

Veterinaria México

Volumen 35
Volume

Número 4
Number

Octubre-Diciembre 2004
October-December

Artículo:

Dimorfismo sexual en el volumen del *stratum* granular y el sistema de fibras musgosas del hipocampo de ratas juveniles testigo y malnutridas prenatalmente

Derechos reservados, Copyright © 2004:
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM

Otras secciones de
este sitio:

- 👉 [Índice de este número](#)
- 👉 [Más revistas](#)
- 👉 [Búsqueda](#)

*Others sections in
this web site:*

- 👉 [Contents of this number](#)
- 👉 [More journals](#)
- 👉 [Search](#)



www.Medigraphic.com

Dimorfismo sexual en el volumen del *stratum* granular y el sistema de fibras musgosas del hipocampo de ratas juveniles testigo y malnutridas prenatalmente

Sexual dimorphism in the granule cell *stratum* and the mossy fibers system of the hippocampus in young control and prenatally malnourished rats

Norma Serrano-García***
Leticia Granados-Rojas***
Sofía Díaz-Cintra***

Abstract

Prenatal protein malnutrition leads to more anatomical alterations in the hippocampus in older rather than in younger rats. However, sex differences are unknown. In the present study we estimated the volume in the granule cell *stratum* (GCS) and mossy fiber system (MFS) in male and female 30-day-old Sprague-Dawley rats, born from dams fed a normal 25% or 6% casein diet during gestation. At birth, all rats were randomly mixed and fed the 25% casein diet until euthanized. There were four experimental groups: 1) male controls, 2) male prenatally malnourished, 3) female controls, and 4) females prenatally malnourished. Five brains from each group were perfused and processed using the Timm's method. For each, volume was estimated using the Cavalieri's principle, and the dentate gyrus was analyzed as follows: *a*) GCS volume; *b*) supra and *c*) infrapyramidal bundle plus the hilar region, and *d*) MFS total volume. No significant sex-related effects were found on GCS measurements in control animals. However, total MFS and suprapyramidal bundle volumes were significantly reduced in female rats compared to male controls. Also, 30-day-old female rats had significantly smaller GCS and MFS regions than malnourished males. Thus, this study supports the hypothesis that the volume of the hippocampus undergoes sex-dependent changes especially in rats that were prenatally malnourished.

Key words: PRENATAL MALNUTRITION, HIPPOCAMPUS, GRANULAR *STRATUM*, MOSSY FIBERS, SEXUAL DIMORPHISM.

Resumen

La malnutrición proteínica prenatal produce mayores alteraciones en la morfología del hipocampo de ratas adultas que en las ratas jóvenes. Sin embargo, no se conoce si hay diferencias por género. En el presente estudio se estimó el volumen del *stratum* de las células granulares (SCG) y del sistema de fibras musgosas (SFM) en ratas macho y hembra de 30 días de edad, Sprague-Dawley, que nacieron de madres nutridas con dieta normal (25%) o malnutridas con sólo 6% de caseína durante la gestación. Al nacimiento, las crías se mezclaron y fueron asignadas a madres nodrizas alimentadas con dieta de 25% de caseína y mantenidas con esta dieta hasta su sacrificio. Se formaron cuatro grupos de ratas experimentales: 1) machos testigo, 2) machos malnutridos prenatalmente, 3) hembras testigo y 4) hembras malnutridas prenatalmente. Se perfundieron y procesaron con el método de Timm cinco cerebros de cada grupo experimental. En cada uno se estimó el volumen mediante el principio de Cavalieri y se analizaron en el giro dentado: *a*) el volumen del SCG, los haces *b*) supra, *c*) infrapirramidal más la región del hilus y *d*) volumen total del SFM. No se hallaron efectos significativos por género en las mediciones del SCG en animales testigo. Sin embargo, el volumen total del SFM y el haz suprapirramidal disminuyó significativamente en ratas hembras testigo con respecto la rata macho testigo. Además, en la rata hembra de 30 días, todas las regiones del SCG y el SFM fueron significativamente menores en comparación con las ratas macho malnutridas prenatalmente. Así, este estudio soporta la hipótesis de

Recibido el 7 de julio de 2003 y aceptado el 26 de enero de 2004.

*Laboratorio de Neurotoxicología, Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía, 14269, México, D.F.

**División de Medicina Experimental, Instituto Nacional de Pediatría, Secretaría de Salud, 04530, México, D.F.

***Departamento de Neurobiología del Desarrollo y Neurofisiología, Instituto de Neurobiología, Universidad Nacional Autónoma de México, Campus UNAM-Juriquilla, Apartado Postal 1-1141, Juriquilla, Querétaro, México.

que el volumen del hipocampo muestra efectos diferenciales debido a las diferencias sexuales, en ratas en especial si se ha sufrido malnutrición prenatal.

Palabras clave: MALNUTRICIÓN PRENATAL, HIPOCAMPO, *STRATUM* GRANULAR, FIBRAS MUSGOSAS, DIMORFISMO SEXUAL.

Introduction

During development, the central nervous system is sensitive to different harmful environmental factors such as malnutrition, alcoholism and drug addiction.^{1,2} Such factors lead to functional alterations especially in the cognitive aspect.³ The hippocampus is a brain structure related to this function morphologically affected by malnutrition⁴ depending on when it occurs.⁵ Díaz-Cintra *et al.*⁶ reported that the hippocampus of prenatally malnourished rats euthanized at 4 postnatal ages (15, 30, 90 and 220 days after birth) showed smaller cell size and decreased dendritic branches and thorns of the granule cells of the dentate gyrus. Also the CA3 hippocampal pyramidal cells showed decreases in size of the soma, basal and apical dendrites and thorn density. They also reported that those alterations remain for a long period of time, even after adequate nutrition of rats after birth.⁷ The CA1 hippocampal neurons are also affected in dendritic size and length and the number of thorns at days 30 and 220 after birth. These changes are reflected in the thickness of the *strata, radial* and *molecular*.⁸ In other studies conducted in the hippocampus of male rats under a prenatal hypocaloric and 6% casein diet in the short (15 days after birth) and long (90 and 220 days after birth) periods, a reduction in the area⁹ and volume of the mossy fibers was found,¹⁰ as well as in the number of mossy fiber on the CA3 thorny excrescences.¹¹ Similar volumes in the granule *stratum* of the dentate gyrus and mossy fibers were found in prenatally malnourished 30-day-old female rats.¹²

On the other hand, it is known that there are sex-related differences in the rat brain¹³ as well as in the hippocampus formation as part of the limbic system, which is one of the most studied regions in relation to sexual dimorphism. Hippocampal neurons contain high levels of gonadal steroids and important anatomical differences have been found.¹⁴ Therefore, the hippocampus is thicker on the right side of the male rat and on the left side of the female rat.¹³ When the hippocampus is formed, the volume of the subiculum is larger in males than in females,¹⁵ as well as the number of granule cells in the dentate area.¹⁶ The volume of the mossy fibers of the dentate gyrus is smaller in the female rat because

