



**Universidad**  
de La Laguna

**EFFECTOS MORFOMÉTRICOS DEL ALCOHOL  
EN NÚCLEOS DE LA FASCIA DENTADA Y  
ÁREA CA1 DEL HIPOCAMPO EN RATONES  
MACHOS ALBINOS**

Trabajo de Fin de Grado 2019-2020

Alumna: María Cristina Díaz Hernández

Tutora: María del Mar Pérez Delgado

Departamento de Anatomía. Universidad de La Laguna. Tenerife. España



# Índice

• Resumen .....	4
• Introducción .....	5
• Material y métodos .....	7
• Desarrollo postnatal morfométrico y plasticidad neuronal .....	9
• Resultados .....	10
• Síndrome alcohólico fetal .....	18
• Discusión .....	20
• Conclusión .....	23
• ¿Qué he aprendido realizando el TFG? .....	25
• Bibliografía .....	26
• Conformidad para la presentación de la memoria y defensa .....	29

## Resumen

Se ha realizado un análisis cariométrico de las neuronas piramidales del área CA1 del Asta de Ammón y de las células granulares de la hoja suprapiramidal de la fascia dentada, ambas zonas localizadas en hipocampo, en ratones macho que habían ingerido alcohol de forma crónica desde su nacimiento, y comparado los resultados con animales de un grupo control a las mismas edades postnatales. Los parámetros analizados han sido el área y el perímetro de los núcleos celulares de las zonas ya mencionadas. Para ello se ha utilizado muestras cerebrales de ratones machos albinos, de edades comprendidas entre los 55 días y los 160 días.

Los resultados obtenidos sugieren que el alcohol pueda ser responsable de una neurogénesis y un desarrollo anormal de las neuronas, evidenciado en los cambios de las medidas nucleares, que pudieran relacionarse con un deterioro en las funciones propias del hipocampo, como la memoria y el aprendizaje.

A karyometric analysis of the pyramidal neurons of the CA1 area of the Amen of the Ammon and of the granular cells of the suprapyramidal leaf of the dentate fascia, both areas located in the hippocampus, has been carried out in male mice that had chronically ingested alcohol since birth , and compared the results with animals from a control group at the same postnatal ages. The parameters analyzed have been the area and perimeter of the cell nuclei of the aforementioned areas. For this we have used brain samples from male albino mice, aged between 55 days and 160 days.

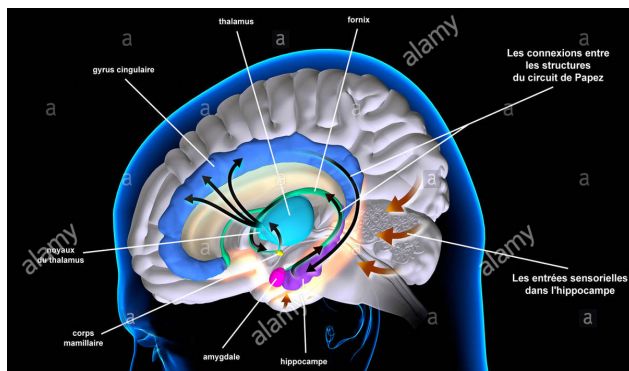
The results obtained suggest that alcohol may be responsible for neurogenesis and abnormal development of neurons, evidenced by changes in nuclear measures, which could be related to a deterioration in the functions of the hippocampus, such as memory and learning.

# Introducción

El sistema nervioso es el más complejo del organismo, interviene en la conducta del individuo, en la regulación del movimiento, en la percepción sensorial, y en funciones complejas como el aprendizaje y la memoria. Uno de los problemas más importantes en el estudio de la fisiología del sistema nervioso es aprender acerca del proceso de aprendizaje.<sup>29</sup>

El sistema nervioso está organizado en sistema nervioso central formado por el cerebro y la médula espinal, el sistema nervioso periférico formado por los nervios sensoriales, y el sistema nervioso autónomo el cual controla las funciones viscerales. A su vez, todos estos sistemas están compuestos por una unidad funcional básica denominada neurona, que varían en su morfología, y transmiten su información a través de señales eléctricas, también conocido como sinapsis eléctrica.<sup>29</sup>

El sistema nervioso tiene tres funciones básicas: sensitiva, integradora y motora. Éste detecta estímulos externos o provenientes del interior del organismo, la recepción de estos estímulos corresponde a la función sensitiva. La información sensitiva se analiza, se almacena y se utiliza para la toma de decisiones sobre la conducta a seguir, este proceso corresponde a la función integradora. Por último, estaría la función efectora o motora realizada por músculos o glándulas.



Las neuronas sensitivas son el componente aferente del sistema nervioso, conducen impulsos nerviosos de los receptores sensoriales hasta el sistema nervioso central, donde se integra y almacena la información aferente, que es el sustrato de la memoria, localizado principalmente a nivel hipocampal por medio del circuito diencefálico.

Al igual que en otras estirpes celulares del cuerpo humano, a nivel del sistema nervioso existen pruebas de la formación de nuevas neuronas a partir de neuroblastos durante toda la vida. Este proceso, llamado neurogénesis, se puede observar en el hipocampo.<sup>3</sup>

Como explican Guyton y Hall en el Tratado de Fisiología Médica [2006], el hipocampo se encuentra en la región más medial de la corteza en el lóbulo temporal. Luego se pliega medialmente debajo del cerebro y asciende hasta la cara interna inferior del ventrículo lateral. Este núcleo es conocido, entre otros, por el importante papel que juega en la memoria y el aprendizaje. Dicha importancia se ve ejemplificada en el hecho de que, cuando extraemos ambos hipocamos (como en el tratamiento de algunos pacientes epilépticos), la persona es incapaz de crear nuevos recuerdos a largo plazo tanto de tipo verbal como simbólico. Esto se denomina “amnesia anterógrada”.<sup>9</sup> Se piensa que el papel del hipocampo en la memoria es fruto de sus conexiones con las áreas de “recompensa” y “castigo” del sistema límbico. De esta manera, el hipocampo sería en mayor medida el responsable de decidir qué recordar y qué no.

En su estudio Shapiro [2001] nos explica que la memoria del evento más breve puede

durar toda la vida. Por lo tanto, el aprendizaje y la memoria requieren mecanismos neuronales que permitan cambios rápidos pero persistentes en los circuitos cerebrales. La neuropsicología del hipocampo, la electrofisiología sináptica y celular, la farmacología y la genética molecular convergen y comienzan a revelar estos mecanismos. Las lesiones del hipocampo deterioran profundamente la memoria de eventos recientes en humanos y roedores. Es decir, cuando la neurogénesis se compromete, la formación de memoria y demás funciones del hipocampo se ven afectadas.<sup>3</sup>

Según el estudio de Wozniak et al. [2004], cuando la degeneración neuronal es particularmente grave en varias de las regiones específicas del cerebro, como el circuito diencefálico, se altera de forma grave el aprendizaje profundo y la memoria.

La experimentación con animales, sobre todo con roedores, es una buena herramienta para observar las consecuencias producidas por una exposición temprana al alcohol, ya que las respuestas fisiológicas producidas son similares a las humanas. El comportamiento neuronal consecuente es significativamente similar a la clínica y el comportamiento producido en humanos.<sup>4</sup>

La atrofia del cerebro es una neuropatología común que encontramos en el alcoholismo crónico. Además, las deficiencias cognitivas y de comportamiento son señas de identidad de los efectos sobre el Sistema Nervioso Central a la exposición al alcohol en el período fetal <sup>10</sup>, fenómeno también conocido como Síndrome Alcohólico Fetal.

Los cambios en la morfometría cerebral se han informado ampliamente en diversos estudios que examinan los efectos del consumo crónico de alcohol en pacientes dependientes del alcohol.

La toma de alcohol tiene un impacto sustancial en las discapacidades neurológicas y demencia en toda la población, siendo el hipocampo una de las zonas cerebrales más estudiadas en este contexto. La evidencia acumulada<sup>24</sup> en varios modelos de roedores ha demostrado que la exposición a etanol produce un deterioro cognitivo en las tareas dependientes del hipocampo. Estos efectos adversos pueden estar relacionados con el hecho que el etanol deteriora los mecanismos de plasticidad celular y sináptica, incluidos los cambios adversos en la morfología neuronal, la arquitectura de la columna vertebral, la comunicación neuronal y un aumento de la muerte neuronal.

En este estudio, se analizará el desarrollo de las células granulares de la lámina suprapiramidal de la fascia dentada y de las células piramidales de CA1 del asta de Ammón, por medio de un estudio cariométrico, analizando los efectos de la ingesta crónica de alcohol en el desarrollo del hipocampo en ratones machos albinos.

## Material y métodos

Como animal experimental se ha escogido al ratón macho albino de la cepa "swiss" para la realización de este estudio. Tomando como referencia el trabajo de Serrano Aguilar [1983], existen una serie de razones por las cuales este ratón es el animal de elección:

- Podemos llevar un control del embarazo.
- El Departamento de Anatomía tiene experiencia con dicho animal.
- Se puede llevar a cabo un estudio completo del desarrollo de los centros del encéfalo debido a que la maduración cerebral se produce generalmente cerca del nacimiento del roedor.

