

EFFECTOS DEL ENRIQUECIMIENTO AMBIENTAL TEMPRANO Y DEL NIVEL NUTRICIONAL DURANTE LA CITODIFERENCIACION NEOCORTICAL DE LA RATA

Luis Adaro A. (MV), Víctor Fernández H. (CD), Jorge Palavicino V. (PE).

EFFECTS OF THE EARLY ENVIRONMENTAL ENRICHMENT AND THE NUTRITIONAL STATUS DURING THE NEOCORTICAL CITODIFFERENTIATION OF THE RAT

The effects of two macroenvironmental conditions on the morphological development of three levels of mother-infant inter-relations were studied during the lactation period of the rat "brain growth spurt" (1st - 18th postnatal days). Gross anatomical modifications were observed in body weight and size. The second order segments were the most numerous neuronal appendices in all experimental groups. Our results indicate that macroenvironmental stimulation increases significantly the dichotomous response of basilar dendrites in the large pyramids of layer V of the somatosensory cortex (1st - 4th order segments in the control and large litters, 3rd and 4th order branches in the small litters). The gestation of fifth and sixth order branches found in the small litters appears to be related to improved nutritional-microenvironmental interactions.

La existencia de períodos críticos y/o vulnerables del desarrollo encefálico, fue inicialmente descrita por Dobbing y su grupo de trabajo en la Universidad de Manchester (1972), como una necesidad de estudiar el período de la génesis cerebral que es más afectado por la desnutrición. Si bien es cierto, este concepto se describió, en un principio, en relación al problema nutricional, en la actualidad se reconoce que la estructuración normal del sistema nervioso, a pesar de estar programada genéticamente, es afectada, además de la desnutrición, por numerosos factores. Los efectos de cada uno de ellos son más evidentes cuando actúan en determinados períodos de la ontogenia encefálica. Ejemplos de ello lo constituyen el virus de la rubéola y el alcoholismo, cuyas acciones son marcadamente deletéreas durante el primer trimestre del embarazo (período crítico para estas noxas). Sin embargo, se ha observado que sus efectos son de menor magni-

tud cuando interfieren el desarrollo en etapas más avanzadas de la génesis neural.

En el caso particular de la desnutrición, se ha visto que ella puede alterar el desarrollo pre y postnatal, pero sus efectos son marcadamente acentuados si actúa durante el período de rápido crecimiento encefálico, etapa que en la rata corresponde a los primeros estados de la citodiferenciación celular que en este caso es postnatal (Cordero, 1976). Los eventos que toman lugar en esta última fase conducen a la arborización de las neuronas, al rebrote de sus espinas dendríticas y, por lo tanto, al establecimiento de conexiones sinápticas (Salas, 1978). Esta posibilidad de desarrollo intensivo, en un intervalo de tiempo muy breve, es privativa de la etapa de la lactancia exclusiva de la rata. Ella es coincidente, además, con el período de máxima entrega de estímulos por parte de la madre hacia sus crías. Estas circunstancias hacen que esta fase morfogénica se considere como un estado muy crítico, no sólo frente a la acción de agentes negativos sino que también frente a condiciones más favorables, como son los niveles de enriquecimiento del macro y microambiente (Adaro, 1986).

Numerosos investigadores han demostrado que la estimulación precoz en animales de experimentación, especialmente ratas, provoca modificaciones importantes en el espesor cortical y en la capacidad de aprendizaje (Rosenzweig y Cols., 1972).

Departamento de Ciencias Biológicas Animales.
Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias.
Universidad de Chile. Casilla 2, Correo 15.
Santiago, Chile.

Departamento de Fisiología y Biofísica.
Facultad de Medicina.
Universidad de Chile, Casilla 70055.
Santiago-7, Chile.

Financiado por Proyectos: B-2675-8715 DIB Universidad de Chile y CONICYT-FONDECYT 0580, 1987.

Por otra parte, se ha observado que la privación de estímulos ambientales y/o sociales en diferentes especies tales como ratas (Griffiths, 1961), pollos (Padilla, 1935) y primates (Harlow, 1962), puede provocar posteriormente importantes deficiencias de la conducta emocional y de las capacidades de aprendizaje. En el caso específico del hombre se ha observado que un nivel de estimulación adecuado, en las primeras etapas del desarrollo neurológico, se traduce en una mejoría notable del coeficiente intelectual (Winick, 1975). Es importante además, destacar que en todos los modelos en que se desnute a los animales de experimentación, se provocan alteraciones en la organización social del grupo y en la entrega de estímulos sensoriales (Workshop on Malnutrition, 1986).

