



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLAS DE HIDALGO

FACULTAD DE CIENCIAS MEDICAS Y BIOLOGICAS

“DR. IGNACIO CHAVEZ”

DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO

MAESTRIA EN FARMACOLOGIA BASICA

EFFECTO DE LA ADMINISTRACION NEONATAL DE GLUTAMATO
MONOSODICO SOBRE LA CITOARQUITECTURA DE LAS
NEURONAS DEL CIRCUITO TRISINAPTICO DEL HIPOCAMPO DE
LA RATA ADULTA.

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN FARMACOLOGIA BASICA

PRESENTA

Q.F.B. Dulce Anahí Velázquez Zamora.

DIRECTOR DE TEIS

D. en C. Ignacio González Burgos

MORELIA, MICHOACAN

OCTUBRE DE 2008.

No guardes nunca en la cabeza aquello que te quepa en un bolsillo.

Albert Einstein.

DEDICATORIA

Dedico este trabajo de tesis al amor de mi vida mi pequeña Paola Michelle, a mis padres y a todas las personas que me han brindado su apoyo a lo largo de mi formación profesional.

EL PRESENTE TRABAJO DE TESIS SE REALIZO EN EL
LABORATORIO DE PSICOBIOLOGIA DEL CENTRO DE
INVESTIGACION BIOMEDICA DE MICHOACAN Y DEL
CENTRO DE INVESTIGACION BIOMEDICA DE
OCCIDENTE, DEL INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO
SOCIAL.

INDICE

Resumen.....	6
Introducción.....	7
Antecedentes.....	24
Planteamiento del problema.....	28
Hipótesis.....	29
Objetivo General.....	30
Objetivos Particulares.....	30
Material y Método.....	31
Diagrama de Flujo.....	33
Resultados.....	34
Discusión.....	39
Conclusión Particulares.....	43
Conclusiones Generales.....	44
Referencias.....	42

RESUMEN

La activación de la neurotransmisión glutamatérgica en el hipocampo se ha relacionado con procesos cognoscitivos como el aprendizaje y la memoria de referencia espacial. Tales contactos postsinápticos excitatorios en su mayoría se establecen en las espinas dendríticas de las estirpes neuronales del circuito trisináptico hipocampal. Varios estudios han demostrado que activación de los receptores para glutamato median varios procesos fisiológicos tales como diferenciación y migración neuronal, y la formación de circuitos neuronales en el Sistema Nervioso Central. Adicionalmente, los receptores para glutamato están estrechamente relacionados con los efectos excitotóxicos producidos por la administración de altas concentraciones de glutamato monosódico (GMS) a edades tempranas. Datos experimentales han mostrado que la administración subcutánea de GSM a los días 1, 3, 5 y 7 postnatal produce en el adulto alteración en la expresión de las subunidades proteicas NR1, NR2A y NR2B así como NR2C y NR2D del hipocampo. Por otra parte se han reportado modificaciones en la citoarquitectura de neuronas piramidales del campo CA1 del hipocampo producidas por la administración de GSM a edades temprana así como deficiencias en la adquisición y recuperación de información espacial. En objetivo del presente trabajo fue caracterizar la citoarquitectura de las neuronas del circuito trisináptico hipocampal de la rata adulta. Se administro una solución acuosa de 4mg/g de peso de GSM a un grupo ratas macho Sprague/Dawley los días 1, 3, 5 y 7 postnatal. Un grupo control fue tratado con una solución acuosa de NaCl 1.37 mg/g. Un grupo no tratado constituyó el grupo testigo. Nuestros resultados muestran incremento en el numero de bifurcaciones en las neuronas granulares del giro dentado. Estos resultados sugieren al efecto que tiene el glutamato sobre procesos de remodelación compensadores de la excitabilidad neuronal exacerbada, y, un mayor numero de espinas dendriticas delgadas en neuronas piramidales del campo CA1 del hipocampo pudiera ser el resultado de la hiperexcitabilidad neuronal. En el análisis correspondiente a la excrescencias espinosas del campo CA3 del hipocampo no se encontraron diferencias significativas.

INTRODUCCION

El Sistema Nervioso Central (SNC), es un conjunto de estructuras funcionalmente especializadas para recibir, procesar e integrar información obtenida tanto del medio externo como interno. El cerebro es un órgano conformado por neuronas; la neurona es considerada la unidad tanto anatómica como funcional del sistema nervioso y es a través de ésta que ocurre la propagación e integración de información eléctrica dentro de un circuito neural. Las neuronas son células nerviosas asimétricas que se caracterizan por tener tres componentes macroestructurales: un soma, un axón y un gran número de prolongaciones citoplasmáticas conocidas como dendritas a través de las cuales el flujo de información eléctrica circula de neurona a neurona y a otras células excitables a través de la sinapsis. La sinapsis es definida como aquella zona identificada como el sitio de comunicación interneuronal que permite el flujo de información en los circuitos del cerebro (Foster, 1897). La sinapsis está constituida por un componente presináptico axonal y un postsináptico que mayoritariamente lo constituyen las dendritas y generalmente tal información fluye en una sola dirección. El componente presináptico está representado por terminales nerviosas que contienen vesículas membranosas que liberan la sustancia neurotransmisora implicada en respuesta a la generación de un potencial de acción en la terminal presináptica. A través de estas vesículas, las moléculas del neurotransmisor difunden de la hendidura sináptica donde posteriormente se unen de manera específica a receptores que se encuentran en la membrana del elemento postsináptico. El componente postsináptico puede estar localizado directamente en las dendritas o pequeñas protuberancias que emergen de ellas, las llamadas espinas dendríticas (Bonhoeffer and Yuste; 2002). El resultado de lo anterior es la generación de un potencial sináptico en la neurona postsináptica y el tipo de receptor activado dicta la respuesta de la neurona. (Sommer et al., 1992).

Los aminoácidos que tienen actividad neurotransmisora son los más abundantes y más ampliamente distribuidos en las distintas regiones del SNC (Genoux y Montgomery, 2007). Por su acción en la neurona postsináptica, son agrupados en aminoácidos inhibidores GABA y glicina, y aminoácidos excitadores, como glutamato y aspartato. En el SNC, la mayoría de las sinapsis

excitadoras son glutamatérgicas (Sommer et al., 1992.). Tales contactos excitadores ocurren en el botón axonal ya sea terminal o de paso y en un compartimiento postsináptico altamente especializado, la espina dendrítica (Costa et al., 1979.).

El glutamato, es un aminoácido no esencial que no cruza la barrera hematoencefálica y de esta manera no puede ser suministrado al cerebro por el sistema circulatorio. En cambio, es sintetizado a partir del metabolismo energético de la glucosa vía el ciclo de Krebs y transaminación de α -oxoglutarato y también a partir de la glutamina que es sintetizada en células gliales; la glutamina es transportada a la terminal nerviosa y localmente es convertida por la glutaminasa a glutamato. El glutamato que se encuentra contenido en la terminal nerviosa es almacenado en vesículas sinápticas y liberado de la terminal nerviosa por un proceso exocitótico dependiente de calcio (Ca^{+2}) en respuesta a un impulso nervioso (Cooper et al., 2003; Figura 1).

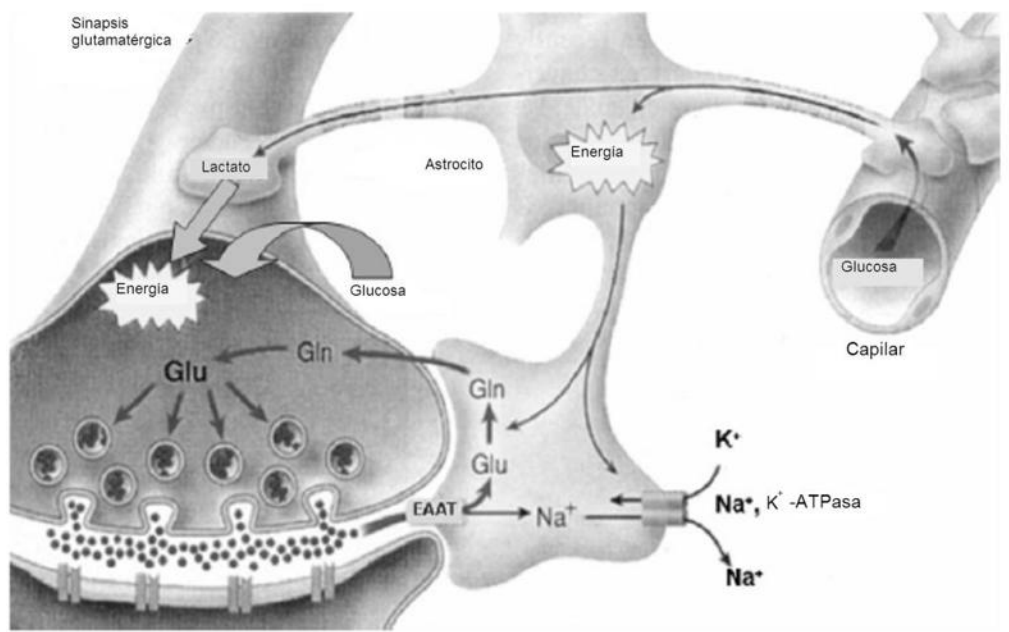


Figura 1.- Diagrama que muestra el acoplamiento metabólico neurona-glía. Modificado de: Magistretti et al., 1999.

Fisiológicamente, en la gran mayoría de las sinapsis excitadoras el glutamato endógeno ejerce sus efectos postsinápticos a través de dos familias

de receptores de membrana: los receptores ionotrópicos y los receptores metabotrópicos. Los receptores ionotrópicos se encuentran acoplados a canales que son permeables a cationes tales como el K^+ , Na^+ y Ca^{++} ; la permeabilidad relativa a estos cationes varía de acuerdo a la familia y a la composición de las subunidades del receptor (Hollman y Heinemann, 1994). En relación a lo anterior, estudios moleculares han confirmado que hay al menos tres tipos de receptores ionotrópicos, los AMPA (ácido propiónico α -amino—3hidroxi-5-metil-4-isoxazol), los kainato y los NMDA. De estos, tanto los receptores AMPA como los kainato se encuentran mediando el potencial postsináptico excitador rápido (EPSP). Estos receptores se encuentran asociados principalmente a canales iónicos altamente permeables a los iones Na^+ , K^+ y presentan baja permeabilidad al Ca^{++} . Por su parte, el receptor NMDA es un receptor ionotrópico acoplado a un canal altamente permeable a Ca^{++} que se encuentra bloqueado por el ión Mg^{++} bajo condiciones de reposo (Dickenson, 2001) y es liberado hacia fuera del canal por un mecanismo dependiente de voltaje (Lambe et al., 1998). Tras la estimulación sináptica se incrementa la permeabilidad del canal al ión Ca^{++} y por lo tanto, el incremento de la concentración de este en la neurona postsináptica. Al respecto, hay diversos procesos fisiológicos en los que el Ca^{++} que entra a través de este receptor participa; interviene de manera preponderante en el desarrollo cerebral y en algunas formas de plasticidad sináptica. En relación a este último, algunos autores lo han asociado a eventos más lentos y prolongados tales como la depresión a largo y plazo (LTD) y la potenciación a largo plazo (LTP) (Bliss y Collingridge, 1993), considerados estos como fenómenos subyacentes a procesos más complejos como la memoria y el aprendizaje (Maren y Baudry, 1995; Asztely y Gustafsson 1996).

Por su parte, los receptores metabotrópicos -de los cuales se han descrito hasta ahora ocho tipos diferentes ($mGluR_1$ - $mGluR_8$)- se encuentran acoplados a proteínas G. Sus mecanismos de acción son dependientes de la movilización de los iones Ca^{+2} del retículo endoplásmico por la formación de trifosfato de inositol (Hille, 1992). Estos receptores han sido divididos en tres grupos: el grupo I incluye los $mGluR_1$ y $mGluR_5$, los cuales activan la vía de la fosfolipasa C y se encuentran anclados a la membrana postsináptica; el grupo II incluye a $mGluR_2$ y $mGluR_3$, y el grupo III que incluye a los $mGluR_4$,

mGluR6, mGluR7 y mGluR8, los cuales están acoplados negativamente a adenilato ciclasa para la formación de AMPc; (Conn and Pin, 1997). De lo anterior, evidencias experimentales indican que los mGluR miembros de la familia I se encuentran localizados principalmente en el componente postsináptico, mientras que los miembros de la familia II y III se encuentran expresados principalmente en el elemento presináptico donde sirven como autoreceptores y heteroreceptores regulando negativamente la neurotransmisión glutamatergica (Conn and Pin 1997; Figura 2).

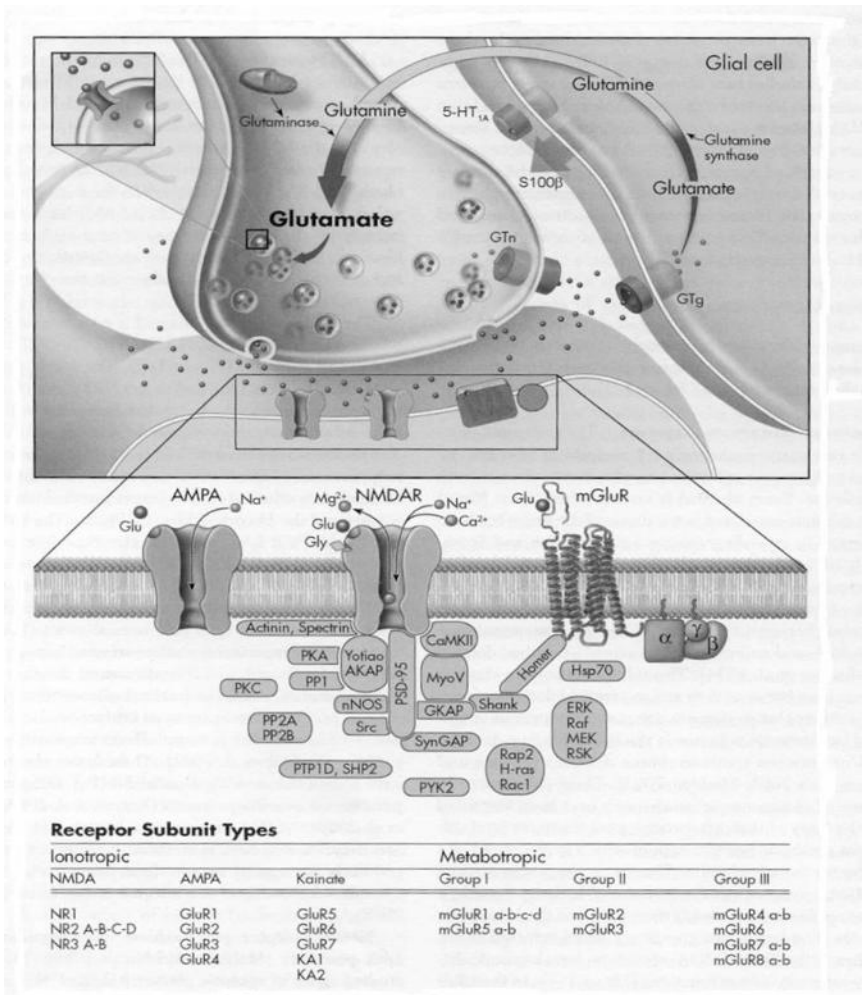


Figura 2.- Imagen que ilustra la localización en la membrana plasmática de los receptores a glutamato. Tomado de: www.chrisparsons.de/Chris/images/Book%20Cover.jpg

