

03068

2
28



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

Colegio de Ciencias y Humanidades
Unidad Académica de los Ciclos Profesional
y de Posgrado
Instituto de Investigaciones Biomédicas

Determinación cerebral de serotonina y ácido 5-
hidroxiindolacético en ratas normales,
desnutridas y rehabilitadas sometidas
a privación de sueño.

T E S I S

Que para optar al Grado de:
MAESTRO EN CIENCIAS FISIOLÓGICAS

P r e s e n t a

ALFONSO BENITO ALFARO RODRIGUEZ

México, D. F.

1995.



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 está 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.

RECONOCIMIENTO

**EL PRESENTE TRABAJO DE TESIS SE
REALIZO EN EL INSTITUTO DE NEUROBIOLOGIA
DE LA U.N.A.M. EN COLABORACION CON LA UNIDAD
DE SALUD INFANTIL DEL INSTITUTO NACIONAL
DE PEDIATRIA-SSA.**

DEDICATORIA

A mis Papás, hermanos y sobrinos: Marcela, Héctor y Jorgito

A Ilián mi esposa ; mi más importante compañera y Alfonsito

En memoria de la Dra. Carolina Durán Chávez

A mis compañeros y amigos de Neuroquímica: Norma Labra , Jorge Cruz, David Calderón, José Luis Hernández, Antonio Gómez, Gerardo Barragán y Raúl Rodríguez.

A mis amigos de Neurología: Rigoberto González, Carmen Escalante, Salvador Huitrón, Erik Murillo, Verónica Custodio y Reyes Haro.

A mis más estrictas críticas: Angélica González y Sonia Ramírez

A mis viejos amigos Carlos Mújica y Guillermo Espinoza

AGRADECIMIENTOS

A los Doctores León Cintra McGlone y Sofía Díaz-Cintra por la asesoría en la realización del trabajo.

Al Director del Instituto Nacional de Pediatría Dr. Silvestre Frenk quien en su afán por la superación del Instituto, abrió las puertas de éste para quienes quisimos seguir con nuestra inquietud por la investigación.

Al Dr. Ismael Lares Asseff por su apoyo y ejemplo académico.

Al Dr. Luis Castilla Serna por darme la oportunidad de desarrollar este trabajo en el Laboratorio de Neuroquímica de la Unidad de Investigación en Salud Infantil-INP SSA, además del apoyo y ánimo que me brindó durante la realización del mismo.

A la Dra. Carolina Escobar Briones quien con su profesionalismo y un alto sentido del compañerismo me guió en los primeros esbozos de este trabajo, aconsejándome y dándome las bases para su desarrollo final.

Al M. en C. Agustín Galván Rosas por sus ideas siempre oportunas y colaboración durante la elaboración del trabajo.

A los miembros del jurado por la revisión y mejoramiento del trabajo:

Dr. León Cintra McGlone
Dr. Salvador Huitrón Reséndiz
Dra. María Corsi Cabrera
Dr. Carlos Paz Tres
M. en C. Reyes Haro Valencia

INDICE

1).- RESUMEN.....	3
2).- INTRODUCCION.....	4
Desnutrición en modelos biológicos.....	4
Alteraciones conductuales por la desnutrición.....	6
Alteraciones morfológicas y anatómicas.....	6
Neurotransmisores y desnutrición.....	7
Serotonina y desnutrición.....	10
Estudio del sueño.....	11
Importancia de la privación de sueño.....	13
Ritmos circádicos.....	14
Papel del núcleo supraquiasmático(NSQ).....	15
Papel de los núcleos del rafe.....	17
Importancia de la serotonina en el sueño.....	18
Sueño y desnutrición.....	20
Planteamiento del problema.....	22
3).- HIPOTESIS.....	22
4).- OBJETIVOS GENERALES.....	23
5).- MATERIAL Y METODOS.....	23
Animales.....	23
Reproducción.....	24
Técnica de HPLC.....	25
Reactivos.....	26
Procedimiento.....	26
Método de privación de sueño.....	26
Procesamiento del tejido.....	27
Mediciones.....	28
Análisis estadístico.....	29
6).- RESULTADOS.....	29
7).- DISCUSION.....	33
8).- REFERENCIAS.....	40

RESUMEN

En estudios previos realizados con métodos electrofisiológicos se han analizado los estadios de vigilia del ciclo del sueño y la vigilia con la técnica de privación total de sueño y se han estudiado los efectos de la desnutrición severa y de la rehabilitación nutricional después de 24 horas de privación total de sueño para determinar los niveles de serotonina en los núcleos supraquiasmático y rafe dorsal. En el presente trabajo se utilizaron ratas macho de 60 días de edad de la cepa Sprague Dawley y se alimentaron con una dieta isocalórica con un contenido normal de 25% de caseína (controles) y otra con un porcentaje bajo de proteína 6% (malnutridos) que se administraron durante el periodo prenatal, lactancia y después del destete (21 días), o bien en el grupo rehabilitado, la dieta de 6% de caseína se administró durante la gestación y la dieta 25% al nacimiento (6/25%), hasta los 60 días (día basal). A esta edad los animales fueron privados de sueño durante 24 hrs y posteriormente se decapitaron y disecaron los núcleos, procesando el tejido por medio de la técnica de HPLC. Se observó en los malnutridos que la privación de sueño provocó incrementos significativos en las concentraciones de serotonina, en comparación con los rehabilitados y controles, así como en las ratas desnutridas que no fueron privadas de sueño. En cuanto a la concentración del metabolito de la serotonina (ácido 5 hidroxindolacético) no hubo un recambio igual al precursor en el caso de las ratas desnutridas con privación de sueño; en los demás grupos no hubo diferencias significativas en este sentido.

INTRODUCCION

La desnutrición es un problema común y de primer orden en los países en desarrollo que afecta a la población de bajos recursos de un modo directo desde su base alimenticia familiar. La causa principal es la pobreza ya que una parte significativa de la población se dedica a actividades primarias, como la agricultura, que tienen muy poco rendimiento económico. Por otra parte, la ignorancia coadyuva a que se incremente el problema de la desnutrición sobre todo en las poblaciones latinoamericanas, del Africa septentrional y del sur de Asia, que son países con grandes problemas socio-políticos y con pocos recursos económicos. El efecto de estos factores se ha reflejado tanto en problemas de salud pública como en problemas de atención y de aprendizaje, en particular en los niños.

"La desnutrición energético proteínica es un estado patológico de etiología social que se presenta como consecuencia de la falta de ingestión de la cantidad suficiente de los alimentos que contienen los nutrimentos requeridos por el organismo para el adecuado crecimiento, desarrollo y funcionamiento de sus órganos y sistemas" (González-Richmond '87). Tomando como base la definición anterior, se conocen alteraciones de órganos y sistemas, como es el caso del sistema inmune y daños psicológicos y neurológicos entre otros.

El problema de la desnutrición ha llevado a muchos investigadores a estudiar estas alteraciones por medio de modelos biológicos experimentales, según el área afectada. La desnutrición proteínica en ratas es el modelo experimental que intenta replicar los efectos de la desnutrición en los humanos.

Desnutrición en modelos biológicos

No fue sino hasta los estudios de Sugita en 1918 cuando se hizo un estudio

sistemático sobre los efectos de la desnutrición en el desarrollo cerebral en las ratas, aunque con algunas deficiencias metodológicas como el no tener un control adecuado, ni tampoco se controló el número de animales utilizados, etc. No obstante, los resultados arrojaron nuevos indicios respecto a las alteraciones que sufre el cerebro bajo condiciones de desnutrición, abriendo así una nueva línea de investigación en el campo de la morfofisiología. Siguieron a este estudio varias investigaciones relacionadas principalmente con la desnutrición durante el período de la lactancia. Es así como Dobbing y Sands ('71) proponen el concepto de "período crítico", que se refiere al momento cuando el cerebro cursa por un crecimiento celular rápido y es altamente vulnerable a sufrir alteraciones por eventos externos. Esta etapa se presenta en todas las clases de mamíferos y eventualmente en todo el cuerpo del animal, existiendo sin embargo diferencias entre especies, en cuanto al momento en el que sucede el período crítico en relación con la maduración del sistema nervioso al nacimiento y que puede corresponder a los picos de acumulación de ADN y mielina. Lo anterior es muy importante ya que se establece un período de vulnerabilidad durante el desarrollo del organismo. Esta idea no es nueva, ya que se basa en el fundamento de la teratología, puesto que el cerebro es vulnerable tanto en el desarrollo físico como eventualmente en el desarrollo conductual. Un daño en este período puede ocasionar secuelas permanentes e irreversibles. Según Cravioto y Arrieta('85) la importancia de esta etapa es muy grande, porque da lugar a la consideración de una patología del desarrollo cerebral en la que el momento en que actúan los factores etiológicos en relación al período de crecimiento cerebral tendrá mayor importancia que la intensidad y duración de la agresión. Así se presentan durante esta fase de aceleración del crecimiento cerebral restricciones moderadas del crecimiento somático, de prevalencia alta en poblaciones humanas, que dan por resultado modificaciones estructurales y funcionales que pueden ser

permanentes.

Alteraciones conductuales asociadas a la desnutrición

Se ha observado que animales severamente desnutridos muestran un retraso en la aparición y desarrollo de patrones locomotores así como de comportamiento. Salas y Cintra ('73), mostraron que la desnutrición crónica afecta la maduración del substrato neuronal que controla al complejo neuromuscular para los mecanismos adaptativos involucrados en el nado. Salas ('78) encontró disminución en las conductas exploratoria y de orientación cuando los animales son sometidos a un ambiente nuevo y como consecuencia, presentan efectos en el comportamiento. También se observó un incremento en la agresividad y en la carga emocional en respuesta a condiciones de estrés y disminución en la eficiencia de aprendizaje. Cabe señalar que el aislamiento afecta más a los animales desnutridos, en este caso a la rata; este tipo de estudios pudieran reflejar lo que se observa en los niños sometidos a un ambiente aislado de estímulos sensoriales, presentando además una serie de deficiencias en relación con su entorno social, como falta de comunicación y dificultad para integrarse como grupo en la sociedad (Cravioto y Arrieta '85).

Alteraciones morfológicas y anatómicas

Son numerosos los estudios que existen en la literatura acerca de lo que ocurre en el sistema nervioso central a nivel anatómico morfológico por los efectos que produce la desnutrición. Sobotka y cols, ('74), en sus estudios sobre desnutrición neonatal, encontraron que la desnutrición perinatal provoca deficiencias a largo plazo. Estas deficiencias han sido medidas en las alteraciones de la función y la composición química cerebral, e incluyen disminución tanto del tamaño celular como de la mielinización y del crecimiento dendrítico neuronal, manifestándose

como un retardo en el desarrollo cerebral. Por otro lado Sima y Sourander ('78), en un estudio de la desnutrición pre y posnatal sobre el crecimiento axonal y la mielinización de las fibras motoras centrales, encontraron una deficiencia en el crecimiento axonal y en la mielinización en el tracto cortical de la rata. Efectos similares fueron reportados por Wiggins y cols ('76), en animales rehabilitados nutricionalmente.

Por otro lado, el cerebelo es una de las estructuras que sufren cambios por efecto de la desnutrición, particularmente en las células de Purkinje que muestran reducción de ramas y espinas dendríticas (McConell y Berry '78) (Warren y Bedi '88), además la desnutrición produce reducción del número de células granulares en las capas interna y externa del cerebelo de la rata (Barnes y Altman '73). Lewis y cols ('75) encontraron incrementada la actividad mitótica en la capa granular externa en las ratas desnutridas de 21 días de nacidas, prolongándose la síntesis de ADN.

Todas estas alteraciones tanto a nivel químico como morfológico se manifiestan en diferentes parámetros; es así como vemos que por una parte la desnutrición causa en algunos casos incrementos y en otros reducciones del metabolismo del sistema nervioso central (SNC).

Neurotransmisores y desnutrición

Es indudable que la composición de los alimentos puede influir sobre la síntesis de algunos neurotransmisores, esto se ha encontrado para acetilcolina (ACh) y algunas aminas como serotonina (5-HT), noradrenalina (NA) y dopamina (DA). Por lo que la mayor parte de los estudios de los efectos de la desnutrición sobre neurotransmisores cerebrales ha estado enfocado sobre NA, DA, ACh, 5-HT e histamina.

Morgane y cols, ('78) estudiaron el efecto de una dieta con un porcentaje

bajo de proteínas (8% de caseína) durante los periodos de desarrollo pre y posnatal. Analizaron las concentraciones de 5-HT, ácido 5-hidroindolacético (5-HIAA) y NA en el telencéfalo, en la región del puente y médula espinal, en el diencefalo, en el cerebro medio y en el cerebelo.

En general, las concentraciones más altas para estos neurotransmisores se encontraron en los animales desnutridos. Para 5-HT y 5-HIAA los aumentos más notables se observaron en el diencefalo, en la región puente-médula y telencéfalo. En cambio para NA, los cambios más significativos ocurrieron en el cerebro medio, en la región puente-médula y en el cerebelo.

El efecto de la desnutrición sobre 5-HT se pudo apreciar desde los primeros días posnatales. En cambio, los aumentos en la concentración de NA, con excepción del día cero, se aprecian después de los 60 días. Se encontró además que la desnutrición afectó principalmente a los cuerpos celulares, dado que las regiones donde ocurrieron los cambios más importantes en las concentraciones de 5-HT y NA fueron el cerebro medio y el tallo cerebral.

