

**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA  
FACULTAD DE VETERINARIA**

**EFFECTOS DE LA SUBNUTRICIÓN DURANTE LA GESTACIÓN Y LA  
LACTACIÓN SOBRE LA MEMORIA ESPACIAL EN RATAS DE 365 DÍAS DE  
VIDA**

**Por**

**Eva Victoria GENOVESE GONZALEZ**

TESIS DE GRADO presentada como uno de los requisitos para obtener el título de Doctor en Ciencias Veterinarias.


Orientación: Tecnología de los Alimentos.

MODALIDAD: Ensayo experimental.

**MONTEVIDEO  
URUGUAY  
2022**

**PÁGINA DE APROBACIÓN**


**Presidente de Mesa:**

  
.....  
JUAN PABLO DAMASCO

**Segundo Miembro (Tutor):**

  
.....


**Tercer Miembro:**

  
.....  
DRA. ANALIA ROMERO

**Fecha:**

04 de Mayo de 2022

**Autor:**

  
Bach. Eva Genovese González

## **AGRADECIMIENTOS**

-Agradezco haber tenido acceso a una educación pública y de calidad. Creo que es necesario mostrar mi gratitud a un sistema en donde la mayoría de aquellas personas que no pueden tener una educación terciaria contribuyen a que el engranaje de este sistema funcione para los que si podemos aprovechar esta oportunidad. Por ser quienes de verdad hacen posible todo este meollo mi gratitud debe quedar por escrito por si algún día caigo en la tentación del olvido.

-Agradezco a mi tutor, Dr. Paul Ruiz, por su enseñanza durante el trabajo, por su ayuda, por estar a disposición, respondiendo siempre con inmediatez mis dudas e inquietudes y por amoldarse a mi ritmo sin cuestionamientos.

-A quienes colaboraron con el cuidado y manejo de los animales con los cuales se trabajó en esta tesis, Martin Duque y Emiliano Herrera.

-A los animales que dieron su vida para poder llevar a cabo este experimento con el fin de generar conocimiento.

-A Aurora Cabrera, agradecerle por las inmensas manos que le ha tendido a mi familia, ayuda que fue vital en situaciones verdaderamente difíciles de afrontar... donde estés, ¡¡¡gracias!!!

-A mis compañeros de carrera y con los que en algún momento supe disfrutar de este camino: Paula, Juri, Tato, Goga, Comander, Yaneth y Paola.

- Estefanía, Victoria, Paola y Yaneth), amigas que sembré a lo largo de todas mis etapas, gracias por ser las personas que uno elige para que las alegrías sean compartidas y los pesares más livianos.

-A mi familia perruna y gatuna, gracias por permitirme practicar el reflejo tusígeno y la protrusión del tercer parpado, pero sobre todo gracias por su naturaleza tan noble, por su lealtad, y por ser unas mascotas increíbles, me enseñaron a respetar mucho más a mi futura profesión. A: Cuki, Newton, Diana, Kunta, Merlin, Catalina, Mintaka, Kanuta, Galatea, Galileo, Minerva, Lucky, Thor, Leonarda, Puella, Apolo, Boudica.

### **A MI FAMILIA:**

-Mis hermanas, Patricia y Leticia

Ellas son, aparte de mis guardianas en todas las batallas, mis mejores amigas, mis cómplices, con quienes puedo contar en todas las horas, son un resorte que me impulsa para adelante y de quien siempre me puedo sostener cuando las fuerzas flaquean. Ambas tienen la maravillosa virtud de que a pesar de haber salido jodidas más de una vez al poner el cuerpo para protegerme, que no se les notase la pesadumbre. Sin dudas hacen que mi vida sea más fácil y disfrutable, solo por el hecho de compartirla junto a ellas...

-A Alejandro, mi pareja y el mejor compañero de vida que hubiese podido imaginar, gracias por ser familia, amigo, por hacerme feliz, cuidarme, creer en mí, por quererme en todas mis versiones, por motivarme a ser una mejor persona y enseñarme con su ejemplo de resiliencia de que cuando las raíces son firmes la tempestad no desmorona. Gracias mi bou!

-A Victoria, con quien generé los primeros recuerdos que forman mi identidad en la facultad y quien después se volvió una pieza mucho más valiosa en mi vida, hoy parte de mi familia, mi cuñada, amiga y fiel sponsor!

-A mis Padres Nelson y Walter (2 padres, suerte la mía...)

A Waltin, por muchas cosas que ya no tengo la oportunidad de agradecerle personalmente, pero espero que haya podido reconocer en mí la reciprocidad a todo su amor incondicional... ABChe sos mi identidad y estas en todo!

A Nelson, el papá con quien comparto la vida, agradecerle por ser un padre amoroso, paciente, comprensivo, por ser mi cómplice de fechorías, gracias por hacer de escudo en contiendas que ya arrancaban perdidas cuando me mandaba alguna macana...gracias pa por las lecciones de piensos y razones que tanto atesoró!

-Por último, darle las gracias a Nelly, mi señora madre y persona favorita en todo el mundo, una mujer canosa, gordita, de apenas 1.52 mts de estatura, de apariencia frágil, pero que sus cojones y alma de buey la hacen medir más que un gigante. Gracias por todos tus sacrificios, por tu amor constante e incondicional, por allanar el camino SIEMPRE, por confiar en mí, por ser la mejor referente que una hija pueda tener, por hacer de mi una persona de bien con tu ejemplo... gracias por ser un cachito mío mami!!!

**Tabla de contenido**

<b>PÁGINA DE APROBACIÓN.....</b>	<b>2</b>
<b>AGRADECIMIENTOS .....</b>	<b>3</b>
<b>1. LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>6</b>
<b>2. RESUMEN.....</b>	<b>7</b>
<b>SUMMARY .....</b>	<b>8</b>
<b>3. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>9</b>
<b>4. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>10</b>
<b>5. HIPÓTESIS.....</b>	<b>24</b>
<b>6. OBJETIVOS GENERALES Y PARTICULARES .....</b>	<b>24</b>
<b>7. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>25</b>
<b>8. RESULTADOS.....</b>	<b>30</b>
<b>9. DISCUSIÓN.....</b>	<b>32</b>
<b>10. CONCLUSIONES.....</b>	<b>36</b>
<b>11. BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>37</b>

## 1. LISTA DE FIGURAS

**Figura 1:** Hipótesis de Barker.

**Figura 2:** Vista macroscópica de hemisferio cerebral donde se aprecia la región del hipocampo en la rata, (señalada con círculo).

**Figura 3:** Circuito neuronal del hipocampo de ratón adulto.

**Figura 4:** Imagen histológica del hipocampo donde se observan las regiones que componen su corteza, asta de Ammón: regiones CA1 y Giro Dentado.

**Figura 5:** Imágenes histológicas de diferentes regiones de hipocampo tratadas con impregnación argéntica.

**Figura 6:** Esquema de circuito neuronal de hipocampo de ratón adulto.

**Figura 7:** Imagen de Laberinto de 3T, con los distintos sectores señalizados.

**Figura 8:** Imagen de Corte histológico de hipocampo de rata macho de 365 días de vida, con técnica Hematoxilina y Eosina.

**Figura 9:** Gráfica de medias y desvíos de tiempo que utilizaron los animales de los grupos C y T en realizar el laberinto de 3 T.

**Figura 10:** Gráfica de medias y desvíos de los errores que cometieron los animales de los grupos C y T al realizar el laberinto de 3 T.

**Tabla 1:** Medias y desvíos de los pesos corporal, encefálico, cerebral e índice encéfalo/ somático a los 365 días de vida en los grupos C y T. Se indica para cuales variables hay diferencias significativas entre los grupos.

**Tabla 2:** Variables histológicas del hipocampo. Se observan medias y desvíos de distintas variables de los animales que conforman los grupos Control y Tratados. Se indica para cuales variables hay diferencias significativas entre los grupos.

## 2. RESUMEN

Estudios han demostrado que la subnutrición proteínica en el período perinatal (gestación y lactación) produce alteraciones en la morfología del hipocampo y deterioro de las habilidades cognitivas en ratas adultas por el fenómeno conocido como programación fetal. Sin embargo, no se conoce si existen diferencias a nivel cognitivo y en la morfología del hipocampo con una restricción proporcional de todos los nutrientes *in útero*, (sin castigar el aporte de un solo componente de la dieta) y durante la lactación en la vida adulta. En el presente trabajo se estimó el tiempo y errores cometidos en un laberinto por ratas Wistar, macho de 365 días de edad, que nacieron de madres nutridas con una dieta *ad libitum* (grupo Control -sin subnutrición-) o subnutridas con una restricción del 50% del alimento *ad libitum* durante la gestación (grupo Subnutrido). Al nacimiento todas las madres pasaron a comer *ad libitum*, pero a los nacidos de madres tratadas con subnutrición en la gestación lactaron en camadas más grandes para que el tratamiento de penuria alimenticia se mantenga durante la lactación. Se formaron dos grupos de ratas macho experimentales: Control (C) y Subnutrido (S). Luego de pasar por el laberinto se sacrificó a los animales y se procesaron los hipocampos para análisis histológico. Mediante tinción con hematoxilina y eosina se evaluó el espesor y longitud de distintas regiones hipocámpales (CA1, CA2, CA3, Giro Dentado).

No se hallaron efectos significativos por el tratamiento en las mediciones comportamentales ni histológicas, sin embargo en la región CA1 hubo una diferencia, en donde se vió aumento del espesor de esta región en ratas subnutridas. Así es que la subnutrición durante la gestación y lactación no generó efectos significativos a largo plazo sobre la memoria espacial ni cambios en la histología del hipocampo en la vida adulta de ratas macho.

## SUMMARY

Studies have shown that protein malnutrition during the perinatal period (gestation and lactation) produces morphological alterations in the hippocampus and cognitive decline in adult rats due to the phenomenon known as fetal programming. However, it is still unknown if there are any differences both, at a cognitive level and in the hippocampus morphology with a proportional restriction of the total nutrient intake *in utero* (without punishing a single component of the diet) and during lactation in adulthood. In the present study, we analyzed the time and errors made in a maze by 365-day-old Wistar male rats, born to dams fed *ad libitum* (Control group –without malnutrition-) or malnourished with a 50% food restriction during pregnancy (Malnourished group). At birth, all mother rats were fed *ad libitum*, but those born of mother rats that were malnourished during pregnancy suckled in large litters so as to maintain the malnutrition treatment during lactation. Two groups of experimental male rats were formed: control (C) and undernourished (S). After passing through the maze, the animals were slaughtered and their hippocampi were processed for histological analysis. Using Hematoxylin and Eosin staining, the thickness and length of different hippocampal regions (CA1, CA2, CA3, Dentate Gyrus) were evaluated. No significant effects on behavioural and histological measures due to the treatment were found. However, in the CA1 region, there is a difference towards greater thickness in treated rats. Thus, malnutrition during pregnancy and lactation did not produce significant long-term effects on spatial memory or changes in hippocampal histology in adult male (365 days of life).



### 3. INTRODUCCIÓN

Existe una amplia gama de estudios llevados a cabo en distintas especies animales que evidencian los efectos de la subnutrición durante la gestación y la lactación sobre las futuras generaciones. Cuando un feto se enfrenta a una situación de subnutrición se someterá a una serie de procesos que alterarán la estructura y la función de sus órganos para preservar el desarrollo de sus funciones vitales y promover la supervivencia (Duran, 2004).

En Uruguay hay sistemas de producción intensiva en donde se gestan animales en subnutrición. Es importante tener en cuenta cual es el alcance de este fenómeno, ya que el mismo acarrea pérdidas económicas por contar con animales que presentan menores tasas de rendimiento (reproductivo, de peso, etc.) y un aumento en la morbi-mortalidad, sobre todo de las crías. En nuestro país, dos de los más importantes rubros de cría de animales que se comercializa son el ganado bovino lechero y el ovino, ambos en el último tercio de gestación sufren un balance energético negativo -BEN- (Fernandez, 2000). Así bien, en el ganado lechero vacuno, la cantidad de energía requerida para el mantenimiento, la gestación y la producción de leche excede la cantidad de energía que la vaca puede obtener de la dieta, disparandose la orden interna para que las reservas corporales (tejido adiposo e incluso tejido muscular), viertan al torrente sanguíneo aquellos elementos, como ácidos grasos libres (AGL) y aminoácidos, que serán fuente de energía adicional para cubrir la demanda de una alta síntesis de leche y las demandas energéticas de los tejidos periféricos. Este mecanismo es el que le permite a la vaca tener los nutrientes extras necesarios para una alta producción de leche, y la consecuencia es una pérdida de peso, que normalmente expresamos en pérdida de condición corporal. Esto es normal hasta un límite, pasado ese límite se pueden encontrar el cuadro clínico de cetosis bovina (García-Roche, 2017). En el caso de los ovinos, por el sistema de pastoreo y el ciclo estral de las ovejas (poliéstrica estacional), al final de la gestación no suele haber mucha oferta forrajera de campo natural (otoño tardío-invierno). Sumado a esto, el aumento de tamaño del cordero en el último tercio de gestación le resta capacidad estomacal a la madre que le provoca menos apetito, determinando un BEN, que lleva a un cuadro clásico llamado toxemia de la preñez (caída de la glucosa en sangre que resulta en un incremento de la producción de cetonas). Por otro lado es bien sabido que la nutrición materna juega un rol preponderante en el peso del cordero al nacer y en su viabilidad neonatal (Cal-Pereyra et al., 2012).

