipocampo y las áreas MO, VO, LO de la corteza prefrontal.

## MATERIALES Y METODOS

### DISEÑO EXPERIMENTAL



## **Animales de experimentación**

Se utilizaron ratas machos de la cepa Swiss-Wistar provenientes de cuatro grupos de ratas progenitoras.

### **Manejo de las progenitoras:**

Se formaron cuatro grupos de tres ratas hembras Swiss-Wistar de segundo parto, su fase estral se determinó mediante citología vaginal exfoliativa y se dejaron tres hembras con un macho durante dos noches, se consideraron preñadas las que presentaron espermatozoides en frotis vaginal al día siguiente, determinado como el día 1 de preñez. Estas ratas consumieron la dieta control o la dieta experimental restringida de ácidos grasos n6/n3, según el grupo al que fueron asignadas. Al nacimiento las camadas se homogenizaron a 12-14 crías dentro de los grupos. A los 21 días posnatales se destetaron y separaron nueve machos de cada grupo de progenitoras, se alojaron en jaulas de 40 x 80 cm. (3 sujetos por jaula), y se mantuvieron en condiciones constantes a una temperatura de 21°C, 60% de humedad ambiental y ciclos de luz-oscuridad de 12 hrs. (7:00 am a 7:00 pm).

### **Diseño y tratamiento de grupos:**

#### **Grupo Control**

Crías provenientes de progenitoras alimentadas con la dieta balanceada durante todo el estudio. Estas crías continuaron su alimentación con la misma dieta de sus madres hasta los 60 días de edad posnatal.

#### **Grupo D (Destete)**

Crías provenientes de progenitoras alimentadas con la dieta balanceada durante la gestación y lactancia, iniciaron la dieta restringida a partir del destete (día 21 posnatal) hasta los 60 días de edad posnatal.

#### **Grupo LD (Lactancia y Destete)**

Crías provenientes de progenitoras alimentadas con la dieta balanceada durante la gestación y con la dieta restringida a partir del nacimiento hasta los

60 días de edad posnatal.

#### Grupo GLD (Gestación, Lactancia y Destete)

Crías provenientes de progenitoras alimentadas con la dieta restringida en ácidos grasos a partir de la gestación y hasta los 60 días posnatales.

#### *Criterios de inclusión:*

Ratas machos ubicados dentro de los parámetros normales de peso y tamaño corporal y que no presentaron señales de enfermedad.

#### *Formulación de dietas:*

Se elaboraron 2 dietas semipurificadas con caseína como fuente de proteína. La dieta control contenía una mezcla de aceites de canola, soya, maíz y pescado que aportaron >1,600 mg/100 g dieta de ácido linoleico (n6) y > 400 mg/100 g dieta de ácido linolénico (n3), en una proporción n6/n3 de 4:1. Mientras que la dieta experimental contenía 2% de aceite de maíz. El aceite de maíz contiene abundante ácido linoleico (> 57%) pero es deficiente en ácido linolénico (< 0.9%), por lo que se utiliza frecuentemente para generar este tipo de malnutrición (Frances, 2000; Bourre et al, 1988). Nuestra dieta experimental aportó <1,040 mg/100 g dieta de n6 y <18 mg/100 g dieta de n3 con una proporción n6/n3 de >57:1. Ambas dietas fueron isocalóricas e isoprotéicas, y contenían el resto de nutrientes requeridos (Formuladas según las recomendaciones de la NCI-ARD y verificado mediante análisis proximal bromatológico). Tablas 2 y 3.

LÍPIDOS	MAIZ	CANOLA	SOYA	PESCADO
Acido Linoleico 18:2n-6 (esencial)	50 - 60	20	51	--
Acido Linolénico 18:3n-3 (esencial)	0 - 0.9	10	7	--
DHA	--	--	--	200 mg/100 g

**Tabla 2** contenido de poliinsaturados del Aceite refinado de maíz vs. canola y soya. (Logan, 2003).



CONTROL		EXPERIMENTAL	
NUTRIENTE	%	NUTRIENTE	%
Proteínas (caseína)	23	Proteínas (caseína)	23
Carbohidratos	49	Carbohidratos	51
Lípidos (Aceite de soya y canola, pescado)	7	Grasas (aceite de maíz)	2
Humedad	10-12	Humedad	10-12
Vitaminas	1	Vitaminas	1
L-cistina	0.3	L-cistina	0.3
L-metionina	0.4	L-metionina	0.4
Fibra	5	Fibra (Alfahacel)	5
Bitartrato de colina	0.2	Bitartrato de colina	0.2
Minerales	4	Minerales	4
Antioxidantes	0.02	Antioxidantes	0.02

**Tabla 3** Composición de las dietas.

Con el fin de confirmar la restricción de ácidos grasos esenciales sobre los neonatos, se destinaron de 3 a 5 lactantes por grupo a la extracción de leche, inmediatamente posterior a 3 minutos de lactación se sacrificaron con cloroformo y se extrajo rápidamente el total del contenido gástrico por gastrectomía radical (Larqué et al, 2000; Saste, Carver, Stockar, Benford, Chen, Phelps, 1998), las muestras de leche fueron almacenadas a  $-70^{\circ}\text{C}$  y posteriormente analizadas. La grasa se extrajo con una mezcla de solventes cloroformo/metanol (2:1), se aislaron metilesteres con HCL 3 mol/L a  $85^{\circ}\text{C}$  y se disolvieron en hexano. Posteriormente se analizaron por cromatografía gas-líquido (GLC- columna capilar flexible silica 100 m x 0.25 mm Supelco, en cromatógrafo HP 5890, programado por 14 min. a  $175^{\circ}\text{C}$  inicial y ascenso secuencial de  $3^{\circ}\text{C}/\text{min}$ . hasta  $230^{\circ}\text{C}$ , presión de gas 290 kPa utilizando Helio). Se confirmó la posición de los dobles enlaces mediante espectrometría de masas (Analytical System MS 7070, programa de 15 min. a  $140^{\circ}\text{C}$  inicial y ascenso  $1.5^{\circ}\text{C}$  hasta  $220^{\circ}\text{C}$ .), analizando sus derivados 2-Alkenil-4,4-dimetiloxazolinedel en busca de isómeros de  $18n-3$  y  $18n-6$  para estimar presencia de cadenas medianas y largas poli-insaturadas en la leche. Tabla 4

LIPIDOS	% mol	LIPIDOS	% mol
Triglicéridos	90	Ácidos Grasos libres	0.1-0.4
Colesterol	0.2-0.4	18:2n-6	< 5
Fosfolípidos	0.6-1.0	18:3n-3	trazas

**Tabla 4** Contenido lipídico de la leche de ratas experimentales. La leche de ratas controles contenía los valores normales (18:2n-6 = 7; 18:3n-3 = 1).

### Parámetros de estudio:

Análisis somatométrico de las crías

- 1.- Número de crías nacidas vivas y muertas.
- 2.- Peso corporal.
- 3.- Longitud cráneo caudal.
- 4.- Perímetro cefálico.

Pruebas de conducta

Para analizar los efectos de la restricción lipídica impuesta a las crías provenientes de los diferentes grupos, se utilizaron los laberintos elevado en cruz y campo abierto (ansiedad y actividad locomotora), y el laberinto acuático de Morris (aprendizaje espacial). Para aplicar las pruebas conductuales se dispuso de un sitio tranquilo, aislado de ruidos ambientales, con iluminación blanca, difusa, atenuada y con un entorno visualmente neutro para las ratas. Todos los experimentos fueron grabados en video para su posterior análisis. Las pruebas de ansiedad y actividad locomotora iniciaron el día 50 de edad posnatal, y consistieron de un ensayo diario de 5 min. en cada laberinto durante tres días consecutivos.

**Ansiedad:** Laberinto elevado en cruz.

Consistió de 4 brazos dispuestos en cruz y elevados sobre un pedestal, dos de los brazos cubiertos y los otros dos descubiertos, el centro de la cruz mide 10 cm. x 10 cm. y es el sitio de colocación del animal para el inicio de la prueba. Figura No. 5

La prueba inició al depositar la rata en el centro del laberinto, se le dejó deambular 5 minutos y se registraron los siguientes parámetros:

Tiempo de permanencia en brazos abiertos: Inversamente proporcional al nivel de ansiedad.

Número de cruces centrales: Indicativo del nivel de actividad locomotora.

#### **Actividad locomotora: Campo abierto**

Consistió en una caja de 60 cm. x 60 cm. con paredes laterales de 25 cm. de altura, Figura No. 6. Se depositó la rata en el centro de la arena y se dejó deambular por 5 minutos, Se dibujó una cuadrícula (10 x 10 cuadros, equivalentes a 6 cm. X 6 cm.) en la pantalla del monitor sobre la imagen de la arena y se registraron los siguientes parámetros:

Distancia total: Corresponde al cálculo de la distancia recorrida en cm. (total de cuadros recorridos).

Cuadros centrales: Número de cuadros centrales recorridos. (La rata ansiosa evita cruzar el centro de la arena).

#### **Aprendizaje espacial**

Se utilizó el laberinto acuático de Morris en su versión clásica, consistió de una piscina de 1.80 m de diámetro, con 37 cm. de altura y de color negro. Se llenó de agua hasta un nivel de 25 cm. y se colocó la plataforma de escape en uno de los cuadrantes imaginarios Figura 7. La plataforma consistió de un cilindro de 10 cm. de diámetro en color negro y se ubicó 1 cm. por debajo del nivel del agua, de manera que no fue visible para las ratas (Morris, 1984), fuera de la piscina se colocaron orientadores visuales en cada punto cardinal. Las pruebas iniciaron el día 53 de edad posnatal y continuaron durante siete días. Inicialmente se realizó una sesión de habituación; que consistió en tres ensayos consecutivos de 90 segundos durante los cuales, la rata se liberó dentro del agua en ausencia de la plataforma de escape. La prueba consistió de una sesión diaria con cuatro ensayos consecutivos, cada uno con un tiempo máximo de

latencia de 90 s y un intervalo inter ensayo de 10-12 min., el aprendizaje se consideró completo al observar una curva de latencia de escape asintótica entre tres sesiones.

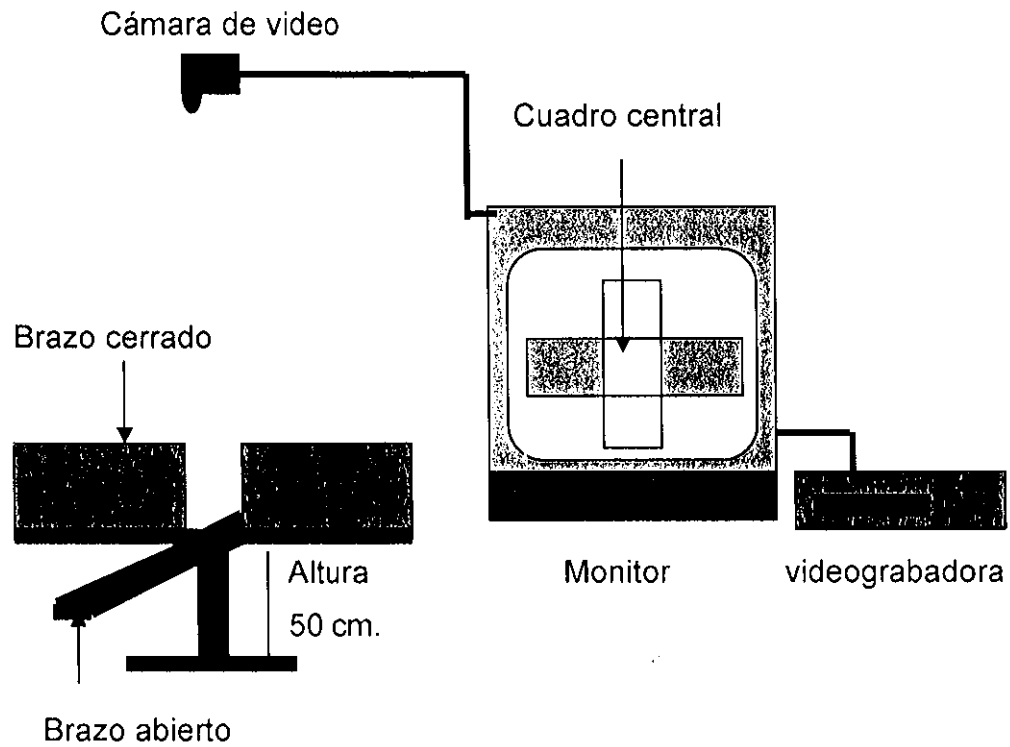
En cada sesión de prueba se seleccionó aleatoriamente el cuadrante de inicio para la rata, que estaba marcado por una cinta blanca (*orientador espacial interno*). La rata se depositó en el agua con la cabeza dirigida contra la pared de la piscina, siguiendo la dirección de las manecillas del reloj en orden sucesivo, de manera que al final de cada día partió desde el centro de cada uno de los cuadrantes. Cada ensayo inició al depositar el animal en el agua y se consideró terminado cuando éste encontró la plataforma de escape y permaneció por lo menos durante 8 segundos sobre ella (*etapa de adquisición*). En el primer día de ensayos, las ratas que no encontraron la plataforma antes de los 90 segundos fueron guiadas hacia ella y se les dejó permanecer encima 8 segundos. Se grabó todo el tiempo que las ratas permanecieron en la piscina para realizar el registro. Se consideraron los siguientes parámetros:

Latencia de escape: tiempo que transcurre desde que se deposita la rata en el agua hasta que localiza la plataforma de escape (90 seg. máximo).

Tiempo de permanencia en el cuadrante de la plataforma: indica el progreso en la capacidad de orientación del animal para localizar la plataforma, (precisión de la búsqueda), debe resultar una curva inversa a la de latencia de escape.

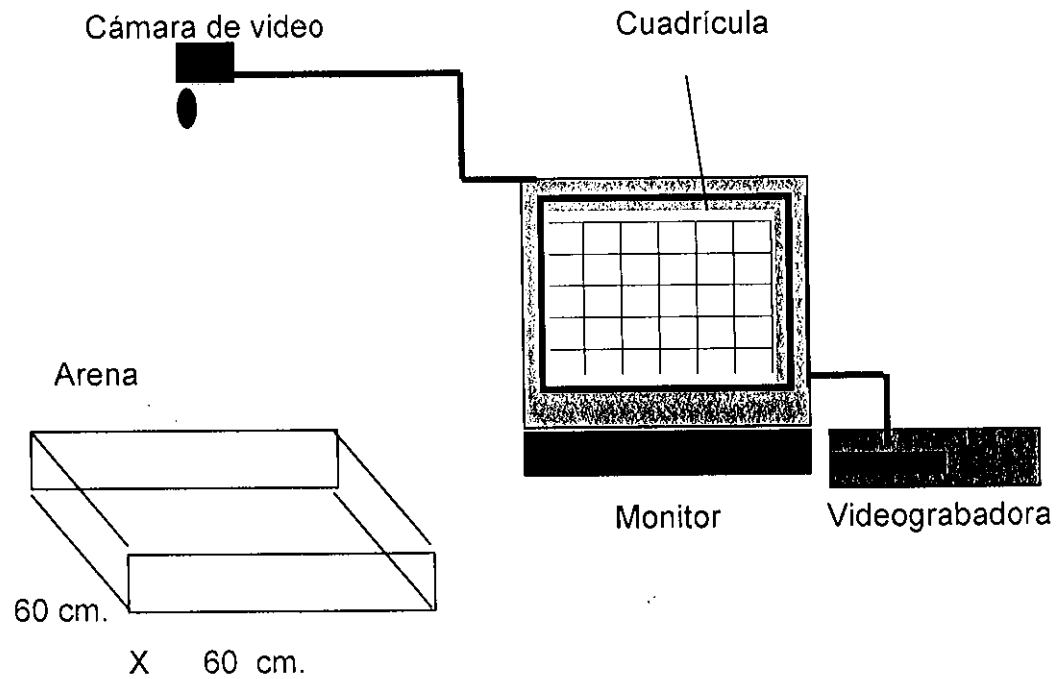
Longitud de la trayectoria: distancia que recorre la rata mientras navega en el agua, hasta encontrar la plataforma.

Velocidad: Calculada en función de distancia/tiempo (cm. /segundo).



