

03068



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

7

COLEGIO DE CIENCIAS Y HUMANIDADES
UNIDAD ACADÉMICA DE LOS CICLOS PROFESIONAL
Y DE POSGRADO
CENTRO DE NEUROBIOLOGIA

24.

**EFFECTOS DE LA MALNUTRICION HIPOPROTEINICA
CRONICA SOBRE LA MORFOLOGIA DEL NUCLEO
SUPRAQUIASMATICO DE LA RATA ADULTA**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS FISIOLÓGICAS

P R E S E N T A :

BIOL. JULIO CESAR ROJAS CASTAÑEDA

DIRECTOR DE TESIS: DR. LEON CINTRA McGLONE

MEXICO, D. F.

1998

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

263505



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**EFFECTOS DE LA MALNUTRICIÓN HIPOPROTEÍNICACRÓNICA
SOBRE LA MORFOLOGÍA DEL NÚCLEO SUPRAQUIASMÁTICO
DE LA RATA ADULTA**

Biol. Julio César Rojas Castañeda

**Centro de Neurobiología
Universidad Nacional Autónoma de México**

**Departamento de Neurociencias
Instituto de Fisiología Celular
Universidad Nacional Autónoma de México**

Y

**Laboratorio de Histomorfología
Unidad de Investigación en Salud Infantil
Instituto Nacional de Pediatría**

El presente trabajo de tesis fue realizado en el Centro de Neurobiología de la UNAM, Instituto de Fisiología Celular, UNAM y en el Laboratorio de Histomorfología del Instituto Nacional de Pediatría, bajo la dirección del Dr. León Cintra McGlone.

DEDICATORIA

Con amor para Rosa María, Luis Daniel y Julio César

A la memoria de mi madre

A mi padre y hermanos

A mis amigos y compañeros

AGRADECIMIENTOS

Con especial agradecimiento a los Doctores León Cintra y Raúl Aguilar por su dirección, asesoramiento, apoyo, paciencia y facilidades brindadas para la realización del presente trabajo.

A la Dra. Sofía Díaz-Cintra por su valioso apoyo y sugerencias durante la realización del presente trabajo.

Al Dr. Fructuoso Ayala por sus sugerencias durante la realización del presente trabajo.

A la M. en C. Pilar Durán por la ayuda proporcionada durante la realización del presente trabajo.

Al Sr. Pedro Medina y M. en C. Agustín Galván por su apoyo en el Bioterio.

A mis compañeros del Centro de Neurobiología de la UNAM: Pilar, Ivette, Azucena y Agustín.

A mis compañeros del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM: Carolina, Ivette, Alberto, Daniel, José Luis, Arturo, Jorge y Carlos.

A mis compañeros del Instituto Nacional de Pediatría: Rosa María, Gloria, Gabriela, Leticia y Pedro.

A los miembros del jurado por la revisión hecha al manuscrito y por sus valiosas sugerencias:

Dr. León Cintra McGlone
Dr. Raúl Aguilar Roblero
Dr. Fructuoso Ayala Guerrero
Dra. Sofía Díaz-Cintra
Dra. María Luisa Fanjul de Moles

RECONOCIMIENTO

A las autoridades del Instituto Nacional de Pediatría: Dra. Alessandra Carnevale Cantoni, Dr. Roberto Rivera Luna y Dr. Ismael Lares Asseff. Por permitir que el presente trabajo se realizará en colaboración con el Centro de Neurobiología y el Instituto de Fisiología Celular de la UNAM.

Este trabajo fue apoyado parcialmente por los proyectos de DGAPA IN-208494, IN-208597 e IN-206697.

ÍNDICE

RESUMEN.....	3
SUMMARY.....	4
INTRODUCCIÓN.....	5
ANTECEDENTES.....	7
Períodos Críticos de desarrollo cerebral.....	7
Malnutrición y desarrollo cerebral.....	9
Ritmos biológicos y el núcleo supraquiasmático.....	12
Localización del núcleo supraquiasmático.....	15
Desarrollo del núcleo supraquiasmático.....	16
Citoarquitectura del núcleo supraquiasmático.....	19
Aferencias al núcleo supraquiasmático.....	19
Eferencias del núcleo supraquiasmático.....	21
Planteamiento del problema.....	23
HIPÓTESIS.....	23
OBJETIVOS.....	23
Objetivo general.....	23
Objetivos específicos.....	23
MATERIAL Y MÉTODOS.....	25
Animales y tratamiento nutricional.....	25
Procedimiento histológico.....	26
Distribución de las fibras de los tractos RH, serotoninérgico y GH, y células inmunoreactivas al PIV, la VP y la PAGF en el NSQ.....	27
Análisis morfométrico.....	28
Análisis estadístico.....	29
RESULTADOS.....	30
I.- OBSERVACIONES CUALITATIVAS.....	30
A) Distribución de las fibras del tracto RH, en secciones mediales del NSQ de la rata macho adulta.....	30
B) Distribución de las fibras del tracto serotoninérgico y GH, en secciones mediales del NSQ de la rata macho adulta.....	30
C) Distribución de las células inmunoreactivas al PIV, a la VP y a la PAGF, en secciones mediales del NSQ de la rata macho adulta.....	33
II.- ANÁLISIS MORFOMÉTRICO.....	35
A) Tracto serotoninérgico, en secciones mediales del NSQ de la rata macho adulta.....	35
B) Tracto GH, con fibras inmunoreactivas al NPY, en secciones mediales del NSQ de la rata macho adulta.....	35

C) Células inmunoreactivas al PIV, en secciones mediales del NSQ de la rata macho adulta.....	39
D) Células inmunoreactivas a la VP, en secciones mediales del NSQ de la rata macho adulta.....	39
E) Células inmunoreactivas a la PAGF, en secciones mediales del NSQ de la rata macho adulta.....	43
DISCUSIÓN	46
CONCLUSIONES	51
ABREVIATURAS	52
REFERENCIAS	53

RESUMEN

La malnutrición proteínica crónica en ratas produce cambios morfológicos y bioquímicos sobre el sistema nervioso central en desarrollo, en particular, ocasiona diversas alteraciones en el ritmo circádico de la conducta de consumo de agua y del ciclo sueño vigilia, que son regulados por el núcleo supraquiasmático (NSQ) del hipotálamo. El propósito del presente estudio fue evaluar los efectos que produce la malnutrición hipoproteínica crónica (dieta con 6 % de caseína) durante los periodos pre- y postnatal, sobre la distribución del tracto retinohipotalámico en el NSQ, en las áreas ocupadas por el NSQ, y en sus zonas densa (mayor densidad de células ó fibras) y en la difusa (fibras y células escasas), y determinar en cada una, la distribución y el número de células inmunoreactivas al péptido intestinal vasoactivo (PIV), a la vasopresina (VP), a la proteína ácida gliofibrilar (PAGF), y a las fibras inmunoreactivas a la serotonina y al neuropéptido Y (NPY). Las comparaciones morfométricas de cada uno de los anticuerpos utilizados, se llevaron al cabo en secciones mediales del NSQ de la rata macho adulta, con la ayuda de un sistema digital de imágenes. Las pruebas estadísticas de anova de una vía y "t" para grupos independientes fueron usadas para comparar diferencias entre el grupo control y el malnutrido, el nivel de significancia se ajustó a $p < 0.05$. La malnutrición hipoproteínica crónica, no afectó la distribución de las fibras, las células ó el área ocupada por el NSQ. Sin embargo, disminuyó significativamente el número de células inmunoreactivas al PIV, a la VP, a la PAGF y a las fibras serotoninérgicas. Estos resultados sugieren un aumento en el neuropilo de los animales malnutridos. Además, la malnutrición induce alteraciones diferenciales sobre grupos celulares y de fibras específicas a largo plazo. Por otra parte, es probable que existan mecanismos de compensación adaptativa involucrados con el mantenimiento de la integridad de la zona retinoreceptora. Así, las alteraciones celulares específicas observadas en este trabajo, podrían estar relacionadas con los trastornos en la conducta circádica de consumo de agua y el ciclo sueño-vigilia reportados en sujetos malnutridos.

SUMMARY

Chronic protein malnutrition in rats produces morphological and biochemical changes on the developing central nervous system, producing several alterations in the circadian rhythm of drinking behavior and that of the sleep-wake cycle, that are regulated by the suprachiasmatic nucleus (SCN) of the hypothalamus. The purpose of this study was to evaluate the effects that produce chronic protein malnutrition (diet of 6% casein) during prenatal and postnatal development on the distribution of retinohypothalamic tract into SCN, in the area by SCN, and in its dense (increased number of cells or fibers) and diffuse (decreased number of cells or fibers) regions, and determine in each the distribution and number of immunoreactive cells to vasoactive intestinal polypeptide (VIP), vasopressin (VP), glial fibrillar acid protein (GFAP), as well as, immunoreactive fibers to serotonin and neuropeptide Y (NPY). Morphometric comparisons for each of utilized antibodies were performed in middle sections of the SCN of the adult male rat, using an imaging digital system. Statistical analysis was made using the one-way analysis of variance (ANOVA) and the Student's-test for independent groups, with a significance level of $p < 0.05$. Chronic protein malnutrition, does not affects the distribution fibers, cells or the area by SCN. However, produced significant reduction of number of immunoreactive cells to VIP, VP and GFAP, and serotonergic fibers. These results suggests an increase of neuropil in malnourished animals. Moreover, in a long-term malnutrition produces differential effects on the several populations of cells and fibers into SCN. On the other hand, its possible the presence of adaptative compensatory mechanisms involucrated with the maintenance of the integrity of th retinorecipient zone. Thus, specific cellular alterations observed in this study may be involved with several disorders observed in the circadian rhythmicity of drinking behavior and that of the sleep-wake cycle in the malnourished organisms.

INTRODUCCIÓN

El consumo adecuado y balanceado de nutrientes es importante para la generación de energía y de los elementos necesarios que forman y mantienen la estructura celular, la cual a su vez genera los precursores de enzimas, de hormonas y de neurotransmisores peptídicos, entre otros. La organización estructural de estos elementos permiten el desarrollo del individuo y el funcionamiento de diversos sistemas metabólicos, que ayudan al organismo a interactuar y acoplarse con el medio.

Por otra parte, según la FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación), a mediados de la década pasada, cerca de 512 millones de personas, aproximadamente el 21% de la población de los países en desarrollo padecían desnutrición en diversos grados (i.e. alrededor del 11% de las personas desnutridas en el mundo se encuentra en América Latina y el Caribe). Se ha calculado que 20 millones de personas al año mueren por causas relacionadas con la desnutrición, de las cuales 14 millones son niños, quienes son los más susceptibles debido a que su cuerpo está en crecimiento, la evidencia física de la desnutrición es la reducción de la talla y del peso corporal (Organización de las Naciones Unidas, 1985).

La malnutrición es un término cualitativo, que comprende todas las formas de nutrición insuficiente o en exceso (consumo de una dieta no balanceada), mientras que la desnutrición es un término cuantitativo que incluye la reducción general en el consumo de calorías, proteínas, carbohidratos, lípidos, vitaminas o varios elementos traza. En muchos casos, estas deficiencias ocurren en combinación y se complican aún más porque se asocian a enfermedades y a diversos factores sociales y culturales (Morgane et al., 1993). El modelo de malnutrición en humanos es difícil de estudiar, debido a que las alteraciones provocadas no pueden ser directamente asociadas a este evento. Por esta razón, los efectos de la malnutrición hipoproteínica sobre el sistema nervioso central (SNC) en desarrollo, se estudian utilizando a la rata como modelo experimental, ya que esta especie al igual que el hombre son organismos altriciales, en los cuales el desarrollo y maduración de las diversas estructuras del SNC

inician desde la gestación y continúan durante la etapa postnatal. El desarrollo y maduración del SNC se realiza en diferentes periodos de la ontogenia, por lo tanto los efectos de la malnutrición sobre el SNC en desarrollo dependen de la duración, la severidad y el tipo de insulto en relación a los eventos del desarrollo en el SNC (Morgane et al., 1992).

Al mismo tiempo, y debido a que la rata es un organismo ampliamente utilizado en diversos temas de estudio, se conoce su fisiología básica. Por lo que ha sido empleada en estudios de malnutrición hipoproteínica, incluyendo aquellos relacionados con la conducta circádica y la homeostasis del ciclo sueño-vigilia y consumo de agua, entre otros. En estas funciones que permiten conocer la integridad funcional del organismo, el núcleo supraquiasmático (NSQ) desempeña un papel primordial como reloj biológico.

En el presente trabajo, se pretende conocer los posibles efectos que puede inducir la malnutrición hipoproteínica crónica durante el desarrollo pre- y postnatal, sobre la organización celular e inervación aferente en el NSQ de la rata macho adulta, analizadas por medio de técnicas inmunocitoquímicas y evaluadas a través de técnicas morfométricas.

ANTECEDENTES

Períodos críticos de desarrollo cerebral

Los procesos de desarrollo y maduración del SNC en los mamíferos altriciales, se realizan tanto en el periodo prenatal como en el postnatal. En estas etapas hay un periodo crítico en el que dichos procesos son susceptibles a ser alterados por agentes exógenos como la malnutrición (Dobbing, 1972; Smart, 1991). En el periodo crítico, ocurre una tasa máxima de maduración en diversos procesos del SNC (Fig. 1), como son la división celular (neurogénesis y gliogénesis), migración celular, diferenciación celular (crecimiento del árbol dendrítico, extensiones axónicas y formación de circuitos), mielinización, sinaptogénesis, síntesis y liberación de neurotransmisores, además de muerte celular selectiva ó apoptosis (Winick y Noble, 1966; Dyson y Jones, 1976; Morgane et al., 1992). Dichos eventos en el SNC se realizan en forma secuencial y son altamente regulados. Debido a que se efectúan en distintos momentos de la ontogenia en las diferentes estructuras cerebrales, hay una susceptibilidad temporal en relación a los factores endógenos y ambientales. Los efectos del insulto dependen de su duración y del periodo de desarrollo en el que se encuentre el SNC, por lo tanto, se afecta tanto a las estructuras que están en desarrollo en el momento en que ocurre la malnutrición así como a las que se desarrollan posteriormente (Morgane et al., 1993).

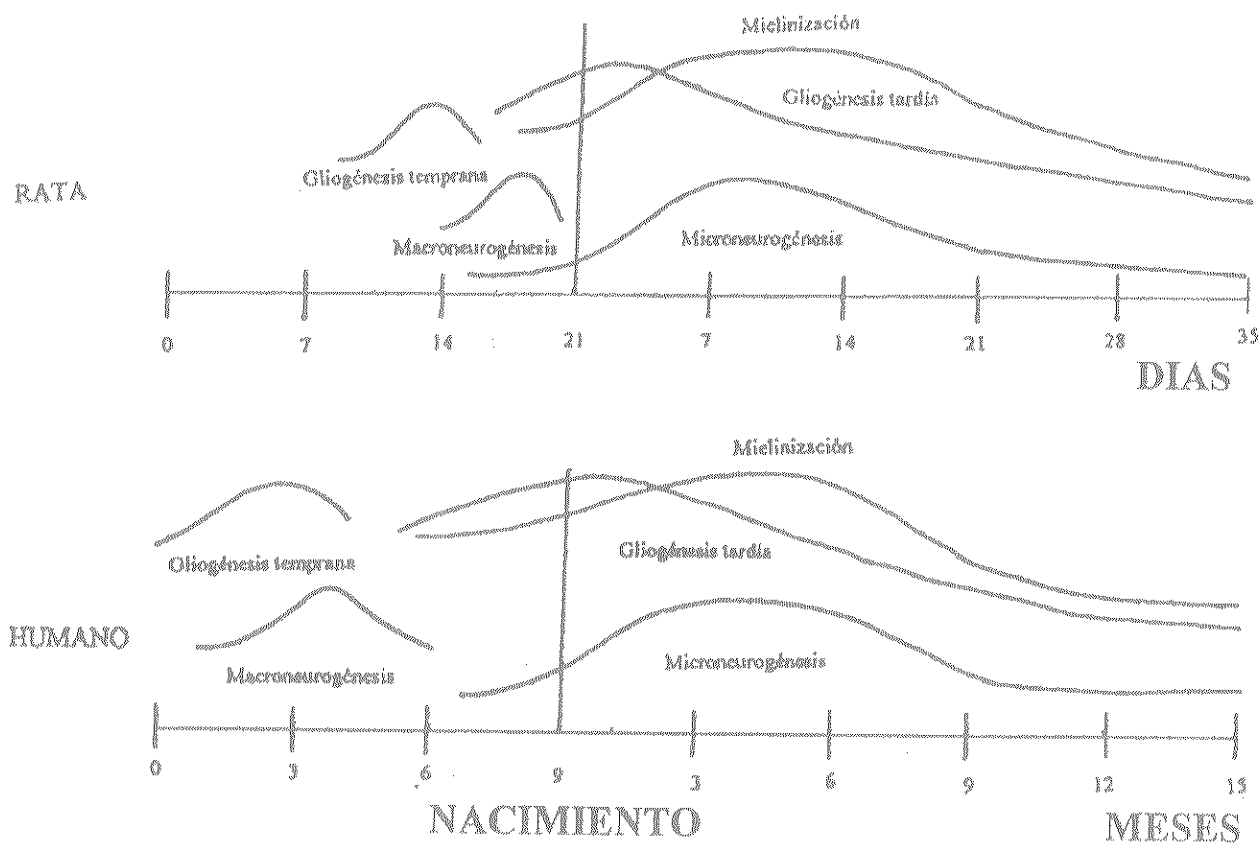


Fig. 1. Comparación entre las curvas de crecimiento celular y mielinización de los principales eventos que se realizan durante el desarrollo del cerebro de la rata y el hombre. El punto máximo de cada curva representa el periodo de máxima vulnerabilidad de cada evento. (Modificado de Morgane et al., 1993).