Las experiencias realizadas durante el período vulnerable del crecimiento cerebral han permitido conocer la plasticidad del sistema nervioso. En este sentido, se ha observado que el sistema se organiza de acuerdo a las condiciones nutricio-ambientales imperantes. Esta propiedad es de vital importancia, especialmente porque al entregar estímulos en forma adecuada, se prepara el sustrato neurológico que será responsable de las respuestas que darán los sujetos posteriormente ("terreno apto"). La entrega de estímulos luminosos, olfatorios, táctiles, etc. durante el primer mes de vida, en el caso del perro, facilitará los procesos de entrenamiento que se realizarán más tarde, con el objeto de que el animal cumpla funciones específicas en su vida adulta (Beaver, 1982).

En el presente trabajo fundamentalmente se analizan los efectos del macroambiente sobre el desarrollo de la corteza cerebral, en ratas sometidas al modelo experimental de manejo del tamaño de la camada. Esta metodología involucra además la presencia de efectos nutricionales por incremento o disminución de la ingesta láctea. El objetivo principal de este estudio es conocer los efectos que tiene el enriquecimiento ambiental sobre la citodiferenciación de los procesos dendríticos basales.

MATERIAL Y METODOS

Se utilizaron 107 ratas albinas de la cepa Sprague-Dawley, provenientes de 14 hembras emparentadas entre sí, con el objeto de efectuar mediciones del desarrollo corporal (peso y longitud). Los encéfalos de 74 individuos fueron procesados para realizar estudios de citoarquitectura y 33 de ellos se fijaron y tiñeron siguiendo el método de Golgi-Cox-Sholl. Algunos encéfalos, que presentaban neuronas en óptimo estado de impregnación, fueron analizadas morfológicamente. En este caso particular se evaluó la dicotomía del árbol dendrítico, con el

objeto de verificar diferencias estructurales determinadas por efectos ambientales.

Inmediatamente después del parto se formaron tres grupos experimentales, cada uno de ellos con niveles de nutrición determinados por el tamaño de la camada (Dobbing, 1972). Los grupos se identificaron como sobredimensionado, estándar y reducido, con 13, 8 y 4 individuos por camada respectivamente. El 50% de las camadas de cada grupo se mantuvo en un hábitat enriquecido y el porcentaje restante en un macroambiente privado (Hebb, 1949). La diferencia macroambiental fue dada por una serie de factores, entre los cuales se deben considerar los diversos grados de: luminosidad, estrés, contaminantes ambientales y manejo de las ratas.

Las crías permanecieron con sus madres por un período de 18 días, al término del cual fueron pesadas, medidas y sacrificadas por decapitación, extrayéndose los encéfalos para ser procesados histológicamente. Los cerebros seleccionados fueron fijados y teñidos a través del método de Golgi-Cox-Sholl, que permite identificar, con gran precisión, cuerpos neuronales y ramas dendríticas. Por cada encéfalo fijado se seleccionaron 15 neuronas piramidales de la capa V de la corteza somatosensorial. Las células escogidas debían presentar un perfil somático regularmente piramidal; distribución simétrica de sus dendritas basales y estar situadas en un rango de profundidad entre 250 y 550 μm medidos desde la base de la capa VI, la base de la capa VI es el único punto de referencia anatómico que no cambia de posición durante el desarrollo ontogénico de la placa neocortical (Lund y Mustari, 1977). Mediante el empleo de una cámara lúcida, las neuronas fueron dibujadas con un aumento de 400 X.

En las células seleccionadas se estudió el número de segmentos del árbol dendrítico basal. La topología dendrítica fue determinada utilizando el sistema de ordenación centrífuga (figura 1). Se considera que los segmentos que emergen directamente del soma son primarios, éstos, a su vez al bifurcarse originan ramas de segundo orden, las que formarán ramas de tercer orden y así sucesivamente. Se comparó entre ambas condiciones ambientales, enriquecida y privada, el promedio de segmentos dendríticos por orden y por grupo experimental. El análisis estadístico se realizó mediante la prueba no paramétrica "test Wilcoxon" con niveles de significancia de $p < 0,05$.

