



Universidad Nacional Autónoma de México

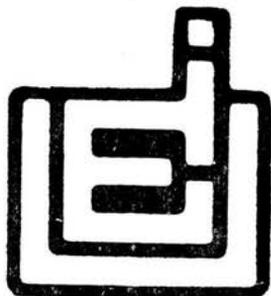
Escuela Nacional de Estudios Profesionales Iztacala

"Influencia de la Desnutrición Prenatal y Postnatal en las Neuronas del Núcleo Locus Coeruleus. Un Estudio Citomorfo-métrico en Rata".

TESIS PROFESIONAL

Que para obtener el Título de
B I O L O G O
P r e s e n t a

RICARDO PEREZ GARCIA



San Juan Iztacala

México 1984



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

El presente trabajo se -
llevó a cabo en el Labo-
ratorio del Dr. León Cin-
tra McGlone del Departam-
ento de Fisiología del
Instituto de Investiga-
ciones Biomédicas, UNAM.
bajo su dirección.

A la memoria de mi madre.

A mi padre.

A mis hermanos: Rosa María
Húgo Hilarrio
José Juárez

A Ana Rosa Cortés

A mis amigos que me brindaron su apoyo en todo momento.

Gerardo Reyes
Francisco Javier Delgado
Juan Manuel Lechuga

Omar Morales
Cuauhtemoc Aguirre
Marco Antonio Rios

A G R A D E C I M I E T O S

- Deseo expresar mi agradecimiento al Departamento de Fisiología y a los directivos y personal del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM, por haberme brindado la oportunidad y facilidades en la realización de esta tesis.
- Agradezco al grupo del Dr. P.J. Morgane de la Worcester Foundation for Experimental Biology, M.A. y al Dr. T. Kemper de Neurobiología del Boston City Hosp. U.S.A. por las sugerencias y el material biológico empleado en la presente tesis.
- Al Dr. León Cintra McGlone, por su gran apoyo, sus consejos y valiosa dirección.
- A la Dra. Sofía Y. Díaz-Cintra, por su inagotable estímulo, su entereza y acertada asesoría.
- A la Dra. Elsa Calleja, a la M.en C. Bertha Segura, al Biol. Ignacio Peñaloza y al I.Q. Abel Fuentes, por sus oportunas sugerencias.

GLOSARIO

INTRODUCCION -----	1
DESNUTRICION -----	7
OBJETIVOS -----	11
MATERIALES Y METODOS -----	12
RESULTADOS -----	20
DISCUSION -----	26
CONCLUSIONES -----	33
REFERENCIAS -----	35

RESUMEN

El presente trabajo se realizó con el propósito de investigar el efecto que produce una desnutrición protéínica crónica, instalada pre y posnatalmente, en las células reticulares del núcleo Locus coeruleus de la rata, mediante el empleo de dietas isocalóricas con un contenido de 25% y 6% de caseína. Se efectuó un estudio histológico morfométrico con la técnica de Nissl midiendo los ejes mayor y menor, en los tres tipos celulares: multipolar, fusiforme y ovoide encontrados en dicho núcleo en sus regiones rostral, medial y caudal en tres edades distintas: 30, 90 y 220 días. El análisis morfométrico reveló un comportamiento celular diferente en los animales normales y los desnutridos, en las tres regiones en las que artificialmente se dividió esta estructura, que varió según la edad y pérdida a largo plazo.

Se hacen consideraciones en cuanto a los procesos metabólicos adaptativos que provoca la desnutrición que conduce a patrones morfológicos que difieren en las poblaciones neuronales del tipo no piramidal localizadas en este núcleo y otros como el rafe dorsal, y las poblaciones piramidales que se encuentran en el área cortical cerebral y cerebelar, para permitir la supervivencia y la competencia de los animales desnutridos en su medio ambiente.

INTRODUCCION

En los últimos años se ha desarrollado gran interés en la organización anatómica, fisiológica y bioquímica del núcleo Lo-cus coeruleus (LC) , ya que forma parte importante de los sistemas monoaminérgicos. Estos sistemas poseen neurotransmisores como la noradrenalina, la dopamina o la serotonina, que son de vital importancia puesto que inciden en la regulación y control de funciones tanto del sistema nervioso central (SNC), como del sistema nervioso periférico, como son los mecanismos del ciclo sueño-vigilia, regulaciones neuroendocrinas, motoras, sensoriales, funciones límbicas, analgesia, presión sanguínea, tono muscular, etc. Además estudios recientes revelan que el LC posee receptores estrogénicos, siendo así un candidato involucrado en la comunicación directa con el eje hipotálamo hipofisiario.

Localización.

De acuerdo con los trabajos de Russel (1955), el término "coeruleus" fué usado por primera vez por Wenzel y Wenzel en 1811 para identificar en el hombre un conjunto neuronal esparcido en el piso rostral del cuarto ventrículo y lateral a la sustancia gris pontina; en el hombre y en los primates se encuentra pigmentada con gránulos de melanina en su citoplasma. Santiago Ramón y Cajal en 1910, identificó al núcleo incluido dentro de la sustancia "ferrugínea" en el mesencéfalo. Actualmente se ubica lateral a la sustancia gris pontina, medial a las fi-

bras del braquium conjuntivum y ventral a la raíz del núcleo trigémino a nivel mesencefálico. En la mayoría de los animales estudiados a la fecha es difícil delimitar al núcleo claramente, sin embargo, es posible diferenciarlo mejor en el cerebro de la rata, en comparación con el cerebro del gato o del mono.

Origen.

El LC en la rata se origina tempranamente en el día 10 al 14 de gestación, Lauder y Bloom (1974). El número de células que lo constituyen se considera que sea de unas 1,500 a cada lado del tallo cerebral, Swanson (1976).

Citoarquitectura.

Shimizu e Imamoto (1970), estudiaron al LC de la rata utilizando la técnica de Golgi y describieron tres tipos celulares que denominaron: fusiformes y multipolares de tamaño mediano (20 x 15 micras) y ovoides de tamaño pequeño. Ramón-Moliner y Dansereau (1974), en estudios hechos con impregnación de Golgi-Cox, revelaron dos tipos de neuronas, unas de tamaño mediano con dendritas relativamente cortas que denominaron células leptodendríticas, y otras pequeñas que poseen dendritas escasas y largas, células isodendríticas, que pueden compararse con las neuronas pequeñas que se encuentran en la sustancia gris adyacente. Swanson (1976), demostró que las neuronas del LC parecen ser de forma multipolar con tres a cinco dendritas largas que irradian del soma y se ramifican de una a dos veces, muchas de

estas dendritas se extienden por fuera de los límites del núcleo hacia las áreas vecinas. Los axones de las neuronas del LC llevan típicamente de dos a tres colaterales finas dentro del propio núcleo y corren anterolateral al punto de vecindad con el *braquium conjunctivum*.

Swanson (1976), divide al LC de la rata en dos porciones, una dorsal en donde el número de células fusiformes es la más abundante y una porción ventral en donde las células más comunes son las multipolares. Shimizu y col. (1979), describieron al LC de ratas en diferentes edades, en dos tipos principales de neuronas de tamaño mediano (20 x 35 micras) y neuronas pequeñas (10 x 15 micras). Las células de tamaño mediano fueron de dos tipos predominando las fusiformes que se localizan principalmente en la parte dorsocaudal del núcleo, mientras que las multipolares o piramidales se localizan principalmente en la parte ventral. En ambas células se encontraron espinas en la superficie del soma. Se observó que los axones toman un curso en dirección laterodorsal o laterocaudal mandando frecuentemente axones colaterales recurrentes dentro del propio núcleo. Pfister y Danner (1980), en su material tratado con Golgi rápido distinguieron tres tipos de neuronas en el núcleo: poligonales que presentan espinas somáticas, fusiformes y neuronas pequeñas sin espinas.

Cintra y col. (1982), usando la técnica de Golgi rápido, identificaron tres tipos de células: fusiformes, multipolares y ovoides en el LC de ratas macho de tres edades. Cada tipo celu-

lar en base a la arquitectura de su orientación dendrítica, a las medidas de su extensión linear y al número de espinas dendríticas, presentan características individuales en relación con las edades estudiadas: 30, 90 y 220 días.

Mapeo.

Estudios de Maeda y col. (1973), hechos en el gato utilizando histoquímica de fluorescencia, distinguieron dos tipos de neuronas catecolaminérgicas cuyos somas fueron grandes y pequeños. Léger y col. (1978), empleando histoquímica y autorradiografía confirmaron la existencia de estos dos tipos neuronales y además reportaron células con contenido indolaminérgico distribuidas en todas las partes del núcleo LC. Estas células parecen corresponder a los tipos mediano e intermedio descritos por Léger y Hernández-Nicase (1980), se presume que las neuronas pequeñas son interneuronas porque existe la evidencia en el sentido de que no contienen monoaminas. Pfister y Danner en 1980, usaron técnicas de histofluorescencia en el estudio del LC de la rata y revelaron células de tipo poligonal con contenido de monoaminas.

Ultraestructura.

El LC ha sido objeto de estudios ultraestructurales en los cuales se ha observado que las células presentan un retículo endoplásmico rugoso, el que forma cuerpos organizados de Nissl que predominan en todo el citoplasma y un alto desarrollo del cuer-

po de Golgi alrededor del núcleo celular que se extiende dentro de los troncos dendríticos.

Shimizu y col. (1979), demostraron la existencia de contactos dendrodendríticos entre las células que contienen noradrenalina en el LC. Groves y Wilson (1980), estudiaron al LC con microscopía electrónica y encontraron que la mayoría de las fibras aferentes hacia el núcleo hacen sinapsis con las dendritas en sus apéndices con espinas, así como en las espinas somáticas. Además, estos autores describen perfiles postsinápticos de acuerdo con las características de las vesículas sinápticas de tres tipos: redondas y pequeñas, redondas y grandes y finalmente - grandes y aplanadas.