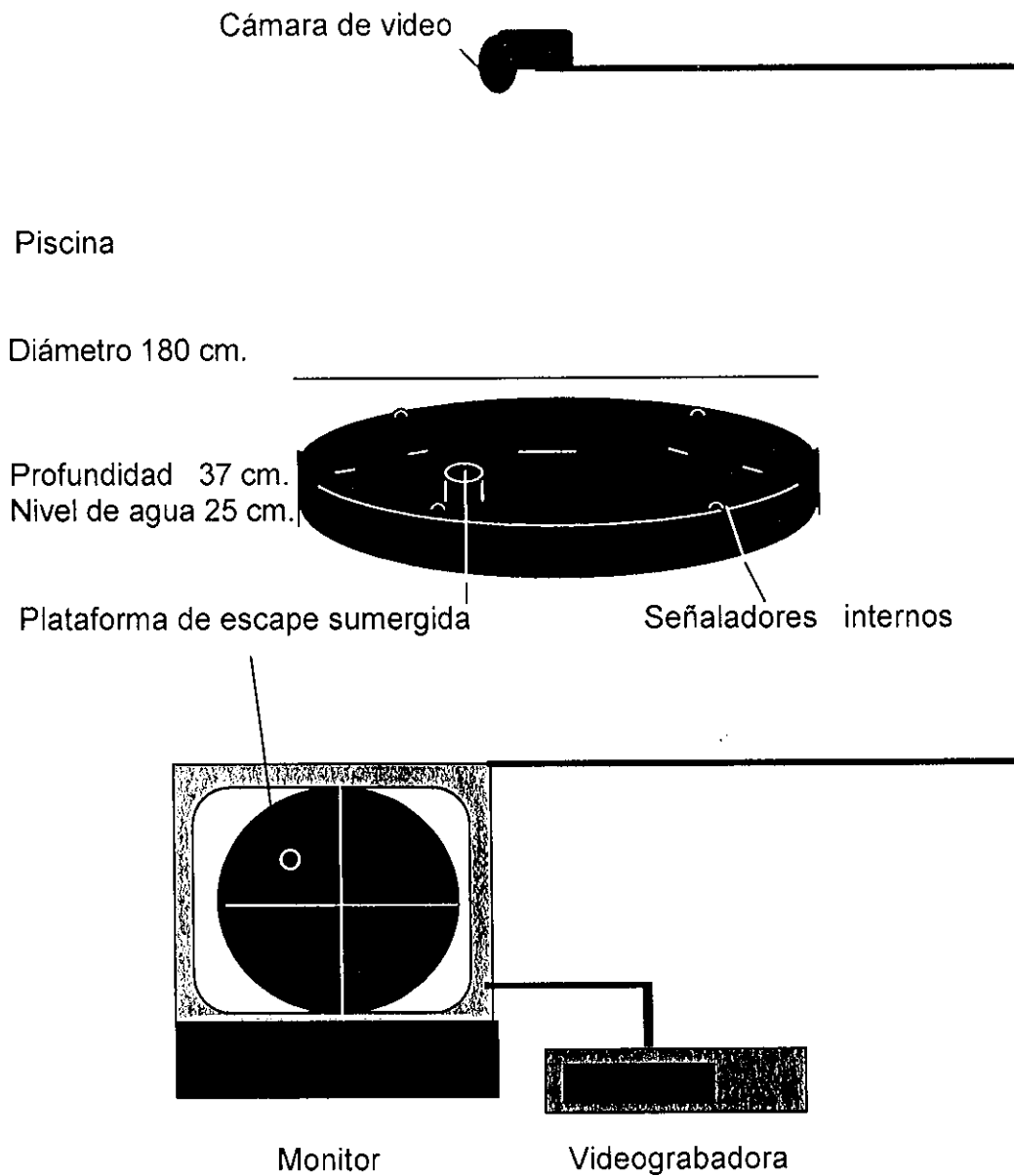
**FIGURA 5 LABERINTO ELEVADO EN CRUZ**

Se aprecia el laberinto y el circuito cerrado de televisión mediante el cual se grabaron los ensayos, el espacio ocupado por el laberinto se mantuvo aislado, ya que el evaluador colocaba y retiraba las ratas al inicio y fin de cada ensayo, manteniéndose alejado durante los 5 minutos de prueba y solo monitoreaba el evento a través del televisor. En el monitor se aprecian los brazos en cruz, posteriormente se analizaron los videos para registrar los datos de interés.



**FIGURA 6 CAMPO ABIERTO**

La arena se mantuvo aislada y su imagen ocupaba toda la pantalla del televisor para grabar los ensayos, posteriormente se analizaron los videos, para lo cual se colocó sobre la pantalla una cuadrícula de 10 x 10 cuadros, en la cual se contaron los cuadros recorridos en el centro y el total de cuadros, finalmente se calculó la distancia recorrida en cm. considerando que cada cuadro equivale a 6 x 6 cm. Se considera cuadro recorrido cuando el cuerpo y la cola de la rata pasan por dos lados opuestos del cuadro.



**FIGURA 7 LABERINTO ACUÁTICO DE MORRIS**

La piscina se mantuvo aislada y se monitoreo el ensayo a través del televisor, la cámara se situó por encima de la piscina a 1.80 m. de manera que la imagen de la piscina ocupara toda la pantalla del televisor y se grabaron los ensayos.

## **Análisis cuantitativo de celularidad neuronal.**

### *Preparación de los tejidos:*

A los 60 días de vida posnatal se sacrificaron los animales mediante inyección ip de pentobarbital sódico (80 mg/Kg. de peso). Se perfundieron 200 ml de una solución lavadora a 37 °C, (NaCl 0.9%, heparina 5.000 UI/L, procaína 0.1%), a presión máxima de 120 cm<sup>3</sup> de columna de agua durante 3 minutos. Seguida de igual volumen de solución fijadora (paraformaldehído 3%, amortiguada en fosfatos y aclarada con NaHO). Se extrajeron los cerebros y se sumergieron en la misma solución fijadora durante 8 días y se incluyeron en parafina. Se cortaron en secciones coronales de 40 μm en micrótomo. Los cortes se tiñeron con hematoxilina-eosina (técnica de Harris), se utilizó el sistema de análisis de imagen Leica Qwin 500 y la cámara clara accesoria para el estudio morfológico en microscopia de luz. Para el conteo de las regiones Ca1 e hylus del hipocampo se cortaron secciones desde 2.30 mm hasta 6.30 mm anterior a Bregma; mientras que para el conteo de las regiones orbital ventral, orbital lateral y orbital medial (.VO. LO, MO) de la corteza prefrontal se hicieron cortes a partir de 5.20 mm y hasta -1.30 mm de Bregma. Figura 8.

### *Método de conteo neuronal:*

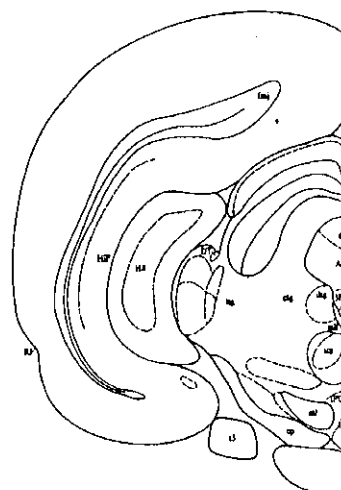
El número total de neuronas de cada una de las regiones del Hipocampo y la corteza prefrontal se calculó mediante el método del fraccionador óptico, que combina técnicas estereológicas consistentes en un análisis tridimensional para contar núcleos o nucleolos neuronales, un disector óptico y un esquema de muestreo sistematizado y uniforme (Gundersen 1988,1999). Este método reduce la influencia del encogimiento u otros cambios del tejido debidos al proceso de fijación, emparafinado o montaje. Tampoco es afectado por el tamaño o la forma de los somas neuronales, el traslape de cortes o la sobre posición de imágenes (West, Slomianka, Gundersen, 1991).

Se analizó un corte de cada 20 ( $f_1 = 20$ ), el conteo se realizó en una fracción del área de muestra ( $\alpha_m = 86,060.20 \mu^2$ ), mediante una cuadrícula rectangular sobrepuesta al azar en la imagen del tejido, para ello se utilizó la



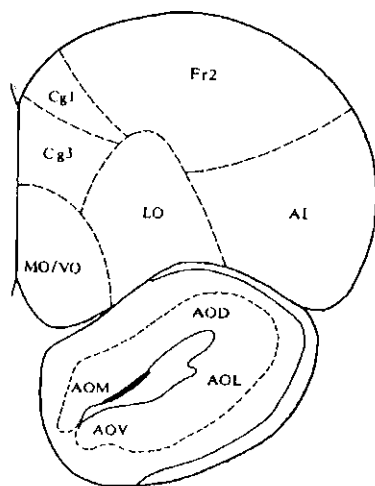


De - 2.30 de Bregma

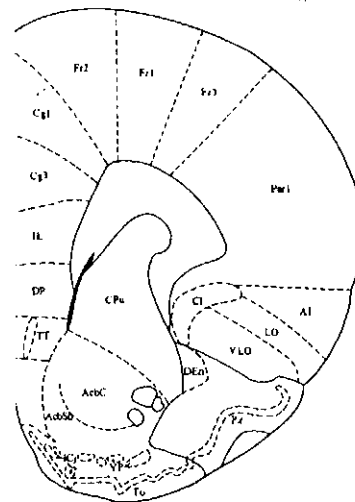


a - 6.30 de Bregma

Hipocampo



De 2.70 de Bregma



a -1.40 de Bregma

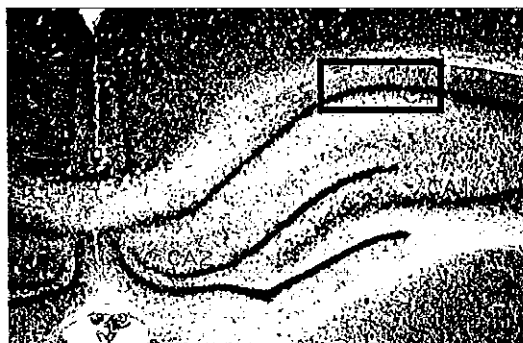
Corteza prefrontal

**FIGURA 8** Cortes coronales del cerebro de rata, indican los limites de las áreas de muestreo para las regiones hipocampales y de la corteza prefrontal.

### Figura No. 9 Área de conteo.

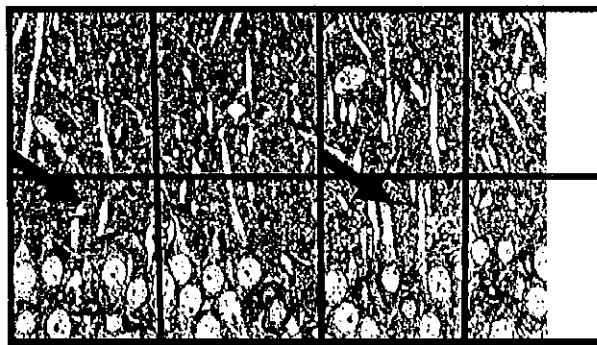
Corte coronal de hipocampo.

Se midió ( $\mu^2$ ) el área de muestra sobre la cual se colocó la rejilla para hacer el conteo.



### FIGURA 10 Número de Neuronas CAI del hipocampo (40X).

Se colocó la rejilla al azar sobre la imagen del tejido mediante cámara clara y se contaron los nucleolos visibles de las células ubicadas dentro de los cuadros señalados. Se midió el área ( $\mu^2$ ) de conteo.



### FIGURA 11 Índice de madurez

Neuronas de CAI (100 X)

Se midieron el área ( $\mu^2$ ) del núcleo y el área del soma ( $\mu^2$ ) para calcular su relación proporcional y estimar madurez neuronal.



De igual manera se procedió en el hilus y en las regiones de la corteza prefrontal propuestas.

## RESULTADOS

---

### Parámetros somatométricos

Los animales que consumieron la dieta experimental mostraron signos de malnutrición por ácidos grasos como pelo escaso y frágil, dermatitis leves y mayor propensión a enfermedad respiratoria. Las camadas de las hembras que consumieron la dieta restringida fueron menores que las control, sin que estas diferencias fueran significativas ( $p > 0.05$ , datos no mostrados). El análisis de varianza de una vía no mostró diferencias en el peso corporal ( $F_{3, 32} = 2.03$ ;  $p > 0.05$ ), la longitud cráneo caudal ( $F_{3, 32} = 0.78$ ;  $p > 0.05$ ) y el perímetro cefálico ( $F_{3, 32} = 2.05$ ;  $p > 0.05$ ) entre animales control y restringidos. Tabla No 5

### SOMATOMETRIA

Etapa/ Grupo	Peso corporal (gr.)	Longitud cráneo caudal (cm.)	Perímetro cefálico (cm.)
Control	275.89 ± 2.50	17.76 ± 0.15	11.67 ± 0.19
D	274.88 ± 1.62	17.78 ± 0.12	11.60 ± 0.09
LD	274.78 ± 1.60	17.63 ± 0.12	11.57 ± 0.12
GLD	274.33 ± 2.30	17.62 ± 0.16	11.58 ± 0.13

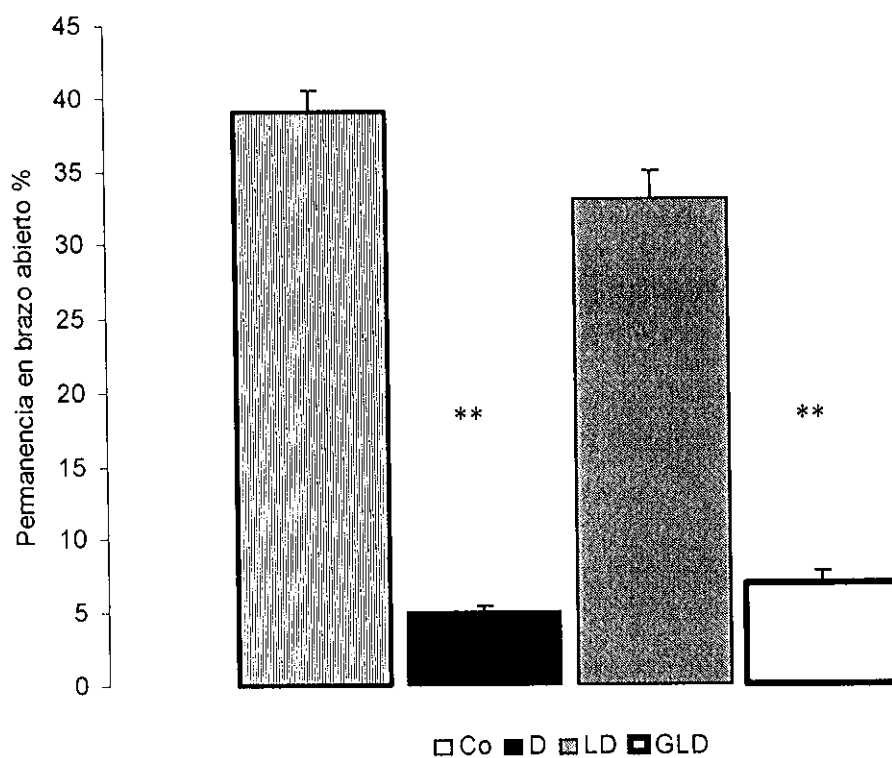
**Tabla No. 5** Contiene las medias ± el ES de los parámetros somatométricos registrados al final del estudio.

### Ansiedad

El porcentaje de tiempo de permanencia en el brazo abierto del laberinto elevado en cruz guarda una relación inversa con el nivel de ansiedad de los animales, el análisis de varianza de una vía demostró diferencias significativas entre los grupos estudiados ( $F_{3, 32} = 107.08$ ,  $p < 0.001$ ). Análisis posteriores (Tukey) mostraron que los animales que consumieron la dieta restringida desde

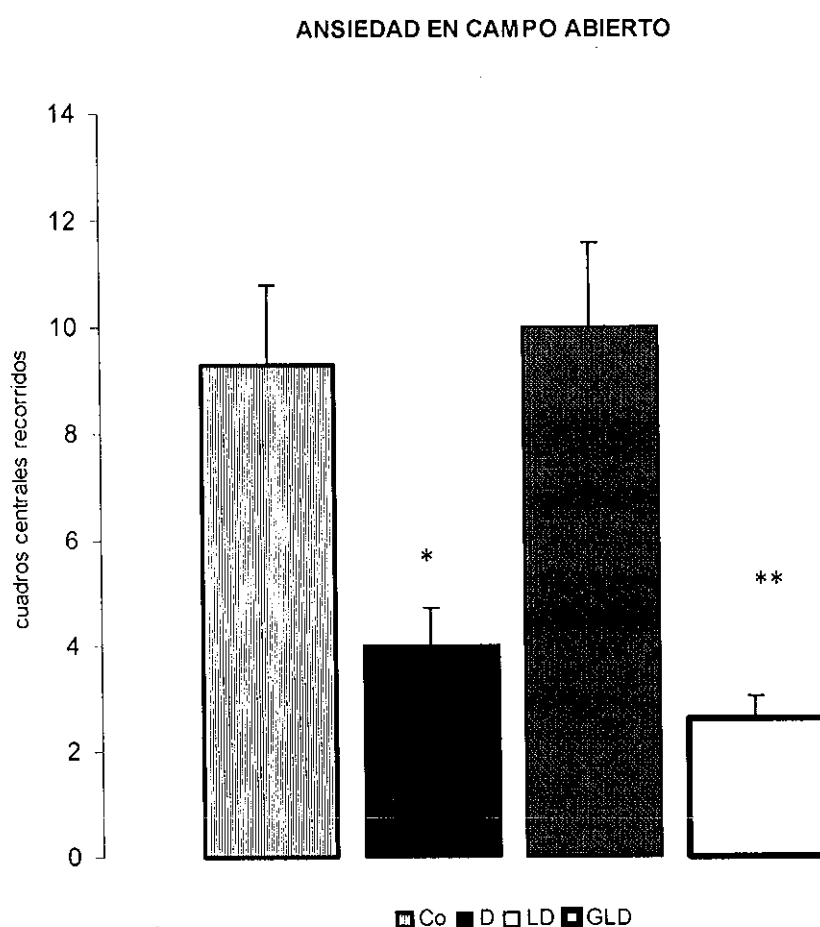
la gestación (GLD), así como los restringidos a partir del destete (D) mostraron una notable reducción del tiempo de permanencia en el brazo abierto respecto a los sujetos control y a los restringidos a partir de la lactancia (LD) ( $p < 0.01$ ), el comportamiento de estos últimos en este paradigma no fue distinto al de los controles ( $p > 0.05$ ). Figura 12

#### ANSIEDAD EN EL LABERINTO ELEVADO EN CRUZ



**Figura No. 12** Las columnas representan la media  $\pm$  el ES de la suma de valores acumulados durante los 3 días de duración de esta prueba, se muestra el porcentaje de tiempo que las ratas alimentadas con dieta restringida permanecieron en los brazos abiertos del laberinto elevado. Los menores tiempos correspondieron a las ratas D y a las GLD, comparadas con el grupo control (\*\*  $p < 0.01$ ) y el LD (\*\* $p < 0.01$ ).