Malnutrición y desarrollo cerebral

La malnutrición, en cualquiera de las etapas vulnerables del SNC, es un evento cuya etiología es multifactorial y por lo tanto el estudio en el hombre es complejo. Esta puede producir trastornos que finalmente se reflejarán en la capacidad del organismo para adaptarse al medio. En los países subdesarrollados la malnutrición se presenta de manera frecuente durante los periodos pre y postnatal, mientras que en países desarrollados es común la malnutrición durante la etapa prenatal. El estado nutricional de la futura madre es un factor importante para considerar los efectos de la malnutrición durante la etapa prenatal (Rosso, 1990).

La malnutrición durante la etapa de la gestación, parece estar relacionada con disturbios genéticos, hipoxemia, agentes tóxicos como el alcohol y drogas (Fisher, 1988; Sastry, 1991), malnutrición de la madre así como diversos factores sociales y culturales (Morgane et al., 1993). La malnutrición prenatal provoca el tamaño reducido del feto y escasa diferenciación de la placenta (Altman et al., 1970; Morgane et al., 1993), esto provoca reducción en el flujo sanguíneo, con lo cual disminuye el transporte de oxígeno y nutrientes hacia el feto y puede ocasionar alteraciones permanentes en las estructuras del SNC que presentan un desarrollo temprano (Chase et al., 1971; Forbes et al., 1977; Morgane et al., 1993).

Durante el desarrollo heterocrónico celular del SNC, este tipo de malnutrición provoca alteraciones en la proliferación de los diversos linajes celulares, como es el alargamiento del ciclo celular y por consiguiente la reducción permanente de la densidad de células nerviosas así como la proporción de los diversos tipos celulares (Morgane et al., 1993).

Estudios anatómicos en el SNC en desarrollo, han mostrado que la malnutrición prenatal produce reducción del tamaño del soma, de las ramificaciones y espinas dendríticas sobre el desarrollo postnatal de las células granulares del giro dentado (Díaz-Cintra et al., 1991) y en las neuronas piramidales de los campos CA3 y CA1 de la formación hipocámpica (FH) (Díaz-Cintra 1994). Se ha reportado que la

malnutrición prenatal no produce cambio significativo sobre el volumen ocupado por el plexo de fibras musgosas de la FH a los 30 días de edad, mientras que a los 15, 90 y 220 días de edad es disminuído significativamente (Cintra et al., 1997a). Por otra parte, se conoce que las células piramidales del estrato molecular, del campo CA1 de la FH, presentan una disminución en la densidad de espinas dendríticas, mientras que en el estrato radiado hay un incremento en la densidad de espinas dendríticas a los 30 días de edad y un déficit a los 90 y 220 días de edad. Estos resultados sugiere un periodo de adaptación del cerebro a la malnutrición a los 30 días de edad (Cintra et al., 1997b).

La malnutrición postnatal induce disminución en la densidad celular de las células granulares del cerebelo, de las neuronas piramidales del campo CA3 y células granulares del giro dentado de la FH (Paula-Barbosa et al., 1989). Además, provoca disminución en la mielinización de las neuronas de la corteza visual (Warren y Bedi, 1982), en la proliferación dendrítica de la corteza cerebral (Salas et al., 1974) y en la densidad sináptica de las fibras musgosas de la FH (Andrade et al., 1991).

La malnutrición perinatal produce reducciones en las células de la FH; 1) en la densidad de las células granulares del giro dentado (Bedi 1991), y del tamaño del soma, así como del número de ramificaciones y espinas dendríticas (Cintra et al., 1990), y 2) en las células piramidales del campo CA3 del hipocampo (García-Ruiz et al., 1993). En las células piramidales de la corteza visual primaria se reduce la densidad de espinas dendríticas dependiendo del tiempo de la malnutrición (Díaz-Cintra et al., 1990). Además, se conoce que la malnutrición produce alteraciones en la concentración de aminas biogénicas (Stern et al., 1974, Morgane et al., 1978 y Chen et al., 1992), así como en la síntesis de neurotransmisores (Venero et al., 1992), especialmente en las células del rafe dorsal que sintetizan la serotonina, muestran alteraciones en sus patrones dendríticos (Díaz-Cintra et al., 1981).

La malnutrición reduce el sueño de ondas lentas y el sueño de movimientos oculares rápidos produciendo un incremento en la vigilia (Forbes et al., 1977). Por otra parte, produce alteraciones del ritmo circádico del ciclo sueño-vigilia: en la amplitud del ciclo, la acrofase, la duración, la frecuencia

y la organización de los ciclos de sueño (Cintra et al., 1988). También se ha reportado que la malnutrición induce alteraciones en la ritmicidad circádica de la conducta de ingesta de agua y se ha observado la partición de la actividad en dos bloques bajo un ciclo de luz-obscuridad 12:12 hrs (Rojas et al., 1992, 1993, Aguilar-Roblero et al., 1993a), así como el enmascaramiento en la respuesta al fotoperíodo (Salazar 1996). Estas manifestaciones funcionales podrían involucrar alteraciones en el sustrato anatómico que regula diversas conductas circádicas, ya que se conoce que el NSQ en animales malnutridos presenta alteraciones morfológicas (Cintra et al., 1994; Pérez, 1995).

Para revertir los efectos mencionados, se han diseñado experimentos de rehabilitación nutricional con una dieta adecuada (Dyson y Jones, 1976) así como estimulación ambiental apropiada (Morgane et al., 1993), ambas manipulaciones experimentales pueden restituir parcialmente la función, como el efecto de recuperación encontrado en la conducta exploratoria en la rata (Escobar y Salas, 1987).

Ritmos biológicos y el núcleo supraquiasmático

Las variaciones periódicas en los diversos parámetros fisiológicos son una propiedad general de la materia viva, desde los organismos unicelulares hasta los pluricelulares. Esta periodicidad desempeña un papel importante en la integración de los diversos procesos fisiológicos en los seres vivos (Brady, 1984). Si estas fluctuaciones se presentan a intervalos regulares se denominan ritmos biológicos (Bunning, 1973), y si su frecuencia se acerca a las 24 horas se les llama circadianos (circa: aproximadamente, días: día) (Halberg, 1969). Estos ritmos representan la organización temporal de los diversos procesos fisiológicos y conductuales para una adaptación óptima al medio (Meijer y Rietveld, 1989). Así, el fenómeno geofísico de la rotación de la Tierra provoca cambios ambientales evidentes, con lo cual algunos procesos fisiológicos como la actividad y el reposo o el consumo de agua y alimento oscilan con una frecuencia similar al ciclo ambiental luz-oscuridad (Minors y Waterhouse, 1981).

Los ritmos biológicos se ajustan a los periodos ambientales como el ciclo de luz-oscuridad y se manifiestan con una periodicidad cercana a las 24 horas en un fenómeno conocido como sincronización, en el cual el periodo endógeno y la fase del oscilador se ajustan al periodo y fase (hora de ocurrencia de un evento cíclico) del estímulo ambiental, lo que permite ajustar y adecuar el tiempo biológico con el geofísico para lograr una adaptación máxima del organismo (Granados et al., 1995). Por otra parte, cuando a un organismo se le mantiene bajo aislamiento de señales ambientales como el ciclo de luz-oscuridad, el ritmo biológico manifiesta su periodo endógeno, a este fenómeno se le conoce como oscilación espontánea, o "free running" (Meijer y Rietveld, 1989), y comprueba la naturaleza endógena de los ritmos circádicos (Halberg, 1969).

El sistema orgánico capaz de generar un orden temporal en las actividades del organismo, aún en ausencia de señales ambientales, y que permite la interacción adecuada del dominio temporal entre el organismo y el ambiente se denomina sistema circádico, formado por sus vías aferentes las cuales están involucradas con los procesos de sincronización (Moore y Lenn, 1972; Moore, 1983, Aguilar-

Roblero, 1993b, Morin, 1994), el reloj biológico que tiene la capacidad de oscilar con un periodo regular y transmitir dichas oscilaciones al organismo y además utiliza éstas como referencia temporal interna (Aguilar, 1993) y sus vías eferentes relacionadas con la transmisión de la ritmicidad al resto del organismo (Watts, 1991, Aguilar, 1993b).

El NSQ de los mamíferos, ha sido considerado como el principal reloj circádico, relacionado con la sincronización a los ciclos de luz ambiental y capaz de generar ritmos circadianos de diversos procesos fisiológicos y conductuales (Rusak y Zucker, 1979).

Las evidencias experimentales que sustentan esta afirmación son:

- a) La lesión bilateral del NSQ, ocasiona la supresión de diversos ritmos circádicos (Mosko y Moore, 1978, Rusak y Zucker, 1979).
- b) La estimulación química y eléctrica de las neuronas del NSQ causan cambios de fase en los ritmos en oscilación espontánea (Rusak y Gross, 1982).
- c) La persistencia del ritmo circádico tanto en la actividad eléctrica del NSQ después de la supresión quirúrgica de sus aferentes, en registros *in vivo* (Inouye y Kawamura, 1982) e *in vitro* (Green y Gillette, 1982; Newman y Hospod, 1986, Shibata et al., 1982). Así como el mantenimiento del ritmo en la secreción de vasopresina en explantes del núcleo (Earnest y Sladek, 1987).
- d) El trasplante de tejido fetal del NSQ es capaz de restaurar la ritmicidad en animales con ablación del NSQ (Drucker-Colín et al., 1984; Aguilar-Roblero et al., 1986; Lehman et al., 1987). El periodo de la ritmicidad restaurada depende del tejido transplantado (Ralph et al., 1990).

El sistema circádico se ha considerado como multioscilar, debido al fenómeno de "splitting" ó partición, que se presenta en el hámster cuando se expone a luz continua brillante, el cual consiste en la disociación en dos componentes rítmicos de periodo diferente durante la actividad locomotora, (Meijer y Rietveld, 1989). Además, la lesión unilateral del NSQ en sujetos expuestos a ciclos de luz continua, suprime uno de los elementos rítmicos en el fenómeno de partición (Pickard y Turek, 1982). Por otra parte, la lesión del NSQ no modifica el ritmo de temperatura corporal (Krieger et al., 1977), mientras que la restricción en la disponibilidad de alimento induce cambios de fase en diversos ritmos circádicos en ratas bajo un ciclo de luz-oscuridad (Krieger, 1974), y no se suprime por la lesión del NSQ, por lo que se propone tanto al núcleo ventromedial como al hipotálamo lateral como osciladores circádicos de estos eventos (Krieger et al., 1977).

La integración de la información entre los distintos osciladores del sistema circádico, para el funcionamiento óptimo del sistema, se realiza por medio del acoplamiento, que es la capacidad que tiene un oscilador circádico, con periodo y fase propia, para ajustar sus parámetros a los de otros osciladores con los que interactúa. Asimismo, es posible que la glándula pineal tenga la función de sincronizador interno del sistema circádico, ya que la administración de melatonina puede sincronizar ritmos circádicos en oscilación espontánea en ratas (Reedman et al., 1983) y en hámsters lesionados en el NSQ y transplantados con el NSQ fetal (Romero et al., 1993). Por otra parte, se conoce que la pinealectomía facilita la partición del bloque de actividad de la ritmicidad circádica locomotora en hámsters (Aguilar-Roblero y Vega-González, 1993c).

Localización del núcleo supraquiasmático

El NSQ se localiza en el hipotálamo anterior, es una estructura bilateral al tercer ventrículo que se encuentra sobre el quiasma óptico, en los roedores es de forma ovoíde (Lydic et al., 1982) (Fig. 2).

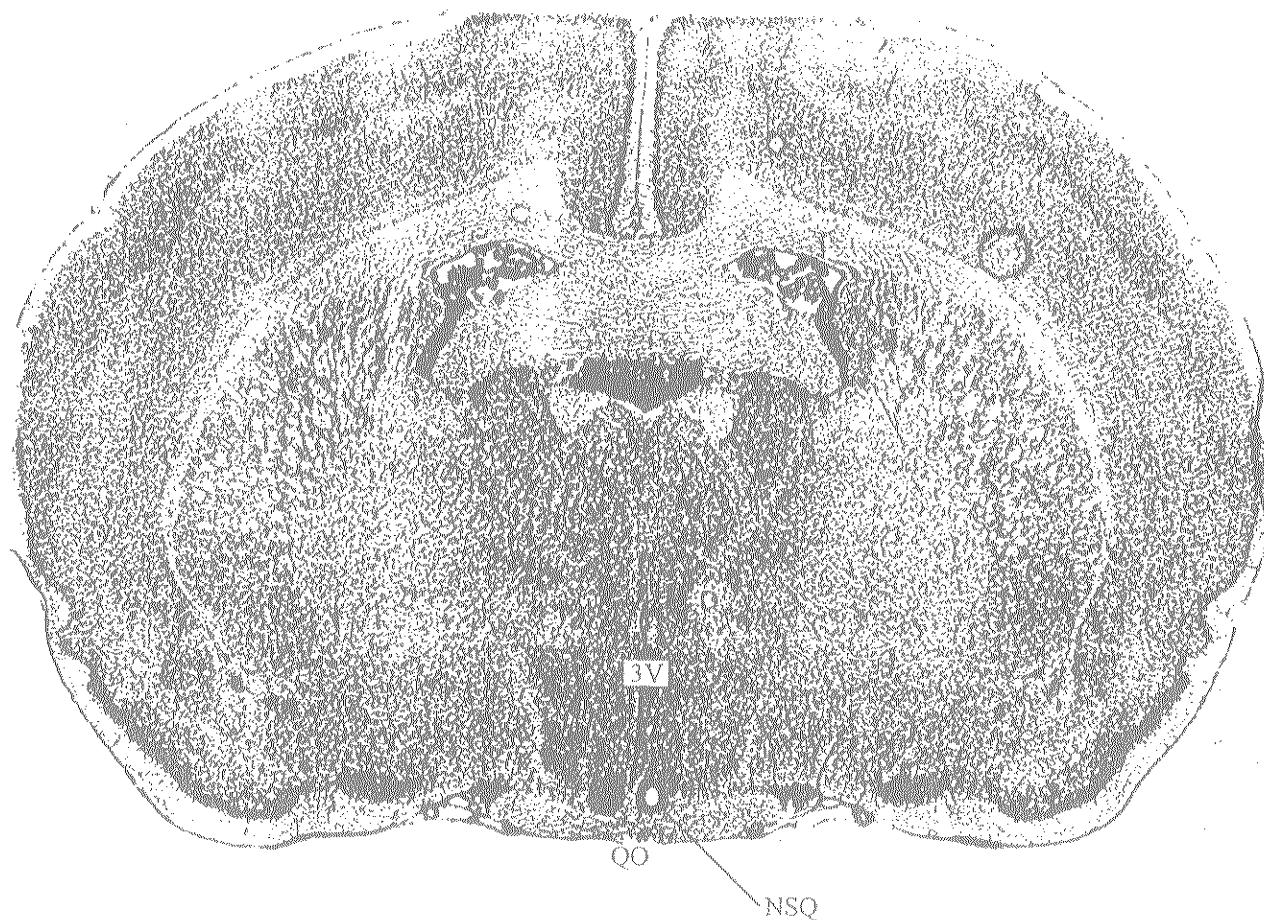


Fig. 2. Localización del núcleo supraquiasmático: 3V; tercer ventrículo, QO; quiasma óptico, NSQ; núcleo supraquiasmático.

Desarrollo del núcleo supraquiasmático

En la rata, el hipotálamo se origina del epitelio germinal del diencéfalo a partir del día embrionario 12 (E12) hasta el día E18. El NSQ se forma del neuroepitelio de la matriz germinal adyacente al surco ventromedial del tercer ventrículo, caudal al receso óptico, (Altman y Bayer, 1978a) sus neuronas se generan entre los días E14-E17, con un máximo durante el día E15 (Altman y Bayer, 1978b). El primordio del NSQ presenta una zona ventral que dará origen a una porción ventrolateral entre los días E15-E16 y una región dorsal que generará la parte dorsomedial del NSQ entre los días E16-E17. Mientras que para el día E18 termina la neurogénesis (Altman y Bayer 1978a). Por otra parte, no se ha establecido el periodo de generación de las células gliales, células inmunoreactivas a la proteína ácida glio-fibrilar (PAGF). Sin embargo, la formación de estas células en la matriz germinal probablemente continúa hasta el día E18 (Moore, 1991).

En el día E17, el NSQ es evidente ya que las neuronas pequeñas se empaquetan de manera estrecha. Entre los días E17 y postnatal 10 (P10), el NSQ se alarga de un modo gradual y su apariencia es similar a la del organismo adulto. Con base en la citoarquitectura, este núcleo se subdivide desde el día P6 en dos regiones: una ventrolateral y otra dorsomedial, y se refleja por el aumento en el tamaño de las neuronas así como el incremento relativo en el neuropilo, en especial en la porción ventral. La región ventrolateral a partir del día E19, se caracteriza por el contenido del péptido intestinal vasoactivo (PIV) en sus neuronas (Ishikawa y Frohman, 1987), mientras que las neuronas de la región dorsomedial presentan inmunoreactividad a la vasopresina (VP) desde el día P2. Así, la morfología definitiva del NSQ se define desde el día P10 (Moore, 1991).