Proyecciones.

Desde los estudios de Dhälstrom y Fuxe (1965), se sabe que las células del núcleo LC poseen noradrenalina y dentro del SNC constituyen el grupo A6. Andén y col. (1966), confirmaron que la noradrenalina del cerebro es provista principalmente por el LC, en donde unos pocos cientos de neuronas envían proyecciones ascendentes y descendentes a prácticamente todas las regiones del SNC (Fig.1). Recientemente se ha enfatizado en las proyecciones aferentes serotoninérgicas del núcleo rafe dorsal al LC. Esta mezcla de entradas hacia el LC nos hace comprender la heterogeneidad de las relaciones neurofisiológicas del núcleo.

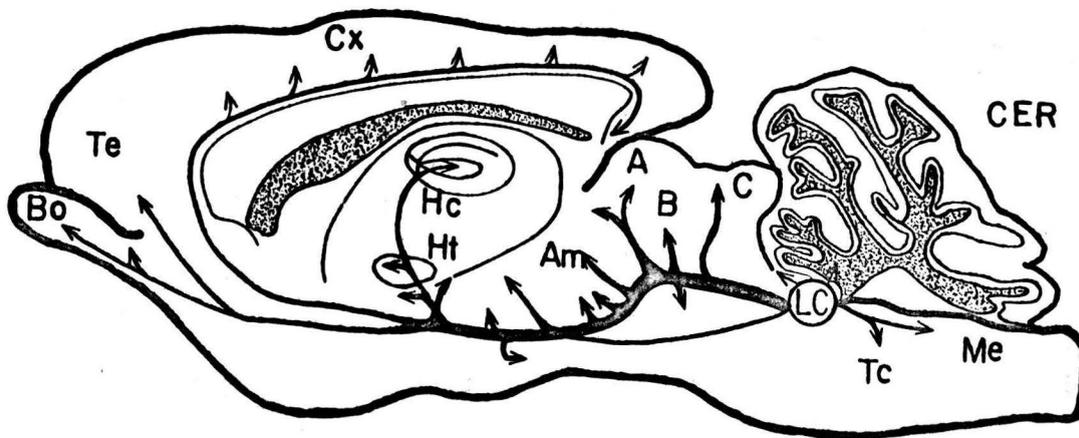


Fig. 1 Proyecciones de la raíz noradrenérgica dorsal, que se origina en el núcleo Locus coeruleus.
 Abreviaciones: área pretektal (A, B y C), amígdala (Am), hipocampo (Hp), hipotálamo (Ht), corteza (Cx), telencéfalo (Te), bulbo olfatorio (Bo), tallo cerebral (Tc), cerebelo (CER), médula espinal (Me).

Relaciones Neurovasculares.

Según Felten y Crutcher (1979), las células del LC se encuentran densamente empaquetadas con los grupos celulares noradrenérgicos y fuertemente vascularizadas con vasos sanguíneos de 8-40 micras de diámetro. La microscopía de luz revela una relación cercana con los vasos sanguíneos, capilares y pequeñas arteriolas de 15-30 micras de diámetro en una proporción del 22%. Al microscopio electrónico se revela que ésta aposición de las neuronas con los vasos sanguíneos poseen una simple capa endotelial con una fuerte unión rodeada por una membrana basal. Shimizu y col. (1979), observaron que las dendritas poseen ésta misma relación con los vasos sanguíneos, teniendo una influencia posiblemente neurohumoral.

La relación neurovascular representa en el sistema, "un canal aferente vascular" que convierte a las sustancias de la sangre en receptores de las neuronas monoaminérgicas, o en un sistema de acarreo de la sangre. Estas relaciones se presentan en otros sistemas monoaminérgicos localizados en el núcleo anteroventral coclear supraóptico, en el complejo del rafe y en la sustancia nigra.

DESNUTRICION.

La significancia funcional de muchas alteraciones producidas en el cerebro por la desnutrición es motivo de planteamiento de preguntas y de discusiones. Por otra parte, se sabe que el SNC ha perdido la posibilidad de formar nuevas células por su alto grado de especialización o por determinada fenomenología que produzca pérdida y daño de las neuronas, por lo cual, estos efectos son mucho más severos en el SNC que en el resto del organismo. La capacidad de formar nuevas células ha sido reemplazada en cada neurona por la función de formar nuevos procesos y conexiones sinápticas principalmente (Schepherd 1983). Se ha sugerido que se debe poner más atención a los efectos producidos por la desnutrición en la ramificación dendrítica y en el establecimiento de conexiones sinápticas, dado que estas estructuras pueden contener una relevancia más directa en la capacidad que posee el cerebro, para el manejo y procesamiento de información.

La rata proporciona un modelo experimental conveniente en el cual se pueden estudiar los efectos de la desnutrición en el SNC en desarrollo, ya que buena parte de éste se completa posnatalmente abarcando los llamados "períodos críticos" de rápido crecimiento y división neuronal que ocurre al término del destete, y la diferenciación celular que termina hasta cerca del día 21 posnatal, Dobbing y col. (1971). La respuesta que se presenta ante la desnutrición modificándose la cantidad de leche durante este período de amamantamiento, es un factor impor-

tante para el resto de la vida del animal.

Winick y Noble (1966), sostienen la tesis de que si la desnutrición se instala al principio de los "períodos críticos", el efecto puede ser más severo y permanente. Por consiguiente no solo la duración y extensión de la desnutrición si no también el nivel de maduración del SNC son responsables de estos efectos.

Existen evidencias que han demostrado que la desnutrición tiene efectos más severos en aquellas estructuras cerebrales que poseen una neurogénesis posnatal extensa, como ocurre en el cerebelo, el hipocampo y el bulbo olfatorio (Barnes y Altman 1973). Se sabe también que estructuras de reciente aparición filogenética como lo son las neocortezas cerebelar y cerebral resultan más afectadas por la desnutrición posnatal (Leuba y Rabinowicz 1979 a y b), sobre todo en el ordenamiento laminar de las capas corticales (Cordero y col. 1976), particularmente en la corteza primaria visual y en las células granulares y de Purkinje en el cerebelo (Barnes y Altman 1973).

Los trabajos recientes demuestran que la desnutrición en ratas neonatas, causan distorsiones en algunos aspectos del desarrollo dendrítico y sináptico. Por ejemplo McConell y Berry (1978), hicieron estudios sobre las influencias de la desnutrición desde el nacimiento hasta que son configurados los patrones de ramificación y se establecen las redes dendríticas, de las células de Purkinje en el cerebelo. Estos autores encontraron una reducción en la longitud de los segmentos dendríticos,

así como una reducción en la longitud de los segmentos distales y un decremento en la porción de las células granulares y las de Purkinje en el cerebelo. En experimentos posteriores Mc Conell y Berry (1981), encontraron que si estas ratas eran alimentadas de manera adecuada posnatalmente a los 10 o 15 días se evitaban los cambios, mientras que si se alimentaban a los 20 días posnatales no se abolían dichos efectos. Salas y col. (1974), efectuaron estudios en ratas mantenidas en desnutrición posnatal del día 4 al 13 y encontraron una reducción en el número de espinas, en la densidad dendrítica basal y en el grosor dendrítico de las células piramidales grandes de la capa V de las cortezas frontal y occipital. Salas (1980), también encontró que un déficit nutricional desde el nacimiento hasta el día 20, produjo una reducción en la densidad de las espinas dendríticas en las células piramidales grandes de la capa V de las cortezas frontal, parietal y occipital. Cordero y col. (1976), al producir desnutrición en la rata por aumento en el número de organismos en una camada, encontraron que se reduce el número, así como el espacio de las dendritas basales en las células piramidales de la capa V de la corteza occipital, Leuba y Rabinowicz (1979 a y b), demostraron que existen modificaciones severas en las densidades neuronales, en el volumen cortical y en la densidad de espinas de la corteza cerebral en ratones desnutridos posnatalmente y en camadas con madres desnutridas. Estos autores demostraron que la red dendrítica fué dañada particularmente por la desnutrición posnatal en donde

se presentaron cambios permanentes más allá de los 180 días pos natales. Empleando desnutrición prenatal West y Kemper (1976), y usando la técnica de Golgi rápido en cerebros de rata, encon traron en las células de la corteza visual, y en las células de Purkinje del cerebelo, que había un decremento en la densidad de las espinas, así como una reducción en la longitud dendrítica de estas células. Jones y Dyson (1981), efectuaron estudios de la ultraestructura de las sinapsis, en ratas que fueron desnutridas posnatalmente y demostraron que el número de uniones si nápticas por unidad de área de la capa molecular de la corteza occipital fué menor en los animales desnutridos a los 7 y 20 días de edad y las sinapsis que se pueden tipificar como inmaduras se mantienen por un período mayor en los cerebros de los desnutridos.

En estudios previos realizados en el núcleo rafe dorsal Díaz-Cintra y col. (1981), emplearon el paradigma en el cual las ratas fueron alimentadas con dietas conteniendo 25% y 8% de caseína como fuente proteínica principal, las cuales se administraron antes del apareamiento, durante la gestación, la lactancia y hasta que las ratas fueron sacrificadas a las edades de 30, 90 y 220 días. En ratas alimentadas con 25% de caseína, el hallazgo más notable fué un incremento significativo en las espinas dendríticas entre 30 y 90 días en los tres tipos celulares identificados: fusiformes, multipolares y ovoides, se guido por un decremento significativo en las espinas dendríticas de los tres tipos celulares entre los 90 y 220 días. Sin-

embargo las ratas con desnutrición proteínica no mostraron este decremento en espinas entre los 90 y 220 días.

En estudios que llevaron a cabo Cintra y col. (1982), en el núcleo LC de ratas alimentadas con dietas de 25% de caseína, encontraron los mismos tres tipos celulares que en el rafe dorsal. Estas células mostraron un decremento significativo de espinas entre los 30 y 90 días seguido por un incremento significativo de espinas entre los 90 y 220 días. Así en ambos núcleos en ratas alimentadas con la dieta de 25% de caseína se encontró un fenómeno denominado producción y pérdida de espinas fuera de fase, el cual no se observó en los animales desnutridos.