Centrándonos en el objetivo del estudio, se formaron dos grupos diferentes de ratones.

El primer grupo se corresponde con los "ratones control", con un desarrollo en condiciones normales. En total son 20 ratones sacrificados a las edades de 55, 85, 115 y 160 días de vida, cada subgrupo formado por 5 ratones. En cada animal se medían un promedio de 60 núcleos en cada zona a estudio.

El segundo grupo se corresponde con el grupo alcohol, también en total 20 ratones y sacrificados en las mismas edades. Este grupo fue expuesto de manera crónica al alcohol en el período postnatal, mediante la adición en el agua (tanto en la lactancia como en el posterior destete) de un 20% de etanol, desde el nacimiento hasta el día del sacrificio.<sup>16</sup>

Los animales eran pesados antes de su sacrificio y se determinaba la actividad motora con la ayuda de un giroscopio, contando el número de revoluciones en 15 minutos. Además, se midió la ingesta de líquido diaria en los dos grupos<sup>17</sup>.

Tras seleccionar a los ratones, por vía intraperitoneal se les inyecta Nembutal (0,03 gr/100 mL) como anestésico. Posteriormente, se limpia el sistema circulatorio con suero fisiológico hasta que el contenido vascular sale al completo.

A continuación, se procede a realizar la fijación, llevada a cabo con solución de BOUIN. Una vez fijado, se extrae el cerebro y, de nuevo, es inmerso en BOUIN durante 24 horas.

El siguiente paso es la deshidratación de la pieza, para endurecer la estructura y poder incluirla en parafina. Para ello, se utiliza alcohol etílico en diferentes concentraciones. Una vez deshidratada la pieza, se procede a la inclusión en parafina siguiendo unas condiciones estándar.

Posteriormente se procede al corte. En este caso, se realizaron cortes seriados de 10 micras de grosos, recogiendo las muestras en series alternas, que se tiñeron con el método de Klüver Barrera para su estudio morfométrico.

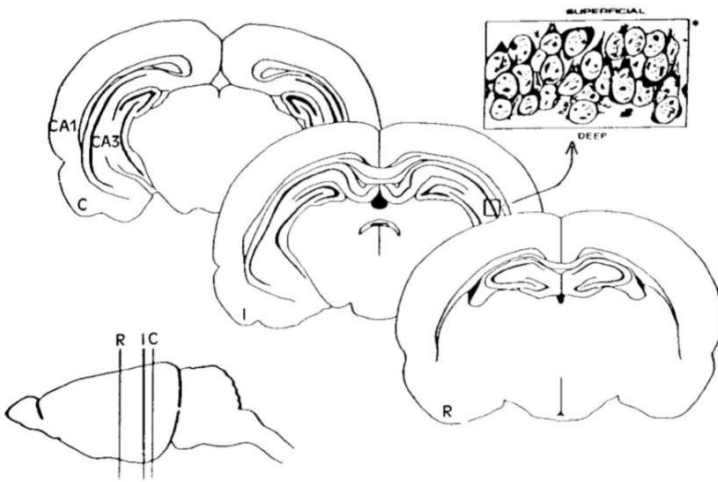
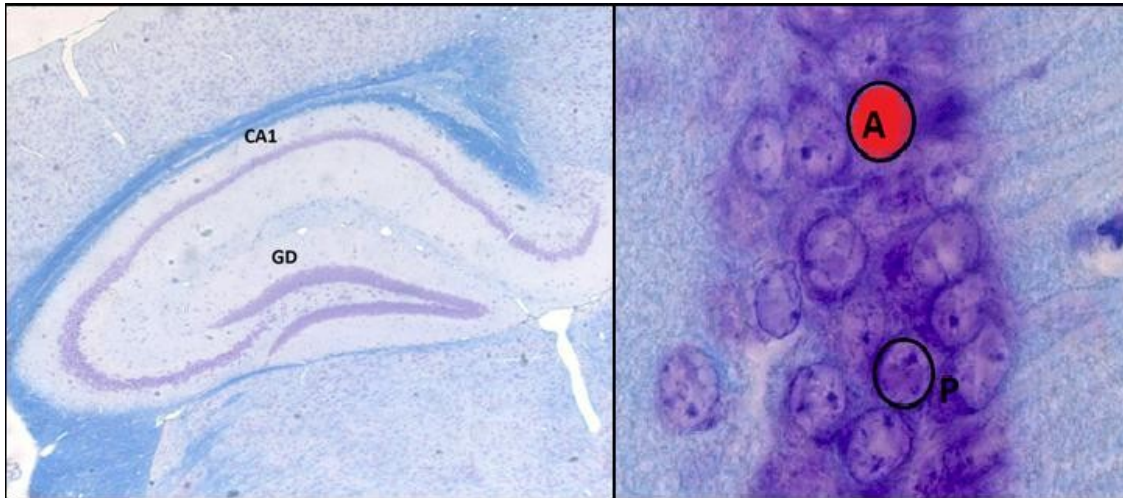


Fig. 1. Representation of the three studied topographic levels in the brain of the mouse. A) rostral level; B) intermediate level; and C) caudal level. With respect to the surface of the brain the superficial and deep layers of CA1 and CA3 are measured separately. The lateral view of the mouse brain shows the location of the three levels that correspond, approximately, to 1.5/10 (A), 5/10 (B) and 6/10 (C) of the total rostrocaudal length of the hippocampus of the mouse.

Las mediciones se realizaron en los núcleos en los que se observaban estructuras nucleolares (para evitar medir sólo una porción periférica del núcleo). Se recogieron datos sobre el perímetro y el área nuclear, en células piramidales del asta de Ammón y en las células granulares de la lámina suprapiramidal de la fascia dentada, tomando la medida a 60 núcleos de cada zona a estudiar.

Como referencia, para poder estudiar la anatomía del ratón, se ha tomado el atlas Paxinos y Watson: The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates (4th Edition).



Se ha empleado un software informático para el procesamiento y la medición de los perímetros y áreas de las neuronas piramidales del área CA1 del Asta de Ammón y de las células granulares de la hoja suprapiramidal de la fascia dentada visualizadas en el microscopio, también conocido como Virtual Microscopy Test Image.



# Desarrollo postnatal morfométrico y plasticidad neuronal

Estudios anteriores de Pérez-Delgado et al. [1992][1994] aprecian un decrecimiento nuclear a lo largo del desarrollo morfométrico postnatal, que podría estar relacionado a un sobrecrecimiento de las neuronas, en los primeros días de vida, y a una posterior estabilización a un tamaño y desarrollo óptimo en relación con la funcionalidad de los núcleos.

Sin embargo, la insuficiencia de los estudios histológicos de la estructura microscópica normal del hipocampo en animales inmaduros en los días iniciales de la vida postnatal limita la comprensión de sus cambios morfogenéticos ante las actuales evidencias de su relevancia clínico-patológica.

Quintana-Polanco et al. [2014] evidencian una transformaciones del hipocampo en los 10 primeros días de vida postnatal, y ponen de manifiesto signos evidentes de mayor madurez de las neuronas piramidales y granulosas dentadas y una más completa estratificación cortical en sus regiones, que justificarían el sobrecrecimiento inicial en el desarrollo morfométrico de las neuronas hipocampales en los primeros días de vida del ratón.

Como se explico anteriormente,<sup>9</sup> el hipocampo sería en mayor medida el responsable de decidir qué recordar y qué no. De hecho, hasta el evento más breve puede durar toda la vida registrado en nuestra memoria.

Por lo tanto, el aprendizaje y la memoria requieren mecanismos neuronales que permitan cambios rápidos pero persistentes en los circuitos cerebrales. La neuropsicología del hipocampo, la electrofisiología sináptica y celular, la farmacología y la genética molecular convergen y comienzan a revelar estos mecanismos. Las lesiones del hipocampo perjudican profundamente la memoria de eventos recientes en humanos y roedores.<sup>24</sup>

# Resultados

## Ingesta de agua, peso y actividad

No se vieron diferencias entre ambos grupos respecto a la ingesta de agua. En cambio, el peso corporal del grupo alcohol era inferior en comparación al grupo control de ratones. De la misma manera, la actividad motora fue inferior en el grupo alcohol.<sup>17</sup>

## Estudio cariométrico

Los datos obtenidos nos muestran el valor medio tanto del área como del perímetro de cada día a estudiar en ambos grupos, además de la desviación y el error estándar de todos los datos.