Introducción

Durante el desarrollo, el sistema nervioso central es sensible a diversos factores nocivos del medio ambiente como la desnutrición, el alcoholismo y la drogadicción, entre otros,^{1,2} que ocasionan alteraciones en sus funciones, particularmente en el aspecto cognitivo.³ El hipocampo es una estructura cerebral relacionada con esta función y la malnutrición afecta este sustrato morfológico,⁴ dependiendo del periodo en el que se instala.⁵ Así, Díaz-Cintra *et al.*⁶ observaron en el hipocampo de ratas que fueron malnutridas durante el periodo prenatal y estudiados en cuatro edades posnatales (15, 30, 90 y 220 días de edad), una disminución del tamaño celular, de ramas y espinas dendríticas de las células granulares del giro dentado. También, las células piramidales del campo CA3 de la misma estructura, mostraron disminuciones en el tamaño del soma, de las dendritas basales y apicales, así como de la densidad de espinas. Además, reportaron que estas alteraciones permanecen a largo plazo aun después de haber restituido nutrimentalmente al animal desde el momento del nacimiento.⁷ La misma malnutrición durante el periodo prenatal, en las neuronas piramidales del campo CA1 del hipocampo en edades posnatales de 30 y 220 días, también se ven afectadas por este factor de malnutrición prenatal que reduce su tamaño, longitud de las dendritas y el número de espinas. Estos cambios se reflejan en el grosor disminuido de los *strata, radial* y *molecular*.⁸ En otros estudios realizados en hipocampos de ratas macho malnutridos durante el periodo prenatal con una dieta hipocalórica pero con sólo 6% de caseína y analizados los efectos en el periodo posnatal (15 días de edad) y a largo plazo (90 y 220 días de edad), se encontró reducción del área⁹ y del volumen de las fibras musgosas,¹⁰ así como disminución en el número de sinapsis de las fibras musgosas sobre las excrescencias torneadas del CA3 del hipocampo.¹¹ Efectos similares de disminución significativa en el volumen del *stratum* granular del giro dentado y de las fibras musgosas por la malnutrición prenatal, se encontraron en ratas hembras de 30 días de edad.¹²

Por otro lado, se sabe que existen diferencias por género en el cerebro de la rata,¹³ y la formación hipocámpica como parte del sistema límbico que es

the number of granule cells is lower; however, the number of synapses is higher balancing the number of synaptic connections between the CA3 granular and the pyramidal cells.¹⁷ In relation to the dendritic branching of the hippocampus and the dentate gyrus there are differences in the density of the branches as well as in the number of dendritic thorns.¹⁸ It is known that neuron losses in the hippocampus are higher in young female than in male rats.¹⁶ Furthermore, studies conducted by Aloisi *et al.*¹⁹ on neuron activity in the hippocampus showed a higher number of neurons labeled with c-fos in females than in males.

When differences are related to the sex of the animals subjected to prenatal malnutrition, behavioral and psychological differences are found.^{20,21} These changes in both sexes can be due to different alterations in the anatomical substrate of the hippocampus. To test this possibility, a previous paper¹² reported that prenatal malnutrition has a significant impact on the volume of mossy fibers and the granule layer only in female rats of 30 days of age.

To elaborate on the differential changes for each strata of the hippocampus, this study was designed in order to establish the sex-dependent differences in the total volume of the dentate gyrus and the intratopographic distribution of the MF divided into supra and an infrapyramidal bundles that make the first and second relay of the trisynaptic circuits of the hippocampus respectively.

Material and methods

Animals and reproduction

Twelve Sprague-Dawley female rats were maintained at 12/12 h dark-light illumination, 22-24°C temperature and a humidity of 40-50%. During the 5 weeks previous to breeding they had free access to feed and water. Six female rats, the control group, were fed a 25% casein diet and the other six, the experimental or malnourished group, were fed a 6% casein diet. After five weeks they were divided in groups of 3 and put in cages with one male. Vaginal smears were performed to check pregnancy and each rat was put in an individual cage and fed the corresponding diet (25% or 6%) during all the gestation period. At parturition the litters born the same day and on the same diet were weighed and separated by sex, and then mixed. Each litter had only 8 rats (4 females and 4 males) from malnourished mothers (6%) that were assigned to foster mothers fed with a 25% casein diet. This was the prenatally malnourished group (6/25). The litters from mothers with a 25% casein diet were kept with their mothers. This was the control group (25/25). The rats were weaned at 21 days of age and

una de las áreas más estudiadas en relación con el dimorfismo sexual, porque sus neuronas poseen altos niveles de esteroides gonadales y porque muestra diferencias anatómicas importantes.¹⁴ Así, el grosor del hipocampo es mayor en el lado derecho en el macho y en la hembra en el izquierdo.¹³ En la formación hipocámpica, el volumen del subiculum es mayor en el macho que en la hembra¹⁵ al igual que el número de neuronas en el giro dentado.¹⁶ El volumen de las fibras musgosas del giro dentado es menor en hembras porque el número de células granulares es menor; sin embargo, la cantidad de sinapsis es mayor, lo que equilibra el número de contactos sinápticos entre las células granulares y piramidales del CA3.¹⁷ En relación con los árboles dendríticos del hipocampo y del giro dentado, son diferentes tanto en la densidad de ramas como en el número de espinas dendríticas.¹⁸ Se sabe que en el hipocampo de los ratones juveniles, la pérdida de neuronas es mayor en las hembras que en los machos.¹⁶ Además, los estudios de Aloisi *et al.*¹⁹ sobre la actividad neuronal en el hipocampo mostraron un mayor número de neuronas marcadas con c-fos en hembras, comparado con los machos.

Cuando se asocian estas diferencias por género en animales sometidos a periodos prenatales de malnutrición, se han encontrado diferencias conductuales y fisiológicas.^{20,21} Estos cambios en ambos géneros pueden deberse a las alteraciones diferenciales en el sustrato anatómico del hipocampo. Para probar esta posibilidad, en un trabajo previo¹² se informó que la malnutrición prenatal afecta significativamente el volumen del sistema de fibras musgosas y la capa granular sólo en ratas hembras de 30 días de edad.

Para abundar acerca de los cambios diferenciales por cada strata del hipocampo, se diseñó el presente estudio para establecer las diferencias por género del volumen total del *stratum* granular del giro dentado y de la distribución intratopográfica de las FM divididas en dos haces supra e infrapiramidal que constituyen parte del primer y segundo relevos del circuito trisináptico hipocámpico, respectivamente.

Material y métodos

Animales y reproducción

Se utilizaron 12 ratas hembras de la cepa Sprague-Dawley, que se mantuvieron bajo idénticas condiciones de iluminación (12/12 h oscuridad/luz), temperatura (22-24°C) y humedad (40-50%), con libre acceso al alimento y agua durante cinco semanas previas a la cruce. Seis hembras del grupo testigo se alimentaron con una dieta de 25% de caseína y seis del grupo malnutrido con sólo 6%. Para la reproducción, después de las cinco semanas, se separaron tres ratas

put in pairs in separate cages (16 cages total). The pairs were separated by sex and type of diet (6/25, 25/25). They had free access to water and a 25% casein diet.