OBJETIVO.

El presente estudio se realizó con el propósito de emplear una dieta con un porcentaje aún menor de proteína que el usado previamente en otros estudios (Morgane y col. 1978 y Resnick y col. 1982), es decir, se redujo el contenido de caseína del 8% al 6%, con la finalidad de emplear un modelo más drástico de desnutrición prenatal y posnatal, con el objeto de corroborar la hipótesis en el sentido de que la desnutrición produce alteraciones en el SNC que perduran a largo plazo y poder conocer en que medida son afectadas las células del núcleo Locus coeruleus; mediante el empleo de un índice muy fino de medición como lo es el tamaño celular, para poderlo correlacionar con reportes previos.

MATERIALES Y METODOS.

Los procedimientos fueron desarrollados con el intento de simular las condiciones bajo las cuales las poblaciones humanas existen típicamente o con mayor frecuencia: a) Restricción proteínica crónica, comenzando antes de la unión o apareamiento de los progenitores, b) El déficit calórico en una dieta baja en proteína, se compensa con exceso en carbohidratos, c) Las dietas experimental y control tienen un alto contenido en grasas, d) Las manipulaciones de las dietas se llevaron más allá del periodo de gestación, de lactancia y de destete.

Aunque las características de la desnutrición humana varían de situación a situación, la forma de desnutrición que prevalece está caracterizada por su naturaleza crónica, por la falta de cantidades adecuadas de proteína de alta calidad en la dieta, por la sustitución de proteínas por grasas y carbohidratos y por el uso continuo de esta dieta inadecuada a través de la vida del individuo.

Se usaron dos dietas experimentales diferentes que variaron en el porcentaje proteínico (Tabla I).

Características sobresalientes de las dietas:

- 1.- La dieta normal (25% de caseína) y la dieta baja en proteína (6% de caseína) son isocalóricas ya que el déficit calórico de la que contiene 6% se compensa con

TABLA I

Composición Nutricional de las Dietas

Componente	Dieta * 25% Caseína	Dieta * 6% Caseína	Dieta Comercial
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.

carbohidratos adicionales.

- 2.- Las dos dietas tienen un mayor contenido de grasas respecto a la comida normalmente usada en los bioterios para ratas (15% vs 5% aprox.).
- 3.- La caseína es usada como fuente de proteína para ambas dietas.
- 4.- Debido a que la caseína es baja en contenido de aminoácidos sulfurados las dos dietas son complementadas con metionina.
- 5.- Ambas dietas tienen menos agua que la comida normal para ratas.

Las dietas se instalaron siguiendo el paradigma de Resnick y col. (1979), y se obtubieron del laboratorio proveedor, en polvo. Para poderlas diferenciar se les adicionó un color inerte, así la dieta baja en proteína se le identificó con un color verde oscuro, y la dieta normal por un color amarillo. Aunque las dietas tienen bajo contenido en agua, el alto contenido de grasa les da una consistencia blanda y el uso de grasa insaturada (aceite de maíz) hace imposible que se les de la forma de croquetas. Las dietas fueron administradas en cantidades suficientes, aseguradas en la caja de malla de alambre por medio de un surtidor.

Cuatro ratas hembras Sprague-Dawley (Charles River Lab. Co) con un peso corporal entre los 175-200 gr correspondientes a una edad aproximada de 50 días fueron colocadas por caja y tuvieron

libre acceso al agua y a una de las dietas durante cinco semanas previas al apareamiento. Las cajas de malla de alambre fueron de 27.95 x 45.70 x 30.50 cm y en su base se colocó una charola de lámina con una capa de 2.5 a 5 cm de viruta de madera, el cuarto de la colonia se mantuvo con un horario de 12:12 hr luz/obscuridad a una temperatura de $21^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ durante todo el tiempo. Los machos con un peso corporal de 325-350 gr fueron alimentados durante una semana previa al apareamiento con las mismas dietas de las hembras.

El apareamiento se realizó colocando en la caja un macho con tres hembras que fueron alimentadas con una u otra dieta (25% o 6%) por un período de 10 días. En la mayoría de los casos el día de la preñez se controló examinando frotis vaginales diariamente. Debido a que las ratas hembras son sexualmente receptivas unas horas en la noche del proestro, se presumió que la preñez ocurrió entre la 1:00 AM y las 4:00 AM, previas a la detección de esperma en los frotis vaginales. Al décimo día los machos fueron separados, y al vigésimo primer día después del apareamiento las hembras se separaron individualmente en cajas de plástico de 22.82 x 45.70 x 20.32 cm y diariamente se revisaron a las 4:00 PM durante los días siguientes hasta el momento en que ocurrieron los nacimientos.

Los neonatos se distribuyeron al azar en camadas de 8 para cada hembra del mismo grupo de tratamiento dietético. Para la crianza al azar se reunieron todos los neonatos que nacieron particularmente en un día, en un recipiente grande mezclándolos cui-

dadosamente, previo al sorteo del grupo combinado para la distribución con las hembras. Este procedimiento se hizo con el propósito de incrementar la homogeneidad de la población. El sexo en las ratas se determinó por la distancia anal uretral, rutinariamente se distribuyeron a cada hembra cuatro machos y cuatro hembras neonatas.

Durante el período de lactancia se limpió y dotó de nueva viruta a la caja dos veces por semana, excepto en los cuatro días siguientes al nacimiento cuando la camada no se perturbó. Los días previos al destete, los neonatos tuvieron libre acceso a la misma dieta con la que se alimentó a la madre durante la gestación y lactancia. A los 21 días posnatales la madre se removió de la caja. Posteriormente los animales fueron sexados y distribuidos en cajas de alambre colocando cuatro machos y cuatro hembras por caja para evitar la cruce. Cualquier camada con menos de seis neonatos en el período del destete fué desechada. Cuando las ratas macho alcanzaron las edades de 30, 90 y 220 días, fueron sacrificadas y preparadas para las técnicas histológicas cerebrales (Fig.2).

A las ratas de 30 días se les administró una dosis de hidrato de cloral de 350 mg/Kg por vía intraperitoneal y a las ratas de 90 y 220 días una dosis de pentobarbital sódico de 55 mg/Kg por la misma vía, una vez anestesiadas, cada rata se perfundió vía intracardiaca, primero con solución salina fisiológica y en seguida con formalina al 10% en solución salina amortiguada con sales de sodio y potasio (pH 7.0) de 3-5 min. Posteriormente,

se removió el cerebro del cráneo, preferentemente al día siguiente. El cráneo se abrió ordenadamente para exponer el cerebro, removiendo el temporal y los músculos de la región occipital, usando pinzas para hueso y cortando fuera del lambdo ides, ésta es el área más gruesa que cubre al cráneo, hay que ser muy cuidadosos de no cortar la meninge ya que cruza todo el cerebro, con pinzas gubias se rompe el resto del techo del cráneo.

Una vez efectuada la craneotomía se procedió a la inclusión del cerebro en una mezcla de albúmina-gelatina. La mezcla se preparó con 9 gr de albúmina purificada en 100 ml de agua destilada tibia, hasta que se obtuvo una pasta blanca sin grumos, al mismo tiempo se disolvieron 9 gr de gelatina en polvo, en 200 ml de agua destilada tibia. La gelatina más la albúmina se agitaron hasta obtener una mezcla homogénea. La mezcla final se reposó en baño María a una temperatura de 37°C aproximadamente (a temperaturas mayores pueden cocer la albúmina) por espacio de una hora, se eliminó la espuma remanente y se almacenó en el refrigerador a 0°C hasta que se usó. Previamente a la inclusión se disolvió en un vaso de precipitado la albúmina-gelatina en baño María a 40°C. Una vez líquida la mezcla se vaciaron 10 ml en un molde de cartón o de plástico, al incluir el cerebro no deben de existir burbujas, además de orientarlo con al fileres entomológicos para la ubicación de las estructuras. Una vez seca y endurecida la mezcla, se colocó en vapores de formolina pura en un frasco tapado y almacenado en el refrigerador

por un período de tres días. Después se removi6 la albúmina-gelatina que contiene al cerebro del molde, y se coloc6 en un frasco que contenía 100 ml de formol al 10% y 100 ml de sacarosa al 7.5%. El cerebro que fué incluido en la albúmina-gelatina, y en esta solución permaneci6 flotando; después de un tiempo (2 días aprox.) se va al fondo del frasco lo que indica que la albúmina-gelatina ha quedado fijada por embebimiento de la formalina sacarosa.

Postfijado así el cerebro e incluido, se procedió a la obtención de los cortes frontales del tallo cerebral donde se localiza el núcleo Locus coeruleus por congelación entre 30 y 60 micras de grosor. Cada corte se colect6 en un recipiente con divisiones individuales que contenían agua destilada, conservando su seriación. Enseguida se procedió al montaje, colocando en una caja petri gelatina al 2% (2 gr de gelatina más 50 ml de agua destilada más 50 ml de etanol 80%), y se montaron los cortes por flotación en portaobjetos 7.5 x 5.0 cm etiquetados, y se secaron a temperatura ambiente durante 3 días y fueron almacenados en cajas portaobjetos hasta su tinción.

En un tren de cajas para tinción, con la canastilla que contiene los portaobjetos, empleando un solo cerebro cada vez, se procedió a mordentar los cortes en etanol 96% acidulado (con 5 gotas de ácido acético glacial, por cada 100 ml) durante 10 min; luego se lavaron en agua destilada 2 min, se tiñeron en una solución al 0.1% de violeta de cresilo, se lavaron en agua destilada 2 min, y en seguida se procedió a deshidratar en alcoholes

graduales: etanol 70% 5 min, etanol 80% 5 min, etanol 96% 5-10 min (hasta que viró la tinción del tejido). En este paso se invirtió la secuencia hasta una segunda tinción, es decir, se regresó el tejido rehidratándolo, pasando por los alcoholes hasta la violeta de cresilo 2 min; se volvió a deshidratar en los alcoholes con dos cambios de etanol 96%, se aclaró en terpinol 5-10 min, y se emplearon dos cambios de xileno de 5 min cada uno, posteriormente se montó en resina.