Se han estudiado también la dopamina y la histamina en relación a la desnutrición. Enwonwu y Worthington ('74), encontraron que en las ratas y cobayos desnutridos después de 3-7 semanas de vida, se produce un aumento significativo de histamina cerebral. Ramanamurthy ('77), encontró cambios de concentración de 5-HT, DA y NA desde el comienzo de la gestación en ratas que recibieron una dieta baja en calorías y proteínas. Durante los primeros 10 días sólo pudieron detectar niveles medibles de DA, pero no de 5-HT o de NA. Sin embargo, después de los 15 días de vida posnatal se encontró un aumento de la concentración de estas aminas hasta el día 28. Las diferencias entre animales desnutridos y controles sólo se encontraron desde los 14 días de vida posnatal. A partir de esta edad se encontró que la concentración de las tres aminas estaba disminuida en los animales con desnutrición, en comparación con los grupos

controles. Estos hallazgos se han confirmado por los estudios de Wiggins y Enna ('84) en los que se encontró también una disminución de aminas biogénicas en animales desnutridos. Aunque Stern y cols ('75) y Morgane et al ('78), reportaron aumentos en las concentraciones de 5-HT y 5-HIAA en ratas desnutridas en diferentes regiones cerebrales, principalmente en el diencéfalo y el tallo cerebral.

Stern y cols, ('75), concuerdan en que la desnutrición proteínica hace que las aminas como la 5-HT, norepinefrina y el 5-HIAA, aumenten en el cerebro. La distribución regional del aumento de los niveles de indoles en la rata desnutrida confirman lo reportado por Sobotka y cols, ('74).

Por su parte, Hernández ('76,'89) y Hernández et al ('93), describen que los cambios en la concentración de 5-HT en los cerebros de ratas desnutridas pueden ser secundarios a las alteraciones en la disponibilidad de sustratos para su síntesis. El nivel plasmático de triptófano determina la concentración de triptófano cerebral y la síntesis de serotonina. Miller y cols, ('77a,'78b), Shoemaker y Wurtman ('71) han reportado que los niveles tanto de indolaminas como de catecolaminas se encuentran incrementados en los animales desnutridos a lo largo de su vida. En otros estudios en los cuales determinaron las concentraciones totales y libres del triptófano plasmático en animales con porcentajes diferentes de proteína en su dieta mostraron que el grupo desnutrido tuvo significativamente elevado el triptófano total al compararlo con el grupo control.

Por su rápida degradación es muy difícil medir las concentraciones de ACh como tal, por lo que se ha medido a través de sus enzimas, tanto precursoras como degradadoras, para evaluar su concentración a partir de la cantidad de enzima capturada. Blusztajn y Wurtman ('81), encontraron que la concentración cerebral de ACh aumenta con la edad. Por otro lado Rajalakshmi y cols.,('74), encontraron que las ratas desnutridas neonatalmente no mostraron

concentraciones alteradas de ACh cerebral a la edad del destete. Wiggins y Enna ('84), reportaron una disminución de los niveles de ACh cerebrales por efectos de la desnutrición.

Serotonina y desnutrición

La importancia que tiene la dieta en la producción del precursor de la serotonina, explicaría los cambios de sus concentraciones en animales desnutridos, los cuales pudieran deberse a alteraciones de la relación triptófano-aminoácidos libres en el plasma. Esto llevaría a un aumento del triptófano cerebral, precursor de 5-HT. El cambio de la relación triptófano-aminoácidos libres se ha explicado por un aumento de la insulina provocado por la ingestión de glúcidos. Esta hormona, además de elevar el triptófano plasmático, estimula el transporte de otros aminoácidos. El aumento de triptófano cerebral lleva a un aumento de 5-HT cerebral ya que la triptófano-hidroxilasa, enzima que cataliza la hidroxilación del triptófano a 5-hidroxitriptófano (5-HTP), no estaría saturada (Fernstrom y Wurtman '74). La 5-HT entonces resulta de la decarboxilación del 5-HTP. En la dieta, se encuentran además los ácidos grasos no esterificados, compuestos que compiten con el triptófano por los mismos lugares de ligamen en la molécula de albúmina, de modo que su aumento en la dieta puede inducir aumentos del triptófano libre (Fernstrom y Wurtman '74). Experimentalmente en ratas desnutridas con dieta hipoproteínica se ha detectado aumento del triptófano plasmático como resultante de un aumento en la concentración de ácidos grasos no esterificados o por alteración del ligamen del triptófano a la albúmina, probablemente producido por la disminución de la albúmina (Hernández '89). Aunado a la importancia que tiene la dieta en la producción del precursor de la serotonina y de ésta sobre el sueño, es importante valorarla en diferentes modelos nutricionales acoplados al estudio del sueño.

La 5-HT es sintetizada a partir del aminoácido L-triptófano, que es el sustrato primario. El triptófano del plasma procede principalmente de la dieta. El triptófano tiene una variación rítmica diaria en su concentración y es posible que ésta influya en la tasa de síntesis de la serotonina cerebral (Peroutka y cols '80).

Siguiendo la vía sintética, el triptófano se hidroxila en la posición 5 (**Fig 1**), por medio de la enzima Triptófano-hidroxilasa, siendo el producto intermedio el 5-hidroxitriptófano sobre el que actúa otra enzima que es la triptófano-descarboxilasa, que lo convierte en 5-HT o serotonina, y por acción de la enzima monoaminooxidasa (MAO), se convierte la serotonina en ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA) Mandell y Knapp ('77) (**Fig 2**).

Estudio del sueño

Tanto el sueño MOR, como el sueño de ondas lentas (SOL) y la vigilia, son fundamentalmente estados diferentes de vigilancia, determinados por variables electrográficas y fisiológicas. Además los sueños MOR y SOL se alternan durante la noche.

En el electroencefalograma (EEG) se identificaron durante el estado de vigilia ó alerta, ondas beta y theta de baja amplitud y alta frecuencia (13 a 35 Hz), acompañadas por una alta actividad electromiográfica (EMG) y movimientos oculares frecuentes.

Las etapas del SOL (4 etapas en el hombre), son tranquilas y estables fisiológicamente, en comparación con los estados de vigilia y el sueño MOR. La fase 1 está presente en cada transición entre la vigilia y el sueño y le corresponde alrededor del 5% del tiempo de sueño. La fase 2 es abundante, ya que representa más del 50% del tiempo total de sueño; en ella, se detectan algunas ondas delta, preludio del sueño lento y profundo. El tono muscular es débil y no hay movimientos oculares. Esta fase corresponde al principio del sueño

Serotonina (5-hidroxitriptamina)

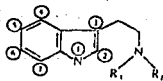


Figura 1. Estructura molecular de la serotonina

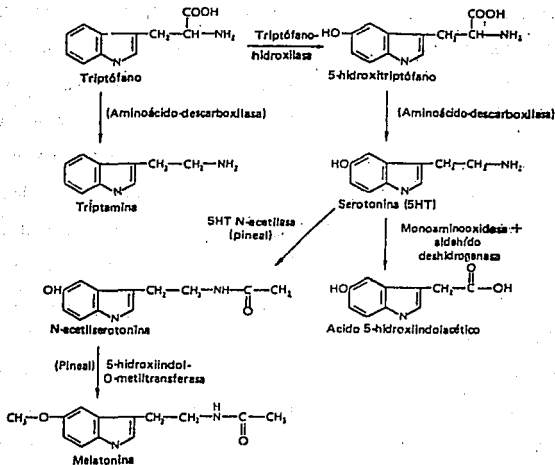


Fig. 2. Vía sintética de la serotonina (modificado de Cooper y col 1984)

propriadamente dicho. Las fases 3 y 4 constituyen el sueño lento profundo (sueño delta) y representan alrededor del 50% del sueño total. Estas fases se caracterizan por la aparición de ondas delta, ocupando al menos, un 20% del trazado. Cuando la proporción de estas ondas sobrepasa el 20% se entra en la fase 4. En el curso de las fases 3 y 4, el tono muscular es débil y la actividad es casi nula. Las frecuencias cardiaca y respiratoria tienden a ser más lentas y regulares, aunque en todas las etapas del sueño está presente cierto grado de tono muscular (Baker '85).

El sueño MOR se caracteriza por una amplia gama de cambios fisiológicos. El electromiograma (EMG), que ordinariamente se registra en los músculos submentonianos, alcanza su nivel más bajo durante el sueño MOR. La atonía es más extensa en los músculos del cuello, pero afecta todos los grupos musculares importantes. No obstante, los músculos extraoculares no están paralizados e intermitentemente ocurren movimientos oculares rápidos conjugados. La iniciación del sueño MOR también se acompaña de algunos cambios metabólicos, entre ellos un aumento de la temperatura encefálica, así como incremento del consumo de oxígeno por estructura.

El sueño MOR ocurre típicamente después de un cambio del sueño SOL de etapas 3 ó 4 a etapa 2 (Fig 3). Esta secuencia se repite durante toda la noche, en el transcurso de la cual se pueden producir esporádicamente movimientos corporales o despertares breves en el humano y va cambiando de acuerdo con la edad. Cabe señalar que a lo largo de la vida de los mamíferos, hay un cambio en duración en cada etapa del sueño en relación a la vigilia (Baker '85) (Fig 4).

El estudio del sueño ha tomado una importancia relevante en las últimas tres décadas, en las cuales se ha llegado a obtener un mejor conocimiento de los mecanismos y acciones cerebrales que lo controlan; sin embargo, quedan aún muchas incógnitas por resolver sobre sus posibles funciones. Estudios realizados

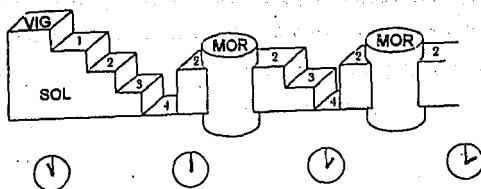


Fig.3 Alternancia de los estados del sueño en el humano (modificado de Borbély 1983)

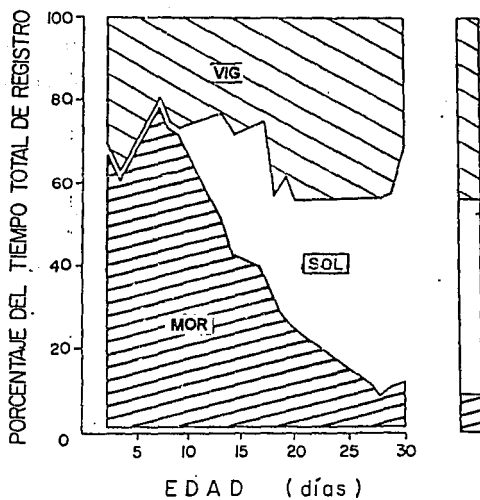


Fig.4 Desarrollo de los estados de vigilia (Vig, Sol, y Mor) durante el primer mes de vida de la rata (según Jouvet-Mournier y cols 1970)

por Gaddum en 1961 citados y retomados por Drucker-Colín ('76) indican que existen correlaciones entre eventos bioquímicos y estados fisiológicos. Además se han venido haciendo estudios relacionados con dichos eventos para ver los efectos que causa la desnutrición sobre éstos (Cintra y col '86).

Importancia de la privación de sueño

La privación del sueño se ha usado como una herramienta poderosa para estudiar sus funciones y se ha basado en uno de los fundamentos de la fisiología: privar al cuerpo de "cierto" órgano para conocer su función.

Los síntomas observados más comúnmente en los estudios realizados sobre la privación prolongada de sueño en humanos son: fatiga, irritabilidad, delirio de persecución, deficiencias en la atención y trastornos de la percepción. Cuando se somete a las personas a privación de sueño por un período prolongado, éstas muestran posteriormente un aumento en la duración de algunas fases del sueño, efecto de "rebote" vgr. incrementos en los porcentajes de las etapas 4 del sueño SOL y del estado de sueño MOR (Kales y cols., '70).

Cuando se somete a personas a privación del sueño MOR, tienden a pasar al MOR más pronto durante el transcurso de la noche, y se vuelve cada vez más difícil prevenir su ocurrencia. Cuando se suspende la privación del sueño MOR y se permite a la persona un sueño ininterrumpido, ésta presenta un aumento en la proporción de sueño MOR o un "rebote" de sueño MOR. Este rebote con frecuencia es intensamente fásico, con aumento de la densidad de los movimientos oculares rápidos y puede ser descrito por la persona como sueño perturbado o no restaurador. La privación selectiva de las etapas 3 y 4 del SOL, causa rebote del sueño de ondas lentas, pero sin otras consecuencias importantes (Agnew y cols.'64).

Los estudios sobre privación del sueño en humanos han dado origen a

algunos procedimientos clínicos interesantes. Los estudios de privación prolongada de sueño MOR realizados en animales han producido resultados más espectaculares, entre ellos se han observado aumentos tanto del comportamiento agresivo (Morden y cols, '68) y de la actividad sexual (Dement '65), como cambios en el aprendizaje (Stern '70). En las ratas, la privación total de sueño prolongada causa hiperagresividad, cese del comportamiento de acicalamiento, pérdida extrema de peso, hipotermia e hipersensibilidad a los estímulos auditivos (Sitaram y cols '79). Estas ratas mueren después de un promedio de 13 días de privación total de sueño prolongado (límites 3 a 33 días). La privación selectiva del sueño MOR tiene consecuencias similares, pero los síntomas evolucionan gradualmente y la muerte ocurre más tarde (de 27 a 45 días).

El ciclo sueño-vigilia y su alternancia durante el nictémero (escala de 0 a 24 horas, en donde el cero es tomado a conveniencia del estudio) en los roedores como la rata son bien conocidos, por lo que se ha tomado como índice de integridad funcional.

Ritmos circádicos

Se sabe que todos los seres vivos poseen ritmicidad circádica (intervalo de aproximadamente 24 horas) o reloj biológico por medio del cual se regulan muchas de sus funciones fisiológicas más importantes. Esto se ha visto por estudios realizados tanto en plantas como en animales, principalmente en roedores y en otras especies como son los felinos y el hombre mismo.

El ciclo del sueño y la vigilia probablemente es el resultado de múltiples ritmos biológicos que giran en torno a un intervalo de aproximadamente veinticuatro horas. El término circádico del latín *circa*= cercano, *dies*= día indica un intervalo cercano a 24 horas.

Es poco lo que se sabe acerca de las variaciones cíclicas en el hombre, pero

se ha subrayado su importancia potencial para la medicina y para la comprensión de la conducta. Se ha demostrado en los laboratorios que los animales reaccionan de manera diferente a drogas específicas, a temperaturas extremas, a los rayos ultravioleta y a los rayos X según el momento del día en que se les presenten.