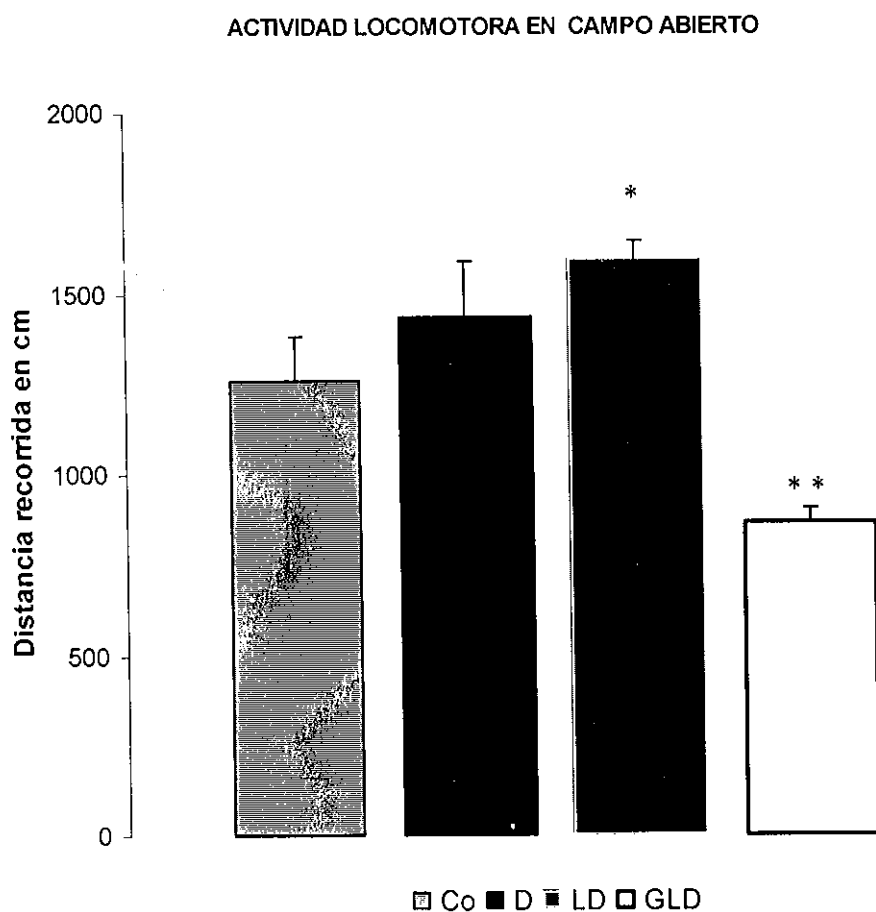
Estos resultados se confirmaron al registrar los cuadros centrales recorridos en campo abierto, valor que consideramos indicativo del nivel de ansiedad (a menor número de cuadros centrales, mayor nivel de ansiedad). El análisis de varianza del número de cuadros centrales recorridos evidenció diferencias entre los grupos ( $F_{3,32} = 71.47$   $p < 0.001$ ), al analizar los datos posteriormente encontramos que los sujetos restringidos durante GLD recorrieron menos cuadros centrales, seguidos por los sujetos restringidos en D comparados con los controles y con los LD. Figura 13.



**Figura No. 13** Valores promedio  $\pm$  ES del número de cuadros centrales recorridos los 3 días que duró la prueba de ansiedad en campo abierto. Los animales GLD y los D resultaron ansiosos cuando se compararon contra los controles (\*\* $p < 0.01$  y \* $p < 0.05$  respectivamente) y contra los LD (\*\* $p < 0.01$  y \* $p < 0.05$  respectivamente).

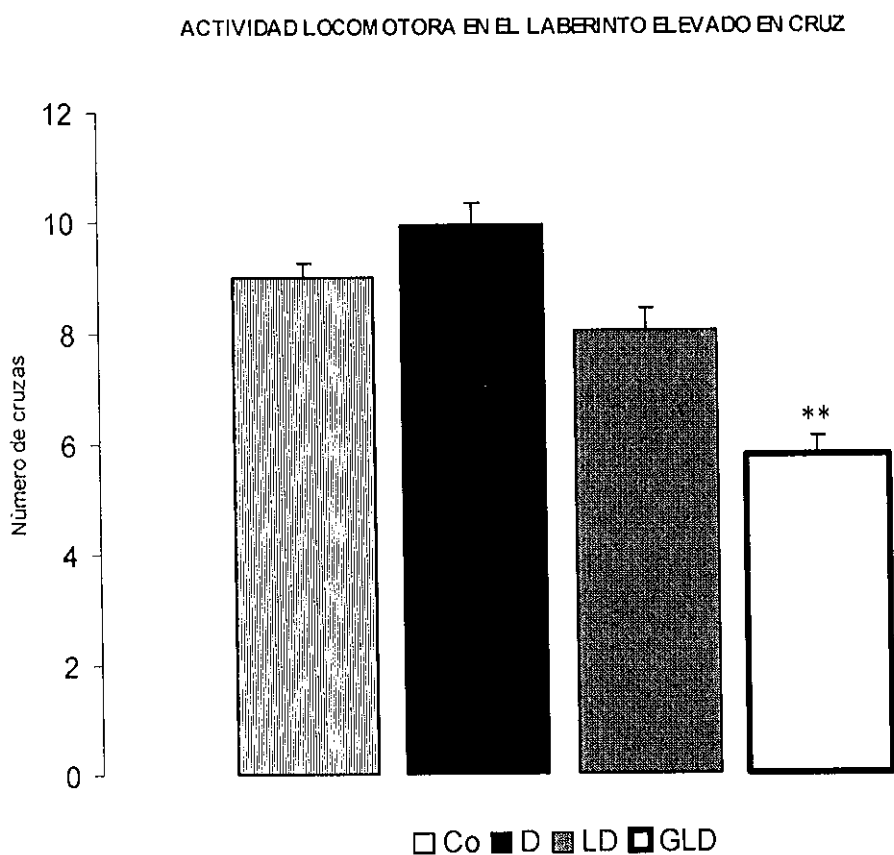
### Actividad Locomotora

Al analizar la varianza de la distancia recorrida en campo abierto se observaron diferencias significativas entre los grupos ( $F_{3, 32} = 5.29$ ;  $p < 0.05$ ), posteriores análisis señalaron que la actividad disminuyó significativamente en el grupo GLD respecto al control y al D y LD, y aumentó en el grupo LD comparado con el control y el GLD. Figura 14



**Figura No. 14** Las columnas representan la media  $\pm$  ES de la distancia recorrida los 3 días de la prueba de exploración en campo abierto. Los sujetos GLD se mostraron poco activos respecto al control y D (\*\* $p < 0.01$ ), mientras que los LD recorrieron mayor distancia que el control (\* $p < 0.05$ ) y que GLD (\*\* $p < 0.01$ ).

En el laberinto elevado en cruz se cuantificó el número total de cruces - indicativo del nivel de actividad locomotora- y se apreciaron diferencias entre los grupos ( $F_{3, 32} = 17.16$   $p < 0.01$ ), los animales GLD redujeron notablemente su actividad respecto a los controles y a los D, mientras que los sujetos D incrementaron su actividad sin alcanzar la significancia respecto al control ( $p > 0.05$ ), pero sí respecto al GLD ( $p < 0.01$ ). Figura 15

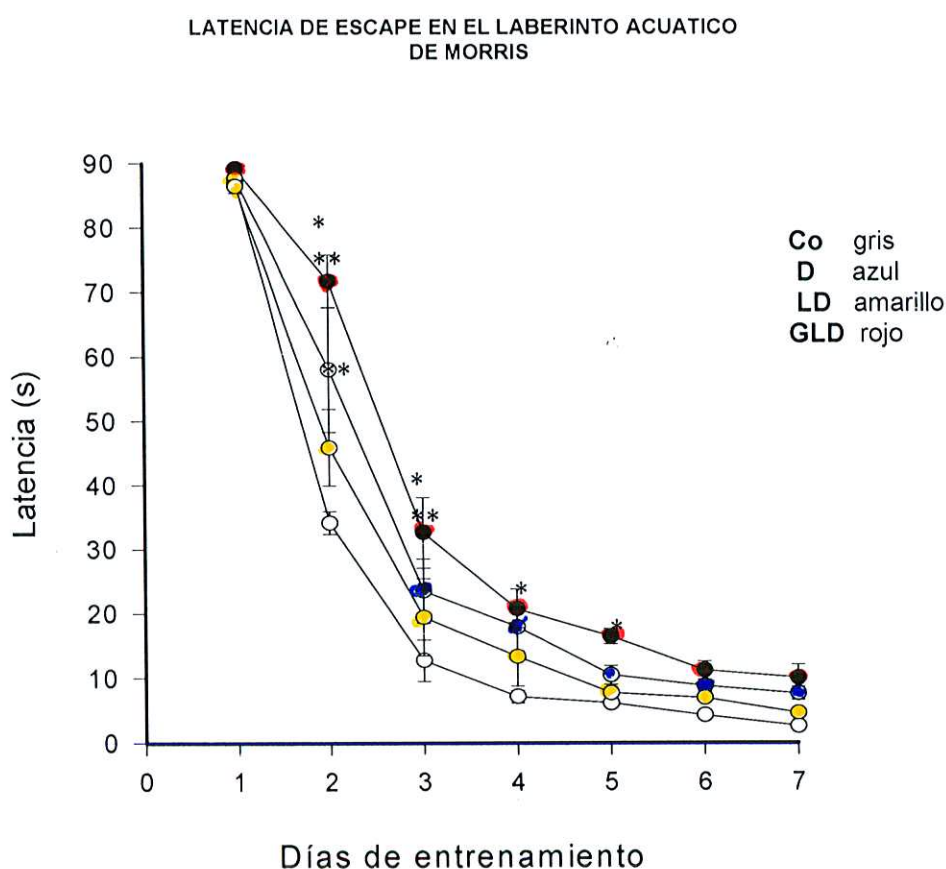


**Figura No. 15** Se muestran los valores promedio  $\pm$  el ES de la media, correspondientes a la suma de datos acumulados durante los 3 días de la prueba, referentes al número de cruces por el centro del laberinto elevado en cruz, los animales GLD fueron significativamente menos activos que los controles (\*\*  $p < 0.01$ ) y que los D (\*\*  $p < 0.01$ ).

### Aprendizaje Espacial

Los sujetos de todos los grupos fueron capaces de aprender a localizar la plataforma sumergida en el laberinto acuático. Sin embargo; el análisis de

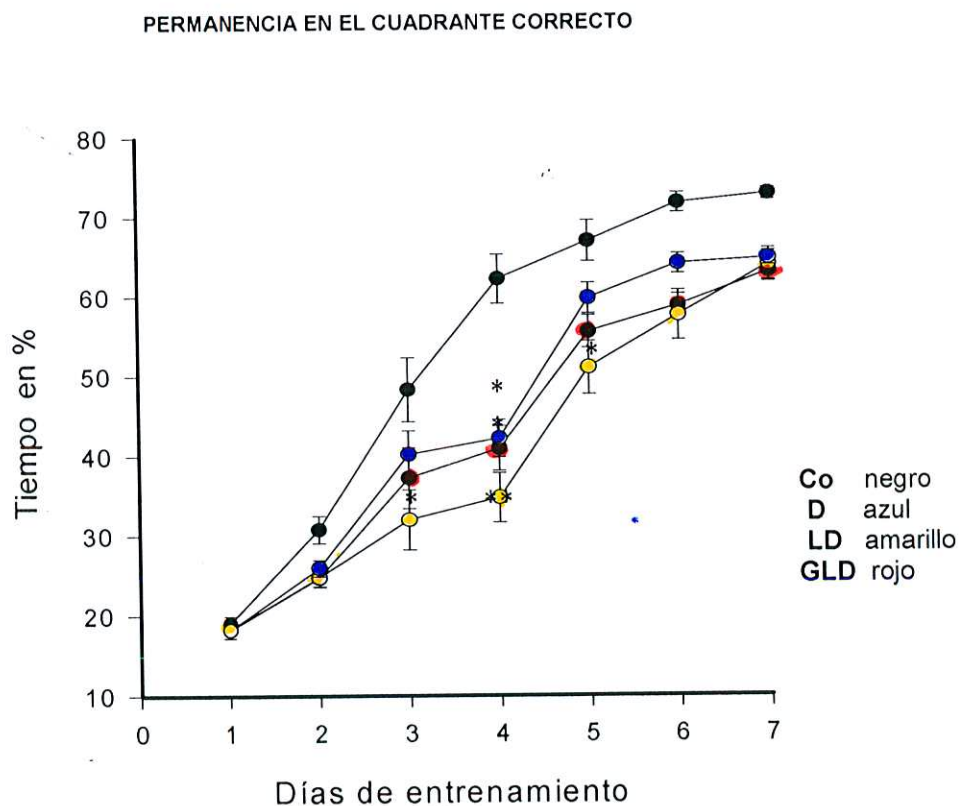
varianza de dos vías del tiempo de latencia de escape mostró diferencias significativas entre los grupos ( $F_{3, 32} = 91.20$ ;  $p < 0.001$ ) que variaron en los días de entrenamiento ( $F_{3, 32} = 44.39$ ;  $p < 0.001$ ). Análisis posteriores mostraron que los animales GLD tuvieron latencias de escape significativamente mayores respecto a los controles en los días 2 y 3 ( $p < 0.01$ ), 4 y 5 ( $p < 0.05$ ), respecto a los LD los días 2 ( $p < 0.01$ ) y 3 ( $p < 0.05$ ) y respecto a D el día 2 ( $p < 0.05$ ) los animales D mostraron retraso respecto al control los días 2 ( $p < 0.01$ ), 3 y 4 ( $p < 0.05$ ) y respecto a LD el día 2 ( $p < 0.05$ ). Figura 16.



**Figura No. 16** Cada esfera representa la media  $\pm$  el ES del tiempo en segundos que transcurrió para que las ratas localizaran la plataforma de escape oculta. Gradualmente las ratas de todos los grupos utilizaron menos tiempo en llegar a la plataforma. El grupo GLD mostró las mayores latencias de escape respecto al control al LD y al D (\*\* $p < 0.01$  y \* $p < 0.05$ ) y os D respecto al control y al LD (\*\* $p < 0.01$  y \* $p < 0.05$ ).

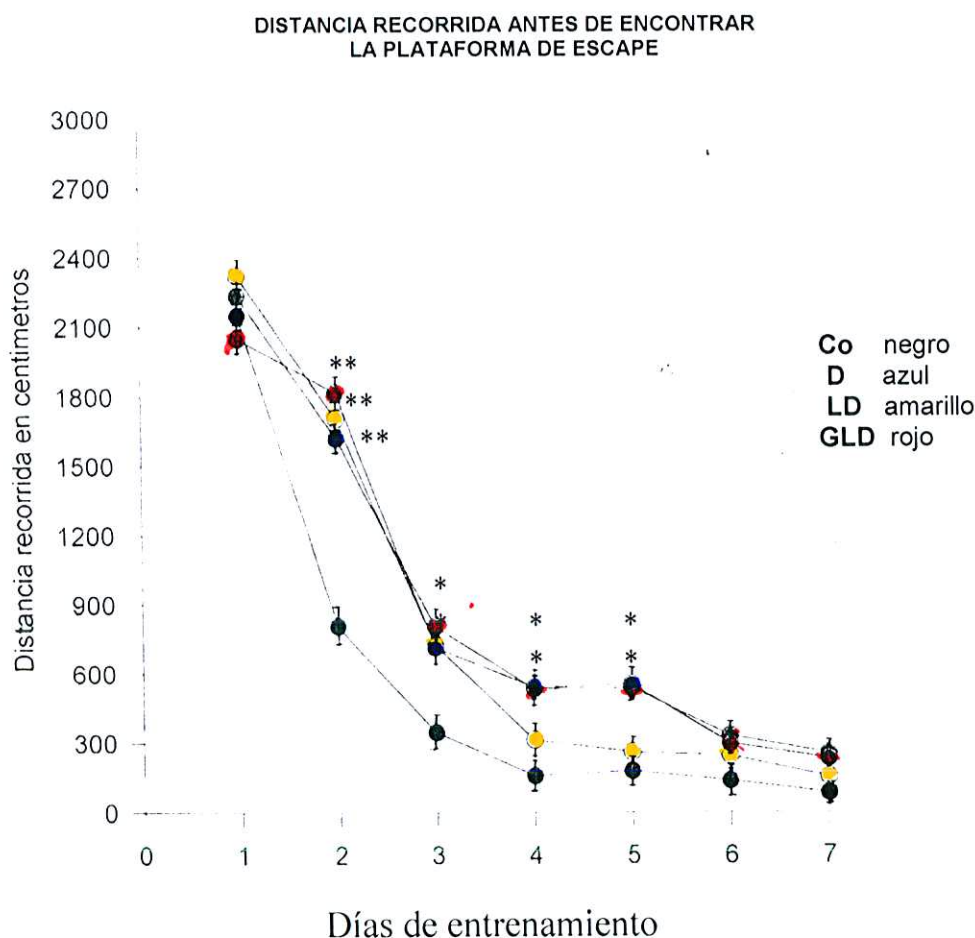


Se analizó el porcentaje de tiempo que cada animal permaneció en el cuadrante que contenía la plataforma durante el estudio como indicativo del progreso en la precisión de la búsqueda, todos los animales aumentaron gradualmente su tiempo de nado en el cuadrante correcto; sin embargo, el análisis de varianza de dos vías mostró diferencias significativas entre los grupos ( $F_{3, 32} = 67.90$ ;  $p < 0.001$ ) en distintos días de entrenamiento ( $F_{3, 32} = 42.95$ ;  $p < 0.001$ ). El análisis posterior mostró que las ratas LD pasaron menos tiempo nadando en el cuadrante correcto que los sujetos control el día 4 ( $p < 0.01$ ) y los días 3 y 5 ( $p < 0.05$ ). También los animales GLD y D nadaron menos tiempo en el cuadrante correcto comparados con los controles el día 4 ( $p < 0.05$ ). No hubo diferencias entre los grupos experimentales. Figura 17



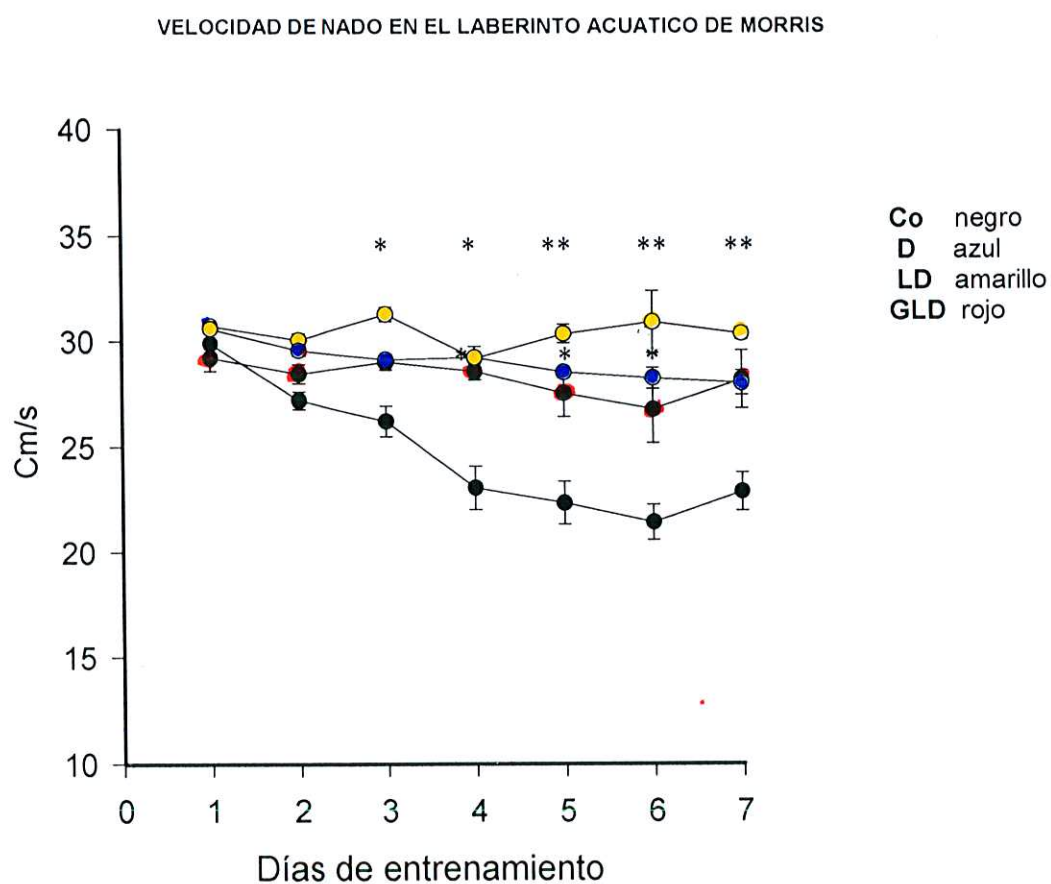
**Figura No. 17** Cada esfera representa la media  $\pm$  el ES de la media del % de tiempo de permanencia en el cuadrante correcto a lo largo de la prueba, se observa una curva inversa a la presentada por las latencias de escape. Los sujetos LD nadaron menos tiempo en el cuadrante correcto (días 3 al 5  $**p < 0.01$  y  $*p < 0.05$ , seguidos por los restringidos en GLD y D el día 4 ( $*p < 0.05$ ).