El glutamato es un aminoácido fundamental para el funcionamiento normal del SNC; participa en un gran número de procesos neurales tales como la diferenciación y migración neuronal, así como la génesis axonal en el sistema nervioso en desarrollo. En el sistema nervioso maduro este aminoácido

es parte central de fenómenos tales como la neuroplasticidad y de procesos psicobiológicos tales como la memoria y el aprendizaje (Hille, 1992). Cuando hay liberación de altas concentraciones de glutamato a la hendidura sináptica se produce una excesiva activación de sus receptores presentes en la membrana postsináptica, lo cual a su vez produce un incremento en la concentración de Ca^{+2} intracelular que excede la capacidad reguladora de la célula (pérdida de la homeostasis celular), lo que puede dañar y eventualmente matar a las células blanco vía un proceso referido como excitotoxicidad (Choi, 1988; Wollmuth y Sakmann, 1998; Michaelis y Rothman, 1990; Hartley et al., 1993; Cooper et al., 2003; Coyle y Morrison, 2002). El término “excitotoxicidad”, ha sido definido como un mecanismo de daño neuronal que esta directamente relacionado con la disfunción de la sinapsis excitadoras (Jonhston et al., 2002). Este fenómeno fue primero descrito por Lucas y Newhouse en 1957, quienes reportaron que al administrar glutamato monosódico (GMS) subcutáneamente a ratones neonatos producía degeneración neuronal en la capa más profunda de la retina (Lucas y Newhouse, 1957). Posteriormente Olney confirmó que el glutamato y compuestos análogos administrados sistémicamente ejercen su efecto neurotóxico cuando son administrados en individuos inmaduros que no poseen una barrera hematoencefálica bien desarrollada (Olney, 1997, 1978; Weindl, 1973; Ullensvang et al., 1997). Olney también encontró en sus experimentos que la toxicidad inducida por glutamato esta acompañada por edema celular, el cual es más marcado cerca de los componentes dendrosomales de neuronas que se sabe contienen receptores al aminoácido (Olney, 1978). Desde esta descripción, el fenómeno de excitotoxicidad se ha visto como la vía común de muerte neuronal durante estados de hipoxia e isquemia perinatal, choque hipoglucémico, traumatismos craneocéfálicos, epilepsia y desordenes neurodegenerativos como la enfermedad de Alzheimer y esquizofrenia (Cline et al., 1987; Doi et al., 2000; Meadorf-Woodruff and Healy 2000).

Hay hipótesis en las que se ha aceptado de manera general que el receptor NMDA de glutamato participa de manera importante en ciertos aspectos de la toxicidad, posiblemente porque presenta alta permeabilidad al ión Ca^{++} (Figura 3).

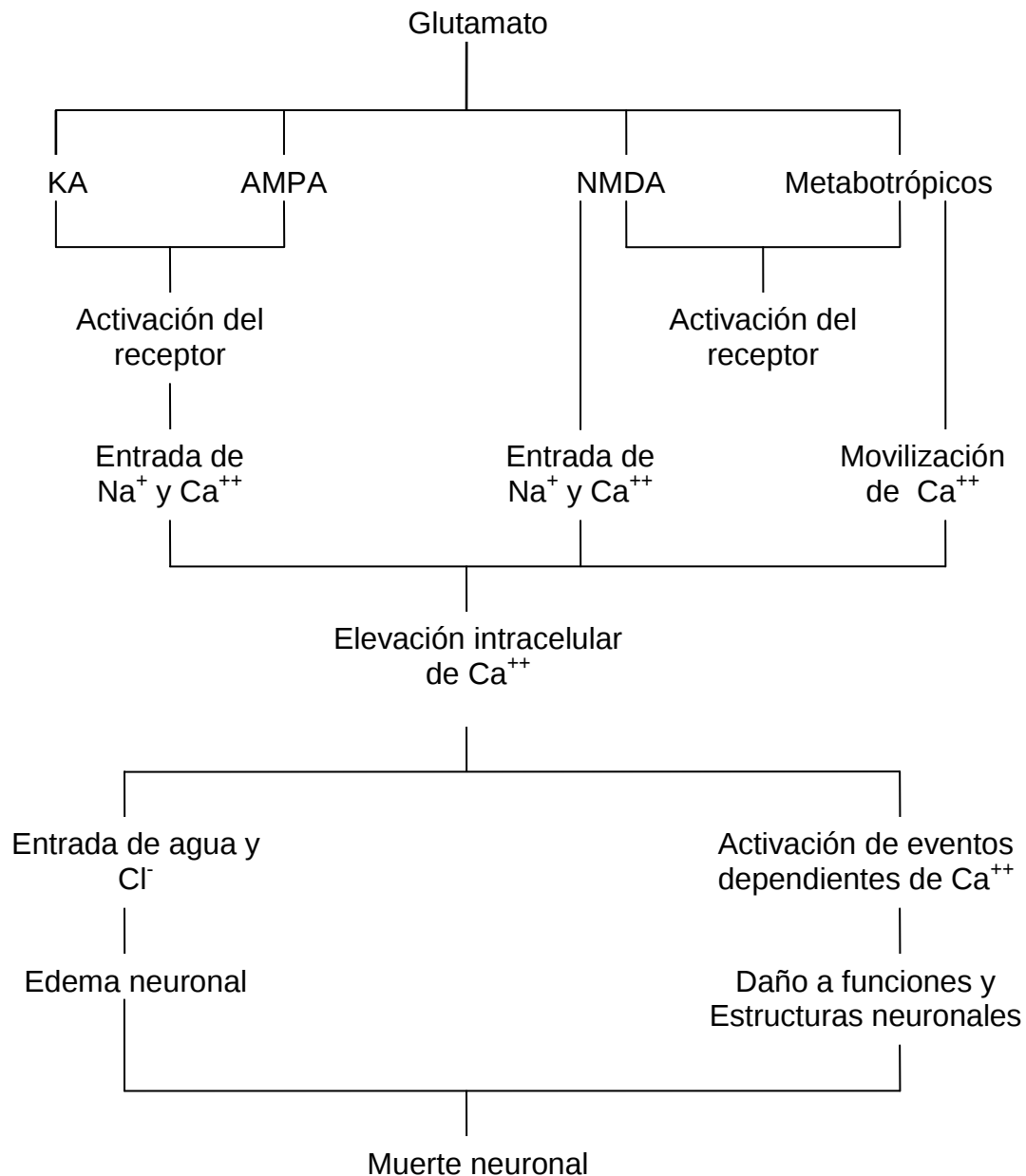


Figura 3.- Imagen esquemática de la cascada excitotóxica mediada por la actividad del glutamato. Modificado de: Bittigau and Ikonomidou, 1997.

A concentraciones fisiológicas, el ión Ca^{++} es un mensajero intracelular que participa de manera importante en procesos celulares como la diferenciación y crecimiento neuronal, la excitabilidad de la membrana, la exocitosis y la actividad sináptica. Por su parte, las neuronas poseen mecanismos homeostáticos especializados que les permiten regular de manera muy sutil las concentraciones de Ca^{++} intracelular, entre los cuales se incluye la presencia de bombas que participan en la entrada y salida de este ión,

sistemas amortiguadores para calcio y sistemas de almacén para tal ión (Arundine and Tymianski, 2003). Derivado de lo anterior, cuando hay concentraciones elevadas de Ca^{++} en el interior de las células de tal magnitud que exceden su capacidad reguladora, se produce la activación inapropiada de procesos dependientes de calcio entre los que se encuentran la reactivación de enzimas (proteasas, lipasas, endonucleasas) y otros procesos metabólicos que directamente dañan a las neuronas, o bien; se produce la formación de reacciones tóxicas que causan la muerte celular (Sattler and Timianski, 2000).

La base de la citoarquitectura hipocampal son las neuronas glutamatérgicas. Estas células principales (células granulares y piramidales) representan el 90% de las neuronas hipocampales; el 10% restante de las células hipocampales son las interneuronas GABAérgicas, las cuales representan la red neuronal que controla y regula a las neuronas glutamatérgicas (Freund and Buzsáki, 1996). Con base en lo anterior, mediante estudios electrofisiológicos se ha podido establecer que las aferencias de la corteza entorrinal al hipocampo establecen contactos sinápticos con neuronas hipocampales mediados por las fibras de la vía perforante (Nadler et al., 1976), por lo que se ha considerado al glutamato como un neurotransmisor importante para la fisiología de esta región cerebral (Hille, 1992).

El hipocampo es una estructura subcortical localizada dentro de un anillo de arquicorteza que rodea al sistema ventricular y que es conocido como corteza límbica. En la rata se encuentra localizado dorsoventralmente en un eje septo-temporal que, en su porción dorsal, se extiende desde el septum hasta la parte caudal de la amígdala, centralmente. Es una estructura enrollada sobre sí misma en ambos hemisferios, cuyo eje longitudinal va desde el polo septal al polo temporal y su eje transversal está definido como el plano perpendicular al eje longitudinal (Noback and Demarest, 1975; Witter, 1989; Figura 4)

En el primate la orientación del hipocampo es diferente al de los roedores. El hipocampo posterior en primates corresponde al hipocampo dorsal de la rata y el hipocampo anterior corresponde al hipocampo ventral (Amaral, 1987).

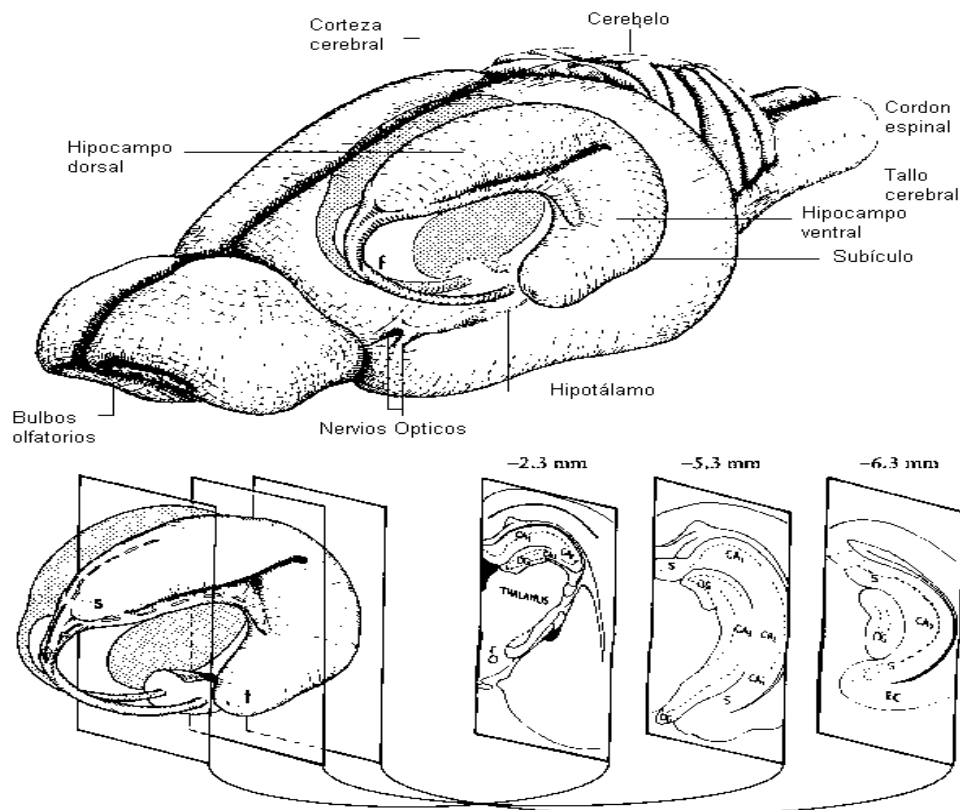


Figura 4.- Imagen que muestra la organización tridimensional del hipocampo de la rata y estructuras relacionadas. Abajo, se muestran tres secciones coronales con sus respectivas coordenadas en un sentido anteroposterior. CA1, CA2, CA3: Campos de Cuerno de Ammón 1–3; DG: Giro dentado; EC: corteza entorrinal; f: fornix; s: polo septal del hipocampo; S: subículo; t: polo temporal de hipocampo. Tomado de: Amaral and Witter, 1995.

En el hipocampo se distinguen tres regiones bien diferenciadas: 1) el cuerno de Ammón o hipocampo propiamente dicho, que incluye los campos CA1-CA3 formados por una hilera continua de neuronas piramidales glutamatérgicas; 2) el Giro Dentado (GD), formado por una hilera de neuronas granulares que igualmente utilizan glutamato como neurotransmisor; y 3) la región hilar, formada por células polimórficas también glutamatérgicas.

En todas las regiones del hipocampo se encuentran, además, interneuronas inhibitorias de naturaleza GABAérgica, en las que coexisten neuropeptidos. En CA1 existen tres tipos de interneuronas GABAérgicas: las interneuronas oriens/alveus, las lacunoso/moleculares (ambas nombradas así con base a su localización) y las células en canasta localizadas en el nivel de la capa de somas de las células piramidales. En el giro dentado existen tipos análogos a los de CA1.

La topografía básica de los subcampos hipocampales es muy similar; todos consisten de una capa de alrededor de 50 μm de espesor constituida por somas neuronales cuyas dendritas apicales se extienden a través de una zona denominada estrato radiado de aproximadamente 320 μm de espesor, hasta el *estrato lacunoso-molecular* de alrededor de 100 μm de espesor; por su parte, las dendritas basales de tales neuronas piramidales invaden el *estrato oriens*, cuyo espesor es de aproximadamente 120 μm . De manera general, la neurona piramidal constituye la gran mayoría de neuronas en la capa piramidal. Se caracteriza por tener dendritas basales que se extiende en el *estrato oriens* y una dendrita apical que se extiende a la fisura hipocampal. Por su parte, las neuronas piramidales de CA3 varían consistentemente tanto en su longitud como en su organización, lo cual esta relacionado con su posición a lo largo del eje transversal. Neuronas en la parte proximal, cercanas al GD, tienen un árbol dendrítico de aproximadamente 10 μm de longitud total, mientras que, neuronas en la parte distal, tienen un árbol dendrítico más largo de aproximadamente 16 μm de longitud total (Witter and Amaral, 2004). Finalmente, las neuronas de CA1 tienen un árbol dendrítico de aproximadamente 13.5 μm de longitud (Ishizuka et al., 1995; Figura 5).