RESULTADOS Y DISCUSION

En el cuadro 1 se señala el número promedio de los segmentos dendríticos, ordenados de acuerdo a

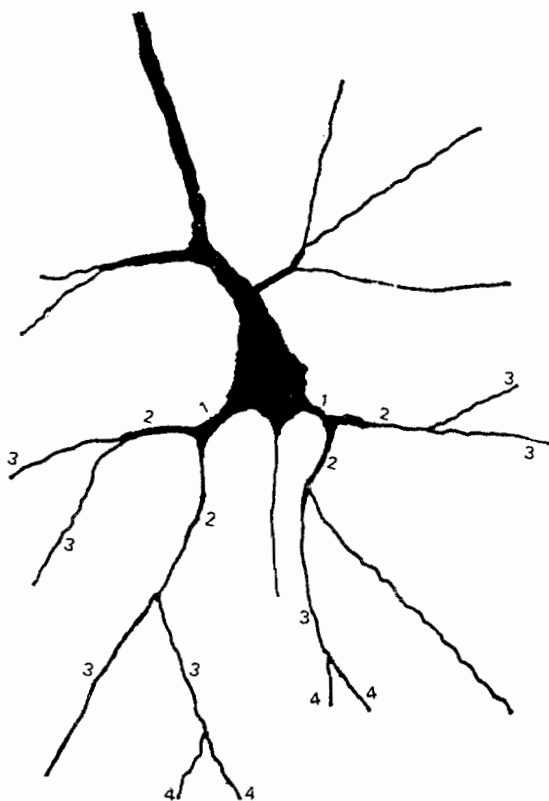


Figura 1. Ordenación centrífuga de segmentos del árbol dendrítico basal de neuronas piramidales de capa V.

su disposición centrífuga, en los tres grupos experimentales (sobredimensionado, estándar y reducido). Se observa que el grupo reducido y enrique-

cido, presenta dendritas de quinto y sexto orden que parecen haber emergido como consecuencia de mejores condiciones nutricional-ambientales. Es curioso detectar, además, que las ramas de más alto orden presentan una desviación estándar muy alta. Este resultado puede interpretarse como el producto de dos situaciones: a) escaso porcentaje de neuronas que presentan segmentos dendríticos de orden 4 ó superior (20,5% del total) y b) al hecho de que las ramas terminales más periféricas, en un momento dado del desarrollo, se encuentran en una etapa de crecimiento activo, lo que provoca en sus extremos rebrotes de conos dendríticos junto con procesos de autotomía (Speidel, 1942; Purves, 1985).

Al observar los segmentos de primer y segundo orden queda en evidencia que en los grupos sobredimensionado y estándar se producen diferencias por efecto macroambiental en favor de aquellos que permanecieron en el hábitat enriquecido ($p < 0,05$). En las capas de menor tamaño las diferencias entre las medidas obtenidas en ambas condiciones macroambientales son prácticamente nulas ($p > 0,05$), situación que indica que las mínimas diferencias observadas serían producto del azar. Por otra parte, este resultado señala que los segmentos más cercanos al soma (primer y segundo orden) habrían alcanzado su techo genético. Esta máxima expresión se manifiesta, además, al comparar los promedios obtenidos por los tres grupos experimentales en el medio enriquecido (2,33 - 2,47 y 2,33 en los segmentos de primer orden y 4,23 - 4,27 y 4,30 en las ramas de segundo orden).

En los segmentos de tercer y cuarto orden se puede observar una fuerte influencia de la condi-

CUADRO 1
ORDEN DE DENDRITAS BASALES POR TAMAÑO DE CAMADA Y CONDICION AMBIENTAL
(PROMEDIO ± DESVIACION ESTANDAR)

Orden de Dendrita	Sobredimensionado (60)		Estándar (60)		Reducido (60)	
	Enriquecido	Deprivado	Enriquecido	Deprivado	Enriquecido	Deprivado
1°	2,33 ± 0,54 ^A	2,07 ± 0,36 ^b	2,47 ± 0,56 ^A	2,13 ± 0,34 ^b	2,33 ± 0,54 ^A	2,37 ± 0,48 ^a
2°	4,23 ± 0,62 ^A	3,87 ± 0,50 ^b	4,27 ± 0,63 ^A	3,93 ± 0,36 ^b	4,30 ± 0,86 ^A	4,37 ± 0,75 ^a
3°	2,00 ± 1,71 ^A	1,33 ± 1,49 ^b	3,23 ± 1,20 ^B	1,67 ± 1,37 ^c	4,67 ± 1,58 ^C	2,67 ± 1,40 ^d
4°	0,40 ± 0,95 ^A	0,07 ± 0,36 ^b	0,86 ± 1,34 ^B	0,13 ± 0,50 ^c	2,27 ± 1,12 ^C	0,53 ± 0,88 ^d
5°	—	—	—	—	0,60 ± 1,17 ^C	0,07 ± 0,36 ^d
6°	—	—	—	—	0,13 ± 0,50	—

Letras en mayúsculas indican enriquecimiento macroambiental.

Letras en minúsculas indican deprivación macroambiental.

Letras distintas señalan diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) para análisis inter o intragrupos.