Los tiempos de experimentación en algunos modelos animales son largos además de costosos, por estas razones es importante utilizar un modelo experimental preciso, económico y rápido como es el caso de las ratas, sin perjuicio de las diferencias que existen entre especies.

El análisis de esta tesis se centra en el estudio de la memoria espacial bajo los efectos de la subnutrición ya antes mencionados. Esta función cognitiva es de suma importancia para los animales ya que les otorga orientación al situarlos en un espacio tridimensional, permitiéndoles aprender, memorizar, reconocer y relacionar las referencias del ambiente en el que se mueven. Por lo tanto es crucial para un eficiente desempeño de sus habilidades diarias y como consecuencia el aumento de las probabilidades de supervivencia. Para poder evaluar a la memoria espacial de ratas que fueron subnutridas durante la gestación y la lactación tenemos que estudiar con cierto detalle el hipocampo, que es una estructura del sistema nervioso central (SNC) en donde con mayor relevancia tiene lugar esta función.

En base a lo antes expuesto nos proponemos determinar de qué manera la subnutrición por restricción del consumo de alimento durante la gestación y la lactación altera la memoria espacial en ratas adultas.

## **4. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA**

### **4.1 PROGRAMACIÓN FETAL**

El estatus nutricional de una hembra durante la preñez tiene gran importancia para el crecimiento postnatal y el desarrollo de sus crías, y determina efectos permanentes en ellas, lo cual se conoce como “programación fetal” (revisión: Desai y Hales, 1997). Este concepto abarca, entre otros los efectos de la malnutrición fetal o neonatal sobre el desarrollo pre y postnatal y hasta la vida adulta (Engelbregt et al., 2000). Una de las adaptaciones del feto del mamífero a la falta de nutrientes u oxígeno es la disminución de la tasa mitótica, especialmente en aquellos tejidos que están en rápida división celular en el momento de la carencia del nutriente (Cooper et al., 2002). Existe evidencia indicando que el status nutricional de la madre puede generar alteraciones estables de la expresión genética del genoma fetal, lo que sería un mecanismo molecular por el cual la nutrición materna influiría en la programación fetal (Wu et al., 2006).

El concepto de “Programación fetal” tiene su origen en estudios epidemiológicos realizados en humanos por el Dr. David Barker, quien indagó en la génesis de algunos trastornos cardiovasculares proponiendo un origen fetal para estos trastornos derivado de la instauración de mecanismos de adaptación del feto a la subnutrición durante su desarrollo temprano (Barker, 2004). La hipótesis original de Barker respecto al origen fetal de las enfermedades ha sido ampliamente aceptada y extendida al desarrollo de varias patologías (Ver fig.

1). De hecho, en la actualidad se acepta que patologías tales como la hipertensión, la diabetes mellitus tipo II y las enfermedades coronarias guardan relación con la nutrición pre y posnatal en su etiología (Moreno y Dalmau, 2001).

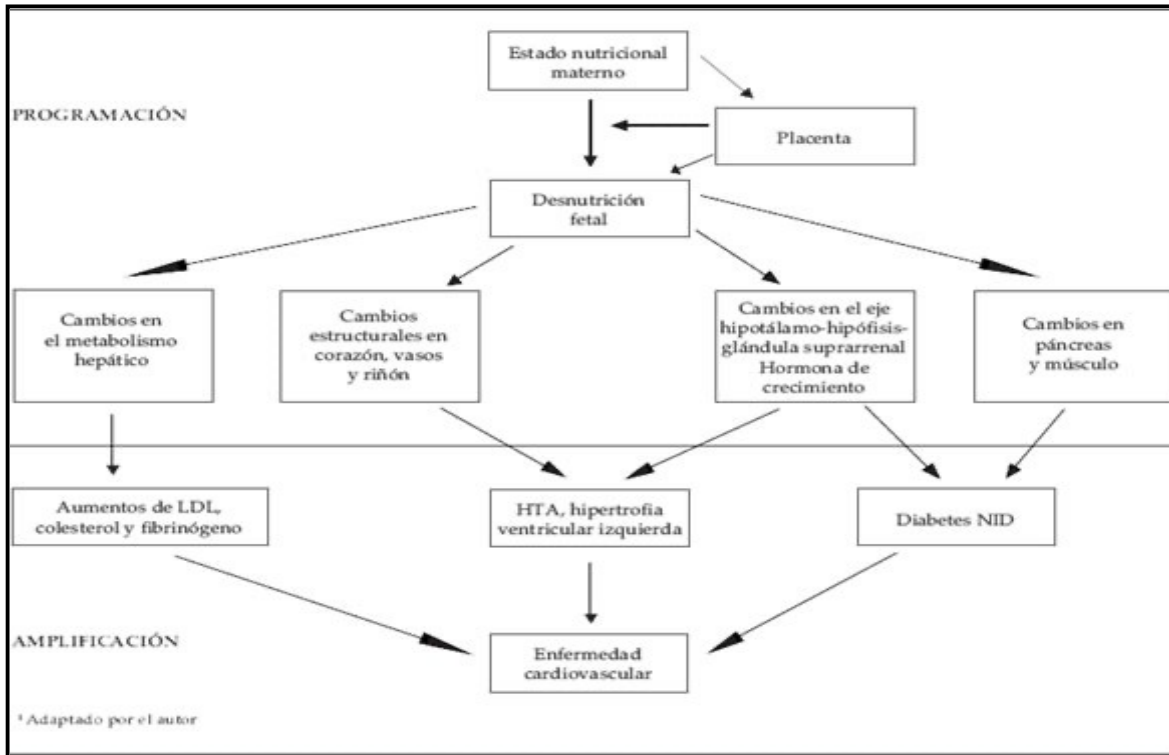


Figura 1. Hipótesis de Barker (Fuente: García et al., 2012)

## ANTECEDENTES DE LA PROGRAMACIÓN FETAL PARA LA SUBNUTRICIÓN DURANTE LA GESTACIÓN EN DISTINTOS MODELOS ANIMALES Y SISTEMAS.

### 4.1.1. Efectos de la restricción en el ser humano: diabetes, enfermedades cardíacas, obesidad.

El investigador británico David Baker, en 1980, formuló una hipótesis que relacionaba la incidencia de determinadas enfermedades del adulto como diabetes mellitus, hipertensión, dislipemias, muerte por enfermedad coronaria, con el ambiente intrauterino. El postulado original sostenía que “la nutrición, la salud y el desarrollo deficiente en niñas y mujeres jóvenes constituyen una causa de elevada prevalencia de mortalidad cardiovascular en la generación siguiente”(Barker, 2004).

La restricción del crecimiento intrauterino y el bajo peso al nacer, se han identificado como marcadores de nutrición insuficiente. El efecto a corto plazo permite la supervivencia del feto, mientras que a largo plazo predispone a enfermedades de la edad adulta (Duran Pablo, 2004).

La desnutrición, así como la sobrenutrición fetal aumenta el riesgo de desarrollar alteraciones en el peso y composición corporal fetal, y posteriormente obesidad, síndrome metabólico, incremento en la adiposidad, alteración en el metabolismo de la glucosa y / o insulina, alteración del metabolismo lipídico, alteraciones hepáticas y de las cifras tensionales (Castro, 2020).

#### 4.1.2. Efectos de la restricción en ovinos y los músculos estriados esqueléticos.

Se ha reportado que corderos nacidos de madres restringidas (con 70% de sus requerimientos cubiertos) desde 30 días antes de la concepción hasta los 100 días de gestación presentaron menores tasas de ganancia durante el engorde en comparación con aquellos hijos de madres no restringidas (Nordby et al., 1987). También, Daniel y colaboradores (2007) observaron que los corderos hijos de madres restringidas al 50% de sus requerimientos entre los días 30 y 70 de gestación crecieron más lentamente durante el engorde y fueron más livianos al sacrificarlos a las 24 semanas de edad. En ovinos se acepta que restricciones previas a los 85 días de gestación darán como resultado un menor número de fibras en el músculo, mientras que restricciones posteriores al día 85 de gestación reducirán el tamaño de las fibras (Fahey et al., 2005). Por otra parte, se ha demostrado que ante situaciones adversas durante el desarrollo fetal, el músculo esquelético tiene una prioridad baja en la partición de nutrientes frente a otros tejidos, dado que no es esencial para el desarrollo de las funciones vitales de los individuos, por lo que es mucho más vulnerable a sufrir alteraciones durante su desarrollo (Zhu et al., 2004; Abud, 2015; Ithurralde et al., 2021).

#### 4.1.3. Efectos de la restricción en ratas macho y la capacidad reproductiva.

En animales de experimentación, la subnutrición en etapas tempranas de la vida (gestación más lactación) provoca que ratas macho adultas tengan menor número de células de Sertoli, tanto en total como por corte de túbulo seminífero, además de menor peso corporal y testicular (Genovese et al., 2010). En este sentido, neonatos que han sido subnutridos durante toda su gestación (por restricción de alimento a sus madres) también presentan menor peso testicular y un número menor absoluto de estas células (Genovese et al., 2011). Por otra parte, se sabe que crías macho lactantes cuyas madres han sido alimentadas con dietas bajas en proteína (durante el período de lactación) tienen menor

número de células de Sertoli y menor peso testicular y corporal a los 21 días de vida que las alimentadas sin restricción (Ramos et al., 2006). A su vez, la alimentación materna con dietas bajas en proteína durante el período de lactación determina cambios en la estructura testicular de los lactantes cuando llegan a adultos (Toledo et al., 2011). Por otra parte, restricciones proteicas y energéticas maternas durante la lactación, traen aparejado en ratas pre púber, menor concentración de andrógenos en sangre y menor producción de receptores a andrógenos en sus células testiculares (Teixeira et al., 2007). Recientemente encontramos que los machos que fueron gestados y lactaron con subnutrición cuando son adultos jóvenes presentan mayor número de células mioides en apoptosis y en la etapa juvenil (neonato y púber) sus células de Sertoli y células mioides expresan menos los receptores para andrógenos (Genovese et al., 2019).

#### 4.1.4. Efectos de la restricción en ratas y sistema nervioso.

Los efectos de la desnutrición precoz generan un déficit sobre la capacidad de aprendizaje en la rata adulta (Caldwell y Churchill, 1967).

Se conoce poco sobre si la memoria espacial se encuentra alterada en ratas nacidas de madres con subnutrición crónica durante la gestación. Nuestro equipo encontró datos (en otro trabajo experimental), evaluando el desempeño en el Water Morris Maze (MWM) (Ruiz et al., 2013). Los resultados preliminares muestran diferencias entre ratas nacidas de madres sin subnutrición y las que si fueron subnutridas, donde se vió una alteración de la navegación espacial en los animales tratados. Esto podría ser indicativo de un déficit en la capacidad de evocación, producto del tratamiento experimental.

## **4.2 MEMORIA ESPACIAL**

### 4.2.1. CLASIFICACIÓN DE LA MEMORIA

Definiendo a la memoria se puede decir que es la capacidad de almacenar y recuperar las informaciones, así como también mantener la fidelidad de los eventos a recordar.

Existen diversas clasificaciones de memoria según se atienda a su contenido (declarativo o procedimental), su duración (a corto plazo o a largo plazo) o a su naturaleza, es decir aquellas que se mantienen a lo largo del tiempo frente a las que son transitorias (memoria de trabajo) (Deiana et al., 2011).