Una vez secas las preparaciones, se procedió a la selección de los portaobjetos que contenían los cortes donde se observaron las regiones rostral (interaural 0.2 mm, bregma -8.8 mm), medial (interaural -0.3 mm, bregma -9.3 mm) y caudal (interaural -0.8 mm, bregma -9.8 mm) según coordenadas estereotáxicas del atlas para rata de Paxinos y Watson (1982).

Las mediciones del cuerpo celular se efectuaron en los tipos celulares identificados como fusiforme, multipolar y ovoide en sus ejes mayor y menor en las tres regiones que configuran al LC. Las mediciones se realizaron con el microscopio de Luz Zeiss y con objetivos planapocromáticos de 40X/0.85 usando aceite de inmersión y ocular con reglilla de 50 unidades calibrada a escala micrométrica (0.01 mm).

De las preparaciones seriadas fueron seleccionadas 810 células de ratas controles (25% de caseína) y 810 células de ratas experimentales (6% de caseína), que contuvieran el núcleo completo y el soma neuronal bien teñido para el estudio de cada una

de las tres regiones en las que se dividió al núcleo y para los tipos celulares fusiformes, multipolares y ovoides, en las edades de 30, 90 y 220 días. Se midieron un total de 540 células del tipo fusiforme, 540 del tipo multipolar y otras 540 del ovoides en las regiones rostral, medial y caudal en las que se dividió el núcleo, por edad y condición experimental.

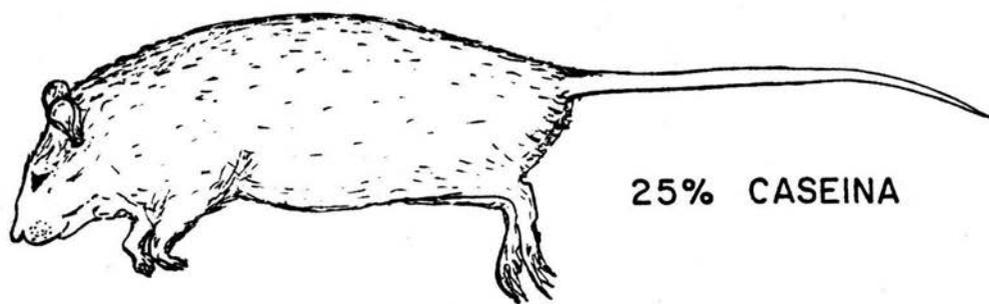
Se efectuaron comparaciones en cuanto a la variación que se encontró en el cuerpo celular, debido a la desnutrición y a la edad en lo que respecta a la longitud del eje mayor y el eje menor de las ratas control, versus el eje mayor y el eje menor de ratas experimentales, en las tres regiones del núcleo LC.

La significancia estadística para determinar las variaciones más importantes en las mediciones del cuerpo celular de las ratas experimentales respecto a las ratas controles, se obtuvo empleando una prueba de "t" Student para dos grupos no correlacionados.

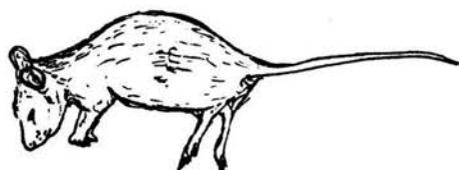
RESULTADOS.

Los estudios citomorfométricos revelaron tres tipos celulares que configuran al LC: fusiformes, multipolares y ovoides, los que fueron cuantificados en sus ejes mayor y menor del soma neuronal en las regiones rostral, medial y caudal como pueden observarse a la edad de 90 días, en las figuras 3, 4 y 5; también fué evidente un empaquetamiento celular diferente entre los animales normales y los desnutridos, así como, entre las tres regiones en las que se dividió el núcleo.

En la figura 6 se muestran los valores medios (\bar{X}) del eje mayor y menor de las células fusiformes en su región rostral, medial y caudal a las edades de 30, 90 y 220 días. La región medial mostró el mayor número de cambios en estas células y se encontraron diferencias significativas en el eje menor en las tres edades estudiadas, a los 90 días este parámetro estuvo significativamente más reducido respecto al control. En la misma región a los 220 días se encontró un decremento significativo del eje mayor experimental con respecto al control. La región caudal mostró cambios significativos en el eje menor a la edad de 30 días donde hubo un aumento en el desnutrido respecto al control, y a los 220 días se presentó un decremento más significativo del mismo parámetro. En las tablas II a IV se presentan los porcentajes de cambio de los parámetros estudiados.



25% CASEINA



6% CASEINA

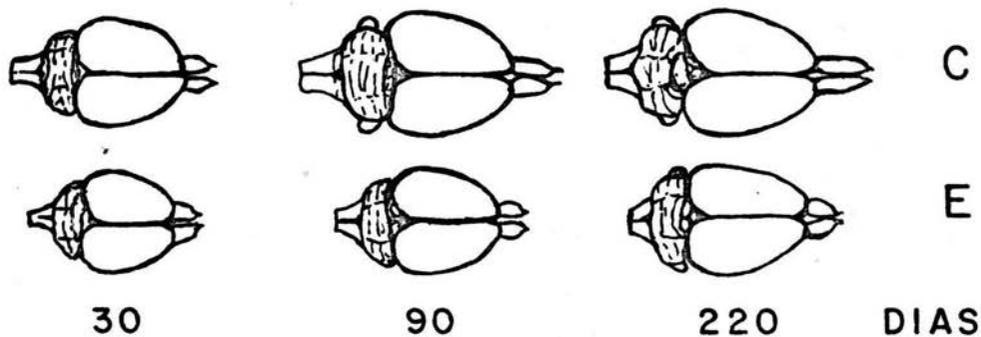


Fig.2 En la parte superior se muestra la talla corporal de ratas macho control (25% de caseína) y desnutrido (6% de caseína) a los 90 días de edad. En la parte inferior se muestran los cerebros de una vista dorsal comparativa de ratas controles (C) y experimentales (E) a 30, 90 y 220 días.



Fig. 3 Fotomontaje en el plano coronal rostral (anterior) del núcleo Locus coeruleus (LC), delimitado con líneas discontinuas. A la izquierda se muestran las fotografías del LC en donde se seleccionaron las células (160X) de las ratas controles y a la derecha las de los animales desnutridos. Las fotografías inferiores muestran ejemplos de los tres tipos celulares en donde se midieron los ejes mayor y menor del cuerpo celular (400X). Nótese el empaquetamiento celular diferente entre el control y el desnutrido así como en las 3 regiones del LC. Abreviaciones: pineal (P), corteza occipital (CXO), acueducto (A), substancia gris periventricular (SGV), núcleo rafe dorsal (R), brachium conjuntivum (BC), fascículo longitudinal medial (FLM), tracto espino talámico (TET), célula fusiforme (F), célula multipolar (M) y célula ovoide (O). Edad 90 días.

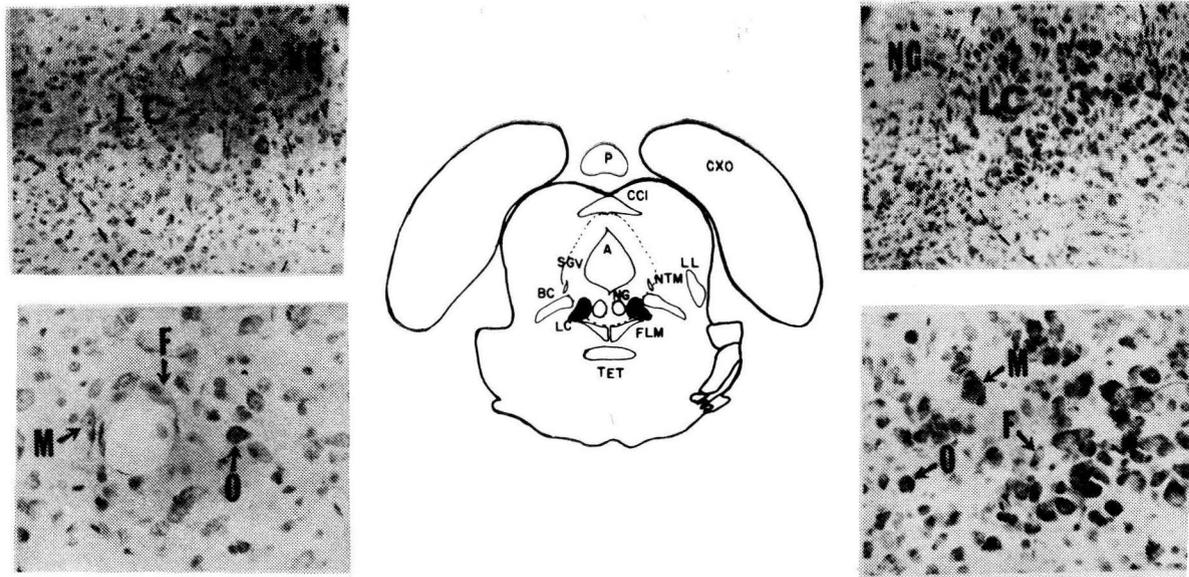


Fig. 4 Fotomontaje en el plano coronal medial del núcleo *Locus coeruleus*. Con las mismas especificaciones de la Fig. 3. Abreviaciones: comisura del colículo inferior (CCI), lemnisco lateral (LL), núcleo mesencefálico (NTM), núcleo Gudden (tegmental dorsal) (NG).