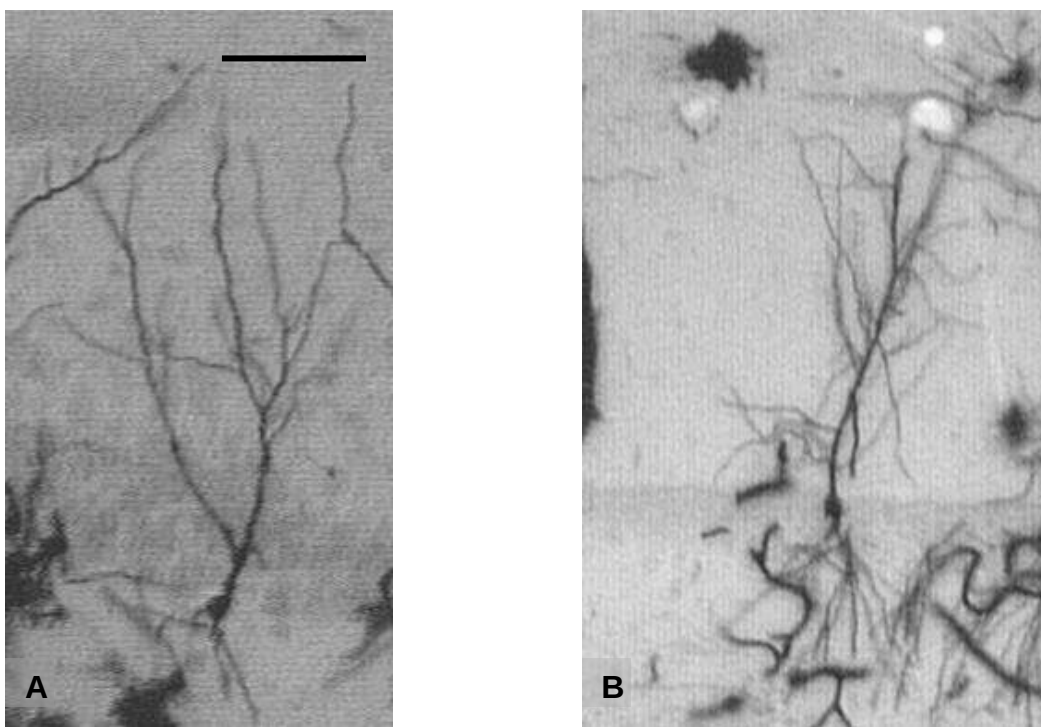


Figura 5.- Imágenes representativas de células del hipocampo impregnadas con la técnica de Golgi. **A)** neurona piramidal del campo CA3 del hipocampo; **B)** neurona piramidal del campo CA1 del hipocampo. Escala: 100 μm .

El GD comprende tres capas a través de las cuales podemos encontrar dispuestas sus células principales, las células granulares; 1) la *capa granular* que contiene un paquete denso de somas de las células granulares; 2) la *capa molecular* que esta formada por las dendritas apicales de las células granulares y sus fibras aferentes; 3) la *capa polimorfa*, que se encuentra en el hilus del giro dentado y tiene una gran variedad de tipos celulares; está constituida por segmentos de axones de las células granulares y células en canasta.

Las células granulares forman la mayoría de las células de el GD. Se caracterizan por tener un cuerpo celular pequeño de aproximadamente 10 μm de diámetro, un árbol dendrítico unipolar y variaciones significativas en la longitud dendrítica (Claiborne et al., 1990). La longitud dendrítica total de las células granulares de la capa suprapiramidal es significativamente mayor a aquella que se encuentran dispuestas en la capa infrapiramidal (Amaral et al., 1990). Al respecto, las dendritas apicales de las células granulares se extienden dentro de la capa molecular a lo largo del eje septo-temporal del hipocampo (Seress and Pokorny, 1981; Figura 6).

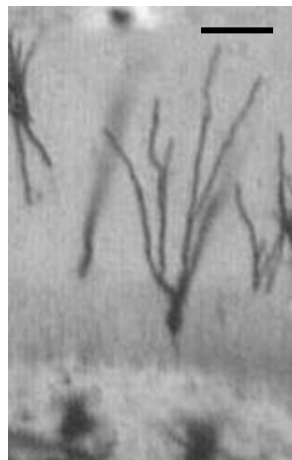


Figura 6.- Imagen representativa de una célula impregnada con la técnica de Golgi de neuronas granulares del Giro Dentado del hipocampo. Escala: 50 μm .

Es importante hacer la distinción entre el hipocampo y la formación hipocampal; esta última incluye a la corteza entorrinal, al giro dentado, al propio hipocampo y al complejo subicular. El término hipocampo incluye el campo de las células piramidales del propio hipocampo (CA1-CA3), junto con las células de la región hilar y las células granulares del giro dentado (Gottlieb and Cowan, 1973).

La principal vía de entrada de información al hipocampo la constituye las fibras glutamatérgicas de la vía perforante; esto es, una proyección masiva de fibras provenientes de la corteza entorrinal. Para ello, las fibras de la vía perforante viajan dorsalmente “perforando” la capa piramidal de el subículo a lo largo de su eje longitudinal e inclinándose fuertemente a lo largo de un plano transversal; por ultimo establecen contactos sinápticos principalmente con las espinas dendríticas de las células granulares de la capa suprapiramidal del Giro dentado (GD) (Stanfield and Cowan, 1988) y con el Cuerno de Ammon (Steward, 1976). Subsecuentemente, los axones que emergen de estas células granulares constituyen las llamadas fibras musgosas, las cuales forman contactos sinápticos con las excrescencias espinosas de la dendrita apical de las células piramidales tanto de tallo largo como de tallo corto del campo CA3 del hipocampo (Stanfield and Cowan, 1988), en la porción del estrato radiado. Posteriormente, ramificaciones de los axones de las células de CA3- denominadas colaterales de Schaffer envían información glutamatérgica hacia el estrato radiado del campo CA1 donde establecen contactos sinápticos con las espinas dendríticas de las células piramidales, cuyos axones a su vez se proyectan al subículo y a la corteza entorrinal (Buhl, y cols., 1989); ambos sistemas eferentes constituyen la vía de salida de la información organizada en el hipocampo. Las fibras de la vía perforante se distribuyen principalmente dentro de la capa molecular del giro dentado, estrato lacunoso-molecular del hipocampo y la capa molecular del subículo (Hjorth-Simonsen and Jeune, 1972). Estas fibras se originan en las células de la capa II de las porciones medial y lateral de la corteza entorrinal lateral y terminan en el GD y el campo de CA3; mientras que las neuronas de la capa III de la porción medial de la corteza entorrinal lateral dan origen a aferencias dirigidas hacia las espinas dendríticas del campo CA1. Algunas proyecciones menores pueden originarse en capas más profundas de la corteza entorrinal. Esto es lo que se conoce como el circuito trisináptico hipocámpal (Figura 7).

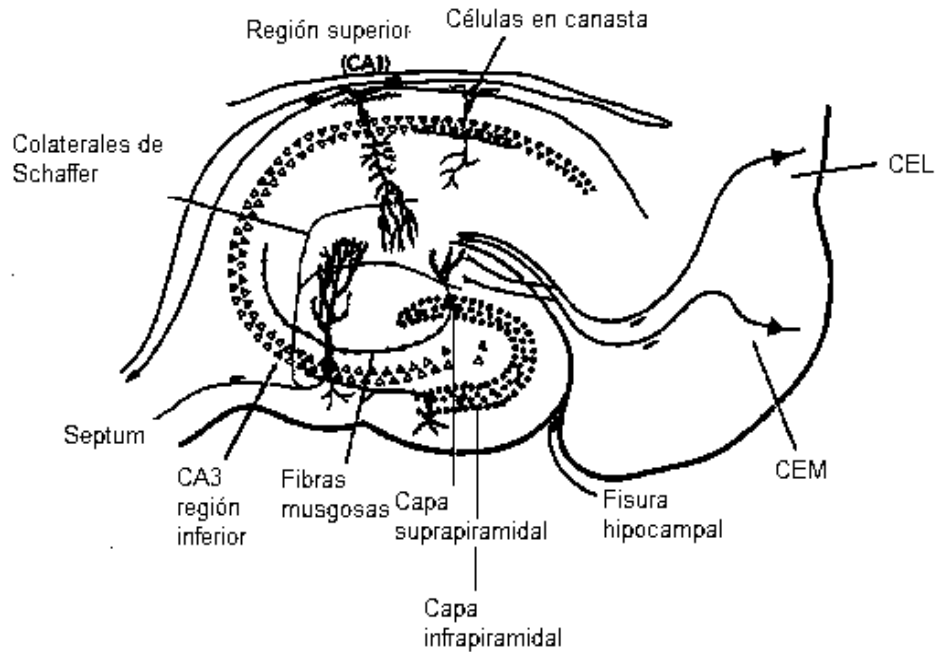


Figura 7.- Imagen esquemática del circuito trisináptico hipocámpico; CEM: Corteza entorrinal medial; CEL: corteza entorrinal lateral; CA: Cuerno de Ammón 1-3. Modificado de: O'Keefe and Nadel, 1978.

En cuanto a las eferencias del hipocampo, el subículo parece ser la región que da origen a la mayoría de estas proyecciones extrínsecas hacia áreas corticales y subcorticales, incluida la corteza entorrinal; con una contribución de CA1 a este sistema eferente, ambos terminan predominantemente en las capas superficiales del área entorrinal medial. El subículo envía, además, proyecciones al septum, al *nucleus accumbens*, al complejo amigdalóide, al complejo mamilar, al tálamo anterior y al hipotálamo (Witter, 1989). Adicionalmente, las neuronas piramidales de CA3 envían colaterales excitadoras al septo lateral y al hipocampo contralateral, así como colaterales intrínsecas que van longitudinalmente a regiones más septales o temporales de CA3 (Buhl, 1989; Ottersen and Storm-Mathisen, 1989).

Funcionalmente, el hipocampo es el responsable de muchas de las funciones mnésicas del lóbulo temporal. Participa de manera importante en la organización de la conducta exploradora, interviene en el componente motivacional de la actividad motriz, participa en los patrones de ingesta y procesos motivacionales básicos, en la manifestación de la capacidad de

alternancia espontánea, en la discriminación olfativa y en la organización del aprendizaje y la memoria (Jarrad, 1993).

En el humano, se cree que el almacenamiento de la memoria declarativa a largo plazo depende de la integridad de estructuras del lóbulo temporal y diencefálicas tales como el hipocampo, subículo y corteza entorrinal. Aunado a esto diversos trabajos en roedores reportan que estas mismas estructuras cerebrales juegan un papel muy importante en la navegación espacial (O'Keefe and Nadel, 1978); es decir, se encuentran mediando la representación neural de un espacio físico mediante la creación interna de un mapa cognoscitivo (O'Keefe and Nadel, 1978). De lo anterior, han definido a la memoria declarativa como el tipo de memoria involucrada en el recuerdo conciente de la información, que consiste en recordar lugares, personas y objetos (Squire, 1992). Este tipo de memoria es la responsable de la acumulación de hechos y datos derivados de experiencias aprendidas tanto espaciales como no espaciales. Así mismo, tanto en la memoria de trabajo como en la memoria de referencia, el hipocampo juega un papel importante en el procesamiento de las relaciones temporales entre estímulos en curso y representaciones de eventos recientes.

Específicamente se ha sugerido que la actividad de las llamadas células “de lugar” hipocámpales esta relacionada con la representación espacial (Nadel and Eichenbaum, 1999; O'Keefe and Dostrovsky, 1971; Muller, 1996) y con la localización del individuo en un lugar determinado (Poucet et al., 2004). De lo anterior, evidencias experimentales han revelado que la actividad de las células específicamente de CA3 y CA1 del hipocampo dorsal esta correlacionada con la posición que ocupa el individuo en el medio (O'Keefe and Dostrovski, 1971; Moser et al., 1993). De todo ello, se ha reportado que la disminución en la población de células piramidales del campo CA1 del hipocampo dorsal afecta de manera directa la habilidad del individuo para la resolución de tareas de tipo espacial (Volpe et al., 1992).

El aprendizaje se describe como el mecanismo por el cual la información nueva acerca del mundo es adquirida, es decir, el proceso en virtud del cual nuestra conducta varía y se modifica a lo largo del tiempo adaptándose a cambios que se producen en el entorno (Aguado-Aguilar, 2001). Por su parte y

de manera asociada, la memoria es el mecanismo por el cual esa información es retenida, recuperada y evocada (Squire; 1992).

En el hipocampo la gran mayoría de las sinapsis excitadoras ocurren en pequeñas protuberancias que emergen de las dendritas de las células piramidales y granulares referidas como espinas dendríticas (Harris et al., 1989). Estudios basados en microscopia electrónica han confirmado que las espinas dendríticas constituyen la unidad básica funcional de integración de los circuitos neuronales, y que más del 90% de las sinapsis excitatorias se llevan a cabo en ellas (Gray 1959).

Las espinas dendríticas son pequeñas protuberancias membranosas que emergen de la superficie neuronal y son consideradas parte de los componentes postsinápticos de muchas de las conexiones sinápticas glutamatérgicas excitadoras en el cerebro maduro (Harris and Kater, 1994) y que, además, representan un sitio neural clave en la expresión de fenómenos de plasticidad sináptica y estructural (Ramón y Cajal, 1888). El término “plasticidad” se remite hoy a la capacidad del sistema nervioso para cambiar en respuesta a presiones ambientales, lesiones o modificaciones en el estado interno del organismo. Así, el organismo está capacitado para adaptarse a cambios que tienen lugar en una escala de minutos o segundos. Las modificaciones que operan en esa escala temporal pueden implicar cambios en la función de la sinapsis. De hecho, la expresión plasticidad sináptica se refiere al proceso por el cual ocurren cambios a largo plazo en las conexiones sinápticas, lo cual produce cambios positivos en la eficacia tanto de las sinapsis como de las neuronas (Calverley y Jones, 1990). En este sentido, se ha propuesto que el sustrato neuroanatómico en el que subyace el aprendizaje y la memoria está representado por las espinas dendríticas de las neuronas constituyentes de regiones cerebrales involucradas en dicho proceso cognoscitivo (Koch et al., 1992; Koch y Zador, 1993). Por lo general, se ha observado que las espinas dendríticas establecen contactos sinápticos únicos, aunque se han encontrado espinas con más de un axón conectado a ellas (Goldman-Rakic, 1999).

Al igual que en neuronas de la neocorteza y otras regiones cerebrales, en las dendritas de neuronas piramidales hipocampales la morfología de las espinas varía considerablemente; podemos encontrar espinas con cuello largo,

corto, grueso, delgado, cilíndrico, irregular o ramificado y todas las combinaciones posibles, así como cabezas de espinas pequeñas, grandes, esféricas, ovales o de forma irregular (Harris and Kater, 1994.; Wodley et al., 1990). Con base en lo anterior, en la región CA1 del hipocampo y en el GD se han descrito por lo menos seis tipos de espinas, las cuales se han clasificado según la forma geométrica tanto del cuello como de la cabeza. En general y de acuerdo a criterios morfológicos bien definidos y a estudios hechos con microscopia electrónica de transmisión, se les clasificó inicialmente en delgadas, gordas, en hongo, ramificadas y doble o varicosa (Calverley y Jones, 1990; Harris et al., 1989). Estudios previos han mostrado que las espinas son estructuras particularmente plásticas que pueden responder morfológicamente a una gran variedad de estímulos fisiológicos (Guthrie et al., 1991; Wodley et al., 1990). Las espinas delgadas tienen una longitud más grande que el diámetro de su cuello y una cabeza bulbosa pequeña, en tanto que las espinas gordas son más cortas que amplias, de tal manera que no muestran distinción entre el cuello y la cabeza. Las espinas en hongo tienen un cuello muy estrecho y una cabeza más grande que éste. Las espinas ramificadas muestran cabezas dobles de proporciones semejantes entre sí que emergen del mismo cuello, formando dos cuellos que se observan a manera de pedículos de dos cabezas pequeñas; por lo cual cada cabeza de la espina ramificada hace contacto sináptico con axones presinápticos diferentes (Sorra et al., 1998); además muestran un cuello de características similares al de las espinas en hongo. Más recientemente se ha agregado a esta clasificación las espinas dobles y las espinas anchas. Las espinas dobles muestran dos cabezas una sobre otra; la diferencia con respecto a las espinas ramificadas estriba en que en las espinas dobles ambas cabezas se encuentran alineadas longitudinalmente y separadas por un cuello de diámetro pequeño y semejante a aquel que separa a la dendrita progenitora y a la cabeza más baja. Las espinas anchas muestran características geométricas similares a las espinas gordas; la única diferencia morfológica es que su eje longitudinal es al menos dos veces mayor que su eje transversal; lo anterior bajo consideración de que ni las espinas gordas ni las anchas poseen una diferenciación entre el cuello y la cabeza (Tarelo-Acuña et al., 2000).