Dentro de la memoria a largo plazo se distingue entre memoria explícita y la memoria implícita (Dew y Cabeza, 2011; Mulligan, 2012). La memoria implícita o no declarativa es aquella que nos permite ejercer hábitos cognitivos o motores,

de ahí que también se denomine procedimental. Es altamente influenciado por predisposiciones biológicas de cada especie animal y de cada individuo para adquirirlas. Prácticamente todas las formas de aprendizaje que dan lugar a memoria implícita están condicionadas por grados más o menos específicos de plasticidad cerebral. Hay muchos ejemplos, las abejas son animales especialmente capaces de establecer asociaciones con colores y olores, los pájaros que anidan tienen una excelente memoria espacial, las ratas son animales bien adaptados al aprendizaje en laberintos, los primates han desarrollado habilidades especiales para el aprendizaje de naturaleza social y, entre estos últimos, los humanos son especialmente capaces de reconocer voces y rostros. Ni que decir tiene, lo importante que son también las predisposiciones de origen ambiental, educativas y sociales. Se adquiere gradualmente, perfeccionándose con la práctica. Presenta una expresión en gran medida automática e inconsciente, difícil de declarar verbalmente o por escrito. Sin embargo, la memoria explícita o declarativa, de expresión consciente, fácilmente verbalizable, es el almacenamiento cerebral de hechos (memoria semántica) y sucesos (memoria episódica) (Tulving, 2002). Este tipo de memoria puede adquirirse en uno o pocos ensayos y tiene como destacada particularidad el poder expresarse en situaciones y modos diferentes a los del aprendizaje original, es decir, es una memoria de expresión flexible, promiscua y cambiante. La memoria episódica resulta del aprendizaje relacional, que consiste en analizar, comparar y contrastar diferentes tipos de información (Crystal, 2010; Ferbinteanu et al., 2006; Morris, 2001). Un ejemplo es el aprendizaje que permite orientarnos en el espacio circundante, de ahí que aunque dado su carácter consciente parezca ser más susceptible de humanos, también esté presente en otros animales, lo que nos permite estudiar el aprendizaje espacial en modelos experimentales (Deiana et al., 2011).

Entonces podemos definir a la memoria espacial como el modo en el que percibimos el espacio, es decir, la manera en la que mantenemos en la mente un espacio tridimensional a través del cual nos movemos, teniendo en cuenta sus volúmenes y referencias. De hecho dentro del hipocampo (estructura que es objetivo de estudio en este trabajo) se encuentran células llamadas “de lugar” que trabajan como un verdadero GPS cerebral (Olivares et al., 2015).

La orientación y exploración en espacios nuevos o desconocidos son una de las facultades cognitivas más usadas y que postula la idea de que la representación de nuestro entorno se genera en el hipocampo como un “mapa cognitivo” (Olivares et al., 2015).

#### 4.2.2. APRENDIZAJE ESPACIAL

El animal debe de utilizar una determinada estrategia de navegación, ya sea innata o bien aprendida, para recordar donde está su guarida o donde encontrar el alimento. La capacidad de los animales de emplear distintas estrategias de navegación para encontrar un lugar en un entorno previamente visitado se le denomina aprendizaje espacial. Por otra parte, entendemos la memoria espacial como la habilidad para codificar, almacenar y recuperar información aprendida sobre las localizaciones espaciales (Kessels et al., 2001).

Actualmente se considera que existen dos sistemas de navegación espacial, el táxico, y el cartográfico (Mittelstaedt M. L. y Mittelstaedt, H, 1980).

El aprendizaje táxico se cimienta en el empleo de una estrategia de orientación propioceptiva, situando el espacio en un marco de referencia centrado en el propio sujeto. A su vez este sistema puede desarrollarse a través de dos mecanismos: el aprendizaje de respuesta u orientación y el aprendizaje de guía (Santin et al., 2000). En el aprendizaje de respuesta u orientación los animales utilizan patrones motores estereotipados localizando el lugar deseado tras aprender series de movimientos, mientras que en el aprendizaje de guía el animal aprende a asociar una pista a la meta, como ocurre por ejemplo en las tareas discriminación visual simple, donde los animales distinguen entre pistas visuales disponibles en su entorno para alcanzar la meta (Hu et al., 2005).

En el aprendizaje cartográfico se aprende la localización de un lugar con respecto a la configuración de las pistas disponibles en el entorno circundante. En este aprendizaje, las pistas utilizadas son distales y el animal se forma un mapa cognitivo, es decir una representación espacial o mapa del entorno en el cual se encuentra la meta. De este modo los organismos aprenden a anticipar no solo los estímulos particulares, sino también los elementos interconectados del mapa cognitivo, lo que hace posible establecer inferencias lógicas en la navegación de los sujetos como rutas más cortas y obtención de nuevas soluciones, entre otras (Eichenbaum et al., 1990; Eichenbaum, 1997; Lafon et al., 2009).

Por consiguiente, para que se establezca una representación espacial en el cerebro se requiere que exista una correcta integración de la información sensorial que se percibe, y esta información se ha dividido en información alotética ó idiotética. Los estímulos alotéticos son aquellos que proporciona el ambiente, es decir: estímulos visuales, olfativos, ó sonidos que aportan información espacial al sujeto. Los aprendizajes basados en esta información se denominan aprendizajes alocéntricos (Braun et al., 2012). Los estímulos idiotéticos hacen referencia a estímulos del propio cuerpo, vestibulares, propioceptivos o motores y aportan información de los cambios continuos de la posición u orientación del sujeto. El aprendizaje basado en estos estímulos se denomina egocéntrico (Burgess, 2006). Existen evidencias experimentales de

que en determinadas situaciones, las ratas intentan aplicar varias estrategias para solventar problemas espaciales, siendo capaces de cambiar a una u otra cuando sea necesario (Burgess, 2006).

#### 4.2.3. IMPORTANCIA DE LA MEMORIA ESPACIAL

La navegación espacial es importante para muchos de los repertorios conductuales de los animales: búsqueda de comida, conducta parental y reproductiva, regreso al nido o huída a un lugar seguro. El aprendizaje y la memoria espacial se relacionan con la capacidad de adquirir y retener asociaciones de las características del ambiente, lo que permite al organismo desenvolverse en el espacio. La memoria espacial consiste en múltiples mecanismos especializados en codificar, almacenar, recuperar información acerca de rutas, configuraciones y localizaciones espaciales. Permite poder anticiparnos a los cambios que existan en el espacio (Kessels et al., 2001).

La estructura cerebral que tiene mayor participación en la generación de la memoria es el hipocampo, el cual veremos con más detalle a continuación (Olivares et al., 2015).

#### 4.3 GENERALIDADES DEL HIPOCAMPO

Comprender los mecanismos cerebrales implicados en la organización de las funciones cognitivas es una tarea extremadamente difícil, dada la enorme complejidad del cerebro en cuanto a las estructuras que lo componen y las interrelaciones de las mismas. Desde una perspectiva neuropsicológica, el punto de partida de los estudios sobre la anatomía de la memoria se puede situar en los trabajos de (Lashley, 1950), el cual dedicó gran parte de su vida a la búsqueda del sustrato neural que sirviera de soporte a la memoria y al aprendizaje, a lo que él denominó engrama (huella en el cerebro). Mediante la ablación experimental y el registro conductual postoperatorio, observó que si bien el deterioro de la memoria era proporcional al tamaño de las lesiones cerebrales, no habían localizaciones aisladas de memoria, concluyendo así que el engrama no estaba localizado en una región concreta del cerebro sino que estaba distribuido por todo el encéfalo (Lashley, 1950).

El hipocampo se encuentra situado en el sistema límbico, relacionado tanto con la memoria como con los procesos mentales que tienen que ver con producción y regulación de estados emocionales, además de intervenir en la navegación espacial. Es una estructura pequeña, con forma curvada y alargada que se ubica en la parte interior del lóbulo temporal y se proyecta desde el hipotálamo a la amígdala. Cada encéfalo tiene 2 hipocampos, uno en cada hemisferio cerebral (Ver fig.2). El hipocampo está asociado a una parte de la corteza cerebral conocida como arquicorteza que es una de las regiones más ancestrales del encéfalo, por lo que tiene tan solo tres capas neuronales en cada sector de su corteza y no seis como en el caso del neocortex. A su vez se subdivide en tres



regiones, las cortezas de Ammón 1, 2, 3 (CA1, CA2 Y CA3). Debido a sus capas de neuronas densamente empaquetadas, el hipocampo ha sido utilizado frecuentemente como un sistema modelo para el estudio de la neurofisiología. La forma de la plasticidad neuronal conocida como potenciación a largo plazo (LTP) fue descubierta por primera vez en el hipocampo. La principal función es la de mediar en la generación y recuperación de recuerdos en conjunto con muchas áreas repartidas en la corteza y con otras áreas del sistema límbico. Por lo tanto tiene un papel muy importante en la consolidación de los aprendizajes realizados, ya que por un lado permite que ciertas informaciones pasen a memoria de largo plazo y por el otro vincula este tipo de contenidos con ciertos valores positivos o negativos, dependiendo si estos recuerdos han estado asociados a experiencias placenteras o dolorosas (fisiológica o psicológicamente).

El hipocampo no contiene recuerdos, sino que actúa como nodo de activación que permite que se activen distintos recuerdos distribuidos por distintas partes del encéfalo. También tiene función de navegación espacial, ya antes mencionada (Olivares et al., 2015).

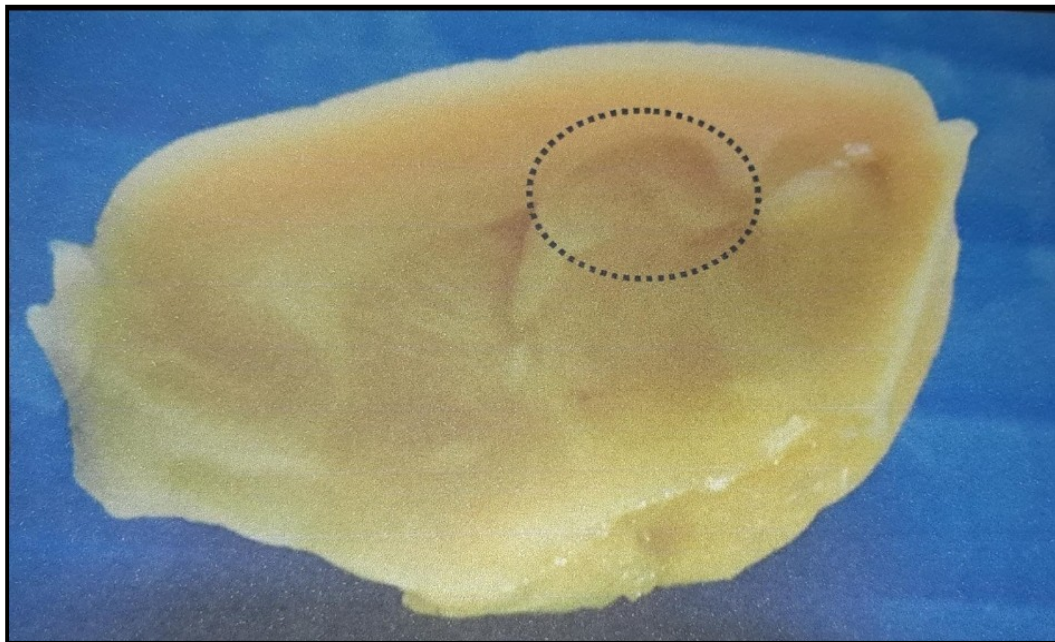


Figura 2. La imagen muestra macroscópicamente un hemisferio cerebral donde se aprecia la región del hipocampo en la rata, señalada con círculo (Histología. Fvet, UdelaR).

#### 4. 3.1. IMPORTANCIA DE LAS REDES NEURONALES EN EL APRENDIZAJE ESPACIAL

Es importante destacar que las teorías actuales sobre la memoria asumen la existencia de múltiples formas de memoria, proponiendo la existencia de varios tipos de circuitos neuronales que están adaptados a almacenar distintos tipos de información (Packard y Goodman, 2012; Poldrack y Packard, 2003; McDonald y Sadowsky, 2002). Concretamente en el cerebro de mamíferos, el hipocampo y el estriado dorsal es el sustrato de dos tipos de memoria diferentes. Así, la región hipocampal es importante en la memoria declarativa, mientras que el estriado dorsal lo es en la memoria implícita, es decir, en la memoria de hábitos o la memoria procedimental (Packard, 2009).

O'Keefe y Nadel, (1978) tomando como partida los trabajos de Tolman, propusieron al hipocampo como la estructura cerebral que interviene en la confección de un mapa cognitivo, es decir, que los animales elaboran una especie de representaciones internas como resultado de la codificación de las relaciones espaciales que guardan entre si los diferentes hitos del entorno (O'Keefe, 1976).

La mayor parte de los estudios de lesiones del hipocampo en humanos, primates y roedores sugieren un papel primordial del hipocampo en la consolidación de la memoria tanto a corto como a largo plazo. El daño en esta estructura puede producir déficits en la memoria declarativa (Squire y Zola-Morgan, 1991; Squire 1992), y concretamente en la memoria episódica (Vargha-Khadem et al., 1997). Además estudios de lesión hipocampal ponen de manifiesto su implicancia en el aprendizaje espacial (Morris et al., 1982; O'Keefe, 1976; Telensky et al., 2011).

En 1976 O'Keefe descubre en el hipocampo de la rata la existencia de las llamadas células de lugar "place cells". Estas células varían su tasa de disparo (actividad) específica y selectivamente cuando una rata ocupa una localización determinada en un entorno (O'Keefe, 1976). Anatómicamente son neuronas piramidales que se han encontrado en las áreas CA1 y CA3 del hipocampo, en el subiculum y en la corteza entorrinal y que actualmente se han observado también en primates.