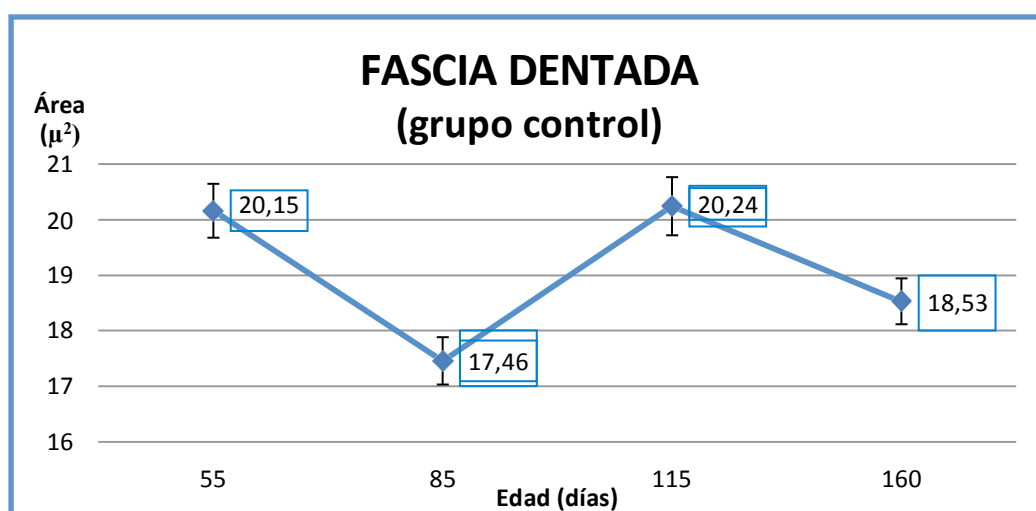
En todas nuestras gráficas utilizamos el valor medio de las medias de los parámetros medidos, perímetro y área nuclear, en cada animal. Además, también indicamos el error estándar de cada media de edad.

GRUPO CONTROL					GRUPO ALCOHOL				
<b>PERÍMETRO</b>					<b>PERÍMETRO</b>				
FASCIA DENTADA					FASCIA DENTADA				
EDAD (DÍAS)	55	85	115	160	EDAD (DÍAS)	55	85	115	160
MEDIA	18,86	17,17	17,73	17,44	MEDIA	16,43	16,46	14,51	14,83
ST DESV.	1,68	1,61	1,85	1,76	ST DESV.	2,30	1,68	2,06	1,96
ST ERROR	0,22	0,21	0,24	0,23	ST ERROR	0,30	0,22	0,27	0,25
CA1					CA1				
EDAD (DÍAS)	55	85	115	160	EDAD (DÍAS)	55	85	115	160
MEDIA	22,72	19,89	20,23	18,96	MEDIA	20,09	19,10	19,65	18,39
ST DESV.	2,03	1,88	1,73	1,72	ST DESV.	2,36	1,97	3,06	3,17
ST ERROR	0,26	0,24	0,22	0,22	ST ERROR	0,30	0,25	0,39	0,41
<b>ÁREA</b>					<b>ÁREA</b>				
FASCIA DENTADA					FASCIA DENTADA				
EDAD (DÍAS)	55	85	115	160	EDAD (DÍAS)	55	85	115	160
MEDIA	20,15	17,46	20,24	18,53	MEDIA	15,22	14,88	12,55	13,63
ST DESV.	3,76	3,29	4,04	3,19	ST DESV.	4,03	2,85	3,61	3,16
ST ERROR	0,48	0,43	0,52	0,41	ST ERROR	0,52	0,37	0,47	0,41
CA1					CA1				
EDAD (DÍAS)	55	85	115	160	EDAD (DÍAS)	55	85	115	160
MEDIA	29,29	22,68	24,91	21,31	MEDIA	23,00	19,96	23,16	20,54
ST DESV.	5,18	4,26	4,19	4,71	ST DESV.	5,31	4,08	8,57	4,80
ST ERROR	0,67	0,55	0,54	0,61	ST ERROR	0,69	0,53	1,11	0,62

### Área: fascia dentada (grupo control)

En cuanto a la hoja suprapiramidal de la fascia dentada en los individuos control del día 85 se puede apreciar una disminución del área media de los núcleos de las neuronas, con una posterior subida hacia el día 115 y, finalmente, una nueva reducción en los ratones del día 160.

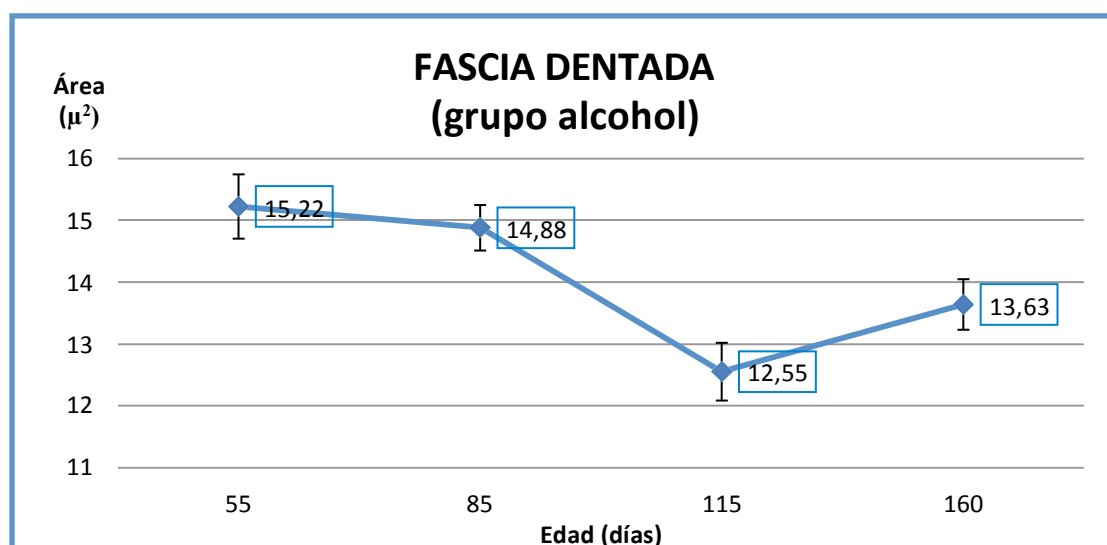
Hemos comprobado que la diferencia entre los grupos de edades son relevantes, siendo todas ellas  $p < 0.05$ .



### Área: fascia dentada (grupo alcohol)

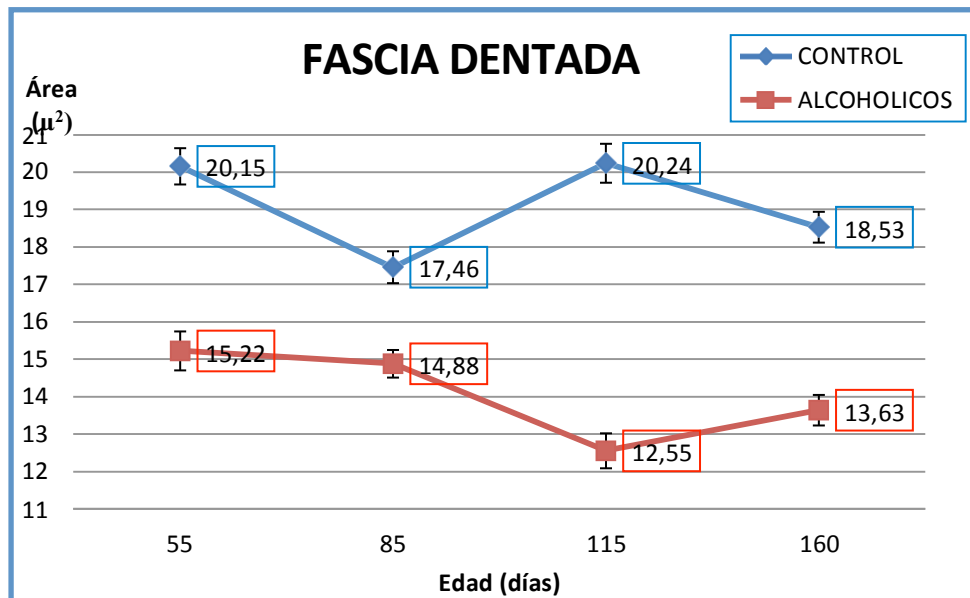
El grupo alcohólico sufre un descenso progresivo entre los días 55 y 115 con un ligero aumento de la expansión de su área nuclear hacia el día 160. Hay que tener en cuenta que en estas variaciones del tamaño de los núcleos neuronales, los alcohólicos siempre están por debajo de la media del grupo control.

Hemos comprobado que las diferencias entre los grupos de edad no son significativas ( $p > 0.05$ ), excepto entre los días 85 y 115 ( $p < 0.05$ ).