Referente a la distancia total recorrida a través de la prueba; el mismo análisis demostró diferencias significativas entre los grupos ( $F_{3, 32} = 45.21$ ;  $p < 0.001$ ) y en los días de entrenamiento ( $F_{3, 32} = 515.94$ ;  $p < 0.001$ ). El análisis posterior mostró que los animales restringidos en D recorrieron las mayores distancias los días 2 ( $p < 0.01$ ) 4 y 5 ( $p < 0.05$ ), seguidos por los LD que fueron distintos al control los días 2 ( $p < 0.01$ ) y 3 ( $p < 0.05$ ), los GLD les siguieron el día 2 ( $p < 0.01$ ) y los días 3 al 5 ( $p < 0.05$ ) respecto al control. Figura 18



**Figura No. 18** Cada esfera representa la media  $\pm$  el ES de la distancia en cm que la rata debió recorrer antes de localizar la plataforma de escape. Gradualmente, a través de los días las ratas de todos los grupos disminuyeron la distancia antes de llegar a la plataforma. Los tres grupos experimentales recorrieron mayores distancias respecto a los controles los días 2 al 5 (\*\* $p < 0.01$  y \* $p < 0.05$ ). Entre ellos no hubo diferencias significativas.

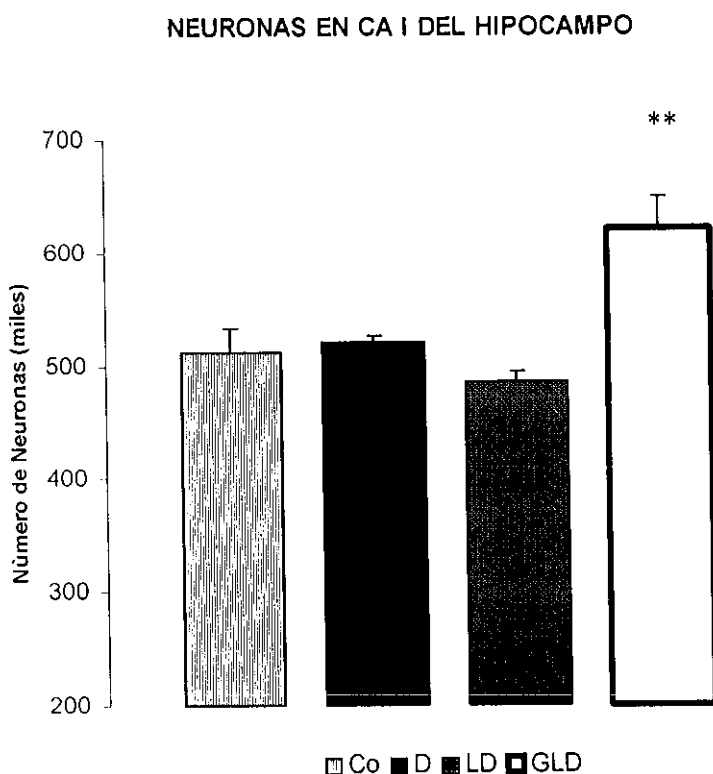
Así mismo, en el análisis de la velocidad de nado se encontraron diferencias significativas entre los grupos ( $F_{3,32} = 60.82$ ;  $p < 0.001$ ) que variaron en los días de entrenamiento ( $F_{3,32} = 26.37$ ;  $p < 0.001$ ), al analizarlos posteriormente encontramos que los sujetos LD mostraron una mayor velocidad de nado en comparación con los sujetos control los días 3 y 4 ( $p < 0.005$ ) y 5 al 7 ( $p < 0.001$ ), seguidos por D que también superaron a aquellos del grupo control los días 4 al 6 ( $p < 0.005$ ). Por su parte los animales restringidos en GLD nadaron más rápido que los controles sin alcanzar la significancia. Figura 19



**Figura No.19** Valores promedio  $\pm$  ES de la velocidad de navegación a través del estudio. Los animales LD nadaron más velozmente que los controles durante todo el estudio, ( $*p < 0.05$  y  $**p < 0.01$ ), seguidos por los del grupo D ( $*p < 0.05$ ), no se apreciaron diferencias entre los grupos experimentales.

## Población neuronal regional

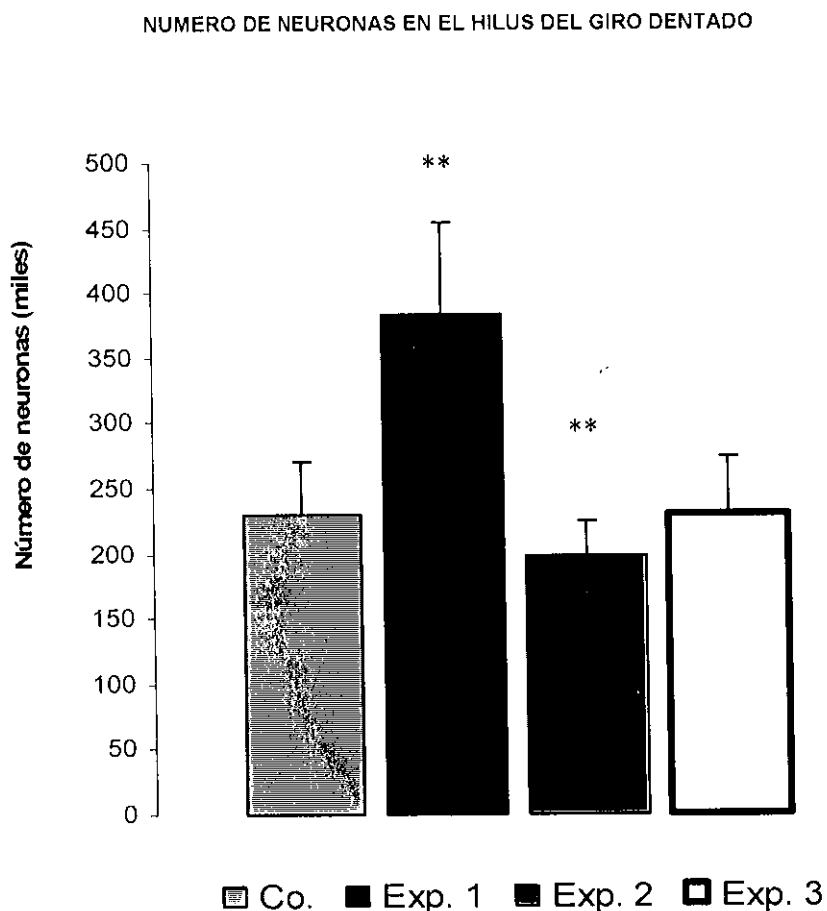
El análisis de varianza de una vía del número de neuronas en CA1 del hipocampo manifestó diferencias significativas entre los grupos ( $F_{3,12} = 32.35$   $p < 0.001$ ), el análisis posterior (Tukey) indicó que el Grupo GLD aumentó significativamente el número de neuronas respecto al control (media = 621,343 vs 511,338 del Co;  $p < 0.01$ ), el grupo GLD fue diferente respecto a los grupos D y LD ( $p < 0.01$ ). Mientras que, en los animales desnutridos a partir del nacimiento (LD) y a partir del destete (D) la restricción impuesta no tuvo efectos significativos respecto al control o entre ellos. Figura 20, imagen 1



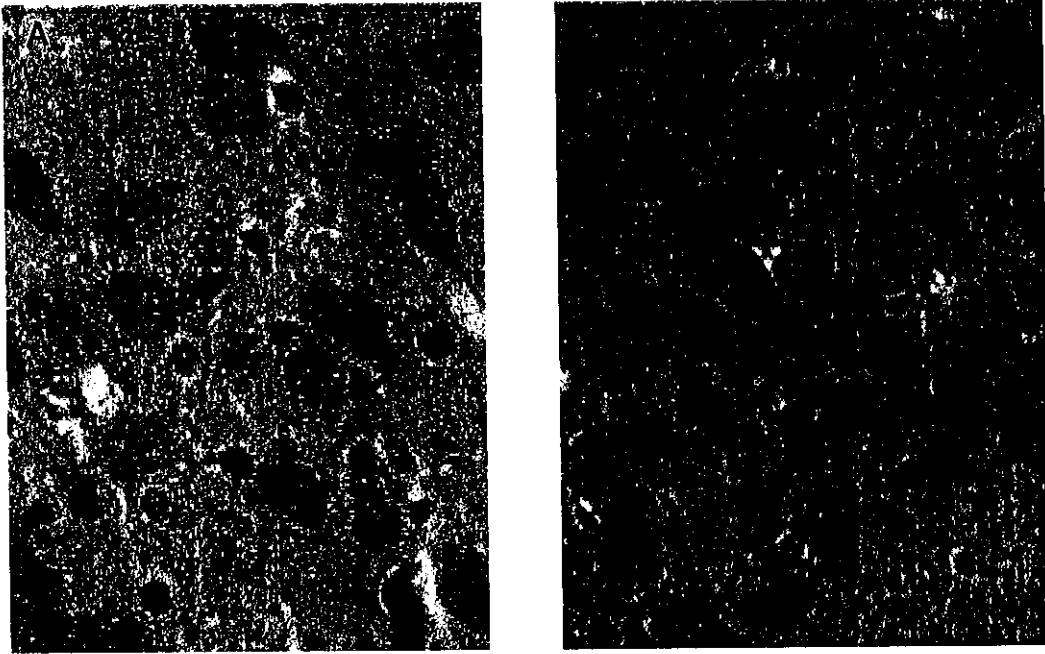
**Figura No. 20** Se muestran las medias  $\pm$  ES del número de neuronas en la zona CA1 del hipocampo. La mayor población correspondió a las ratas del grupo GLD, esta diferencia fue significativa al compararse con el grupo control (\*\*  $p < .01$ ).

El análisis de varianza del registro de la población neuronal en el hilus del giro dentado del hipocampo, reveló diferencias significativas entre los

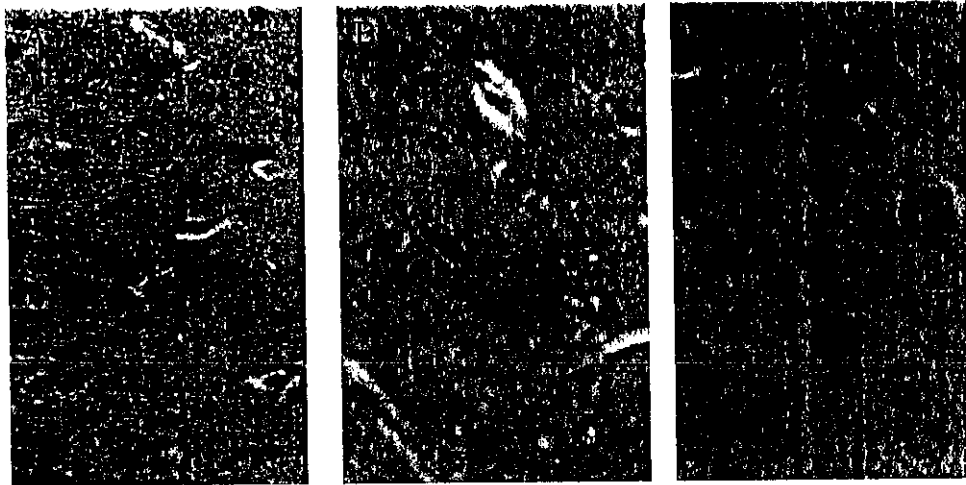
grupos ( $F_{3,12} = 181.28$   $P < 0.001$ ). El análisis posterior señalo las diferencias entre los sujetos restringidos en D, que aumentaron significativamente el número (media = 384,000) respecto al control (media = 234,700;  $p < 0.01$ ), y respecto a LD Y GLD ( $p < 0.01$ ), los LD disminuyeron significativamente el número de neuronas (media = 197,000) respecto al control ( $p < 0.01$ ), mientras que la restricción durante GLD, no produjo efectos significativos respecto al control ni a LD, pero sí respecto a D ( $p < 0.01$ ). Figura 21, imagen 2



**Figura No. 21** Promedios  $\pm$  ES del número de neuronas en el hilus del giro dentado. Los animales D mostraron el mayor número de neuronas comparados con el control (\*\* $p < .001$ ), así como a los GLD y LD. Las ratas con restricción en LD revelaron disminución significativa de la población neuronal (\*\*  $p < .001$ ).



**Imagen 1** Región de CA1 del hipocampo en - 4.30 de Bregma (40 x).  
A: Grupo CO B: Grupo GLD en el que se aprecia mayor número de neuronas.



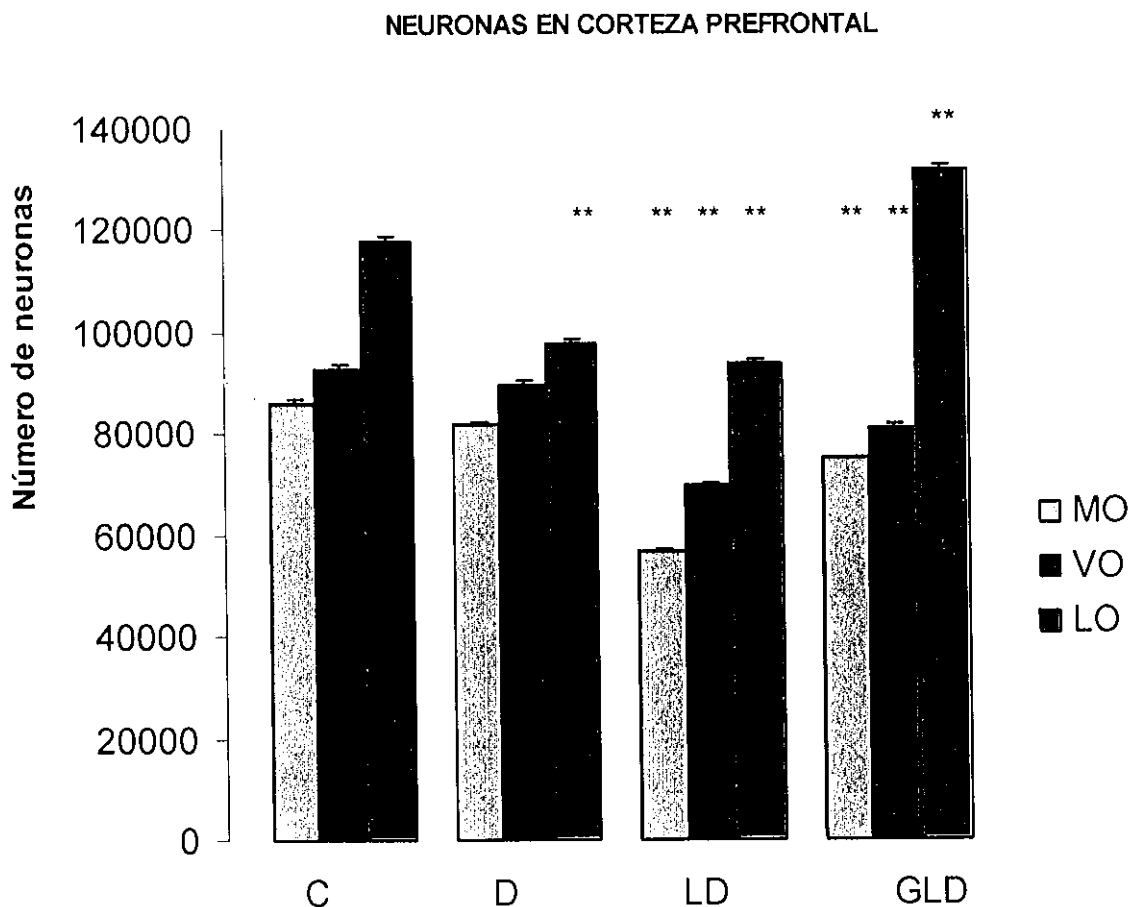
**Imagen 2** Fotografías del Hilus del hipocampo derecho en - 4.30 de Bregma (10X). A: Grupo CO B: Grupo D. C: Grupo LD. Se aprecia diferente número de neuronas en cada una.