El número de neuronas inmunoreactivas para ambos péptidos, así como el plexo axonal y los procesos dendríticos se incrementan gradualmente, tanto dentro del núcleo como en las áreas adyacentes, de esta forma se presenta el patrón similar al del sujeto adulto. Durante el día E18, el citoplasma de las neuronas inmaduras del NSQ es angosto y conserva estrecha relación con procesos de la glía radial, el pericarion contiene conos de crecimiento dendrítico, ambos, evidentes hasta el día

P4, cuando las neuronas parecen haber alcanzado un complemento total de las dendritas primarias. La muerte celular ocurre entre los días E20-P6 con un promedio del 5 % de la población neuronal y parece no haber una localización regional específica para este evento. El neuropilo del NSQ para los días E18 y E19, consiste de dendritas dispersas, numerosos conos de crecimiento dendrítico y haces dispersos de pequeños axones mielínicos. Mientras que para el día E20 se incrementan estos parámetros, indicando la formación de nuevas dendritas primarias y ramificaciones dendríticas hasta el día P10. A partir del día E21 son evidentes las espinas dendríticas. Durante el día E19 son escasas las sinapsis, las del tipo dendro-dendríticas son abundantes en la porción ventral del NSQ. El número de sinapsis alcanza un máximo durante los días P6-P10 (Moore, 1991).

En el día P2, los axones provenientes del quiasma óptico penetran en la parte ventral del NSQ. Durante los días P4-P10, las fibras provenientes de la retina hacen contacto sináptico con las dendritas de las neuronas del NSQ y las fibras de origen del cuerpo geniculado lateral que contienen el neuropéptido Y (NPY) también establecen sinapsis (Card y Moore, 1989).

El desarrollo del ritmo funcional de las neuronas del NSQ se inicia con la utilización de glucosa desde el día E19 (Reppert y Schwartz 1984), y en la tasa de disparo durante E22, el cual al parecer, se sincroniza por señales maternas (Shibata y Moore 1988). Esto probablemente refleja, que el desarrollo en el ritmo sea la expresión de la función circádica individual de las neuronas del NSQ, que se acoplan por mecanismos no sinápticos, debido a que en esta etapa del desarrollo la formación de contactos sinápticos en el NSQ es escasa (Shibata y Moore, 1987).

Así, entre los días E19-P10 se realiza un cambio a partir de osciladores neuronales acoplados por mecanismos no sinápticos, que son sincronizados por señales maternas y que se integran en una red neuronal funcional con inervación aferente, conexiones intrínsecas y proyecciones eferentes. Esta red acopla al oscilador circádico con los sistemas efectores que muestran ritmo, por lo que se sugiere que la ritmicidad se determina genéticamente. La expresión asincrónica en la función circadiana durante el

desarrollo postnatal temprano, probablemente refleje la maduración diferencial de los sistemas efectoros que muestran la ritmicidad (Moore, 1991) (Fig. 3).

EVENTOS DEL DESARROLLO DEL NÚCLEO SUPRAQUIASMÁTICO

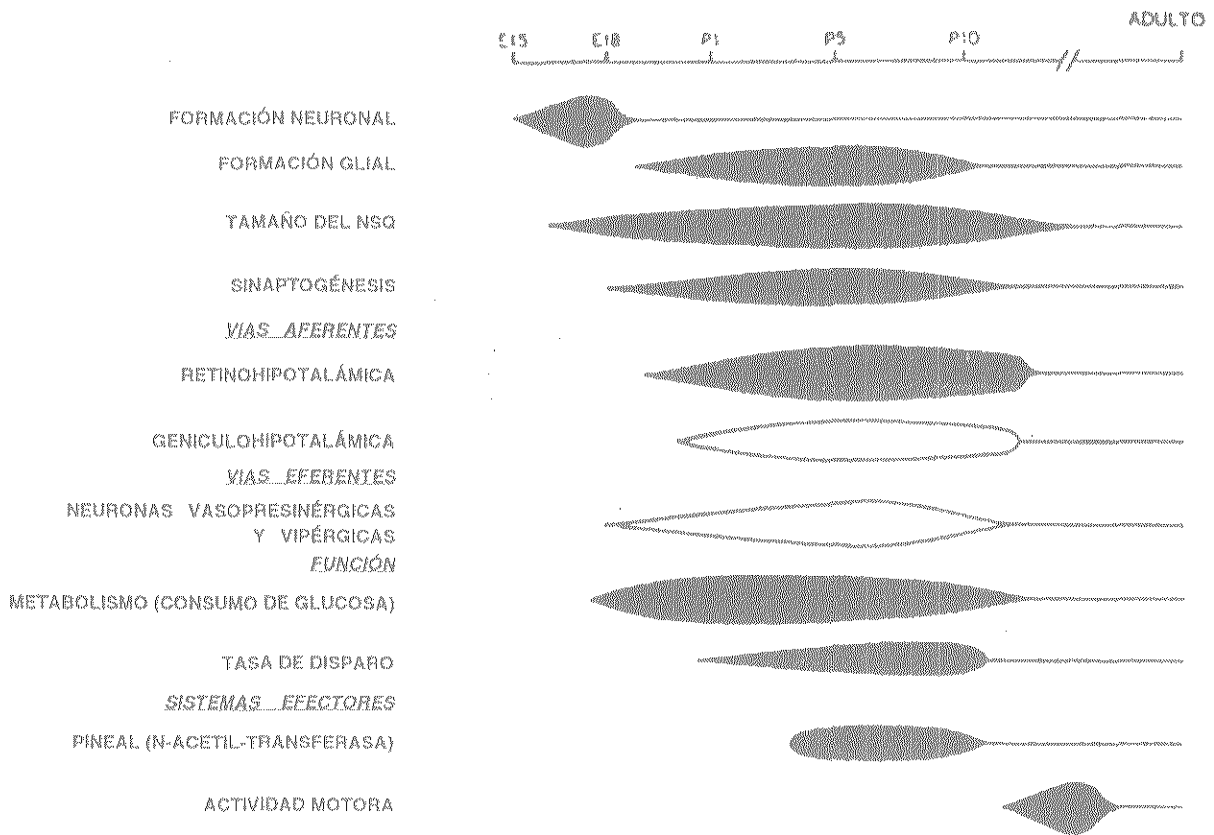


Fig. 3. Diversos eventos del desarrollo en el núcleo supraquiasmático (NSQ) de la rata, durante los periodos embrionarios (E) y postnatal (P). (Modificado de Moore, 1991).

Citoarquitectura del núcleo supraquiasmático

Diversos estudios realizados sobre la anatomía del NSQ, en la mayoría de los mamíferos, han mostrado que esta estructura puede ser dividida en dos regiones principales a causa de la distribución diferencial de sustancias neuroactivas que contienen las neuronas, así como a la inervación de las vías aferentes al NSQ, las cuales son prominentes en la porción ventrolateral.

Se ha calculado el volumen de cada NSQ en la rata macho adulta, el cual es de aproximadamente 0.068 mm^3 y el número de neuronas es alrededor de 8, 000. La mayoría de las células en la porción dorsomedial son bipolares y tienen un área aproximada de $83.5 \pm 4.1 \mu\text{m}^2$, mientras que en la región ventrolateral abundan las neuronas de tipo multipolar que presentan un área de alrededor de $102.5 \pm 5.3 \mu\text{m}^2$. El diámetro medio varía entre 7-10 μm . (van den Pol, 1980, 1991).

Las neuronas localizadas en la porción dorsomedial del NSQ, producen sustancias neuroactivas como la VP, la somatostatina, la angiotensina II, la hormona liberadora de la tirotrópina, la encefalina y la neurofisina; y las neuronas localizadas en la región ventrolateral producen el PIV, el péptido liberador de la gastrina y la bombesina. (van den Pol y Tsujimoto, 1985; van den Pol, 1991). Además el ácido gama amino butírico se localiza en todo el NSQ (van den Pol, 1991). Los axones de las vías aferentes al NSQ generan sustancias neuroactivas en alta densidad, como la serotonina (5HT), el NPY, el glutamato y el aspartato. Además, otras sustancias presentes en los axones pero en menor cantidad incluyen a la epinefrina, la sustancia P, la norepinefrina, la prolactina, la dopamina y la colecistoquinina (van den Pol y Tsujimoto, 1985).

Aferencias al núcleo supraquiasmático

En los mamíferos, el NSQ se considera el marcapaso circádico, por lo tanto, sus aferentes están relacionadas con los procesos de sincronización. Una vía visual bilateral directa al NSQ, asimétrica en la rata, está formada por axones amielínicos que provienen de las células ganglionares de la retina, los cuales se proyectan especialmente hacia la porción ventral del núcleo. Esta proyección visual se conoce

como el tracto retino-hipotalámico (RH), y es suficiente para mantener la sincronización aún en ausencia de otras proyecciones retinales (Klein y Moore, 1979).

No se ha determinado algún neurotransmisor para esta proyección visual, sin embargo, algunos estudios electrofisiológicos sugieren al ácido glutámico como neurotransmisor de esta vía por medio de los receptores NMDA (N-metil-D-aspartato) (Kim y Dudek, 1991; Colwell et al., 1991).

Una vía visual secundaria que se proyecta al NSQ, conocida como el tracto genículo-hipotalámico (GH), se origina en la hojuela intergeniculada, que es inervada por las células ganglionares de la retina. Las fibras del tracto GH contienen NPY (Mantyh y Kemp, 1983), que se proyectan de forma simétrica a cada NSQ y ocupan especialmente su porción ventromedial (Moore y Card, 1993). La ablación de la hojuela intergeniculada produce alteraciones del ángulo de fase durante la sincronización así como un retraso en la sincronización después de un cambio de fase, una vez que el ritmo recupera la fase estable (Johnson et al., 1989). Además, bloquea el alargamiento del periodo circadiano asociado con la exposición a la luz constante (Pickard 1985) y elimina el "splitting" (partición del bloque de actividad circádica con separación de 180°) originado en los ritmos de actividad locomotora durante la exposición prolongada a luz constante en el hámster (Harrington y Rusak 1988). La estimulación eléctrica de la hojuela intergeniculada (Johnson et al., 1989; Rusak et al., 1989) así como la inyección de NPY en el NSQ induce cambios de fase tanto en la ritmicidad de la actividad locomotora (Albers y Ferris 1984) como en la actividad eléctrica del NSQ (Medanic y Gillette, 1993).

Por otra parte, se ha reportado que las células ganglionares de la retina tienen fibras terminales en el rafe dorsal (Shen y Semba, 1994). Este núcleo contiene neuronas que sintetizan 5HT, las cuales inervan al NSQ de manera similar a la del tracto GH (Moore y Card 1993). La destrucción de las fibras inmunoreactivas a la 5HT provoca alteraciones del ángulo de fase durante la sincronización (Smale et al., 1990).

Se ha considerado la participación del sistema endocrino en el proceso de la transmisión de la señal oscilatoria al resto del organismo. Así, la producción de la hormona de la glándula pineal, la melatonina, se regula por el NSQ (Klein y Moore, 1979); y éste presenta además, un gran número de receptores para esta hormona (Weaver et al., 1989), lo cual sugiere que podría tener un papel en la función del NSQ (Moore y Card 1993); ya que se conoce que la melatonina es capaz de producir sincronización (Cassone 1986) y de mantener el acoplamiento entre osciladores (Yanovski et al., 1990).

Eferencias del núcleo supraquiasmático

Las proyecciones eferentes del NSQ se dividen en seis componentes anatómicos cuyos blancos se localizan tanto en el hipotálamo como fuera de éste (Watts, 1991).

Proyecciones intrahipotalámicas:

1) Un haz de fibras rostrales se proyectan hacia el área preóptica, especialmente hacia la parte ventral del área preóptica medial, al núcleo periventricular anteroventral y al núcleo preóptico anterodorsal.

2) La más densa de las proyecciones se localiza en el área del hipotálamo anterior, desde la parte dorsal del NSQ, en dirección caudal, hasta la región ventral en relación al núcleo paraventricular del hipotálamo. Esta región se conoce como la zona subparaventricular. Las fibras continúan caudalmente hacia la región de células dispersas, medial a los núcleos ventromedial y dorsomedial y el último relevo hacia el área hipotalámica posterior y al extremo rostral de la sustancia gris periacueductal.

3) Fibras que se proyectan caudalmente a través del área retroquiasmática para terminar en la región de células dispersas entre los núcleos arcuato y ventromedial.

Proyecciones extrahipotalámicas:

1) Existe una proyección dorsal directa a los núcleos principal e intrafascicular de los núcleos basales de la estría terminal, a el núcleo paraventricular del tálamo y núcleo paratenial.

2) Un haz de fibras al núcleo septal lateral intermedio.

3) Una pequeña proyección lateral sobre el tracto óptico y hacia la hojuela intergeniculada del núcleo geniculado lateral.

Planteamiento del problema

Como se mencionó previamente, la malnutrición es un problema de salud que se presenta a nivel mundial, los niños son los más afectados debido a que están en crecimiento, sin embargo, el modelo de malnutrición en el hombre es difícil de estudiar a causa de que éste se asocia con enfermedades y diversos factores sociales y culturales. Por lo tanto, las alteraciones sobre el SNC en desarrollo observadas en el hombre, no se pueden atribuir en su totalidad a la malnutrición. Por consiguiente, la rata constituye un modelo experimental idóneo ya que es un organismo altricial, que al igual que en el hombre, se conoce una parte de su fisiología general. Debido a que el NSQ se ha considerado como el reloj biológico y se conoce que la arquitectura del ritmo circádico de consumo de agua en ratas malnutridas está alterado, en este trabajo nos enfocamos a estudiar la morfología del NSQ de la rata macho adulta, sometida a malnutrición hipoproteínica pre- y postnatal.

HIPÓTESIS

Diversos estudios han mostrado que el NSQ del hipotálamo, es una estructura que funciona como marcapaso circádico de diversos procesos fisiológicos y conductuales como la función circádica del ciclo sueño-vigilia y la conducta de consumo de agua, los cuales son afectados por la malnutrición, por lo tanto, es probable que la citoarquitectura del NSQ este alterada cuando la malnutrición hipoproteínica se instala de un modo crónico.

OBJETIVOS

Objetivo General

Valorar los efectos de la malnutrición hipoproteínica crónica sobre la morfología del NSQ de la rata macho adulta a nivel de microscopía óptica.

Objetivos específicos

Determinar en secciones mediales del NSQ de ratas macho adultas, normales y malnutridas:

a) La distribución de las fibras de los tractos RH, GH y serotoninérgico, así como las células inmunoreactivas al PIV, la VP y la PAGF.

Cuantificar:

b) Las áreas celulares tanto de mayor densidad (zona densa ó compacta), menor densidad (zona dispersa ó difusa), así como el área ocupada por el NSQ (zonas compacta más dispersa), en las detecciones inmunocitoquímicas para el PIV, la VP y la PAGF.

c) El número de células inmunoreactivas al PIV, la VP y la PAGF tanto en las zonas densa y dispersa como en el área ocupada por el NSQ.

d) El área de mayor densidad de fibras inmunoreactivas al NPY y a la SHT, tanto en las zonas densa y dispersa, así como en el área ocupada por el NSQ, y determinar el número de estas fibras en las tres regiones mencionadas.

MATERIAL Y MÉTODOS

Animales y tratamiento nutricional

Se utilizaron ratas de la cepa Sprague-Dawley: 12 hembras primíparas (250-300 g) y 4 machos (300-350 g). Los animales fueron mantenidos en un cuarto sonoamortiguado, con una temperatura de $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ y un ciclo de luz-oscuridad de 12:12 horas (luces encendidas desde las 8:00 am). Se asignaron al azar ratas de ambos sexos, que fueron alimentadas con dietas isocalóricas (Harland-Tekland, Madison, WI). Al grupo control (6 hembras y 2 machos) se le alimentó con dieta cuyo contenido de caseína fue del 25%, al grupo experimental (6 hembras y 2 machos) se le alimentó con dieta del 6% de caseína. Tres ratas hembras se colocaron en cada caja de policarbonato, mientras que los machos se mantuvieron de manera individual. Las dietas fueron suministradas a las ratas hembras primíparas desde 5 semanas antes del apareamiento, durante la gestación y la lactancia, mientras que a los machos se les proporcionó la dieta correspondiente desde una semana antes y durante el apareamiento.

Para el apareamiento, una rata macho alimentada con el mismo tipo de dieta que las ratas hembras, se introdujo por cada caja que contenía a las hembras. Se realizaron frotis vaginales cada mañana para determinar cuando ocurrió el apareamiento.

Una semana antes del parto, las hembras preñadas fueron separadas y colocadas individualmente en cajas de policarbonato con viruta esterilizada para la elaboración del nido.

El día del nacimiento, todas las crías fueron redistribuidas por un procedimiento al azar, a madres de la misma condición nutricional que las crías, de tal forma que cada camada se ajustó con ocho crías (cuatro hembras y cuatro machos).

El día del destete (21 días de edad) y los días siguientes, las crías se mantuvieron con la misma dieta que sus madres. Los animales tuvieron libre acceso al agua y alimento.

Procedimiento histológico

Se utilizaron un total de 24 ratas macho entre los 9-11 meses de edad; 12 controles (25% de caseína) y 12 malnutridas (6% de caseína).