### Comparación entre grupo control y grupo alcohol: Fascia Dentada (Área)

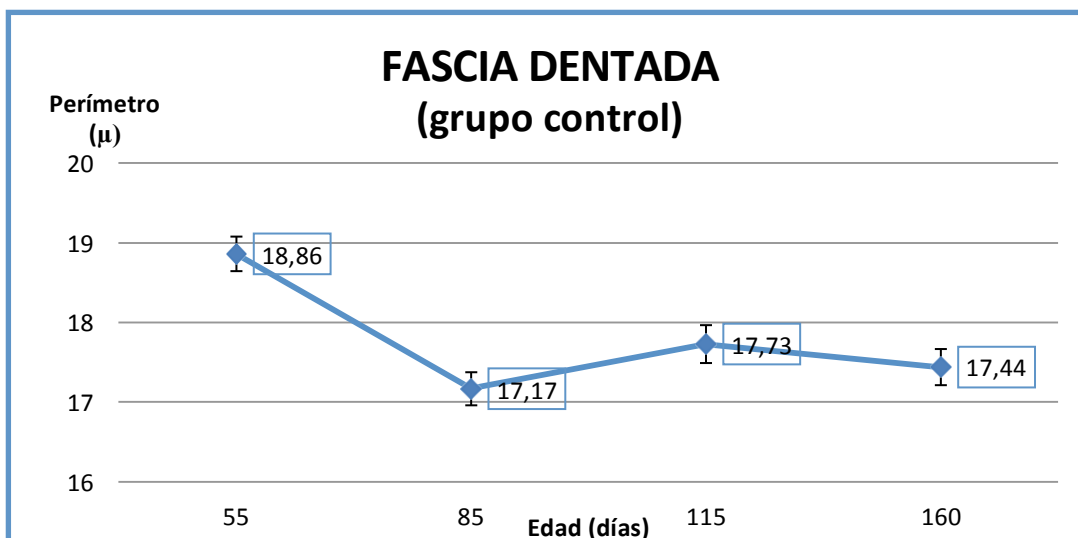
Se ha comparado todos los datos para saber si estas variaciones en el crecimiento de las neuronas en comparación entre el grupo control y el alcohólico eran relevantes o no. En la hoja suprapirramidal se pueden detectar diferencias significativas en cuanto al tamaño de unas células granulares con otras ( $p < 0,05$ ), entre todos los grupos de edad.



### Perímetro: fascia dentada (grupo control)

En los individuos del día 85 se puede apreciar una disminución en la media de los perímetros de los núcleos de las neuronas, con un leve aumento en cuanto a su tamaño hacia el día 115 y, finalmente, una nueva reducción en los ratones del día 160; sin embargo, todos estos altibajos poseen variaciones dentro de un mismo margen, siendo sus valores muy próximos entre ellos.

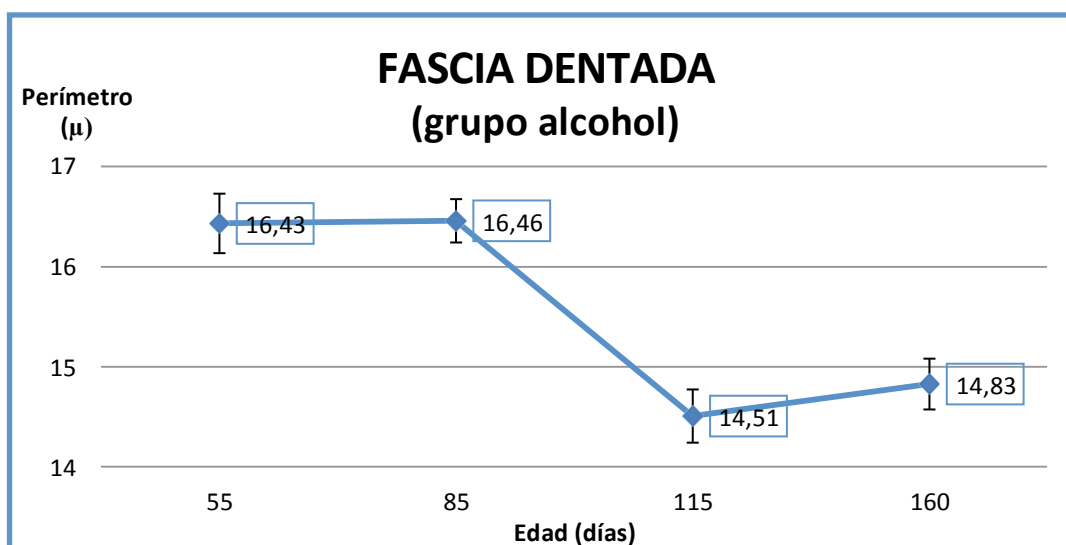
Hemos comprobado que la diferencia entre los días 55 y 85 de edad son relevantes ( $p < 0,05$ ), en cambio, las demás diferencias entre los grupos de edad no son relevantes ( $p > 0,05$ ).



Perímetro: fascia dentada (grupo alcohol)

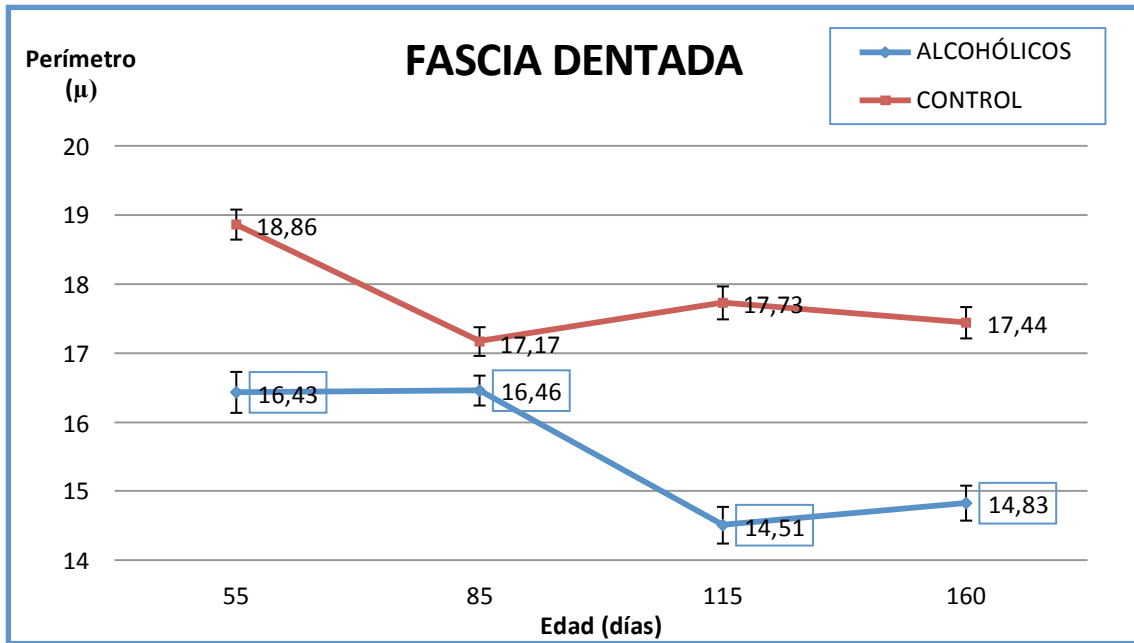
El grupo alcohólico sufre un descenso progresivo entre los días 85 y 115, mientras que entre los días 55-85 y 115-160 las variaciones medias de los perímetros son mínimas. Hay que tener en cuenta que en estas variaciones del tamaño de los núcleos neuronales, los alcohólicos siempre están por debajo de la media del grupo control.

Hemos comprobado que las diferencias entre los grupos de edad no son significativas ( $p$  valor $>0.05$ ), excepto entre los días 85 y 115 ( $p$ -valor $<0.05$ ).



Comparación entre grupo control y grupo alcohol: Fascia Dentada (Perímetro)

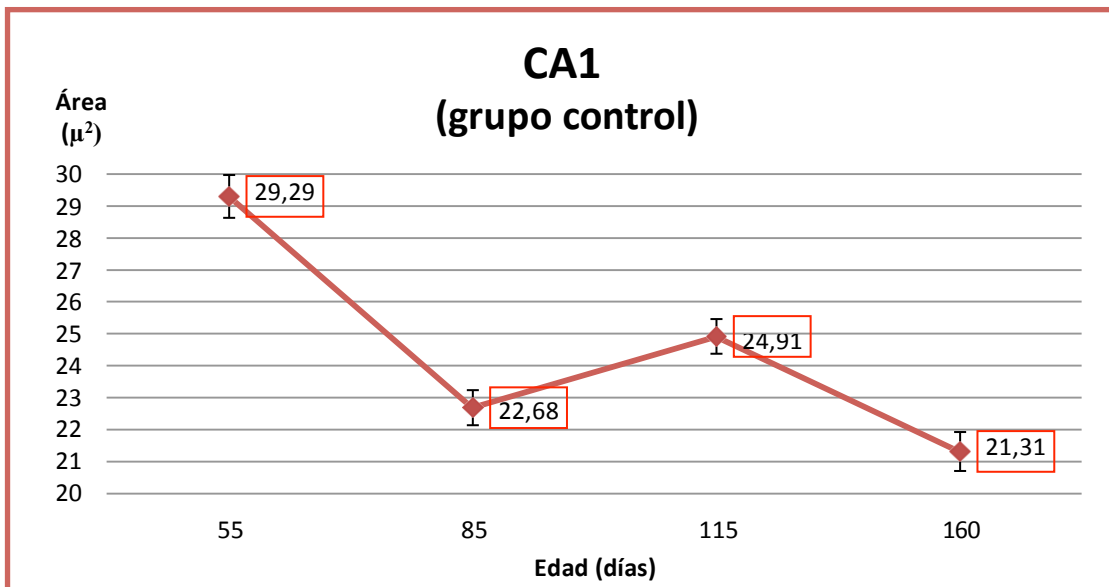
Se ha comparado todos los datos para saber si estas variaciones en el crecimiento de las neuronas en comparación entre el grupo control y el alcohólico eran relevantes o no. En la hoja suprapiramidal se pueden detectar diferencias significativas en cuanto al tamaño de unas células granulares con otras ( $p<0.05$ ), entre todos los grupos de edad, con valores inferiores en el grupo alcohol.