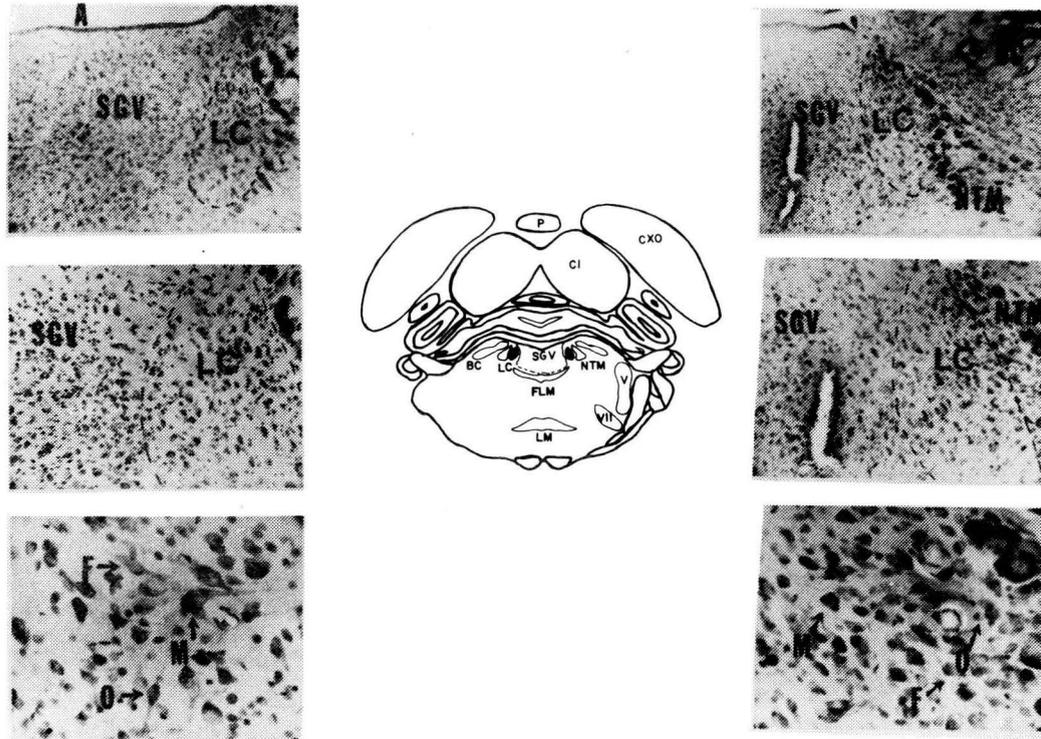


Fig. 5 Fotomontaje en el plano coronal caudal (posterior) del núcleo Locus coeruleus. Con las mismas especificaciones de las Figs. 3 y 4. Abreviaciones: colículo inferior (CI), lemnisco medio (LM), núcleo del nervio trigémino (V), núcleo facial (VII).

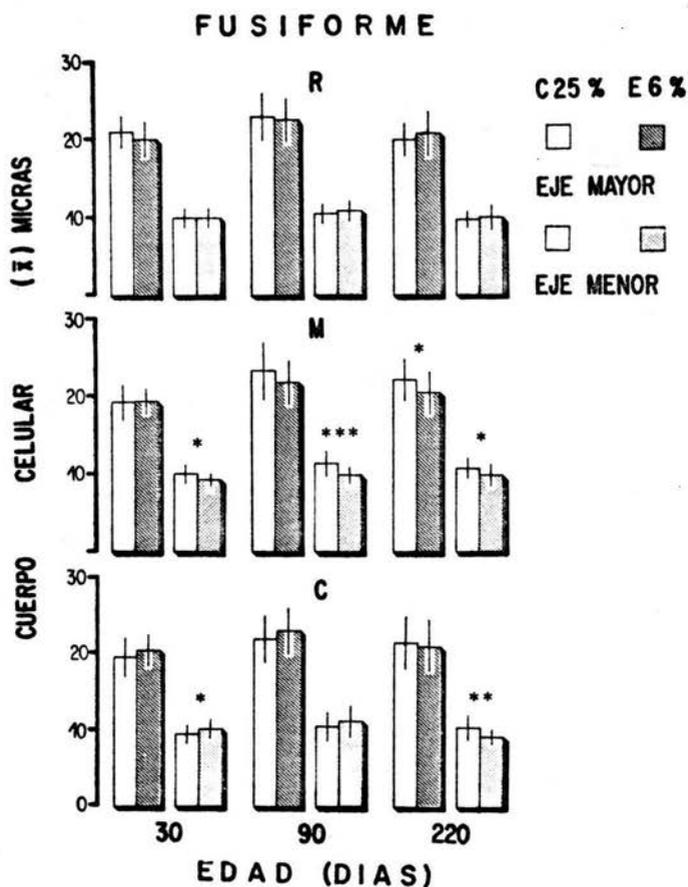


Fig. 6 Efectos de la desnutrición en el eje mayor y menor de las células fusiformes del núcleo Locus coeruleus. Cada barra representa el promedio (\bar{X}) + 1 desviación estándar (DS) de 30 células en su porción rostral (R), medial (M) y caudal (C) a las edades de 30, 90 y 220 días. Las ratas control (25% de caseína) se representan en su eje mayor y menor con barras vacías y los organismos experimentales (6% de caseína) se representan en su eje mayor por barras con líneas inclinadas y en su eje menor por barras cuadrículadas. Obsérvese un mayor efecto en el eje menor de la región (M) y (C) en diferentes edades. La significancia estadística expresada con asteriscos corresponden a: $p < 0.05^*$, $p < 0.01^{**}$ y $p < 0.001^{***}$

TABLA II

Valores medios, desviación estandar (+) y % de cambio de los ejes mayor y menor del soma en las células fusiformes, multipolares y ovoides en el núcleo Locus coeruleus, en las regiones: rostral (R), medial (M) y caudal (C) en ratas controles (25% de caseína) y ratas experimentales (6% de caseína) a los 30 días de edad.

Tipo celular	Condición	R		M		C	
		Eje mayor (micras)	Eje menor (micras)	Eje mayor (micras)	Eje menor (micras)	Eje mayor (micras)	Eje menor (micras)
Fusiforme	Control	20.92	10.04	19.19	10.04	19.45	9.48
		+1.93	+1.14	+2.32	+1.25	+2.52	+1.22
	Experimental	19.99	10.01	19.25	9.31	20.32	10.14
		+2.37	+1.19	+1.70	+0.88	+2.05	+1.28
% de cambio	-4.95	-0.30	+0.31	-7.27*	+4.47	+6.96*	
Multipolar	Control	16.73	11.34	15.73	10.84	16.49	11.31
		+1.45	+1.03	+1.83	+1.35	+1.04	+1.02
	Experimental	15.86	10.91	15.83	10.51	16.69	11.31
		+1.42	+0.86	+1.28	+1.00	+1.53	+0.99
% de cambio	-5.20*	-3.79	+0.64	-3.04	+1.21	0.00	
Ovoide	Control	12.01	11.04	11.44	10.74	11.07	10.41
		+1.35	+0.98	+1.28	+1.07	+1.09	+0.93
	Experimental	11.27	10.51	10.78	9.98	11.14	10.68
		+0.98	+1.27	+1.24	+0.91	+0.91	+0.91
%de cambio	-6.16*	-4.80*	-5.77*	-7.08**	+0.63	+2.59	

n=30 p < 0.05* p < 0.01**

TABLA III

Valores medios, desviación estandar (+) y % de cambios de los ejes mayor y menor del soma en las células fusiformes, multipolares y ovoides en el núcleo Locus coeruleus, en las regiones rostral (R), medial (M) y caudal (C) en ratas controles (25% de caseína) y ratas experimentales (6% de caseína) a los 90 días de edad.

Tipo celular	Condición	R		M		C	
		Eje Mayor (Micras)	Eje Menor (Micras)	Eje Mayor (Micras)	Eje Menor (Micras)	Eje Mayor (Micras)	Eje Menor (Micras)
Fusiforme	Control	22.78	10.51	23.31	11.47	21.81	10.51
		+2.95	+1.24	+3.73	+1.73	+3.02	+1.81
	Experimental	$\bar{22.51}$	$\bar{10.87}$	$\bar{21.85}$	$\bar{9.98}$	$\bar{22.91}$	$\bar{11.27}$
		+2.85	+1.34	+2.80	+1.11	+3.28	+1.74
% de cambio	-1.18	+3.43	-6.26	-12.99***	+5.04	+7.23	
Multipolares	Control	17.89	12.34	18.59	13.00	17.33	11.81
		+2.30	+2.22	+2.07	+1.49	+3.34	+1.83
	Experimental	$\bar{18.49}$	$\bar{13.00}$	$\bar{16.59}$	$\bar{11.01}$	$\bar{17.03}$	$\bar{11.70}$
		+2.25	+1.16	+1.93	+1.24	+1.78	+1.33
% de cambio	+3.35	+5.34	-10.75***	-15.30***	-1.73	-0.93	
Ovoides	Control	12.40	11.37	12.87	11.70	12.47	11.51
		+1.65	+1.35	+2.42	+2.08	+2.20	+1.73
	Experimental	$\bar{13.44}$	$\bar{12.30}$	$\bar{11.97}$	$\bar{10.88}$	$\bar{12.04}$	$\bar{11.27}$
		+2.19	+1.78	+1.89	+1.64	+2.34	+2.22
% de cambio	+8.38*	+8.17 *	-6.96	-7.00	-3.44	-2.00	

n=30 p < 0.05* p < 0.001***

TABLA IV

Valores medios, desviación estandar (+) y % de cambios de los ejes mayor y menor del soma en las células fusiformes, multipolares y ovoides en el núcleo Locus coeruleus, en las regiones rostral (R), medial (M) y caudal (C) en ratas controles (25% de caseína) y ratas experimentales (6% de caseína) a los 220 días de edad.