Algunas espinas de las células piramidales contienen en su cuello una estructura peculiar llamada “aparato de la espina”. Esta estructura está constituida por dos o tres sacos membranosos de retículo endoplásmico liso (REL) que se encuentran separados por una banda de material electrodensito de naturaleza proteica que está constituido en parte por microtubulos o filamentos de actina. Se sabe que en el microambiente de la espina el aparato de la espina es un secuestrador de Ca^{++} (Mihály et al., 1987). De alguna manera, la presencia del aparato de la espina en el cuello podría incrementar también la resistencia eléctrica de la espina (Millar et al., 1985), lo cual hace difícil que un potencial de acción en la sinapsis sea propagado por la dendrita progenitora (Fifková, 1987). Además, en el cuello de las espinas están presentes bombas de calcio, las cuales participan en la extrusión del ión (Majewska et al., 2000), con lo que se evita el incremento de su concentración en la dendrita progenitora durante su difusión hacia ella (Volfovski et al., 1999). Otra implicación funcional del cuello de la espina es que entre más estrecho es este, los iones calcio encuentran mayor resistencia física y eléctrica en su paso desde la espina a la dendrita (Volfovski et al., 1999;81; Majewska et al., 2000). Por un lado en las espinas de cuello estrecho como las delgadas y las en hongo ocurre un incremento más rápido en el potencial de la membrana de la espina tras la inversión del mismo después de haberse presentado el estímulo sináptico, en comparación con espinas de cuello menos estrecho (Koch et al., 1992).

Por otra parte, la superficie de la cabeza de la espina constituye el sitio de comunicación de las sinapsis excitadoras mediadas por glutamato; en ella se localizan receptores a dicho neurotransmisor acoplados a canales iónicos y otros sistemas de señalización involucrados en la transmisión sináptica. Estos son sistemas de acoplamiento de la actividad sináptica en la neurona postsináptica que actúan como vías de señalización en procesos de plasticidad sináptica (Gray, 1959; Kennedy, 2000). Visto al microscopio electrónico de transmisión, esta zona de material electrodensito de naturaleza proteica es conocida como la densidad postsináptica (PSD). El tamaño y/o la forma de la PSD puede también influir en la eficiencia de la transmisión sináptica como modulador en la conducción del potencial sináptico (Calverley and Jones, 1990).

En las neuronas piramidales hipocámpales del campo CA3 el 90% de las protuberancias dendríticas en la dendrita apical proximal son las llamadas “*excrecencias espinosas*”. Las excrecencias espinosas representan el sitio de contacto sináptico de las fibras musgosas provenientes del GD. Estas protuberancias dendríticas tienen como característica peculiar que de ellas emergen alrededor de 1 a 16 ramificaciones proveniente de la misma dendrita progenitora y además pueden ser inervadas por el mismo o por diferentes botones axonales (Chicurel and Harris, 1992). Estructuralmente, las excrecencias espinosas son un tipo de espina ramificada compleja cuya densidad de los lóbulos tiene apariencia a un racimo de uvas (Hama and Kosaka, 1994). Este tipo de espinas usualmente contienen orgánulos subcelulares que raramente se encuentran en las espinas simples entre los que se incluyen ribosomas, cuerpos multivesiculares, mitocondrias y microtúbulos (Chicurel and Harris, 1992) y la presencia de bombas de extrusión de iones que le confiere a la excrecencia la capacidad de mantener la homeostasis en la espina. Se han descrito dos subtipos de neuronas piramidales del área CA3 del hipocampo; 1) neuronas piramidales “de tallo corto”, localizadas más superficialmente en el estrato piramidal; en éstas, el tallo de las dendritas apicales es más grueso y tienen un gran número de excrecencias espinosas; adicionalmente, este tipo de neuronas poseen dendritas tanto apicales como basales profusamente ramificadas; 2) neuronas piramidales “de tallo largo”, las cuales tienen una dendrita apical más larga respecto a las de tallo corto, un número menor de excrecencias espinosas y relativamente menos ramificaciones tanto en las dendritas basales como en la dendrita apical (Fitch et al., 1989).

ANTECEDENTES

El daño neuronal por excitotoxicidad es la consecuencia de la activación excesiva de los receptores NMDA por la liberación de altas concentraciones de glutamato (Rothman and Olney, 1986). Los receptores NMDA, receptores ionotrópicos, son altamente permeables al ión Ca^{++} , por lo que su actividad exacerbada ha sido relacionada a procesos patológicos que involucran muerte neuronal como isquemia e hipoxia neonatal y epilepsia (Meador-Woodruff and Healy, 2000). Durante la etapa del desarrollo postnatal, datos experimentales han mostrado que ratas de menos de una semana de edad son insensibles al daño por excitotoxicidad debido a que en esta etapa hay poca expresión y funcionalidad de los receptores NMDA y AMPA, los principales mediadores de la excitotoxicidad (Liu et al., 1996; Wolf y Keilhoff, 1984; Campochiaro y Coyle, 1978). Cambios durante el desarrollo en la expresión de receptores ionotrópicos a glutamato contribuye en parte a la vulnerabilidad del neonato al daño neuronal por excitotoxicidad (Mitani et al., 1998). Específicamente, hay datos que han mostrado que la expresión del receptor NMDA es mayor durante los días postnatal 6-7, por lo que los autores sugieren que a esta edad el individuo es más vulnerable (Ikonomidou et al., 1996).

Hay modelos experimentales que se han utilizado para reproducir al menos algunos aspectos del daño neuronal por excitotoxicidad; tal es el caso del modelo utilizado por Lucas y Newhouse (1959) y por Olney (1978), en el que la administración subcutánea de 4mg/g de peso de glutamato monosódico (GMS) produce muerte neuronal en individuos que tienen una barrera hematoencefálica poco desarrollada. Recientemente, datos obtenidos en nuestro laboratorio han mostrado que la administración subcutánea de GMS a dosis de 4mg/g de peso a ratas de pocos días de nacidas produce muerte neuronal de aproximadamente el 12% de las estirpes neuronales del campo CA1 del hipocampo de la rata adulta; además de producir en las neuronas remanentes del campo CA1 disminución en la arborización dendrítica y cambios en la densidad de espinas; así como en la proporción del tipo de espinas en la dendrita progenitora (Beas-Zarate et al., 2002). Los autores sugieren que tales alteraciones en la citoarquitectura neuronal podrían ser el

resultado de un fenómeno plástico que tiende a compensar la actividad neuronal exacerbada (Beas-Zarate et al., 2002).

De la misma manera, otras evidencias experimentales han mostrado que el mismo esquema de tratamiento produce incremento en la expresión de las subunidades NR2A y NR2B del receptor NMDA en hipocampo de ratas adultas, por lo que se sugiere que las propiedades del receptor NMDA pueden cambiar y, eventualmente, mediar el evento neurotóxico (Beas-Zarate et al., 2001). Entre otros reportes hay datos que muestran que las mismas condiciones experimentales producen alteraciones en la expresión de genes de las subunidades NR2C y NR2D en el hipocampo; al respecto los autores proponen que la sobre-activación de los receptores NMDA podría modificar la subunidad del receptor y su composición estructural en el desarrollo postnatal y tal sobre-expresión de la subunidad del receptor NMDA es en parte una respuesta compensatoria por alteración en los circuitos neuronales del hipocampo lo que podría ser un factor determinante para modular el patrón de arborización dendrítica y la sinaptogénesis (Beas-Zarate et al., 2002).

Entre otras evidencias experimentales, se sabe que la administración neonatal de GMS a dosis de 4mg/g peso produce disminución del potencial postsináptico excitatorio, así como deficiencias en el mantenimiento y consolidación del LTP en neuronas hipocámpales del campo CA1 de ratas adultas tras la estimulación de las colaterales de Schaffer (Sanabria et al. 2002). La generación del LTP, una forma de plasticidad inducida por la estimulación de alta frecuencia en muchas de las vías excitadoras del SNC, es un fenómeno subyacente a procesos neurobiológicos como la memoria y el aprendizaje (Eichenbaum, 1996; Bliss and Collingridge, 1993). Además, se ha reportado que la inducción y consolidación del LTP esta fuertemente relacionada a variaciones en las espinas dendríticas (Bennet, 2000).

Otros estudios experimentales han mostrado que regiones cerebrales como la corteza prefrontal la administración neonatal de GMS produce muerte neuronal de aproximadamente el 29%, así como retracción dendrítica y disminución en el patrón de arborización en las neuronas piramidales remanentes de la tercera capa de la corteza cerebral. Sin embargo, este tratamiento no produjo cambios ni en la densidad, ni en la proporción de las espinas dendríticas de ratas en edad juvenil (González-Burgos et al., 2001).

Entre otros hallazgos, esta reportado que la administración de dosis GMS inductoras de crisis convulsivas en ratas adultas jóvenes produce reducción en la densidad de espinas en las neuronas piramidales de CA1, sin modificaciones en la forma de las espinas remanentes, es decir los efectos del glutamato sobre la arborización no induce modificaciones en la arborización al corto plazo (González-Burgos et al., 2004).

En su funcionalidad el hipocampo se encuentran relacionado a funciones mnésicas del lóbulo temporal como la memoria declarativa, la cual consiste en el recuerdo conciente de la información, y en recordar lugares, personas y objetos (Squire, 1992). Lo anterior se ha puesto en evidencia en estudios clínicos en los cuales la ablación del hipocampo o el daño en el tejido por isquemia conducen a profundas deficiencias en tareas de aprendizaje y memoria espacial (Corkin et al 1997).

En estudios en roedores, se ha reportado que la lesión hipocampal produce deficiencias en la realización de tareas de tipo espacial, por lo que los autores proponen que las células de lugar forman parte de un sistema integral importante para la navegación espacial (Poucet et al., 2004).

Por otra parte, evidencias experimentales han reportado que la estimulación sostenida de la vía perforante produce deficiencia en la adquisición de memoria espacial.

Se ha relacionado a las deficiencias en el aprendizaje y la memoria con la disminución en la población neuronal de las regiones CA3 y CA1 del hipocampo, lo cual se ve prevenido tras la administración de agonistas glutamatérgicos (Rogers et al., 1989). En concordancia con lo anterior, lesiones en las que se involucra al 40% del volumen total del hipocampo en roedores produce deficiencias en la adquisición de memoria de tipo espacial (Moser et al., 1993; Moser et al., 1995).

En otros estudios experimentales se ha reportado que lesiones en el GD del hipocampo producen deficiencias en la capacidad del individuo para crear diferentes representaciones espaciales del medio ambiente (Hasselmo, 2005). De manera particular, esta demostrado que el GD del hipocampo esta involucrado en la transformación pero no en la recuperación del aprendizaje espacial (Kesner et al., 2006).

Por otra parte, hay estudios que reportan que la inactivación temporal de la región CA3 del hipocampo de ratones tratados con dietilditiocarbamato (DDC), un agente quelante de metales pesados, produce deficiencias en la adquisición pero no en el recuerdo de información de tipo espacial, lo que sugiere que la región CA3 del hipocampo es esencial en la consolidación de la memoria espacial (Florian et al., 2004). Otros hallazgos experimentales mostraron que lesiones en la región CA3 del hipocampo producen deficiencias en la codificación y recuperación de información de tipo espacial, por lo que los autores sugieren que la región CA3 del hipocampo es esencial en la transformación y recuperación de información de tipo espacial (Lee and Kesner, 2004).

Recientemente, se ha observado que animales sometidos a la administración neonatal de GMS muestran deficiencias en la adquisición de información espacial en la edad adulta y que estas deficiencias podrían deberse a alteraciones en la actividad funcional del hipocampo dorsal inducidas por la acción tóxica del fármaco, en el largo plazo (Olvera-Cortés et al., 2005). Así, la muerte neuronal en CA1 así como alteraciones en la citoarquitectura de las mismas quizás sea el sustrato neuronal que subyace a las deficiencias cognitivas reportadas.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La entrada de información al hipocampo a través de la vía perforante activa la transmisión de información excitadora a través del circuito trisináptico que subyace a la organización de las funciones cognoscitivas en las que dicha estructura participa. El daño excitotóxico producido por glutamato monosódico administrado neonatalmente provoca despoblación neuronal y cambios en la citoarquitectura neuronal de las células piramidales del campo CA1 de hipocampo de ratas, que podrían estar relacionados con algunas de las alteraciones en el aprendizaje espacial reportadas en estudios previos. Sin embargo, no se han estudiado los efectos de la administración de glutamato monosódico sobre el resto de los componentes neuronales del circuito trisináptico.

HIPOTESIS

La administración neonatal de glutamato monosódico produce modificaciones en la citoarquitectura de las neuronas granulares del giro dentado y piramidales de los campos CA3 y CA1 del hipocampo de ratas, en la edad adulta.

OBJETIVO GENERAL

Caracterizar la citoarquitectura de las neuronas del circuito trisináptico del hipocampo de ratas adultas, después de la administración neonatal de glutamato monosódico.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Cuantificar y comparar el patrón de arborización de las neuronas del Giro Dentado y del Campo CA1 del hipocampo.
2. Cuantificar y comparar la densidad de espinas dendríticas de las neuronas del Giro Dentado y del campo CA1 del hipocampo.
3. Cuantificar y comparar la densidad proporcional de las espinas delgada, gorda, en hongo, ancha, dobles y ramificadas en las neuronas del Giro Dentado y del campo CA1 del hipocampo.
4. Cuantificar y comparar el área de excrescencias espinosas de las neuronas de tallo largo del campo CA3 del hipocampo.

MATERIAL Y METODOS

Animales de laboratorio

Los sujetos de estudio experimental fueron otorgados por el bioterio perteneciente al Centro de Investigación Biomédica de Michoacán (CIBIMI). Se utilizaron ratas macho de la cepa Sprague-Dawley, los cuales fueron mantenidos bajo condiciones estándar de bioterio con ciclos luz / oscuridad de 12 x 12 h (07:00-19:00 h), con suministro de agua y alimento *ad libitum*.

Metodología

Se utilizaron 24 ratas procedentes de diferentes camadas. Ocho animales, que conformaron el grupo experimental, fueron inyectados subcutáneamente con una solución de Glutamato Monosódico (GMS) al 50 % en solución acuosa, a una dosis de 4mg/g de peso corporal, los días 1, 3, 5, y 7 postnatal. El grupo control, de ocho animales, recibió tratamiento con una solución equimolar de Cloruro de Sodio (NaCl) al 17.27% en solución acuosa, a una dosis de 1.37 mg/g de peso; esta solución fue administrada subcutáneamente a los días 1, 3, 5 y 7 postnatal. Un grupo no tratado de 8 animales, conformó el grupo testigo.