#### 4.4. HISTOLOGÍA DEL HIPOCAMPO

Todas las áreas del hipocampo comparten como característica una organización cortical simplificada en tres capas (Cajal, 1911; Stephan, 1975) (Ver fig. 3).

1. Una capa superficial o molecular con pocos cuerpos neuronales pero conteniendo glía y neuropilo. Stephan, (1975) subdivide, en el asta de Amón, esta capa en: stratum lacunosummoleculare, statum radiatum y stratum lucidum (ver fig. 4).

2. Una capa intermedia, celular, donde aparece compactado un claro grupo de células principales, bien sean células granulares en el giro dentado (GD) o piramidales (asta de Amón, subiculum, ver fig. 4).

3. Una capa profunda polimorfa formada por neuronas polimorfas, no piramidales y neuropilo (stratum oriens con el alveus; hilio del GD, ver fig. 4).

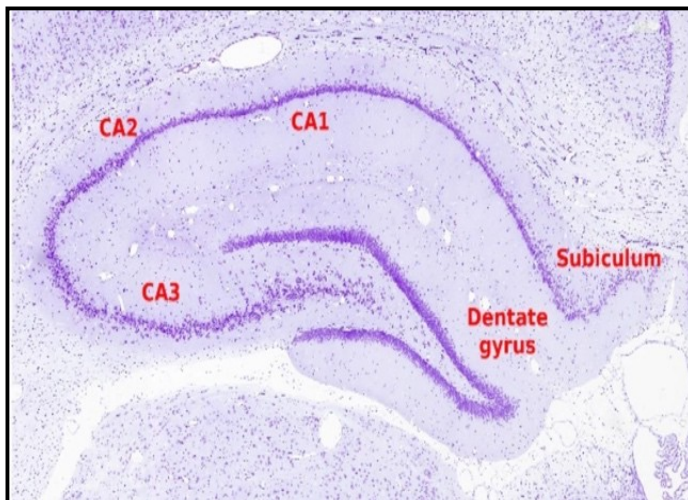


Figura 3. Imagen histológica del hipocampo donde se observa las regiones que componen su corteza, asta de Ammón: regiones CA1, CA2, CA3; Giro Dentado (Megias, Molist, Pombal, 2019. Atlas de histología animal y vegetal.

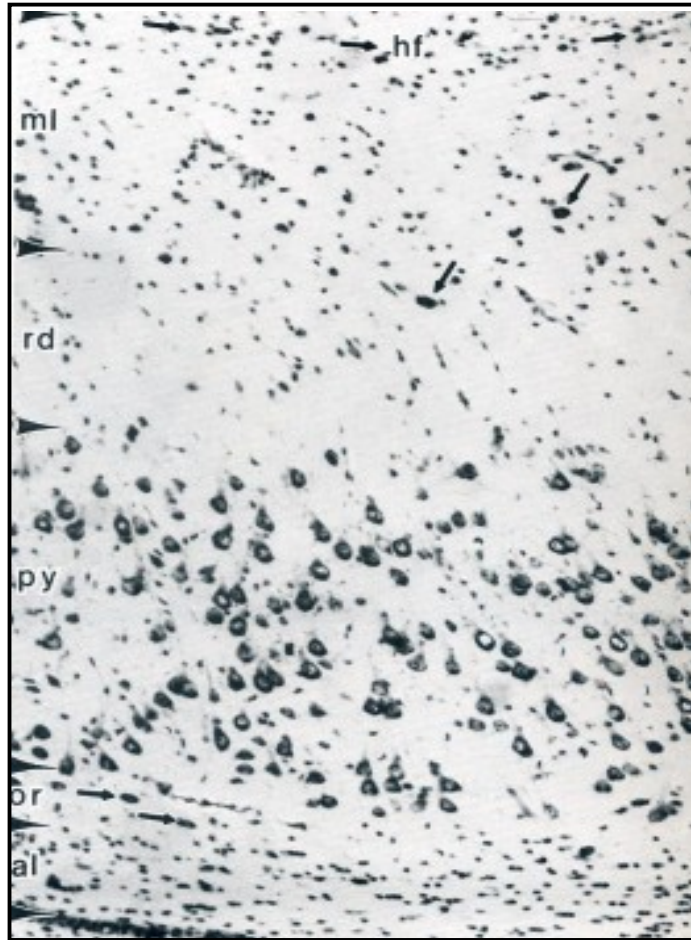


Figura 4. Región CA1 de macaco, homólogo al del humano. Bajo la fisura del hipocampo se encuentra una capa molecular, en el que se pueden diferenciar un stratum lacunosum moleculare (ml) con mayor cantidad de glía y un stratum radiatum (rd) con menor cantidad de glía. La capa piramidal (py) o capa principal está formada por células piramidales menos densamente empaquetadas que en el hipocampo murino. En el stratum oriens (or) se observan neuronas fusiformes señaladas con flechas. El alveus (al) es una capa de sustancia blanca que recubre al hipocampo. Las capas moleculares del asta de Amón, que contiene escasas neuronas dispersas (flecha), se encuentra adyacente y enfrentada a la correspondiente capa molecular del giro dentado. La fisura del hipocampo (hf) las separa. (Rosene y Van Hoesen, 1977).

#### 4.4.1. REGIONES HISTOLÓGICAS DEL HIPOCAMPO

En resumen (Stephan, 1975) propone clasificar las estructuras principales del hipocampo de la siguiente forma:

##### **Región del Subiculum:**

- Capa molecular
- Capa piramidal
- Capa multiforme

##### **Región del Cornu Ammonis o cuerpo de Ammon:**

- Capa superficial o molecular :
  - Strato Lacunosumoleculare
  - Strato Radiatum
  - Strato Lucidum (solo presente en CA3)
- Capa piramidal
- Capa plexiforme u oriens

##### **Región del Giro Dentado :**

- Capa molecular
- Capa granular
- Capa polimórfica

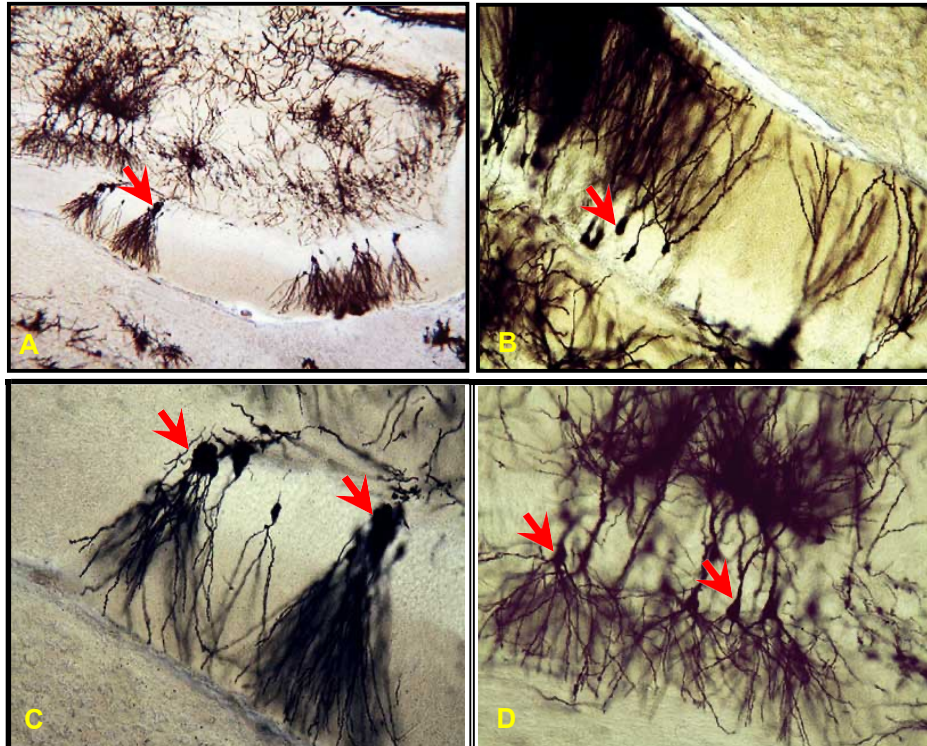


Figura 5. Fotografías de hipocampo tratado con la técnica de impregnación árgentica. En A, se observa visión panorámica del hipocampo en donde se muestra la dificultad de establecer límites entre los componentes (35x). En B, neuronas del giro dentado a mediano aumento (100x). En C, mayor aumento de neuronas del giro dentado (400 x). En D, Neuronas piramidales del cuerno de Ammon en la región CA1 (100x). Todas las flechas rojas señalan somas neuronales. Modificado del atlas de histología de la Universidad de los Andes, Venezuela.

La región CA3 está formada por una capa de neuronas piramidales que se caracterizan por unas excrecencias dendríticas en las que hacen sinapsis las fibras musgosas formando el stratum lucidum. Sus dendritas apicales se extienden superficialmente hacia la fisura. Las células de CA3 emiten las colaterales de Schaffer que terminan en CA1. Es en el campo CA1 donde se reconoce mejor la organización en tres capas: el stratum oriens, el stratum piramidale y el stratum lacunosum moleculare (donde se ramifican las dendritas apicales y que, en el desarrollo, contiene las neuronas de Cajal Retzius). El área CA1 se identifica claramente en los roedores, constituyendo una zona de neuronas piramidales densamente agrupadas

El área CA3 se continúa con el área CA1 a través de una región que muchos consideran una simple región de transición, donde se conserva la arquitectura previamente descrita, pero no recibe fibras musgosas y, por lo tanto, carece de stratum lucidum. (Lorente de Nó, 1947), denominó a esta región campo CA2. Estudios recientes han demostrado que CA2 tiene entidad propia y establece conexiones funcionalmente importantes y diferentes a las de CA3 y CA1 (Chevalleyre y Siegelbaum, 2010; Ding y Van Hoesen, 2010; Jones y McHugh, 2011). El campo CA1 recibe las aferencias de las colaterales de Schaffer y el punto donde estas terminan fue identificado por Lorente de Nó como el final del hipocampo propiamente dicho (asta de Amón) y el inicio del prosubiculum.

El prosubiculum es frecuentemente ignorado en las descripciones del hipocampo, y muchos autores lo consideran como una zona de transición poco delimitable entre el asta de Amón y el subiculum. En el presente texto se limita a exponer datos sobre el el asta de Amón y el GD, dejando al margen al subiculum o al conjunto de estructuras allocorticales que forman el complejo subicular (prosubiculum, subiculum, presubiculum, postsubiculum y parasubiculum). En conjunto, en roedores, el subiculum es una zona más ancha y más compleja aunque sigue respetando la disposición trilaminar propia del allocórtex (Lorente de Nó, 1947; Amaral, 1978). De todas estas subregiones, el subiculum y el prosubiculum constituyen el origen de algunas de las eferencias más importantes del hipocampo (Meibach y Siegel, 1977; Rosene y van Hoesen, 1977; Swanson y Cowan, 1977). La principal característica del subiculum es la presencia de neuronas piramidales gigantes, mucho mayores que las del asta de Amón, que conforman una capa principal ancha y relativamente densa, características que aumentan conforme el subiculum se “aleja” del asta de Amón (Rosene y van Hoesen, 1987). Además, en el subiculum no se identifica stratum oriens sino una capa llamada multiforme o plexiforme con una región profunda densa de neuronas piramidales pequeñas y otra más superficial formada por neuronas fusiformes (Rosene y van Hoesen, 1987). Las neuronas de CA1 y subiculum uncales son significativamente más pequeñas que las de sus pares en el resto del hipocampo (Ver fig. 6).