Histological procedure

At 30 days of age, male and female rats (5 animals/group) were weighed before being anesthetized with 50 mg/kg pentobarbital and while under deep sleep were perfused with a sodium sulphide buffer solution followed by 1% paraformaldehyde and 1.25% glutaraldehyde in 0.10M phosphate buffer, pH 7.4¹⁰. After perfusion, the brains were removed, weighed, and post-fixed in the same fixative adding 30% sucrose for cryoprotection. Then, tissue blocks containing the subiculum and hippocampus were cut in the cryostat in a rigorous serial sequence in the coronal plane; each section was 40 micrometers and placed on a slide. Once sections were dried and attached, Timm's method was used for processing.²² All the preparations were dehydrated and mounted in synthetic resin, covered with a slide cover and allowed to dry guarded against dust. They were then classified according to the experiment. Study zones were identified in each preparation as indicated in Figure 1.

Stereology

Only in the sections classified in the equivalent and equidistant planes of each brain, volumes were estimated by group: 1) from the total granule stratum (TGS), 2) the sub pyramidal bundle of the MFS (SBMFS), 3) the infrapyramidal bundle of the MFS plus the hilar region (IBHMFS) and 4) the total mossy fiber system (TMFS). A light microscope with lighted camera and flat chromatic 6.3X objective was used for evaluation and under which drawings were made along the hippocampus. Stereological measurements were made for each animal, randomly choosing the first section among the first ten; then sections were selected every 400 micrometers. For volume quantification the Cavalieri principle was applied,²³ counting the points falling in the region under scrutiny. The total number was obtained multiplying the number of points times the area of each one and the section thickness. The statistical analysis for volume of the regions analysed was made using the version 10 of the SPSS package followed by a Student "t" test.

Results

Body and brain weight

Although body weight of females in both experimental groups (control and malnourished) is less compared

hembras en cada caja a la que se le colocó un macho. Se realizaron frotis vaginales para identificar a las hembras preñadas, y cada animal se colocó en una caja independiente y se alimentó con la dieta correspondiente (25 o 6%) durante todo el periodo de gestación. Al momento del parto, las camadas nacidas en el mismo día y de la misma dieta nutritiva se pesaron y separaron por sexo y luego se mezclaron entre sí. Cada camada, contenía sólo ocho crías (cuatro hembras y cuatro machos) provenientes de madres malnutridas (6%) que se asignaron a madres nodrizas bien alimentadas con una dieta al 25% de caseína y se formó el grupo malnutrido prenatal (6/25). Los críos descendientes de madres alimentadas con la dieta de 25% de caseína se mantuvieron con sus madres formando el grupo testigo (25/25). A los 21 días de edad, los animales se destetaron y se separaron dos animales en cada caja (16 cajas en total), los cuales fueron separados por género y por condición nutricional (6/25, 25/25) y tuvieron libre acceso al agua y a la dieta de 25%.

Procedimiento histológico

A los 30 días de edad, las ratas macho y hembra testigo y experimentales (cinco animales/grupo) se pesaron antes de anestesiarlos con pentobarbital (50 mg/kg), y bajo plano anestésico profundo, se procedió a su perfusión por vía intracardiaca haciendo pasar una solución amortiguadora de sulfuro de sodio seguido de un fijador formado por 1% paraformaldehído y 1.25% de glutaraldehído en solución amortiguadora 0.10 M de fosfatos pH 7.4.¹⁰ Después de la perfusión, se extrajeron los cerebros, se pesaron y se fijaron en el mismo fijador adicionado con 30% de sacarosa para su crioprotección. Posteriormente se procedió a cortar, en el criostato, los bloques de tejido que contenían la formación hipocámpica (subiculum e hipocampo) siguiendo una estricta seriación en un plano coronal; cada corte se hizo de 40 micrómetros y se colocó en portaobjetos; una vez secos y pegados los cortes, se procedió al revelado con la técnica de Timm.²² Todas las preparaciones se deshidrataron, se montaron en resina sintética, se cubrieron con un cubreobjetos y se dejaron secar protegidas del polvo; posteriormente se clasificaron según el procedimiento experimental y en cada una se localizaron las zonas de estudio como se indica en la Figura 1.

Estereología

Sólo en los cortes derechos clasificados en los planos equivalentes y equidistantes en cada cerebro, se estimaron por grupo los volúmenes: 1) del *stratum* granular total (SGT), 2) del haz suprapiramidal del

Figura 1. Fotomicrografía de un corte medial del hipocampo, teñido con la técnica de Timm indicando las distintas regiones analizadas. *Stratum granular* (SG) y del sistema de fibras musgosas (SFM). Región del hilus (H). Haz infrapiramidal del SFM (HISFM) y haz suprapiramidal del SFM (HSSFM).

Photomicrograph of a medial section of the hippocampus, stained with Timm's method indicating the different studied regions. Granule *stratum* (SG) and the mossy fiber system (FSM). Hilus region (H). Infrapyramidal bundle of the MFS (HISFM) and suprapyramidal bundle of the MFS (MSSFM).

to males (14%), no significant differences were found. Also, brain weight of control and malnourished females showed no significant differences compared to control and prenatally malnourished males. In both cases differences were only -7%. (Table 1).

Control group, gender comparisons

Female controls showed a 10.06% decrease in the total granule stratum volume (TGS) when compared to control males (Table 2), but no statistical differences

SFM (HSSFM), 3) del haz infrapiramidal del SFM más la región del hilus (HIHSFM) y 4) del sistema de fibras musgosas totales (SFMT). La valoración se llevó a cabo usando un microscopio fotónico con cámara lúcida y un objetivo plano y cromático de 6.3X, con el que se realizaron esquemas a lo largo del hipocampo. El criterio de medición por estereología se inició en cada animal, eligiendo al azar el primer corte entre los diez primeros; posteriormente, se seleccionaron los cortes siguientes cada 400 micrómetros. La cuantificación del volumen se llevó a cabo aplicando el principio de Cavalieri,²³ que consiste en un conteo de los puntos que caen dentro de la región analizada. El volumen total se obtuvo multiplicando el número de puntos por el área de cada uno de ellos y el grosor del corte. El análisis estadístico del volumen de las regiones estudiadas se llevó a cabo usando el paquete estadístico SPSS versión 10, aplicando la prueba estadística "t" de Student.

Resultados

Peso corporal y cerebral

Aunque los pesos corporales de las hembras de ambos grupos experimentales, testigo y malnutridas, son menores (14%) con respecto al peso del macho, no se encontraron diferencias significativas. Al mismo tiempo, el peso cerebral de las hembras testigo y malnutridas no mostró diferencias significativas cuando se compararon con el peso del macho testigo y malnutrido prenatalmente; en ambas las diferencias fueron sólo de -7%. (Cuadro 1).