Área: CA1 (grupo control)

En cuanto al área CA1 del Asta de Ammón, en el grupo control se aprecia un descenso en el tamaño del área de los núcleos entre los días 55 y 85. Posteriormente experimentan un pequeño aumento entre los días 85 y 115 para, de nuevo, disminuir en el día 160 hasta su mínimo.

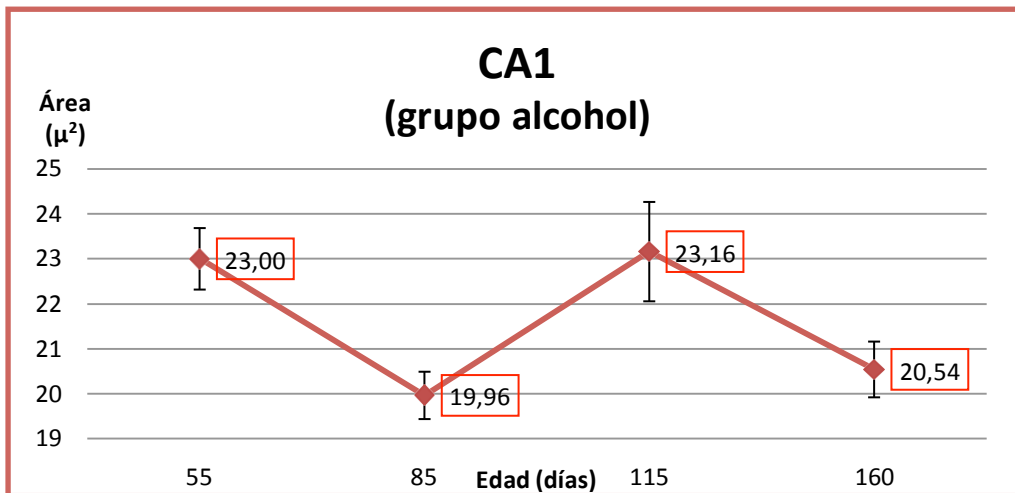
Hemos comprobado que la diferencia entre los grupos de edad son relevantes, siendo todas ellas  $p < 0.05$ .



### Área: CA1 (grupo alcohol)

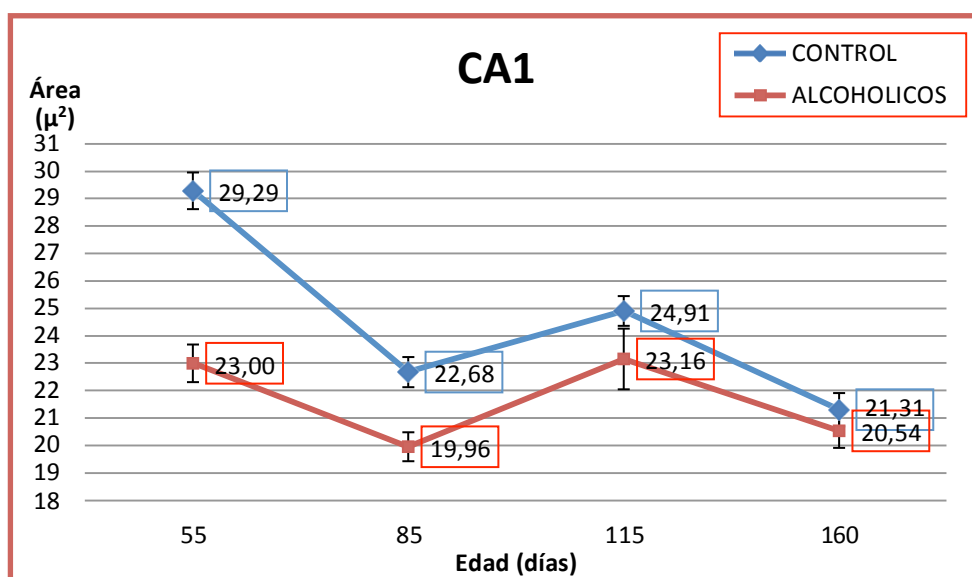
En el grupo alcohol de esta misma área se observa el mismo patrón que en el grupo control: una disminución del tamaño entre los días 55 y 85, un aumento del tamaño de los núcleos hacia el día 115 y, de nuevo, una disminución del tamaño en el grupo de los 160 días.

Hemos comprobado que las diferencias entre los grupos de edad no son significativas ( $p$  valor  $>0.05$ ), excepto entre los días 55 y 85 ( $p$  valor  $<0.05$ ).



### Comparación entre grupo control y grupo alcohol: CA1 (Área)

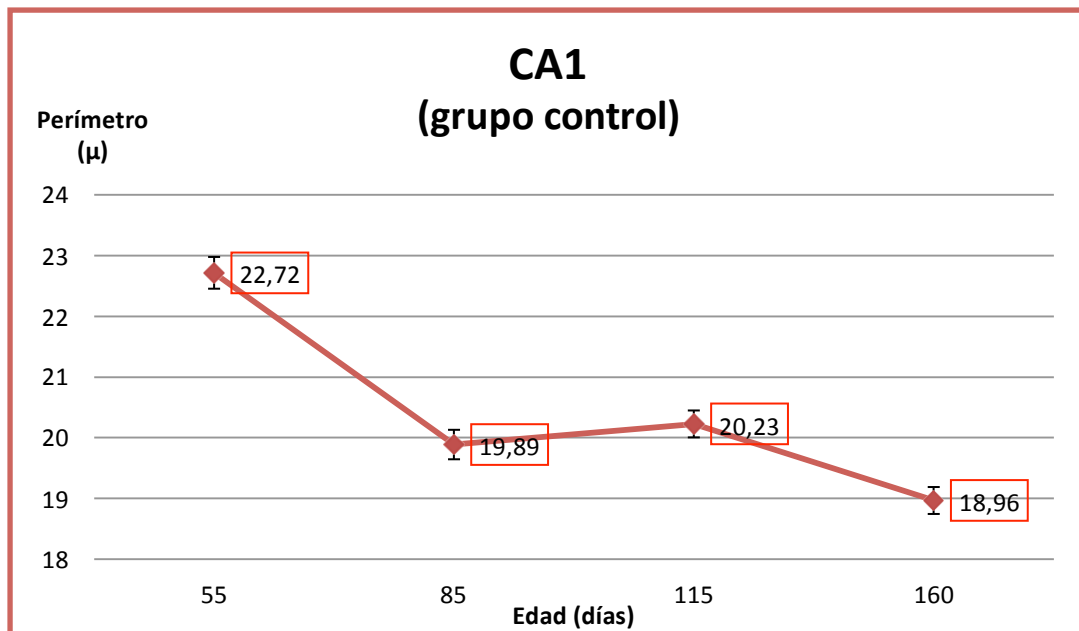
Se han comparado estos datos para detectar si estas variaciones en el crecimiento de las neuronas entre el grupo control y el alcohólico son relevantes o no. Lo obtenido indica que en el área CA1 del asta de Ammón se detectan diferencias significativas en cuanto al tamaño del área nuclear ( $p < 0.05$ ), pero en los grupos de edad de 115 y 160 días se observa que las diferencias no son significativas ( $p$  valor  $>0.05$ ).



### Perímetro: CA1 (grupo control)

En cuanto al perímetro de los núcleos del área CA1 del Asta de Ammón del grupo control observamos un descenso en el tamaño entre los días 55 y 85 de edad. Seguidamente hay un ligero aumento en el tamaño hasta el día 115, donde el tamaño vuelve a descender hasta el día 160 de edad.

Hemos comprobado que solo entre los días 55 y 85 hay diferencias significativas ( $p < 0.05$ ), en cambio, en entre los demás grupos de edad no existen diferencias significativas ( $p > 0.05$ ).