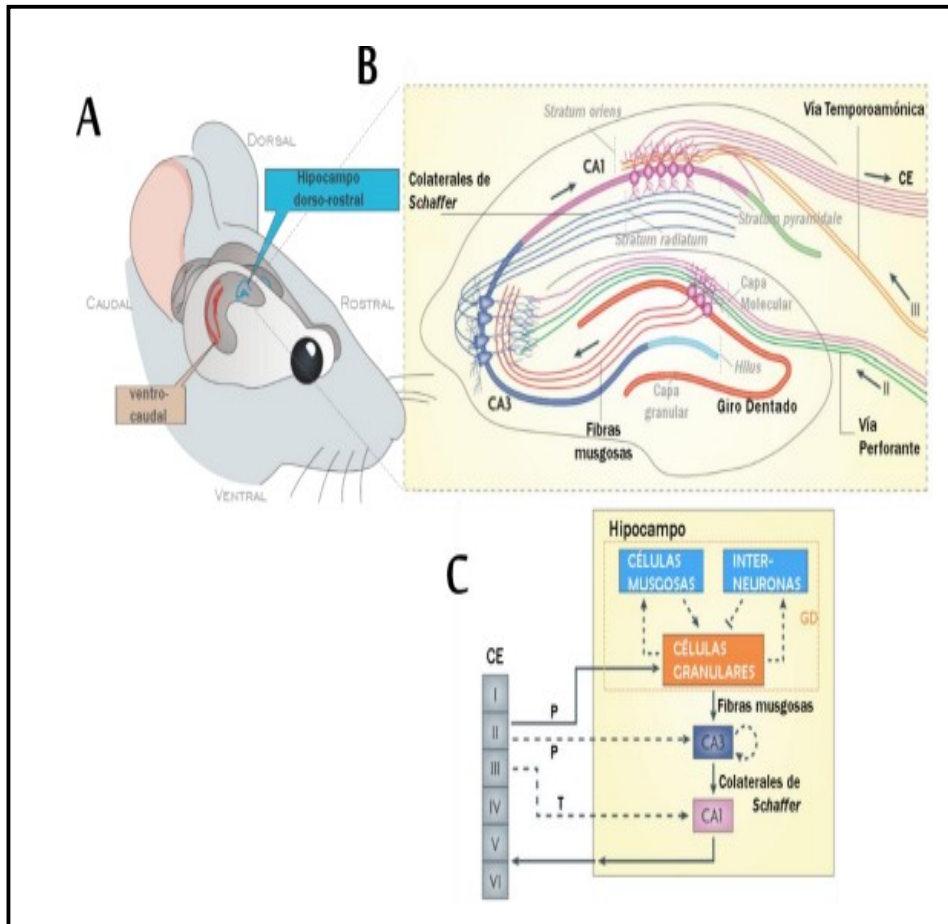


Figura 6. Circuito neuronal del hipocampo de ratón adulto. (A) Localización tridimensional del hipocampo en el encéfalo de ratón adulto en relación a diferentes coordenadas anatómicas. (B-C) Ilustración y diagrama del flujo de información ipsilateral en el hipocampo y su interconexión con la corteza entorrinal (CE). La principal aferencia al hipocampo es la vía perforante (P) que transmite información procedente de la capa II de la CE medial (líneas verdes) y lateral (líneas rosas) a diferentes niveles del árbol dendrítico de las células granulares del giro dentado (GD) situado en la capa molecular. Las neuronas granulares a través de sus axones (fibras musgosas) proyectan hacia las dendritas apicales de las células piramidales de CA3, las cuales inervan las neuronas piramidales de CA1 vía colaterales de Schaffer. Las neuronas de CA1 establecen conexiones de regreso a la CE, aunque a capas más profundas, cerrando así el circuito. A su vez, CA3 también recibe proyecciones directas procedentes de la capa II de CE a través de la vía perforante (P), y CA1 recibe aferencias de la capa III de CE mediante la vía temporoamónica (T). (C) Además, las células de la capa granular de GD conectan con células musgosas e interneuronas del hilus que envían señales excitadoras e inhibitoras respectivamente a las células granulares. Finalmente, las células de CA3 realizan sinapsis con otras neuronas de la misma región y mediante conexiones comisurales contactan con neuronas de CA3 y CA1 del hipocampo contralateral (no mostrado). Imágenes modificadas de (Deng y Gage, 2015).



## 5. HIPÓTESIS

La subnutrición durante la gestación y la lactación de las ratas altera negativamente la memoria espacial cuando los animales son adultos (365 días de vida).

## 6. OBJETIVOS

### Objetivo General

Determinar si la subnutrición durante la gestación y la lactación altera la memoria espacial de ratas en la edad adulta.

### Objetivos Particulares

Determinar si el tiempo que demora la solución del laberinto “T” de ratas macho subnutridas *in útero* y hasta los 25 días de edad es diferente al de sus controles a 365 días de nacidos.

Determinar si número de errores cometidos en un laberinto “T” de ratas macho subnutridas *in útero* y hasta los 25 días de edad es diferente al de sus controles a 365 días de nacidos.

Determinar si los pesos corporal, encefálico y cerebral de ratas macho subnutridas *in útero* y hasta los 25 días de edad es diferente al de sus controles a 365 días de nacidos.

Determinar si el espesor de las capas de la corteza del hipocampo de ratas macho subnutridas *in útero* y hasta los 25 días de edad es diferente al de sus controles a 365 días de nacidos.

## 7. MATERIALES Y MÉTODOS

El protocolo de experimentación fue aprobado por el Comité de Ética en el Uso de Animales (CEUA) de Facultad de Veterinaria (UdelaR) (protocolo: 573/17).

### 7.1 DISEÑO EXPERIMENTAL

El experimento abarcó la restricción alimentaria de las crías durante la gestación (limitando la alimentación materna) y la lactación (aumentando el número de crías lactantes por camada). Se llevó a cabo en el laboratorio de experimentación animal de la Facultad de Veterinaria. Los animales fueron alojados con 12 hs de luz diarias y a 22°C. Se utilizó siempre el mismo tipo de ración balanceada (23% proteína; 8% fibra; 2,5% calcio; 1,25 % fosforo).

Se utilizaron 30 ratas Wistar primíparas, servidas por el mismo macho. Contaban con pesos corporales de  $232,5 \pm 10.5$  gramos, y tres meses de vida al inicio del experimento. Fueron asignadas al azar a cada uno de los grupos experimentales una vez diagnosticada la gestación la cual se describe a continuación.

Se diagnosticó gestación por frotis vaginal diario, modificado del procedimiento descrito por Marcondes (2002), implicó (en horas de la mañana) colocar y retirar en la misma maniobra 100 micro litros de suero fisiológico intra vaginal con cuentagotas. Se observó al microscopio el líquido resultante extendiendo en un portaobjetos y se determinó como día 1 al día de la aparición de espermatozoides en el frotis.

#### Período de gestación de las ratas

Con las hembras positivas se organizaron los siguientes grupos experimentales:

**Grupo control** (grupo C, n= 8): alimentados *ad libitum* con agua y ración.

**Grupo subnutrido** (grupo S, n=8): alimentado durante toda la gestación y hasta el parto con 50% del consumo *ad libitum* diario materno (datos de consumo *ad libitum* obtenidos en un experimento preliminar); los consumos fueron ajustados con el registro de consumo de los animales ya adjudicados al grupo control diariamente a lo largo de la gestación.

Las ratas gestantes tratadas fueron alojadas individualmente desde el inicio del experimento

En ambos grupos se tomó diariamente el peso corporal materno y se estableció como criterio de punto final experimental de las hembras tratadas la pérdida de más del 10% del peso corporal al inicio del experimento. Sin embargo ningún animal llegó a esa pérdida de peso final.

### Período de lactación de las ratas

Desde el día del parto (días 21-22 del experimento) ambos grupos de madres pasaron a tener alimento y agua *ad libitum*. Las camadas del grupo **C** estaban compuestas por 8 crías (retirando o agregando crías marcadas de otras madres si fuera necesario) hasta el destete, mientras que en el grupo **S** tuvieron 14 crías por camada durante la lactación. Las madres fueron pesadas cada 7 días durante este período, que duró 25 días. Las crías fueron identificadas de manera individual y permanente por perforaciones en el pabellón auricular, y fueron destetadas a los 25 días de vida.

### Período de crecimiento adulto de las ratas

Una vez destetados los animales (25 días de vida) fueron alojados en cajas de a 5 individuos, con alimento y agua *ad libitum* hasta los 365 días de vida.

Grupo control (N=8); Grupo subnutrido (N=8). (De aquí en más se va a seguir con ese N por grupo).

## **7.2 MEDICIÓN DE VARIABLES COMPORTAMENTALES**

A cada una de las ratas se las hizo pasar por un laberinto de múltiple T durante 6 días consecutivos, registrando sus performances en video para luego obtener datos de interés a fin de su análisis. Se midieron 2 tipos de variables: tiempo y errores.

**Tiempo total:** es el tiempo en segundos que demora cada individuo desde que se lo coloca adentro del laberinto hasta que llegan a la meta (lugar del laberinto al cual se llega a través de un camino sinuoso en donde está la ración que utilizamos como recompensa generando un estímulo positivo). Pasados los 300 segundos dentro del circuito sin que hayan llegado a la meta, dejamos de cronometrar y damos por finalizada la pasada de ese animal, asignándole ese valor de tiempo (300 seg, aunque demore más).

**Tiempo distante (Td):** Tiempo en segundos en que cada rata se encuentra dentro de la parte del laberinto que forma la "T" más distante al punto de llegada.

**Tiempo plaza (Tp):** Tiempo en segundos en que cada rata se encuentra dentro de la parte del laberinto llamado “plaza” que se localiza más ó menos equidistante entre el punto de partida y la meta.

**Tiempo objetivo (To):** Tiempo en segundos en que cada rata se encuentra dentro de la parte del laberinto que conforma la “T” donde se encuentra la meta.

**Errores:** Se entiende como “error” a la opción de camino que tome la rata en el trayecto hacia la meta que la desvíe del objetivo, habiendo previamente estandarizado el camino más directo a criterio de quien luego procese los videos (debe mantenerse siempre la misma perspectiva).

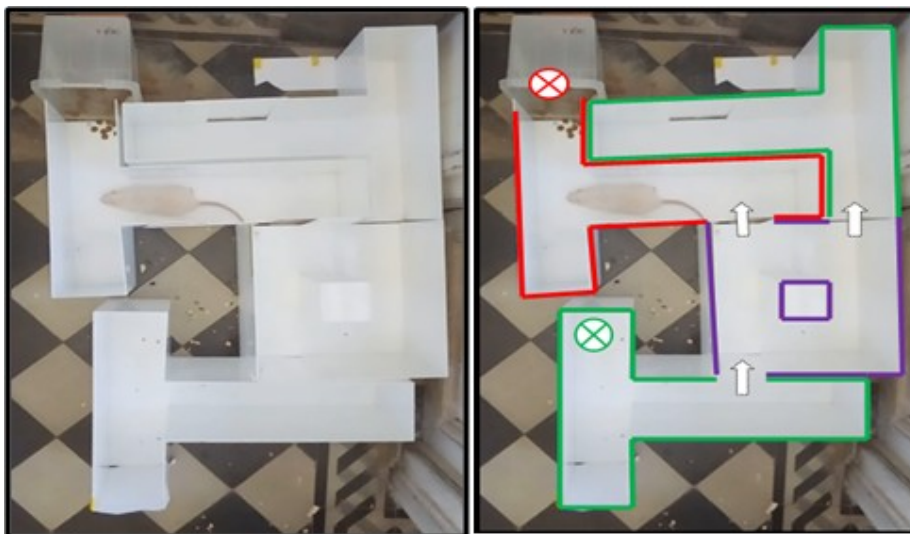


Figura 7: Laberinto de 3T, con los distintos sectores señalizados.

Td= T distantes al objetivo; Tp= T plaza; To= T objetivo

### 7.3 MUESTREO Y PROCESAMIENTO HISTOLÓGICO

Una vez finalizado el pasaje de ambos grupos (C y S) por el laberinto (una semana después) se procedió al muestreo. En primer lugar, previo al sacrificio se registró el peso corporal de cada individuo. El sacrificio se llevó a cabo respetando las normas de bienestar animal, cumpliendo con las disposiciones legales nacionales e internacionales. Los animales fueron anestesiados con Ketamina y Xilacina intraperitoneal (70 mg/kg de Ket. + 10ml/kg de Xil.) previo a la decapitación.

Sus encéfalos fueron removidos del cráneo. Se tomó el peso del encéfalo total. Fueron fijados por inmersión con solución buffer de paraformaldehído al 4% y

almacenados en etanol 70° (v/v). Posteriormente, se diseccionó el cerebro de los animales, se pesó y se calculó el índice cerebro somático (ICS).

Los hemisferios cerebrales izquierdos fueron procesados con pasajes en concentraciones crecientes de etanol, impregnados en cloroformo y finalmente parafina líquida para confeccionar bloques que luego se cortaron en secciones de 5 micrómetros de espesor, en sentido longitudinal, parasagital.

## 7.4 Histología cuantitativa

Los cortes histológicos teñidos con Hematoxilina y Eosina fueron examinados con un sistema de análisis de imágenes: microscopio óptico Olympus BX50, (Olympus, Tokio, Japon), video cámara (SSC-C158P; Sony, Tokio, Japón) y computadora personal con el programa Image Pro Plus (Media Cybernetics, Silver Spring, MA, USA) a un aumento final de 400 x en el monitor de la pc. Se midió el espesor de cada capa de la corteza del hipocampo: espesor de la capa granular (o principal) del asta de Ammón: regiones ECA1, ECA2, ECA3; espesor de la capa granular o principal del Giro Dentado en su rama dorsal (EGDD), ventral (EGDV) y en el vértice del mismo (EGDVE), así como también la longitud de las ramas ventrales y dorsales del GD que luego se sumaron, obteniendo la longitud total del giro dentado (LTGD) para hacer los cálculos estadísticos (ver fig. 8). Grupo control (N=8); Grupo Subnutrido (N=8).