Todos los animales fueron sacrificados a los 120 días de edad, para lo cual fueron anestesiados en una atmósfera de éter etílico anhidro y perfundidos por vía intracardiaca con 200mL de solución lavadora, la cual consistió en una solución amortiguadora a base de fosfato de sodio monobásico y fosfato de sodio dibásico 0.1M con pH 7.4; a esta solución se le adicionó 1000 U/L heparina sódica como anticoagulante, y 1g/L procaína como vasodilatador. Durante la perfusión se administró un volumen de 200 mL de solución fijadora, la cual es una solución preparada a base de una solución amortiguadora de fosfatos, pH 7.4, y a la cual se le adicionó formaldehído en proporción al 10%. Ambas soluciones fueron perfundidas a una presión de 140 cm. de agua. Posteriormente se realizó una craneotomía para la extracción de los cerebros, los cuales se dejaron inmersos en solución fijadora por al menos 48 h más. Posteriormente se llevó a cabo la disección de los cerebros para la obtención del hipocampo.

Como resultado de la disección del cerebro, se seleccionó el bloque de tejido correspondiente al hipocampo dorsal, el cual fue procesado de acuerdo a

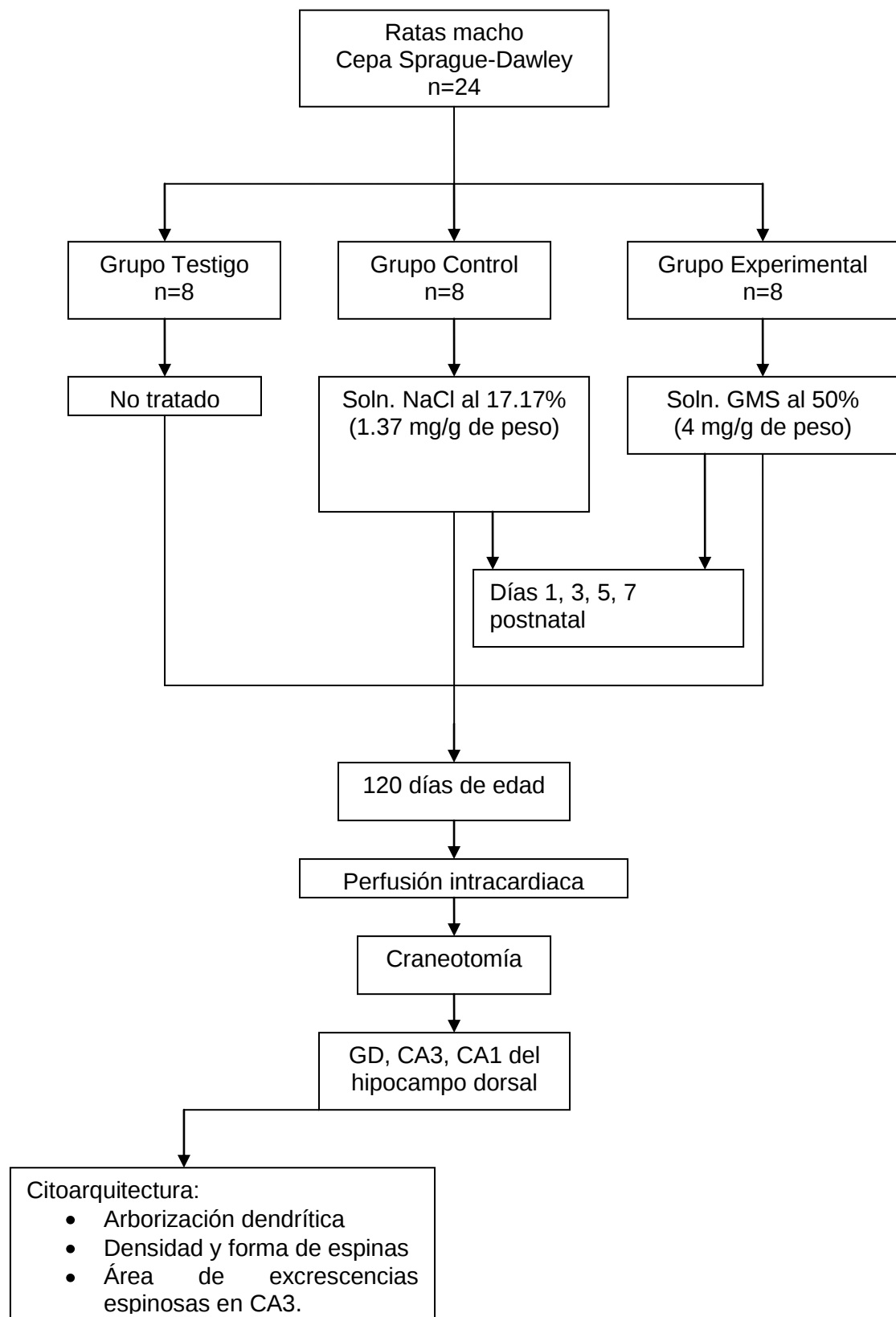
una modificación del método de Golgi (González-Burgos et al., 1992). Se obtuvieron cortes coronales de 100 μm de espesor; de éstos, se seleccionaron 8 neuronas pertenecientes a la región del Giro Dentado del Hipocampo para su estudio morfológico, el cual consistió en la cuantificación de bifurcaciones totales de las dendritas principales. De estas estirpes neuronales, también se cuantifico la densidad así como la forma de las espinas encontradas en 50 μm mediales del tercio dendrítico distal de una dendrita principal.

De las neuronas piramidales de CA3 de tallo largo del hipocampo se seleccionaron 8 neuronas, de las cuales se cuantificó el área ocupada por las excrescencias espinosas, mediante su alineación con un analizador de imágenes (Zeiss Image 3.0).

El análisis de las neuronas pertenecientes a la región CA1 de hipocampo consistió en la cuantificación del número de bifurcaciones totales encontradas tanto en las dendritas basales como apicales. Además, se cuantificó la densidad así como la proporción del tipo de espinas dendríticas encontradas en 50 μm mediales de una de las dendritas oblicuas emergentes de la apical de las neuronas piramidales.

Los datos morfométricos fueron analizados estadísticamente mediante la prueba de varianza (ANOVA) y la prueba de Tuckey .

DIAGRAMA DE FLUJO.



RESULTADOS

En el presente estudio se observó que en el grupo de individuos tratados con GMS a los días postnatal 1, 3, 5 y 7 se produjo un incremento significativo en el número de bifurcaciones de las neuronas granulares de la capa suprapiramidal del GD del hipocampo. Entre los grupos testigo y control no se encontraron diferencias significativas (Figura 8).

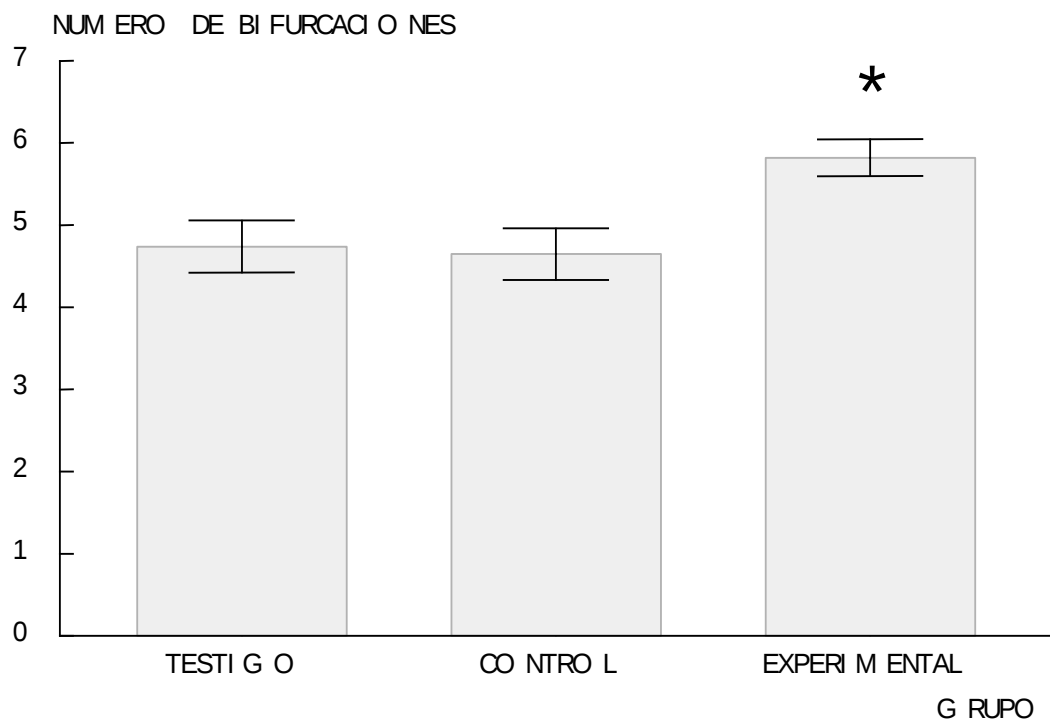


Figura 8.- Representación gráfica del número de bifurcaciones presentes en neuronas granulares de Giro Dentado de las ratas adultas correspondientes a cada grupo de estudio. Grupo Testigo: no tratado; Control: Tratado con NaCl; Experimental: Tratado con GMS. Media $\pm$ error estándar. $p < 0.05$ (ANOVA, Tukey).

En cuanto a la densidad de espinas dendríticas no se encontró diferencia significativa entre los tres grupos. Lo mismo ocurrió en la proporción del tipo de espinas en las neuronas granulares de GD del hipocampo (Figura 9 y Tabla 1).

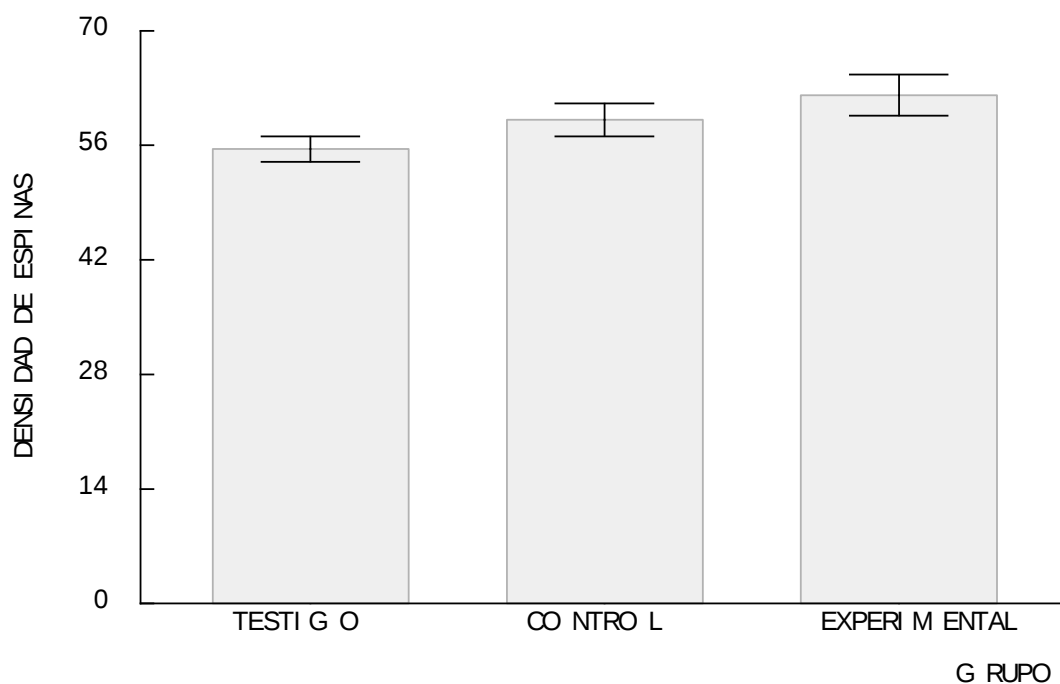


Figura 9.- Representación gráfica de la densidad de espinas dendríticas presentes en 50 μ m mediales del tercio dendrítico distal al soma de neuronas granulares de la capa suprapiramidal de la región del Giro Dentado del hipocampo. Media $\pm$ error estándar. (ANOVA, Tukey).

Tabla 1.- Tabla representativa de la densidad proporcional del tipo de espinas en neuronas granulares del giro dentado del hipocampo.

TIPO DE ESPINA	TESTIGO	CONTROL	EXPERIMENTAL
DELGADA	25.37 $\pm$ 1.32	27.51 $\pm$ 1.13	27.18 $\pm$ 1.62
GORDA	11.18 $\pm$ 0.26	9.85 $\pm$ 0.55	12.37 $\pm$ 0.88
HONGO	16.33 $\pm$ 0.64	19.1 $\pm$ 0.99	18.85 $\pm$ 0.76
ANCHA	2.26 $\pm$ 0.23	2.04 $\pm$ 0.24	2.82 $\pm$ 0.39
RAMIFICADA	0.33 $\pm$ 0.12	0.37 $\pm$ 0.05	0.68 $\pm$ 0.11
DOBLE	0.04 $\pm$ 0.25	0.04 $\pm$ 0.25	0.10 $\pm$ 0.05

Media $\pm$ error estándar (ANOVA, Tukey).

Respecto a las neuronas piramidales de tallo largo de CA3, no se encontró diferencia significativa entre grupos en el área que ocupan las

excrescencias espinosas presentes en la dendrita apical principal de dichas células (Figura 10).

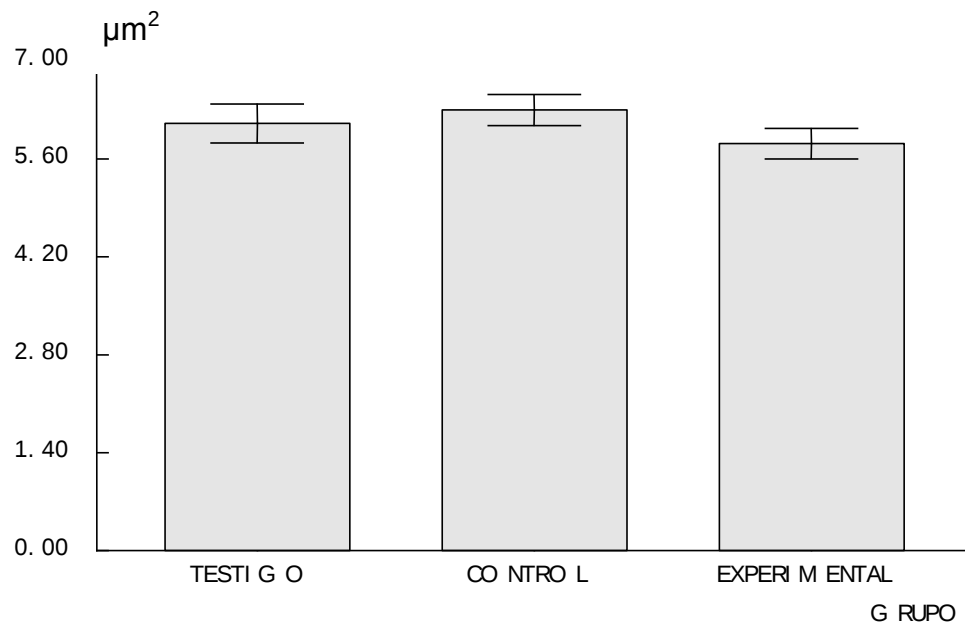


Figura 10.- Representación grafica del área de excrescencias espinosas presentes en la dendrita principal apical de neuronas piramidales de tallo largo de la región CA3 del hipocampo. (ANOVA, Tukey).

Referente a los resultados encontrados en el campo CA1 del hipocampo, en el presente trabajo no se encontraron diferencias significativas en el número de bifurcaciones entre los diferentes grupos de estudio (Figura 11). Por otra parte, en la densidad de espinas no se encontraron diferencias significativas entre grupos (Figura 12). Finalmente, se observó un incremento significativo en la proporción de espinas delgadas en el grupo experimental respecto al grupo testigo y al grupo control (Tabla 2).