Cuadro 1
PESOS (G) DE RATAS JUVENILES DE 30 DÍAS DE EDAD

WEIGHT (G) OF YOUNG 30-DAY-OLD RATS				
	Males	Females	% change	P
Body weight				
Control	125.9 ± 9.6	108.1 ± 7.3	14.1	NS
Prenatally malnourished	125.1 ± 0.6	107.5 ± 2.8	14.0	NS
Brain weight				
Control	1.4 ± 0.0	1.3 ± 0.05	7.14	NS
Prenatally malnourished	1.3 ± 0.1	1.2 ± 0.08	7.16	NS

Statistical "t" Student test. Mean average and ± standard deviation, NS = not significant.

Cuadro 2

VOLUMEN (MM³) DE LA CAPA GRANULAR Y EL SISTEMA DE FIBRAS MUSGOSAS DEL HIPOCAMPO EN LAS RATAS MACHO TESTIGO VS. HEMBRAS TESTIGO DE 30 DÍAS¹

GRANULE CELL *STRATUM* AND MOSSY FIBER SYSTEM VOLUME (MM³) OF THE HIPPOCAMPUS IN 30-DAY-OLD MALE CONTROL VS. FEMALE CONTROL RATS¹

<i>Region</i>	<i>Male</i>	<i>Female</i>	<i>% change</i>	<i>P</i>
TGS	0.866 ± 0.11	0.778 ± 0.06	10.06	NS
SBMFS	0.830 ± 0.16	0.608 ± 0.08	26.86	*
IBHMFS	1.208 ± 0.08	1.073 ± 0.10	10.80	NS
TMFS	2.012 ± 0.11	1.650 ± 0.19	17.91	*

Statistical "t" Student test. Mean ± standard deviation. TGS = total granule stratum, SBMFS = suprapyramidal bundle of the mossy fiber system, IBHMFS = infrapyramidal bundle plus de hilus region of the mossy fiber system and TMFS = total mossy fiber system. NS = not significant * P < 0.05

were found. On the other hand, when the volume of the supra pyramidal bundle of the mossy fiber system (SBMFS) was compared between control males and females, the latter showed a 26.86% reduction which was statistically different. ($t = 2.61$). Although the analysis of the infrapyramidal volume plus the hilar region (IBHMFS) in males and females showed a 10.80% reduction, there were no significant differences. When the total mossy fiber system (MFS) was evaluated in males and females, females showed a significant reduction of 17.91% ($t = 3.35$) (Table 2).

Prenatally malnourished groups, gender comparisons

When female and male rats only malnourished during the prenatal period were compared, volume reductions turned out to be different when statistical tests were applied (Table 3). The females showed a 28.70% reduction ($t = 14$) in the total volume of the granule cell *stratum* (TGS). On the other hand, statistically significant differences were found when comparing the volume of the suprapyramidal bundle of the mossy fibers system (SBMFS) of males and females; females showed a 24.60% reduction ($t = 2.9$). A statistical difference was also found in the analysis of the infrapyramidal bundle plus the region of the hilus (IBHMFS) when males and females were compared and the reduction in females was 29.78% ($t = 5.47$). In the fourth analysis performed on the total mossy fibers system (TMFS), the prenatally malnourished females showed a significant reduction of 28.57% ($t = 6.34$).

Grupo testigo, comparaciones por género

Las hembras testigo mostraron una reducción de 10.06% en el volumen total del *stratum* granular (SGT) cuando se les comparó con el de los machos testigo (Cuadro 2), pero no presentó diferencias estadísticas. Por otro lado, al comparar el volumen del haz suprapiramidal del sistema de fibras musgosas (HSSFM), entre machos y hembras testigo, éstas mostraron una reducción de 26.86%, que fue estadísticamente diferente ($t = 2.61$). Aunque el análisis del haz infrapiramidal más la región del hilus (HIHSFM) entre machos y hembras se redujo en 10.80%, no presentó diferencias significativas. Finalmente, cuando se valoró el total del sistema de fibras musgosas (SFM) en machos y hembras, las hembras mostraron una reducción significativa de 17.91% ($t = 3.35$) (Cuadro 2).

Grupos malnutridos prenatalmente, comparaciones por género

Todas las comparaciones entre las hembras y los machos que fueron malnutridos sólo durante el periodo prenatal presentaron reducciones que fueron diferentes al aplicárseles la prueba estadística (Cuadro 3). Las hembras mostraron una reducción de 28.70% ($t = 14$) en el volumen total del *stratum* granular (SGT). Por otro lado, las diferencias estadísticamente significativas se localizaron al comparar el volumen del haz suprapiramidal del sistema de fibras musgosas (HSSFM) entre machos y hembras; mostrando las hembras una reducción de 24.60% ($t = 2.9$). También

Discussion

A study about the impact of malnutrition in the hippocampus has a crucial role because it concerns the development and integration of mental functions such as learning and memory.²⁴ From previous studies,^{25,26} we know that malnutrition in the prenatal or postnatal period in experimental animals, such as the rat, affects some functions associated to the hippocampus (for example, spatial navigation and induced kindling with stimulation). Morphology measurement results in the hippocampus of young 30-day-old control rats and those that underwent prenatal malnutrition not only prove the hypothesis of a different gender response, (males prove to have more volume in the hippocampus), but also the long term effect of malnutrition.⁶⁻⁹ Indeed, the prenatally malnourished female rat does not show any recovery at all from the volume reduction in the granule cell layer or in the mossy fibers system as compared to the male.¹² This difference is obvious only in a study of this sort, since there were no significant differences in body and brain weight among male and female rats in controls as well as in prenatally malnourished animals (Table 1), as Madeira *et al.* similarly found^{27,28} in 30-day-old animals, but using a hypothyroidism model.

These results indicate a correlation with the initial dysfunction and long-term potentiation and maintenance (LTP) that show adult animals that were malnourished during the prenatal period.²⁹ Indeed, these functional changes might be compatible with the decrease in the MFS volume seen in these prenatally malnourished rats, irreversibly accompanied by the decrease in synaptic contacts¹¹ reflected in behavioral

en el análisis del haz infrapiramidal más la región del hilus (HIHSFM) al comparar los machos con las hembras se encontró diferencia estadística y la reducción de las hembras fue de 29.78% ($t = 5.47$). En el cuarto análisis realizado en el total del sistema de fibras musgosas (SFMT), las hembras malnutridas prenatalmente mostraron una reducción significativa de 28.57% ($t = 6.34$).