Las ratas, que son animales de hábitos nocturnos, se usan a menudo en estos experimentos, las horas de luz diurna son su período inactivo aunque la rata es en realidad un animal policíclico en relación al sueño que también duerme durante la fase oscura. Según Borbély ('78) la rata presenta una actividad discontinua y períodos de máxima actividad al inicio y al término de la fase de oscuridad (**Fig 5**), en tanto que al inicio de la fase de luz encuentra su nivel mínimo de actividad motora (Borbély y Neuhaus '79 y Kleitman '63).

Según Borbély ('93) Hay indicaciones de que los ritmos circadianos puedan generarse en los propios núcleos supraquiasmáticos. Siguen en pie varias cuestiones en las cuales se discute ahora si en los mamíferos más desarrollados hay estructuras que, aparte de los mencionados núcleos, generen ritmos o al menos, si se estropea el reloj principal, puedan actuar como relojes de remplazo.

Papel del núcleo supraquiasmático

Se ha identificado al núcleo supraquiasmático (NSQ) del hipotálamo como un oscilador importante, con funciones de marcapasos que interviene en el control de diversos ciclos como la secreción de hormonas, la temperatura corporal, la conducta alimenticia, la ingesta de agua, la actividad locomotora y la regulación del ciclo sueño-vigilia (Aschoff y cols, '82).

El NSQ en la rata está situado en la posición anterior y ventral del hipotálamo (**Fig 6**), tiene una disposición bilateral al tercer ventrículo y sobre el quiasma óptico, según los atlas de Paxinos y Watson ('82) y Paxinos ('85).

Por medio de técnicas inmunocitoquímicas se ha comprobado la existencia de algunos neurotransmisores en el NSQ como: el péptido intestinal vasoactivo (PIV), la vasopresina (VP), la serotonina (5-HT) y el péptido pancreático aviar (PPA). De acuerdo a estudios enzimáticos se ha establecido la presencia de otras sustancias bioactivas dentro del NSQ, como los receptores colinérgicos y la enzima precursora de la acetilcolina, la colinacetiltransferasa (CAT), lo que hace pensar que la acetilcolina (Ach) sea un neurotransmisor dentro de esta región (Segal '78). Van den Pol y Tzujimoto ('85) por métodos inmunohistoquímicos, demostraron la presencia en el NSQ de colecistoquinina, prolactina, sustancia P, neurotensina, etc.

La gran cantidad de neurotransmisores localizados en el NSQ da una idea de la organización compleja axonal del mismo. Además para estudiar su ritmicidad circádica se ha intentado determinar el mecanismo por el cual llegan los estímulos luminosos al núcleo y se han descrito en los roedores tres proyecciones aferentes al NSQ. La primera y más importante, se origina en la retina y recorre los nervios ópticos hacia el quiasma óptico para llegar al NSQ, que se conoce como vía retinohipotalámica (RHT) y la cual, según estudios experimentales es esencial para la sincronización de los ritmos circadianos (Moore '83). La vía RHT está dispuesta de manera bilateral y presenta la misma disposición en la mayoría de los mamíferos incluyendo al hombre, (Hendrickson y cols '72, May y cols '85). Además en estudios autorradiográficos se ha identificado una proyección retinal indirecta desde la porción ventral del núcleo geniculado lateral (NGL), considerado como el núcleo terminal de las fibras retinales que se orientan hacia el NSQ (Ribak y Peters '75).

En el NSQ se observa una proyección proveniente de los núcleos del rafe que posiblemente sea la responsable de los niveles elevados de serotonina (Saavedra y cols '74). Además, Foote y cols ('78) han encontrado que el complejo del rafe,

recibe una proyección retinal, y que a su vez el complejo del rafe proporciona proyecciones serotoninérgicas abundantes hacia el NSQ. Azmitia y Segal (78a), demostraron que los núcleos del rafe proyectan a la porción ventral del NGL, por lo que podemos decir que hay una vía directa RHT y dos indirectas NGL ventral y núcleos del rafe (Fig 7).

Núcleo rafe dorsal

Al NRD se le identifica como el grupo B7 según la clasificación de Dahlström y Fuxe ('64) y se extiende en su polo caudal (Fig 8) desde el complejo oculomotor del puente. En su posición rostral limita con la sustancia gris periventricular. Todo el NRD corre dorsal a los fascículos longitudinales mediales del tallo cerebral según Azmitia ('78b) y Tork ('85).

Los estudios de fluorescencia de Dahlström y Fuxe ('64) indican que en el cerebro de la rata, la serotonina se localiza en neuronas extensamente repartidas en el tallo cerebral e identificadas como monoaminérgicas. Por medio del método de formaldehído el cual induce fluorescencia, estos autores describen a las células serotoninérgicas como el grupo B1 al B9 en una distribución caudo-rostral.

Por diversos estudios realizados en ratas, gatos y conejos, (Brodal y cols '60, y Taber '61 y Felten y Harrigan '80), se sabe que la 5-HT se produce en los núcleos serotoninérgicos, cuya organización caudorostral se identifica como los núcleos del rafe, siendo el núcleo rafe dorsal (NRD) el principal productor de serotonina en el sistema nervioso central.

El NRD envía muchas fibras al diencéfalo y pocas a la corteza cerebral, otras descienden a la médula espinal (Fig 9), y estas últimas tienen la capacidad de suprimir el dolor. La serotonina liberada en el diencéfalo y en el cerebro desempeña casi con seguridad un papel inhibitor esencial para producir el sueño para el cual juega un papel muy importante.

Hay que señalar que la serotonina no sólo se encuentra en las células

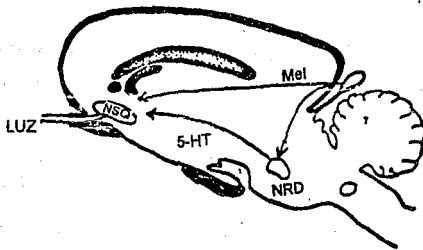


Figura 7. Proyecciones aferentes del núcleo rafe dorsal al núcleo supraquiasmático (modificado de Azmitia y cols 1978)

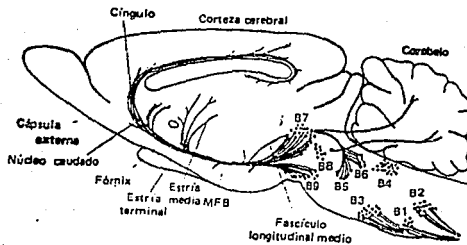


Figura 8. Localización del núcleo rafe dorsal identificado como el grupo B7 según Fuxe (modificado de Cooper y cols 1984)

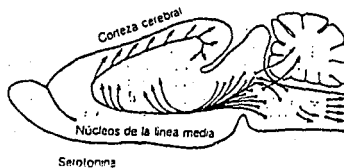


Figura 9. Aferencias del núcleo rafe dorsal hacia el diencéfalo, corteza y tallo cerebral.

nerviosas, sino que también está localizada en las plaquetas. De hecho, sólo del 1-2 % de la serotonina corporal se encuentra en el cerebro (Cooper y cols '84).

Importancia de la serotonina en el sueño

Por diversos estudios experimentales se sabe que la serotonina se involucra en la regulación de funciones como la memoria, el aprendizaje, el sueño y el control del movimiento, según Azmitia y Gannon ('86). Los estudios fluorométricos de Bogdansky y cols ('56), mostraron distribución heterogénea de la 5-HT en el SNC, además encontraron concentraciones altas de 5-HT en el mesencéfalo y en el hipotálamo, lo cual les permitió suponer el posible papel del neurotransmisor dentro del SNC. Por otra parte, las lesiones en los centros serotoninérgicos, principalmente en el NRD, producen un periodo de insomnio prolongado, en experimentos en los cuales se impide la formación de serotonina por medio de un inhibidor enzimático llamado paraclorofenilalanina (PCPA), el cual impide la formación de serotonina consiguiendo así un prolongado insomnio en animales (Jouvet '72), una posterior administración del precursor 5-hidroxitriptófano (5-HTP) sintetizó serotonina permitiendo a los animales dormir pasajeramente. En experimentos realizados por Koella y cols ('74), en los cuales se inyectó 5-HTP en gatos y conejos, observaron que se prolongó marcadamente el SOL. En el hombre, se han administrado dosis de entre 1 y 10 g de L-triptófano, produciendo un incremento del tiempo de sueño, principalmente de SOL (Hartman '68). Por otro lado, inyecciones de cantidades pequeñas de serotonina (30-50 ng) en el cuarto ventrículo en gatos indujeron una conducta electrográfica de marcados signos de sueño, apareciendo un periodo corto de SOL, después de un corto intervalo aparece un segundo periodo de SOL hasta de casi la totalidad del tiempo de sueño (Koella '74). Las experiencias de los trabajos relacionados con serotonina y sueño, indican que la serotonina desempeña un papel importante en la

regulación del sueño; datos neurofisiológicos han mostrado que las células del rafe descargan al máximo durante la vigilia y disminuyen con el sueño, alcanzando valores mínimos en el sueño desincronizado (MOR) Jouvet ('88). Las concentraciones extracelulares de 5-HIAA medidas en hipotálamo anterior y posterior por voltametría *in vivo* han reportado un incremento de ésta con la vigilia y su disminución con el sueño (Cespuglio '90). Se ha relacionado principalmente al NRD con el SOL, ya que se cree que el mecanismo de disparo se encuentra en éste, en tanto que estudios *in vivo* han relacionado a algunos péptidos con propiedades hipnogénicas -como el VIP o polipéptido intestinal vasoactivo y al CLIP o péptido de corticotropina del lóbulo intermedio- en la inducción del SOL (El Kafi y col '94); estos estudios sugieren que el NRD es un "blanco" para la expresión de sustancias hipnogénicas. Los resultados de estos estudios indican que la 5-HT no media directamente la generación del sueño, sin embargo es necesaria para esta función; estos estudios soportan la hipótesis de que la 5-HT, la cual es liberada durante la vigilia, puede inducir la síntesis y liberación de factores hipnogénicos que podrían ser responsables secundarios de la inducción del sueño (Imeri '94).

En lo que se refiere al sueño MOR, se ha mostrado que las estructuras encargadas del mantenimiento de éste se encuentran en el área de los núcleos tegmentales colinérgicos como son el laterodorsal y el pedúnculo pontino (Kayama '92 y Shouse '92). Por otro lado Hobson propone la hipótesis de interacción recíproca en donde el tallo cerebral contiene dos poblaciones de neuronas; una población (colinérgica) llega a ser activa durante el sueño MOR; a la cual llama "REM-on"; mientras la otra población (células serotoninérgicas y noradrenérgicas) llega a ser de tipo inhibitoria llamandola "REM-off"; la base de esta interacción recíproca es la diferencia en las propiedades químicas y eléctricas de estas neuronas (Hobson'89). Por lo que podríamos decir que la serotonina es importante

en la regulación tanto del SOL como del sueño MOR.

Sueño y desnutrición

Los estudios de los potenciales evocados como indicadores de la alteración nerviosa central por la desnutrición perinatal, desarrollados por Salas y Cintra ('73), han mostrado que la desnutrición temprana afecta el desarrollo de ambos sistemas talamocorticales de proyección, específicos y no específicos. Según los estudios electrocorticográficos realizados por Forbes y cols ('77) detectaron en registros de 24 hrs, de ratas desnutridas pre y posnatalmente con una dieta hipoproteínica del 8%, cambios en la distribución de las fases de sueño, en especial durante la fase de oscuridad, donde aumentó la duración del sueño de movimientos oculares rápidos (MOR).

Por su parte Salas y cols ('83), observaron que los ciclos de sueño en animales desnutridos se interrumpen constantemente y que la fase de vigilia aumenta, previamente se encontró también retraso en la adquisición del patrón adulto de la actividad eléctrica espontánea (EEG) (Salas y Cintra '75).

Teniendo en cuenta los antecedentes y tomando al sueño como índice de integración funcional en animales normales y desnutridos jóvenes Cintra y col en '86 realizaron estudios de privación total de sueño (por la técnica de locomoción forzada) y de privación selectiva de sueño MOR en sujetos control y desnutridos de 30 y 60 días de edad que correspondieron a: día basal 1, día 2 privación de sueño y 3 días de recuperación para analizar las fases de actividad y de reposo de los estados de vigilancia y su ritmicidad circádica. En estos, se encontró que a los 30 días de edad, en las ratas desnutridas con privación total de sueño por 24 hrs, disminuyó la vigilia y se incrementó el SOL, tanto en fase de luz como en la fase oscura; al día basal 1 y se incrementó el sueño MOR en la fase oscura, al día 4 aumentó la vigilia en la fase de luz y disminuyó en la fase de oscuridad, aumentando el SOL en la fase oscura en tanto que el sueño MOR disminuyó en

la fase de luz de los días 3 al 5, mostrando un incremento menor compensatorio o de "rebote". A los 60 días de edad, los animales desnutridos mostraron reducción de la vigilia y aumentos en el SOL y el sueño MOR en la fase de actividad, así como disminución del sueño MOR en la fase de reposo. En el día 3 se encontró incremento en el SOL y disminución del sueño MOR en las ratas desnutridas en la fase de reposo; en el día 5 hubo disminución de la vigilia en la fase de actividad. En los días 3,4 y 5 disminuyó el sueño MOR en la fase de reposo y aumentó en el día 5 en la fase de actividad. En general los valores promedio de la amplitud del ritmo circádico de los estados de vigilancia fueron mayores en los animales desnutridos que en los animales control. El análisis del patrón circádico de cada uno de los estados de vigilancia, reveló que la amplitud de cada uno de ellos durante los momentos de cambio, alcanza sus valores máximo o mínimo en un tiempo menor en los animales desnutridos que en los controles, lo que sugiere que éstos últimos se anticipen a dichos cambios, aun cuando tardan más en llegar a su nuevo estado de vigilancia que los desnutridos (Cintra y col '88). Por otro lado en experimentos hechos con privación selectiva de sueño MOR (por el método de la plataforma), se encontró un patrón similar al registrado con privación total de sueño por la técnica de locomoción forzada. Estos trabajos sugieren que la desnutrición afecta la distribución circádica de los estados de vigilancia en las fases de actividad o de reposo, e interfiere con la cantidad promedio de cada estado de vigilancia que se encontró durante cada una de estas fases. Observándose además cambios o inversiones de fase, tanto antes como después de la privación de sueño. Se ha encontrado que los animales desnutridos tienen aumentado el SOL y el MOR durante la fase de actividad, por lo que se sugiere que el mecanismo fisiológico compensatorio de sueño MOR o "rebote" está reducido por la desnutrición y las ratas desnutridas requieren más días que las ratas control para recuperar los valores promedio del día basal. Estos resultados

indican que la desnutrición quizás altere a las estructuras que controlan las funciones homeostáticas de los estados de vigilia y las que regulan su ritmicidad circádica.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En base a estos estudios y conociendo los efectos de la desnutrición a nivel estructural, nos surgió la idea de conocer los cambios a nivel de los neurotransmisores en estructuras específicas, ya que en estudios previos se han realizado pero a nivel de áreas y no de núcleos cerebrales específicos que se reconocen como reguladores en la integración del ciclo sueño-vigilia como son el NRD, productor principal de serotonina en el cerebro y el NSQ como un oscilador importante de los ritmos circádicos. Para dar continuidad a estos trabajos, se hicieron mediciones de 5-HT y 5-HIAA en las estructuras antes mencionadas a los 60 días después del nacimiento, edad en la cual se sabe que se han desarrollado las estructuras relacionadas con el sueño. Con el fin de detectar si se revierten los efectos de la desnutrición en la concentración de 5-HT y 5-HIAA, se trabajó con un modelo de rehabilitación posnatal, lo cual no se había propuesto en trabajos anteriores relacionados con sueño.