Tipo celular	Condición	R		M		C	
		Eje mayor (micras)	Eje menor (micras)	Eje mayor (micras)	Eje menor (micras)	Eje mayor (micras)	Eje menor (micras)
Fusiforme	Control	19.93	9.75	22.18	10.84	21.42	10.48
		+2.24	+1.04	+2.69	+1.30	+3.43	+1.67
	Experimental	20.68	10.04	20.55	9.98	20.92	9.38
		+2.88	+1.61	+2.68	+1.36	+3.42	+1.04
% de cambio	+3.76	+2.97	-7.34*	-7.93*	-2.33	-10.10**	
Multipolares	Control	16.53	11.14	17.86	12.20	17.19	11.71
		+2.12	+1.41	+1.82	+1.30	+2.62	+1.63
	Experimental	16.89	11.34	16.46	11.14	17.36	11.71
		+1.61	+1.09	+1.61	+1.20	+1.84	+1.17
% de cambio	+2.17	+1.79	-7.83**	-8.68**	+0.98	0.00	
Ovoides	Control	11.81	10.98	12.20	11.27	12.70	11.97
		+1.31	+1.17	+1.61	+1.46	+2.13	+1.91
	Experimental	11.44	10.51	11.24	10.78	12.04	10.51
		+1.16	+0.97	+1.14	+1.06	+1.38	+0.97
% de cambio	-3.13	-4.28	-7.86**	-4.34	-5.19	-12.19***	

n=30 p < 0.05* p < 0.01** p < 0.001***

Las células multipolares (Fig.7), mostraron cambios en la porción rostral y medial exceptuando la caudal. En la porción rostral a los 30 días la única diferencia significativa que se encontró fué un decremento en el eje mayor de las células experimentales con respecto a las células controles. La porción medial mostró los cambios más significativos a las edades de 90 y 220 días en ambos ejes, en donde se observó una reducción significativa en los ejes mayor y menor de las células experimentales, con respecto a los controles (Tablas II a IV).

En las células ovoides (Fig.8), fué el único tipo celular donde encontramos alteraciones en las tres regiones. La porción rostral a los 30 y 90 días mostró cambios significativos tanto en el eje mayor como en el eje menor del soma experimental, a los 30 días se presentaron significativamente disminuidos ambos ejes con respecto al control, en tanto que a los 90 días estos dos pa rámetros experimentales estuvieron significativamente aumentados respecto al control. En la porción medial, las células ovoides mostraron una reducción significativa del cuerpo celular en su eje mayor, a los 30 y a los 220 días; en esta misma región a los 30 días el eje menor del soma experimental, resultó significativamente disminuido respecto al soma control. En la porción caudal sólo se encontró significativamente disminuído el eje menor del soma experimental, respecto al control, a la edad de 220 días (Ta blas II a IV).

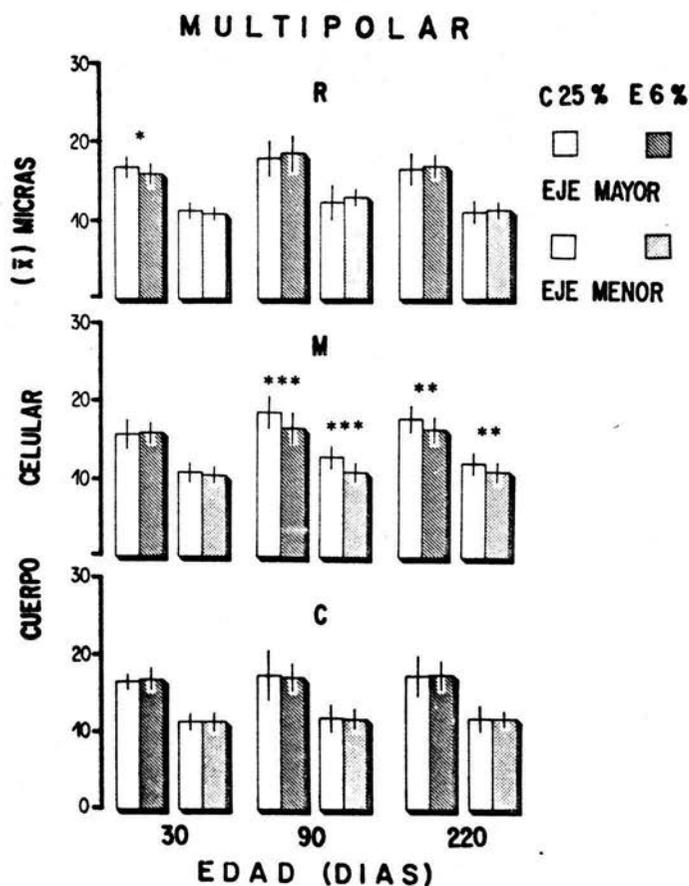


Fig. 7 Efectos de la desnutrición en el eje mayor y menor de las células multipolares del núcleo Locus coeruleus. Cada barra representa el promedio (\bar{X}) + 1 desviación estandar (DS) de 30 células en su porción (R), (M) y (C), representadas con las especificaciones de la Fig. 6. Obsérvese el cambio en la región (M) a los 90 y 220 días en ambos ejes. $p < 0.05^*$, $p < 0.01^{**}$ y $p < 0.001^{***}$

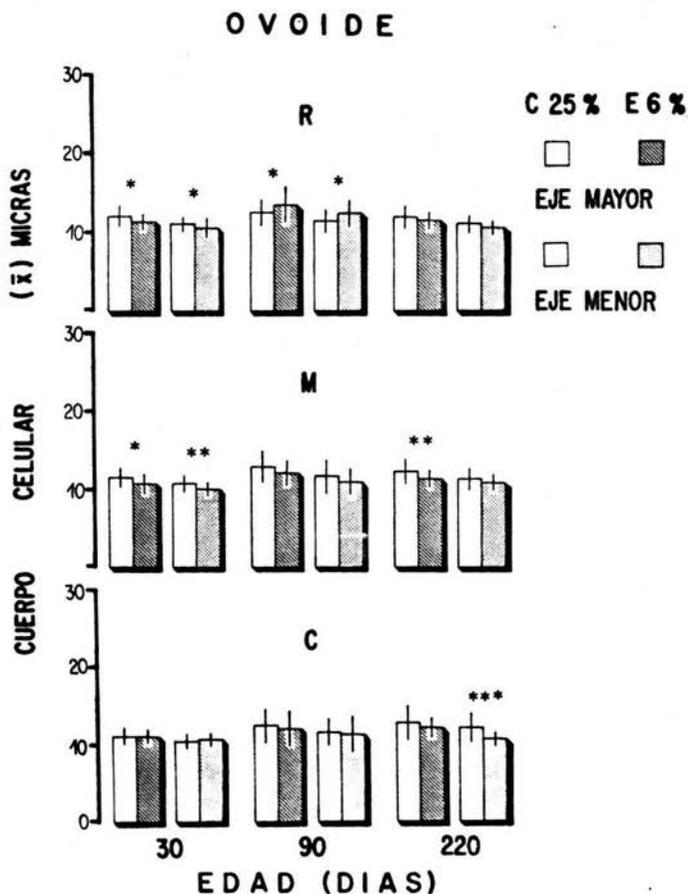


Fig. 8 Efectos de la desnutrición en el eje mayor y menor de las células ovoideas del núcleo Locus coeruleus. Cada barra representa el promedio (\bar{X}) + 1 desviación estándar (DS) de 30 células en su porción (R), (M) y (C), representadas con las especificaciones de la Fig. 6. Nótese un efecto difuso en ambos ejes en las 3 regiones en diferentes edades. $p < 0.05^*$, $p < 0.01^{**}$ y $p < 0.001^{***}$

Cuando analizamos el número de cambios significativos producidos por la desnutrición en los ejes mayor y menor de los tres tipos celulares del núcleo LC y en sus tres regiones encontramos 16 decrementos y solo 3 incrementos en el tamaño celular, uno en las células fusiformes en la región caudal y dos en las células ovoides en la región rostral. Por otra parte la región más afectada por la desnutrición fué la región medial con 11 cambios seguidos de la rostral con 5 y luego la caudal con 3.

Así, el 97% de los cambios corresponden a decrementos en el cuerpo celular de los tipos fusiforme, multipolar y ovoide en el LC y en las tres regiones del mismo, y sólo 3% de incrementos el cual correspondió a dos tipos celulares el fusiforme y el ovoide. La célula más afectada en el tamaño celular fué la ovoide en sus tres regiones, seguida de la fusiforme y finalmente la multipolar.

La figura 9 describe el valor medio total de la suma de las tres regiones y de los tres tipos celulares del núcleo LC en sus ejes mayor y menor, en las tres edades estudiadas, encontrándose en las células fusiformes a la edad de 220 días que el eje menor del soma experimental se redujo significativamente respecto al control. Las células ovoides a los 30 y a los 220 días mostraron reducciones significativas del eje mayor y menor del soma experimental en comparación con el control.