Discusión

El estudio del efecto de la malnutrición en el hipocampo ocupa un lugar preponderante por su relación con el desarrollo e integración de procesos mentales como el aprendizaje y la memoria.²⁴ Por estudios previos,^{25,26} se sabe que la malnutrición en animales de experimentación como la rata, instalada en los periodos prenatal o posnatal, afecta algunas funciones asociadas con el hipocampo (por ejemplo, de navegación espacial y la inducción del encendido por estimulación). Los resultados morfométricos realizados en el hipocampo de ratas juveniles testigo de 30 días y malnutridas en el periodo prenatal, prueban no sólo la hipótesis de la respuesta diferencial por el género (el macho muestra mayor volumen del hipocampo), sino el efecto a largo plazo de la malnutrición.⁶⁻⁹ En efecto, la hembra malnutrida prenatalmente no muestra recuperación en cuanto a la reducción del volumen de la capa granular ni tampoco en el sistema de fibras musgosas en relación con el macho.¹² Esta diferencia es evidente sólo con este tipo de estudio, ya que no hay diferencias significativas en el peso corporal y cerebral entre ratas macho y hembras tanto testigo como malnutridos

Cuadro 3

VOLUMEN (MM³) DE LA CAPA GRANULAR Y EL SISTEMA DE FIBRAS MUSGOSAS DEL HIPOCAMPO DE LAS RATAS MACHO MALNUTRIDO VS. MALNUTRIDAS PRENATALMENTE DE 30 DÍAS DE EDAD¹

GRANULE CELL STRATUM AND MOSSY FIBER SYSTEM VOLUME (MM³) OF THE HIPPOCAMPUS OF PRENATALLY MALNOURISHED 30-DAY-OLD MALE VS. FEMALE RATS¹

Region	Male	Female	% change	P
TGS	0.836 ± 0.03	0.5960 ± 0.02	28.70	*
SBMFS	0.756 ± 0.13	0.5700 ± 0.03	24.60	*
IBHMFS	1.078 ± 0.07	0.7620 ± 0.10	29.78	*
TMFS	1.824 ± 0.17	1.300 ± 0.07	28.57	*

Statistical "t" Student test. Mean and standard deviation. TGS = total granule stratum, SBMFS = supra pyramidal bundle of the mossy fiber system, IBHMFS = infrapirymidal bundle plus the hilius region of the mossy fiber system and TMFS = total mossy fiber system
*P < 0.05.

changes of these malnourished individuals at long term,⁵ which are considered to have greater impact in the female.

The TGS volume showed no significant differences in the control group of young males and females which could correlate with plastic hormone protection factors in the dentate gyrus of the hippocampus of the young female rat, hence having no difference from males. This same result was reported by Tanapat *et al.*³⁰ who did not find a significant decrease in the GCS volume either, but in adult rats. In this study significant decreases between the control groups were found in the suprapyramidal bundle volume and in the total number of the mossy fibers in the female rat (Table 2), as Madeira *et al.* reported²⁷ in the 30-day-old control female rat, with these findings prevailing to adult stages according to Madeira *et al.*¹⁷ in 180-day-old female rats. In control animals, according to both measurements (TGS and TMFS), the same volume is found to be maintained in the young or adult stage. In contrast, prenatally malnourished female rats showed a significant decrease in both volumes (TGS and TMFS), unlike the prenatally malnourished male. It is known that this type of prenatal malnutrition has a significant impact in the MFS volume at 15, 90 and 220 days of age,¹⁰ but in the female this impact is more evident from 30 days of age. This study finds that in a 6% prenatal protein malnutrition, males showed only small 4% and 9% decreases in TGS and TMFS volumes respectively. Also the supra and infrapyramidal bundle volumes decreased 9% and 11% respectively, but these results are not statistically different. In contrast, in the malnourished female rats, considering the same malnutrition paradigm, in which the volume decreases were greater and statistically significant in TGS and TMFS (23% and 21%), the infrapyramidal bundle showed a greater reduction (29%) and the smaller effect was found in the suprapyramidal bundle (6%), a change which was not significant.¹² This reduction might be due to a decrease in the number of granule cells in the granule stratum. Therefore, in the first few days of postnatal life there is natural death (apoptosis) and cell degeneration in control animals, since sexual dimorphism is evident in the number of granule cells since that time period.³¹

Concerning the enzymatic cell mechanism among males and females, Ramirez *et al.*³² showed a clear sexual dimorphism in the rat's brain, from the catalytic active patterns of creatine kinase during postnatal development. Only the female showed a 45% decrease in this enzyme activity between 14 and 21 days of age; during puberty, the enzyme differential values were higher in young females than in males. On the other hand, Hilton *et al.*³³ found sexual dimorphic

prenatalmente (Cuadro 1), dato similar al registrado por Madeira *et al.*^{27,28} en animales de 30 días de edad, pero utilizando un modelo de hipotiroidismo.

Una correlación que se pudiera inferir por estos resultados se relaciona con la disfunción en el inicio y mantenimiento de la potenciación a largo plazo (LTP) que muestran los animales adultos que fueron malnutridos durante el periodo prenatal.²⁹ En efecto, estos cambios funcionales pudieran ser imputables con la disminución en el volumen del SFM observado en estas ratas malnutridas prenatalmente, acompañados de manera irreversible con la disminución en los contactos sinápticos,¹¹ efecto que se refleja en los cambios conductuales de estos individuos malnutridos a largo plazo;⁵ mismos que se considera están más alterados en la hembra malnutrida prenatalmente.

El volumen del SGT no presentó diferencias significativas en el grupo testigo de machos y hembras juveniles, efecto que pudiera correlacionarse con los factores hormonales plásticos de protección en el giro dentado del hipocampo de la rata hembra juvenil, por lo que no difiere del macho. Este mismo resultado fue reportado por Tanapat *et al.*,³⁰ quienes tampoco encontraron disminución significativa en el volumen del SCG, pero en ratas adultas. En este estudio de los grupos testigo, se encontraron disminuciones significativas en el volumen del haz suprapirramidal y en el total de las fibras musgosas en la rata hembra (Cuadro 2); datos similares a los de Madeira *et al.*,²⁷ en la rata hembra testigo de 30 días de edad; resultado que se sigue conservando hasta en la etapa adulta, según Madeira *et al.*,¹⁷ en ratas hembras de 180 días de edad. En los animales testigo, según ambas mediciones (del SGT y del SFMT) se observa que en la etapa juvenil o adulta se mantiene el mismo volumen. Por el contrario, las ratas hembra malnutridas prenatalmente presentaron disminución significativa en ambos volúmenes (SGT y SFMT), a diferencia del macho malnutrido prenatalmente. Se sabe que este tipo de malnutrición prenatal afecta de manera importante el volumen del SFM a los 15, 90 y 220 días de edad,¹⁰ pero en la hembra este efecto es más claro desde los 30 días de edad. En este estudio se encuentra que en un paradigma de malnutrición prenatal a 6%, los machos malnutridos mostraron sólo pequeñas disminuciones de 4% y 9% en los volúmenes del SGT y el SFMT, respectivamente. También se redujo el volumen de los haces supra e infrapirramidal en 9% y 11%, respectivamente, pero estos resultados no son estadísticamente diferentes. Por el contrario, en las hembras malnutridas con el mismo paradigma, en donde estas disminuciones del volumen fueron mayores y estadísticamente son significativos en el SGT y en SFMT (23% y 21%), el haz infrapirramidal mostró una mayor reducción (29%) y el menor efecto

differences in kainic acid and estradiol in the hippocampus of the newborn rats. It is known that during the prenatal period in the rat, maternal stress has a negative impact in the density of the postsynaptic sites (dendritic spikes) of the projecting cells (pyramidal) of the visual and motor cortex of the rat.^{34,35} Also, it has been reported that malnutrition leads to a decrease in these cell parameters in the same pyramidal cells of the visual cortex of the male rat.³⁶ The hippocampus is not only affected by the action of the adrenal steroids, but by malnutrition as well, and these effects are different according to gender. Thus, structural and functional plasticity is expressed in several ways in the hippocampus and particularly in the dentate gyrus zone.^{9-12,34}