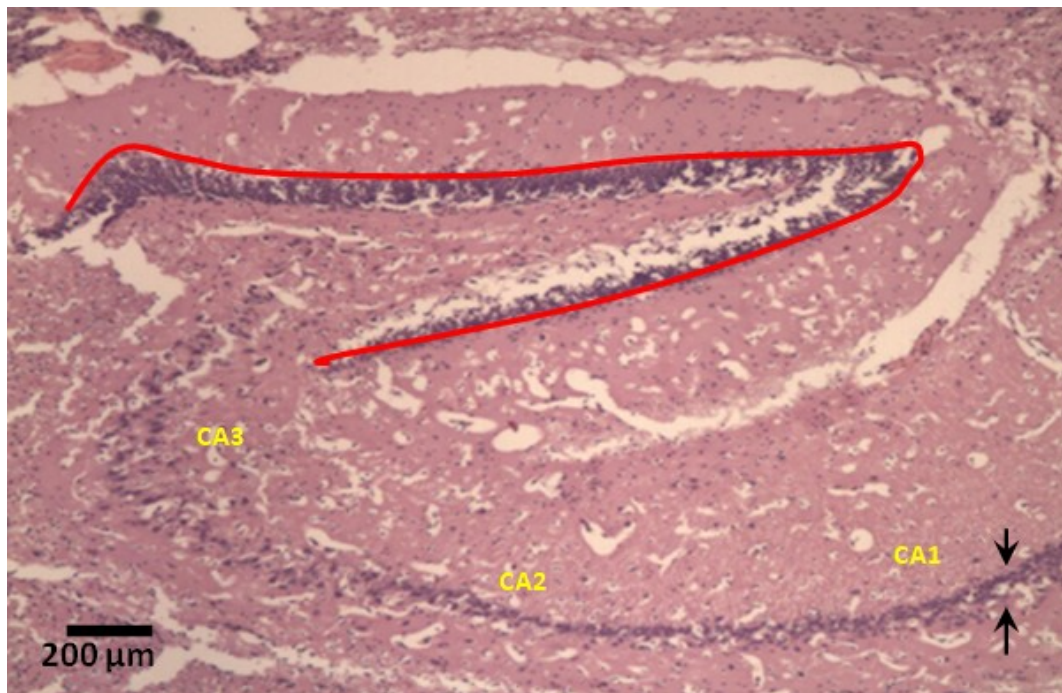


Figura 8: Fotografía de hipocampo de ratas de 365 días de vida. Teñido con hematoxilina y eosina. La línea roja representa la longitud del giro dentado (LTG). Entre las flechas negras se observa el espesor del hipocampo a nivel de la región CA1. Con letras amarillas se marcan las regiones del hipocampo. Imagen obtenida a 40x.

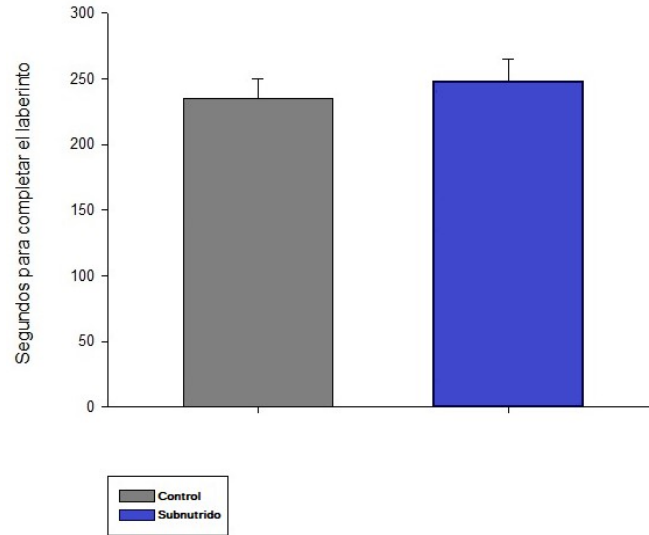
## **7.5 Análisis estadístico**

Todas las variables cuantitativas fueron expresadas como medias  $\pm$  ds. Se estudió la distribución normal de las variables medidas con el test de Shapiro-Wilk. Se estimó los efectos de grupo e individuo dentro de grupo. La variación entre ratas dentro de un mismo tratamiento fue considerada como parte del error experimental cuando se analizaron las diferencias entre tratamientos. Tanto las diferencias entre grupos en las variables histológicas cuantitativas, así como el peso encefálico y las variables comportamentales fueron comparadas por ANOVA. Los valores fueron considerados diferentes a  $P \leq 0,05$  y se estudiaron las diferencias *post hoc* entre grupos con test de Tukey.

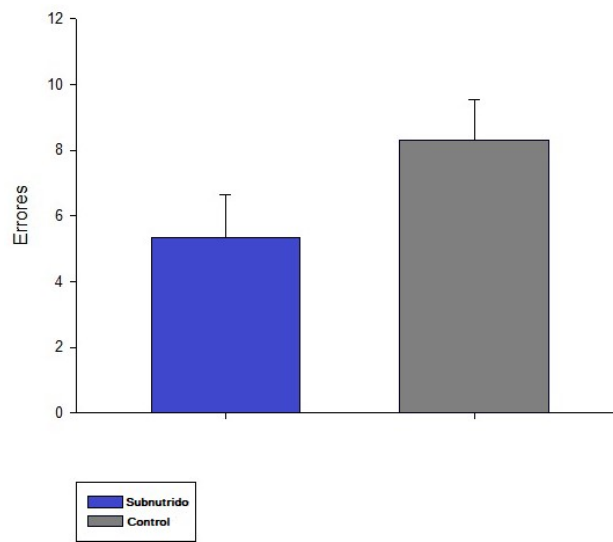
## 8. RESULTADOS

### RESULTADOS DE VARIABLES COMPORTAMENTALES

Cuando analizamos las variables comportamentales (número de errores y tiempo total) dentro del laberinto y a lo largo de los sucesivos días, no se encontraron diferencias significativas entre el grupo control y el grupo subnutrido (ver gráficos 1 y 2).



**Figura 9.** Medias y desvíos de tiempo (seg) que utilizaron los animales en los grupos **C** y **T** en realizar el laberinto de 3T.



**Figura 10.** Medias y desvíos de los errores (N) que cometieron los animales pertenecientes a los grupos **C** y **T** en realizar el laberinto de 3 T.

## **RESULTADOS MACROSCÓPICOS**

Encontramos diferencias en los pesos: corporal, encefálico y cerebral entre el grupo control y el subnutrido. No encontramos diferencias en el índice encéfalo /somático entre los grupos C y S. (Ver tabla 1).

**Tabla 1.** Medias y desvíos del peso corporal, encefálico, cerebral e índice encéfalo/ somático a los 365 días de vida en los grupos C y S.

Grupos	Peso corporal (g)	Peso encefálico (g)	Peso cerebral (g)	Índice encéfalo/somático
C	579,9 ± 34,1	2,3 ± 0,1	1,61 ± 0,06	0,004 ± 0,0002
S	532,8 ± 25,5*	2,1 ± 0,08**	1,5 ± 0,09*	0,004 ± 0,0001

\*: P<0.05; \*\*: 0.001≤P<0.051 comparados con el grupo control.

## **RESULTADOS HISTOLÓGICOS**

De las variables estudiadas encontramos diferencias únicamente en la región del hipocampo CA1 (ver tabla 2).

**Tabla 2.** Variables Histológicas del hipocampo. Espesores en micras de la capa granular del asta de Ammón: ECA1, ECA2, ECA3; espesor de la capa granular Giro Dentado en su rama dorsal (EGDD), ventral (EGDV) y vértice (EGDVE). Longitud total del giro dentado (LTGD).

Variables (µm)	Grupo Control (C)	Grupo Subnutrido (S)
ECA1	181,7 ± 15,0*	239,0 ± 22,5
ECA2	79,8 ± 5,2	86,7 ± 3,8
ECA3	304,8 ± 13,6	326,0 ± 25,9
EGDD	104,9 ± 12,0	120,3 ± 12,3
EGDV	76,4 ± 8,4	91,3 ± 10,1
EGDVE	128,5 ± 24,3	143,4 ± 24,1
LTGD	4152,4 ± 103,3	4253,3 ± 142,9

\*: P<0.05 comparados con el grupo control.



## 8. DISCUSIÓN

### Variables comportamentales

En nuestro trabajo, el estudio comportamental en ratas macho de 365 días de vida que fueron sometidas a subnutrición en el periodo perinatal (gestación y lactación) a las cuales llamamos “S” y ratas controles de la misma edad y origen genético sin haber sufrido la restricción en esas primeras etapas de la vida a las que llamamos “C”, no prueban la hipótesis de respuesta diferencial ya que no se evidencian disimilitudes significativas. Estos resultados abarcan tanto el tiempo de ejecución del laberinto como el número de errores que cometieron en el transcurso del mismo. Nuestros resultados difieren con los de Sanchez Turet y colaboradores, (1975). Estos investigadores bajo condiciones de trabajo muy similares a las nuestras (tipo de restricción, periodo de restricción) encuentran que en ratas Sprague Dawley a las 15 semanas de edad (105 días de vida) exhiben diferencias muy significativas entre los grupos “S y C” de su modelo. Esta diferencia nos hace pensar que el crecimiento compensatorio que ocurre en las etapas desde neonato hasta adulto se vió afectada, ya que según Duran Fernandez-Feijoo y colaboradores, (2017) el crecimiento postnatal después de la restricción del crecimiento intra uterino es fundamental para la consolidación de la memoria en modelos animales. Sin embargo, es bien sabido que está relacionado con mayor riesgo de disfunción metabólica, ya que por programación fetal se generó lo que se llama un “fenotipo ahorrador” que son individuos que están preparados para llevar a cabo sus funciones metabólicas en ambientes más empobrecidos, en respuesta a lo que predijo la adversidad intra uterina, en definitiva la definición de programación fetal.

Teniendo esto en cuenta, se considera que el verdadero desafío es encontrar el equilibrio correcto del aumento de peso temprano en la población restringida para evitar la obesidad y diabetes por un lado y las dificultades de aprendizaje por otro, ya que tanto una sobrenutrición como una nutrición deficiente generan estos problemas a largo plazo.

En efecto, las hembras subnutridas tanto de nuestro modelo experimental como las de Sanchez Turet y colaboradores, (1975) y Duran Fernandez-Feijoo y colaboradores, (2017) tienen en común el tipo de restricción alimentaria que se basa en una disminución de entre un 40% y un 50% de la dieta diaria *ad libitum* que consumieron los grupos C, sin castigar el aporte proteico o de algún otro oligo elemento en particular.

Por lo que teniendo en cuenta que la mayoría de los modelos experimentales de subnutrición perinatal se basan en la restricción de proteínas en las dietas y siendo estas el componente principal neurotrófico es esperable que los resultados no sean tan drásticos en nuestro trabajo en comparación con los

estudios de otros autores. El trabajo de Cordoba y colaboradores, (1994) muestra que con subnutriciones proteicas en torno al 8% en edad perinatal induce, (incluso después de un largo periodo de recuperación nutricional) un déficit en la navegación eficiente del lugar en ratas adultas. Este efecto también es mencionado por varios autores en diferentes regiones del hipocampo. En el caso de Cintra y colaboradores, (1997) utilizaron un modelo de subnutrición proteica prenatal y estudiaron su impacto sobre las células piramidales CA1 en ratas de edades (15, 30, 90 y 220 días). Por otro lado Díaz-Cintra y colaboradores, (1994) estudiaron el efecto de la subnutrición proteica prenatal y la rehabilitación nutricional pos natal sobre las células piramidales del hipocampo en la región CA3 en ratas de (15, 30, 90 y 220 días de vida) y por último Díaz- Cintral y colaboradores, (1991) estudiaron los efectos de la privación prenatal de proteínas en el desarrollo posnatal de células granulares en el giro dentado del hipocampo, también en las mismas cuatro edades (15, 30, 90 y 220 días). Lo interesante es que los tres trabajos mencionados anteriormente concluyen en que existe una distribución bimodal de cambios en la plasticidad neuronal, con un período aparente de “rehabilitación” en el día 90, ya que se observa menos escasez en los componente citoarquitectónicos de las distintas regiones, en un intento de recuperación o de adaptación cerebral a la desnutrición pero queda sin éxito más adelante ya que se generó un déficit para seguir el ritmo de desarrollo neural normal a los 220 días. Esto podría explicar por qué nosotros no encontramos diferencias en nuestras variables y con nuestras condiciones experimentales. Tal vez no sea solo una cuestión de edad del estudio sino la mezcla entre edad y el tipo de subnutrición planteadas en esta tesis.