En la corteza cerebral prefrontal se encontraron diferencias significativas en el número de neuronas entre los grupos, en las distintas regiones analizadas (MO, VO, LO). Figura 22,

El análisis de varianza del número de neuronas de la región Orbital medial (MO) mostró diferencias significativas entre grupos ( $F_{3,12} = 495.00$   $P < 0.001$ ), estas diferencias residieron entre el grupo restringido en LD con una disminución significativa del número neuronal (media = 56,700) respecto al control (media = 86,950;  $p < 0.01$ ), así como entre el grupo GLD (media = 75,747) y el control ( $p < 0.01$ ), también se apreciaron diferencias entre los grupos LD y GLD ( $p < 0.01$ ), en las ratas pertenecientes al grupo con restricción D también se observó disminuido el número de neuronas, aunque las diferencias no fueron significativas (media = 81,700) ( $p > 0.05$ ). Figura 22, imagen 3

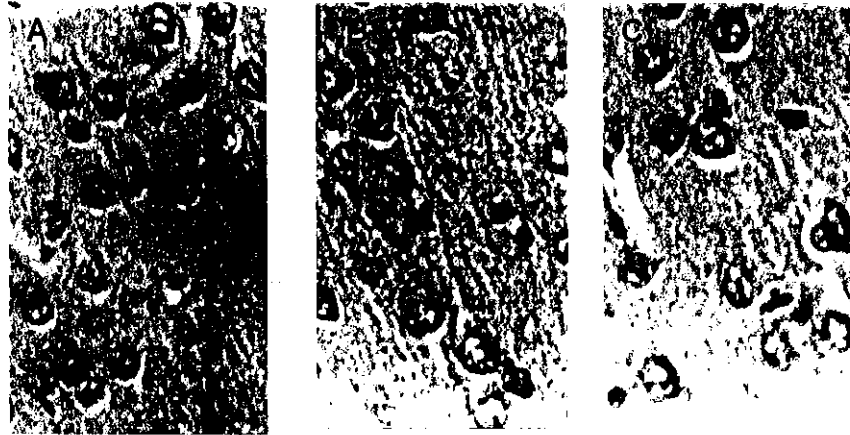
En la región orbital lateral (LO) se apreciaron diferencias significativas entre los grupos ( $F_{3,12} = 505.00$   $P < 0.001$ ), análisis posteriores revelaron un aumento significativo de neuronas de los sujetos GLD (media = 162,000), respecto al control (media = 117,900;  $p < 0.01$ ), y respecto a LD y D. Mientras que, los animales de los grupos LD (media = 93,750) y D (media = 97,900), por lo contrario; presentaron una disminución significativa del número de neuronas respecto al control y GLD. Figura 22, imagen 4

En la región orbital ventral (VO), se apreciaron diferencias significativas del número de neuronas entre los grupos ( $F_{3,12} = 199.69$   $P < 0.001$ ), análisis posteriores ubicaron las diferencias entre los sujetos GLD y los controles (media = 81,000 vs 92,700), entre los sujetos restringidos en LD y controles (media LD = 69,700), así mismo fueron diferentes los grupos D respecto a LD y GLD y LD respecto a GLD ( $p < 0.01$ ). Los animales pertenecientes al grupo D también mostraron disminución del número de neuronas, sin que esta fuera significativa al compararla con el control ( $p > 0.05$ ). Figura 22, imagen 5

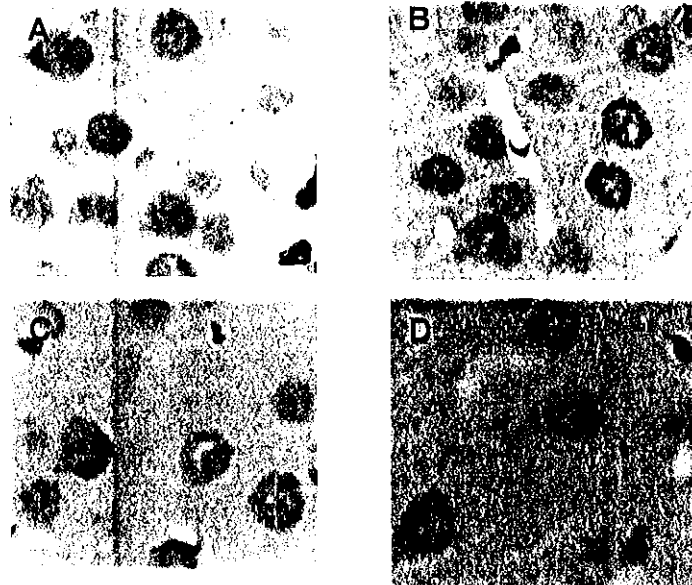


**Figura No. 22** En cada serie de 3 columnas están comprendidas las tres zonas analizadas de la corteza prefrontal promedios  $\pm$  ES de la población regional de neuronas. Los sujetos restringidos en GLD presentaron el mayor número de neuronas en la región LO (\*\*  $p < 0.01$  vs control). Los grupo GLD (\*\* $p < 0.01$ ) y LD (\*\*  $p < 0.01$ ) mostraron significativamente reducido el número de neuronas respecto al control en la zona MO. Por su parte, en VO se redujo el número de neuronas en los grupos restringidos LD (\*\* $p < 0.01$ ) y GLD (\*\* $p < 0.01$ ). En la zona LO disminuyó el número de neuronas en los grupos D y LD (\*\* $p < 0.01$ ) respecto al control.

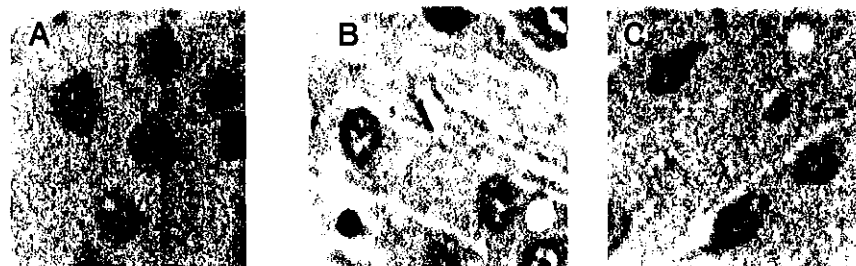




**Imagen 3** Región MO de la corteza prefrontal a 4.20 de Bregma (40X) **A:** Grupo CO. **B** Grupos GLD y **C** Grupo LD. Se aprecia diferente número de neuronas en cada una.



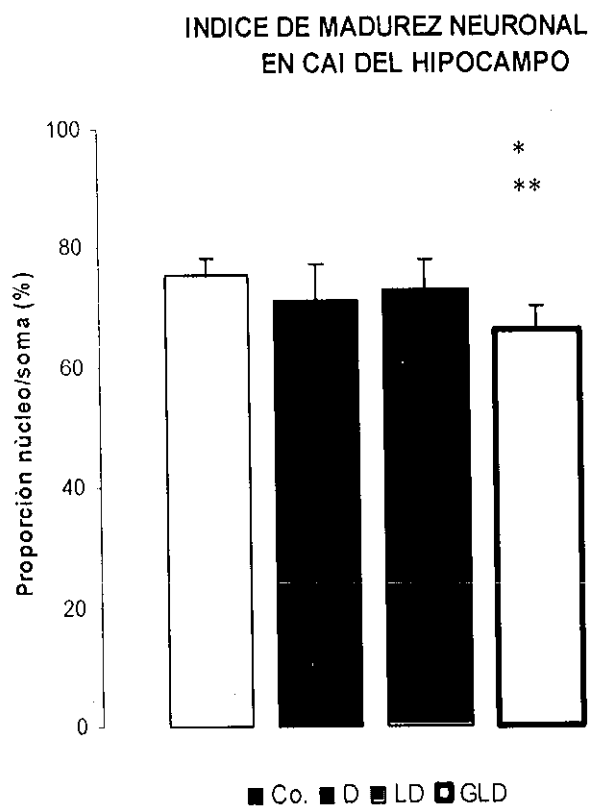
**Imagen 4** Región LO de la corteza prefrontal a 4.20 de Bregma (40X) **A:** Grupo control **B:** Grupo GLD. **C** y **D:** Grupos restringidos en LD y **D**, muestran diferente densidad de neuronas.



**Imagen 5** Región de VO de la corteza prefrontal a 4.20 de Bregma (40X) **A:** Grupo control **B** y **C:** Grupos restringidos en GLD y en LD respectivamente. Se aprecia diferente número de neuronas.

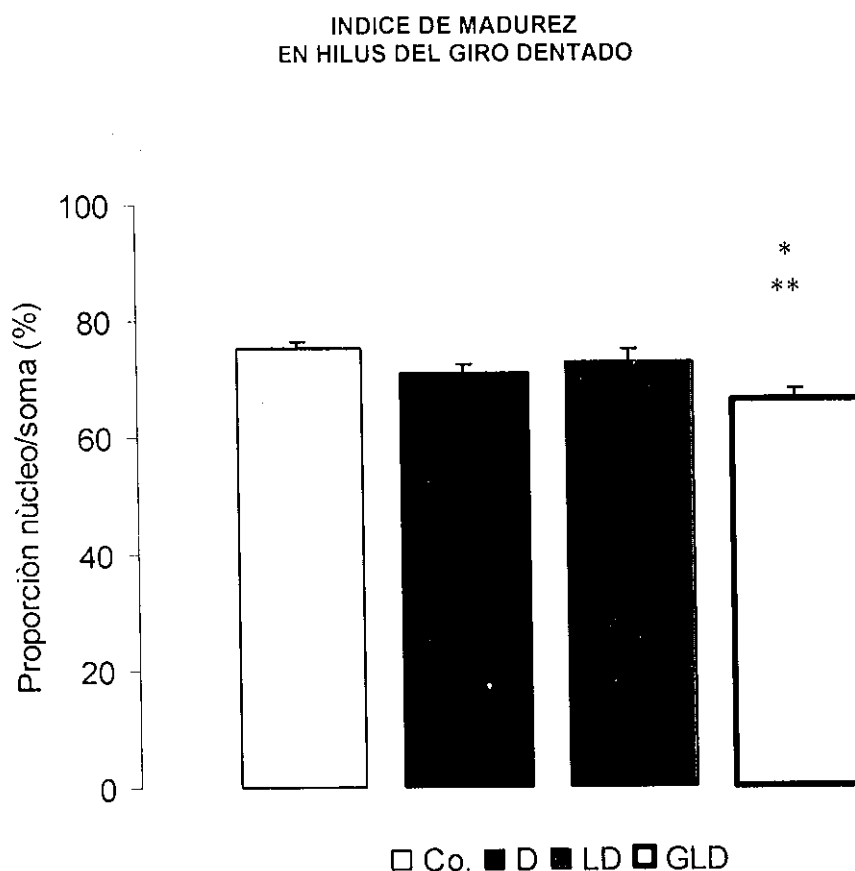
### Madurez neuronal:

Se analizaron las diferencias promedio de la proporción resultante de las áreas núcleo/soma, expresadas en porcentaje de área ocupado por el núcleo respecto al área total del soma, como indicativo del grado de madurez de las neuronas en las mismas regiones antes descritas del hipocampo y la corteza prefrontal (menor % = menor índice de madurez). El análisis de varianza (una vía) mostró diferencias significativas en la proporción núcleo/soma entre los grupos ( $F_{3,12} = 10.81$ ;  $P < 0.01$ ), el análisis de Tukey reveló que en las neuronas residentes en la zona CA1 de las ratas GLD se redujo significativamente la proporción núcleo/soma, comparadas con las ratas control ( $p < 0.01$ ), con las D ( $p < 0.05$ ) y con las LD ( $p < 0.01$ ). Mientras que LD y D no son significativamente diferentes al control ( $p > 0.05$ ). Gráfico No. 23, imagen 6



**Figura No. 23** Valores promedio  $\pm$  ES de la proporción del área núcleo/soma expresada en porcentaje del área del soma neuronal ocupado por el núcleo, respecto al área total del soma. El grupo GLD mostró el menor índice de madurez neuronal (\*\*  $p < 0.01$  y \*  $p > 0.05$ ).

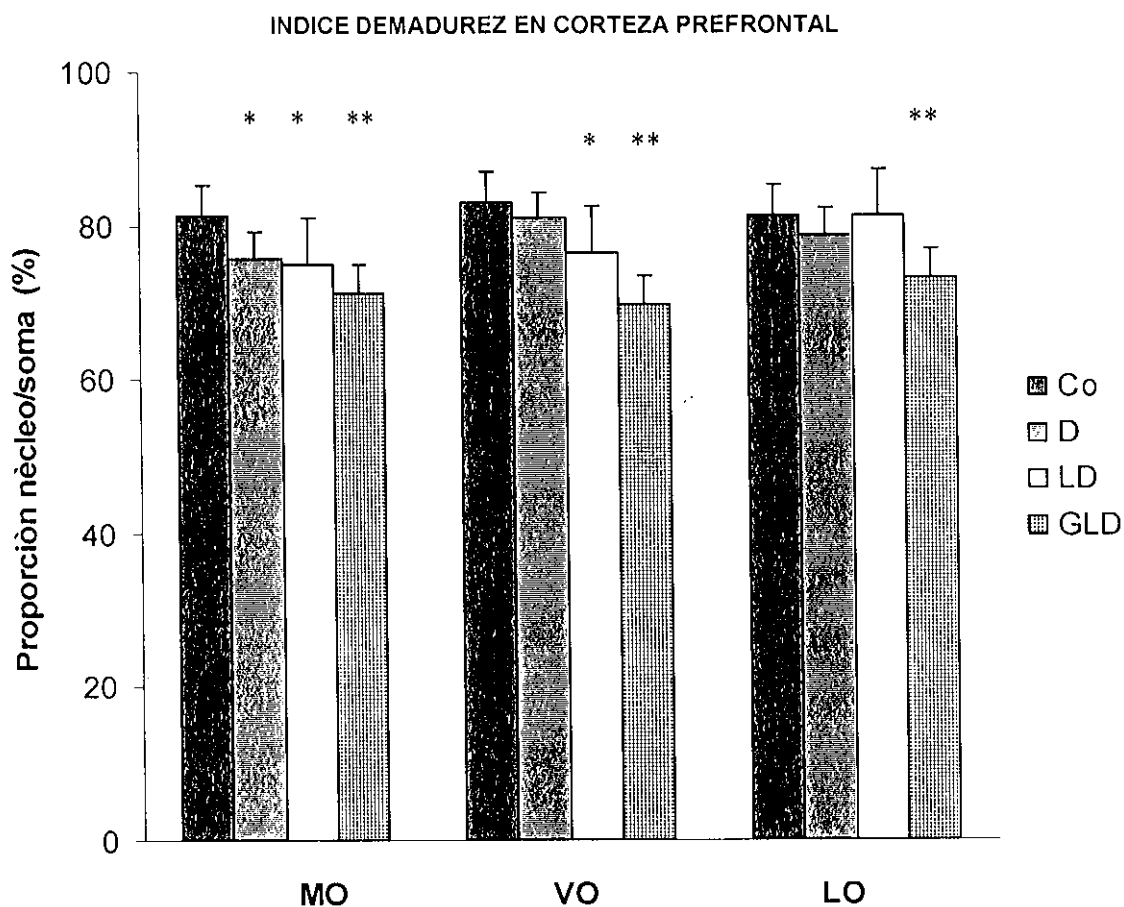
En el hilus del giro dentado se apreció un efecto similar entre los grupos ( $F_{3,12} = 10.52$   $P < 0.01$ ), el análisis posterior mostró una reducción significativa en la proporción núcleo/soma de las neuronas de esta región en los animales GLD respecto al control ( $p < 0.01$ ) y al LD ( $p < 0.05$ ), este último no fue diferente al control ni a D. Figura 24, imagen 6



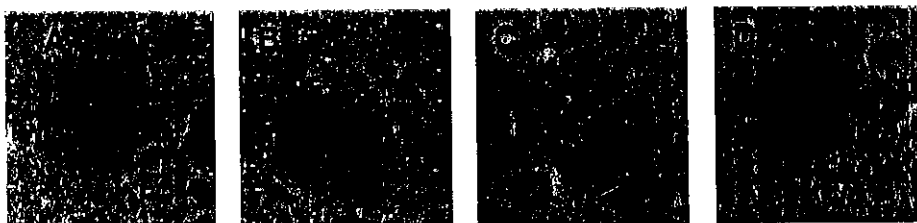
**Figura No. 24** Del análisis de este mismo parámetro, en la zona del hilus del giro dentado (hipocampo) los promedios  $\pm$  ES nuevamente reflejaron inmadurez en el grupo GLD (\*\*  $p < 0.01$  y \* $p < 0.05$ ).

Por su parte, el análisis de varianza de la proporción núcleo/soma de las neuronas de la región MO en la corteza prefrontal mostró diferencias entre los grupos ( $F_{3,12} = 12.39$ ;  $p < 0.001$ ), el análisis posterior señaló diferencias significativas en los tres grupos experimentales respecto al control, los cuales presentaron menor % de área del núcleo respecto al área del soma ( $p < 0.01$ ).