Regarding the different gender-related responses of these factors in the hippocampus, malnutrition installed during the prenatal period as a stress factor³ alters the secretion of adrenal steroids and increases levels in prenatally malnourished female rats, i.e., Figueiredo *et al.*³⁷ found more corticosterone in the hippocampus of normal female rats compared to males and it has been proven that the change in the amount of these adrenal steroids (excess or absence) in the hippocampus leads to cell degeneration.³⁸

Also increased adrenal steroids in the perinatal period lead to disturbances in growth factors such as neutrophins that in the normal female rat brain are decreased compared to those of males.³⁹

In the female rat, experimental depression is another factor that during the prenatal period leads to a decrease in the number of granule cells in the hippocampus, Schmitz *et al.*⁴⁰ Thus, it can be concluded that the adrenal steroids are most important in brain development^{41,42} because they limit the number of cells in the dentate gyrus of the female rat. This factor can be presumed when prenatal malnutrition is used as a stress element during this stage of hippocampus development. The decrease found in the number of cells has an impact on the MFS according to this study and to previous data.^{43,44} Thus, it can be inferred that the gender differences seen in the mossy cell fiber volumes depend on the decrease in the number of granule cells in females.

As previously discussed, in the first weeks of postnatal life, the control female rat shows more granule cell death in the dentate gyrus, consequently leading to a reduced volume of SBMFS and the total volume compared to the control male. In addition, according to these results, prenatally malnourished female rats show ample reductions in the IBHMFS volume plus the hilar region of MFS as compared to the prenatally malnourished male.

The cell mechanism associated to these decreases might be related to the synthesis of certain proteins

se presentó en el haz suprapiramidal (6%), cambio que no fue significativo.¹² Esta reducción pudiera deberse a la disminución en el número de células granulares del *stratum* granular, por lo que en los primeros días de vida posnatal ocurre una muerte natural (apoptosis) y degeneración celular en los animales testigo, ya que desde esos días es evidente el dimorfismo sexual en el número de células granulares.³¹

Respecto del mecanismo enzimático celular entre machos y hembras, el estudio de Ramírez *et al.*³² muestra un claro dimorfismo sexual en el cerebro de la rata, de los patrones catalíticos activos de la creatinincinasa durante el desarrollo posnatal. Sólo la hembra mostró un decremento de 45% de la actividad de esta enzima entre los 14 y 21 días de edad; durante la pubertad, los valores diferenciales de la enzima fueron más altos en las hembras que en los machos juveniles. Por otra parte, Hilton *et al.*³³ encontraron diferencias dimórfico-sexuales en las concentraciones de ácido kaínico y estradiol en el hipocampo de ratas recién nacidas. Se sabe que durante el periodo perinatal en la rata, el estrés materno produce efectos negativos en la densidad de los sitios posinápticos (espinas dendríticas) de las células de proyección (piramidales) de las cortezas visual y motora de la rata.^{34,35} Por otra parte, se ha informado que la malnutrición produce reducciones de estos parámetros celulares en las mismas células piramidales de la corteza visual de la rata macho.³⁶ El hipocampo no sólo se afecta por la acción de los esteroides adrenales, sino por la malnutrición, y estos efectos son distintos según el género. Así, la plasticidad estructural y funcional se manifiesta de varias formas en el hipocampo y en particular en la zona del giro dentado.^{9-12,34}

En relación con la respuesta diferencial de estos factores en el hipocampo según el género, la malnutrición instalada durante el periodo prenatal como factor de estrés³ altera la secreción de esteroides adrenales y aumenta los niveles en las ratas hembras malnutridas prenatalmente; por ejemplo, Figueiredo *et al.*³⁷ encontraron mayor corticosterona en el hipocampo de ratas hembra normales con respecto al macho, y se ha demostrado que la alteración en la cantidad de estos esteroides adrenales (exceso o ausencia) en el hipocampo conlleva a la degeneración celular.³⁸

También el aumento de los esteroides adrenales en la etapa perinatal provoca alteraciones en los factores de crecimiento del tipo de las neurotrofinas, que en el cerebro de la hembra normal están disminuidos con respecto a los del macho.³⁹

En la hembra la depresión experimental es otro factor que durante el periodo prenatal produce reducción en el número de células granulares en

among which trophic factors such as neurotrophins are found,³⁹ which are important for survival and differentiation of neurons in axonal and dendritic pattern development. Concerning these growth and maintenance effects, Díaz-Cintra *et al.*⁶ found a decrease in the size of dendritic branches and thorns of the granule cells in the dentate gyrus of 30-day-old male rats. This study evidently shows that this type of malnutrition affects the size and distribution of fibers and thereby the volume of the hippocampus is decreased in prenatally malnourished animals. Another previous report showed data from female rats that were malnourished during the prenatal period and analyzed at the same 30-day age, but with special emphasis in the mossy fiber volume.¹²

In recent work Luine⁴⁵ both gonadal and adrenal axes showed a possible association with memory and learning functions. This hypothesis was proved in the radial maze and in object location in male and female rats subjected to the same type of chronic stress, males responded better to the memory test (radial maze) while females showed no change in recognition memory.

This stress in the hippocampus CA3 produces different disturbances in neurotransmitters, in the male dopamine and GABA levels are decreased, while in the female 5HT and norepinephrine levels are reduced. These anatomical gender differences have an impact in memory response, as a result of chronic stress. A similar anatomic effect is obtained in the hippocampus in this malnutrition model which can be correlated in the sense that the mossy fibers represent the presynaptic part of the second synapsis of the inner circuit of the hippocampus, which make contact with the pyramidal cells of CA3, where they also play an inductive role on the thorny excrescences of these cells⁴⁶ and ultimately in the integration of information that will go to CA1 and from there once more to the integration cortex of the short term memory.²⁴ The results in the present study indicate that at least in the hippocampus, female rats are more vulnerable to external factors than males, as confirmed by several sexual dimorphism reports,^{12,18,47,48} indicating that spatial memory skills in the rat are also gender and animal species dependent,^{15,49} both variables are important in the response of the animal to the environment.

Acknowledgments

PROBETEL program from UNAM, for granting a scholarship for Norma Serrano Garcia for her BS thesis, from which some data are included in this paper and Hector Ramirez for preparing the graphic material. DGAPA-UNAM project IN-221201,

el hipocampo de la hembra, Schmitz *et al.*⁴⁰ Por lo anterior, se puede inferir que los esteroides adrenales tienen gran importancia en el desarrollo cerebral^{41,42} porque limitan el número de células en el giro dentado de la rata hembra. Este factor puede inferirse al utilizar la malnutrición prenatal como un elemento de estrés durante este periodo de desarrollo del hipocampo. La reducción encontrada en el número de células tiene repercusión en el SFM, según este estudio y por datos previos.^{43,44} Esto lleva a inferir que las diferencias entre géneros observadas en el volumen de las fibras musgosas son dependientes de la reducción en el menor número de células granulares en las hembras.