### Variables macroscópicas

En cuanto al resultado del peso corporal, encontramos que la subnutrición durante la gestación y la lactación afectan el peso corporal de los animales al nacer y a los 365 días de vida. Este resultado confirma evidencias previas (González-Cossío et al., 1998). Incluso en un modelo similar en ratas ya se verificó que este tratamiento afecta el peso corporal y el testicular (Genovese et al., 2010). Un aspecto a tener en cuenta que explicaría porque afecta a la variable peso corporal y peso cerebral pero el índice encéfalo somático se mantiene constante en ambos grupos, es que la estrategia de adaptación a la subnutrición intrauterina que provoca retardo en el crecimiento parece estar asociada a una redistribución del gasto cardíaco y a la priorización de los órganos centrales (cerebro, miocardio y glándulas suprarrenales) en detrimento de órganos periféricos, es el llamado efecto de conservación del cerebro (Pérez- Clariget y Bielli, 2014).

En nuestro caso no hay dudas de que los animales gestaron en un ambiente uterino negativo en cuanto a los nutrientes disponibles para el desarrollo fetal. Esto queda claro al analizar el comportamiento de las madres durante la gestación. En nuestro trabajo las madres de los grupos “S” perdieron peso y las del grupo “C” ganaron peso al final de la gestación. Esto nos lleva a pensar que los fetos tuvieron que adaptarse a la falta de nutrientes y seguramente priorizaron las necesidades de los órganos centrales que se mantuvieron más o menos estables a expensas del esfuerzo metabólico materno. Por otra parte la subnutrición durante la gestación como tratamiento en sí, causa neonatos más livianos, más cortos y camadas más pequeñas (datos del experimento que no abarcan a esta tesis). Sin embargo el índice encéfalo somático (IES) no muestradiferencias entre grupos, por lo que podemos asumir que existió efecto de conservación del cerebro. Estos efectos son sostenidos en el tiempo ya que los animales de la presente tesis tuvieron las mismas diferencias en estas variables entre los grupos S y C, lo que marca claramente efecto de programación fetal por subnutrición.

### Variables morfométricas

Desde una perspectiva mensurable nuestro trabajo utilizó la técnica histológica como herramienta para evaluar distintas regiones del hipocampo con el fin de correlacionarlos con los efectos comportamentales. En el estudio histológico encontramos una pequeña tendencia en la región CA1 en donde detectamos que su espesor era mayor en animales “S” en comparación con los animales “C”.

En cuanto a las variables histológicas medidas, considerando evidencias recientes podrían reevaluarse las variables seleccionadas para futuros estudios. Posteriormente a las mediciones y en el desarrollo de la escritura de esta tesis, hemos encontrado trabajos (Barra Rafael et al., 2019; Moody, Chen y Pan, 2017) quienes con una restricción alimentaria muy similar a la nuestra (que ronda en torno al 40-50% de la alimentación que consumían esos animales *ad libitum* en la gestación y la lactación) buscaron efectos de carácter citológico o bioquímico/molecular en el hipocampo y otras regiones cerebrales. En estas otras variables encontraron empobrecimiento de los recursos neuronales dentro de los que se destacan: menor densidad de espinas dendríticas en las distintas regiones del hipocampo, arborizaciones dendríticas menos pobladas, menor densidad de neuronas en algunas regiones, somas neuronales más pequeños, disminución del diámetro de las fibras mielinizadas y amielinizadas, menor proliferación celular, disminución en la plasticidad neuronal dependiente de BDNF (factor neurotrófico derivado del cerebro), sinapsis retardadas, etc. Sin embargo, a pesar del tratamiento aplicado los impactos en su gran mayoría no se vieron reflejados en la performance de la memoria espacial o el aprendizaje en estas ratas.

## Discusión del resultado CA1

Es complejo interpretar el resultado obtenido en la región del hipocampo CA1. Sin embargo, algunos autores encontraron una tendencia similar al aplicar distintos factores estresantes en la etapa perinatal. En un trabajo que utilizó factores estresantes durante el periodo perinatal, se encontró que los animales tienen alterada la morfología dendrítica y la conectividad sináptica en la corteza prefrontal con una pérdida en el número de neuronas y el número estimado de sinapsis en hipocampo a pesar de exhibir una mayor densidad en el espesor de la región CA1 (Mychasiuk et al., 2012). (misma variable morfométrica que la medida en esta tesis)

Por otro lado Bock y colaboradores, (2011) encontraron que este diseño de estrés materno durante la gestación puede provocar disfunciones emocionales y cognitivas en la descendencia, en su experimento se sometieron a variados estresores y los resultados arrojaron que la región CA1 del hipocampo en la descendencia estresada (grupo tratado) aumentó la densidad de las neuronas piramidales solo en los machos.

Los resultados de estos autores sugieren que los efectos estresantes pueden afectar el ciclo de maduración y poda dendrítica normal en CA1 durante el desarrollo, lo que podría resultar en un exceso de sinapsis menos eficientes, lo que es posible que explique el aumento en el espesor de CA1. Sin embargo, nuestras variables no se enfocaron en medir este ciclo. En este punto entendemos que es necesario continuar los estudios sobre estas muestras con encares diferentes y variables diferentes también.

## 9. CONCLUSIONES

Podemos concluir que en nuestras condiciones experimentales los efectos de la subnutrición por restricción del alimento al 50% de su consumo *ad libitum* durante la gestación y la lactación en las ratas macho, no alteró la memoria espacial cuando los animales fueron adultos a los 365 días de vida.

Al igual que diversos autores comprobamos que la subnutrición durante la gestación y la lactación determinó menor peso corporal.

En nuestras condiciones no encontramos efecto del tratamiento sobre las variables morfométricas estudiadas salvo en la región CA1 que requiere de futuros estudios para explicar el resultado obtenido.

## 9. BIBLIOGRAFÍA

1. Abud, M.J. (2015). Efecto de la oferta de forraje de campo natural sobre el desarrollo fetal de corderos con especial énfasis en el desarrollo muscular (Tesis de maestría) Facultad de Agronomía, UdelaR.
2. Amaral, D. G. (1978). A Golgi study of cell types in the hilar region of the hippocampus in the rat. *Journal of Comparative Neurology*, 182(4 Pt 2), 851–914. doi: 10.1002/cne.901820508
3. Atlas histológico de la Universidad de los Andes, Venezuela. Recuperado de <http://www.medic.ula.ve/histologia/anexos/atlas/15/?C=M;O=A>
4. Barker, D. J. (2004). Developmental origins of adult health and disease. *Journal of Epidemiology and Community Health*, 58(2), 114–115. doi: 10.1136/jech.58.2.114
5. Barra, R., Morgan, C., Sáez-Briones, P., Reyes-Parada, M., Burgos, H., Morales, B., & Hernández, A. (2019). Facts and hypotheses about the programmin neuroplastic deficits by prenatal malnutrition. *Nutrition Reviews*, 77(2), 65–80. doi: 10.1093/nutrit/nuy047
6. Bock, J., Murmu, M. S., Biala, Y., Weinstock, M., & Braun, K. (2011). Prenatal stress and neonatal handling induce sex-specific changes in dendritic complexity and dendritic spine density in hippocampal subregions of prepubertal rats. *Neuroscience*, 193, 34–43. doi: 10.1016/j.neuroscience.2011.07.048
7. Braun, A. A., Graham, D. L., Schaefer, T. L., Vorhees, C. V., & Williams, M.T. (2012). Dorsal striatal dopamine depletion impairs both allocentric and egocentric navigation in rats. *Neurobiology of Learning and Memory*, 97(4), 402–408. doi: 10.1016/j.nlm.2012.03.004
8. Burgess N. (2006). Spatial memory: how egocentric and allocentric combine. *Trends in Cognitive Sciences*, 10(12), 551–557. doi: 10.1016/j.tics.2006.10.005
9. Cajal, S. R. (1911). *Histologie du système nerveux de l'Homme et des vertèbres*. Maloine (Paris), 2, 891-942.
10. Cal-Pereyra, L., Acosta-Dibarrat, J., Benech, A., Da Silva, S., Martín, A., & González-Montaña, J. R. (2012). Toxemia de la gestación en ovejas: Revisión. *Revista mexicana de ciencias pecuarias*, 3(2), 247-264.
11. Caldwell, D., & Churchill, J. (1967). Learning ability in the progeny of rats administered a protein deficient diet during the second half of gestation. *American Academy of Neurology*, 17 (1), 95-99.
12. Castro, M. J. (2020). Programación fetal. *Revista Digital de Postgrado*, 9(2).
13. Chevaleyre, V., & Siegelbaum, S. A. (2010). Strong CA2 pyramidal neuron synapses define a powerful disinhibitory cortico-hippocampal loop. *Neuron*, 66(4), 560–572. doi: 10.1016/j.neuron.2010.04.013
14. Cintra, L., Aguilar, A., Granados, L., Galván, A., Kemper, T., DeBassio, W., Díaz-Cintra, S. (1997). Effects of prenatal protein malnutrition on hippocampal CA1 pyramidal cells in rats of four age groups. *Hippocampus*, 7(2), 192–203. doi:10.1002/(SICI)10981063(1997)7:2<192::AID-HIPO6>3.0.CO;2-P37
15. Cooper, C.R., Bhatia, J.K., Muenchen, H.J., Mc Lean, L., Hayasaka, S., Taylor, J., Poncza, P.J., Pienta, K.J. (2002). The regulation of prostate cancer cell adhesion to human bone marrow endothelial cell monolayers by

- androgen dihydrotestosterone and cytokines. *Clinical & Experimental Metastasis*, 19 (1), 25-33.
16. Córdoba, N. E., Arofo, M. P., Brioni, J. D., & Orsingher, O. A. (1994). Perinatal undernutrition impairs spatial learning in recovered adult rats. *Acta physiologica, pharmacologica et therapeutica latinoamericana*, 44(3), 70–76.
  17. Crystal, J.D. (2010). Episodic-like memory in animals. *Behavioural Brain Research*, 215(2), 235–243. doi:10.1016/j.bbr.2010.03.005
  18. Daniel, Z. C., Brameld, J. M., Craigon, J., Scollan, N. D., & Buttery, P. J. (2007). Effect of maternal dietary restriction during pregnancy on lamb carcass characteristics and muscle fiber composition. *Journal of Animal Science*, 85(6), 1565–1576. doi: 10.2527/jas.2006-743
  19. Deiana, S., Platt, B. y Riedel, G. (2011). The cholinergic system and spatial learning. *Behavioural Brain Research*, 221(2), 389–411. doi: 10.1016/j.bbr.2010.11.036
  20. Deng, W., & Gage, F. H. (2015). The effect of immature adult-born dentate granule cells on hyponeophagial behavior is related to their roles in learning and memory. *Frontiers in Systems Neuroscience*, 9, 34. doi:10.3389/fnsys.2015.00034
  21. Desai, M., & Hales, C.N. (1997). Role of fetal and infant growth in programming metabolism in later life. *Biological Reviews Cambridge Philosophical Society*, 72(2), 329-348.
  22. Dew, I., & Cabeza, R. (2011). The porous boundaries between explicit and implicit memory: behavioral and neural evidence. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1224, 174–190. doi: 10.1111/j.1749-6632.2010.05946.x
  23. Díaz-Cintra, S., García-Ruiz, M., Corkidi, G., & Cintra, L. (1994). Effects of prenatal malnutrition and postnatal nutritional rehabilitation on CA3 hippocampal pyramidal cells in rats of four ages. *Brain Research*, 662(1-2), 117–126. doi: 10.1016/0006-8993(94)90803-6
  24. Ding, S. L., & Van Hoesen, G. W. (2010). Borders, extent, and topography of human perirhinal cortex as revealed using multiple modern neuroanatomical and pathological markers. *Human Brain Mapping*, 31(9), 1359–1379. doi: 10.1002/hbm.20940
  25. Duran Fernandez-Feijoo, C., Carrasco Carrasco, C., Villalmazo Francisco, N., Cebrià Romero, J., Fernández Lorenzo, J. R., Jiménez-Chillaron, J. C., & Camprubí Camprubí, M. (2017). Influence of catch up growth on spatial learning and memory in a mouse model of intrauterine growth restriction. *PloS one*, 12(5), e0177468. doi: 10.1371/journal.pone.0177468
  26. Durán, P. (2004). Nutrición temprana y enfermedades en la edad adulta: acerca de la "hipótesis de Barker". *Archivos argentinos de pediatría*, 102(1), 26-34.
  27. Eichenbaum H. (1997). Declarative memory: insights from cognitive neurobiology. *Annual Review of Psychology*, 48, 547–572. doi: 10.1146/annurev.psych.48.1.547
  28. Eichenbaum, H., Stewart, C., & Morris, R. G. (1990). Hippocampal representation in place learning. *Journal of Neuroscience*, 10(11), 3531–3542. doi: 10.1523/JNEUROSCI.10-11-03531.1990
  29. Engelbregt, M.J., Houdijk, Y.O., Popp-Snijders, C., & Delemarre-Van de Waal, H.A. (2000). Los efectos del retraso del crecimiento intrauterino y la desnutrición postnatal sobre el inicio de la pubertad en ratas machos y hembras. *Pediatric Research*, 48(6), 803-807.