Todas las comparaciones se refieren a un mismo orden dendrítico (estudio horizontal).

En paréntesis se señala el número de neuronas estudiadas en cada tratamiento.

ción nutricional. En efecto, el número de segmentos dendríticos aumenta significativamente ($p < 0,05$) al disminuir el tamaño de la camada (comparación entre sujetos sometidos a idénticas condiciones macroambientales). Estos resultados son consistentes con los encontrados por Davies y Katz (1983).

El análisis de las figuras 2, 3 y 4 demuestra que las ramificaciones de segundo orden, en todos los grupos y bajo ambos niveles de enriquecimiento, son las más numerosas. Este último resultado es consistente con los estudios de dicotomía realizado por Connor (1982) en las pirámides de la capa V de la corteza visual de ratas adultas. Aparentemente, sólo hace excepción a esta regla el grupo de tamaño reducido que, frente a condiciones más estimulantes desarrolla una mayor cantidad de segmentos de tercer orden (figura 4). Sin embargo, si se considera la suma de ambas condiciones, enriquecida más deprivada, la mayor frecuencia se encuentra a nivel de las ramas de segundo orden, sugiriéndose que esta situación sería una realidad determinada por el genoma. Con respecto a las ramas más periféricas se observa que en todos los casos los segmentos terminales representan un porcentaje muy pequeño del total de la arborización dendrítica (cuadro 1).

Los efectos del ambiente enriquecido sobre la dicotomía dendrítica, aquí presentados, son consistentes con estudios de nuestro grupo que demuestran que tanto la longitud dendrítica total (Adaro y Cols., 1986) como la organización geométrica del campo dendrítico (Fernández y Cols., 1987) son afectados por factores nutricio-ambientales.

Estos cambios son sólo parte de la profunda reorganización estructural que exhibe el sistema nervioso cuando es sometido a modificaciones de su entorno (macro y microambiente) pues ellos, además, suelen incluir incrementos del recuento de espinas dendríticas (Schapiro y Vukovich, 1970, Valverde, 1971), aumento del tamaño del soma y de la densidad de las células gliales (Rosenzweig, 1972), etc. De este modo, se demuestra que el ambiente constituye, en animales jóvenes, el factor de impulso más importante para el desarrollo cortical, situación demostrada hace unos 200 años por el anatomista italiano Michele Gaetano Malacarne, quien observó que los animales entrenados mostraban un mayor desarrollo de las fisuras de la superficie encefálica, hecho que constituye un índice de evolución filogenética y ontogenética.

*Fernández y Cols., 1987. Comunicación personal.

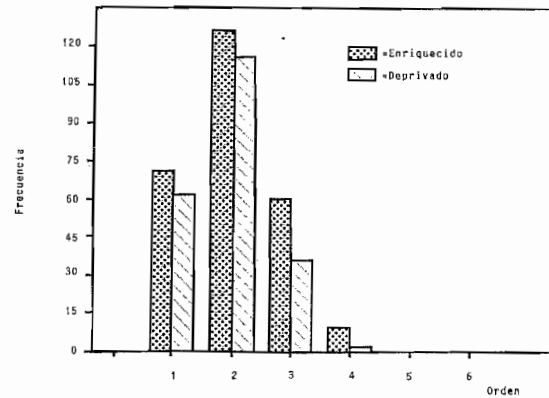


Figura 2. Frecuencia de dendritas basales según orden y condición ambiental (Grupo Sobredimensionado).

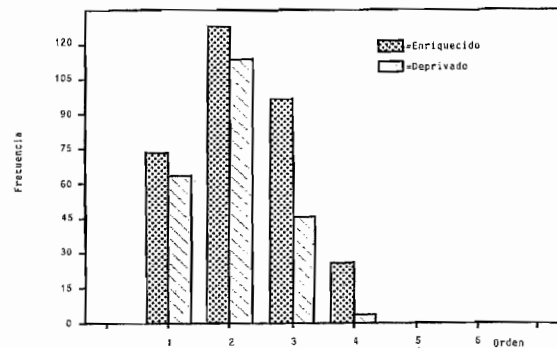


Figura 3. Frecuencia de dendritas basales según orden y condición ambiental (Grupo Estándar).

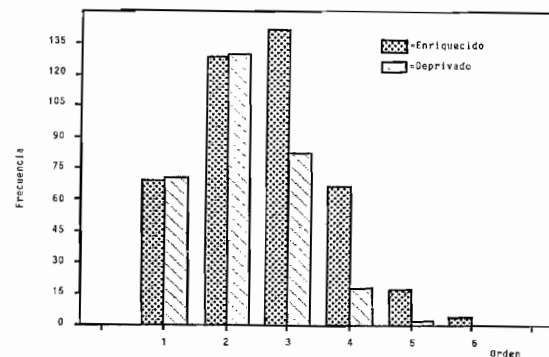


Figura 4. Frecuencia de dendritas basales según orden y condición ambiental (Grupo Reducido).