Como anteriormente se discutió, la hembra testigo en las primeras semanas de vida posnatal presenta mayor muerte de células granulares en el giro dentado, y repercute en la disminución del volumen del HSSFM y el total con respecto al macho testigo. Además, en estos resultados, las ratas hembras malnutridas prenatalmente presentan reducciones amplias en el volumen del HIHSFM más la región hiliar del SFM con respecto al macho malnutrido prenatalmente.

El mecanismo celular asociado con estas reducciones podría estar relacionado con la síntesis de ciertas proteínas, entre las cuales están los factores tróficos como la neurotrofina,³⁹ que son importantes para la sobrevivencia y diferenciación de la neurona en sus patrones de desarrollo axonal y dendrítico. En relación con estos efectos de crecimiento y mantenimiento, Díaz-Cintra *et al.*⁶ observaron disminución del tamaño de ramas y espinas dendríticas de las células granulares del giro dentado en ratas macho de 30 días de edad. En este estudio es evidente que esta forma de malnutrición afecta el tamaño y distribución de las fibras y con ello se produce disminución en el volumen del hipocampo de los animales malnutridos prenatalmente. Otro trabajo previo, mostró datos en hembras que fueron malnutridas durante el periodo prenatal y estudiadas a la misma edad de 30 días, pero con especial énfasis en el volumen de las fibras musgosas.¹²

En un trabajo reciente Luine⁴⁵ mostró que ambos ejes, gonadales y adrenales, pudieran estar asociados con la función de memoria y aprendizaje. Esta hipótesis se probó en el laberinto radial y en la localización de objetos en ratas macho y hembra sometidos al mismo tipo de estrés crónico, los machos respondieron mejor a la prueba de memoria (laberinto radial), en tanto que la hembra no modificó la memoria de reconocimiento.

Este estrés en el CA3 del hipocampo produce alteraciones diferenciales de los neurotransmisores; en el macho se reducen la dopamina y el GABA mientras que en la hembra se reducen los niveles de

for purchasing the diet that has been used from the first stage (IN209195) in this and other research protocols.

Referencias

1. Dyson SE, Jones DG. Some effects of undernutrition on synaptic development. A quantitative ultrastructural study. *Brain Res* 1976; 114:365-378.
2. Baraban SC, Schwartzkroin PA. Effects of prenatal cocaine exposure on the developing hippocampus: intrinsic and synaptic physiology. *J Neurophysiol* 1997; 77:126-136.
3. Morgane PJ, Austin-LaFrance R, Bronzino J, Tonkiss J, Diaz-Cintra S, Cintra L, *et al.* Prenatal malnutrition and development of the brain. *Neurosci Biobehav Rev* 1993; 17:91-128.
4. Fish I, Winick M. Effect of malnutrition on regional growth of the developing rat brain. *Exp Neurol* 1969; 25:534-540.
5. Katz HB, Davies CA, Dobbing J. Effects of undernutrition at different ages early in life and later environmental complexity on parameter of the cerebrum and hippocampus in rats. *J Nutr* 1982; 112:1362-1368.
6. Diaz-Cintra S, Cintra L, Galvan A, Aguilar A, Kemper T, Morgane PJ. Effects of prenatal protein deprivation on postnatal development of granulate cells in the fascia dentate. *J Comp Neurol* 1991; 310:356-364.
7. Diaz-Cintra 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.
8. Cintra L, Aguilar A, Granados L, Galvan A, Kemper T, DeBassio W, *et al.* Effects of prenatal protein malnutrition on hippocampal CA1 pyramidal cells in rats of four age groups. *Hippocampus* 1997; 7:192-203.
9. Granados L, Cintra L, Aguilar A, Corkidi G, Kemper T, Morgane P, *et al.* Mossy fiber of the hippocampal formation in prenatal malnourished rats. *Bol Estud Med Biol* 1995; 43:3-11.
10. Cintra L, Granados L, Aguilar A, Kemper T, DeBassio W, Galler J, *et al.* Effects of prenatal protein malnutrition on mossy fiber of the hippocampal formation in rats of four age groups. *Hippocampus* 1997; 7:184-191.
11. Granados-Rojas L, Larriva-Sahd J, Cintra L, Gutierrez-Ospina G, Rondan A, Diaz-Cintra S. Prenatal protein malnutrition decreases mossy fiber-CA3 thorny excrescences asymmetrical synapses in adult rats. *Brain Res* 2002; 933:164-171.
12. Granados-Rojas L, Serrano N, Gutierrez-Ospina G, Diaz-Cintra S. Prenatal protein malnutrition affects differentially the volume of the granule layer and mossy fiber in young male and female rats. *Proc West Pharmacol Soc* 2002; 45:53-54.
13. Diamond MC. Sex differences in the rat forebrain. *Brain Res* 1987; 434:235-240.

5-HT y norepinefrina. Estas diferencias anatómicas por el género repercuten en la respuesta de memoria, provocada por el estrés crónico. Efecto anatómico similar en el hipocampo que se obtiene en este modelo de malnutrición y que se puede correlacionar en el sentido de que las fibras musgosas representan la parte presináptica de la segunda sinapsis del intracircuito del hipocampo, que hacen contacto con las células piramidales del CA3, en donde, además, desarrollan un papel inductivo sobre las excrescencias torneadas de estas células⁴⁶ y, por ende, en la integración de la información que pasará al CA1 y de ahí de nuevo a la corteza de integración para la memoria de corto plazo.²⁴ Los resultados del presente estudio indican que al menos en el hipocampo, las ratas hembras son más susceptibles a los factores externos que el macho, como diversos trabajos de dimorfismo sexual lo constatan,^{12,18,47,48} indicando que las habilidades de memoria espacial en la rata dependen también del género y la especie de un animal;^{15,49} ambas variables son importantes en la respuesta del animal al medio ambiente.

Agradecimientos

Se agradece al programa PROBETEL de la UNAM por la asignación de beca para Norma Serrano García, para realizar su tesis de licenciatura, parte de cuyos datos se incluyen en este trabajo; y a Héctor Ramírez por la preparación del material gráfico. A la DGAPA-UNAM proyecto IN-221201, por la compra de la dieta que desde la primera etapa (IN209195) se ha venido utilizando en el desarrollo de éste y otros protocolos de trabajo.