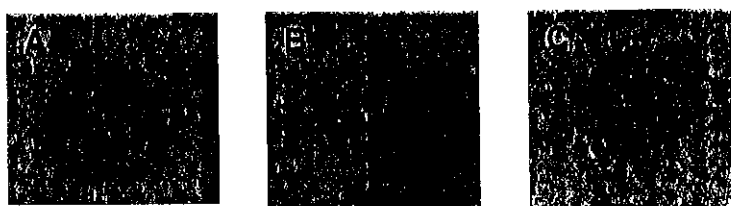
Así mismo se encontraron diferencias entre D y GLD, LD y GLD ( $p < 0.01$ ). Por su parte, en la región VO se encontraron diferencias significativas entre los grupos ( $F_{3,12} = 19.76$ ;  $p < 0.001$ ), GLD presentó el menor % respecto al control ( $p < 0.001$ ), respecto a D y a LD ( $p < 0.01$ ), LD fue significativamente menor que el control ( $p < 0.01$ ). Para la región LO, se apreciaron diferencias significativas entre los grupos ( $F_{3,12} = 19.76$ ;  $p < 0.01$ ), dadas entre el grupo GLD y el control ( $p < 0.01$ ), y entre el LD y GLD ( $p < 0.01$ ). Gráfico 25, imágenes 7, 8 y 9



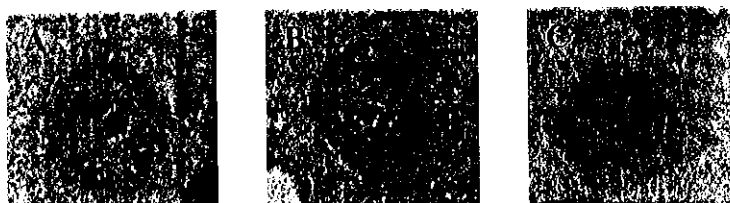
**Figura No. 25** Los valores corresponden a las medias  $\pm$  ES de la proporción del área núcleo/soma. La mayor inmadurez en las tres áreas estudiadas de la corteza prefrontal se observó en tejidos del grupo de ratas GLD, (\*\*  $p < 0.01$ ). El grupo LD presentó menor índice de madurez respecto al control en las regiones MO (\*\* $p < 0.01$ ) y VO (\*  $p < 0.05$ ), el D presentó menor índice de madurez en MO respecto al control (\*\*  $p < 0.01$ ).



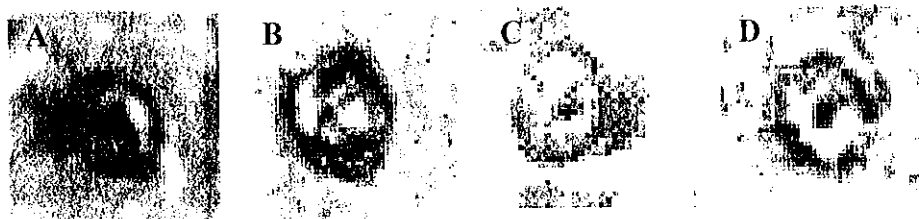
**Imagen 6** A y B: Región CA1 del hipocampo derecho en - 4.30 de Bregma (100X). A: Neuronas del grupo control. B Neuronas del grupo GLD, la proporción del área ocupada por el núcleo en relación al área del soma es menor. C y D: Fotografías del Hilus izquierdo en - 4.30 de Bregma (40X). C: Neuronas del grupo control. D Neuronas del grupo GLD, la proporción del área ocupada por el núcleo en relación al área del soma es menor.



**Imagen 7** Región VO de la corteza prefrontal a 4.20 de Bregma (100X). A: Grupo control. B y C Grupos GLD y LD



**Imagen 8** Región LO de la corteza prefrontal a 4.20 de Bregma (100X). A: Grupo control. B: Grupo GLD C: Grupo D



**Imagen 9** Región MO de la corteza prefrontal a 4.20 de Bregma (100X). A: Grupo control. B: Grupo GLD C: Grupo LD D Grupo D

## DISCUSIÓN

---

Los poli-insaturados ARA (20:4n-6) y DHA (22:6n-3) forman fosfatidilserina y fosfatidiletanolamina, entre otros fosfolípidos constituyentes de las membranas neuronales, les confieren fluidez y regulan múltiples funciones celulares. Se derivan de los ácidos grasos esenciales linoleico (18:2n-6) y linolenico (18:3n-3) respectivamente, estos dos deben ser aportados por la dieta. Su ingestión es indispensable durante el desarrollo del sistema nervioso, especialmente en la última semana de gestación y en la segunda y cuarta semanas de vida posnatal en la rata. Los efectos bioquímicos más notables debidos a la restricción lipídica se presentan cuando la dieta es deficiente en n3 o cuando contiene mayor proporción n6/n3 (Bourre, 1989).

En nuestro trabajo, la dieta control contenía ácido linoleico (n6) a  $> 1,600$  mg/100 g y ácido linolenico (n3) a  $> 400$  mg/100 g con una relación n6/n3 de 4:1, estos valores representaron un promedio de los recomendados para el desarrollo de ratas (Bourre, Piciotti, Dumont, Pascal, 1990; Bourre et al, 1993). Mientras que la dieta experimental contenía ácido linoleico a  $< 1,040$  mg/100 g y ácido linolenico a  $< 18$  mg/100 g, la relación n6/n3 fue superior a 57:1, (en la leche de las madres alimentadas con esta dieta, se encontraron 5 % molar de n6 (respecto a  $> 7\%$  molar en control) y solo trazas de n3 (1% molar en control), según confirmó el análisis cromatográfico, así que esta dieta restringió ligeramente a n6 y fue deficiente en n3, así mismo, agudizó la diferencia proporcional n6/n3 como en otros experimentos (Bourre et al, 1990). Varios reportes indican que esta deficiencia reduce el nivel de DHA y aumenta el de ARA y/o EPA en las membranas cerebrales, nosotros no lo evaluamos, pero otros investigadores lo han confirmado reiteradamente y aseguran que los efectos finalmente observados se deben a este cambio lipídico (Ikemoto et al, 2000; Bourre, 1989).

En nuestro estudio, el análisis microscópico demostró distintos efectos de la deficiencia de ácidos grasos esenciales sobre la celularidad neuronal en cada región cerebral estudiada y en las distintas etapas del desarrollo en que se instaló, lo que apoya nuestra hipótesis. Tanto el número de neuronas como el índice de madurez fueron alterados. Observamos mayor número de neuronas en CA1 del hipocampo y en la región Orbito Lateral (LO) de la corteza prefrontal tras la restricción en gestación-lactancia y después del destete (GLD), al igual que en el Hylus del Giro Dentado tras la restricción iniciada al destete (D). Por el contrario, se redujo el número de neuronas en el Hylus, tras la restricción durante la lactancia y después del destete (LD), también se redujo en LO tras restringir en LD y D, y en el grupo LD además se redujo el número en las regiones orbito ventro-mediales (VOMO).

Hasta ahora, no se han reportado efectos similares debido a la deficiencia de n6 y/o n3, los estudios realizados al respecto son escasos y distintos. Ahmad (2002) restringió el consumo de n3 por tres generaciones sin encontrar alteración del número de neuronas de CA1 ni Hylus, pero observó disminuido el tamaño del soma neuronal en hipocampo y corteza cerebral. Los resultados pueden ser distintos por el hecho de aplicar la restricción por varias generaciones, pues ya se ha demostrado que los efectos bioquímicos tisulares son distintos según la generación en que son medidos y el número de generaciones desnutridas precedentes (Bourre 1989; Clandinin y Jumpson, 1997; Wainwright, 1994), además, los métodos de conteo fueron distintos, para nuestro análisis microscópico aplicamos el método del fraccionador óptico, que según Gundersen (1988) y West (1991,1993), es más confiable y menos afectado por los procesos a los que se someten los tejidos, que otros métodos.

Para explicar nuestros resultados, podemos recurrir a varios argumentos, por una parte, está confirmado que el establecimiento prenatal y posnatal de varios sistemas de neurotransmisores en la corteza y el hipocampo regulan la organización celular de estas regiones durante el desarrollo (Kolb y Tees 1990),

por ejemplo, se ha confirmado que la inervación serotoninérgica ejerce un efecto modulador de la circuitería interna en la formación hipocampal, y que la alteración de este sistema neuroquímico afecta el patrón de organización celular y puede alterar el número final de neuronas (Kolb y Tees 1990). Así mismo, existe evidencia de que la organización estructural de las regiones mediales de la corteza prefrontal, es regulada por la interacción competitiva de las aferencias dopaminérgicas y serotoninérgicas, y se ha asegurado que la alteración prenatal de cualquiera de los dos sistemas afecta el patrón de organización neuronal cortical (Bolte, Cunningham, Benes, 1998). Ahora bien, ya se ha comprobado que la deficiencia de n3 reduce el nivel de dopamina y sus receptores en el circuito mesocorticolímbico (Kodas et al 2002; Zimmer et al 2002), y altera al sistema serotoninérgico (Delion 1996; Farkas 2002; Innis 2001). Entonces es posible que de esta manera la deficiencia de n3 altere prenatal y/o posnatalmente la organización de las poblaciones neuronales y ello se refleje en el número de neuronas, como se observó en nuestro experimento.

Más específicamente, se ha evidenciado que la deficiencia de n3 durante la gestación de la rata eleva el nivel de serotonina en los neonatos (Innis y De la Prensa 2001), por el contrario, la deficiencia aplicada posnatalmente o en la vida adulta reduce su nivel (Delion 1996); así que, la deficiencia durante la gestación puede afectar el patrón histogénico de algunas regiones de manera distinta, respecto a la deficiencia iniciada a partir del nacimiento o del destete, considerando que se presentan distintos procesos por etapa, y tardíamente continúan la neurogénesis en algunas regiones como el hilus del giro dentado y la reorganización sináptica en varias regiones (Kolb y Tees 1990), todos procesos susceptibles a la subnutrición (Morgane et al 1993).

Esto puede ayudarnos a entender las diferencias en el número de neuronas encontradas entre áreas y etapas desnutridas, sin embargo, sería determinante evaluar la neurogénesis de las regiones de interés (número total de neuronas y de neuronas "nuevas") mediante doble marcaje



inmunocitoquímico, inmediatamente después de la restricción en gestación (evaluar al nacimiento), luego de la restricción en lactancia (evaluar al destete) y luego de la restricción iniciada en el destete. Simultáneamente podrían evaluarse los niveles de neurotransmisores y sus receptores, incluso el número de neuronas dopaminérgicas y serotoninérgicas mediante inmunomarcaje específico en los mismos momentos, pero estos podrían ser los objetivos de un trabajo subsiguiente. En nuestro estudio, al evaluar a todos los sujetos hasta los 60 días de edad, apreciamos alteraciones celulares que pueden ser resultado del traslape de los procesos afectados, pero, no tenemos la evidencia precisa de lo ocurrido en cada período del desarrollo.

En la misma tónica, otros neurotransmisores parecen estar implicados, la neurogénesis fetal GABAérgica continúa en la corteza hasta los 15 días de vida posnatal (Vincent, Pebreza, Benes, 1995) y durante estos días las neuronas GABAérgicas presentan receptores para glutamato, la actividad glutamatérgica continúa aumentando hasta después del destete y regula la histogénesis GABAérgica cortical, a su vez, el sistema GABAérgico modula la migración y diferenciación de otras neuronas en la corteza (Coyle, 1982). Ahora bien, recientemente se evidenció el efecto modulador de n3 sobre la transmisión glutamatérgica (Berry, 2005), por lo que ambos sistemas neuroquímicos son susceptibles a la deficiencia lipídica y sus alteraciones pueden afectar de distinta manera la neurogénesis prenatal y/o posnatal, pero aún se requiere de investigación al respecto.

Por otra parte, el DHA es un antioxidante que acumulado en la fosfatidilserina ejerce un efecto antiapoptótico (Kim y Akbar, 2003), así que podemos esperar que la deficiencia de DHA libere de inhibición a la apoptosis y cause inicialmente una pérdida mayor de neuronas para luego dar lugar a una intensiva neurogénesis compensatoria en algunas regiones cerebrales. Este fenómeno ya ha sido observado en el giro dentado tras la deficiencia de vitamina E, que comparte con el DHA los mecanismos antiapoptóticos (Ciaroni,

Cuppini, Cecchini, Ferri, Ambrogini, Cuppini, 1999). Y también se conoce que la deficiencia de n3 retrasa el crecimiento de conos y el establecimiento de sinapsis (Innis y De la Prensa, 2001), lo cual podría modificar la supervivencia neuronal que depende en parte de las conexiones establecidas (Rakic, 1988), además, se ha confirmado una relación inversa entre la proporción de sinapsis por neurona y el número de neuronas vinculada a la desnutrición proteica en el desarrollo (Peeling y Smart, 1994), entonces es posible que la deficiencia de n3 al alterar la sinaptogénesis de lugar a una pérdida de neuronas que puede ser seguida por neurogénesis o reorganización sináptica con efectos en la citoarquitectura neuronal en algunas regiones cerebrales, o bien, por otros mecanismos compensatorios. En todo caso, se requiere de investigación específica que evalúe la muerte neuronal en las regiones propuestas y discrimine entre la alteración primaria de la neurogénesis y los cambios secundarios en respuesta a la apoptosis, .tras la deficiencia de n3 y n6.

En este estudio hemos observado que el número neuronal tras la restricción de n6-n3 difiere regionalmente, efecto que ya ha sido observado tras otros modelos de desnutrición (Lukoyanov y Andradre, 2000), tras la deprivación alimenticia disminuye el número de neuronas del giro dentado y aumenta en la corteza (Bedi, 2003), la restricción de proteínas reduce el número de neuronas en el giro dentado y en CA3 (Lukoyanov y Andradre, 2000), pero lo aumenta en la corteza occipital (Soto et al, 1999), lo que sugiere que cada región cerebral y dependiendo de su etapa exacta de histogénesis responde de manera diferente a la desnutrición.

El análisis microscópico también demostró retraso de la maduración neuronal en la mayoría de las áreas estudiadas, la deficiencia de lípidos esenciales durante todo el desarrollo retrasa la maduración en neuronas de todas las áreas analizadas, la restricción iniciada al nacimiento retrasa la maduración en MO y VO, mientras que la restricción iniciada a partir del destete solo afecta MO.

Los procesos madurativos incluyen el crecimiento de la arborización dendrítica, el establecimiento de sinapsis y la mielinización de fibras, estos fenómenos requieren una síntesis macromolecular intensa reflejada en el crecimiento somático y nuclear mientras se ajusta la proporción núcleo/soma. Durante la gestación, las neuronas grandes piramidales, establecidas y diferenciadas en capas tempranas maduran antes que las neuronas pequeñas no piramidales de las últimas capas y diferenciadas tardíamente. A partir del nacimiento la maduración se intensifica entre los días 10 a 18 independientemente de la capa cortical y el tipo celular, el crecimiento dendrítico es estimulado por las aferencias subcorticales, callosas y de varios sistemas neurotransmisores (Koolb y Tees, 1990). La sinaptogénesis es predominantemente posnatal y se intensifica en la 2ª y 3ª semana en coincidencia con el desarrollo de espinas dendríticas (Millar, 1988), así mismo se intensifica la mielinización (Kolb y Tees, 1990), y ya mencionamos que la restricción de n3 limita el crecimiento de conos axónicos, demora el crecimiento de las neuritas y el establecimiento de sinapsis, además de alterar la mielinización (Anderson 1994; Salvati, Sanchez, Campeggi, Suchanek, Breitschop, Lassman, 1996; Yeh et al, 1993). De esta manera, la susceptibilidad de estos procesos es diferente en cada etapa y los efectos sobre la maduración son distintos, por lo que evaluados al mismo día de edad posnatal, se encuentran en distintos estadios de maduración, como lo apreciamos en este trabajo.

Probablemente la deficiencia de n3 y n6 instalada durante la gestación afectó la neurogénesis intensa ocurrida la última semana, coincidiendo con el período de mayor necesidad de incorporación de n3 (Schiefermeier y Llavín, 2002), a pesar de que la madre consumió una dieta balanceada antes de la gestación, su previa acumulación de n3 en los triglicéridos corporales es movilizadas rápidamente al cambiar el contenido dietario de AAL y AL (Perona, Portillo, Macarulla, Tueros, Ruiz, 2000), además, ya se ha probado el cambio lipídico del tejido cerebral y el retraso del desarrollo al aplicar la deficiencia de n3 durante la gestación aislada (Innis y De la Prensa, 2001). Al continuar la deficiencia

posnatalmente, con seguridad se afectó el período de crecimiento rápido y luego la fase transitoria que coincide con la segunda etapa de intensa necesidad de incorporación de n3, afectando la organización neural mediada por la sinaptogénesis (Bourre 1989; Menard et al, 1998), así mismo, en la cuarta semana posnatal se afecta la incorporación lipídica de nuevo (Bourre 1989; Iritani et al 1993), coincidiendo con el destete y afectando los procesos de reorganización, maduración y la neurogénesis tardía (Morgane et al, 1993).

De este modo, la desnutrición lipídica podría retrasar la maduración neuronal de diferentes regiones en cada etapa afectada, según los procesos exactos coincidentes con la malnutrición, un efecto evidente del retraso madurativo puede relacionarse con el retraso en el crecimiento somático, dato ya reportado (Ahmad, 2002), y podría alterar las proporciones núcleo/soma. Sin embargo, es necesario considerar que aún en condiciones normales, la proporción núcleo/soma es diferente entre los distintos tipos de neuronas de la misma región cerebral y que algunas regiones como el hilus, muestran una enorme variedad de tipos neuronales (Kobl y Tees, 1990); en todo caso, nosotros promediamos las proporciones de 100 neuronas con tamaño similar (ejes mayor y menor) por región y encontramos diferencias significativas entre los grupos.

Así mismo, se asegura que la susceptibilidad y respuesta de cada región cerebral a la deficiencia de n6-n3 varía tanto como los cambios bioquímicos que provoca en sus membranas, estos corresponden a la distribución regional de ácidos grasos, que es distinta incluso en condiciones nutricias normales, en cada región, tipo celular y en grupo de fosfolípidos (Bourre, 1990). También las diferencias en el patrón histogénico de cada región cortical, la influencia de los distintos sistemas de neurotransmisores que se van estableciendo y que diseñan junto a otros factores neuroquímicos el arreglo citoarquitectónico de las diferentes regiones corticales, contribuyen a caracterizar el efecto preciso de la desnutrición sobre el número, tamaño y maduración de las neuronas de cada región en cada etapa del neurodesarrollo. Estos factores, además de la edad precisa en que se realiza el conteo y los métodos utilizados para ello,

determinan la diversidad de resultados tras este u otros modelos de desnutrición aplicados al desarrollo.