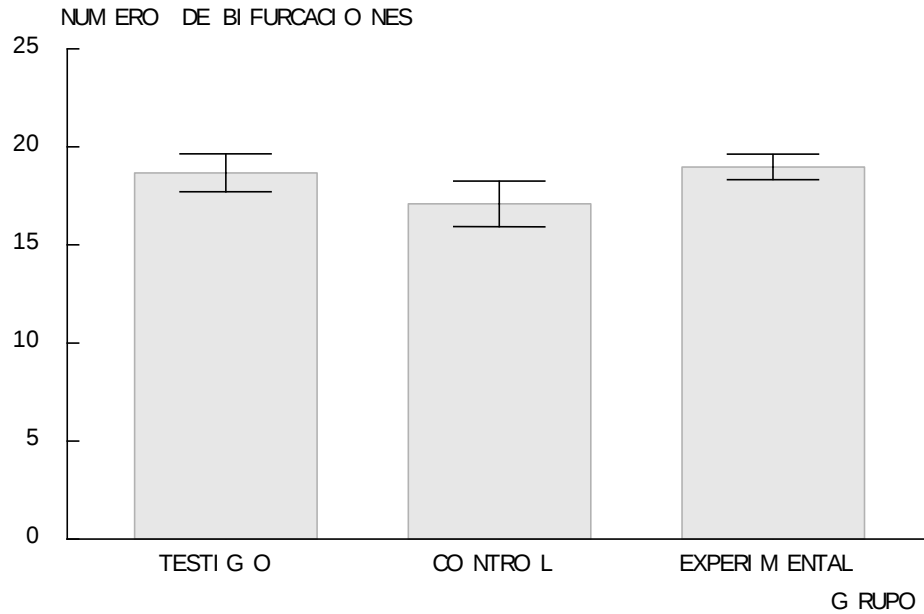


Figura 11.- Representación gráfica del número de bifurcaciones presentes en neuronas piramidales del campo CA1 del hipocampo de las ratas adultas correspondientes a cada grupo de estudio. Grupo Testigo: no tratado; Control: Tratado con NaCl; Experimental: Tratado con GMS. Media $\pm$ error estándar (ANOVA, Tukey).

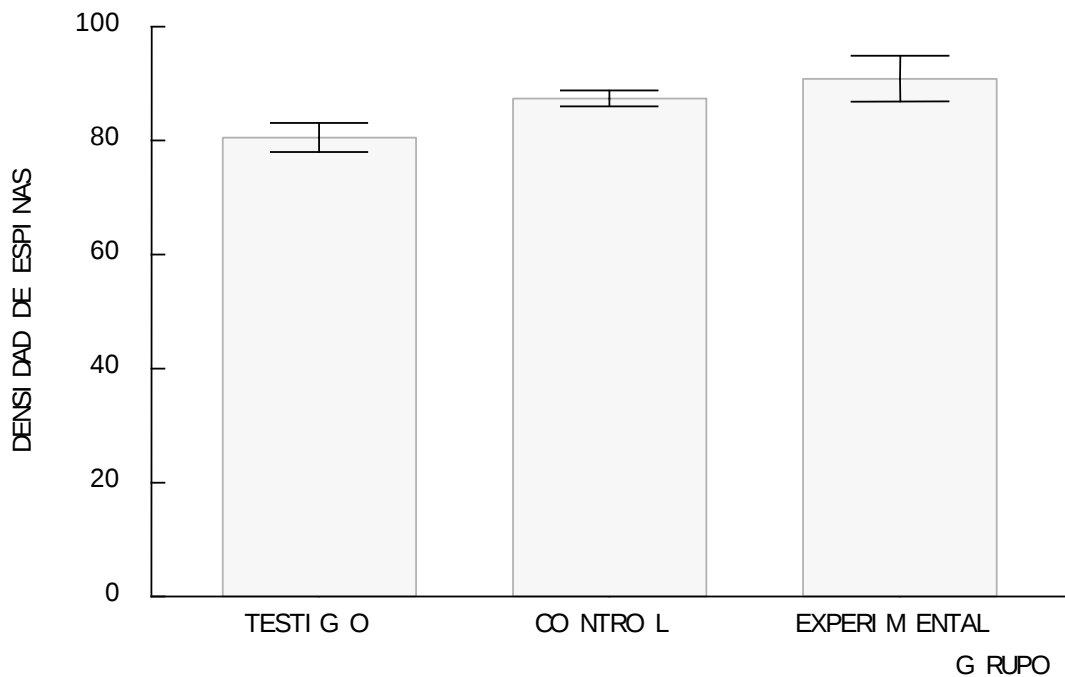


Figura 12.- Representación gráfica de la densidad de espinas dendríticas presentes en 50µm mediales de dendritas oblicuas de neuronas piramidales del campo CA1 del hipocampo (ANOVA, Tuckey).

Tabla 2.- Tabla representativa de la densidad proporcional del tipo de espinas en dendritas de las neuronas piramidales del campo CA1 del hipocampo.

TIPO DE ESPINA	TESTIGO	CONTROL	EXPERIMENTAL
DELGADA	37.43±1.46	39.22±0.84	42.68±1.7 ^{a b}
GORDA	14.37±0.70	15.22±0.53	14.70±0.75
HONGO	25.20±0.97	29.02±0.66	29.20±1.89 ^a
ANCHA	3.18±0.35	3.41±0.44	3.68±0.38
RAMIFICADA	0.26±0.06	0.39±0.12	0.37±0.05
<i>DOBLE</i>	0.60±0.02	0.10±0.03	0.18±0.05

Media ± error estándar (ANOVA, Tukey).

a: Testigo vs. Experimental; b: control vs. Experimental. $p < 0.05$.

DISCUSION

El hipocampo es una estructura subcortical del lóbulo temporal relacionado funcionalmente con procesos de aprendizaje y memoria espacial (O'Keefe and Nadel, 1978). Tales procesos cognoscitivos son fenómenos subyacentes a la entrada de información a través de las fibras de la vía perforante mediante la activación de la neurotransmisión excitatoria de las estirpes neuronales que constituyen el circuito trisináptico hipocampal. Dicho circuito esta integrado por neuronas granulares del giro dentado y neuronas piramidales del campo CA3 y CA1 del hipocampo (Amaral and Witter 1995).

Datos experimentales han mostrado que el daño excitotóxico por la administración neonatal de glutamato monosódico produce despoblación neuronal, así como cambios en la citoarquitectura de neuronas remanentes del campo CA1 del hipocampo de la rata adulta (Beas-Zarate et al., 2002). Así mismo, se han reportado deficiencias cognoscitivas relacionadas con la capacidad de aprendizaje espacial (Olvera-Cortés et al., 2005). Otros trabajos han reportado incremento en la expresión de las subunidades NR1, NR2A y NR2B, así como de las subunidades NR2C NR2D del receptor NMDA en el hipocampo de la rata adulta, lo que se ha asociado con alteraciones en la apertura del canal iónico y, por lo tanto, con la sensibilidad del mismo (Beas-Zarate et al., 2001). Las alteraciones de las subunidades NR2C y 2D estarían relacionadas con el crecimiento dendrítico (Beas-Zarate et al., 2002), lo que resulta congruente con los hallazgos del presente estudio, en relación con las modificaciones en la arborización dendrítica en las neuronas granulares del GD. En el presente trabajo se observo un incremento significativo en el número de bifurcaciones, en tanto que en la densidad y proporción del tipo espinas dendríticas no se observaron diferencias significativas. Lo anterior sugiere que, aunque no existe mayor aglutinamiento de espinas por unidad de área dendrítica, existe mayor número de espinas totales y con ello, mayor número de contactos sinápticos en relación con el incremento la arborización dendrítica. El incremento en el número de bifurcaciones quizás se deba al efecto que tiene el glutamato sobre procesos de remodelación compensadores de la excitabilidad neuronal exacerbada. El hecho de que no se vea modificada la densidad de espinas sugiere que tales neuronas granulares pueden modular

de manera eficiente la excitabilidad neuronal exacerbada por la liberación excesiva de glutamato.

En lo que se refiere a las neuronas piramidales de tallo largo de CA3 del hipocampo, en el presente trabajo no se encontraron diferencias significativas en el área que ocupan las excrescencias espinosas presentes en la dendrita apical principal. Las excrescencias espinosas son un tipo de espina que se sabe tienen una alta capacidad metabólica debido a la presencia de organelos metabólicamente activos que están ausentes en las espinas dendríticas simples (Chicurel and Harris, 1992). Datos experimentales han mostrado la presencia de canales de calcio activados por voltaje y una baja densidad de receptores NMDA en la periferia de las excrescencias en contraste con las espinas simples, por lo que han sugerido que en las espinas complejas como las excrescencias espinosas la dinámica del Ca^{++} depende principalmente de la activación de canales de calcio dependientes de voltaje activados por la despolarización mediada por el receptor AMPA (Reid et al., 2001). La importancia del flujo de calcio en las excrescencias espinosas a través de los canales de calcio dependientes de voltaje se desconoce; sin embargo, se ha sugerido que probablemente la transición localizada de este ión probablemente se encuentre mediando eventos plásticos, así como procesos homeostáticos en la espina (Reid et al, 2001). La activación de canales de Ca^{++} dependientes de voltaje en las excrescencias puede por lo tanto, ser importante para mediar procesos dependientes de Ca^{++} en la sinapsis donde hay baja densidad de receptores NMDA (Jaffe and Brown, 1997).

En las neuronas del campo CA1 del hipocampo no se observaron diferencias en el número de bifurcaciones, sin embargo observamos una mayor densidad proporcional en las espinas delgadas. La proporción mayor de las espinas delgadas en una neurona, sugiere la facilidad con la cual esta es excitada. En base a la geometría de su cabeza y cuello, se dice que la espina delgada es más eficiente para la transmisión del impulso sináptico porque tienen un cuello demasiado estrecho por lo que ocurre un incremento más rápido en el potencial de la membrana tras la inversión del mismo después de haberse presentado un impulso sináptico (Koch et al.; 1992). Este hecho nos permite sugerir que la densidad de espinas delgadas es mayor debido a la hiperexcitabilidad neuronal. En este sentido, se ha propuesto que las espinas

que tienen cuellos largos como las espinas delgadas presentan cierta tendencia a retener más calcio en sus cabezas lo cual podría estar relacionado con mecanismos neuroprotectores de daño inducido por la sobre-estimulación química mediada por la neurotransmisión glutamatérgica (González-Burgos et al., 2004), lo que resulta congruente con el modelo de inducción de excitotoxicidad utilizado en el presente estudio.

La administración neonatal de glutamato produce incremento en la expresión de la subunidad NR2C y NR2D (Beas-Zarate et al., 2002), en el hipocampo de la rata adulta. Hay datos que muestran que hay una expresión mayor de estas subunidades en relación a las otras, en el curso de la edad postnatal (Wenzel et al., 1997). Además, se ha sugerido que la presencia de estas subunidades desempeña una función importante en el desarrollo dendrítico y diferenciación neuronal respectivamente (Metzger et al., 2005; Kitayama et al., 2004), lo cual en parte sustenta lo observado en la arborización dendrítica tanto de las neuronas granulares del giro dentado. Por otro lado, se han observado alteraciones en la expresión de las subunidades NR1, NR2A y NR2B en estudios en que se induce excitotoxicidad en un modelo semejante al utilizado en el presente estudio (Beas-Zarate et al., 2001). Lo anterior pudiera estar relacionado con deficiencias en la integración de la información aferente mediada por glutamato a receptores NMDA localizados en las espinas dendríticas de neuronas principales del hipocampo (en preparación). Lo anterior contribuiría a explicar la baja eficiencia conductual en el aprendizaje espacial reportada previamente con la utilización de este mismo modelo experimental (Olvera-Cortés et al., 2005) y, por otro lado, estaría relacionado con la posible expresión de mecanismos plásticos compensatorios tales como el incremento de espinas altamente eficientes (Koch et al., 1992) observado en el presente estudio en el campo CA1, las cuales están, además, directamente relacionadas con la adquisición de información nueva, es decir, con el aprendizaje (Kasai et al., 2003; Bourne and Harris, 2007).

Funcionalmente el hipocampo es importante para el establecimiento de aprendizaje y memoria espacial (O'Keefe and Nadel, 1978). En base a esto, datos conductuales obtenidos en nuestro laboratorio han revelado que la administración neonatal de glutamato produce deficiencias en la actividad integrativa del hipocampo; específicamente el individuo presenta deficiencias

en la adquisición y recuperación de información espacial nueva (Olvera-Cortés et al., 2005). En relación al papel que desempeñan cada una de las regiones que integran el circuito trisináptico hipocampal, hay datos que muestran que funcionalmente la región del giro dentado participa de manera importante en el patrón de separación de información espacial, lo cual es esencial para determinar la representación intrahipocampal del ambiente (Lee and Kesner, 2004). Se ha observado que la región del giro dentado en conjunto con el campo CA3 del hipocampo participa de manera importante en el proceso de codificación de información espacial nueva (Marr, 1971), lo que estaría sustentado en la relación anatómica entre las neuronas granulares y la región CA3 a través de las fibras musgosas. Además, cabe mencionar que a las neuronas piramidales del campo CA3 no llegan solo fibras provenientes del giro dentado, sino también llegan fibras provenientes de la vía perforante para establecer un contacto primario con tales neuronas; al respecto hay hipótesis que postulan que tales conexiones están relacionadas con el proceso de adquisición de la información espacial que va a ser integrada dentro del hipocampo (Lee and Kesner, 2004). Por todo ello, han sugerido algunos autores que funcionalmente la región de CA3 participa de manera importante en los procesos de codificación rápida de información espacial nueva, así como en el proceso de adquisición de información espacial en el contexto de memoria a corto plazo a través de dos vías diferentes (Lee and Kesner, 2004). Por su parte, la actividad de las neuronas de CA1 se ha visto asociado a procesos de recuperación de información espacial nueva; esta región hipocampal representa la principal vía eferente de información del hipocampo a otras estructuras corticales (Lee et al., 2004). Con base en lo anterior, los cambios observados en la citoarquitectura de las neuronas que constituyen a CA1 podrían en cierta manera estar relacionados con las deficiencias en la actividad integrativa del hipocampo.

En conjunto, en el presente trabajo sugerimos que las modificaciones en la citoarquitectura encontradas en las neuronas granulares del giro dentado y en neuronas piramidales del campo CA1 del hipocampo de la rata adulta podrían representar mecanismos plásticos moduladores de la excitabilidad neuronal exacerbada, subyacentes a las alteraciones en la organización de la información espacial. A estos factores morfológicos, podrían agregarse las

alteraciones en la expresión de las subunidades que conforman al receptor NMDA.

CONCLUSIONES PARCIALES

1. La administración neonatal de GMS produce en la rata adulta modificaciones en la arborización de las neuronas granulares y no así, sin embargo en las neuronas piramidales de CA1.
2. Las excrescencias espinosas de las neuronas piramidales de tallo largo de CA3 no se vieron afectadas por acción tóxica de GMS en el largo plazo.
3. La densidad de las espinas dendríticas se mantuvo sin modificaciones tanto en la región de GD como de CA1.
4. El efecto de la administración de GMS produce incremento en la proporción de espinas delgadas en las dendritas de neuronas piramidales del campo CA1.