HIPOTESIS

1) En los animales desnutridos cuyos niveles de 5-HT se encuentran elevados al ser privados de sueño se alteran los perfiles basales del ciclo sueño-vigilia, así como en la fase de recuperación siguiente a la privación total de 24 hrs de sueño, por lo tanto, la vigilia forzada aunada a la desnutrición producirá un efecto de potencialización que se reflejará tanto en el aumento de la concentración de 5-HT como de su metabolito 5-HIAA en el NRD.

2) La desnutrición ocasiona retrasos de fase en los estados de vigilancia (vigilia, SOL y sueño MÓR) , lo que sugiere un daño funcional importante en aquellas estructuras que regulan tanto el sueño como su ritmicidad circádica. Así, al evaluar en NSQ (oscilador de dichos ritmos) se encontrarán elevados en los animales desnutridos los niveles de 5-HT y su metabolito por este retraso de fase.

3) Así, si la desnutrición pre y posnatal produce daños importantes en las concentraciones de aminas biogénicas en el cerebro, entonces la rehabilitación nutricional posnatal revertirá los niveles basales de serotonina y de su metabolito tanto en el NRD como en el NSQ.

OBJETIVOS GENERALES

Determinar en animales control, desnutridos y rehabilitados de 60 días de edad las concentraciones de serotonina y su metabolito, después de 24 hrs de privación total de sueño, en núcleos cerebrales específicos como son: el NSQ y el NRD.

Establecer las comparaciones entre los núcleos rafe dorsal y supraquiasmático de las concentraciones de 5-HT y 5-HIAA en animales control, desnutridos y rehabilitados.

MATERIAL Y METODOS

Animales

Se utilizaron 30 ratas macho de la cepa Sprague-Dawley de 60 días de edad de tres condiciones nutricionales: desnutridas (6/6% de caseína), rehabilitadas (6/25%) y controles (25/25%), de las cuales se tomaron 15 animales

de cada grupo para privación y 15 sin privación de sueño, para luego determinar en ambos grupos las concentraciones de 5-HT y 5-HIAA en los núcleos supraquiasmáticos y rafe dorsal.

Reproducción

Estas ratas se obtuvieron de la cruce de 30 ratas hembras y 10 machos de la cepa Sprague-Dawley (**Fig 10**). Las hembras de 90 a 100 días de edad con un peso de 250 a 300 g, se mantuvieron en condiciones de luz-oscuridad 12:12h, el período de luz inició a las 8 a.m., la temperatura ambiental fluctuó de 22 a 24 grados centígrados, la humedad relativa de 40 a 50% y se mantuvo a los animales con libre acceso al agua y alimento.

Diez hembras fueron alimentadas con una dieta de 6% de caseína (madres desnutridas), diez hembras con una dieta de 25% de caseína (madres control) y 10 hembras nodrizas (**Tabla 1**), durante cinco semanas antes del apareamiento.

Después de este período, se introdujo un macho en cada caja conteniendo 3 hembras a las cuales se les puso una marca con violeta de cresilo para llevar un registro individual. Para determinar el día de gestación, se efectuaron frotis vaginales cada mañana, con el propósito de detectar la presencia de espermatozoides. De acuerdo a los datos registrados, todas las hembras que presentaron frotis positivos, fueron separadas en cajas de plástico de manera individual respecto a la dieta correspondiente. Todas las ratas preñadas continuaron consumiendo la misma dieta nutricional durante el período de gestación. Al momento del parto, las camadas nacidas en el mismo día y de la misma dieta nutricional fueron pesadas y sexadas, y se mezclaron entre sí. Con el fin de obtener camadas genéticamente heterogéneas, a cada hembra se le asignaron 4 crías hembras y 4 machos, las crías descendientes de madres desnutridas siguieron con el mismo tratamiento para obtener animales con

METODOS
30 HEMBRAS
(SPRAGUE/DAWLEY)

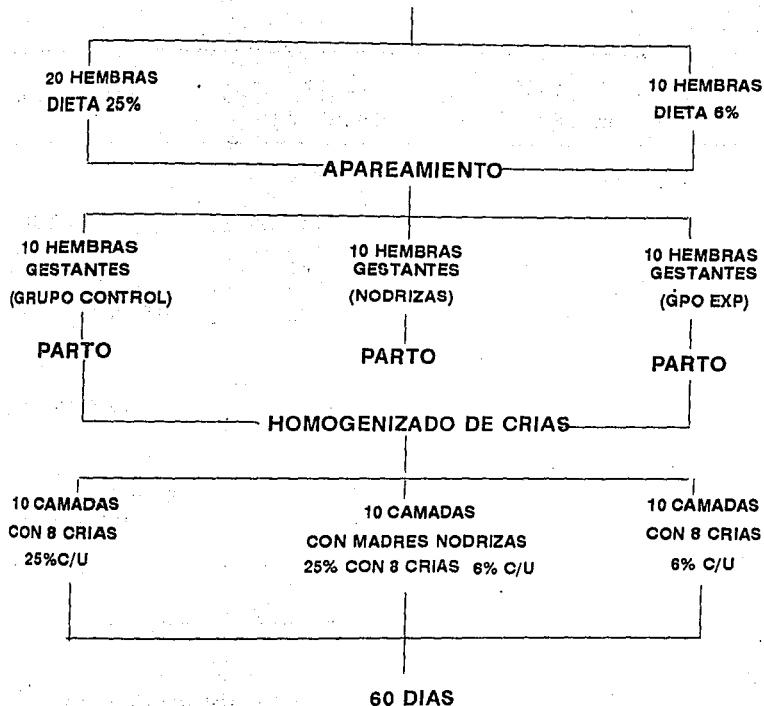


Figura 10. Diagrama del método de cruce y obtención de las camadas hasta los 60 días de edad .

TABLA I

Composición Nutricional de las Dietas

Componente	Dieta * 25% Caseína	Dieta * 6% Caseína	Dieta
PROTEINA	21.8	5.3	26.3
GRASA	15.4	15.0	7.1
CARBOHIDRATO	50.9	68.9	42.9
SALES	4.7	4.0 ⁺	3.5
VITAMINAS	1.0	1.0	0.3
AGUA	2.2	1.2	9.6
COMPONENTE NO NUTRITIVO	4.2	4.2	10.3
Kcal/g	4.3	4.3	3.0

* Complementación con L-metionina (0.4%) debido a la ausencia de éste aminoácido esencial en la caseína.

+ Complementación con fosfato de calcio monobásico (0.6%) y - carbonato de zinc (0.001%) a la mezcla de sales en ésta dieta para mantener éstos minerales a niveles encontrados en otras dietas.

desnutrición severa, las madres siguieron con una dieta de 6% de caseína. Por otro lado para obtener animales rehabilitados, las crías con desnutrición prenatal se asignaron a madres nodrizas con una dieta de 25% de caseína para su rehabilitación nutricional. Finalmente se obtuvieron 10 camadas desnutridas cada una con 8 crías ,10 camadas control también con 8 crías cada una y 10 camadas con 8 crías rehabilitadas. Se registró el peso corporal de las madres y de cada crío cada tercer día, hasta el destete a los 21 días de edad. En esa edad, se alojaron 4 animales en cada caja, los cuales fueron separados por sexo y condición nutricional.

Técnica de HPLC

La **Cromatografía de Líquidos de Alta Presión ó Alta Resolución (HPLC)**, es una de las herramientas de la química analítica que ha tenido auge en los últimos años por su precisión en las mediciones. Está constituida (**Fig 11**) por: el reservorio, la bomba/gradiente de elución, la cámara de inyección ó inyector, la columna, un detector (en este caso es un detector electroquímico), un colector y un registrador de datos.

La **cromatografía** es un método de separación; se deben degasificar los solventes y la fase móvil, con el fin de eliminar los gases disueltos, como el oxígeno (O₂), para reducir las posibilidades de formación de burbujas en la bomba y en el detector durante la operación, además de prevenir reacciones entre los solventes y de cualquiera de ellos con la fase estacionaria en la columna. Para degasificar un solvente es necesario aplicar vacío con agitación vigorosa, o utilizar un baño de ultrasonido; este paso es muy importante para no ocasionar cambios de concentración de la muestra o romper el equilibrio de los solventes. Para poder llevar a cabo la separación por HPLC, de una muestra, el primer paso a seguir es disolver dicha muestra en un solvente apropiado, el cual en forma ideal debería ser idéntico a la fase móvil. A continuación la muestra se

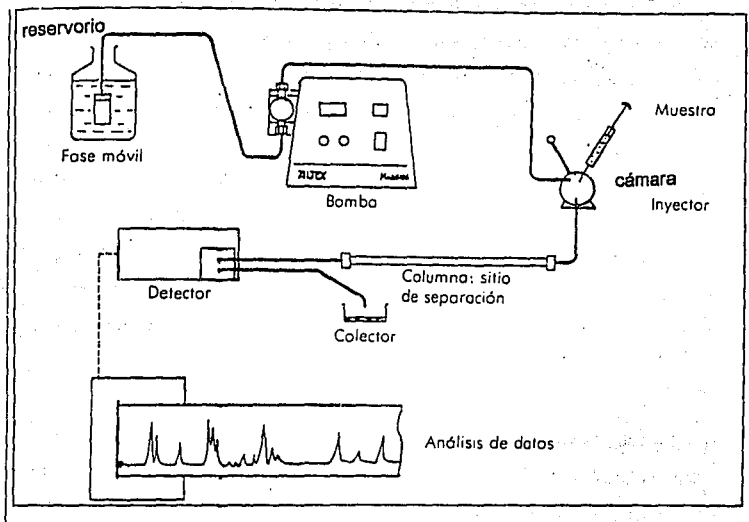


Figura 11. Principales componentes de un HPLC (modificado de la revista Pharma 1990)

introduce por medio de un mecanismo inyector en la parte superior de la columna. La muestra se mueve dentro de la columna por un flujo continuo de fase móvil que es impulsado por una bomba. Algunos componentes de la muestra viajan por la columna más lentamente que otros; los componentes que tienen más afinidad por la columna, tardan más en salir de la misma. Posteriormente pasa la muestra por un detector, que en el caso de las aminas se recomienda que sea electroquímico; la detección electroquímica se basa en la medición de un número de electrones requeridos para oxidar o para reducir un soluto en un electrodo según Mefford y Barchas ('80) y Seegal y cols ('86).

Reactivos: ácido cítrico 0.1M, acetato de sodio 0.1M, metanol-agua 80:20, metanol, etanol, acetonitrilo, tetrahidrofurano, ácido perclórico 0.1N, kit estándar de referencia para serotonina.

PROCEDIMIENTO

Los animales se seleccionaron al azar para las determinaciones por medio de HPLC. Se utilizaron 10 animales macho de cada condición experimental (6/6%, 6/25% y 25/25%) y de 60 días de edad, obteniendo un total de 30 animales para el estudio. Un grupo de 15 animales, 5 de cada condición, sirvieron como controles, desnutridos y rehabilitados y se les decapitó sin privarlos de sueño. Otro grupo de 15 animales se sometieron a privación de sueño, durante 24 horas, al final de las cuales fueron decapitados para procesar el tejido.

Método para privación de sueño

El mecanismo de privación es por locomoción forzada por medio de un cilindro rotatorio, formado por una serie de discos de acrílico de 32 cm de diámetro cubiertos por una malla de alambre. Un motor hace rotar al cilindro a una velocidad de 2.5 mm/seg (**Fig 12**). Los animales se ponen en el cilindro que rota lo que no les permite a las ratas dormir mientras estén en él. A este proceso se

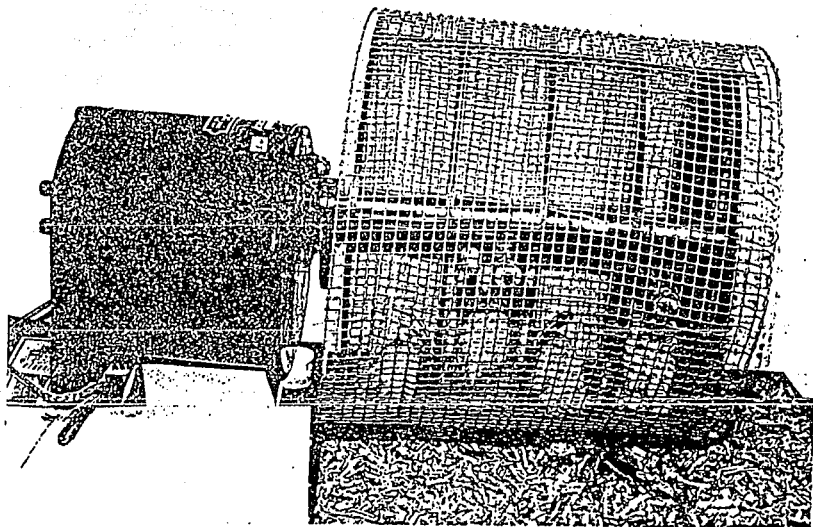


Figura 12. Cilindro rotatorio empleado para la privación de sueño en roedores (modificado de Galván 1993)

sometieron de 8:00 hrs a 8:00 hrs obteniendo un total de 24 hrs de privación de sueño. Cumplido este tiempo se sacrificaron.