La alteración de la celularidad neuronal implica cambios organizacionales que afectan la función de las regiones analizadas, en este trabajo confirmamos el efecto asiogénico de la restricción de n6-n3, observamos que los sujetos del grupo mal nutrido en GLD presentaron un alto nivel de ansiedad evidenciado por su reducido tiempo de permanencia en los brazos abiertos; estos sujetos se mostraron renuentes a deambular por los espacios abiertos y permanecieron en el interior de los brazos cerrados los tres días de prueba. También se mostraron ansiosos en campo abierto, pues caminaron menos en los cuadros centrales; estos resultados coinciden con los resultados de otros modelos de malnutrición prenatal y posnatal (Jaiswal, 1996). El nivel de ansiedad fue similar para los sujetos malnutridos a partir del destete (D), que entraron escasamente a los brazos descubiertos. Estos resultados coinciden con reportes previos (Wainwright et al 1994; Bourre 1993), y al respecto se ha sugerido la alteración de la histogénesis hipocampal como generadora del aumento del comportamiento ansioso (Degroot 2002; Gross y Hen 2004; Menard 1998; Philip y Messier 2000). Por otro lado, se ha descrito que las fibras serotoninérgicas alcanzan la corteza el día 17 gestacional y logran la densidad del adulto a la 4ª semana posnatal, simultáneamente se sintetizan abundantes receptores a serotonina en el hipocampo. Por ello estos períodos se consideran críticos para el establecimiento de la circuitería nerviosa de la ansiedad y todo defecto en este proceso durante el desarrollo ha sido implicado en el incremento de la conducta ansiosa (Gross y Hen 2004). Ya mencionamos que la deficiencia de DHA en el desarrollo altera la transmisión serotoninérgica, lo que incrementa la ansiedad en la vida adulta (Gross y Hen 2004; Menard y Treit 1996).

Por su parte, las áreas lateral y medial de la corteza prefrontal se conectan con estructuras límbicas y cada una modula distintos aspectos del comportamiento ansioso (Lacroix et al 2000), en la organización de estas regiones

se involucran aferencias dopaminérgicas, estas alcanzan la corteza prefrontal lateral al día 15 de gestación, el día 6 posnatal ya se organizaron topográficamente en las distintas regiones prefrontales siguiendo un patrón mediodorsal y a los 60 días presentan la densidad del adulto (Kolb y Tees, 1990). Así mismo, ya comentamos la alteración del sistema dopaminérgico a causa de la deficiencia de DHA (Kodas et al, 2002; Zimmer et al, 2002), la reducción de receptores a dopamina se ha vinculado con el aumento de la ansiedad (Falzone et al, 2002).

En campo abierto, los animales restringidos en GLD mostraron menor actividad locomotora al igual que en el laberinto elevado en cruz, estos resultados confirman reportes previos de experimentos con ratas y ratones restringidos crónicamente de n-3 y/o n-6, que presentaron menor actividad locomotora y retraso en el tiempo de reacción. Se ha sugerido que el aporte insuficiente de n-3 y/o n-6 durante la gestación causa lentitud motora y pasividad en ratas y ratones (Winwraight et al, 1992). Resultados similares se han reportado bajo modelos de malnutrición proteica durante la gestación y lactancia de ratas, que mostraron actividad locomotora pobre y retraso en el desarrollo de la locomoción (Gramsbergen, 1992). Mientras tanto, los animales restringidos en LD aumentaron significativamente la actividad locomotora en campo abierto, lo que también se ha reportado tras la desnutrición proteica (Wolf, 1986). Mientras que los sujetos restringidos en D presentaron tendencia a la hiperactividad sin alcanzar la significancia. Es necesario considerar el hecho de que las ratas restringidas en GLD redujeron su actividad locomotora en ambos laberintos, lo que podría influir en la reducción de la permanencia en brazos abiertos o en el tránsito por los cuadros centrales, a diferencia de las ratas restringidas en D, que fueron muy activas en los brazos cerrados y los cuadros periféricos, pero mostraron un alto conflicto de aproximación-retirada en brazos abiertos, sin embargo este parámetro se considera indicativo de ansiedad definitivo (Aguilar, 2002; Pellow, 1985; Philip, 2000).

Sabemos que la regulación de la actividad locomotora corresponde al hipocampo (Lukoyanov y Andrade, 2000) y la corteza prefrontal, cada región en ella se especializa en la regulación de los distintos componentes de la conducta, su desarrollo varía cronológicamente y es influido por los sistemas de neurotransmisores ya mencionados; por lo que parece congruente observar diferentes efectos de la restricción de n6-n3 según el período afectado y la región evaluada, que a su vez se reflejan en diferentes alteraciones de la celularidad y sus efectos en el estado psiconeural y sus evidencias en el comportamiento.

En el laberinto Acuático de Morris, los sujetos de todos los grupos aprendieron a localizar la plataforma sumergida. Sin embargo, los animales restringidos en GLD mostraron latencias de escape mayores respecto al control, lo que concuerda con reportes previos de experimentos con ratones restringidos crónicamente de n-3 (Greiner et al, 1999). En nuestro trabajo las diferencias fueron dadas especialmente por el retraso del 2º al 4º día de prueba, que corresponden al período de adquisición; experimentos previos revelaron un retraso similar sin apreciar diferencias significativas en la latencia de escape final (Wainwright et al, 1994). Los animales restringidos en GLD mostraron conductas perseverativas, con una limitada capacidad de cambiar de estrategia, lo que se evidenció al permanecer menos tiempo en el cuadrante correcto y al nadar más tiempo en círculos antes de localizar la plataforma, estos resultados concuerdan con los reportados como efecto de la restricción de proteínas, que sugieren un defecto cognitivo con falla en la precisión de la búsqueda de la plataforma, lo cual es atribuido a anomalías hipocámpicas (Lukoyanov y Andrade, 2000), además de fallas funcionales de la corteza prefrontal que normalmente regula la capacidad de cambiar de estrategia (Ramnani, 2004). Los sujetos restringidos en LD permanecieron menos tiempo en el cuadrante correcto que los controles, sin embargo no presentaron latencias mayores, al parecer por compensar el tiempo perdido al nadar más velozmente.

Otros defectos cognitivos han sido reportados como fallas en la capacidad de retención (Rutrich, 1984), déficit de atención y mayor distractibilidad en ratas restringidas de n-3 perinatalmente (Belzung et al, 1998). Estos defectos cognitivos son atribuidos a lesiones de la corteza prefrontal. Incluso se ha sugerido la influencia del estado psiconeural sobre los procesos cognitivos, al inicio de las pruebas de aprendizaje los animales ansiosos tratan de escapar por las paredes de la piscina más que los controles; parece que no "atienden" la tarea debido a su estado emocional y eso prolonga el período de adquisición, esta conducta ya ha sido descrita en otros reportes con similares aseveraciones (Lukoyanov y Andradre, 2000). Sin embargo, aún se requiere de investigación sobre la desnutrición lipídica y sus efectos en procesos cognitivos así como sobre la interdependencia entre cognición y emoción.

Por otra parte, la memoria espacial de trabajo es dependiente de los receptores a NMDA en la corteza prefrontal dorsomedial (Kats, 1982), a su vez, el DHA modula la función de los transportadores de glutamato por lo que influye en la regulación de este sistema (Berry et al, 2005), es probable entonces, que la restricción de n3 perturbe la histogénesis prenatal y/o posnatal Glutamatérgica y esta pueden subyacer a los defectos cognitivos durante el aprendizaje espacial.

En nuestro trabajo los sujetos malnutridos durante todo el desarrollo fueron los más afectados conductual y morfológicamente, los restringidos a partir del destete presentaron ansiedad y mayor actividad locomotora con efectos morfológicos similares a los GLD, mientras que los restringidos a partir del nacimiento se mostraron muy activos, y salvo una imprecisión en la búsqueda de la plataforma, no presentaron otros efectos cognitivos o emocionales significativos, mientras que morfológicamente mostraron efectos opuestos a los presentados por los otros dos grupos. Al respecto, se ha sugerido que la cualidad y severidad de los efectos de la desnutrición aplicada durante la lactancia sobre la morfología del hipocampo y la corteza, así como



sus evidencias conductuales, dependen del estado nutricional exacto que le precede (en gestación) o que le sigue (posdestete) (Katz, 1982). En distintos experimentos se han demostrado efectos paradójicos o nulos de varias formas de desnutrición y otros factores lesivos aplicados durante la etapa de lactancia (Redy y Sastry, 1979; Subba y Subba, 1982). O bien, se han descrito períodos muy estrechos dentro de la etapa de lactancia, en los que algunas regiones y ciertos tipos de neuronas son sensibles a factores externos diversos que aumentan o disminuyen su número, estos cambios además pueden ser transitorios (Miki, 2003).

Nuestros resultados confirman que el consumo insuficiente de ácidos grasos esenciales durante el desarrollo, afecta la conducta de distinta manera, según el tiempo que permanezca la condición subnutricia y la etapa del desarrollo en que se instale, y que estos efectos se relacionan con alteraciones del número y madurez de las neuronas del hipocampo y la corteza prefrontal debidas a la alteración de los procesos neurogénicos y madurativos. Por último, en el análisis morfométrico los sujetos experimentales mostraron peso y longitud craneocaudal al nacimiento y al destete dentro de los valores normales. Estos resultados son congruentes con los reportados por otros investigadores (Iritani 1993; Hausman, 1991; Schiefermeier et al, 2002). El tamaño y peso cerebral tampoco se alteró, lo cual apoya a otros reportes (Ikemoto, 2001; Wainwright et al, 1991). Tabla 4, En torno a esto, se afirma que la reducción del aporte dietario de ácidos grasos no altera la morfología macroscópica corporal, siempre que se mantenga constante el aporte calórico total y el resto de nutrientes (Maynard, 1981), ya que la ingesta reducida de grasas activa un mecanismo compensatorio de biosíntesis de triglicéridos a partir de azúcares, los tejidos reciben ácidos grasos de cadena corta y mediana en cantidad para la construcción tisular, por lo que el volumen y peso no son alterados (Champe y Harvey, 1994).

Este trabajo presenta efectos morfológicos de la deficiencia de n3 que no habían sido reportados, corrobora efectos conductuales que le antecedieron y

ofrece expectativas sobre un interesante campo de exploración, que nos aproxima al entendimiento de las complejas interrelaciones entre los cambios bioquímicos tisulares debidos a la restricción de ácidos grasos esenciales durante el desarrollo, y sus efectos en la neurogénesis y organización neuronal manifestados como cambios en la celularidad, con las consecuentes alteraciones funcionales evidenciadas en el comportamiento. Además, confirma y amplía la noción de la diferente vulnerabilidad de las regiones cerebrales a la malnutrición en las etapas prenatal y posnatal del desarrollo, así como la posibilidad de desarrollar mecanismos compensatorios durante la lactancia que enmascaran los efectos.

Considerando la enorme similitud entre los mamíferos altriciales, que incluye al ser humano, este trabajo confirma que el contenido lipídico de la dieta de las madres durante la gestación y la lactancia, así como la dieta de los infantes y jóvenes es determinante de su desarrollo y por consiguiente de su desempeño cognitivo y su emotividad en la vida adulta. Reconociendo la necesidad de difundir esta información a la población en general y de apoyar la recomendación de aumentar el consumo de grasas de la familia omega -3, especialmente durante el desarrollo infantil.

## CONCLUSIONES

---

1.- La restricción dietaria de n6 y n3 durante el desarrollo prenatal y posnatal o solo posnatal altera el número de neuronas y retrasa su maduración de distinta manera en CA1 e Hilus del hipocampo, y en las regiones LO, VO, MO de la corteza prefrontal, según los períodos de desarrollo afectados.

2.- La restricción dietaria de n6-n3 durante todo el desarrollo aumenta el tiempo de latencia de escape en el laberinto acuático de morris, y este efecto se puede atribuir a una reducción de la precisión de la búsqueda de la plataforma relacionada con la alteración de la histogénesis del hipocampo y la corteza prefrontal.

3.- La restricción de n6-n3 afecta el estado psiconeural manifestado por aumento de ansiedad y alteración de la actividad locomotora de distinta manera en cada período del desarrollo afectado, este efecto puede deberse a la alteración de la celularidad de las regiones analizadas, que implica la alteración de la histogénesis de los sistemas serotoninérgico y dopaminérgico.

4.- Las alteraciones morfológicas de las poblaciones neuronales en CA1 e hilus del giro dentado del hipocampo y las regiones MO VO LO de la corteza prefrontal durante el desarrollo, se manifiestan en el adulto, como fallas cognitivas y alteraciones de la emotividad, difieren en dependencia del período exacto del neurodesarrollo subyacente al momento de aplicar la desnutrición y de la susceptibilidad de cada región cerebral al cambio lipídico, estos efectos podrían relacionarse con la alteración de la neurogénesis, apoptosis y organización nerviosa de las regiones analizadas, mediados a su vez, por la alteración de la histogénesis de varios sistemas neuroquímicos.

## BIBLIOGRAFÍA

---

- Aguilar, R., Gil, L., Flint, J., Gray, J. A., Dawson, G. R., Driscoll, P. (2002). Learned fear, emotional reactivity and fear of heights: a factor analytic map from a large F(2) intercross of Roman rat strains. *Brain Research Bulletin*, 57(1):17-26.
- Ahmad, A., Murthy, M., Greiner, R. S., Moriguchi, T., Salem, N. (2002). A decrease in cell size accompanies a loss of docosahexaenoate in the rat hippocampus. *Nutrition Neuroscience*, (2):103-13.
- Anderson, G. J. (1994). Developmental sensitivity of the brain to dietary n3 fatty acids. *Journal of Lipids*, 35 -1 105-11.
- Anderson, G. J., Connor, W. E., Corliss, J. D. (1990). *Docosahexaenoic acid is the preferred dietary n-3 fatty acid for the development of the brain and retina. Pediatric Research*, 27(1): p. 89-97.
- Barr, M. L., Kiernan, J. A. (1994). *El Sistema Nervioso Humano*. Ed. Harla.
- Belzung, C., Lequisquet, A. M., Barreau, S., Delion, S. (1998). Alpha linolenic acid deficiency modifies distractibility en rats during aging. *Journal of Nutrition*, 128, 9:1537-1542
- Berger, A., Mutch, D. M., Jerman, J. B., Roberts, M. A. (2002). Unravelin lipid metabolism whit microarrays: effects of arachidonate and docosahexaenoate acid and murine hepatic and hippocampal gene expression. *Genome Biology*, 3 preprint 004.1-4.54.
- Berry, C. B., Hayes, D., Murphy, A., Wessner, M., Rauen, T., McBean, G. J. (2005). Differential modulation of the glutamate transporters GLT1, GLAST and EAAC1 by docosahexaenoic acid. *Brain Research*, 1037(1-2)123-33.
- Bolte, T. J., Cunningham, M. C., Benes, F. M. (1998). Neonatal raphe lesions increase dopamine fibers in prefrontal cortex of adult rats. *Neuroreport*, (8):1811-5.

- Bourre J. M. (1989). Nature origin and role of fatty acids of the nervous system: an essential fatty acids and alpha-linolenic acid changing the structure and cerebral function. *Bulletin Academy Natural 1 Med*, 173:9 1137-1151.
- Bourre, J.M., (1992). Postnatal dietary fat influences mRNAs involved in myelination. *Developmental Neuroscience*, 14:1 61-68.
- Bourre, J. M., Bonneil, M., Clément, M., Dumont, O., Durand, G. Lafont H., et al. (1993). Function of dietary polyunsaturated fatty acids in the nervous system. *Prostaglandine Leukotriene Essential Fatty Acids*, 48:1, 5-15.
- Bourre, J. M., Dumont, O., Pascal, G., Durand, G. (1993). Dietary alpha-linolenic acid at 1.3 g/Kg maintains maximal docosahexaenoic acid concentration in brain, heart and liver of adult rats. *Journal of Nutrition*. 123(7):1313-9
- Bourre, J. M., Piciotti, O., Dumont, G., Pascal, G. D. (1990). Dietary linoleic acid and polyunsaturated fatty acids in rat brain and other organs: Minimal requirements of linoleic acid. *Lipids*. 25:465-472.
- Brewuer, J., Zhao, Z., Desmond, J., Glover, G. (1998). Making memories brain activity that predicts how well visual experience will be remembered. *Science*. 281(5380):1185-7
- Chalton, S., Vancassel, D. S., Belzung, C., Guilloteau, D., Lequisquet, A. M., Besnard, J. C., et al. (1998). Dietary fish oil affects monoaminergic neurotransmission and behavior in rats. *Journal of Nutrition*, 128(12), 2512-2519.
- Champe, P. C., Harvey, R. A. (1994). *Biochemistry*. J. B. Lippincott Company, Philadelphia. PA.
- Ciaroni, S., Cuppini, R., Cecchini, T., Ferri, P., Ambrogini, P., Cuppini, C. (1999). Neurogenesis in the adult rat dentate gyrus is enhanced by vitamin E deficiency. *Journal of Comp Neurol*, 411(3):495-502.
- Clandinin, M.T., Jumpsen, J. (1997). Fatty acid metabolism in brain in relation to development, membrane structure, and signaling. In *Handbook of*

*Essential Fatty Acid Biology*. Yehuda, S., Mostofsky, D. I., Eds. Humana Press, Totowa, N.J. 15;-65.

Connor, W. E., Neuringer, M. (1988) The effects of n-3 fatty acid deficiency and repletion upon the fatty acid composition and function of the brain and retina. *Prog Clin Biol*, 282:275-94.

Connor, S. L., Zhu, N., Anderson, G. J., et al. (2000). Cheek cell phospholipids in human infants: a marker of docosahexaenoic and arachidonic acids in the diet, plasma, and red blood cells. *American Journal of Clinical Nutrition*, 71 :21 –27.

Coyle, J. T. (1982). Development of neurotransmitters in the neocortex. *Neurosci Research Bulletin*, 20:479-491.