Para visualizar el tracto RH en el NSQ, se anestesiaron con pentobarbital sódico (40 mg/kg), seis ratas control y seis malnutridas. Cada organismo recibió una inyección de 5 μ l (12:00-12:30 hrs) de toxina del cólera conjugada con peroxidasa de rábano (CT-HRP, cholera toxin β -subunit, List Biological) al 1%, disuelta en una solución de dimetil-sulfóxido al 2% en solución salina fisiológica, dentro de la cámara posterior del ojo, por medio de una microjeringa Hamilton. El periodo de sobrevivencia de los organismos fue de 48 horas y posteriormente se anestesiaron con pentobarbital sódico (40 mg/kg) y se perfundieron por vía intracardiaca (entre las 12:00-13:00 horas) con solución salina seguida por una solución fijadora de paraformaldehído al 4%, 15% de solución de ácido pícrico saturado y 2.5 % de glutaraldehído en buffer de fosfatos salino al 0.1 M con pH de 7.4. Al término de la perfusión, se removieron los cerebros y se postfijaron en el mismo fijador. Posteriormente, los cerebros fueron crioprotegidos en soluciones graduales de sacarosa al 10, 20 y 30%. Cada cerebro fue seccionado a 40 μ m de grosor en el plano coronal por medio de un criostato, y cada cuatro secciones mediales del NSQ fueron procesadas para ésta técnica. El producto de reacción de la peroxidasa fue visualizado con tetrametilbenzidina. Estas secciones de tejido se deshidrataron con soluciones graduales de acetona y se montaron en laminillas con resina sintética. Las otras secciones de tejido que se colectaron, se procesaron para las detecciones inmunohistoquímicas del PIV y la VP como se describe:

Al cumplir la edad establecida, 6 ratas malnutridas con sus respectivos controles fueron anestesiadas con pentobarbital sódico (40 mg/kg) y perfundidas por vía intracardiaca (entre las 12:00-13:00 horas)

con solución salina a la que siguió una solución fijadora que contenía paraformaldehído al 4% y 15 % de ácido pícrico saturado, en buffer de fosfatos al 0.1 M, el pH de esta solución fue ajustado a 7.4. Al término de la perfusión, los cerebros fueron removidos y se postfijaron en el mismo fijador. Posteriormente, los cerebros fueron crioprotegidos en soluciones graduales de sacarosa al 10, 20 y 30%. Al concluir este procedimiento, cada cerebro se seccionó a 40 μ m de grosor en el plano coronal por medio de un criostato, las secciones mediales del NSQ se colocaron en buffer de fosfatos (0.1 M, pH 7.6) y se formaron 4 grupos por cada NSQ para inmunohistoquímica. Cada grupo de muestras (incluyendo las secciones colectadas en el procedimiento anterior) fueron incubadas con diluciones de 1:1000 de los siguientes anticuerpos primarios: PIV, VP, PAGF, 5HT y NPY (Incstar), en buffer de fosfatos salino con suero de cabra al 1% y Triton-X-100 al 0.5%.

Después de la incubación con el anticuerpo primario, las secciones de tejido se procesaron de acuerdo con el método de avidina-biotina (antiperoxidase rabbit IgG, Vectastain) y se revelaron con diaminobenzidina. Las secciones de tejido fueron deshidratadas en soluciones graduales de alcohol, aclaradas con xilol y montadas con resina sintética.

Todo el procedimiento histológico e inmunohistoquímico se realizó siempre a la par, tanto con un sujeto control como con un malnutrido. De cada sujeto, se seleccionó una laminilla de la sección medial del NSQ y se codificaron con números al azar para que las mediciones fueran realizadas a ciegas y evitar sesgos en la interpretación de resultados.

Distribución de las fibras de los tractos RH, serotoninérgico y GH, y células inmunoreactivas al PIV, la VP y la PAGF en el NSQ.

De cada animal, se evaluó una sección medial del NSQ. Se observaron las laminillas y se realizó una comparación visual de la distribución tanto de las fibras de los tractos RH, GH y serotoninérgico

así como de las células que contienen el PIV, la VP y la PAGF en el NSQ. La descripción se realizó de manera unilateral, excepto, en el tracto RH el cual se consideró como estructura bilateral.

Análisis morfométrico

De cada animal, se evaluó el NSQ unilateral en una sección medial, por medio de un sistema de análisis digital de imágenes, con el programa Histo 2000 de Biocom, los parámetros analizados fueron los siguientes:

A) El área celular ocupada por las células inmunoreactivas al PIV, la VP y la PAGF (zona compacta) y el área ocupada por las fibras que contienen el PIV y la VP ó donde la densidad de las células inmunoreactivas al PIV, la VP y la PAGF fue menor (zona dispersa).

B) El área ocupada por el NSQ en las detecciones inmunohistoquímicas para el PIV, la VP, la PAGF, la 5HT y el NPY. Ambos procedimientos se realizaron a un aumento de 200X.

C) A mayor aumento (400X), se determinó el número de células inmunoreactivas al PIV, la VP y la PAGF en las zonas compacta y dispersa, así como en el área que ocupa el NSQ.

D) Se determinaron a un aumento de 200X, las áreas ocupadas por las fibras inmunoreactivas a la 5HT y al NPY. Se consideró el área densa de fibras (zona compacta) y el área de fibras dispersas (zona dispersa), así como el área que contiene al NSQ.

Para determinar la densidad de fibras inmunoreactivas a la 5HT y al NPY, se procedió a generar por medio de una computadora una serie de curvas semicirculares (sinusoides) paralelas, para que funcionaran como retícula. Este patrón no está influenciado por la organización isotrópica de los axones (van den Pol y Tsujimoto, 1985). Cada intersección de una fibra con la curva fue contada como la

presencia de una fibra. Este procedimiento se realizó a través de la cámara lucida a un aumento de 600X. Con este método se evaluaron las tres regiones antes mencionadas.

Análisis estadístico

Los resultados obtenidos se representan como la media \pm E.E., y se compararon estadísticamente a través de la prueba de análisis de varianza de una vía y con la prueba de "t" para grupos independientes. El nivel de significancia fue ajustado con $p < 0.05$.

RESULTADOS

I.- OBSERVACIONES CUALITATIVAS

A) Distribución de las fibras del tracto RH, en secciones mediales del NSQ de la rata macho adulta.

La figura 4, muestra secciones del NSQ de la rata macho adulta, en la que se pueden observar la distribución de las fibras del tracto RH en el NSQ. Entre ambos grupos experimentales, control y malnutrido, no se encontraron diferencias aparentes en la distribución de las fibras del tracto RH, que se caracteriza por su distribución asimétrica, el tracto es más robusto en el núcleo contralateral, en relación al sitio de la inyección de la toxina del cólera conjugada con peroxidasa de rábano, en el cual aproximadamente dos tercios del núcleo son ocupados por las fibras provenientes de la retina. Cuando se considera una distribución anatómica desde la región ventral hacia la porción dorsal, mientras que en el tercio restante (porción dorsal) la inervación es escasa. En el núcleo ipsilateral la inervación es menos densa y ocupa aproximadamente el 40% del NSQ, en donde también la porción dorsal presenta una inervación escasa.

B) Distribución de las fibras del tracto serotoninérgico y GH, en secciones mediales del NSQ de la rata macho adulta.

En la figura 5A, se observa tanto la distribución de las fibras del tracto serotoninérgico, que tienen su origen en el rafe, así como las fibras inmunoreactivas al NPY, que provienen de la hojuela intergeniculada, (Fig. 5B), en secciones mediales del NSQ de la rata macho adulta. Tanto en el grupo control como en el malnutrido, la distribución de ambos tractos en el NSQ aparentemente fue similar, estos se proyectan al parecer, de manera simétrica sobre cada núcleo. Aproximadamente tres cuartos del NSQ son inervados densamente por estas fibras, especialmente desde la parte ventral hacia la

medial, a la que llamamos zona densa, mientras que la porción dorsal ó zona difusa, presenta inervación escasa.

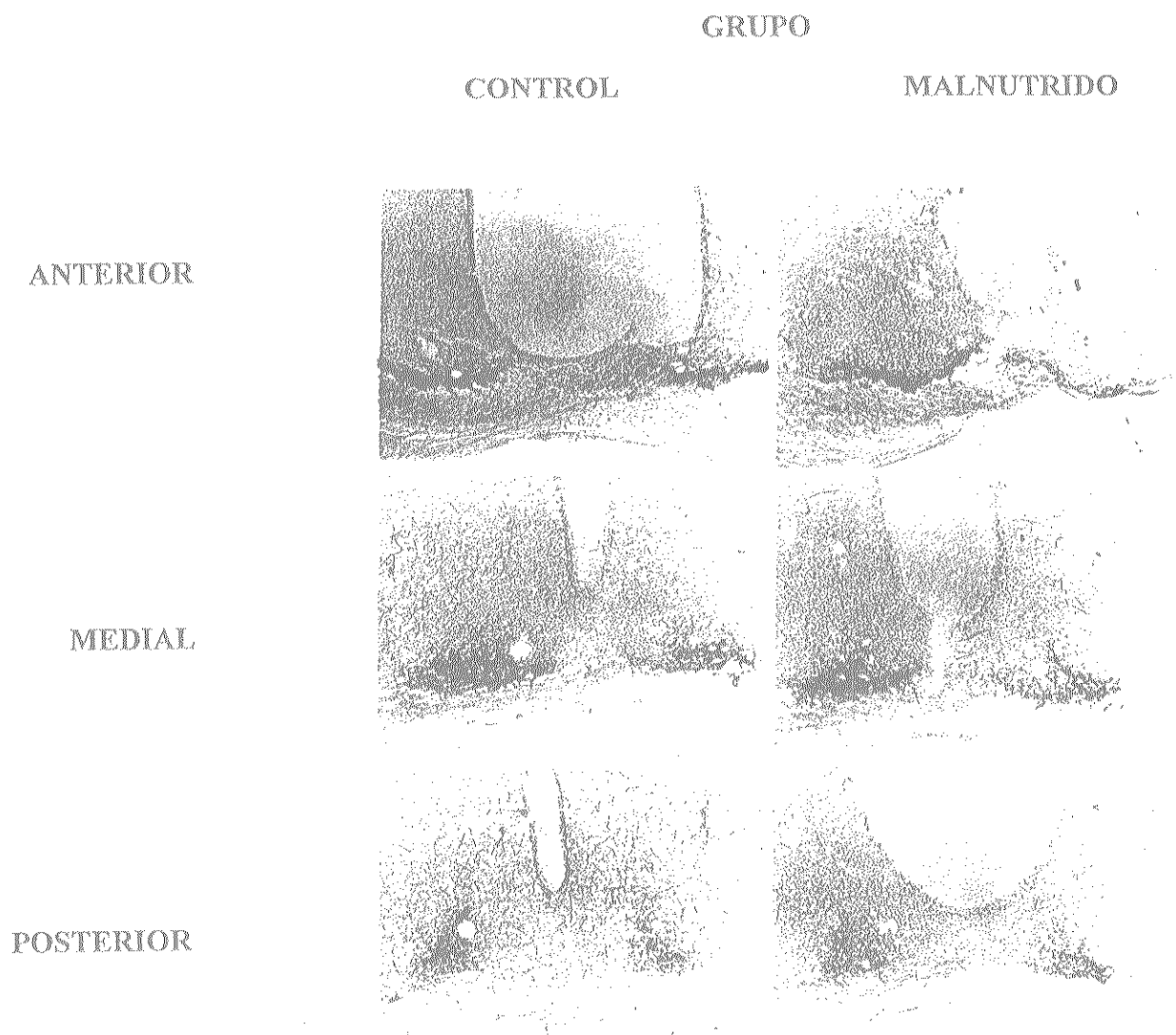


Fig 4. Distribución de las fibras del tracto retinohipotalámico en el núcleo supraquiasmático de la rata macho adulta, definido por la inyección de toxina del cólera conjugada con peroxidasa de rábano dentro de la cámara posterior del ojo. No se observaron diferencias evidentes en su distribución entre ambos grupos. 63X.

GRUPO

CONTROL

MALNUTRIDO

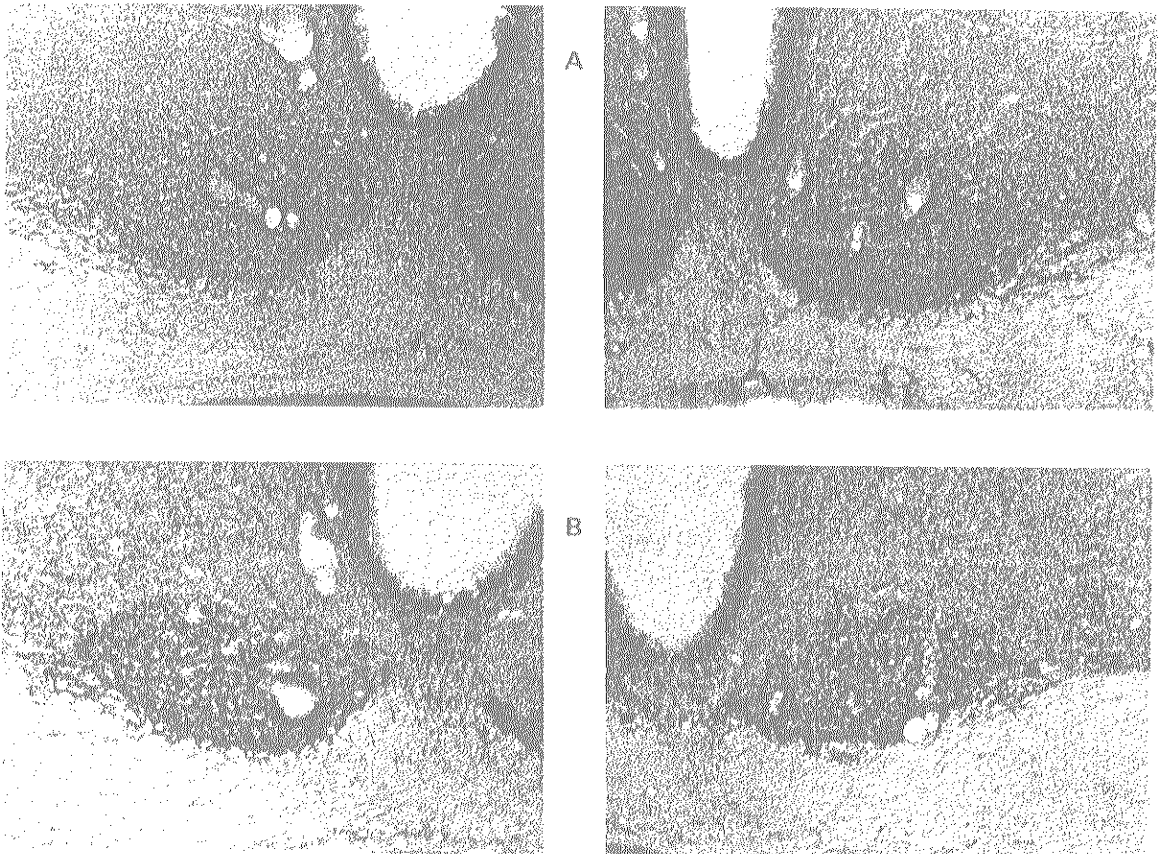


Fig 5. Cortes coronales de la región medial del núcleo supraquiasmático de la rata macho adulta, con fibras terminales inmunoreactivas a la serotonina (A) y al neuropéptido Y (B). Entre ambos grupos experimentales no se observaron diferencias aparentes en su distribución. 125X.

C) Distribución de las células inmunoreactivas al PIV, a la VP y a la PAGF, en secciones mediales del NSQ de la rata macho adulta.

Las células inmunoreactivas al PIV se localizaron especialmente en la porción ventral ó zona densa del NSQ, para este tipo celular, mientras que en la porción dorsal ó zona difusa estas células son escasas, y aparentemente no hay diferencia en su distribución entre los grupos control y malnutrido, como se aprecia en la figura 6A. Estas células presentan una disposición que se traslapa con los fibras de los tractos RH, GH y serotoninérgico, por lo tanto, reciben información fótica directa a través del tracto RH e indirecta por medio de las fibras provenientes de la hojuela intergeniculada y del rafe. Estas células ocupan aproximadamente el 50 % del área del NSQ.

La distribución de las células inmunoreactivas a la VP, entre los grupos control y malnutrido, parece ser similar, como se muestra en la figura 6B. Las células se localizan en la porción dorsomedial del NSQ ó zona densa, y ocupan aproximadamente el 50% de éste, mientras que hacia la porción ventral son escasas (zona difusa). Por lo tanto, la inervación visual directa por el tracto RH e indirecta por el aporte de las fibras de los tractos GH y del rafe en el NSQ, es escasa en la región ocupada por las células inmunoreactivas a la VP.

En la figura 6C, se observa la distribución de los astrocitos (células inmunoreactivas a la PAGF), en secciones mediales del NSQ de la rata macho adulta, entre los grupos control y malnutrido la cual aparentemente fue similar. Estas células ocupan un área aproximada del 60% del NSQ, desde su porción ventral hacia la medial (zona compacta), mientras que en la porción dorsal la población celular disminuye (zona dispersa).