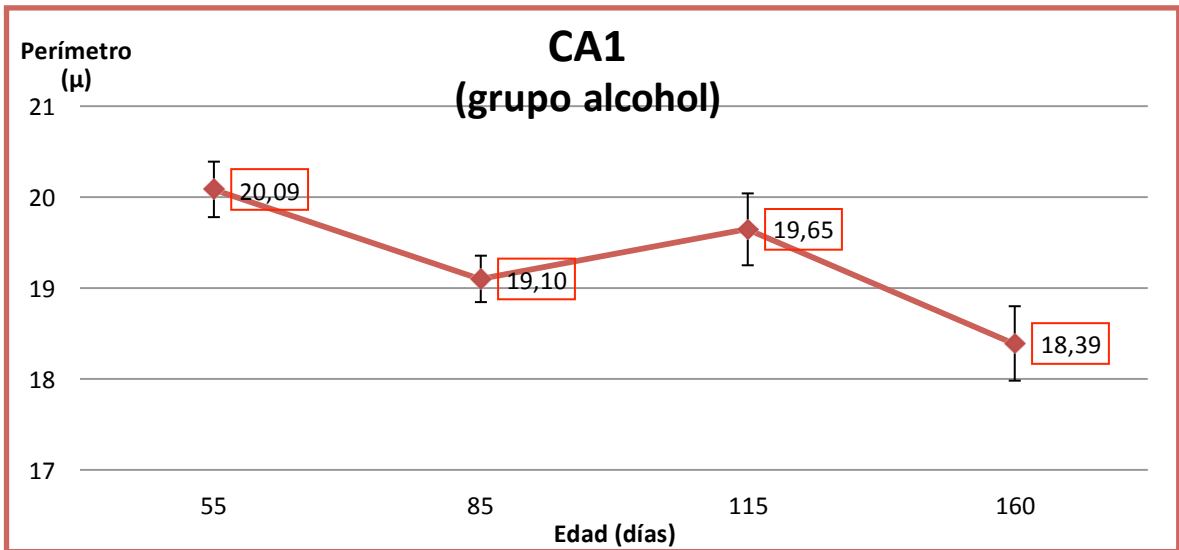


### Perímetro: CA1 (grupo alcohol)

De igual manera que en el grupo control, el perímetro de los núcleos en el grupo alcohol disminuye en cuanto a tamaño entre los días 55 y 85, aunque no de una manera tan pronunciada. Entre los días 85 y 115 hay un aumento mínimo en el perímetro y, posteriormente, una disminución del tamaño hacia el día 160.

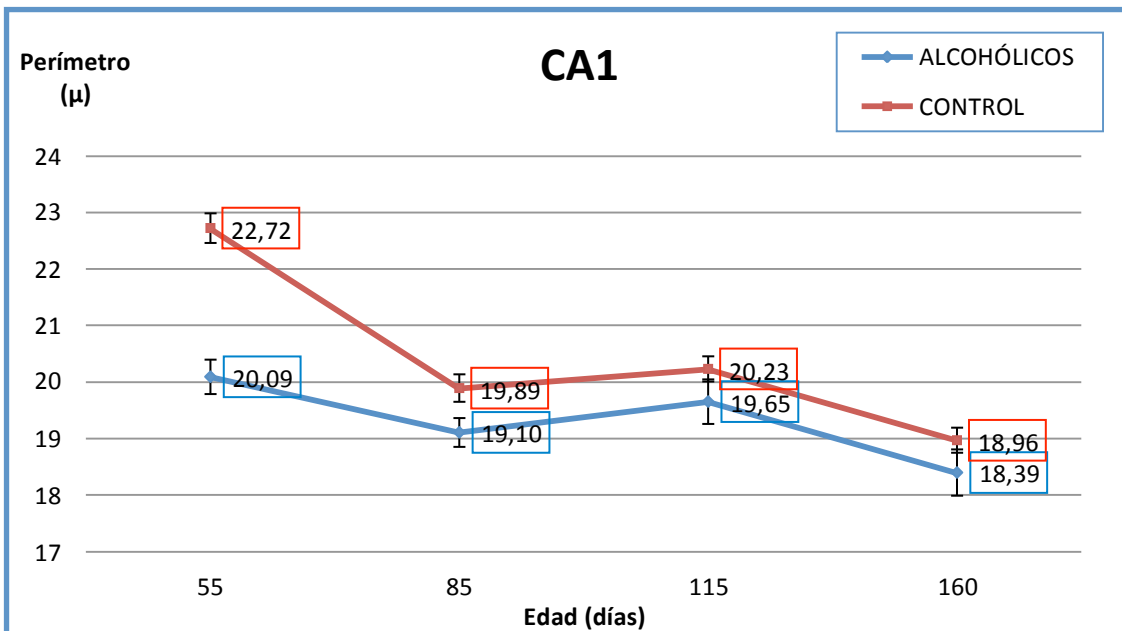
Hemos comprobado que las diferencias entre los grupos de edad no son significativas ( $p > 0.05$ ).





Comparación entre grupo control y grupo alcohol: CA1 (Perímetro)

Se han comparado estos datos para detectar si estas variaciones en el crecimiento de las neuronas entre el grupo control y el grupo alcohol son relevantes o no. Lo obtenido indica que en el área CA1 del asta de Ammón se detectan diferencias significativas en cuanto al tamaño del perímetro nuclear ( $p < 0,05$ ) hasta el día 160 donde las diferencias dejan de ser significativas ( $p > 0,05$ ).



## Síndrome alcohólico fetal

La exposición prenatal al alcohol es una de las causas más importantes de deterioro cognitivo prevenible en el mundo.<sup>20</sup> El sistema neurológico en desarrollo es extremadamente sensible al daño causado por el alcohol y ahora también hay evidencia sustancial que el daño relacionado con el alcohol puede extenderse más allá de la persona individual, lo que lleva a cambios epigenéticos y vulnerabilidad y desventaja intergeneracional. No se conoce el nivel seguro el momento de dejar de beber para mujeres embarazadas o lactantes ni la cantidad de alcohol (> cuatro bebidas en 2 horas para las mujeres) más dañina para el feto y su posterior desarrollo. La exposición al alcohol aumenta el riesgo de problemas congénitos, incluido el trastorno del espectro alcohólico fetal (FASD) y su forma más grave, el síndrome de alcoholismo fetal (FAS). El impacto de FASD y FAS es duradero y de por vida sin tratamiento o cura actual.<sup>1</sup>

El síndrome de alcoholismo fetal (FAS) se caracteriza por retraso en el crecimiento, dismorfologías faciales y una gran cantidad de trastornos del comportamiento neurológico. Los efectos del comportamiento neurológico en FAS y en el trastorno del neurodesarrollo relacionado con el alcohol, incluyen aprendizaje y memoria deficientes, déficit de atención y disfunción motora. Muchos de estos déficits de comportamiento se pueden modelar en roedores.<sup>26</sup>

Los estudios de comportamiento neurológico muestran que los animales expuestos prenatalmente al alcohol se ven afectados en muchas de las mismas tareas de aprendizaje espacial y memoria sensibles al daño del hipocampo, incluidos los laberintos en T, el laberinto de agua de Morris y el laberinto del brazo radial.

Kalberg et al [2006] sugieren que todos los niños pequeños con SAF deben recibir evaluaciones completas del desarrollo que incluyan una evaluación de su funcionamiento motor, para identificar áreas problemáticas y proporcionar acceso a programas de intervención para el desarrollo que apunten a áreas deficitarias como las habilidades motoras finas. Las demoras motoras finas en niños con SAF pueden estar relacionadas con déficits neuroconductuales específicos que afectan las habilidades motoras finas.

La evidencia directa de la participación del hipocampo es proporcionada por estudios neuroanatómicos del hipocampo<sup>25</sup> que documentan un número reducido de neuronas, una menor densidad de la columna dendrítica en las neuronas piramidales y una menor plasticidad morfológica después del enriquecimiento ambiental en ratas expuestas prenatalmente al alcohol.

Los estudios electrofisiológicos también demuestran cambios en la actividad sináptica en cortes cerebrales del hipocampo in vitro aislados de animales prenatales expuestos al alcohol.

Consideradas en conjunto, estas observaciones demuestran que la exposición prenatal al alcohol puede provocar un desarrollo y función anormales del hipocampo. Dichos estudios proporcionan una mejor comprensión de los déficits neurológicos asociados con FAS en humanos, y también pueden contribuir al desarrollo de estrategias para mejorar los efectos de la exposición prenatal al alcohol en el comportamiento.

Uban K.A. et al [2010] afirmaron que la exposición prenatal al alcohol (PAE) altera la neurogénesis adulta y la respuesta neurogénica al estrés en ratas macho. Determinaron que en comparación con las mujeres de la condición de control, la restricción dietética prenatal mejoró la

supervivencia de las nuevas neuronas, mientras que el PAE alteró la diferenciación de las células recién producidas en la circunvolución dentada adulta. Las alteraciones en la neurogénesis del hipocampo después de PAE pueden contribuir al aprendizaje y los déficits de memoria observados en individuos con trastornos del espectro alcohólico fetal.

## Discusión

Cada centro cerebral tiene un desarrollo propio en cuanto a la evolución de los parámetros nucleares<sup>13,14</sup>. Esta afirmación se conoce con el nombre de “heterocronía”<sup>30</sup> y explicaría que diferentes centros experimenten cambios en edades distintas, ya que están influenciados por características propias y otros factores, tales como factores ambientales. Esto explicaría las variaciones en el tamaño del área y el perímetro nuclear de nuestras muestras.

Como ha quedado reflejado en los resultados expuestos en este estudio, la morfometría de las neuronas hipocampales se ve alterada por la exposición crónica al alcohol. Aún así, los efectos del alcohol en el hipocampo no solo afectan a la estructura de sus neuronas, sino también a la neurogénesis y a las funciones relacionadas con este núcleo<sup>10,22</sup>.