En relación con los cambios debidos a la edad (Tabla V), las células del núcleo LC presentaron las siguientes características:

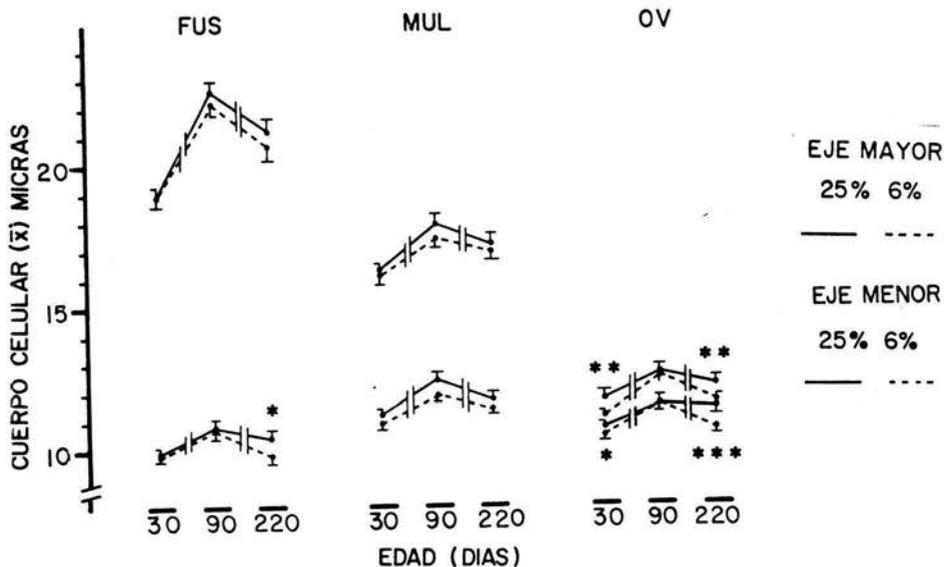


Fig. 9 Gráfica que muestra el valor medio (\bar{X}) total y 1 desviación estándar de la suma de las tres regiones del núcleo Locus coeruleus (R, M y C) en cada uno de los tres tipos celulares y en los dos ejes medidos. Cada punto representa el promedio de 30 células. Obsérvese el incremento del tamaño del cuerpo celular entre 30 y 90 días y el decremento entre 90 y 220 días en ambas condiciones experimentales. Los asteriscos muestran las diferencias significativas entre el control y el desnutrido. Las células ovoides muestran el mayor número de cambios a los 30 y 220 días. $p < 0.05^*$, $p < 0.01^{**}$ y $p < 0.001^{***}$

Se encontraron por lo general incrementos significativos en los dos parámetros estudiados del cuerpo celular, entre 30 y 90 días en las tres regiones analizadas, en los organismos controles. Sin embargo entre los 90 y 220 días las células fusiformes y las multipolares en los animales control, presentaron un decremento significativo en su eje mayor y menor de la porción rostral y únicamente en las células multipolares se encontró un decremento en el eje menor de la porción medial entre las mismas edades; las células ovoides no mostraron cambios en esas edades.

Los organismos experimentales mostraron incrementos entre 30 y 90 días de los ejes mayor y menor de la región rostral, en los tres tipos celulares. Las células fusiformes en la región medial presentaron un incremento significativo del eje mayor y la célula ovoide en esta misma región, también presentó incremento en el eje mayor y en el menor entre 30 y 90 días. La célula fusiforme fué el único tipo celular en la rata experimental que presentó un incremento de ambos ejes entre 30 y 90 días en la región caudal. Entre 90 y 220 días las ratas experimentales presentaron decrementos significativos en los tres tipos celulares, en la región rostral de los ejes mayor y menor y en la región caudal las células fusiformes presentaron un decremento en ambos ejes, en esas edades.

Cuando comparamos en la tabla V las tres regiones en los tres tipos celulares en ambos animales controles y desnutridos

TABLA V

Porcentajes de cambio debidos a la edad (entre los 30 y los 90 días, y los 90 y 220 días) en los ejes mayor y menor del soma en las células fusiformes, multipolares y ovoides del núcleo Locus coeruleus, en las regiones rostral (R), medial (M) y caudal (C) en ratas controles (25% de caseína) y ratas experimentales (6% de caseína).

Tipo celular	Condición	R		M		C		
		Eje Mayor	Eje Menor	Eje Mayor	Eje Menor	Eje Mayor	Eje Menor	
Fusiforme	Control	+ 9%*	+ 5%	+21%***	+14%***	+12%*	+ 11%**	
		30 Vs 90	Experimental	+13%***	+ 9%*	+14%***	+ 7%	+13%***
	90 Vs 220	Control	+13%***	- 7%*	- 5%	- 6%	- 2%	0.0
		Experimental	- 8%*	- 8%*	- 6%	0.0	- 9%*	- 17%***
Multipolar	Control	+ 7%*	+ 9%*	+18%***	+20%***	+5%	+ 4%	
		30 Vs 90	Experimental	+17%**	+19%***	+ 5%	+ 5%	+2%
	90 Vs 220	Control	- 8%*	-10%*	- 4%	- 6%*	-1%	- 1%
		Experimental	- 9%**	-13%***	+ 1%	+ 1%	+2%	0.0
Ovoide	Control	+ 3%	+3%	+13%***	+ 9%*	+13%*	+10%**	
		30 Vs 90	Experimental	+19%***	+17%***	+11%***	+ 9%*	- 8%
	90 Vs 220	Control	-5%	-3%	-5%	-4%	+ 2%	+ 4%
		Experimental	-15%***	-15%***	-6%	-1%	0.0	- 7%

n=30 p < 0.5* p < 0.01** p<0.001***

se observó que la región rostral fué la que presentó el mayor número de cambios significativos estadísticamente (19), seguida de la región medial (10) y la menos afectada fué la región caudal (8).

De estos cambios en la región rostral, los animales control mostraron 7 cambios significativos distribuidos de la siguiente forma: las células fusiformes presentaron un incremento en su eje mayor entre 30 y 90 días, así como entre 90 y 220 días, y un decremento en su eje menor entre los 90 y 220 días. Las células multipolares mostraron incrementos del eje mayor y menor entre 30 y 90 días; entre 90 y 220 días se observaron decrementos en ambos ejes.

El animal desnutrido mostró 12 cambios muy consistentes en los tres tipos celulares, incrementos de ambos ejes mayor y menor entre 30 y 90 días, y entre 90 y 220 días mostraron decremento en dichos ejes.

En la región medial los organismos controles presentaron 7 cambios significativos localizados 6 de ellos entre 30 y 90 días con un incremento para ambos ejes en los tres tipos celulares, en tanto que el tipo multipolar, mostró un decremento de su eje menor entre 90 y 220 días. El animal desnutrido mostró 3 incrementos entre 30 y 90 días que fueron en el eje mayor y en ambos ejes en la ovoide.

La región caudal resultó ser la menos afectada, en los organismos controles encontramos 4 incrementos entre 30 y 90 días del eje mayor y menor en las células fusiformes y en las ovoides. El animal desnutrido mostró 4 cambios localizados en las

células fusiformes con incremento de ambos ejes entre 30 y 90 días, en tanto que entre 90 y 220 días hubo un decremento en dichos ejes.

En general se resume de estos resultados por la edad, que la región rostral del núcleo LC presentó un mayor número de cambios significativos en ambas condiciones, control y experimental. Dichos cambios en el eje mayor y menor de esta región en los tres tipos celulares se encuentran incrementados entre 30 y 90 días y luego decrementados entre 90 y 220 días. Las otras tres regiones mostraron cambios, fundamentalmente entre 30 y 90 días con incrementos del tamaño celular en organismos control y experimental, y los decrementos fueron localizados entre 90 y 220 días.

DISCUSION.

Se conoce desde hace tiempo que en general, las relaciones entre un organismo y su medio ambiente son muy importantes para que pueda existir un adecuado desarrollo y funcionamiento de los diversos sistemas que lo configuran. En este contexto se sabe que en los diversos organismos y en particular en los mamíferos, la nutrición juega un papel primordial para que se establezcan las bases estructurales y anatómicas adecuadas en sis temas como en el nervioso.

Por otra parte se conoce que de acuerdo con el grado de desarrollo que puedan presentar al nacer los mamíferos se les ha dividido en especies precoces y altriciales, entre las primeras se encuentran los que nacen con un grado de madurez avanzado y son capaces de defenderse por sí solos, en cambio los altriciales nacen relativamente inmaduros y necesitan del cuidado materno para sobrevivir, dentro de este grupo se encuentran tanto el hombre como la rata. Es por ello que en las últimas décadas han tenido mucha importancia los conocimientos relativos al crecimiento que ocurre en cualquier órgano, incluyendo al cerebro, el cual se lleva a cabo por el incremento del número de células o por el incremento del tamaño de las mismas, acoplándose ambos mecanismos. También se ha dividido el crecimiento de cualquier órgano en tres fases principales: a) un período temprano de rápida división celular, en el cual las células hijas son iguales en tamaño (hiperplasia), b) una segunda fase en la cual continúa

la división celular pero más lentamente, por lo que las células que resultan de tal división incrementan su tamaño en forma individual (hiperplasia con su concomitante hipertrofia) y c) una fase final en la cual cesa la división celular y todo el crecimiento que se produce es por agrandamiento (hipertrofia); en particular en el caso del sistema nervioso se lleva a cabo la diferenciación celular individual.

En el cerebro el período de hiperplasia termina más pronto que en otros órganos del cuerpo, por ejemplo en la rata la división celular en el cerebro se termina cuando ocurre el destete a los 21 días posnatales, de tal manera que la rata infante que se separa de su madre para llevar una existencia independiente, posee un cerebro con una población celular completa. Sin embargo el cerebro no es un órgano homogéneo, por lo que el tiempo en el cual ocurren estas tres fases difiere en regiones específicas. En la mayoría de las áreas del tallo cerebral no existe división celular después de los 15 días posnatales, mientras que en el hipocampo, la división celular se ha completado aproximadamente a los 6 días de edad, en contraste en el cerebelo ésta termina hasta el día 16 ó 17. Recientes estudios en el humano han mostrado que la división celular ocurre a un nivel acelerado hasta el nacimiento, continúa más lentamente hasta los cinco o seis meses y posteriormente cesa. El desarrollo bioquímico de neurotransmisores específicos varía en las diferentes áreas del cerebro, lo que refleja variaciones en cuanto a los diferentes tiempos de desarrollo en varias regiones. En una forma concomi-

tante con los cambios morfológicos y bioquímicos, existen cambios funcionales durante el desarrollo del sistema nervioso.

Como puede apreciarse, un animal o un órgano individual, exhiben un período temprano de rápido crecimiento celular y es precisamente durante este período que es más sensible a los diversos estados nutricionales, por lo que se piensa que la desnutrición puede interferir con el proceso de división celular, que dependiendo del tiempo en el cual ocurra, puede provocar daños en diverso grado, que pueden perdurar a largo plazo.