30. Fahey, A. J., Brameld, J. M., Parr, T., & Buttery, P. J. (2005). The effect of maternal undernutrition before muscle differentiation on the muscle fiber development of the newborn lamb. *Journal of Animal Science*, 83(11), 2564–2571. doi: 10.2527/2005.83112564x
31. Ferbinteanu, J., Kennedy, P.J. & Shapiro, M.L. (2006). Episodic memory—From brain to mind. *Hippocampus*, 16(9), 691–703. doi: 10.1002/hipo.20204
32. Fernandez, G. (2000). Situación de los recursos genéticos domésticos locales del Uruguay. *Archivo de zootecnia*, 49(187), 333-340.
33. García-Roche Sarocco, M.M. (2017). Impacto del balance energético negativo sobre la función mitocondrial en el hígado bovino. <https://www.colibri.udelar.edu.uy/jspui/bitstream/20.500.12008/19443/1/uy24-18739.pdf>
34. Genovese, P., Herrera, E., Riaño, V., & Bielli, A. (2019). Subnutrition Effects During Pregnancy and Lactation on Mitosis, Apoptosis and Androgen Receptor Expression in the Rat Testis. *Reproduction in Domestic Animals*, 54(3), 506-513.
35. Genovese, P., Riaño, V., Alzugaray, E., Pombo, C., & Bielli, A. (2011). Undernutrition from fetal life to puberty, fetal programming and compensatory growth in rat testes. En *Undernutrition effect, causes and management*. Editorial Nova Science Publishers, Inc. 400. NY 11788.
36. Genovese, P., Núñez, M. E., Pombo, C., & Bielli, A. (2010). Undernutrition during foetal and post-natal life affects testicular structure and reduces the number of Sertoli cells in the adult rat. *Reproduction in domestic animals = Zuchthygiene*, 45(2), 233–236. doi: 10.1111/j.1439-0531.2008.01244.x
37. González-Cossío, T., Sanín, L. H., Hernández-Avila, M., Rivera, J., & Hu, H. (1998). Longitud y peso al nacer: el papel de la nutrición materna. *Salud pública de México*, 40, 119-126.
38. Hu, D., Xu, X., & Gonzalez-Lima, F. (2005). Hippocampal cytochrome oxidase activity of rats in easy and difficult visual discrimination learning. *International Journal of Neuroscience*, 115(5), 595–611. doi: 10.1080/00207450590523440
39. Ithurralde, J., Pérez-Clariget, R., Saadoun, A., Genovese, P., Cabrera, C., López, Y., Bielli, A. (2021). Gestational nutrient restriction under extensive grazing conditions: Effects on muscle characteristics and meat quality in heavy lambs. *Meat Science*, 179, 108532. doi: 10.1016/j.meatsci.2021.10853
40. Jones, M. W., & McHugh, T. J. (2011). Updating hippocampal representations: CA2 joins the circuit. *Trends in Neurosciences*, 34(10), 526–535. doi: 10.1016/j.tins.2011.07.00739
41. Kessels, R. P., de Haan, E. H., Kappelle, L. J., & Postma, A. (2001). Varieties of human spatial memory: a meta-analysis on the effects of hippocampal lesions. *Brain research. Brain Research Reviews*, 35(3), 295–303. doi: 10.1016/s0165-0173(01)00058-3
42. Lafon, M., Vidal, M., & Berthoz, A. (2009). Selective influence of prior allocentric knowledge on the kinesthetic learning of a path. *Experimental Brain Research*, 194(4), 541–552. doi: 10.1007/s00221-009-1728-2
43. Lashley, K.S. (1950). En busca del engrama. *Society for Experimental Biology, Mecanismos fisiológicos en el comportamiento animal. (Simposio de la Sociedad IV.)* (pp. 454–482).
44. Lorente de No R. (1947). A study of nerve physiology. *Studies from the Rockefeller institute for medical research. Reprints.* Rockefeller Institute for



- Medical Research, 132, 1–548.
45. McDonald, J. W., & Sadowsky, C. (2002). Spinal-cord injury. *Lancet*, 359(9304), 417–425. doi: 10.1016/S0140-6736(02)07603-1
  46. Megías, M., Molist, P., & Pombal, M.A. (2019). Atlas de histología vegetal y animal. Órganos animales. Recuperado de [http://mmegias.webs.uvigo.es/2-organos-a/guiada\\_o\\_a\\_inicio.php](http://mmegias.webs.uvigo.es/2-organos-a/guiada_o_a_inicio.php)
  47. Meibach, R. C., & Siegel, A. (1977). Efferent connections of the hippocampal formation in the rat. *Brain Research*, 124(2), 197–224. doi: 10.1016/0006-8993(77)90880-0
  48. Mittelstaedt, M. L., & Mittelstaedt, H. (1980). Homing by path integration in a mammal. *Die Naturwissenschaften*, 67(11), 566-567.
  49. Moody, L., Chen, H., & Pan, Y. X. (2017). Early-Life Nutritional Programming of Cognition-The Fundamental Role of Epigenetic Mechanisms in Mediating the Relation between Early-Life Environment and Learning and Memory Process. *Advances in Nutrition*, 8(2), 337–350. doi: 10.3945/an.116.014209
  50. Moreno, J.M., & Dalmau, J. (2001). Alteraciones en la nutrición fetal y efectos a largo plazo: ¿algo más que una hipótesis? *Acta pediátrica española*, 59(10), 50-58.
  51. Morris, R. G. (2001). Episodic-like memory in animals: psychological criteria, neural mechanisms and the value of episodic-like tasks to investigate animal models of neurodegenerative disease. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 356(1413), 1453–1465. doi: 10.1098/rstb.2001.0945
  52. Morris, R. G., Garrud, P., Rawlins, J. N., & O'Keefe, J. (1982). Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions. *Nature*, 297(5868), 681–683. doi: 10.1038/297681a0
  53. Mulligan, N. W. (2012). Differentiating between conceptual implicit and explicit memory: a crossed double dissociation between category-exemplar production and category-cued recall. *Psychological science*, 23(4), 404–406. doi: 10.1177/095679761143333540
  54. Mychasiuk, R., Gibb, R., & Kolb, B. (2012). Prenatal stress alters dendritic morphology and synaptic connectivity in the prefrontal cortex and hippocampus of developing offspring. *Synapse (New York, N.Y.)*, 66(4), 308–314. doi: 10.1002/syn.21512
  55. Nordby, D. J., Field, R. A., Riley, M. L., & Kercher, C. J. (1987). Effects of maternal undernutrition during early pregnancy on growth, muscle cellularity, fiber type and carcass composition in lambs. *Journal of Animal Science*, 64(5), 1419–1427. doi: 10.2527/jas1987.6451419x
  56. O'Keefe J. (1976). Place units in the hippocampus of the freely moving rat. *Experimental Neurology*, 51(1), 78–109. doi: 10.1016/0014-4886(76)90055-8
  57. O'Keefe J. (1990). A computational theory of the hippocampal cognitive map. *Progress in Brain Research*, 83 , 301–312. doi:10.1016/s0079-6123(08)61258-3
  58. Olivares, J., Juárez, E., & García, F. (2015). El hipocampo: neurogénesis y aprendizaje. *Revista Médica Universidad Veracruzana*, 15(1), 20-28.
  59. Packard, M. G. (2009). Exhumed from thought: basal ganglia and response learning in the plus-maze. *Behavioural Brain Research*, 199(1), 24–31. doi: 10.1016/j.bbr.2008.12.013
  60. Packard, M. G., & Goodman, J. (2012). Emotional arousal and multiple

- memory systems in the mammalian brain. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 6, 14. doi: 10.3389/fnbeh.2012.00014
61. Pérez-Clariget R, Bielli A. Efectos de la nutrición intrauterina sobre la programación fetal de órganos reproductivos y el comportamiento reproductivo futuro en ovinos. *Spermova*, 5(2), 206-212.
  62. Poldrack, R. A., & Packard, M. G. (2003). Competition among multiple memory systems: converging evidence from animal and human brain studies. *Neuropsychologia*, 41(3), 245–251. doi: 10.1016/s0028-3932(02)00157-4
  63. Ramos, C., da Silva, A. M., Costa, W. S., & Sampaio, F. J. (2006). Stereological evaluation of the seminiferous tubules of rats after maternal undernutrition during the lactation period. *Urologia internationalis*, 76(1), 63–66. doi: 10.1159/000089737
  64. Rolls E. T. (1996). A theory of hippocampal function in memory. *Hippocampus*, 6(6), 601–620. doi: 10.1002/(SICI)1098-1063(1996)6:6<601::AID-HIPO5>3.0.CO;2-J
  65. Romero, Y., & Bravo, S. (2012). Fundamentos de la producción ovina en la Región de La Araucanía. INIA Boletín de Divulgación (245). Recuperado de <http://biblioteca.inia.cl/medios/biblioteca/boletines/NR38519.pdf>.
  66. Rosene, D. L., & Van Hoesen, G. W. (1977). Hippocampal efferents reach widespread areas of cerebral cortex and amygdala in the rhesus monkey. *Science*, 198(4314), 315–317. doi: 10.1126/science.41010241
  67. Rosene, D.L., & Van Hoesen, G.W. (1987). La formación del hipocampo del cerebro de los primates. En *Corteza cerebral* (pp. 345-456). Boston: Springer.
  68. Ruiz, P., Genovese, P., Riaño, V., Herrera, E., Ferrer, R., & Bielli, A. (2013). ¿La memoria espacial se ve afectada en ratas nacidas de madres subnutridas? *Revista Argentina de Ciencias del Comportamiento*, 5(Supl.), 348-349.
  69. Sánchez Turet, M., González-Sastre, F., & Sabater Tobella, J. (1976). Efectos de la desnutrición precoz sobre la capacidad de aprendizaje en la rata. *Anuario de Psicología*, 14, 105-115.
  70. Santín, L. J., Rubio, S., Begega, A., Miranda, R., & Arias, J. L. (2000). Aprendizaje espacial e hipocampo. *Revista de Neurología*, 31(5), 455–462.
  71. Squire L. R. (1992). Memory and the hippocampus: a synthesis from findings with rats, monkeys, and humans. *Psychological Review*, 99(2), 195–231. doi: 10.1037/0033-295x.99.2.195
  72. Squire, L. R., & Zola-Morgan, S. (1991). The medial temporal lobe memory system. *Science*, 253(5026), 1380–1386. doi: 10.1126/science.1896849
  73. Stephan, H. (Ed.). (1975). *Allocortex*. Berlín: Springer.
  74. Swanson, L. W., & Cowan, W. M. (1977). An autoradiographic study of the organization of the efferent connections of the hippocampal formation in the rat. *Journal of Comparative Neurology*, 172(1), 49–84. doi: 10.1002/cne.901720104
  75. Teixeira, C. V., Silandre, D., de Souza Santos, A. M., Delalande, C., Sampaio, F. J., Carreau, S., & da Fonte Ramos, C. (2007). Effects of maternal undernutrition during lactation on aromatase, estrogen, and androgen receptors expression in rat testis at weaning. *Journal of Endocrinology*, 192(2), 301–311. doi: 10.1677/joe.1.06712
  76. Telensky, P., Svoboda, J., Blahna, K., Bureš, J., Kubik, S., & Stuchlik, A. (2011). Functional inactivation of the rat hippocampus disrupts avoidance of

- a moving object. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(13), 5414–5418. doi: 10.1073/pnas.1102525108
77. Toledo, F. C., Perobelli, J. E., Pedrosa, F. P., Anselmo-Franci, J. A., & Kempinas, W. D. (2011). In utero protein restriction causes growth delay and alters sperm parameters in adult male rats. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 9, 94. doi: 10.1186/1477-7827-99
  78. Tulving, E. (2002). Episodic memory: from mind to brain. *Annual Review of Psychology*, 53, 1–25. doi: 10.1146/annurev.psych.53.100901.135114
  79. Vargha-Khadem, F., Gadian, D. G., Watkins, K. E., Connelly, A., Van Paesschen, W., & Mishkin, M. (1997). Differential effects of early hippocampal pathology on episodic and semantic memory. *Science*, 277(5324), 376–380. doi: 10.1126/science.277.5324.376
  80. Wu, G.M., Bazer, F.W., Wallace, J.M., & Spencer, T.E. (2006). Board invited review: intrauterine growth retardation: implications for the animal sciences. *Journal of Animal Science*, 84(9), 2316-2337.
  81. Zhu, M. J., Ford, S. P., Nathanielsz, P. W., & Du, M. (2004). Effect of maternal nutrient restriction in sheep on the development of fetal skeletal muscle. *Biology of Reproduction*, 71(6), 1968–1973. doi: 10.1095/biolreprod.104.034561.43