14. Madeira MD, Lieberman AR. Sexual dimorphism in the mammalian limbic system. *Prog Neurobiol* 1995; 45:275-333.
15. Andrade JP, Madeira MD, Paula-Barbosa MM. Sexual dimorphism in the subiculum of the rat hippocampal formation. *Brain Res* 2000; 875:125-137.
16. Wimer CC, Wimer RE, Alameddine L. On the development of strain and sex differences in granule cell number in the area dentate of house mice. *Brain Res* 1988; 470:191-197.
17. Madeira MD, Sousa N, Paula-Barbosa MM. Sexual dimorphism in the mossy fiber synapses of the rat hippocampus. *Exp Brain Res* 1991; 87:537-545.
18. Juraska JM, Fitch JM, Henderson C, Rivers N. Sex differences in the dendritic branching of dentate granule cells following differential experience. *Brain Res* 1985; 333:73-80.
19. Aloisi AM, Zimmermann M, Herdegen T. Sex-dependent effects of formalin and restraint on c-fos expression in the septum and hippocampus of the rat. *Neuroscience* 1997; 81:951-958.
20. Almeida SS, Tonkiss J, Galler JR. Prenatal protein

- malnutrition affects avoidance but not escape behavior in the elevated T-maze test. *Physiol Behav* 1996; 60:191-195.
21. Tonkiss J, Almeida SS, Galler JR. Prenatally malnourished female but not male rats show increased sensitivity to MK-801 in a differential reinforcement of low rates task. *Behav Pharmacol* 1998; 9:49-60.
 22. West JR, Hodges CA, Black AC. Distal infrapiramideal granule cell axons possess typical fiber morphology. *Brain Res Bull* 1981; 6:119-124.
 23. Michel RP, Cruz-Orive LM. Application of the Cavalieri principle and vertical sections method to lung: estimation of volume and pleural surface area. *J Microsc* 1988; 150:117-136.
 24. Rolls ET. A theory of hippocampal function in memory. *Hippocampus* 1996; 6:601-620.
 25. Tonkiss J, Shultz PL, Shumsky JS, Galler JR. Development of spatial navigation following prenatal cocaine and malnutrition in rats: lack of additive effects. *Neurotoxicol Teratol* 1997; 19:363-372.
 26. Bronzino JD, Austin-LeFrance RJ, Morgane PJ, Galler JR. Effects of prenatal protein malnutrition on kindling-induced alterations in dentate granule cell excitability. *Exp Neurol* 1991; 112:216-223.
 27. Madeira MD, Sousa N, Lima-Andrade MT, Calheiros F, Cadete-Leite A, Paula-Barbosa MM. Selective vulnerability of the hippocampal pyramidal neurons to hypothyroidism in male and female rats. *J Comp Neurol* 1992; 322:501-518.
 28. Madeira MD, Paula-Barbosa MM. Reorganization of mossy fiber synapses in male and female hypothyroid rats: a stereological study. *J Comp Neurol* 1993; 337:334-352.
 29. Bronzino JD, Austin-LeFrance RJ, Morgane PJ, Galler JR. Diet-induced alterations in the ontogeny of long-term potentiation. *Hippocampus* 1996; 6:109-117.
 30. Tanapat P, Hastings NB, Reeves AJ, Gould E. Estrogen stimulates a transient increase in the number of new neurons in the dentate gyrus of the adult female rat. *J Neurosci* 1999; 19:5792-5801.
 31. Gould E, Woolley CS, McEwen BS. Naturally occurring cell death in the developing dentate gyrus of the rat. *J Comp Neurol* 1991; 304:408-418.
 32. Ramirez O, Jimenez E. Sexual dimorphism in rat cerebrum and cerebellum: different patterns of catalytically active creatine kinase isoenzymes during postnatal development and aging. *Int J Dev Neurosci* 2002; 20:627-639.
 33. Hilton GD, Nuñez JL, McCarthy MM. Sex differences in response to kainic acid and estradiol in the hippocampus of newborn rats. *Neuroscience* 2003; 116:383-391.
 34. Granados-Rojas L, Sicilia-Argumedo G, Martínez Ávila MA, Pérez TE, Valenzuela PA, Serrano-García N, *et al.* Densidad de espinas dendríticas en neuronas piramidales de la corteza visual de ratas bajo estrés prenatal. *Arch Neurocienci* 1998; 3:128-134.
 35. Sicilia-Argumedo G, Valenzuela PA, Granados-Rojas L, Serrano-García N, Coballase-Urrutia E, Díaz-Cintra S. Disminución del número de espinas dendríticas en las neuronas piramidales de la corteza motora de ratas bajo estrés prenatal. *Arch Neurocienci* 2000; 5:6-11.
 36. Díaz-Cintra S, Cintra L, Ortega A, Kemper T, Morgane PJ. Effects of protein malnutrition on pyramidal cells of the visual cortex in rats of three age groups. *J Comp Neurol* 1990; 292:117-126.
 37. Figueiredo HF, Dolgas CM, Herman JP. Stress activation of cortex and hippocampus is modulated by sex and stage of estrus. *Endocrinology* 2002; 143:2534-2540.
 38. Scaccianoce S, Catalani A, Lombardo K, Consoli C, Angelucci L. Maternal glucocorticoid hormone influences nerve growth factor expression in the developing rat brain. *Neuroreport* 2001; 12:2881-2884.
 39. Lindholm D, Castren M, Hengerer B, Leingärtner A, Castrén E, Thoenen H. Glucocorticoids and neurotrophin gene regulation in the nervous system. *Ann NY Acad Sci* 1994; 746:195-203.
 40. Schmitz C, Rhodes ME, Bludau M, Kaplan S, Ong P, Ueffing I, *et al.* Depression: reduced number of granule cells in the hippocampus of female, but not male rats due to prenatal restraint stress. *Mol Psychiatry* 2002; 7:810-813.
 41. McEwen BS, De Kloet ER, Rostene W. Adrenal steroid receptors and actions in the nervous system. *Physiol Rev* 1986; 66:1121-1188.
 42. McEwen BS. Corticosteroids and hippocampal plasticity. *Ann NY Acad Sci* 1994; 746:134-144.
 43. Gaarskjaer FB. Organization of the mossy fiber system of the rat studied in extend hippocampi terminal area related to number of granule and pyramidal cells. *J Comp Neurol* 1978; 178:49-72.
 44. Gaiarsa JL, Beaudoin M, Ben-Ari Y. Effect of neonatal degranulation on the morphological development of rat CA3 pyramidal neurons: inductive role of mossy fibers on the formation of thorny excrescences. *J Comp Neurol* 1992; 321:612-625.
 45. Luine V. Sex differences in chronic stress effects on memory in rats. *Stress* 2002; 5:205-216.
 46. Amaral DG, Dent J. Development of the mossy fiber of the dentate gyrus: I. A light and electron microscopic study of the mossy fiber and their expansions. *J Comp Neurol* 1981; 195:51-86.
 47. Bousios S, Karandrea D, Kittas Ch, Kittraki E. Effects of gender and stress on the regulation of steroids receptor coactivator-1 expression in the rat brain and pituitary. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2001; 78:401-407.
 48. Bartesaghi R, Serrai A. Effect of early environment on granule cell morphology in the dentate gyrus of the guinea-pig. *Neuroscience* 2001; 102:87-100.
 49. Isgor C, Sengelaub DR. Prenatal gonadal steroids affects adult spatial behavior, CA1 and CA3 pyramidal cell morphology in rats. *Horm Behav* 1998; 34:183-198.