GRUPO

CONTROL

MALNUTRIDO

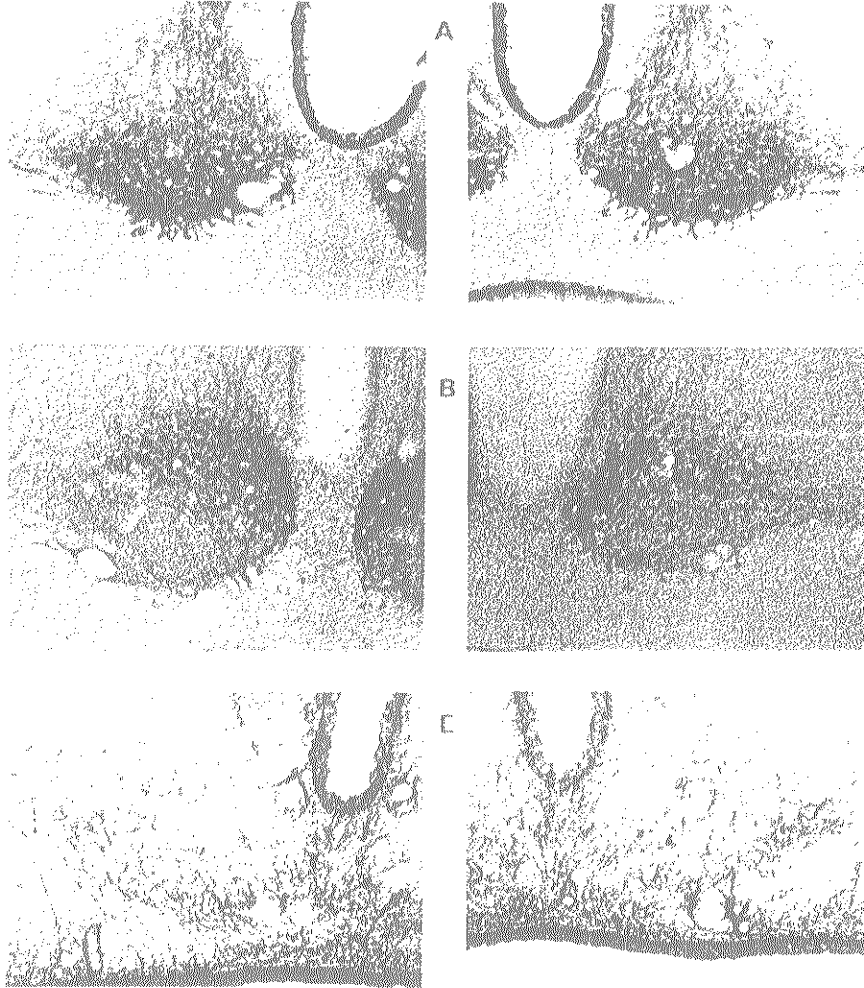


Fig 6. Distribución de las células inmunoreactivas al péptido intestinal vasoactivo (A), a la vasopresina (B) y a la proteína ácida gliofibrilar (C), en secciones mediales del núcleo supraquiasmático de la rata macho adulta. No se observaron diferencias aparentes en su localización entre ambos grupos. 125X.

II.- ANÁLISIS MORFOMÉTRICO

A) Tracto serotoninérgico, en secciones mediales del NSQ de la rata macho adulta.

En la tabla 1 y gráfica 1, se muestra que la malnutrición hipoproteínica crónica produce un escaso aumento del 0.4%, sin diferencia estadística, en el área ocupada por el NSQ. Mientras que la densidad de fibras inmunoreactivas a la 5HT en esta área, se reduce significativamente en un 8.4 % (tabla 1, gráfica 2).

En los sujetos malnutridos, el área de la zona densa fue 2.6% mayor y la densidad de fibras inmunoreactivas a la 5HT fue menor en un 6.4%, sin diferencia significativa en ambos casos (tabla 1, gráficas 1 y 2). Además, la malnutrición produce una disminución tanto en el área de la zona difusa (4.6%), sin diferencia significativa (tabla 1, gráfica 1), como en el número de fibras inmunoreactivas a la 5HT en esta zona (27.9%), con diferencia significativa (tabla 1, gráfica 2).

B) Tracto GH, con fibras inmunoreactivas al NPY, en secciones mediales del NSQ de la rata macho adulta.

En la tabla 1 y gráfica 1, se puede observar que la malnutrición hipoproteínica crónica no produce efectos estadísticamente significativos sobre el área ocupada por el NSQ, ni en la densidad de fibras inmunoreactivas a el NPY en esta región (tabla 1, gráfica 2), sin embargo, en los sujetos malnutridos hay una ligera tendencia a la reducción en ambos parámetros del 0.6 % y 0.1%, respectivamente.

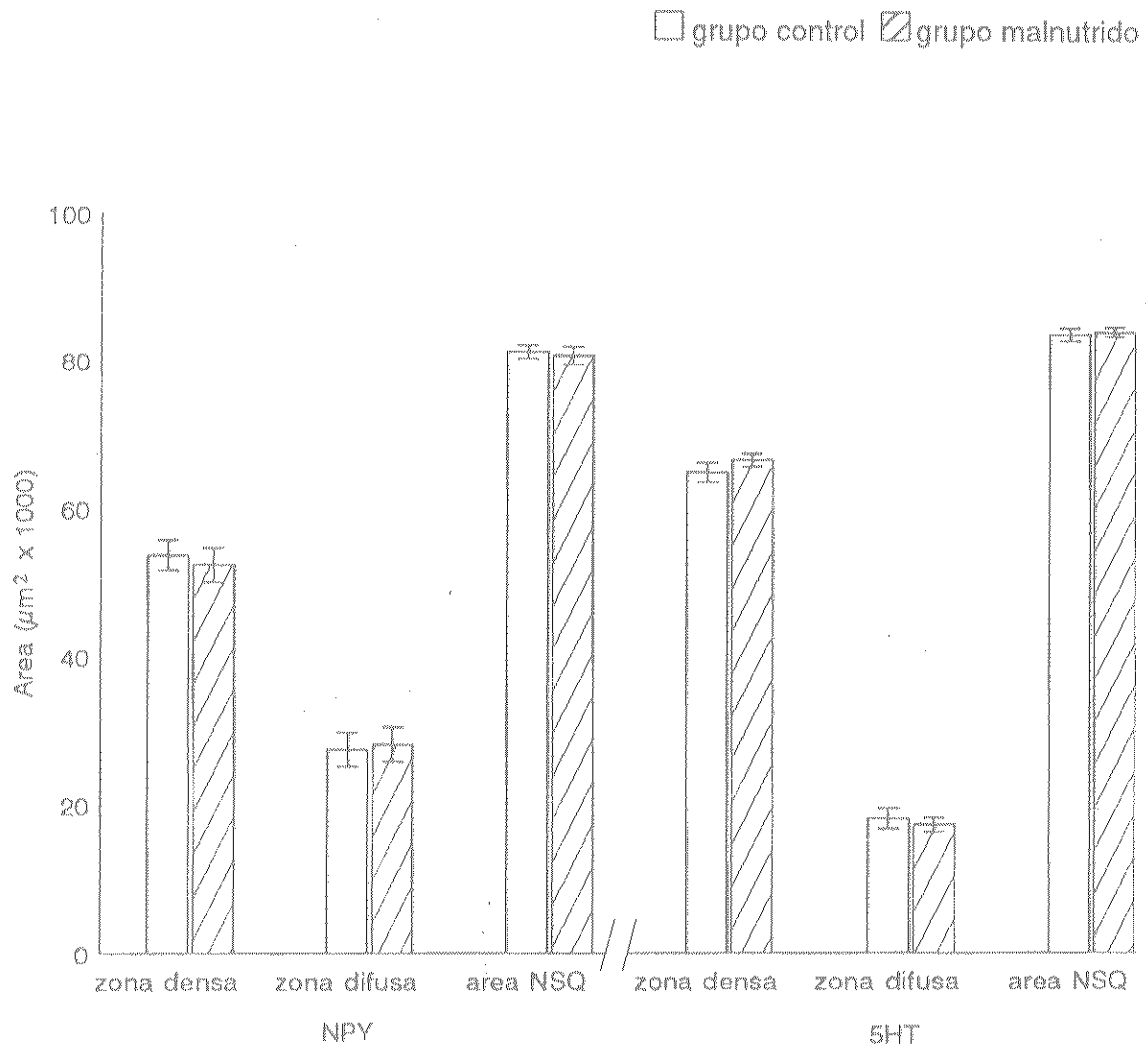
Por otra parte, se observó en los animales malnutridos, tendencias tanto a la reducción en el área de la zona densa del 2.5 % (tabla 1, gráfica 1), así como un aumento del 4.3% en el número de fibras inmunoreactivas al NPY en esta región, aunque sin diferencias significativas (Tabla 1, gráfica 2). En

TABLA 1

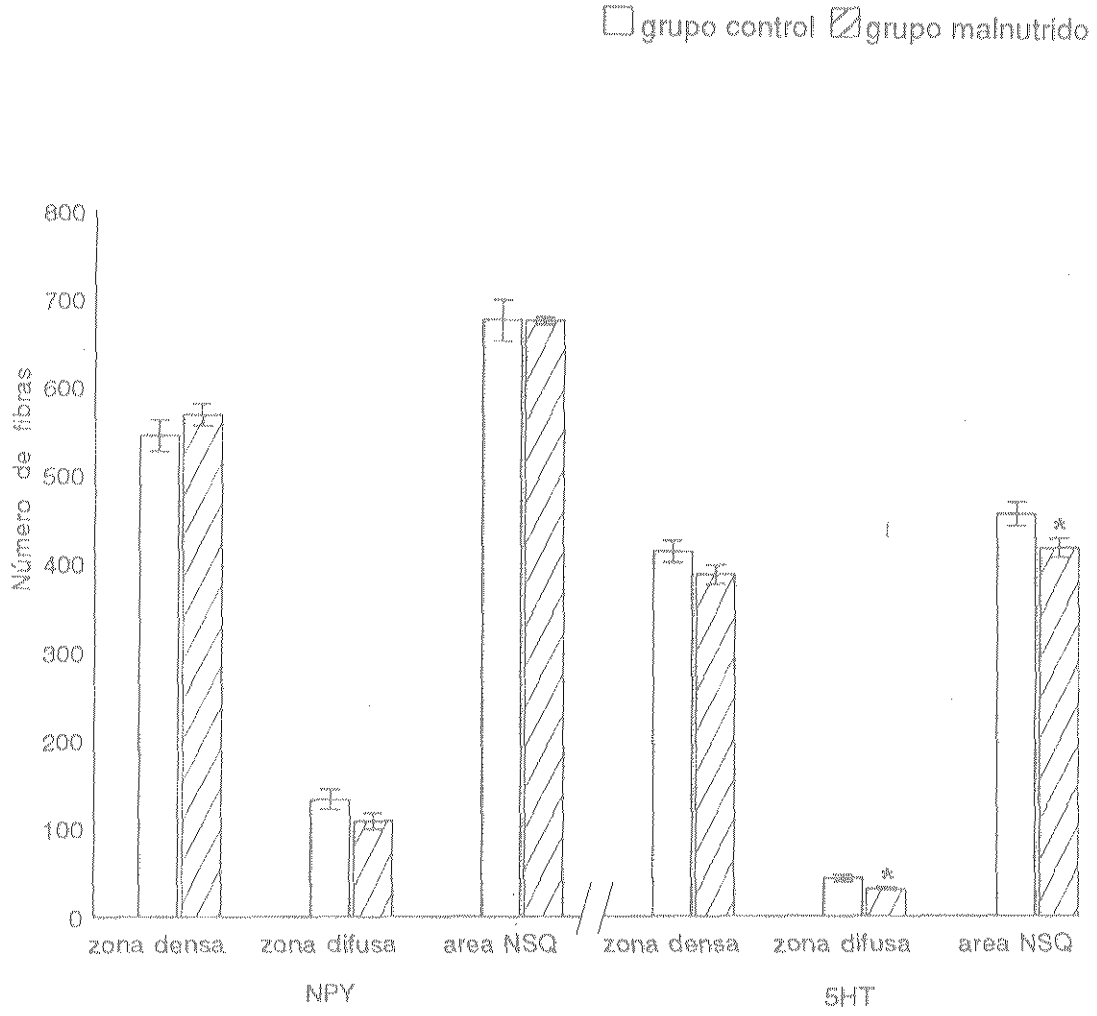
Efectos de la malnutrición hipoproteínica crónica sobre las zonas de distribución y número de fibras inmunoreactivas a la serotonina (5HT) y al neuropéptido Y (NPY), en el núcleo supraquiasmático (NSQ) de la rata macho adulta, en secciones mediales.

Grupos	Area ($\mu\text{m}^2 \times 1000$) de las regiones			Número de fibras en las áreas de las regiones		
	NSQ	Densa	Difusa	NSQ	Densa	Difusa
Control	83.2 \pm 0.9	64.7 \pm 1.3	18.0 \pm 1.4	454.8 \pm 13.3	412.5 \pm 12.4	42.3 \pm 3.9
5HT						
Malnutrido	83.5 \pm 0.6	66.3 \pm 0.8	17.2 \pm 0.9	416.7 \pm 10.8*	386.2 \pm 10.6	30.5 \pm 1.6*
% de cambio	+ 0.4	+ 2.6	- 4.6	- 8.4	- 6.4	- 27.9
Control	81.0 \pm 0.9	53.7 \pm 2.0	27.3 \pm 2.3	675.3 \pm 23.7	544.0 \pm 17.7	131.3 \pm 11.1
NPY						
Malnutrido	80.5 \pm 1.2	52.3 \pm 2.3	28.0 \pm 2.3	674.3 \pm 4.3	567.2 \pm 12.4	107.2 \pm 8.9
% de cambio	- 0.6	- 2.5	+ 2.4	- 0.1	+ 4.3	- 18.3

*Diferencia significativa con $p < 0.05$.



Gráfica 1. Efectos de la malnutrición hipoproteínica crónica sobre el área ocupada por el núcleo supraquiasmático (NSQ) así como en las zonas densa y difusa, con inmunoreactividad al neuropéptido Y (NPY) y a la serotonina (5HT), en secciones mediales del NSQ de la rata macho adulta.



Gráfica 2. Efectos de la malnutrición hipoproteínica crónica sobre el número de fibras inmunoreactivas al neuropéptido Y (NPY) y a la serotonina (5HT), en las áreas de las zonas densa y difusa, así como en el área ocupada por el núcleo supraquiasmático (NSQ), en secciones mediales del NSQ de la rata macho adulta.

relación al área de la zona difusa en los sujetos malnutridos, hubo un aumento del 2.4% (Tabla 1, gráfica 1), mientras que la densidad de fibras inmunoreactivas al NPY fue menor en esta zona en un 18.3%, sin embargo, no se detectaron diferencias estadísticas significativas en estos parámetros (Tabla 1, gráfica 2).

C) Células inmunoreactivas al PIV, en secciones mediales del NSQ de la rata macho adulta.

En la tabla 2 y gráfica 3, se aprecia que la malnutrición hipoproteínica crónica, induce un escaso aumento del 1.2% sobre el área ocupada por el NSQ, sin diferencia significativa. Sin embargo, la densidad de células inmunoreactivas al PIV en esta región, se encontró reducida significativamente en un 24.8% (tabla 2, gráfica 4).

Los sujetos malnutridos presentaron reducciones significativas, tanto en el área de la zona densa (12.2%, tabla 2, gráfica 3), como en el número de células inmunoreactivas al PIV en esta región (24.9%, tabla 2, gráfica 4).

Como se puede observar en la tabla 2, la malnutrición produce un aumento del 18.6% en el área de la zona difusa (gráfica 3), y una reducción del 24.3% en la densidad de células inmunoreactivas al PIV (gráfica 4), ambas con diferencia significativa.

D) Células inmunoreactivas a la VP, en secciones mediales del NSQ de la rata macho adulta.