Procesamiento del tejido

Para la determinación de la actividad de la serotonina se pesaron primero los tubos Eppendorf que se utilizaron en el experimento, para restar después el peso del tubo vacío al del tubo con el tejido.

Después de las 24 hrs de privación de sueño, por decapitación, se les extrajo el cerebro tanto a las ratas privadas como a las no privadas de sueño (controles) y se les disecó el área supraóptica en la cual se encuentran los núcleos supraquiasmáticos y el núcleo rafe dorsal por medio de la técnica de Palkovits y col ('73) y Jacobowitz ('74), que consta de localizar el área por medio de un corte sagital en el cerebro de aproximadamente 2 mm de grosor para el NSQ y 4 mm para el NRD ver **figura 13** y poniéndolo sobre hielo seco; al tejido se le inserta una cánula de 1mm diámetro a manera de sacabocados en el área deseada, para obtener en este caso el NRD (**Figs 14 y 15**) y NSQ (**Figs 16 y 17**); previa estandarización de la localización y disección de los núcleos.

Posteriormente, el tejido se depositó en un tubo Eppendorf de 500 μ l, con 250 μ l de ácido perclórico 0.1N poniéndose a sonicar a 60 mhz por 5 segundos para hacer un homogenado, se centrifugó durante 5 minutos a 9000 rpm en una microcentrífuga, al cabo de los cuales se filtró el homogenado con un filtro swinnex con poro de 0.22 μ m, guardándose el filtrado a -70 °C en un ultracongelador para su posterior inyección al cromatógrafo cuando todas las muestras estuvieran listas (por lo regular una semana después de ser sacrificada la rata). Se prepararon todos los reactivos un día antes de la medición, en cantidad suficiente:

- Buffer de acetatos 0.1M a un pH de 4.1 (40% de ácido cítrico 0.1M / 60% de acetato de sodio 0.1M)

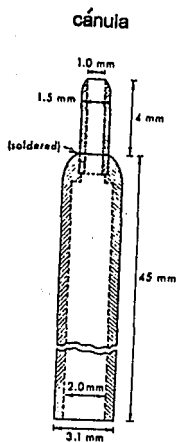
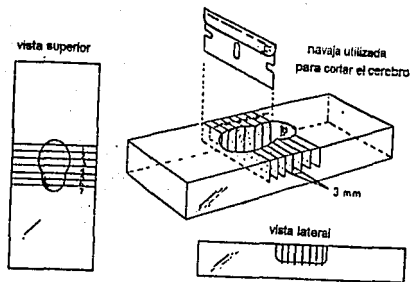
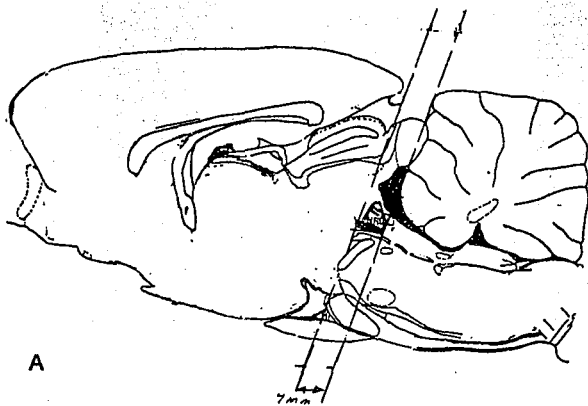
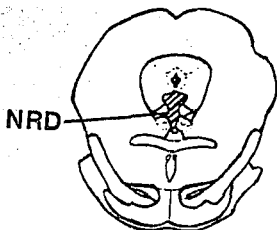


Figura 13. Metodología empleada para el muestreo de áreas cerebrales pequeñas, mediante cánulas de diferentes dimensiones de diámetro que son utilizadas como sacabocados (modificado de Jacobowitz 1974)



A



B

Figura 14. Se muestra en A el nivel del corte sagital y en B el área del NRD, utilizado en el estudio.

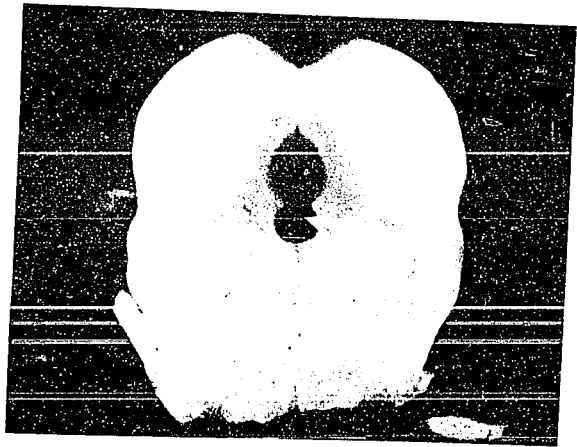
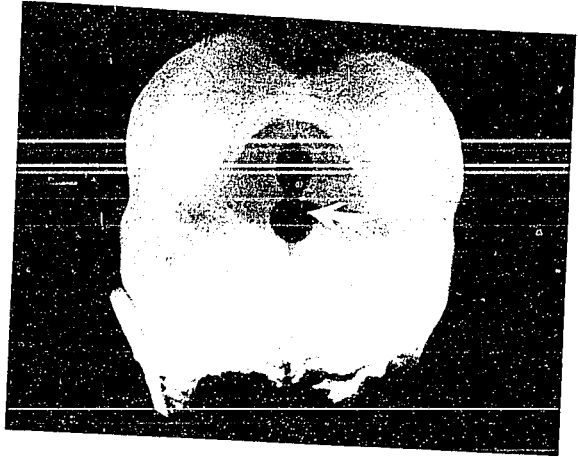
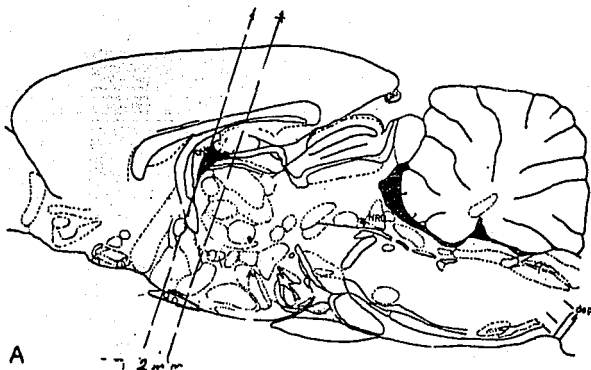
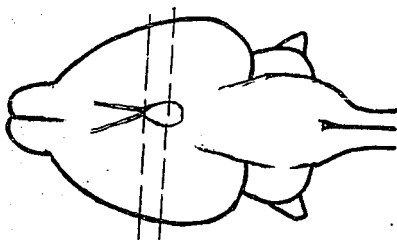


Figura 15. Cortes frontales del tejido cerebral de donde se separó el NRD.



A



B

Figura 16. Localización de los núcleos supraquiasmáticos en el cerebro de la rata. En A se muestra un corte sagital y en B el nivel ventral.

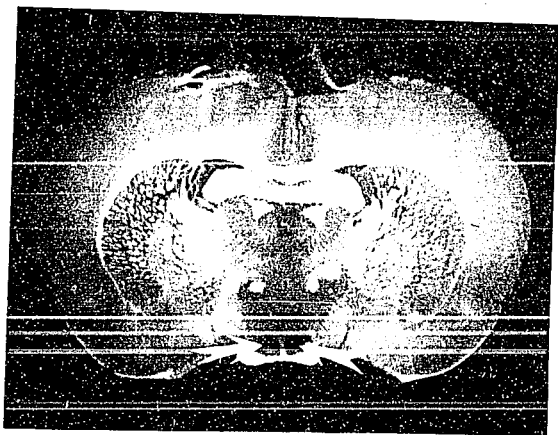
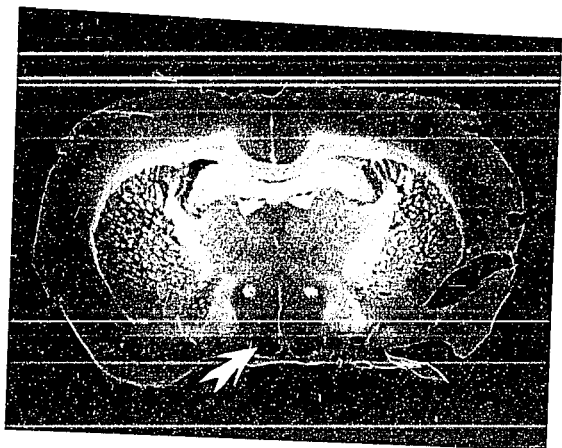


Figura 17. Cortes coronales del área ventral en donde se extrajeron los núcleos supraquiasmáticos.

- Fase móvil: buffer de acetatos-metanol en una proporción 80:20
- Acido perclórico 0.1N para la disolución y homogenización del tejido (éste en particular, preparado antes de sacrificar a las ratas)

Para el lavado de la columna del cromatógrafo se utilizaron las soluciones en el orden que sigue:

- Agua-metanol en proporción de 20:80
- Metanol grado HPLC
- Agua desionizada

Mediciones

Las mediciones se llevaron a cabo en un cromatógrafo de líquidos de alta presión o de alta resolución modelo Perkin Elmer series-3 B, con una columna de fase reversa μ Bondapak C-18 125 A 10 μ m, Waters Millipore, con detector electroquímico y electrodos de trabajo de carbón-cristal y de referencia de Ag/AgCl.

Todos los reactivos se usaron filtrados y sin gas evitando la formación de microburbujas que alteran las mediciones. Al mismo tiempo, del cromatógrafo se extrajeron las burbujas existentes en la tubería y se esperó a que se estabilizará con la fase móvil, poniendo el amperímetro en un rango de 0 a 20 nA con un potencial de 600 Volts y el horno de la columna a 45 °C.

Cuando el detector del amperímetro se estabilizó en cero (cero-nA), con una jeringa Hamilton de 50 μ l se procedió a inyectar estándares con concentraciones conocidas de indolaminas; posteriormente las muestras de cada núcleo, se inyectaron por duplicado en cantidad de 50 μ l en un inyector con un "loop" de 20 μ l, estas condiciones permitieron los registros de la cantidad de serotonina 5-HT y su metabolito 5-HIAA cuyo tiempo de retención fué de 6.20 minutos para la 5-HT y 8 minutos para el 5-HIAA. Estas determinaciones se fijaron en ambos núcleos de estudio; el NSQ y el NRD.

Análisis estadístico

El análisis estadístico de los datos fue llevado a cabo por medio de la prueba de análisis de varianza de dos vías(ANOVA).

La estrategia del análisis consistió en la comparación de los niveles de 5-HT y 5-HIAA en ambos núcleos entre los grupos de experimentación.

Las diferencias entre los niveles de 5-HT y 5HIAA entre los grupos para cada núcleo se realizaron mediante contrastes independientes (prueba de ANOVA). El nivel de significancia de error alfa correspondió a $p < 0.01$ y fue considerado como estadísticamente significativo.

RESULTADOS

El análisis de **varianza de 2 factores** mostró que la nutrición y la privación de sueño ejercieron una influencia significativa sobre los niveles de la 5-HT y el 5-HIAA medidos en el NSQ y en el NRD (**tabla 2**).

NUCLEO RAPE DORSAL

En la **figura 18A** se puede observar que los sujetos desnutridos antes de la privación de sueño, presentaron un aumento significativo ($p < 0.001$) del 40% de 5-HT en el núcleo rafe dorsal, con respecto al grupo control. El grupo de desnutridos con privación de sueño (des/p), presentó aumento significativo ($p < 0.001$) del 388% de 5-HT al ser comparado con el grupo control privado de sueño (con/p), lo cual demuestra que la desnutrición aunada a la privación de sueño produce un efecto sinérgico en la concentración de 5-HT. La comparación entre los grupos control y control con privación de sueño, muestra que la privación de sueño provoca un incremento del 47% en la concentración de 5-HT (**Fig 19A**).

La **figura 18B** muestra los niveles de 5-HIAA del núcleo rafe dorsal. Los animales desnutridos presentaron un incremento significativo ($p < 0.001$) del 42%

con respecto a sus controles, lo que también sucedió en los grupos desnutridos con privación de sueño (des/p) que presentaron un aumento significativo ($p < 0.001$) del 20% de 5-HIAA al ser comparados con sus controles. La comparación entre grupos (**Fig 19B**) no mostró diferencia significativa.

En la **figura 18C** se observó que los animales rehabilitados presentaron decremento significativo ($p < 0.001$) del 23% de 5-HT con respecto al grupo control; también los rehabilitados con privación de sueño (reh/p), presentaron una disminución significativa ($p < 0.001$) del 50% de 5-HT con respecto al grupo control. En la **figura 19C** se observó que no hubo diferencias significativas en el grupo rehabilitado con privación de sueño (reh/p) con respecto a la concentración de 5-HT. Al comparar los grupos control contra los rehabilitados se presentó una disminución significativa ($p < 0.001$) del 25% en los niveles de 5-HIAA (**Fig 18D**), también se observó una disminución significativa ($p < 0.001$) del 23% en los niveles de 5-HIAA en los rehabilitados con privación de sueño (reh/p). En la **figura 19C** se observó un aumento significativo ($p < 0.001$) del 22% de 5-HIAA en el grupo rehabilitado con privación de sueño.