RESUMEN

Los efectos de dos condiciones macroambientales, sobre el desarrollo morfológico de tres niveles de interrelaciones madre-cría, fueron estudiados du-

rante el período de lactancia en la rata, "período de crecimiento rápido del cerebro" (primeros 18 días postnatales). Se observaron modificaciones en el peso y talla corporal. Los segmentos de segundo orden constituyeron la ramificación neuronal más frecuente en todos los grupos experimentales. Nuestros resultados indican que la estimulación macroambiental aumenta significativamente la dicotomía de las dendritas basales en las grandes pirámides de la capa V de la corteza somatosensorial (segmentos de primero a cuarto orden en los grupos control y sobredimensionado, ramas de tercer y cuarto orden en los grupos reducidos). La generación de ramificaciones de quinto y sexto orden, encontradas en los grupos reducidos, parece estar relacionada con una mejoría de las interacciones nutricio-ambientales.

REFERENCIAS

- ADARO, L., V. FERNANDEZ, W. KAUFMANN. Effects of nutritional-environmental interactions upon body weight, body size and development of cortical pyramids. *Nutr. Rep. Int.* 33: 1013-1020, 1986.
- BEAVER, B.V. Somatosensory development in puppies. *Vet. Med. Small Anim. Clin.* 77: 39-41, 1982.
- CONNOR, J.R. A dichotomous response by two populations of layer V pyramidal neurons in the old adult rat visual cortex to differential housing conditions. *Brain Res.* 243: 153-154, 1982.
- CORDERO, M., G. DIAZ, J. ARAYA. Neocortex development during severe malnutrition in the rat. *Am. J. Clin. Nutr.* 29: 358-365, 1976.
- DAVIES, C.A., H.B. KATZ. The comparative effects of early-life undernutrition and subsequent differential environments of the dendritic branching of pyramidal cells in rat visual cortex. *J. Comp. Neurol.* 218: 345-350, 1983.
- DOBBING, J. Lasting deficits and distortions of the adult brain following infantile undernutrition. In: *Nutrition. The Nervous System and Behaviour*. Pan American Health Organization, 1972. p. 15-23. (Sci. Pub. 251).
- GRIFFITHS, W.J., Jr. Effect of isolation on the treadmill running in the albino rat. *Psychol. Rep.* 8: 243-250, 1961.
- HARLOW, H.F., M. HARLOW. Social deprivation in monkeys. *Scient. Am.* 207: 137-146, 1962.
- HEBB, D.O. The effects of early experience on problem-solving and maturity. *Am. Psychologist.* 2: 306-307, 1949.
- LUND, R.D., M.J. MUSTARI. Development of the geniculocortical pathway in rat. *J. Comp. Neurol.* 137: 289-306, 1977.
- PADILLA, S.G. Further studies on the delayed pecking of chicks. *J. Comp. Psychol.* 20: 413-443, 1935.
- PURVES, D., R.D. HADLEY. Changes in the dendritic branching of adult mammalian neurones revealed by repeated imaging in situ. *Nature* 315: 404-406, 1985.
- ROSENZWEIG, M.R., E. BENNET, M. DIAMOND. Brain changes in response to experience. *Scient. Am.* 226: 22-29, 1972.
- SALAS, M., S. DIAZ. Privación neonatal de alimento y desarrollo cerebral: aspectos morfológicos, conductuales y electrofisiológicos. *Bol. Estud. Méd. Biol. Méx.* 30: 111-124, 1978.
- SCHAPIRO, S., K.R. VUKOVICH. Early experience effects upon cortical dendrites: a proposed model for development. *Science* 167: 292-294, 1970.
- SPEIDEL, C.C. Studies of living nerves. VII. Growth adjustment of cutaneous terminal arborization. *J. Comp. Neurol.* 76: 57-59, 1942.
- VALVERDE, F. Rate and extent of recovery from dark rearing in the mouse. *Brain. Res.* 33: 1-11, 1971.
- WINICK, M., K.K. MEYER., R.C. HARRIS. Malnutrition and environmental enrichment by early adoption. *Science* 190: 1173-1175, 1975.
- WORKSHOP ON MALNUTRITION, BRAIN AND BEHAVIOR. Sao Paulo. Ribeirao-Preto. 23-27 marzo, 1986.

Recibido noviembre 1987, aprobado diciembre 1987.