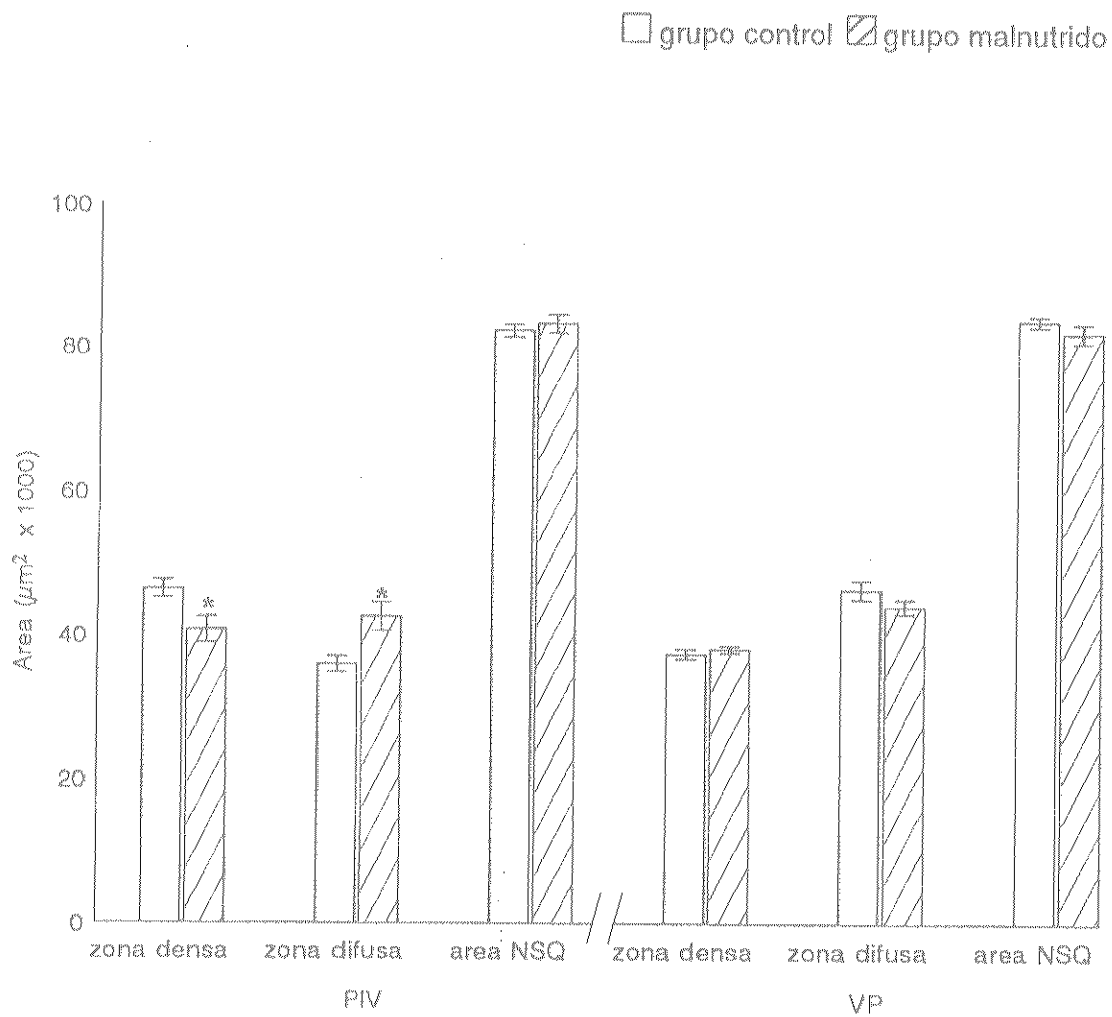
En la tabla 2 se observa que los animales malnutridos presentan una ligera disminución del 2.0% en el área ocupada por el NSQ (gráfica 3), la cual no fue estadísticamente significativa, sin embargo, la densidad de células vipérgicas en dicha región fue reducida en un 14.9% (gráfica 4), con diferencia

TABLA 2

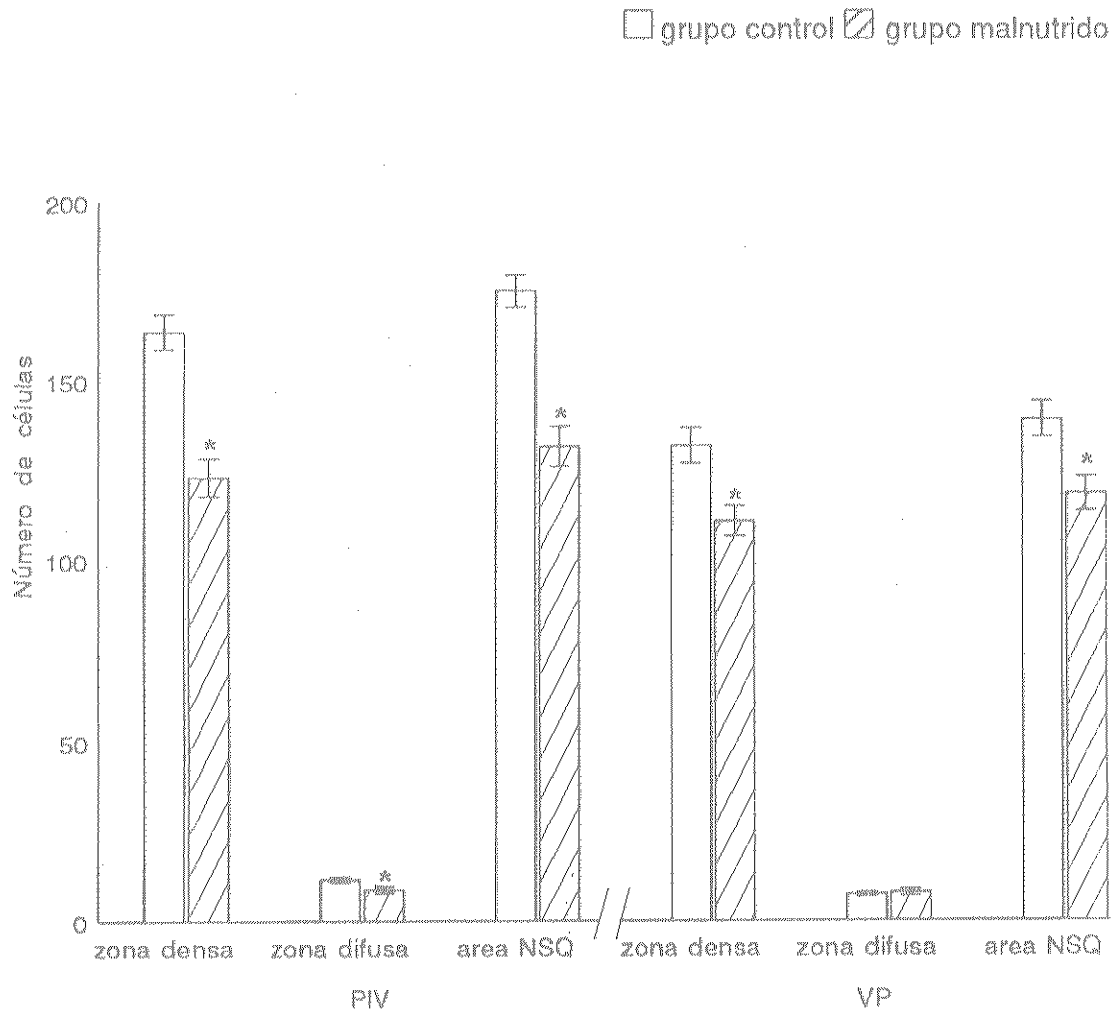
Efectos de la malnutrición hipoproteínica crónica sobre las zonas de distribución y número de células inmunoreactivas al péptido intestinal vasoactivo (PIV), la vasopresina (VP) y la proteína ácida gliofibrilar (PAGF) en el núcleo supraquiasmático (NSQ) de la rata macho adulta, en secciones mediales.

Area ($\mu\text{m}^2 \times 1000$) de las regiones	Número de células en las áreas de las regiones			Número de células en las áreas de las regiones			
	Grupos	NSQ	Densa	Difusa	NSQ	Densa	Difusa
Control		82.2 \pm 0.8	46.3 \pm 1.2	35.8 \pm 1.1	175.2 \pm 4.5	163.7 \pm 4.9	11.5 \pm 0.7
PIV							
Malnutrido		83.2 \pm 1.2	40.7 \pm 1.8*	42.5 \pm 2.0*	131.7 \pm 5.6*	123.0 \pm 5.3*	8.7 \pm 1.0*
% de cambio		+ 1.2	- 12.2	+ 18.6	- 24.8	- 24.9	- 24.3
Control		83.7 \pm 0.8	37.3 \pm 0.7	46.3 \pm 1.3	139.0 \pm 5.0	131.8 \pm 4.9	7.2 \pm 0.6
VP							
Malnutrido		82.0 \pm 1.3	38.0 \pm 0.4	44.0 \pm 1.0	118.3 \pm 4.8*	110.7 \pm 4.2*	7.7 \pm 1.0
% de cambio		- 2.0	+ 1.8	- 5.0	- 14.9	- 16.0	+ 6.9
Control		84.3 \pm 0.6	61.3 \pm 1.0	23.0 \pm 1.2	299.8 \pm 4.9	268.8 \pm 3.9	31.0 \pm 2.8
PAGF							
Malnutrido		83.8 \pm 0.3	60.5 \pm 1.0	23.2 \pm 1.2	220.7 \pm 12.5*	199.8 \pm 12.9*	20.8 \pm 2.6*
% de cambio		- 0.6	- 1.4	+ 0.7	- 26.4	- 25.7	- 32.9

*Diferencia significativa con $p < 0.05$.



Gráfica 3. Efectos de la malnutrición hipoproteínica crónica sobre el área ocupada por el núcleo supraquiasmático (NSQ) así como en las zonas densa y difusa, con inmunoreactividad al péptido intestinal vasoactivo (PIV) y a la vasopresina (VP), en secciones mediales del NSQ de la rata macho adulta.



Gráfica 4. Efectos de la malnutrición hipoproteínica crónica sobre la densidad de células inmunoreactivas al péptido intestinal vasoactivo (PIV) y a la vasopresina (VP), en las áreas de las zonas densa y difusa, así como el área ocupada por el núcleo supraquiasmático (NSQ), en secciones mediales del NSQ de la rata macho adulta.

estadísticamente significativa.

En relación al área de la zona densa, en la tabla 2 se muestra que los sujetos malnutridos presentan un escaso aumento del 1.8% (gráfica 3) sin diferencia significativa, y una reducción del 16% (gráfica 4) en el número de células inmunoreactivas a la VP en la región antes mencionada, con diferencia estadísticamente significativa.

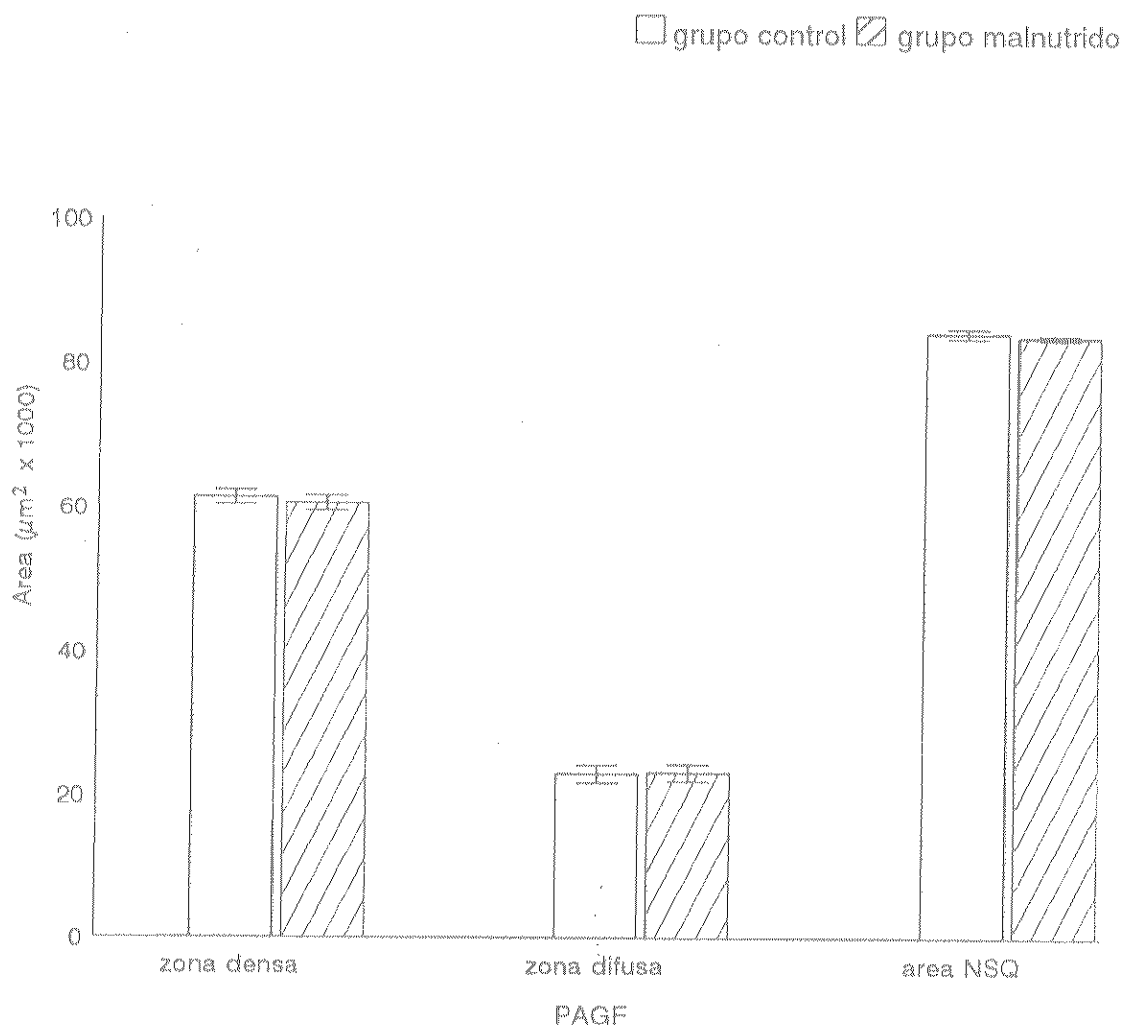
En la tabla 2 se puede observar que los animales malnutridos presentan reducción en el área de la zona difusa del 5.0% (gráfica 3), y aumento en la densidad de células vipérgicas del 6.9% (gráfica 4), ambas sin diferencia estadística.

E) Células inmunoreactivas a la PAGF, en secciones mediales del NSQ de la rata macho adulta.

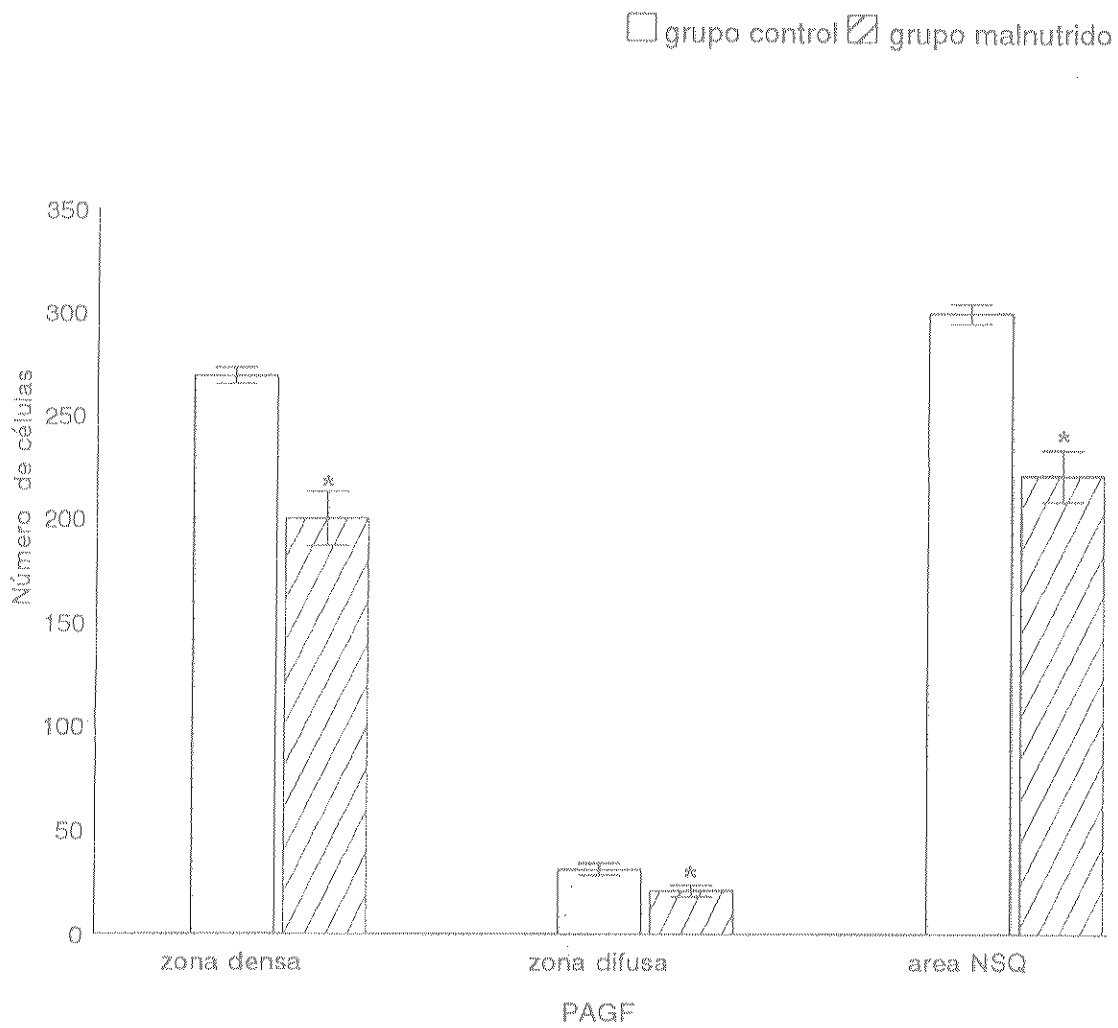
Los sujetos malnutridos presentan una ligera reducción del 0.6% en el área ocupada por el NSQ, (tabla 2, gráfica 5) sin diferencia significativa, mientras que el número de células inmunoreactivas a la PAGF se redujo significativamente en un 26.4% (tabla 2, gráfica 6).

El área de la zona densa de los sujetos malnutridos, presentó una tendencia a la reducción del 1.4% (tabla 2, gráfica 5), aunque sin diferencia significativa. Mientras que el número de células inmunoreactivas a la PAGF en esta región se redujo significativamente en un 25.7% (tabla 2, gráfica 6).

En la tabla 2 y gráfica 5 se observa que la malnutrición hipoproteínica crónica induce un escaso aumento no significativo del 0.7% sobre el área de la zona difusa. En contraste, el número de astrocitos se redujo significativamente en un 32.9% (tabla 2, gráfica 6).



Gráfica 5. Efectos de la malnutrición hipoproteínica crónica sobre el área ocupada por el núcleo supraquiasmático (NSQ), así como en las zonas densa y difusa, con inmunoreactividad a la proteína ácida gliofibrilar (PAGF), en secciones mediales del NSQ de la rata macho adulta.



Gráfica 6. Efectos de la malnutrición hipoproteínica crónica sobre la densidad de células inmunoreactivas a la proteína ácida gliofibrilar (PAGF), en las áreas de las zonas densa y difusa, así como en el área del núcleo supraquiasmático (NSQ), en secciones mediales de la rata macho adulta.

DISCUSIÓN

La distribución anatómica de las vías aferentes (tractos RH, GH y serotoninérgico), así como de los diversos tipos celulares analizados en el NSQ (células inmunoreactivas al PIV, la VP y la PAGF), fue similar en ambos grupos. Esto sugiere que el NSQ del sujeto en la etapa adulta, aparentemente no está afectado de manera significativa en su citoarquitectura por la malnutrición.