NUCLEO SUPRAQUIASMÁTICO

Respecto al núcleo supraquiasmático (**Fig 20A**) también se observó que los animales desnutridos presentaron niveles significativamente elevados ($p < 0.001$) del 50% de 5-HT, con respecto al grupo control; del mismo modo la privación de sueño aunada a la desnutrición incrementó en 275% los niveles de 5-HT, mostandose nuevamente el efecto de sinergismo entre ambos factores. En la **figura 21A** se hizo la comparación entre grupos control, observándose que la privación de sueño provocó un incremento significativo ($p < 0.001$) del 77% de 5-HT.

En el núcleo supraquiasmático (**Fig 20B**) se observó que el grupo desnutrido

tuvo un incremento significativo ($p < 0.001$) del 250% de 5-HIAA con respecto al grupo control, sin embargo, no sucede lo mismo con el grupo desnutrido con privación de sueño (des/p), el cual presentó un decremento significativo ($p < 0.001$) del 21% de 5-HIAA con respecto al grupo control con privación (con/p). La comparación entre grupos mostró que la privación de sueño no altera los niveles de 5-HIAA en los animales desnutridos (**Fig 21B**).

En la **figura 20C** no se observaron diferencias significativas entre el grupo rehabilitado y su control, sin embargo después de la privación de sueño, se observó un decremento significativo ($p < 0.001$) del 50% de 5-HT en los rehabilitados. No hubo diferencias significativas entre los grupos rehabilitados, aun después de la privación de sueño (**Fig 21C**).

En la **figura 20D** se puede observar que existe un incremento significativo ($p < 0.001$) del 200% de 5-HIAA del grupo rehabilitado comparado con su control. La privación del sueño produjo una disminución significativa ($p < 0.001$) del 50% de 5-HIAA en los rehabilitados (reh/p), respecto a su control (con/p). La comparación entre grupos mostró que la privación de sueño produjo una disminución significativa ($p < 0.001$) del 16% en los rehabilitados (**Fig 21C**).

NRD

5-HT

5-HIAA

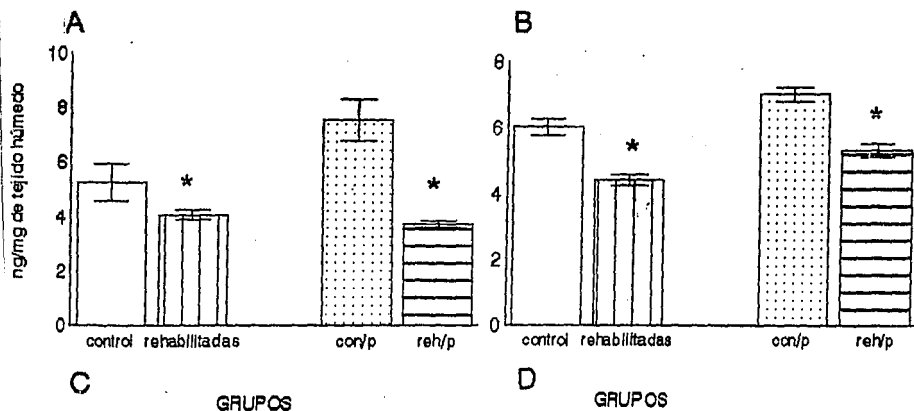
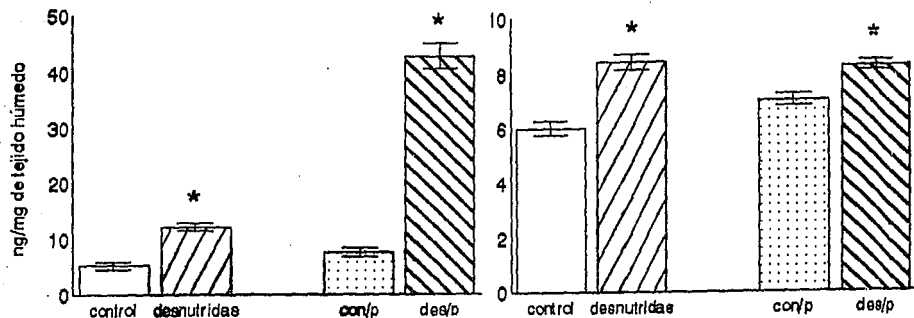


Figura 18. Niveles de 5-HT y 5-HIAA en el NRD de ratas control, desnutridas y rehabilitadas con privación de sueño (* $p < 0.001$). La desnutrición y la privación de sueño aumentan las concentraciones de 5-HT y 5-HIAA en ratas desnutridas (A y B), sin embargo la rehabilitación revierte estos efectos (C y D). con/p: control con privación de sueño; des/p: desnutridas con privación de sueño; reh/p: rehabilitadas con privación de sueño

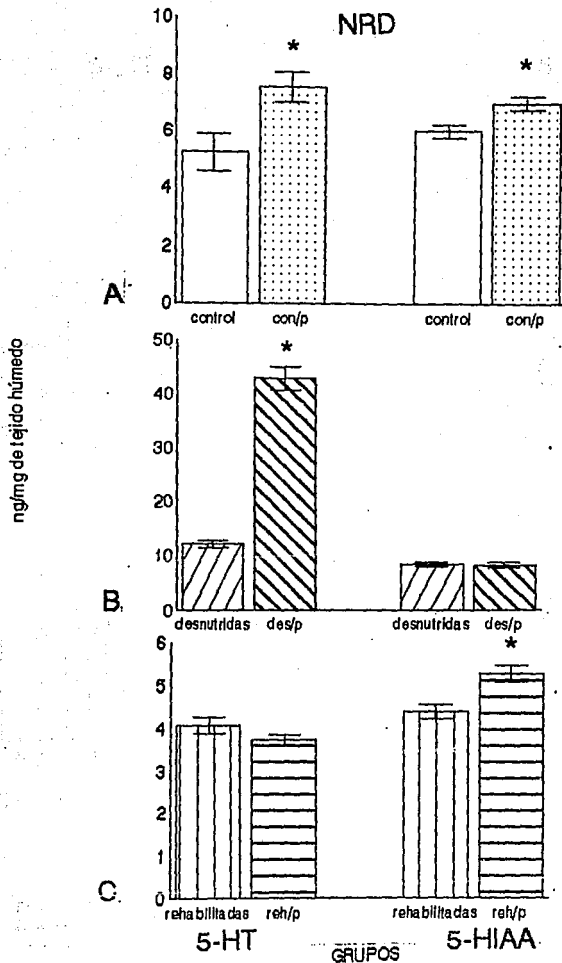
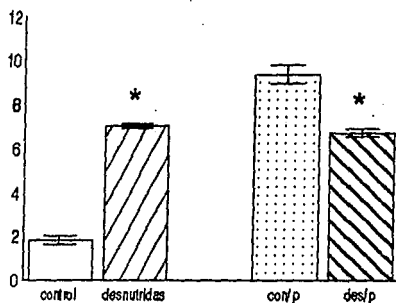
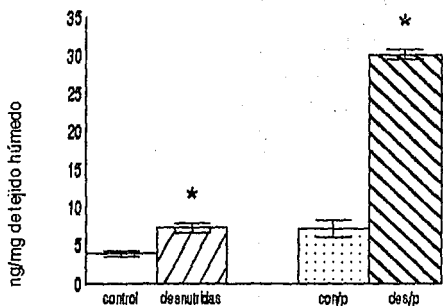


Figura 19. Comparación de los niveles de 5-HT y 5-HIAA en el NRD ($p < 0.001$). Se observa que la privación de sueño aumenta de manera significativa los niveles de 5-HT en las ratas control (A) y en las desnutridas (B). Sin embargo el aumento de la concentración de 5-HIAA sólo se observa en las ratas control y las rehabilitadas (C). con/p: control con privación de sueño; des/p: desnutridas con privación de sueño; reh/p: rehabilitadas con privación de sueño.

NSQ

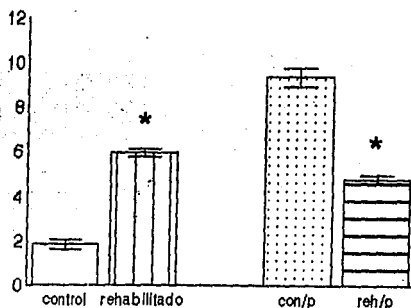
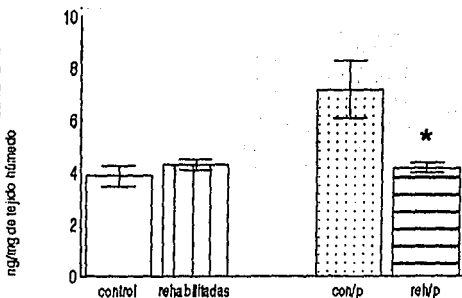
5-HT

5-HIAA



A

B



C

D

GRUPOS

GRUPOS

Figura 20. Niveles de 5-HT y 5-HIAA en el NSQ de ratas control, desnutridas y rehabilitadas con privación de sueño $^*(p < 0.001)$. La desnutrición aumenta la concentración de 5-HT aún sin privación de sueño (A), lo que no ocurre con la 5-HIAA, que disminuye con la privación de sueño (B). La rehabilitación y la privación de sueño disminuyen la concentración de 5-HT y 5-HIAA (C y D). con/p: control con privación de sueño; des/p: desnutridas con privación de sueño; reh/p: rehabilitadas con privación de sueño.

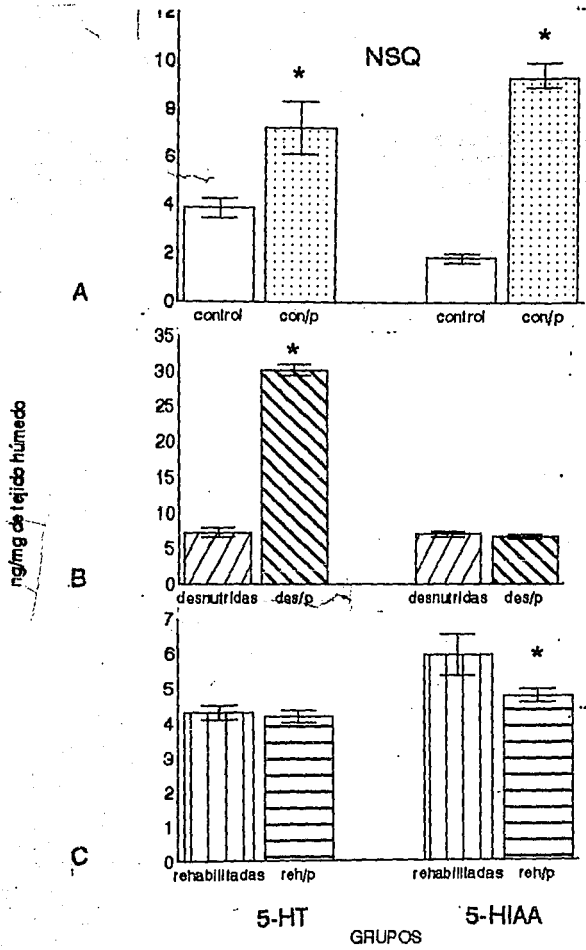


Figura 21. Comparación de los niveles de 5-HT y 5-HIAA en el NSQ * $(p < 0.001)$. Se observa que la privación de sueño aumenta los niveles de 5-HT y 5-HIAA (A), este efecto se incrementa aún más con la desnutrición, sin embargo la concentración de 5-HIAA no se ve afectada por la desnutrición y la privación de sueño (B); la rehabilitación revierte estos efectos (C). con/p: control con privación de sueño; des/p: desnutridas con privación de sueño; reh/p: rehabilitadas con privación de sueño.

TABLA II

ANALISIS DE VARIANZA PARA LOS VALORES DE 5-HT Y 5HIAA OBTENIDOS DEL NSQ Y NRD, CONSIDERANDO DOS FACTORES: NUTRICION Y PRIVACION DE SUEÑO.

NSQ-5HT

Fuentes de Varianza	grados de libertad.	valores de F	probabilidad (F)
1 Factor A	2	348.46	<0.001
2 Factor B	1	427.45	<0.001
3 Interacción A X B	2	255.34	<0.001

NRD-5HT

Fuentes de Varianza	grados de libertad.	valores de F	probabilidad (F)
1 Factor A	2	225.14	<0.001
2 Factor B	1	409.21	<0.001
3 Interacción A X B	2	180.55	<0.001

NSQ-5HIAA

Fuentes de Varianza	grados de libertad.	valores de F	probabilidad (F)
1 Factor A	2	128.06	<0.001
2 Factor B	1	27.25	<0.001
3 Interacción A X B	2	244.26	<0.001

NRD-5HIAA

Fuentes de Varianza	grados de libertad.	valores de F	probabilidad (F)
1 Factor A	2	10.32	<0.003
2 Factor B	1	127.69	<0.001
3 Interacción A X B	2	4.36	<0.017

* FACTOR A : NUTRICION

* FACTOR B : PRIVACION DE SUEÑO

DISCUSION

En el presente trabajo se analizó el efecto que tiene la desnutrición hipoproteínica durante los periodos pre y posnatal del 6% de caseína, o solo durante el periodo prenatal 6/25, en ratas de 60 días de edad. Dado que los animales desnutridos presentan elevados los niveles de aminas biogénicas, las cuales participan en los mecanismos integradores (NRD-NSQ) del sueño, en el presente estudio, aunado al efecto de la dieta, se analizó la privación de sueño sobre los niveles de serotonina (5-HT) y su metabolito ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA), en dos áreas del cerebro: núcleo rafe dorsal (NRD) y los núcleos supraquiasmáticos (NSQ).

El procedimiento empleado por medio de Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) resultó ser un método rápido, confiable y sencillo para la cuantificación de estas monoaminas (Reinhard y cols'80).

Los resultados obtenidos mostraron que tanto la dieta como la privación de sueño, tienen efecto sobre las concentraciones de 5-HT y 5-HIAA, en estas estructuras estudiadas, NRD y NSQ.