El consumo prenatal de alcohol puede causar defectos severos en el desarrollo neuronal<sup>10</sup>, esto es conocido como Síndrome Alcohólico Fetal (FAS: *Fetal Alcohol Syndrome*) que puede ser observado tanto en ratones como en humanos. Los defectos producidos son extensos, entre otros: déficit de atención, hiperactividad, trastornos del ánimo y, también, problemas en el aprendizaje y la memoria. Este síndrome se debe a la alta sensibilidad de las neuronas al alcohol en el período de “mayor crecimiento cerebral” (“*brain growth spurt*”), un período en el que el cerebro fabrica una importante organización multicelular.

Los cambios en el comportamiento están relacionados con la alteración fisiológica en la plasticidad sináptica del hipocampo, que refleja una gran neurodegeneración producida por la exposición al etanol.<sup>10</sup>

Como recogen en su estudio Brady et al. [2006], la fascia dentada se ve afectada por un consumo regular de alcohol en el período prenatal, observándose de esta manera una deficiencia de la memoria en la edad adulta. También se observa un déficit en el receptor de NMDA en la fascia dentada,<sup>5</sup> siendo este un receptor ionotrópico de glutamato y un componente en la plasticidad neuronal y la memoria.

Por otro lado, varios estudios han documentado el papel del sistema colinérgico en los procesos de memoria y aprendizaje. Se ha visto que una disfunción en el sistema neuronal colinérgico está relacionada con una amnesia inducida por etanol.<sup>22</sup>

No solo una exposición crónica al alcohol tiene consecuencias, sino que estudios han demostrado que una sola exposición en etapas tempranas postnatales al etanol provoca una extensa neurodegeneración por apoptosis de las células madre y un consecuente impedimento en el aprendizaje y en la memoria espacial.<sup>28</sup> Todo esto está en relación con la neurogénesis del hipocampo, como aparece en el estudio de Ieraci y Herrera [2007], proceso que ocurre durante toda la vida y que se produce en la zona subgranular del giro dentado. En esta zona un grupo de células madre se dividen y dan lugar a neuronas y células gliales, estando este proceso relacionado en el adulto con el

aprendizaje y la memoria. Por tanto, la exposición al alcohol en este período de “mayor crecimiento cerebral” causa graves daños<sup>6</sup>.

Varios estudios de Contreras et al [2019][2020] también han concluido que el consumo intermitente y excesivo de etanol durante períodos muy cortos de tiempo en la adolescencia, etapa considerada un período vulnerable a los efectos del alcohol en términos de rendimiento cognitivo, afecta de forma drástica a las funciones de aprendizaje espacial y la memoria dependiente del hipocampo, déficits neurológicos que pueden persistir en la edad adulta.

Por este motivo, en la vida adulta también se ve comprometido el rendimiento de la memoria de trabajo, es decir, estructuras y procesos utilizados para el almacenamiento temporal de información y la manipulación de esta.<sup>23</sup>

En el estudio realizado por David F. Wozniak et al. [2004], se observó que la neurodegeneración fue particularmente severa en ciertas áreas específicas del cerebro que comprometían todo el circuito del hipocampo. Se propuso así una posible destrucción de neuronas en estas porciones, dada la severidad de los efectos. Esto contribuiría a un profundo daño en el proceso de aprendizaje y memoria, sin encontrarse reemplazos de estas neuronas dañadas por otras nuevas. Sin embargo, se ha observado una adaptación a dicha pérdida neuronal como: remodelación en las conexiones sinápticas, cambios en la fisiología intrínseca de algunos núcleos o la adquisición de nuevas funciones en otras áreas cerebrales.

En otros estudios, como el realizado por Elin Aberg et als. [2005], destacan el incremento en la proliferación celular y la neurogénesis como método compensatorio en respuesta a esta pérdida neuronal en el hipocampo. A pesar de esto, no se consiguen compensar todos los daños neuronales causados. Los resultados de este estudio, en los que en la última edad estudiada, no presenta diferencias significativas con respecto al grupo control, podría relacionarse en este aspecto con el intento de “compensación” o “adaptación” descrito a nivel del hipocampo.

Estas teorías se han demostrado con pruebas en ratones como el Laberinto T o el Laberinto de Morris.<sup>4</sup> Con estas pruebas se llega a la conclusión de que en los ratones expuestos al alcohol, la memoria y la navegación espacial se ven comprometidas. Además, los resultados indican que el patrón de este déficit se asemeja al observado en hipocampos con daños directos.

También existen estudios neuroanatómicos que muestran unas proyecciones axonales anormales en el hipocampo de roedores expuestos prenatalmente al alcohol, además de una pérdida directa de neuronas piramidales. Asimismo, estudios electrofisiológicos muestran una actividad eléctrica anormal mediante electroencefalografías y también mediante la observación de muestras cerebrales.<sup>4</sup>

Esto no quiere decir que el daño en la memoria no tenga que ver con el daño producido por el etanol en otras áreas cerebrales.<sup>28</sup> Además, existen más estudios relacionados con el efecto del alcohol en la morfometría de otras áreas cerebrales, como en el hipotálamo.<sup>16</sup>

Los resultados expuestos en este trabajo corroboran estas alteraciones al haber

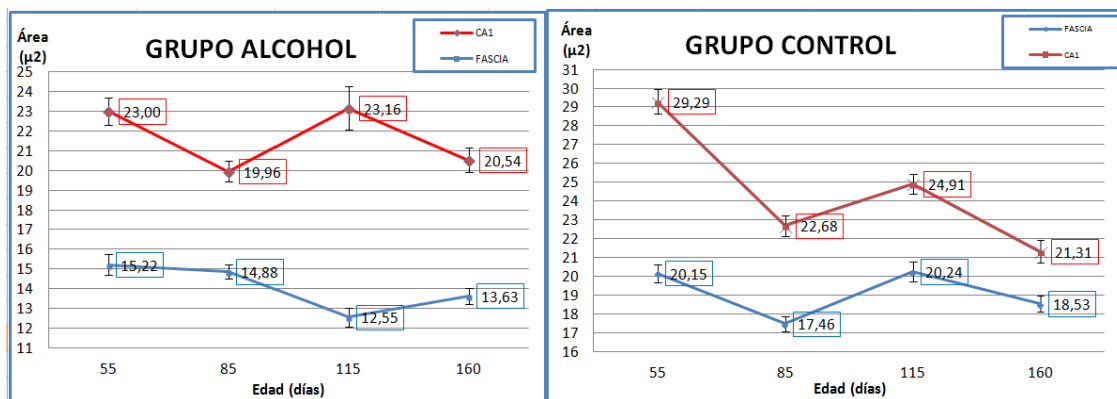
detectado una disminución de los tamaños nucleares en ambas zonas del hipocampo tras el consumo crónico de alcohol, lo cual puede guardar relación con la afectación de la memoria de estos animales.

# Conclusiones

El presente estudio sobre el desarrollo postnatal de los núcleos de las neuronas hipocampales muestra patrones de crecimiento diferentes entre el asta de Amón y la fascia dentada, concretamente del área CA1 y de la hoja suprapiramidal, respectivamente.

## Estudios sobre el área de los núcleos neuronales hipocampales

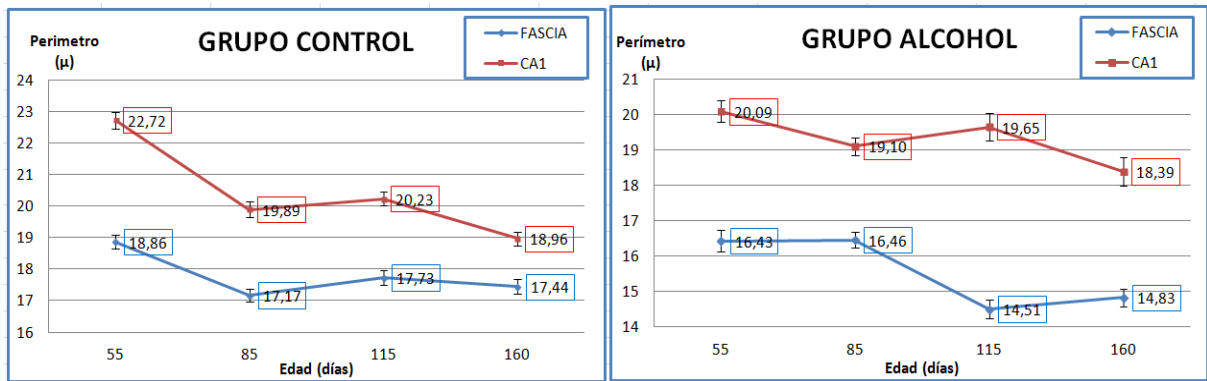
En general, se aprecia que el área de las neuronas piramidales de CA1 es mayor que el de las neuronas granulares de la fascia dentada, tanto en el grupo alcohol como en el grupo control. Esto es algo normal debido a las diferencias cariométricas e histológicas de estas células.<sup>12,13</sup>



Asimismo, si comparamos los parámetros entre las áreas de los grupos control y grupos alcohol, llegamos a la conclusión de que en la fascia dentada las neuronas granulares del grupo alcohol son significativamente ( $p < 0.05$ ) más pequeñas que en las del grupo control. Sin embargo, en el área CA1 las neuronas piramidales muestran un área más pequeña en el grupo alcohol ( $p < 0.05$ ) hasta el día 115, a partir de entonces las diferencias no son lo suficientemente significativas ( $p > 0.05$ ) para afirmar que el área sea más pequeña que en el grupo control.