Se ha reportado que la supresión del tracto RH, puede producir un crecimiento de las fibras de la retina hacia el hipotálamo anterior (Johnson et al., 1988). La malnutrición instalada durante el desarrollo del SNC, es capaz de inducir alteraciones permanentes en los procesos neuronales y de conectividad (Díaz-Cintra et al., 1991, Escobar y Salas, 1993), lo cual sugiere que la malnutrición podría provocar un desarrollo anormal del tracto RH. En este sentido, se ha reportado incremento en el número de neuronas que responden a pulsos de luz en el hipotálamo adyacente al NSQ en sujetos malnutridos (Granados et al., 1995).

En los animales malnutridos, el número de las fibras inmunoreactivas a la 5HT, presentan una disminución estadísticamente significativa en la zona difusa (región no retinoreceptora) (27.9%) y en el área ocupada por el NSQ (8.4%), mientras que en la zona densa (porción retinoreceptora) hubo una disminución, aunque no significativa, del 6.4%. Por otra parte, en los sujetos malnutridos no se detectaron diferencias significativas en el número de fibras inmunoreactivas al NPY en las zonas analizadas, pero sí hubo una tendencia a aumentar (4.3%) en la zona densa de fibras (región retinoreceptora), y de disminución (18.3%) en la zona difusa (porción no retinoreceptora). Sin embargo, el número total de fibras en el área ocupada por el NSQ fue similar en ambos grupos.

Las diferencias en los porcentajes del número de fibras de los tractos serotoninérgico y GH, presentes en el NSQ, probablemente representan que la malnutrición afecta diferencialmente diversas estructuras del SNC, la asincronía en los procesos del desarrollo normal de estas fibras y/o de sus

sitios blanco (NSQ), ó quizás estén relacionados con la existencia de mecanismos de compensación adaptativa involucrados con el mantenimiento de la conectividad en la zona retinoreceptora (región ventromedial). Además, sugieren una mayor susceptibilidad al insulto nutricional de las fibras serotoninérgicas.

Se conoce que los plexos serotoninérgico y GH están involucrados en los mecanismos de ajuste de fase de la ritmicidad circádica (Johnson et al., 1989, Smale et al., 1990). Se ha reportado que los sujetos malnutridos presentan alteraciones en este parámetro en la conducta circádica de consumo de agua (Rojas et al, 1992, Aguilar-Roblero et al., 1993a, Salazar, 1996), es posible que las alteraciones morfométricas en estas fibras estén involucradas en dicho evento.

En el campo CA3 de la FH de animales malnutridos, se ha encontrado una disminución cualitativa en el área ocupada por las fibras que contienen 5HT y en los receptores postsinápticos. Sin embargo, el contenido de 5HT es similar tanto en los animales del grupo malnutrido como en los del grupo control, lo cual probablemente se debe a que los sujetos malnutridos presentan un aumento en la producción y liberación de serotonina. Se ha sugerido que la deficiencia en el plexo serotoninérgico podría provocar la disminución en la inhibición del circuito GABAérgico de la FH, y resultar en el aumento total en la inhibición que suprimiría la acción excitatoria del glutamato, provocando un efecto inhibitorio de la actividad de la FH (Blatt et al., 1994). Es probable que este mecanismo pueda estar involucrado en la integración funcional del NSQ en animales malnutridos.

Los animales malnutridos mostraron reducción significativa tanto en el número de células inmunoreactivas al PIV como en el área de la zona densa (región ventromedial) para este tipo celular. En consecuencia, se encontró un aumento significativo sobre el área de la zona difusa, aunque con la reducción significativa del número de células inmunoreactivas al PIV en esta región. Sin embargo, aunque el área ocupada por el NSQ (zona densa más zona difusa) es similar en ambos grupos, el número de células se redujo significativamente en los sujetos malnutridos, representando ésto que la

malnutrición crónica induce reducción de este tipo neuronal en edades avanzadas. Debido a que el área ocupada por el NSQ es similar en ambos grupos, es probable que la deficiencia celular provoque en los sujetos malnutridos alteraciones en los circuitos internos y externos del núcleo, así como en la producción y secreción de sustancias neuroactivas, reflejándose quizás en alteraciones funcionales, como en el ajuste de fase durante la sincronización (Rojas et al., 1993, Aguilar-Roblero et al., 1993a) ya que las aferentes del NSQ (plexos RH, GH y serotoninérgico) inervan preferencialmente la zona ventrolateral, donde la mayoría de las células que producen el PIV están presentes. Se conoce que estas células contienen además del PIV, el péptido histidina-isoleucina (Nishizawa et al., 1985) y el péptido liberador de la gastrina (Okamura et al., 1986). La administración de estos tres péptidos en conjunto, mimetizan los efectos de retraso de fase por la luz, sin embargo, no inducen adelantos de fase, probablemente a causa de la proporción de cada uno de los péptidos administrados (Albers, et al., 1991).

Con respecto a las células inmunoreactivas a la VP, se encontró una reducción significativa en el número de células tanto en la zona densa (porción dorsolateral) como en el área ocupada por el NSQ, sin embargo, hay un aumento en el número de células (6.9%), aunque no significativo, en la zona difusa (porción ventrolateral, región retinoreceptora). Esto sugiere que la malnutrición probablemente altera los procesos de desarrollo del NSQ, resultando en alteraciones en el número de células en el organismo adulto. Por otra parte, se conoce que la deficiencia en las células que producen VP en el NSQ de ratas diabéticas, no produce alteraciones significativas en la sincronización ó resincronización a un cambio de fase de 6 horas, aunque presentan un periodo endógeno mayor, esto último sugiere que las células inmunoreactivas a la VP en el NSQ interfiere en la expresión de las oscilaciones de alta frecuencia y que estas células no son críticas para la generación de los ritmos circadianos, pero podrían tener un papel importante en su regulación (Groblewski et al., 1981).

En relación al número de células inmunoreactivas a la PAGE, se encontró una disminución significativa en el número de astrocitos en las tres regiones analizadas del NSQ (sin cambios significativos en el área), de sujetos malnutridos, en relación al grupo control.

Se conoce que las células gliales son particularmente vulnerables a la malnutrición (Clos et al., 1977), y se ha sugerido que los astrocitos podrían tener un papel importante en la función del NSQ, debido a que este tipo celular en el SNC expresa receptores para diversos neurotransmisores y neuropéptidos como al glutamato, 5HT, PIV, VP, NPY (Lavialle y Serviere, 1993), y melatonina (Cassone et al., 1996). Además, la aplicación de octanol en el NSQ, es capaz de bloquear las uniones "GAP" de los astrocitos del NSQ, lo cual produce animales conductualmente arrítmicos (Prosser et al., 1994).

En el presente trabajo se determinó la disminución en el número de células inmunoreactivas al PIV, la VP y la PAGE. Sin embargo, se ha reportado que la malnutrición hipoproteínica crónica produce un aumento en el número de células, detectadas con técnicas de rutina (Nissl), a los 30 y 60 días de edad (Pérez, 1995), y una reducción en el tamaño del soma, principalmente a los 30 y 90 días de edad, mientras que a los 220 días de edad se reduce la diferencia en el tamaño (Cintra et al., 1994). Esto sugiere que la malnutrición hipoproteínica crónica, altera el patrón de desarrollo normal de las células del NSQ, mostrado por los animales control y que existe un proceso de crecimiento del soma que persiste en esta región del cerebro, que permite compensar de forma parcial las alteraciones en el neurodesarrollo, similar al que ocurre en otras regiones del SNC (Díaz-Cintra et al., 1990). Esto probablemente representa un mecanismo de compensación adaptativo o de plasticidad restaurativa. Por otra parte, también es factible que la reducción en el número de células detectadas con técnicas inmunohistoquímicas, en el presente trabajo, represente una baja concentración intracelular de los péptidos y proteínas localizados en estas células, los cuales podrían no ser detectados con las técnicas inmunohistoquímicas.

La malnutrición hipoproteínica crónica, produce a largo plazo, una disminución significativa tanto en el número de células inmunoreactivas a la VP (14.9 %), al PIV (24.8 %) y a la PAGF (26.4 %), como en el número de fibras inmunoreactivas a la 5HT (8.4 %), en el área ocupada por el NSQ, la cual no es afectada. Esto sugiere que la deficiencia celular podría ser compensada con un aumento en el neuropilo, como ha sido reportado previamente (Altman et al., 1970, Morgane et al., 1993), y que diversas estructuras y tipos celulares en una misma estructura anatómica del SNC son afectados diferencialmente por la malnutrición.

Se ha sugerido que la hormona de la glándula pineal, la melatonina, tiene una función como sincronizador interno del sistema circádico, a causa de que la administración de esta hormona, puede sincronizar ritmos de actividad locomotora en oscilación espontánea (Reedman et al., 1983), y al parecer actúa sobre el NSQ, debido a que la administración de melatonina en la noche subjetiva produce la reducción de la actividad metabólica en el NSQ (Cassone et al., 1988), e induce cambios de fase en la actividad eléctrica del NSQ *in vitro* (McArthur et al., 1991). Además, el NSQ presenta abundantes receptores a la melatonina (Weaver et al., 1989), en particular en los astrocitos (Cassone et al., 1996).

Se ha reportado que los sujetos malnutridos presentan una disminución en el contenido de melatonina en la glándula pineal así como un retraso en su acrofase (Hebert y Reiter, 1981), estos trastornos podrían ser relacionadas con alteraciones en la capacidad de acoplamiento que presentan los sujetos malnutridos y que se reflejan en la partición del bloque de actividad de la conducta circádica de consumo de agua, en un ciclo de luz-oscuridad de 12:12 h (Rojas et al., 1993, Aguilar-Roblero et al., 1993a, Salazar, 1996), y que podrían involucrar a los astrocitos, debido a que se han detectado receptores a la melatonina en estas células (Cassone et al., 1996), así como de otros neurotransmisores presentes en el NSQ (Lavialle y Serviere, 1993), y a la disminución en el número de astrocitos encontrado en el presente estudio.

CONCLUSIONES

Los resultados del presente estudio sugieren que la malnutrición hipoproteínica crónica:

- No afecta de manera evidente la organización morfológica del NSQ de la rata macho adulta.
- Produce a largo plazo efectos severos sobre las fibras inmunoreactivas a la 5HT en comparación con las fibras inmunoreactivas al NPY.
- Las células inmunoreactivas a la VP son menos afectadas por la malnutrición que las células inmunoreactivas al PIV y a la PAGF.
- La disminución en el número de células en el NSQ, probablemente ocasiona un incremento en el neuropilo.
- Las alteraciones provocadas por la malnutrición sobre el NSQ, evidenciadas con técnicas morfométricas, podrían ser el sustrato anatómico relacionado con las alteraciones sobre el ciclo sueño-vigilia y la conducta circádica de consumo de agua reportados en sujetos malnutridos.

ABREVIATURAS

E	embrionario
FH	formación hipocámpica
GH	genículohipotalámico
NPY	neuropéptido Y
NSQ	núcleo supraquiasmático
P	postnatal
PAGF	proteína ácida glio-fibrilar
PIV	péptido intestinal vasoactivo
RH	retinohipotalámico
SNC	sistema nervioso central
VP	vasopresina
5HT	serotonina

REFERENCIAS

- Aguilar-Roblero, R, García-Hernández, F., Aguilar, R., Arankowsky-Sandoval, G. y Drucker-Colin, R. Suprachiasmatic nucleus transplants function as an endogenous oscillator only in constant darkness. *Neuroscience Letters* 69:47-52, 1986.
- Aguilar-Roblero, R, Cintra, L., Granados-Fuentes, D., Roig, J.A., Rojas-Castañeda, J., Salazar-Juárez, A. y Vergara-Aragón, P. Effects of malnutrition on the circadian architecture of the rat. *International workshop on malnutrition and the developing central nervous system. Acapulco México.* 7-8, 1993a.
- Aguilar-Roblero, R. Teorías básicas de los ritmos biológicos. *Psiquis* 2 (6):121-132, 1993b.
- Aguilar-Roblero Raúl y Vega-González Arturo. Splitting of locomotor circadian rhythmicity in hamsters is facilitated by pinelectomy. *Brain Research* 605:229-236, 1993c.
- Albers, H.E. y Ferris C.F. Neuropeptide Y: role in light-dark cycle entrainment of hamster circadian rhythms. *Neuroscience Letters* 50:163-168, 1984.
- Albers, H.E., Liou, S.Y., Stopa, E.G. y Zoller, R.T. Interaction of colocalized neuropeptides: functional significance in the circadian timing system. *Journal of Neuroscience* 11:846-851, 1991.
- Altman, J., Das, G.D. y Sudarshan, K. The influence of nutrition on neural and behavioral development. I. Critical review of some data on the growth of the body and the brain following dietary deprivation during gestation and lactation. *Developmental Psychobiology* 3:281-301, 1970.
- Altman, J. y Bayer, S.A. Development of the Diencephalon in the rat. III. Ontogeny of the specialized ventricular linings of the hypothalamic third ventricle. *Journal of Comparative Neurology* 182:995-1016, 1978a.
- Altman, J. y Bayer, S.A. Development of the Diencephalon in the rat. II. Correlation of the embryonic development of the hypothalamus with the time of origin of its neurons. *Journal of Comparative Neurology* 182:973-994, 1978b.
- Andrade, J.P., Cadete-Leite, A., Madeira, M.D. y Paula-Barbosa, M.M. Long term low-protein diet reduces the number of hippocampal mossy fiber synapses. *Experimental Neurology* 112:119-124, 1991.
- Bedi, K.S. Effects of undernutrition during early life on granule cell numbers in the rat dentate gyrus. *Journal of Comparative Neurology* 311:425-433, 1991.
- Blatt, G.J., Chen, J. CH., Rosene, D.L., Volicer, L. y Galler, J.R. Prenatal protein malnutrition effects on the serotonergic system in the hippocampal formation: an immunocytochemical, ligand, binding, and neurochemical study. *Brain Research Bulletin* 34:507-518, 1994.
- Brady, J. Behavioral rhythms in invertebrates. En: Jürgen Aschoff (ed). *Handbook of behavioral neurobiology vol 4: Biological Rhythms.* Plenum Press. New York, pp 125-143, 1984.

- Bunning, E. The physiological clock. English University Press, London. p 258, 1973.
- Card, J.P. y Moore, R.Y. Organization of lateral geniculate-hypothalamic connections in the rat. *Journal of Comparative Neurology* 284:134-147, 1989.
- Cassone, V.M. Chesworth, M.J. y Armstrong, S.M. Entrainment of rat circadian rhythms by daily injection of melatonin depends on the hypothalamic suprachiasmatic nuclei. *Physiology & Behavior* 36:1111-1121, 1986.
- Cassone, V.M., Roberts, M.H. y Moore R.Y. Effects of melatonin on 2-deoxy-[1-¹⁴C]glucose uptake within rat suprachiasmatic nucleus. *American Journal Physiology* 255: (Regulatory Integrative Comparative Physiology 24): R332-R337, 1988.
- Cassone, V.M., Whitfield, M.G.R., Leath, T., Natesan, A., Schneider, L. y Tiffany-Castiglioni, E. Melatonin receptors in chick astrocytes *in vivo* and *in vitro*. 26 th Annual Meeting, Society for Neuroscience, Washington, D.C., USA, 1996.
- Chase, H.P., Dabiere, C.S., Welch N. y O'Brien, D. Intrauterine undernutrition and brain development. *Pediatrics* 47:491-500, 1971.
- Chen, J.Ch., Tonkiss, J., Galler, J.R. y Volicer, L. Prenatal protein malnutrition in rats enhances serotonin release from hippocampus. *Journal of Nutrition* 122:2138-2143, 1992.
- Cintra, L., Díaz-Cintra, S., Galván, A. y Morgane, P. Circadian rhythm of sleep in normal and undernourished rats. *Boletín de Estudios Médicos y Biológicos, México* 36:3-17, 1988.
- Cintra, L., Díaz-Cintra S., Galván A., Kemper, T. y Morgane, P.J. Effects of protein undernutrition on the dentate gyrus in rats of three age groups. *Brain Research* 532:271-277, 1990.
- Cintra, L., Galván, A., Díaz-Cintra, S. y Escobar, C. Protein malnutrition on suprachiasmatic nucleus cells in rats of three ages. *Boletín de Estudios Médicos y Biológicos, México* 42:11-49, 1994.
- Cintra, L., Granados., L., Aguilar, A., Kemper, T., DeBassio, W., Galler, G., Morgane, P., Durán, P., y Díaz-Cintra, S. Effects of prenatal protein malnutrition on mossy fibers of the hippocampal formation in rats of four age groups. *Hippocampus* 7:184-191, 1997a.
- Cintra, L., Aguilar, A., Granados., L., Galván, A., Kemper, T., DeBassio, W., Galler, G., Morgane, P., Durán, P., y Díaz-Cintra, S. Effects of prenatal protein malnutrition on hippocampal CA1 pyramidal cells in rats of four age groups. *Hippocampus* 7:192-203, 1997b.
- Clos, J., Favre, C., Selme-Matrat, M., y Legrand, J. Effects of undernutrition on cell formation in the rat brain and specially on cellular composition of the cerebellum. *Brain Research* 123:13-26, 1977.
- Colwell, C.S., Foster, R.G. y Menaker, M. NMDA receptors antagonists block the effects of light on circadian behavior in the mouse. *Brain Research* 554:105-110, 1991.