Crawford, M. (2000). Placental delivery of arachidonic and docosahexaenoic acids: implications for the lipid nutrition of preterm infants. *American Journal of Clinical Nutrition*, 71(1 Suppl): p. 275S-84.

Dagach, R. U., Mena, P. (1995). Nutritional role of omega-3fatty acids during the perinatal period. *Clinical Perinatology*. (1):157-75. 1995).

Degroot, A., Treit, D. (2002). Dorsal and ventral hippocampal cholinergic systems modulate anxiety in the plus-maze and shock-probe tests. *Brain Research*, 949(1-2):60-70.

Delatour, B., Witter, M. P. (2002). Projections from the parahippocampal region to the prefrontal cortex in the rat: evidence of multiple pathways. *European Journal of Neuroscience*, (8):1400-7.

Delion, S., Chalon, S., Guilloteau, D. (1996). Alpha linolenic acid dietary deficiency Alters age related changes of dopaminergic and serotonergic neurotransmission in the rat frontal cortex. *Journal of Neurochemistry*, 66:1582-1591.

Dewille, J. W., Farmer, S. J. (1992). Postnatal dietary fat influences m.RNA involved in myelination. *Development Neuroscience*, 14:1, 61-80

- Dobbing, J., Hopewell, J. W., Lynch, A. (1971). Vulnerability of developing brain. VII. Permanent deficit of neurons in cerebral and cerebellar cortex following early mild undernutrition. *Experimental Neurology*, 32:439-47.
- Eichenbaum, H., Otto, T., Cohem, N. J. (1993). *Two component functions of the hippocampal memory system*. Cambridge University Press.
- FAO (1994). *Expert Consultation on Fats and Oils in Human Nutrition*. Rome, Italy: Food and Agriculture Organization of the United Nations and the World Health Organization.
- Farkas, E., De Wilde, M.C., Kiliaan, A.J., Meijer, J., Keijser, J.N., Luiten, P.G. (2002). Dietary long chain PUFAs differentially affect hippocampal muscarinic 1 and serotonergic 1A receptors in experimental cerebral hypoperfusion. *Brain Research*, Nov 1;954(1):32-41
- Favreliere, S., Barrier, L., Durand, G., Chalion, S., Tallineau, C. (1989): Chronic dietary n-3 polyunsaturated fatty acids deficiency affects the acid composition of plasmeneylethanolamine and phosphatidylethanolamine differently in rat frontal cortex, striatum and cerebellum. *Lipids*, 33:401-407.
- Frances, H., Drai, P., Smirnova, M., Debray, I.M., Bourre, J.M. (2000). Nutritional (n-3) polyunsaturated fatty acids influence the behavioral responses to positive events in mice. *Neuroscience*, 285:223-227.
- Gamoh, S. M., Hashimoto, K. M., Shadat, H. N, Hata, Y. Misawa, S., Masumura, Y. (1999). Chronic administration of docosahexaenoic acid improves reference memory-related learning ability in young rats. *Neuroscience*, 93:237-241.
- Gramsbergen, A., Westerga, J. (1992) Locomotor development in the undernourished rat. *Behavioral Brain Research*, 48(1):57-64
- Green, P., Yavin, E. (1993). Elongation, desaturation, and esterification of essential fatty acids by fetal rat brain in vivo. *Journal of Lipid Research*, 34:2099-2107.

- Green, P., Yavín, E., (1998) Mechanisms of DHA acid accretion in the fetal brain. *Neuroscience*, 15:52(2):129-36.
- Greiner, R. S., Moriguchi, T., Hulton, A., Slotnick, B. M., Salem, N. (1999). Rats with low levels of brain DHA acid show impaired performance in olfactory-based and spatial learning tasks. *Lipids*, 34:S239-43.
- Groenewegen, H. J., (1988). Organization of the afferent connections of the mediodorsal thalamic nucleus in the rat, related to the mediodorsal-prefrontal topography. *Neuroscience*, (2)379-431.
- Gross C, Hen R. (2004). Genetic and environmental factors interact to influence anxiety. *Neurotox Research*. 6(6):493-501.
- Gundersen, H. J., Bagger, P., Bendtsen, T. F., Evans, S. M., Korbo, L., Marcussen, N. (1988). The new stereological tools. Disector, fractionator, nucleator and point sampled intercepts and their use in pathological research and diagnostics. *Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica*, 96, 857-881.
- Hausman, D. B., McCloskey, H. M., Martin, R. J. (1991). Maternal dietary fat type influences the growth and fatty acid composition of newborn and weaning rats. *Journal of Nutrition*, Dec; 121(12):1917-23.
- Ikemoto, A., Nitta, A., Furukawa, S., Ohishi, M., Nakamura, A., Fuji, Y. (2000). Dietary n-3 fatty acid deficiency decreases nerve growth factor content in rat hippocampus. *Neuroscience Letters*, 12;285(2):99-102.
- Ikemoto, A., Ohishi, M., Sato, Y., Hata, N., Misawa, Y., Fuji, Y. et al. (2001). Reversibility of n-3 fatty acid deficiency-induced alterations of learning behavior in the rat: level of n-6 fatty acids as another critical factor. *Journal of Lipid Research*. 1655-1663.
- Innis, S. M., De la Prensa, O.S. (2001). Dietary fatty acid composition in pregnancy alters neurite membrane fatty acids and dopamine in newborn rat brain. *Journal of Nutrition*, 131(1):118-22.
- Iritani, N., Matsumura, Y., Fukuda, H. (1993). Growth and essential fatty acid levels of plasma and liver of suckling rats from mothers fed on fat-free or various fat diets. *Journal of Nutrition, Sci Vitaminol*,. 39 (3):243-52.



- Jaiswal, A. K., Upadhyay, S. N., Satyan, K. S., Bhattacharya, S. K. (1996). Behavioural effects of prenatal and postnatal undernutrition in rats. *Indian Journal Experimental Biology*, 34(12):1216-9.
- Jensen, M. M., Skarsfeldt, T., Hoy, C. E. (1996). Correlation between level of n-3 in brain phospholipids and learning ability in rats. *Biochemical and Biophysical Acta*, May 20, 1300:3203-9.
- Kandel, E., Jessell, T. M., Scharz, J. H. (1997). *Neurociencia y Conducta*. 7. Ed. Prentice Hall.
- Katz, H. B., Davies, C. A., Dobbing, J. (1982). Effects of undernutrition at different ages early in life and later environmental complexity on parameters of the cerebrum and hippocampus in rats. *J Nutr.* 112(7):1362-8
- Kelley, A. E. (1993). Locomotor activity and exploration in Behavioral Neuroscience. *A Practical Approach*. A. Shaghal, Ed. IRL. Press, Oxford. 2:1-21.
- Kim, H. Y., Akbar, M., Lau, A. (2003). Effects of Docosapentaenoic acid on neuronal apoptosis. *Lipids*, Apr;38(4):453-7.
- Kodas, E., Vancassel, S., Lejeune, B., Guilloteau, D., Chalon, S. (2002). Reversibility of n-3 fatty acid deficiency induced changes in dopaminergic neurotransmission in rats: Critical role of developmental stage. *Journal of Lipid Research*, 1209/1219.
- Kolb, B., Tees, R. C. (1990). *The cerebral cortex of the rat*. Massachusetts. Institute of Tecnology.
- Kuresh, A.Y., Martin, A., Joseph, J. A. (2000). Essential fatty acids and the brain: possible health implications. *Journal of Neuroscience* 18:383-399.

- Lacroix, L., Spinelli, S., Heidbreder, C. A., Feldon, J. (2000). Differential role of the medial and lateral prefrontal cortices in fear and anxiety. *Behavioural Neurosciences*, 114 (6):1119-30.
- Larquè, E., Samora, S., Gif, A. (2000). Dietary fatty acids affect the essential fatty acid concentration of rat Milk. *Journal of Nutrition*, 130:847-851.
- Lapillone, A., Claarke, S.D., Heird, W. C. (2004). Polyunsaturated fatty acids and gene expression. *Neuroreport*, Vol. 7 (2) 151-156.
- Lowry, R. R., Tinsley, I, J. (1966). Oleic and linoleic acid interaction in polyunsaturated fatty acid metabolism in the rat. *Journal of Nutrition*, . 88:26-32.
- Lukoyanov, N. V., Andrade, J.P.(2000). Behavioral effects of protein deprivation and rehabilitation in adult rats : relevance to morphological alterations in the hippocampal formation. *Behavioural Brain Research*, 112 85-97.
- Lutz, M. (1998). Diets as a determinant of central nervous system Development :role of essential fatty acids. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 48(1):29-34.
- Mather, I. H., Keenan, T. W. (1998). Origin and secretion of milk lipids. *Journal of mammary Gland Biology and Neoplasia*, 3:259-274.
- Menard, C. R., Goodman, K. J., Corso, T. N., Brenna, J.T., Cunnane, S.C. (1998). Recycling of carbon into lipids synthesized de novo is a quantitatively important pathway of alpha-linolenate utilization in the developing rat brain. *Journal of Neurochemistry*, 71(5):2151-8.
- Menard, J., Treit, D. (1998). The septum and the hippocampus differentially mediate anxiolytic effects of R(+)-8-OH-DPAT. *Behavioural Pharmacology*,(2):93-101.
- Miki, T., Harris, S. J., Wilce, P.A., Takeuchi, Y., Bedi, K. S. (2003). Effects of alcohol exposure during early life on neuron numbers in the rat hippocampus. I. Hilus neurons and granule cells. *Hippocampus*. 13(3):388-98.

- Morgane, P. J., Austin, L.F., Brinzino, J., Tonkiss J., Díaz C. S., Cintra, et al. (1993). Prenatal malnutrition and development of the brain. *Neuroscience. Behavioural Reviews*. 17:91-128.
- Morris, R.M. (1984). Development of water-maze procedure for study spatial learning in the rat. *Journal of Neuroscience Methods*, 11:47-60.
- Morris, R. M., Schenk, F., Jarrand, L. (1990). Ibotenate lesions of the hippocampus and / or subiculum. *European journal of Neuroscience*. 2, 1016-1028.
- Murray, R.K., Peter, A. M., Daryl, K., Granner, Rodwell, W. (1997). Bioquímica de Harper. (14ªed.). Manual Moderno.
- Navarro, G. J. (1993). Aprendizaje y Memoria Humana. McGraw Hill.
- Paxinos, G., Watson, C. (1986). The rat brain in stereotaxic coordinates. (2da ed.). *Academic Press*, New York.
- Peeling, A.N., Smart, J. L. (1994). Successful prediction of immediate effects of undernutrition throughout the brain growth spurt on capillarity and synapse-to-neuron ratio of cerebral cortex in rats. *Metabolic Brain Disease*, (1):81-95.
- Pellow, S., Chopin, P., File, S., Briley, M. (1985). Validation of open closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat *Journal of Neuroscience Methods*, 14:149.
- Perona, J. S., Portillo, M. P., Macarulla, M., Tueros, A. I., Ruiz, G. V. (2000). Influence of different dietary fats on triacylglycerol deposition in rat adipose tissue. *Journal of Nutrition*, 84(5):765-74.
- Philip, M. W., Messier, C. (2000). Ethological confirmatory factor analysis of anxiety-like behaviour in the murine elevated plus-maze. *Journal of Neuroscience Methods*, 114:199-212.

- Pudelkewuiez, C. J., Seuffert, R., Colman, T. (1968). Requirements of female rat for linoleic and linolenic acids. *Journal of Nutrition*, 94:138-146.
- Rakic, P. (1992). *La memoria funcional y la mente*. Investigación y Ciencia 1-69-75.
- Ramnani, N., Owen, A.M. (2004). Anterior prefrontal cortex: insights into function from anatomy and neuroimaging. *Nature Reviews Neuroscience*, 5,184-194.
- Ramos, A., Berton, O., Mormede, P., Chaouloff, F. (1997). A multiple-test study of anxiety-related behaviours in six inbred rat strains. *Behavioural Brain Research*, 85(1):57-69.
- Reddy, P.V., Sastry, P.S. (1979). Studies on neurotransmitter-stimulated phospholipids metabolism with cerebral tissue suspensions: a possible biochemical correlate of sinaptogenesis in normal and undernourished rats. *Brain Res.* 168(2):287-98.
- Rodgers, R., Dalvi, A. (1997). Anxiety, defense and the elevated plus-maze. *Neuroscience Behavioural Reviews*. 21(6) :801-10.
- Rosenzweig, M. R., Leiman, A. I. (1995). *Psicología Fisiológica*. Mc. Graw Hill
- Ruthrich, H.L., Hoffmann, P., Marthies, H., Forster, W. (1984). Perinatal linoleate deprivation impairs learning and memory in adult rats. *Behavioural Neural Biology*, 40(2):205-12.
- Salem, N. (1989). Omega-3 fatty acids: molecular and biochemical aspects. In *New Protective Roles of Selected Nutrients in Human Nutrition* G. Spiller and J. Scala, Eds. Alan R. Liss, Press. New York.
- Salvati, S., Sanchez, M., Campeggi, L. M., Suchanek, G., Breitschop, H., Lassman, H. (1996). Accelerated myelinogenesis by dietary lipids in rat brain. *Journal of Neurochemistry*, 67(4):1744-50.

Saste, M. D., Carver, J. D., Stockar, J. E., Benford, V. J., Chen, L. T., Phelps, C. P. (1998). Maternal diet fatty acid composition affects neurodevelopment in rat pups. *Journal of Nutrition*, 128(4):740-3.

Schiefermeier, M.; Llavín, E. (2002). N-3 Deficient and docosahesahenoic acid-enriched diets during critical periods of the developing prenatal rat brain. *Lipid Research*, 43(1):124-31.

Silvers, K.M., Scott, K.M. (2002). Fish consumption and self-reported physical and mental health status. *Public Health Nutr.* 5:427-431.

Simopolous, A.P. (2001). Evolutionary aspects of diet and essential fatty acids. *World Research Nutrition Diet*, 88:18-27.

Smith, L.L., Haddad. (2000). Overcoming Child Malnutrition in Developing Countries: Past Achievements and Future Choices. *Food, Agriculture and Environment Discussion Paper 30*. Washington, D.C: International Food Policy Research.

Stevens, L. J., Zentall, S. S., Deck, J. L., Abate, M. L., Watkins, B. A., Lipp, S. R. (1995). Essential fatty acid metabolism in boys with attention-deficit hiperactivity disorder. *American Journal of Clinical Nutrition*, 761-8.

Stordy, B. J. (2000). Dark adaptation, motor skills, docosahexaenoic acid, and dyslexia. *American Journal of Clinical Nutrition*, 71(1 Suppl):323S-6.

Subba, R. K. V., Subba, R. K. (1982). Differential effects of early undernutrition in white and grey matter regions of rat brain. *J Neurosci Res.* 7(3):279-87.

Treit, D. (1994). Animal models of anxiety and anxiolytic drug action. En *Handbook of depression and anxiety*. Boer J., Sitzen A. Eds. New York, Mercel Dekker. Inc.

UNICEF. (1993). Epidemiological evidence for a potentiating effect of malnutrition on child mortality. *American Journal of Public Health*, 83.

- Uylings, H. B., & van Eden, C. G. (1990). Qualitative and quantitative comparison of the prefrontal cortex in rat and in primates, including humans. *Progress in Brain Research*, 85, 31-62.
- Vincent, S. L., Pebreza, L., Benes, F. M. (1995). Postnatal maturation of GABA-immunoreactive neurons of rat medial prefrontal cortex. *Journal of Comparative Neurology*, 355(1):81-92.
- Voss, A., Reinhart, M., Sankarappa, S., Sprecher, H. (1991). The metabolism of n-3, n-6 fatty acid in the rat. *Journal of Biological Chemistry*, 266: 1995-2000.
- Wainwright, P. E., Huang, Y. S., Bulman, F.B., Mills, D.E., Redden, P., McCutcheon, D. (1991). The role of n-3 essential fatty acids in brain and behavioral development: A cross-fostering study in the mouse. *Lipids*, 26, 37- 45.
- Wainwright, P.E., Huang, Y. S., Coscina, D. V., Lévesque, S., McCutcheon, D. (1994). Brain and behavioral effects of dietary n-3 deficiency in mice. *Developmental Psychobiology*, 7467-78.
- West, M. J., Slomianka, L., Gundersen, H. J. (1991). Unbiased stereological estimation of the total number of neurons in the subdivisions of the rat hippocampus using the optical fractionator. *Anatomy Research* 231(4):482-97.
- West, M. J., (1993). New stereological methods for counting neurons. *Neurobiology*, 14,275-285.
- Yamamoto, N., Hashimoto, A., Moriuchi, A., Takemoto, Y., Okuyama, H., Nomura, M. et al. (1988). Effect of the dietary  $\alpha$ -linolenate/linoleate balance on lipid compositions and learning ability of rats. II. Discrimination process, extinction process, and glycolipid compositions. *Journal of Lipid Research*, 29:1013-1021.
- Yamamoto, N., Okaniwa, Y., Mori, S., Nombra, M., Okuyama, H. (1999). Effects of high-linoleate and alpha linoleate diet on learning ability of rats aged. *Journal of Gerontology (n.d.)*.

- Yehuda, S., Ravinovitz, S., Carasso, R. L., Montofsky, D. I. (1998). Modulation of learning and neuronal membrane composition in the rat by essential fatty acid preparation: time course analysis. *Neurochemistry Research*, 23:5627-34.
- Yeh, Y. Y., Gehman, M. F., Yeh, S. M. (1993). Maternal dietary fish oil enriches DHA levels in brain subcellular fractions of offspring. *Journal of Neuroscience*, 13(2):218-26.
- Yeh, Y. Y., Yeh, S. M., Lien, E. L. (1998). Modification of milk formula to enhance accretion of long-chain n-6 and n-3 polyunsaturated fatty acids in artificially reared infant rats. *Lipids*, 33(5):513-20.
- Zimmer, L., Vancassel, S., Cantagrel, S. (2002). The dopamine mesocorticolimbic pathway is affected by deficiency in n-3 polyunsaturated fatty acids. *American Journal of Clinical Nutrition*, 75:662-667.