Antes de entrar en el análisis de los grupos experimentales, cabe señalar el efecto que tuvo la privación de sueño sobre las ratas control con y sin privación de sueño en ambos núcleos. En efecto, vemos que los mecanismos serotoninérgicos juegan un papel central en la regulación del sueño y que el NSQ es el oscilador principal de éstos; Tsuchiya y cols('69) reportaron que había un incremento de 5-HT después de una privación de sueño por un periodo corto, por otro lado, Borbély y cols('80) reportaron un aumento de sueño de ondas lentas y sueño MOR, y encontraron incremento de 5-HT y de 5-HIAA después de una privación de 24 hrs en el cerebro de roedores. En el presente estudio, la técnica

utilizada para la privación total de sueño fue en los animales desnutridos 6/6; 6/25 y en el grupo control, por medio de locomoción forzada utilizando un cilindro rotatorio.

Los resultados obtenidos en el grupo control concuerdan con los hallazgos previos, ya que tanto en el NRD como en el NSQ encontramos un incremento en los niveles de 5-HT en las ratas control sometidas a privación de sueño. El aumento en los niveles de 5-HT que nosotros encontramos puede ser resultado de una recaptura de triptófano cerebral, lo cual ha sido reportado por Toru y cols ('75), después de una privación de sueño menos severa. Por lo que podemos concluir con base a lo anterior que la privación de sueño afecta de manera importante los niveles de 5-HT y su metabolito.

En los grupos desnutridos (6/6 y 6/25), encontramos un incremento importante en las concentraciones de 5-HT en ambos núcleos (NRD y NSQ), lo que no se observó en los otros dos grupos. Por lo que respecta a la concentración del metabolito (5-HIAA) no se observó incremento en el grupo desnutrido con privación de sueño.

En este estudio vemos que la desnutrición incrementa de manera significativa los niveles de 5-HT. Esto ya se ha reportado en trabajos previos, en los cuales vemos que la desnutrición durante la etapa temprana del desarrollo del SNC produce una aceleración de la cadena biosintética de la 5-HT cerebral. Según Hernández ('73), Stern y cols ('75), Hernández ('89) y Manjarrez ('88), existe un aumento del neurotransmisor (5-HT) que depende de la elevación de su precursor plasmático L-Triptófano por lo que, en la rata desnutrida, se observa una elevación en la actividad de la enzima limitante, la Triptófano 5-hidroxilasa. Por otro lado, hay un aumento de la concentración cerebral de L-Triptófano en la rata desnutrida durante la gestación; este aumento del sustrato es menor a la constante de afinidad observada en las ratas desnutridas (Manjarrez '93). Por lo

que se puede afirmar que la Triptófano 5-Hidroxilasa durante las primeras etapas del desarrollo cerebral, mantiene su papel de enzima limitante, tal como se ha demostrado en el cerebro de la rata adulta normal (Grahame-Smith'64).

El aumento de la afinidad de la Triptófano 5-Hidroxilasa por el L-Triptófano, nos explicaría el aumento de la actividad enzimática en la rata desnutrida, sin embargo el hecho de que la enzima en condiciones de fosforilación es mucho más activa, nos da un indicio de que el mecanismo enzimático está implícito en la activación de la síntesis del neurotransmisor. Esto nos lleva a pensar que el aumento de la afinidad de la enzima y su mayor capacidad de fosforilación que suceden durante la desnutrición instalada en los períodos críticos del desarrollo cerebral, producen un cambio estructural del complejo enzimático de la Triptófano 5-Hidroxilasa, lo cual es una parte fundamental del mecanismo de la síntesis de la serotonina.

Lo anterior nos podría dar una posible explicación al incremento significativo de 5-HT que encontramos tanto en el NRD como en el NSQ, en las ratas desnutridas. Por otro lado, según Hernández ('76), la desnutrición temprana provoca un aumento de serotonina, de acuerdo con el hecho de que la maduración de ésta ocurre entre la tercera y cuarta semana en la rata. Esto implica cierta vulnerabilidad en el metabolismo de las monoaminas en este período, es decir que el nivel plasmático de L-Triptófano determina la concentración de Triptófano cerebral y la síntesis de serotonina, por lo que la desnutrición crónica induce cambios, que se manifiestan como incrementos en la síntesis de serotonina cerebral.

Las altas concentraciones de serotonina en los animales desnutridos que se describen antes, se acopla a los estudios realizados por Growdon y Wurtman ('79) y Wurtman ('82), que dan una explicación con base a experimentos en modelos animales y humanos. Según éstos autores la carga de hidratos de

carbono en exceso que reciben los animales desnutridos, como consecuencia de una dieta hipoproteínica-isocalórica para inducir desnutrición proteínica, estimula la liberación de insulina, mecanismo que no sólo permite el aprovechamiento a nivel celular de la glucosa, sino también de los aminoácidos para fines de síntesis proteínica, favoreciendo la liberación de puntos de transporte en las proteínas plasmáticas para el Triptófano, el cual compete con otros aminoácidos neutros como por ejemplo Leucina, Isoleucina, Tirosina, Fenilalanina y Valina. De esta manera existe una libertad en el transporte del Triptófano y por lo tanto mayor disponibilidad en plasma para el SNC. Para comprobar esta hipótesis se suministraron cargas de hidratos de carbono a ratas bien nutridas, obteniendo como resultado un aumento en la concentración plasmática de Triptófano unido a proteína y mayor concentración de este aminoácido en el encéfalo Manjarrez '88 . Por otro lado se administró insulina a ratas bien nutridas, obteniéndose un aumento en la concentración de Triptófano plasmático y encefálico. Estos trabajos de Wurtman '82 y Ferstrom '83, fueron los primeros estudios que dieron como indicio que una hormona, aunque de manera indirecta, interviene en la concentración del neurotransmisor (serotonina) en el SNC.

Con las evidencias anteriores podemos decir hasta el momento, que posiblemente los resultados obtenidos en este trabajo en lo que se refiere a la desnutrición, queden explicados por medio del mecanismo que produce altas concentraciones de 5-HT en la desnutrición crónica, que es debida a una mayor disponibilidad de Triptófano a nivel plasmático y por lo tanto existe una alta incorporación del aminoácido en el SNC. Esto es de vital importancia ya que donde encontramos mayor concentración de serotonina es en el NRD, principal productor de serotonina en el cerebro cuyas aferencias se interconectan con el cerebro anterior. Además, el sistema serotoninérgico, se conecta al hipotálamo en donde se localiza ventralmente el NSQ que, como ya vimos anteriormente, es uno

de los osciladores más importantes del cerebro y que tiene que ver con la regulación del ciclo sueño-vigilia. Cabe señalar que el NSQ también tuvo un aumento significativo en las concentraciones de serotonina aunque en menor grado que el NRD.

Aunado al efecto que presentó la desnutrición está acoplado el efecto de la privación de sueño que como vimos al principio de la discusión, incrementa también de manera importante los niveles de las indolaminas. Se ha encontrado que durante el sueño los niveles de 5-HT son bajos y estos se incrementan durante la vigilia, ésto sugiere que la vigilia forzada durante 24 hrs, produzca estos efectos (Héry y cols '72).

En trabajos previos (Galván '93), en donde se observa que las ratas con desnutrición crónica muestran un claro retraso en la maduración de los estados de vigilancia y una cantidad mayor de sueño de ondas lentas y MOR que los animales control, se muestra que la desnutrición produce alteraciones en las estructuras que controlan las funciones homeostáticas de los estados de vigilancia y las que regulan su ritmicidad circádica, lo cual es otro punto que apoya nuestros resultados.

Esto nos da una base para proponer que la desnutrición, aunada a la privación de sueño produce un efecto sinérgico, el cual se ve reflejado en las altas concentraciones de 5-HT en ambas estructuras (NRD y NSQ). Sin embargo esta concentración no se ve reflejada en su metabolito ya que el 5-HIAA no se encuentra incrementado de igual forma que el precursor. Esto nos lleva a pensar en dos hipótesis: una en la que se establece que el sistema enzimático está actuando de manera normal en lo que se refiere a la enzima degradadora, la Monoaminoxidasa (MAO), la cual se satura de tal forma que al llegar a su límite no incrementa su acción, acumulándose la 5-HT en tal forma que no coinciden sus índices de producción con el de degradación. Otra hipótesis nos llevaría a un

estudio posterior en el cual se analizarían los cinco pasos que sigue la 5-HT los que incluyen síntesis, almacenamiento-liberación, interacción con los receptores, recaptura y degradación por la MAO, subrayando que el punto de estudio sería la recaptación. La hipótesis planteada sería que la desnutrición podría tener un efecto que alterara este paso. Este efecto se ha visto con el uso de ciertas drogas como el LSD estudiados por Freedman y Halaris ('78), los cuales demostraron que una disminución de 5-HIAA se acompaña de elevación en la 5-HT, este efecto fue interpretado como indicador de una disminución temporal en la tasa de desintegración de la serotonina.

Por lo que respecta a las ratas rehabilitadas nutricionalmente después del nacimiento, hay un efecto positivo ya que su comportamiento a nivel serotoninérgico como de su metabolito nos da indicios de recuperación metabólica, aunque no similar a los grupos control .

- La desnutrición es un factor que incrementa los niveles de 5-HT con respecto a los controles y rehabilitados en ambos núcleos.
- La privación de sueño tiene efectos sobre los niveles de 5-HT y 5-HIAA, tanto en los animales control como en los desnutridos crónicamente.
- La desnutrición aunada a la privación de sueño presenta un efecto sinérgico el cual eleva de una forma muy significativa los niveles de 5-HT en ambos núcleos.
- El comportamiento de los grupos rehabilitados con y sin privación de sueño es similar a los grupos controles con y sin privación de sueño en el NRD y diferentes en el NSQ con respecto a la 5-HT.
- El comportamiento del 5-HiAA en los grupos desnutridos con y sin privación de sueño no corresponde a la concentración del precursor 5-HT.
- El índice producto-sustrato se encuentra elevado en todos los grupos a excepción de los desnutridos y aun más evidente en los desnutridos privados de

sueño el cual se encuentra significativamente muy reducido.

-La actividad del metabolito no se ve incrementada significativamente a pesar de que el precursor se encuentra muy elevado en los animales desnutridos lo que nos indicaría que el sistema enzimático no se ve forzado a incrementar su actividad.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

REFERENCIAS

Agnew, H. W. Weeb, W. B. and Williams, R. L. (1964): The effects of stage 4 sleep deprivation. *Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol.* **17**: 68-70.

Aschoff, J. Dann, J. S. and Gross G.A. (1982): **Vertebrate circadian systems. Structure and physiology.** Berlin:Springer-Verlang , pp 98-104.

Azmitia, E. C. (1978a): **The serotonin-producing neurons of the midbrain median and dorsal raphe nuclei.** I. Iversen, S. Iversen and Synder (eds.), *Handbook of psychopharmacology.* Plenum Press. New York: 233-314.

Azmitia, E. C. and Segal, M. (1978b): An autoradiographic analysis of the differential ascending projections of the dorsal and median raphe nuclei in the rat. *J. Comp. Neurol.*, **179**: 641-667.

Azmitia, E. C. and Gannon, P. J. (1986): **The primate serotonergic system: A review of human and animal studies and a report on Macaca Fascicularis.** 43, Raven Press. New York: 407-468.

Baker, T. (1985): **Introducción al estudio del sueño.** *Clinicas Médicas de Norteamérica* **6**:1175-1205.

Barnes, D and Altman, J. (1973): Effects of different schedules of early undernutrition on the preweaning growth of the rat cerebellum. *Exp. Neurol.*, **38**: 406-419.

Blusztajn, J and Wurtman, R. (1981) Choline biosynthesis by a preparation enriched in synaptosomes from rat brain. *Nature* **290**:417-418.

Bogdansky, D. F. Pletcher, A. Brodie, B. B. and Udenfriend, S. (1956): Identification and assay of serotonin in brain. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **117**: 82-88.

Borbély, A. A. (1978): Effects of lighth on sleep and activity rhythms. *Prog. Neurobiol.* **10**: 1-31.

Borbély, A. A. and Neuhaus, H. V. (1979): Sleep deprivation: effects on sleep and EEG in the rat. *J. Comp. Physiol.* **133**: 71-87.

Borbély, A. A., Steigrad, P. and Tobler, I.(1980): Effect of sleep deprivation on brain serotonin in the rat. *Behavioural Brain Research*, **1**: 205-210.

Borbély, A. (1993): **"El secreto del sueño"**. 1ra. ed ED. siglo XXI México pp. 181-182.

Brodal, A. Taber, E. and Walber, F. (1960): The raphe nuclei of the brain stem in the cat II. Efferent connections. **J. Comp. Neurol.** 114: 239-259.

Cespuglio, R. Sarda, N.Gharib, A. Houdouin, F. Rampin, C. and Jouvet, M.(1990): Voltammetric detection of the release of 5-hydroxyindole compounds throughout the sleep-waking cycle of the rat. **Expl Brain Res.** 80 :121-128

Cintra, L. and Díaz-Cintra, S. (1985): Efecto de la desnutrición proteínica en los núcleos rafe dorsal, locus coeruleus y en las células no piramidales de la corteza visual de la rata. **Rev. Chil. Nutr.** 13 (2): 76-82.

Cintra, L., Díaz-Cintra, S., Galván, A. and Morgane, P. (1988): Circadian rhythm of sleep in normal and undernourished rats. **Bol. Estud. Méd. Biol., Mex.** 36: 3-17

Cintra, L. Díaz-Cintra, S. Galván, A. Kemper, T. and Morgane, P. (1991) Effects of protein undernutrition on the dentate gyrus in the rat of three age groups **Brain Res.** 532 ;271-277.

Cooper, J. Bloom, F. y Roth, R. (1984): **Las bases bioquímicas de la neurofarmacología.** Manual moderno. Mex . pp 179-186.

Cravioto, J. y Arrieta, R. (1985): **Nutrición, desarrollo mental, conducta y aprendizaje.** Sistema Nacional para el Desarrollo Integral de la Familia (DIF). Mex. pp34-50.