- Díaz-Cintra, S., Cintra, L., Kemper, T. Resnick, O. y Morgane, P.J. The effects of protein deprivation on the nucleus raphe dorsalis: a morphometric golgi study in rats of the three age groups. *Brain Research* 221:243-255, 1981.
- Díaz-Cintra, S., Cintra, L., Ortega, A., Kemper, T. y Morgane, P.J. Effects of protein deprivation on pyramidal cells of the visual cortex in rats of three age groups. *Journal of Comparative Neurology* 292:117-126, 1990.
- Díaz-Cintra, S., Cintra, L., Galván, A., Aguilar, A., Kemper, T. y Morgane, P.G. Effects of prenatal protein deprivation on postnatal development of granule cells in the fascia dentata. *Journal of Comparative Neurology* 310:356-364, 1991.
- Díaz-Cintra, S., García-Ruiz, M., Corkidi, G y Cintra, L. Effects of prenatal malnutrition and postnatal nutritional rehabilitation on CA3 hippocampal pyramidal cells in rats of four ages. *Brain Research* 662:117-126, 1994.
- Dobbing, J. Vulnerable periods of brain development. En: *Lipids, Malnutrition and Developing Brain*. CIBA Foundation Symposium. Elsevier, Amsterdam. pp. 9-29, 1972.
- Drucker-Colín, R., Aguilar-Roblero, R., García-Hernández, F., Fernández-Cancino, F. y Bermúdez-Rattoni, F. Fetal suprachiasmatic nucleus transplants: diurnal rhythm recovery of lesioned rats. *Brain Research* 311:353-357. 1984.
- Dyson, S.E. y Jones, E.G. Undernutrition and the developing nervous system. *Progress in Neurobiology* 7:171-196, 1976.
- Earnest, D.J. y Sladek, C.D. Circadian vasopressin release from perfused rat suprachiasmatic explants in vitro: effects of acute stimulation. *Brain Research* 422:398-402, 1987.
- Escobar, C. y Salas, M. Ameliorating effects of early sensory stimulation on the behavior of adult rats underfed during the lactating period. *Boletín de Estudios Médicos y Biológicos, México* 35:195-202, 1987.
- Escobar, C. y Salas, M. Neonatal undernutrition and amygdaloid nuclear complex development: an experimental study in the rat. *Experimental Neurology* 122:311-318, 1993.
- Fisher, S.E. Selective fetal malnutrition: The fetal alcohol syndrome. *Journal American Coll Nutrition* 7:101-106, 1988.
- Forbes, W.B., Tracy, C., Resnick, O. y Morgane, P.J. Effects of maternal dietary protein restriction on growth of the brain and body in the rat. *Brain Research Bulletin* 2: 131-135, 1977.
- García-Ruiz, M., Díaz-Cintra S., Cintra, L. y Corkidi, G. Effect of protein malnutrition on CA3 hippocampal pyramidal cells in rats of three ages. *Brain Research* 625:203-212, 1993.

- Granados, D.F., Salazar, A.J., Vergara, P.A., Escandón, J.C. Vega, A.G y Aguilar, R.R. Los ritmos circádicos en mamíferos: conceptos, implicaciones y bases biológicas. En: Velázquez, J.M. (Eds), Temas selectos de neurociencias, pp 433-458, 1995.
- Green, D.J. y Gillette, R. Circadian rhythm of firing rate recorded from single cells in the rat suprachiasmatic brain slice. *Brain Research* 245:198-200, 1982.
- Groblewsky, T.A., Nuñez, A.A. y Gold, R.M. Circadian Rhythms in vasopressin deficient rats. *Brain Research Bulletin* 6:125-130, 1981.
- Halberg, F. Chronobiology. *Annual Review of Physiology* 31:675-725, 1969.
- Harrington, M.E. y Rusak, B. Ablation of the geniculohypothalamic tract alters circadian activity rhythms of hamsters housed under constant light. *Physiology & Behavior* 42:183-189, 1988.
- Herbert, D.C. y Reiter, R.J. Influence of protein-caloric malnutrition on the circadian rhythm of pineal melatonin in the rat. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 166:360-363, 1981.
- Inouye, S.I.T. y Kawamura, H. Characteristics of a circadian pacemaker in the suprachiasmatic nucleus. *Journal Comparative Physiology* 146:153-160, 1982.
- Ishikawa, K. y Frohman, L. Ontogenesis of peptide-histidine-isoleucine (PHI)-containing neurons in the suprachiasmatic nucleus (SCN) of the rat. *Brain Research* 407:144-148, 1987.
- Johnson, R.F., Morin, L.P. y Moore, R.Y. Loss of entrainment and anatomical plasticity after lesions of the hamster retinohypothalamic tract. *Brain Research* 460:297-313, 1988.
- Johnson, R.F. Moore, R.Y. y Morin, L.P. Lateral geniculate lesions alter circadian activity rhythms in the hamster. *Brain Research Bulletin* 22:411-422, 1989.
- Kim, Y.I. y Dudek, F.E. Intracellular electrophysiological study of suprachiasmatic nucleus neurons in rodents: excitatory synaptic mechanism. *Journal of Physiology* 444:269-287, 1991.
- Klein, D. C. y Moore, R. Y. Pineal-N-acetyltransferase and hydroxyindole-O-methyltransferase. Control by the retinohypothalamic tract and the suprachiasmatic nucleus. *Brain Research* 174:245-262, 1979.
- Krieger, D.T. Ventromedial hypothalamic lesions abolish food-shifted circadian adrenal and temperature rhythmicity. *Endocrinology* 106: 649-654, 1974.
- Krieger, D.T. Hauser, H. y Krey, L.C. Suprachiasmatic nuclear lesions do not abolish food-shifted circadian adrenal and temperature rhythmicity. *Science* 197:398-399, 1977.
- Lavialle, M. y Servièrre, J. Circadian fluctuations in GFAP distribution in the Syrian hamster suprachiasmatic nucleus. *NeuroReport* 4:1243-1246, 1993.

- Lehman, M.N., Silver, R., Glandstone, W.R., Kahan, R.M. y Bithman, E. Circadian rhythmicity restored by neuronal transplant. Immunocytochemical characterization of the graft and its integration with the host brain. *Journal of Neuroscience* 7:1626-1638, 1987.
- Lydic, R., Albers, H.E., Tepper, B y Moore-Ede M.C. Three-dimensional structure of the mammalian suprachiasmatic nuclei: a comparative study of five species. *Journal of Comparative Neurology* 204:225-237, 1982.
- Mantyh, P.W. y Kemp, J.A. The distribution of putative neurotransmitters in the lateral geniculate nucleus of the rat. *Brain Research* 288:344-348, 1983.
- McArthur, A.J. Guillete, M.U. y Prosser, R.A. Melatonin directly resets the rat suprachiasmatic circadian clock *in vitro*. *Brain Research* 565:158-161, 1991.
- Medanic, M. y Guillete, M.V. Suprachiasmatic circadian pacemaker of rat shows two windows of sensitivity to neuropeptide Y *in vitro*. *Brain Research* 620:281-286.
- Meijer, J.H. y Rietveld, W.J. Neurophysiology of the supraquiasmatic circadian pacemaker in rodents. *Physiological Reviews* 69:671-707, 1989.
- Minors, D.S. y Waterhouse, J.M. Introduction and methods of study. En: Minors D.S. and Waterhouse, J.M. 8Eds), *Circadian Rhythms and the Human*. John Wright and Sons Ltd, Bristol, Great Britain, pp 1-23, 1981.
- Moore, R.Y. y Lenn, N.J. A retinohypothalamic projection in the rat. *Journal of Comparative Neurology* 146:1-14, 1972.
- Moore, R.Y. Organization and function of a central nervous system circadian oscillator: the suprachiasmatic hypothalamic nucleus. *Federation Proceedings* 42:2783-2789, 1983.
- Moore, R.Y. Development of the suprachiasmatic nucleus. En: Klein, D.C., Moore, R.Y. and Reppert, M. (Eds), *Suprachiasmatic Nucleus. The Mind's Clock*, pp 391-404, 1991.
- Moore, R.Y. y Card, P. Visual afferents and suprachiasmatic nucleus pacemaker function. En Nakagawa, H., Oomura, Y. and Nagai, K. (Eds). *New functional aspects of the suprachiasmatic nucleus of the hypothalamus*. John Library & Company Ltd. pp 1-13, 1993.
- Morgane, P.J., Miller, M., Kemper, T., Stern, W., Forbes, W., Hall, R., Bronzino, J., Kissane, J., Hawrylewicz, E. y Resnick, O. The effects of protein malnutrition on the developing central nervous system in the rat. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 2:137-230, 1978.
- Morgane, P.J., Austin-LaFrance, R.J., Bronzino, J.D., Tonkinss, J. y Galler, J.R. Malnutrition and the developing central nervous system. En: R.L. Isaacson and K.F. Jensen (Eds). *The vulnerable brain and environmental risks. Malnutrition and hazard assessment*. Plenum Press, New York. pp. 3-44, 1992.

- Morgane, P.J., Austin-LaFrance, R., Bronzino, J., Tonkiss, J., Díaz-Cintra, S., Cintra, L., Kemper, T. y Galler, J.R. Prenatal malnutrition and development of the brain. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 17:91-128, 1993.
- Morin, L.P. The circadian visual system. *Brain Research Reviews* 67:102-127, 1994.
- Mosko, S. y Moore, R.Y. Neonatal suprachiasmatic nucleus ablation: absence of functional and morphological plasticity. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 75:6243-6246, 1978.
- Newman, G.C. y Hospod, F.E. Rhythm of suprachiasmatic nucleus 2-deoxyglucose uptake *in vitro*. *Brain Research* 381:345-350, 1986.
- Nishizawa, M., Hayakawa, Y., Yanaihara, N. y Okamoto, H. Nucleotide sequence divergence and functional constraint in VIP precursor mRNA evolution between human and rat. *FEBS Letters* 183:55-59, 1985.
- Okamura, H., Murakami, S., Uda, K., Sugano, T., Takahashi, Y., Yanaihara, C., Yanaihara, N. y Ibata, Y. Coexistence of vasoactive intestinal peptide (VIP)-, peptide histidine isoleucine amid (PHI)-, and gastrin releasing peptide (GRP)-like immunoreactivity in neurons of the rat suprachiasmatic nucleus. *Biomedical Research* 7:295-299, 1986.
- Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. El hambre en el mundo. Folleto de la secretaría del día mundial de la alimentación de la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Roma, Italia. pp 20, 1985.
- Paula-Barbosa, M.M., Andrade, J.P., Castedo, J.L., Azevedo, F.P., Camoes, Y., Volk, B. y Tavares, M.A. Cell loss in the cerebellum and hippocampal formation of adult rats after long-term low-protein diet. *Experimental Neurology* 103:186-193, 1989.
- Pérez, E.T. El núcleo supraquiasmático: un estudio morfométrico en ratas con desnutrición crónica. Tesis de Maestría, Proyecto de Maestría en Ciencias Fisiológicas, UACPyP-CCH, UNAM, 1995.
- Pickard, G.E. y Turek, F.N. Splitting of the circadian rhythm of activity is abolished by unilateral lesion of suprachiasmatic nuclei. *Science* 215:1119-1121, 1982.
- Pickard, G.E. Bifurcating axons of retinal ganglion cells terminate in the hypothalamic suprachiasmatic nucleus and the intergeniculate leaflet of the thalamus. *Neuroscience Letters* 55:211-217, 1985.
- Prosser, R.A., Edgar, D.M., Heller, H.C. y Miller, J.D. A possible glial role in the mammalian circadian clock. *Brain Research* 643:246-301, 1994.
- Ralph, M.R., Foster, R.G., Davies, F.C. y Menaker, M. Transplanted SCN determines circadian period. *Science* 247:975-978, 1990.

- Reedman, J., Armstrong, S.M. y Sond, K.T. Free running activity rhythms in the rat: entrainment by melatonin. *Science* 219:1089-1091, 1983.
- Reppert, S.M. y Schwartz, W.J. The suprachiasmatic nuclei of the fetal rat: characterization of a functional circadian clock using ^{14}C -labeled deoxyglucose. *Journal of Neuroscience* 4:1677-1682, 1984.
- Rojas, J.C., Salazar, A.J., Cintra, L. y Aguilar R. Efecto de la desnutrición proteínica sobre la ontogenia del ritmo circádico de ingesta de agua en rata. IV Congreso Latinoamericano de Sueño, México, D.F., 1992.
- Rojas, J.C., Salazar, A.J., Cintra, L. y Aguilar R. Efecto de la desnutrición sobre el ritmo circádico de ingesta de agua y la organización morfológica del núcleo supraquiasmático de la rata. XXXVI Congreso Nacional de Ciencias Fisiológicas, Acapulco, Gro., México, 1993.
- Romero, M., Lehman, M.N. y Silver, R. Age of donor influences ability of suprachiasmatic nucleus grafts to restore circadian rhythmicity. *Developmental Brain Research* 71:45-52, 1993.
- Rosso, P. Prenatal nutrition and brain growth. En: van Gelder, N.M. and Butterworth, R.F., Drujan, B.D.(Eds). *Malnutrition and the infant brain*. Wiley-Liss, New York, pp. 25-40, 1990.
- Rusak, B. y Zucker, I. Neural regulation of circadian rhythms. *Physiological Reviews* 59:449-526, 1979.
- Rusak, B. y Gross, G. Suprachiasmatic stimulation phase shifts rodents circadian rhythms. *Science* 215:407-1409, 1982.
- Rusak, B., Meijer, J.H. y Harrington, M.E. Hamster circadian rhythms phase-shifted by electrical stimulation of the geniculohypothalamic. *Brain Research* 993:283-291, 1989.
- Salas, M., Díaz, S. y Nieto, A. Effect of neonatal food deprivation on cortical and dendritic development of the rat. *Brain Research* 73:139-144, 1974.
- Salazar, A.J. Efecto de la desnutrición proteínica sobre el ritmo de ingesta de agua en rata. Tesis de Maestría en Ciencias Biomédicas, Fisiología. Facultad de Medicina, UNAM, 1996.
- Sastri, B.V. Placental toxicology: Tobacco smoke, abused drugs, multiple chemical interactions, and placental function. *Reproduction, Fertility and Development* 3:355-372, 1991.
- Shen, H. y Semba, K. A retinal projection to the dorsal raphe nucleus in the rat. *Brain Research* 635:159-168, 1994.
- Shibata, S., Oomura, Y., Kita, H. y Hattori, K. Circadian rhythmic changes of neural activity in the suprachiasmatic nucleus of the rat hypothalamic slice. *Brain Research* 247:154-158, 1982.

ESTA TESIS NO PUEDE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

- Shibata, S. y Moore, R.Y. Development of neuronal activity in the rat suprachiasmatic nucleus. *Developmental Brain Research* 34:311-315, 1987.
- Shibata, S. y Moore, R.Y. Development of a fetal circadian rhythm after disruption of maternal circadian system. *Developmental Brain Research* 41:313-317, 1988.
- Smale, L., Michelks, K.M., Moore, R.Y. y Morin, L.P. Destruction of the hamster serotonergic system by 5,7-DHT: Effects on circadian rhythm phase, entrainment and response to triazolam. *Brain Research* 515:9-19, 1990.
- Smart, J.L. Critical periods in brain development. En: *The childhood environment and the adult disease*. Wiley, Chichester, pp. 109-128, 1991.
- Stern, W.C., Forbes, W.B., Resnick, O., y Morgane, P.J. Seizure susceptibility and brain amine levels following protein malnutrition during development in the rat. *Brain Research* 79:375-384, 1974.
- van den Pol, A.N. The hypothalamic suprachiasmatic nucleus of the rat: intrinsic anatomy. *Journal of Comparative Neurology* 191:661-702, 1980.
- van den Pol, A.N. y Tsujimoto, K.L. Neurotransmitters of the hypothalamic suprachiasmatic nucleus: immunocytochemical analysis of 25 neuronal antigens. *Neuroscience* 15:1049-1086, 1985.
- van den Pol, A.N. The suprachiasmatic nucleus: morphological and cytochemical substrates for cellular interaction En: Klein, D.C., Moore, R.Y. and Reppert, M. (Eds), *Suprachiasmatic Nucleus. The Mind's Clock*, pp 17-50, 1991.
- Venero, J.L., Herrera, A.J., Machado, A. y Cano, J. Changes in neurotransmitter levels associated with the deficiency of some essential amino acids in the diet. *British Journal of Nutrition* 68:409-420, 1992.
- Warren, M.A. y Bedi, K.S. Synapse-to-neuron ratios in the visual cortex of adult rats undernourished from about birth until 100 days of age. *Journal of Comparative Neurology* 210:59-64, 1982.
- Watts, A.G. The efferent projection of the suprachiasmatic nucleus: anatomical insights into the control of circadian rhythms. En: Klein, D.C., Moore, R.Y. and Reppert, M. (Eds), *Suprachiasmatic Nucleus. The Mind's Clock*, pp 77-106, 1991.
- Weaver, D.R., Rivkees, S.A. y Reeperrt, S.M. Location and characterization of melatonin receptors in rodent brain by *in vivo* radiography. *Journal of Neuroscience* 9:2581-2590, 1989.
- Winick, M. y Noble, A. Cellular response in rats during maturation at various ages. *Journal of Nutrition* 89:300-306, 1966.
- Yanovski, J.A., Rosenwasser, A.M., Levine, J.D. y Adler, N.T. The circadian activity rhythms of rats in mid- and parasagittal "split-SCN" knife cuts and pinealectomy. *Brain Research* 537:216-226, 1990.