CONCLUSION GENERAL

El Glutamato monosódico administrado neonatalmente produce alteraciones en la citoarquitectura de las neuronas del circuito trisináptico del hipocampo de la rata en la etapa adulta. Lo anterior pudiera corresponder a respuestas plásticas residuales tras la acción tóxica del fármaco, aunque no necesariamente de tipo rehabilitador.

REFERENCIAS

- Adams B, Misane I, Schöt PA and Ören SO. A behavioural analysis of the spatial learning deficit induce by the NMDA receptor agonist MK801 dizocilpine in the rat. *Neuropsychopharmacology*, 1999; 24:414-426.
- Aguado-Aguilar L. Aprendizaje y memoria. (ed) Gadea M., y Pérez L. *Rev Neurol* 2001; 32(4):373-381.
- Amaral DG and Witter MP. 1995. Hippocampal Formation. In: *The Rat Nervous System*. Second edition edited by: praxinos G. London, Academy Press, 1995; 443-93.
- Amaral DG. Memory: anatomical organization of candidate brain regions. In Mountcastle VB., (ed). *Handbook of Physiology, The Nervous System*, vol. V. Baltimore: Waverly Press, 1987; 211-294.
- Amarala DG, Ishizuka N and Claiborne B. Neurons numbers and the hippocampal network. In: Store-Mathisen J, Zimmer J and Ottersen OP. (eds) *Understanding the Brain Trough The Hippocampus: Progress Brain Research*. Elsevier, Amsterdam, New York, Oxford, 1990; 83:1-11.
- Arundine M and Tymianski M. Molecular mechanism of calcium-dependent neurodegeneration in excitotoxicity. *Cell Calcium*, 2003; 34:325-337.
- Asztely F and Gustafsson B. Ionotropic glutamate receptors: Their role in the expression of hippocampal synaptic plasticity. *Mol Neurobiol*, 1996; 12:1–11.
- Balázs R, Jorgensen OS, Hack N. NMDA promotes the survival of cerebellar granule cells in culture. *Neuroscience*, 1988; 27:437-451.
- Beas-Zarate C, Pérez-Vega, MI. and González-Burgos I. Neonatal exposure to monosodium L-glutamate induces loss of neuron and cytoarchitectral alterations in hipocampal CA1 pyramidal neurons of adult rats. *Brain Research*, 2002; 952:275-281.
- Beas-Zarate C, Rivera-Huizar SV, Martinez-Contreras A, Feria-Velasco A and Armendarz-Borunda J. Changes in NMDA-receptor

genes expresi3n are associated with neurotoxicity induced neonatally by glutamate in brain rat. *Neurochem Int*, 2001; 39:1-10.

- Beaz-Zarate C, Flores-Soto, ME and Arnedariz-Borunda J. NMDAR y 2D subunites gene expresi3n is induced in brain by neonatal exposure of monosodium L-glutamate to adult rats. *Neurosci Lett*, 2002; 321:9-12.
- Ben-Ari Y, Represa A. Brief seizure episodes induce long-term potentiation and mossy fibers sprouting in the hippocampus. *Trends Neurosci*, 1990; 13:312-318.
- Bennet MR. The concept of long-term potentiation of transmission at synapses. *Prog. Neurobiol*, 2000; 60:109-137.
- Bittigau P and Ikonomidou K. Glutamate in Neurological Diseases J Chile Neurol, 1997; 12: 471-485.
- Bliss, TVP and Collingridge GL. A synaptic model of memory: Long-term potentiacion in the hippocampus. *Nature*, 1993; 361:31-39.
- Bonhoeffer T and Yuste R. Spine motility. Phenomenology, mechanisms, and function. *Neuron*, 20002; 35(6):1019-27.
- Bourne J and Kristen MH. Do thin spines learn to be mushroom spines that remember?. *Current Opinion in Neurobiology*, 2007; 17:1-6.
- Brennan EM, Martin LJ, Jonhston MV and Blue ME. Ontogeny of non-NMDA glutamate receptors in rat barrel field cortex: α -AMPA and Kainate receptors. *J Comp Neurol*, 1997; 386:29-45.
- Buhl HB, Schwerdtfeger KW and Germroth P. New anatomical aproache to reveal afferent and efferent hippocampal circuitry. In: Chan-Palay, V. and K3hler, C.H. (Eds). *The hippocampus. New Vistas*. Alan R. Liss, Inc. USA. 1989:71-83.
- Bulinski JC, Ohm T, Roder H, Spruston N, Turner DA and Wheal HV. Changes in dendritic structure and function following hippocampal lesion: correlations with developmental events?. *Prog Neurobiol*, 1998; 55:641-650.
- Butler AK and Chesselet MF. A role for N-metil-D-Aspartate receptors in the regulation of synaptogenesis and expresi3n of the polisialylated

form of the neural cell adhesion molecule in the developing striatum. *Dev Neurosci*, 1998; 20:253-262.

- Calverley RKS and Jones DJ. Contributions of dendritic spines and perforated synapses to synaptic plasticity. *Brain Res Rev*; 1990, 15:215-249.
- Campochiaro P, Coyle JT. Ontogenetic development of kainate neurotoxicity: correlates with glutamatergic innervation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1978; 75:2025–2029.
- Chicurel ME and Harris KM. Three-dimensional analysis of the structure and composition of CA3 branched dendritic spines and their synaptic relationships with mossy fiber boutons in the rat hippocampus. *J Comp Neurol*, 1992; 325(2-9):169-182.
- Choi DW and Rothman SM. The role of glutamate neurotoxicity in hypoxic-ischemic neuronal death. *Annu Rev Neurosci*, 1990; 13:171-182.
- Choi, DW. Calcium-mediated neurotoxicity: relationship to specific channel types and role in ischemic damage. *Trends Neurosci*, 1988; 11:465-469.
- Claiborne BJ, Amaral DG and Cowan WM. Quantitative, three-dimensional analysis of granule cell dendrites in the rat dentate gyrus. *J Comp Neurol*, 1990; 302:206-219.
- Cline HT, Debski EA, Constantine-Paton M. 1987. N-methyl-D-Aspartate receptor antagonist desegregates eye-specific stripes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987;84:4342-4345.
- Collin C, Mayaguchi K and Segal M. 1997. Dendritic spine density and LTP induction in culture hippocampal slice. *J Neurophysiol*; 1997; 77:1614-1623.
- Conn PJ and Pin JP. Pharmacology and functions of metabotropic glutamate receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 1997; 37:205-237.
- Conrad LCA, Leonard CM and Pfaff DW. Connections to the median and dorsal raphe nuclei in the rat: An autoradiographic and degeneration study. *J Comp Neurol*, 1974;156, 179-206.

- Copper JR, Bloom EF and Roth RH. (eds). Amino Acid Transmitter. In: The biochemical basis of neuropharmacology. Oxford University Press, 2003; 105-150.
- Corkin S, Amaral DG, González RG, Jonson KA and Hyman BT. HM's medial temporal lobe lesion: findings from magnetic resonance imaging. J. Neurosci, 1997; 17:3949-3979.
- Costa E, Guidotti F, Moroni and Peralta E. Glutamic Acid as a Transmitter Precursor and as Transmitter. In: Filer LJ Jr, Garattini S, Kare MR, Reynolds WA, (eds). 1979. Glutamic acid: Advances in Biochemistry and Physiology. New York: Raven Press; pp 151-161.
- Coyle JT, Leski ML and Morrison JH. The diverse roles of L-glutamic acid in brain signal transduction. In: Davis, K.L, Charney, D., Coyle, JT and Nemeroff C. (eds). Neuropsychopharmacology, the fifth Generation of Progress. Lippincott Williams & Wilkins, 2002; 71-90.
- Datta S, Siwek DF, Patterson EH and Cipolloni PB. 1998. Localization of pontine PGO wave generation sites and their anatomical projections in the rat. Synapse, 1998; 30:409-423.
- Diaz-Citra S, Garcia-Ruiz M, Corkidi G, Cintra L. Effects of prenatal malnutrition and postnatal nutritional rehabilitation on CA3 hippocampal pyramidal cells in rats of four ages. Brain Res, 1994; 662:117-126
- Dickenson AH. Amino Acids: Excitatory. In: Webster RA. (ed). Neurotransmitter, Drugs and Brain Function. John Wiley and Sons Ltd, 2001; 211-223.
- Doi T, Ueda Y, Tokumaru J, Mitzuyama Y and Willmore LJ. 2000. Sequential changes in glutamate transporter mRNA levels during Fe⁺³-induced epileptogenesis. Mol. Brain Res. 75:105-112.
- Edwards FA. Anatomy and electrophysiology of fast synapses lead to a structural model for long-term potentiation. Physiol Rev, 1995; 75:759-187.
- Escobar ML, Barera-Rodríguez EJ, Derrick BE, Reyes JA and Martinez JL Jr. Opioid receptor modulation of mossy fiber

synaptogenesis: in dependence from long-term potentiation. Brain Res, 1997; 751:330-335.

- Fiala JC and Harris MK. Dendritic structure. In: Dendrites. Stuart G, Spruston N and Häusser M (eds). Oxford University Press. 1999; 1:1-33.
- Fiala BA, Joyce JN and Greenough WT. Exp Neurol, 1978; 59:372-383.
- Fifková E. Mechanism of synaptic plasticity In N. W. Milgram NW, C.M. McLeod CM and Petit TL (eds). Neurology and Neurobiology, Neuroplasticity, Learning , and Memory. Alan Liss, New York, 1987; 29:61-86.
- Fitch JM, Juraska JM and Washington LM. The dendritic morphology of pyramidal neurons in the rat hippocampal CA3 area. I. Cell types. Brain Res, 1989; 479:105-114.
- Florian, C. and Rouillet, P. Hippocampal CA3-region is crucial for adquisition and memory consolidation in Morris water mice task in mice. Behavioural Brain Research, 2004; 154(2):365-374.
- Foster M. (1897). The Central Nervous System. A Textbook of Physiology. 7th edition. London.
- Freund TF and Buzsáki G. Interneurons of the hippocampus. Hippocampus, 1996; 6:347-470.
- Genoux D and Montgomery JM. Glutamate receptor plasticity at excitatory synapses in the brain. Proceedings of the Australian Physiological Society, 2007; 38:1-7.
- Goldman-Rakic PS. The "psychic" neuron of the cerebral cortex. Ann N Y Acad Sci, 1999; 30(868):13-26.
- Goldman-Rakic PS. Cellular basis of working memory. Neuron, 1995; 14:477-85.
- González-Burgos I, Pérez-Vega MI and Beas-Zarate C. Neonatal exposure to monosodium glutamate induces cell death and dendritic hypotrophy in the rat prefrontocortical piramidal neurons. Neuroscience Letters, 2001; 297:67-72

- González-Burgos I, López-Vázquez MA and Beas-Zarate C. Density but not shape of hippocampal dendritic spines varies after a seizure-inducing acute dose of monosodium glutamate in rats. *Neuroscience Letters*, 2004; 363:22-24.
- González-Burgos I, Tapia-Arizmendi G and Feria-Velasco A. Golgi method without osmium tetroxide for the study of the central nervous system. *Biotech Histochem*, 1992; 67:288-296.
- González-Burgos. Estudio de la plasticidad estructural del hipocampo y de su correlación con la conducta exploratoria de la rata, durante la intoxicación crónica con etanol. Tesis Doctoral. Universidad Nacional Autónoma de México. México. 1997.
- Gottlieb DI and Cowan WM. Autoradiographic studies of the comisural and ipsilateral association connection of the hippocampus and dentate gyrus of the rat. I. The comisural connection. *Journal of Comparative Neurology*, 1973; 149, 393-422.
- Gould E, Westlind-Danielsson A, Frankfurt M, McEwen BS. Sex differences and thyroid hormone sensitivity of hippocampal pyramidal cells. *J Neurosci*, 1993; 10:996-1003.
- Gray EG. Axo-somatic and axo-dendritic synapses of the cerebral cortex: an electron microscopic study. *J Anat Lond*, 1959; 93:420-433.
- Guthrie PB, Segal M. and Katar SB. Independent regulation of calcium revealed by imaging dendritic spines. *Nature*, 1991; 345:76-80.
- Halasy K, Miettinen R, Szabot E and Freund TF. GABAergic interneurons are the major postsynaptic targets of median raphe afferents in the rat dentate gyrus. *Eur J Neurosci*, 1992; 4:144-153.
- Halpain S, Hipolito A and Saffer I. Regulation of f-actin stability in dendritic spines by glutamate receptors and calcineurin. *J Neurosci*, 1998; 18:9835-9844
- Hama, K., Arai, T. and Kosaka, T. Three-dimensional organization of neuronal and glial processes: high voltage electron microscopy. *Microscopy Research Technique*, 1994; 29: 357-367.

- Harina JH and Davis JN. Topography of locus ceruleus neurons projecting to the area dentate. *Exp Neurol*, 1983; 79, 785-800.
- Harris KM. Calcium from internal stores modifies dendritic spine shape. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999; 96:12213-12215.
- Harris KM and Kater SB. Dendritic Spines: Cellular specializations imparting both stability and flexibility to synaptic function. *Annu Rev Neurosci*, 1994; 17:341-71.
- Harris KM, and Jensen FE and Tsao BH. Ultrastructure, Development and Plasticity of Dendritic Spine Synapses in Area CA1 of the Rat Hippocampus: Extending Our Vision with Serial Electron Microscopy and Three-Dimensional Analyses. In: "the Hippocampus-New Vistas". Chan-Palay, V. and Kôhler, Ch. (eds). Alan R. Liss, Inc., 1989; 33-52.
- Hartley DM, Bjerkness L, Weiss JN and Choi DW. Glutamate receptor-induced Ca^{+2} accumulation in cortical cell culture correlatos with subsequent neuronal degeneration. *J Neurosci*, 1993; 13:1993-2000.
- Hille B. G protein-coupled mechanism and nervous signaling. *Neuron*, 1992; 9:187-195.
- Hjorth-Simonsen A and Jeune B. Origin and termination of the hippocampal perforant pathin the rat stidied by silver impregnation. *J. comp. Neurol*, 1972; 144, 215-231.
- Hollman M and Heinemann S. Cloned glutamate receptors. *Annu Rev Neurosci*, 1994; 17:31-108.
- Ikonomidou C, Qin YQ, Labruyere J, et al: Prevention of trauma induced neurodegeneration in infant rat brain. *Pediatric Research*, 1996; 39(6):1020-1027
- Ikonomidou C, Price MT, Mosinger JL, Frierdich G, Labruyere J, Salles KS and Olney JW. Hypobaric-ischemic conditions produce glutamate-like cytopathology in infant rat brain. *J. Neurosci*, 1989; 9:1693-1700.