Dahlström, A. and Fuxe, K. (1964): Evidence for the existence of monoamine neurons in the central nervous system I. Demonstration of monoamines in the cell bodies of brain stem neurons. **Acta Physiol. Scand.** 62 suppl. 232: 1-55.

Dement, W. C. (1965): Recent studies on the biological role of REM sleep. **Am. J. Psychiatry.** 122: 404-408.

Drucker-Colín, R. and Gutierrez, M. C. (1976): Effects of forebrain lesions on release of proteins from the midbrain reticular formation during the sleep-wake cycle. **Exp. Neurol.**, 52: 339-344.

Dobbing, J., and Sands, J. (1971): Vulnerability of developing brain; IX. the effect of nutritional growth retardation on the timing of the brain growth-spurt. **Biol. Neonate.**, 19: 363-378.

El Kafí, B. Cespuglio, R. Leger, L. Marinesco, S. and Jouvet, M. (1994). Is the nucleus raphe dorsalis a target for the peptides possessing hipnogenic properties? **Brain Res.** **637**: 211-221.

Enwonwu, C. O. and Worthington, B. S. (1974): Concentrations of histamine in brain of guinea pig and rat during protein malnutrition. **Biochem. J.** **144**:601-603.

Felten, D. L. and Harrigan, P. (1980): Serotonergic dendrite bundles in nuclei raphe dorsalis and centralis superior of the rabbit. **Anat. Rec.** pp 196-201.

Fernstrom, J. and Wurtman, R. (1974) Nutrition and brain. **Sci Am**, **230**; 84-91.

Fernstrom, J. D. (1983): Role of precursor availability in control of monoamine biosynthesis in brain. **Physiol. Rev.** **63**: 484-546.

Foote, W. E. Taber-Pierce, E. and Edwards, L. (1978): Evidence for a retinal projection to the midbrain of the rat. **Brain Res.** **156**: 135-140.

Forbes, W. B. Tracy, C. Resnick, O. and Morgane P. J. (1977): Effects of protein malnutrition during development on sleep behavior of rats. **Exp. Neurol.** **57**: 440-450.

Freedman, D and Halaris, E. (1978) Monoamines and the biochemical mode of action of LSD at synapses. **Raven, New York.** 150-173.

Galván, A. (1993) **Efectos de la privación total de sueño en ratas con desnutrición proteínica crónica.** Tesis ; Maestría en Ciencias Fisiológicas. U.N.A.M.

González-Richmond, A. (1987): Elección de un patrón de referencia para uso en vigilancia epidemiológica de la nutrición y el crecimiento. **Rev. Invest. Clín. (Méx)** **39**:131-136.

Grahame-Smith, D. T. (1964): Tryptophan hydroxylation in brain. **Biochem Biophys Res Commun**, **16**: 586-592.

Growdon, J. H. and Wurtman, R. J. (1976) Dietary influences on the synthesis of neurotransmitter in the brain: **Nutrition Reviews** **37**:(5) 129-136.

Hartman, E. (1968) On the pharmacology of dreaming sleep(the D-state), **J. Nerv. Mental Dis.** **146**; 165-173.

Hendrickson, A. E. Wagoner, N. and Cowan, W. M. (1972): An autoradiographic and electron microscopic study of retinohypotalamic connections. **Zellforsch. Mikrosk. Anat.** **135**: 1-26.

Hernández, R. J. (1973): Developmental pattern of the serotonin synthesizing enzyme in the brain of postnatally malnourished rats. **Experientia**, **29**: 1487-1488.

Hernández, R.J. (1976): Effect of malnutrition and 6-Hydroxydopamine on the early postnatal development of noradrenaline and serotonin content in the rat brain. **Biol. Neonate**, **30**:181-186.

Hernández, R., Manjarréz and Chagoya, G. (1989): Newborn humans and rats malnourished in utero: free plasma L-tryptophan, neutral amino acids and brain serotonin synthesis. **Brain Res.**, **488**:1-13.

Héry, F., Royer, E. and Iowinski, I. (1972): Daily variations of serotonin metabolism in the rat brain, **Brain Res.**,**43**:445-465.

Hobson, J.A. (1989) **Sleep**. Scientific American (ED) Library A Division of HPHLP, New York. 213 pp.

Imeri, L. De Simoni, G. Giglio, R. Clavenna, A. and Mancina, M. (1994). Changes in the serotonergic system during the sleep-wake cycle: simultaneous polygraphic and voltammetric recordings in hypothalamus using a telemetry system. **Neuroscience** **58** (2): 353-358.

Jacobowitz, D. (1974): Removal of discrete fresh regions of the rat brain. **Brain Res.**, **80**: 111-115.

Jouvet-Mounier, D. Astic, L. and Lacote, D. (1970) Ontogenesis of the states of sleep in rat, cat and guinea-pig during the first postnatal month, **Dev Psychobiol**, **2**:216-239.

Jouvet, M. (1988) The regulation of paradoxical sleep by the hypothalamo-hypophysis. **Archs ital. Biol.** **126** 259-274.

Jouvet, M. (1972) The role of monoamines and acetylcholine-containing neurons in the regulation of the sleep-waking cycle. **Ergeb. Physiol.** **64**; 165.

Kales, A. Tan, T. L. and Kollar, E. J. (1970): Sleep patterns following 205 hours of sleep deprivation. **Psychosom. Med.** **32**: 189-200.

Kayama, Y. Ohta, M. and Jodo, E. (1992) Firing of "possibly" cholinergic neurons in the rat laterodorsal tegmental nucleus during sleep and wakefulness. **Brain Res** **569**:210-220.

Kleitman, N. (1963) **Sleep and Wakefulness.**: The University of Chicago Press, Chicago pp 215-229.

Koella, W. (1974) Serotonin- a hypnogenic transmitter and an anti-waking agent, **Adv. Biochem. Psychopharmacol**, **11**; 181-186.

Mandell, A. and Knapp S. (1977) Regulation of serotonin biosynthesis in brain-role of the high affinity uptake of tryptophan into serotonergic neurons. **Fed. Proc.**; **36** 2142

Manjarrez, G. Chagoya, G. y Hernández, J. (1988): Desnutrición intrauterina: I. L-triptófano, serotonina y aminoácidos plasmáticos en humanos. **Bol. Med. Hosp. Infant. Mex.** **45**:(11) Nov.

Manjarrez, G. Chagoya, G. y Hernández, J. (1993): Cambios epigenéticos en la expresión de una proteína funcional en el cerebro, inducidos por desnutrición gestacional. **Bol. Med. Hosp. Infant. Mex.** **50**:(2) Feb.

May, R. De Santis, M. and Mead, R. A. (1985): The suprachiasmatic nuclei and retinohypotalamic tract in the western spotted skunk. **Brain Res**, **339**: 378-381.

McConnell, P. and Berry, M. (1978): The effects of undernutrition on Purkinje cell dendritic growth in the rat. **J. Comp. Neur.**, **177**: 159-172.

Mefford, I. and Barchas, J. (1980): Determination of tryptophan and metabolites in rat brain and pineal tissue by reversed-phase, HPLC with electrochemical detection. **J. of Chromatography**, **181**: 187-193.

Miller, M. J. Leahy, J. P. Stern, W. C. Morgane, P. J. and Resnick, O. (1977): Tryptophan availability: relation to elevated brain serotonin in developmentally protein malnourished rats. **Exp. Neurol.**, **57**: 142-157.

Miller, M. J. Leahy, J. P. McConville, F. Morgane, P. J. and Resnick, O. (1977): Effects of developmental protein malnutrition tryptophan utilization in brain and peripheral tissues. **Brain Res. Bull.** **2**: 347-353.

Moore, R. Y. (1983): Organization and function of a central nervous system circadian oscillator: The suprachiasmatic hypothalamic nucleus. **Fed. Proc.** **42**: 2783-2789.

Morden, B. Conner, R. and Mitchel, G. (1968): Effects of rapid eye movement (REM) sleep deprivation on shock-induced fighting. **Physiol. Behav.** **3**: 425-432.

Morgane, P. J., Miller, M., Kemper, T., Stern, W., Forbes, W. Hall, R., Bronzino, J. and Kissane, J. (1978): The effect of protein malnutrition on the developing central nervous system in the rat. **Neurosci. Biobehav. Rev.**, **2** (3) 137-230.

Palkovits, M. (1973): Isolated removal of hypothalamic or other brain nuclei of the rat, **Brain Research**, **59**:449-450.

Paxinos, G. and Watson, Ch. (1982): **The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates**, Academic Press.

Paxinos, G. (1985): **The Rat Nervous System**. Academic Press, Vol. 1 y 2, Sydney.

Peroutka, S. Lebovitz, M. and Snyder (1980) Two distinct serotonin receptors with different physiological functions , **Nature** **280**; 1171-1173.

Rajalakshmi, R. Kulkarni, A. B. and Ramakrishnan, C. V. (1974): Effects of preweaning and post-weaning undernutrition on acetylcholine levels in rat brain. **J. Neurochem.** **23**: 119-121.

Ramanamurthy, P. S. V. (1977): Maternal and early postnatal malnutrition and transmitter amines in the rat brain. **J. Neurochem.**, **28**: 253-254.

Reinhard, J., Moskowitz, M., Sved, A. and Fernstrom, J. A. (1980): Simple, sensitive and reliable assay for serotonin and 5-HIAA in brain tissue using HPLC with electrochemical detection. **Life Sciences**, **27**:905-911.

Ribak, C. E. and Peters, A. (1975): An autoradiographic study of the projections from the lateral geniculate body of the rat. **Brain Res.** **92**: 341-368.

Saavedra, J. M. Palkovits, M. Brownstein, M. J. and Axelrod, J. (1974): Serotonin distribution in the nuclei of the hypothalamus and preoptic region. **Brain Res.** **77**: 157-165.

Salas, M. and Cintra, L. (1973): Nutritional influences upon somatosensory evoked responses during development in the rat. **Physiol. and Behav.** **10**: 1019-1022.

Salas, M. and Cintra, L. (1975): Development of electroencephalogram during starvation in the rat. **Physiol. Behav.** **14**: 589-593.

Salas, M. (1978): Privación neonatal de alimento y desarrollo cerebral; aspectos morfológicos, conductuales y electrofisiológicos. **Bol. Est. Méd. Bol.,Méx.** **30**: 111-124.

Salas, M., Ruiz, C., Torrero, C. and Pulido, S. (1983): Neonatal food restriction: its effects of the sleep cycles and the vigil behavior in adult rats. **Bol. Est. Med. Biol., Méx.**, **32**: 209-215.

Seegal, R., Brosch, k. and Bush, B. (1986): HPLC of biogenic amine and metabolites in brain, cerebrospinal fluid, urine and plasma. **J. of Chromatography**, **377**:131-144.

Segal, M., Dudai, Y. and Amsterdam, A. (1978): Distribution of an Alpha-Bungarotoxin-binding cholinergic nicotinic receptor in rat brain. **Brain Res.** **148**: 105-119.

Shoemaker, W. J. and Wurtman, P.J. (1971): Perinatal undernutrition: Accumulation of catecholamines in the rat brain. **Science** **171**: 1017-1019.

Shouse, M. and Siegel, J. (1992) Pontine regulation of REM sleep components in cats: integrity of the pedunculopontine tegmentum (PPT) is important for phasic events but unnecessary for atonia during REM sleep. **Brain Res.** **571**: 50-63

Sima, A., and Sourander, P. (1978): The effect of pre and postnatal undernutrition on axonal growth and myelination of central motor fibers. **Acta Neuropath. (Berl.)**, **42** . 15-18.

Sitaram, N. and Gillin, J. (1979): Acetylcholine: possible involvement in sleep and analgesia. **Brain Acetylcholine and Neuropsychiatric Disease**. New York press pp 311-343.

Sobolka, T., Cook, P., and Brodie, R. (1974): Neonatal malnutrition: neurochemical, hormonal and behavioral manifestations. **Brain Res.**, **65**: 443-457.

Stern, W. C. (1970): **The relationship between REM sleep and learning**. Boston, Little, Brown and Co. : 249-257.

Stern, W. C. Morgane, P. J. Miller, M. and Resnick, O. (1975): Protein malnutrition in rats: Response of brain amines and behavior to foot shock stress. **Exp. Neurosci.** **47**: 56-67.

Sugita, N. (1918) Comparative Studies in the growth of cerebral cortex. VII. On the influence of starvation at an early age upon the development of cerebral cortex , albino rat. **J. Comp. Neurol.** **29**:177-240.

Taber, E. (1961): The Cytoarchitecture of the brain stem of the cat. I. Brain nuclei of Cat. **J. Comp. Neurol.** **116**: 27-69.

Tork, I. (1985): **Raphe nuclei and serotonin containing systems in: The rat nervous system**, Vol. 2 Hindbrain and spinal cord. Paxinos, G. (ed), 43-78.

Toru, M., Shibuya, H. and Shimazono, Y. (1975): **Monoamine metabolism in rat brain after total sleep deprivation. Advances in sleep research.** New York press pp.116-130.

Tsuchiya, K., Toru, M. and Kobayashi, T. (1969): Sleep deprivation: changes of monoamines and acetylcholine in rat brain, **Life Science**, **8**: 867-873.

Van den Pol, A.N. and Tsujimoto, K. (1985): Neurotransmitters of the hypothalamic suprachiasmatic nucleus: immunocytochemical analysis of 25 neuronal antigens. **Neurosci.** **15(4)**. 1049-1086 .

Warren, M. A., and Bedi, K. (1988): The effects of length period of undernutrition from birth and subsequent nutritional rehabilitation on the granule to Purkinje cell ratio in the rat cerebellum. **J Anat.**, **159**: 147-153.

Wiggins, R. C., Sheldon, Miller, L. Joyce, A., Krigman, M. and Moreli, P. (1976): Myelin synthesis during postnatal nutritional deprivation and subsequent rehabilitation. **Brain Res.**, **107**: 257-273.

Wiggins, R. C. y Enna, S. J. (1984): Undernutrition and development of brain neurotransmitter systems. **Life Sci.** **35**:2085-2094.

Wurtman, R. (1982) Nutrients that modify brain function **Sci Am**, **246**: 42-51