## Estudios sobre el perímetro de los núcleos neuronales hipocampales

De igual manera que el área de los núcleos, el perímetro de las neuronas piramidales de CA1 es mayor que el de las neuronas granulares de la fascia dentada, tanto en el grupo alcohol como en el grupo control.



Asimismo, si comparamos los parámetros entre los perímetros de los grupos control y grupos alcohol, llegamos a la conclusión de que en la fascia dentada las neuronas granulares del grupo alcohol son significativamente ( $p < 0.05$ ) más pequeñas que en las del grupo control. También en el área CA1 las neuronas piramidales muestran un perímetro más pequeño en el grupo alcohol ( $p < 0.05$ ) a excepción del grupo de edad de 160 días, cuando las diferencias no son lo suficientemente significativas ( $p > 0.05$ ) para afirmar que el área sea más pequeña que en el grupo control.

### Conclusión final

Según los datos obtenidos, ante un consumo de alcohol diario en etapas de desarrollo neuronal postnatal, el área y el perímetro de las neuronas hipocampales se ven afectados en su desarrollo morfométrico, de tal forma que interferirá en las funciones relacionadas con dichos núcleos y en su neurogénesis.



## ¿Qué he aprendido realizando el TFG?

- Aprender a cómo realizar un trabajo de investigación y cómo ordenar lo aprendido de varios artículos científicos en un proyecto único.
- Repaso y aprendizaje de conceptos de neurobiología.
- Clínica del Síndrome Alcohólico Fetal y su afectación en el desarrollo neurológico.
- Aprendizaje del uso de un microscopio con test de imagen virtual y perfección en el manejo de un microscopio convencional para la búsqueda de un elemento celular concreto.
- Mejora de habilidades de manejo con programas estadísticos.

# Bibliografía

1. Abel EL. (2006): *Fetal alcohol syndrome: a cautionary note*. Curr Pharm Des.
2. Aberg E., Hofstetter C.P., Olson L. y Brené S. (2005): *Moderate ethanol consumption increases hippocampal cell proliferation and neurogenesis in the adult mouse*. International Journal of Neuropsychopharmacology.
3. Barrett K.E. (2010): *Ganong Fisiología Médica* (23<sup>o</sup> Ed). Ed: McGraw-Hill.
4. Berman R.F. y Hannigan J.H. (2000): *Effects of Prenatal Alcohol Exposure on the Hippocampus: Spatial Behavior, Electrophysiology, and Neuroanatomy*. HIPPOCAMPUS.
5. Brady M.L., Díaz M.R., Iuso A., Everett J.C., Valenzuela F. y Caldwell K.K. (2013): *Moderate Prenatal Alcohol Exposure Reduces Plasticity and alters NMDA Receptor Subunit Composition in the Dentate Gyrus*. The Journal of Neuroscience.
6. Contreras A, Polín E, Miguéns M, et al. (2019): *Intermittent-Excessive and Chronic-Moderate Ethanol Intake during Adolescence Impair Spatial Learning, Memory and Cognitive Flexibility in the Adulthood*. Neuroscience.
7. Contreras A, Morales L, Del Olmo N. (2019): *The intermittent administration of ethanol during the juvenile period produces changes in the expression of hippocampal genes and proteins and deterioration of spatial memory*. Behav Brain Res.
8. Contreras A, Morales L, Del Olmo N, Pérez-García C. (2020): *Effects of Intermittent versus Chronic-Moderate Ethanol Administration during Adolescence in the Adult Hippocampal Phosphoproteome*. Chem Res Toxicol.
9. Guyton C.G. and Hall J.E. (2006): *Tratado de Fisiología Médica*. 11<sup>a</sup> Edición. Elsevier.
10. Ieraci A. y Herrera D.G. (2007): *Single alcohol exposure in early life damages hippocampal stem/progenitor cells and reduces adult neurogenesis*. Neurobiology of Disease .
11. Kalberg WO, Provost B, Tollison SJ, et al. (2006): *Comparison of motor delays in young children with fetal alcohol syndrome to those with prenatal alcohol exposure and with no prenatal alcohol exposure*. Alcohol Clin Exp Res.
12. Mira R.G., Lira M., Tapia-Rojas C., Rebolledo D.L., Quintanilla R.A., Cerpa W. (2020): *Effects of alcohol on hippocampal-dependent plasticity and behavior: role of glutamatergic synaptic transmission*. Frontiers Behavioral Neuroscience.
13. Morishita M., Kawamoto M., Masuda Y., Higuchi K., Tomioka M., Nagamachi N.,

- Mitani H., Ozasa T. y Adachi H. (1974): *Quantitative histological changes in the hypothalamic nuclei in the prepuberal, puberal and postpuberal female rat*. Brain Res.
14. Morishita M., Kawamoto M., Masuda Y., Higuchi K., Tomioka M., Nagamachi N., Mitani H., Ozasa T. y Adachi H. (1976): *Developmental changes in the hypothalamic nuclei in perinatal, neonatal and infant rats*. Brain Res.
  15. Paxinos G. y Watson C. (1998): *The Rat Brain in stereotaxic coordinates* (4th Edition). Academic Press.
  16. Pérez-Delgado M.M, Garcia-Garcia M., Carmona-Calero E., Pérez-González H., Castañeyra-Perdomo A., Ferres-Torres R. (1995): *Alcohol effects on paraventricular hypothalamic nucleus morphometry*. Acta Anat.
  17. Pérez-Delgado M.M, Garcia-Garcia M., Carmona-Calero E., Pérez-González H., Castañeyra-Perdomo A., Ferres-Torres R. (1996): *Efectos del alcohol sobre la morfometría del nucleus ventromedialis*. Arch. Esp. Morfol.
  18. Pérez-Delgado M.M, Serrano-Aguilar P.G., Castañeyra-Perdomo A. y Ferres-Torres R. (1994): *Postnatal Development of Ammon's horn (CA1 and CA3 fields). A Karyometric and Topographic Study*. Histol Histopath.
  19. Pérez-Delgado M.M., Serrano-Aguilar P.G., Castañeyra-Perdomo A. y Ferres-Torres R. (1992): *Postnatal Development of The Dentate Gyrus: A Karyometric and Topographic Study*. Acta Anat.
  20. Pruet D, Waterman EH, Caughey AB. (2013): *Fetal alcohol exposure: consequences, diagnosis, and treatment*. Obstet Gynecol Surv.
  21. Quintana-Polaco I, Castro-Bosch M.N. (2014): *Cambios morfológicos del hipocampo de ratones balb/c en los primeros días de vida postnatal*.
  22. Rezayof A., Alijanpour S., Zarrindast M. y Rassouli Y. (2008): *Ethanol state-dependent memory: Involvement of dorsal hippocampal muscarinic and nicotinic receptors*. Neurobiology of Learning and Memory.
  23. Serrano-Aguilar P.G. (1983): *Repercusiones cariométricas de la castración prepuberal en el hipocampo (un estudio en el ratón blanco)*. Tesina de Licenciatura.
  24. Sharipo M. (2001): *Plasticity, Hippocampal Place Cells, and Cognitive Maps*. Arch. Neurology.
  25. Shim JH, Kim YT, Kim S, Baek HM. (2019): *Volumetric Reductions of Subcortical Structures and Their Localizations in Alcohol-Dependent Patients*. Front Neurol.
  26. Thackray H, Tiff C. (2001): *Fetal alcohol syndrome*. Pediatr Rev.

27. Uban KA, Sliwowska JH, Lieblich S, et al. (2010): *Prenatal alcohol exposure reduces the proportion of newly produced neurons and glia in the dentate gyrus of the hippocampus in female rats.* Horm Behav.
28. Wozniak D.F., Hartman R.E., Boyle M.P., Vogt S.K., Brooks A.R., Tenkova T, Young C, Olney JW y Muglia LJ (2004): *Apoptotic neurodegeneration induced by etanol in neonatal mice is associated with profound learning/memory deficit in juveniles followed by progressive functional recovery in adults.* Neurobiology of Disease.
29. Xaviera García S., Gijón E., Prieto B. (2009): *Fisiología médica.* Ed. Inter sistemas.
30. Zilles K., Schleicher A. y Wingert F. (1976): *Quantitative anylse des waschtums der frischvolumina limbischer kerngebiete in diencephalon und mesencephalon einer ontogenetischen reine von albino mausen.* J.Hirnfors

**Trabajo Fin de Grado**  
**Conformidad para la presentación de la memoria y defensa**

Dr/Drs M<sup>a</sup> del Mar Pérez Delgado, tutor/tutores del trabajo realizado por el alumno(s)/a(s) María Cristina Díaz Hernández con el título "Efectos morfométricos del alcohol en núcleos de la fascia dentada y área ca1 del hipocampo en ratones machos albinos", damos nuestra aprobación para la presentación de la memoria y a su defensa como Trabajo Fin de Grado.

La Laguna, .15 de junio de 2020

Firma alumna



Firmado tutora