- Ishizuka N, Cowan WM and Amaral DG. A quantitative análisis of the dendritic organization of piramidal cells in the rat hippocampus. *J. Comp. Neurol*, 1995; 295, 580-623.
- Isokawa M, Levesque M, Fried I, Ángel J Jr. Glutamate currents in morphologically identified human dentate granule cells in temporal lobe epilepsy. *J Neurophysiol*, 1997; 77:3355-3369.
- Isokawa M. Remodeling dendritic spines in the rat pilocarpine model of temporal epilepsy. *Neurosci Lett*, 1998; 258:73-76.
- Jaffe DV and Brown TH. Calcium Dynamics in Thorny Excrescences of CA3 Pyramidal Neurons. *J Neurophysiol*, 1997; 78:10-18.
- Jarrad LE. On the Role of the Hippocampus in Learning Memory in the Rat. *Behavioural and Neural Biology*, 1993; (60)9-26.
- Jonhston MV, Trescher WH, Ishida A and Nakajima W. Neurobiology of hipoxic-ischemic injury in the developing brain. *Pediatr Res*, 2002; 49:735-741.
- Kasai H, Matsuzaki M, Noguchi J, Yasumatsu N, Nakahara H. Structure-stability-functin relationships of dendritic spines. *Trends Neurosc*, 2003; 26:360-8.
- Kennedy MB. Signal processing machinest at te postsynaptic density. *Science*, 2000; 290:750-54.
- Kitayama T, Yoneyama M, Tamiki K, Yoneda Y. Regulation of neuronal differentiation by N-methyl-D-aspartate receptors expressed in neural progenitor cells isolated from adult mouse hippocampus. *J Neurosci Res*, 2004; 76(5):599-612.
- Koch Ch, Zador A, Brown TH. Dendritic spines: convergente of theory and experiment. *Science*, 1992; 256:973-4.
- Koch Ch and Zador A. The function of dendritic spines, devices subsrving biochemical rather than electrical compartamentalization. *J. Neurosci*, 1993; 13:413-22.
- Komuro H, Rakic P. Modulation of neuronal migration by NMDA receptors. *Science*, 1993; 260:95-97.
- Kostyuk P. 1998. Plasticity in nerve cell function. New Cork: Oxford University Press.

- Krichmar J, Nasuto S, Scorcioni R, Washington S and Ascoli G. 2002. Influence of dendritic morphology on CA3 pyramidal cell electrophysiology. *Brain Res* 941:11-28.
- Lambe B, Kuhse J, Betz H. Evidence for a tetrameric structure of recombinant NMDA receptors. *J. Neurosciece*, 1998; 18:2954-2961.
- Lee I, Rao G and Knierim JJ. Adouble dissociation between hippocampal subfields: differential time course of CA3 and CA1 place cells for processing changed environments. *Neuron*, 2004; 2:803-815.
- Lee I and Kesner RP. Encoding versus retrieval of spatial learning: Double dissociation between the dentate gyrus and the perforant path inputs into CA3 in the dorsal hippocampus. *Hippocampus*, 2004; 14,-76.
- Liu Z, Stafstrom CE, Sarkisian M, Tandon P, Yang Y, Hori A, et al. Age-dependent effects of glutamate toxicity in the hippocampus. *Dev Brain Res*, 1996; 97:178–184.;
- Lucas DR and Newhouse JP. The toxic efect of sodium L-glutamate on the inner layers of the retina. *Arch Ophtalmol*, 1957; 58:193-201.
- Magistretti PJ. Brain energy metabolism. In *Fundamental Neuroscience* (ed. M. Zigmond, F. E. Bloom, S. Landis, J. Roberts, and L. Squire), 1999; 389-413. San Diego: Academic Press.
- Majewska A, Brown E, Ross J and Yuste R. Mechanism of calcium decay kinetics in hippocampal spines: role of spine calcium pumas and calcio difusión through the spine neck in biochemical compartmentalization. *J Neurosci*, 2000; 20:1722-34.
- Maren S and Baudry M. Properties and mechanisms of long-term synaptic plasticity in the mammalian brain: relationships to learning and memory. *Neurobiol Learn Mem*, 1995; 63:1–18.
- Marr D. Simple memory: A theory of archicortex. *Phil Trans R Soc London*, 1971; 262:23.81.
- Meador-Woodruff JH and Healy DJ. Glutamate receptor expression in schizophrenic brain. *Brain Res Rev*, 2000; 31:288-294.

- Metzger F, Pieri I, Eisel UL. Lack of NMDA receptor subunit exchange alters Purkinje cell dendritic morphology in cerebellar slice cultures. *Brain Res Dev Brain Res*, 2005; 155(2):165-168.
- Michaelis RL, Rothman SM. Glutamate neurotoxicity in Vitro, antagonist pharmacology and intracellular calcium concentrations. *J. Neurosci*, 1990; 10:283-292.
- Midtgaard J. Processing of information from different sources: spatial synaptic integration in the dendrites of vertebrate CNS. neurons. *Trends Neurosci*, 1994; 17, 166-173
- Mihály A, Kuhnt U, Siklós L and Joó F. Semiquantitative evaluation of histochemically detectable calcium binding in mammalian brain slices. *J. Neurosci. Methods*, 1987; 20:283-293.
- Millar JP, Rall W and Rinzel J. Synaptic amplification by active membrane in dendritic spines. *Brain Res*, 1985; 325:325-330.
- Mitani A, Watanabe M and Kataoka K. Functional change of NMDA receptors related to enhancement of susceptibility to neurotoxicity in the developing pontine nucleus. *J Neurosci*, 1998; 18: 7941–7952.
- Moser MB, Trowald M and Andersen P. 1994. An increase in dendritic spine density on hippocampal pyramidal cells following spatial learning in adult rats suggest the formation of new synapses. *Proc Natl. Acad. Sci. USA* 91:12673-12675.
- Muller RU. A quarter of a century of place cells. *Neuron*, 1996; 17:813-822.
- Muller M, Gähwiler BH, Rietschin L and Thompson SM. Reversible loss of dendritic spines and altered excitability alter chronic epilepsy in hippocampal slice cultures. *Proc. Natl. Acad Sci USA*, 1993; 90:257-261.
- Nadel L and Eichenbaum H. Introducción to the spatial issue on place cells. *Hippocampus*, 1999; 9:341-345.
- Nadler JV, Vaca KM, White WF, Lynch GS and Cotman CW. Aspartate and glutamate as possible Transmitters of excitatory hippocampal afferents. *Nature (Lond.)*, 1976; 260:538-540.

- Nestler ES, Hyman, SE and Malenka RC. (eds) Excitatory and Inhibitory Amino Acids. In: Molecular Neuropharmacology: A Foundation for Clinical Neuroscience. 2001. McGraw-Hill. 1^{era} edición, pp. 141-164.
- Noback ChR and Demarest RJ. The human Nervous System. Basic principles of neurobiology. 1975. McGraw-Hill. USA. pp. 430-7.
- O'Keefe J and Dovstroski J. The hippocampus as a spatial map. Preliminary evidence from unit activity in the freely moving rat Experimental Brain Research, 1971; 34:171-175.
- O'Keefe J, and Nadel L. The Hippocampus as a Cognitive Map. Oxford: Oxford University Press, 1978.
- Olney, JW. Neurotoxicity of excitatory amino acids. In: Kainic Acid as a Tool in Neurobiology, edited by E.G. McGeer, JW Olney and P McGeer. New York: Raven, 1978.
- Olney. J.W.. Excitotoxic amino acids: Research applications and safety implications. In: Filer LJ et al. eds. Glutamic acid: Advances in Biochemistry and Physiology. Raven Press, 1979; 287-319.
- Olvera-Cortés, E., López-Vázquez, M.A., Beas-Zárate, C. and González-Burgos, I. 2005. Neonatal exposure to monosodium glutamate disrupts place learning ability in adult rats.
- Ottersen, O.P. and Storm-Mathisen, J. 1989. Excitatory and Inhibitory Amino Acids in the Hippocampus. In: "the Hippocampus-New Vistas". Alan R. Liss, Inc. pp 97-117.
- Pérez-Vega MI, Feria-Velasco A, González-Burgos I. Prefrontocortical serotonin depletion results in plastic changes of prefrontocortical neuros underlying a grater efficiency of short-term memory. Brain ResBull 2000; 53:291-300.
- Poirazi P, Brannon T and Mel BW. 2003. Arithmetic of subthreshold synaptic summation in a model CA1 pyramidal cell. Neuron 37:977-987.
- Pokorny J and Yamamoto T. 1981. Postnatal ontogenesis of hippocampal CA1 area in rats. Development of dendritic arborization in pyramidal neurons. Brain Res Bull 7:113-120.

- Pokorny J. and Trojan S. 1983. Chronic changes in the receptive fields of the pyramidal cells of the rat hippocampus after intermittent postnatal hypoxia. *Physiol Mhemoslov* 32:393-402.
- Poucet, B., Lenk-Santini, P.P., Hok V., Save, E., Banquet, J.P., Gaussier, P. and Muller, R.U. 2004. Spatial navigation and hippocampal place cell firing: the problem of goal encoding. *Rev. Neurosci.* 12(2):89-107.
- Ramón y Cajal S. 1888. Estructura de los centros nerviosos. En: Lippman J. and Dunaevsky A. Dendritic Spine Morphogenesis and Plasticity. *J Neurobiol* 2005;64:47-57.
- Reid CA, Fabian-Fine R and Fabian A. Postsynaptic Calcium Transients Evoked by Activation of Individual Hippocampal Mossy Fiber Synapses. *The Journal of Neuroscience*, 2001, 21(7):2206-2214.
- Rogers, B.C., Barnes, M.I., Mitchell, C.L. and Wilson, H.A. 1989. Functional deficits after sustained stimulation of the perforant path.
- Rothman SM and Olney Jw. 1986. Glutamate and the pathology of hypoxic-ischemic brain damage. *Ann. Neurol.* 19:105-111.;
- Sabatini BL, Svoboda K. 2000. Analysis of calcium channels in single spines using optical fluctuations analysis. *Nature*; 408:589-93.
- Sanabria, E.R.G., Pereira, M.F.S., Dolnikoff, M.S., Andrade, I.S., Ferreira, A.T., Cavaleiro, E.A. and Fernandes, M.J.S. 2002. Deficit in hippocampal long-term potentiation in monosodium glutamate-treated rats. *Brain Research Bulletin*, 59(1):47-51.
- Sattler R and Timianski M. 2000. Molecular mechanism of calcium-dependent excitotoxicity. *J Mol Med*; 78:3-13.
- Scheibel ME, Crandall PH and Scheibel AB. 1974. The hippocampal-dentate complex in temporal lobe epilepsy. A Golgi study. *Epilepsia* 15:55-80.
- Segal M. Morphological alterations in dendritic spines of rat hippocampal neurons exposed to NMDA. 1995, *Neurosci. Lett.* 193:73-75

- Segal M. Morphological alterations in dendritic spines of rat hippocampal neurons exposed to NMDA. *Neurosci. Lett.* 193:73-75.
- Seifert G, Zhou M, Dietrich D, Shumacher TB, Dybek A, Weiser T, Wienrich M, Wilhelm D and Steinhäuser C. Developmental regulation of AMPA-receptor properties in CA1 pyramidal neurons in rat hippocampus. *Neuropharmacology* 39(2000) 931-942.
- Seress L and Pokorny J. 1981. Structure of the granular layer of the dentate gyrus. A Light microscopio and Golgy Study. *J. Anat.*, 133/2:181-195.
- Shapiro MI and Eichenbaum H. 1999. Hippocampus as a memory map: synaptic plasticity and memory encoding by hippocampal neurons. *Hippocampus* 9:365-384.
- Smart F.M and Halpain S. Regulation of Dendritic Spine Stability. *Hippocampus* 2000;10:542-554.
- Sommer B, Monyer H, Wisden W, Verdoorn TA, Burnashev N, Sprengel R, Sakmann B, Seeburg PH. Glutamate-gated ion channels in the brain. Genetic mechanism for generating molecular and functional diversity. *Arzneimittelforschung* 1992; 42:209-10.
- Sorra, K.E., Fiala, J.C. and Harris K.M. 1998. Critical assesment of the involvement of perforations, spinulas, and spine branching in hipocampal synapse formation. *J Comp Neurol* 398:225-240.
- Squire, L.R. 1992. Memory and the hippocampus: a synthesis from findings with rats, monkeys, and humans. *Psychol Rev* 99: 195–231.
- Stanfield, V.V. and Cowan, W.M. the development of the hippocampal region. En: Peters, A. y Jones, E.G. 1988. *Cerebral cortex*. Vol. 7. Development and maturation of cerebral cortex. Peters, A. y Jones, E.G. (eds). Plenum Press. N.Y. 6:91-131.
- Steward, O. 1976. Topographic organization of the projections from the entorrinal area to hippocampal formation of the rat. *J. comp. Neurol.* 167:258-314.
- Majan DS, Desiraju T. 1988. Alterations of dendritic branching and spine densities of hippocampal neurons induced by operant conditions in the phase of brain growth spurt. *Exp. Neurol.* 100:1-15.

- Swann JW, Al-Noori S, Jiang M and Lee CL. 2000. Spine loss and other dendritic abnormalities in epilepsy. *Hippocampus* 10:617-625.
- Tarelo-Acuña, L., Olvera-Cortés, E., and González Burgos, I. 2000. Prenatal and postnatal exposure to ethanol induces changes in the shape of the dendritic spinea from hippocampal CA1 pyramidal neurons of the rat. *Neurosci Lett* 286:13-16.
- Tymianski, M. 1996. Cytosolic calcium concentrations and cell death in Vitro. In: Siesjo BK, Wieloch T (eds) *Advances in neurology*. Lippincott-Raven, Philadelphia, pp 85-105.
- Ullensvang, K., Lehre, K. P., Storm-Mathisen, J. & Danbolt, N. C. (1997) Differential developmental expression of the two rat brain glutamate transporter proteins GLAST and GLT. *Eur. J. Neurosci.* 9: 1646–1655.
- Volfovski N. Parnas H., Segal M; and Korkotian E. Geometry of dendritic spines affects calcium dynamic in hippocampal neurons: Theory and experimens. *J. Neurophysiol.* 1999;81:450-62.
- Volpe BT., Davis HP., Towle A., Dunlap WP. Loss of hippocampal CA1 pyramidal neurons correlatos with memory impairment in rats with ischemic or neurotoxin lesions. *Behav Neurosci.* 1992;106:457-464.
- von Campe G, Spencer DD, Lanerolle NC. 1997. Morphology of dentate granule cells in the human epileptogenic hippocampus. *Hippocampus* 7:472-488.
- Weindl A. 1973. Neuroendocrine aspects of circumventricular organs. In *Frontiers in Neuroendocrinology*, edited by W.F. Ganong and L. Martin, pp. 3-32. Oxford University Press. New York.
- Wensel A, Fritsch JM, Moler H and Benke D. NMDA receptor heterogeneity during postnatal development of the rat brain: deferential expression of the NR2A, NR2B and NR2C subunit protein. *J Neurochem.* 68 (1997)469-478.
- Witter MP and Amaral DG. Hippocampal Formation. In: *The Rat Nervous System*. Geroge Paxinos (ed). 3^a edition. Elsevier Academic Press. 2004, p. 635-704.

- Witter, P.M. Connectivity of the rat hippocampus. In: The hippocampus. New Vistas. Chan-Palay, V. and Köhler, Ch. (eds). Alan R. Liss, Inc. USA. 1989. pp 53-69.
- Wodley, C. S., Gould, E., Frankfurt, M. and McEwen, B. S. 1990. Naturally occurring Fluctuation in dendritic spine density on adult hippocampal pyramidal neurons. J. Neurosci. 10:4035-9.
- Wolf G, Keilhoff G (1984) Kainate and glutamate neurotoxicity in dependence on the postnatal development with special reference to hippocampal neurons. Dev Brain Res 14:15–21.;
- Wollmuth, L. P. and Sakmann, B. 1998. Different mechanism of Ca^{+2} transport in NMDA receptor and Ca^{+2} -permeable AMPA glutamate receptor channels. J. Gen Physiol 112:623-636.
- Woolley CS. Structural plasticity of dendrites. In: Dendrites. Stuart G, Spruston N and Häusser M (eds). Oxford University Press 1999; 339-364.