En los últimos años se ha dado mucha importancia a los denominados "períodos críticos", en los cuales ocurre el rápido crecimiento neuronal en el sistema nervioso central (Dobbing y col. 1971), ya que se sabe que si la desnutrición se instala después que han pasado dichos períodos, no se producen los efectos que se han encontrado durante ellos.

Por otra parte se ha enfatizado la importancia del papel que juega el metabolismo en las diversas especies, principalmente en cuanto a sus mecanismos adaptativos en cada organismo, lo cual ha originado conceptos en el sentido de que organismos con talla y peso corporal pequeños dentro de los mamíferos, posean un gasto metabólico mayor, que el que tienen organismos con peso y talla corporal mayores.

Tomando en consideración estos conceptos, es interesante el preguntarse ¿Cuáles son los cambios en los procesos metabólicos que emplean el sistema nervioso central, para adaptarse a factores como la desnutrición?. Si uno observa los cambios en la talla

corporal y cerebral que ocurren en la rata (Fig. 2), parece ser que la reducción que ocurre en mayor grado en el cuerpo y en menor grado en el cerebro, nos indican un mecanismo de adaptación sorprendente, el cual retrasa las curvas de desarrollo y maduración, pero que le permiten al animal sobrevivir y poder competir con otros individuos

Uno de los propósitos de la presente tesis, ha sido el analizar como reaccionan las células del núcleo Locus coeruleus a una desnutrición prenatal y posnatal crónica y comparar los resultados con los hallazgos en estudios previos. En los estudios que realizaron Díaz-Cintra y col. (1984) en estas mismas células empleando técnicas de Nissl y Golgi rápido y aplicando una desnutrición de solo 8% de caseína, reportaron que el eje mayor y menor de las células multipolares y ovoides se encuentra reducido en los animales desnutridos, en las mismas edades estudiadas en el presente trabajo; en las células fusiformes el eje mayor de las neuronas de las ratas desnutridas, también se encontró disminuido, sin embargo su eje menor se encontró aumentado. Los resultados de la presente tesis confirman dichos hallazgos y solo se encontró una diferencia que consistió en un decremento en el eje menor de las células fusiformes, estudiadas con la técnica de Nissl y desnutrición del 6% de caseína.

Al analizar los cambios debidos a la edad en ambos animales controles y desnutridos con la dieta del 8% de caseína, se encontró que entre la edad de 30 y 90 días, existen en los dos animales aumentos en su tamaño celular, cuantificados por la misma me

dición del eje mayor y menor, en las células fusiformes y ovoides. En esas mismas células se encontraron decrementos en el tamaño celular entre los 90 y 220 días, en los mismos parámetros, con la excepción de los controles, que mostraron incrementos en su eje menor. Los hallazgos en la presente tesis también revelan el mismo patrón, pero se encontraron diferencias en las células fusiformes y las ovoides, las que presentaron decrementos en su eje menor entre los 90 y 220 días y las células multipolares, incrementaron su tamaño entre los 30 y 90 días, en las ratas desnutridas y entre los 90 y 220 días los animales normales, mostraron decrementos en ambos ejes; lo cual revela un comportamiento diferente de la célula multipolar, que de acuerdo con los estudios de Pfister y Danner (1980), pudiera ser la productora de noradrenalina.

Es importante observar, de acuerdo con los estudios previos sobre desnutrición de Díaz-Cintra y col. (1981 y 1984), en los núcleos rafe dorsal y Locus coeruleus, en los que se usaron mediciones morfométricas con las técnicas de Nissl y Golgi, así como los resultados que se reportan en la presente tesis, en los cuales se han encontrado incremento en las mediciones de las neuronas de las ratas desnutridas, cuando han sido comparadas con los controles, o por efecto de la edad; que dichos incrementos no se han reportado frecuentemente en la literatura, sino que la gran mayoría de las mediciones efectuadas en las neuronas corticales o en las células de Purkinje en el cerebelo han mostrado déficits en las neuronas de los desnutridos o bien no existen di-

ferencias. En este sentido apoyan estos resultados los hallazgos de Hammer (1981), en las células reticulares del tallo cerebral de animales desnutridos prenatalmente y posnatalmente, que mostraron por la desnutrición prenatal, un incremento de la extensión dendrítica al nacimiento, mientras que la desnutrición posnatal provocó un incremento de las protoespinas dendríticas proximales y distales, a la edad de 20 días. De una manera similar, Schönheit (1982), en un estudio morfométrico usando la técnica de Golgi, para analizar los efectos de la desnutrición en la corteza del cíngulo, encontró en las células estrelladas un incremento en la longitud dendrítica total a la edad de 30 días en los animales desnutridos, que no se encontró a los 60 días. En los estudios mencionados, las células que exhibieron incrementos en las cuantificaciones morfométricas, como una adaptación a la desnutrición son neuronas tipificadas como no piramidales, las cuales en el tallo cerebral son neuronas reticulares con axones cortos o largos; mientras que las que se localizan en la corteza, son interneuronas que establecen circuitos locales. El significado de estos diferentes patrones de adaptación de las células piramidales y las no piramidales, aún es desconocido. Sin embargo el hecho de que presenten diferencias en su adaptación y en su relación entre los núcleos rafe dorsal y Locus coeruleus, provee una evidencia morfológica en el sentido de que las relaciones entre las neuronas pueden ser alteradas en forma fundamental por la desnutrición.

La división artificial que se usó para estudiar al Locus

coeruleus, en sus regiones rostral, medial y caudal, puso de manifiesto que dependiendo de la edad, parece existir una división anatómica que posiblemente tenga una repercusión funcional importante, y dado el diferente comportamiento celular, se refuerza la hipótesis de Pfister y Danner (1980) en la cual presumiblemente las células fusiformes y multipolares son las productoras de noradrenalina, mientras que las ovoides representan la población interneural del núcleo.

Se debe mencionar que este tipo de estudios requiere de nuevas investigaciones que aporten mayor información para poder comprender las relaciones entre los sistemas de neurotransmisores, así como las relaciones entre diversos núcleos como el rafe dorsal y el Locus coeruleus, para poder entender mejor los cambios adaptativos que producen los factores como la desnutrición.

CONCLUSIONES.

Los resultados obtenidos en la presente tesis, permiten hacer las siguientes conclusiones:

- a) Los cambios morfológicos que produce la desnutrición proteínica crónica pre y posnatal, en el tallo cerebral de animales altriciales como la rata, se pudieron detectar a largo plazo en las células reticulares del núcleo Locus coeruleus.
- b) El modelo de desnutrición usado en este estudio produce cambios metabólicos que se reflejan en el peso y tamaño corporal, y cerebral y que en un extraordinario proceso de adaptación, permiten la supervivencia y la competencia de los animales desnutridos al medio ambiente.
- c) La desnutrición produce patrones de adaptación diferentes en las diversas poblaciones neuronales, así en las células piramidales y de Purkinje de las neocortezas cerebral y cerebelar respectivamente, se han reportado cuantificaciones neuronales morfométricas disminuídas, mientras que en las células no piramidales de la neocorteza y las células reticulares del tallo cerebral (núcleo rafe dorsal y Locus coeruleus), muestran incre-

mentos en sus parámetros celulares, empleando las mismas cuantificaciones.

- d) La desnutrición no produce efectos homogéneos en las células reticulares del núcleo Locus coeruleus, lo cual sugiere una diferenciación anatómica y funcional en las tres regiones estudiadas.
- e) Finalmente, la diferente respuesta de las células multipolares y fusiformes a la desnutrición que la de las ovoides, permiten apoyar la hipótesis de que las dos primeras son posibles productoras de noradrenalina y que las células ovoides son interneuronas.

REFERENCIAS

1. Andén, N.E., Dahlström, A., Fuxe, K., Larsson, K., Olson, L. and Urgerstedt, U., Ascending monoamine neurons to the telencephalon and diencephalon, Acta Physiol. Scand., 67 (1966) 313-326.
2. Barnes, D. and Altman, J., Effects of two levels of gestational-lactational undernutrition on the postweaning growth of the rat cerebellum, Exp. Neurol., 38 (1973) 420-428.
3. Cintra, L., Díaz-Cintra, S., Kemper, T. and Morgane, P.J. Nucleus locus coeruleus: a morphometric Golgi study in rats of three age groups, Brain Research, 247 (1982) 17-28.
4. Cordero, M.E., Díaz, G. and Araya, J. Neocortex Development during severe malnutrition in the rat, Am. J. Clin. Nutr. 29 (1976) 358-365.
5. Dahlström, A. and Fuxe, K., 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. (1964) 1-55.
6. Díaz-Cintra, S., Cintra, L., Kemper, T. Resnick, O. and Morgane, P.J. Nucleus raphe dorsalis: a morphometric Golgi study in rats of three age groups, Brain Research. 207: (1981) 1-16.
7. Díaz-Cintra, S., Cintra, L., Kemper, T., Resnick, O. and Morgane P.J. The effects of protein deprivation on the nucleus raphe dorsalis: a morphometric Golgi study in rats of three age groups., Brain Research, 221 (1981) 243-255.
8. Díaz-Cintra, S., Cintra, L., Kemper, T., Resnick, O. and Morgane, P.J., The effects of protein deprivation on the nucleus locus coeruleus: a morphometric Golgi study in rats of three age groups. Brain Research. 304: (1984) 243-253.
9. Dobbing, J., Hopewell, J.W. and Lynch, A., Vulnerability of developing brain VII. Permanent deficit of neurons in cerebral and cerebellar cortex following early mild undernutrition, Exp. Neurol., 32 (1971) 439-447.
10. Felten, D.L., and Crutcher, K.A., Neuronal-vascular relationships in the raphe nuclei, locus coeruleus and substantia nigra in primates, Amer. J. Anat., 155 (1979) 467-482.

11. Groves, P.M. and Wilson, C.J., Fine structure of rat locus coeruleus, J. Comp. Neurol., 193 (1980) 841-852.
12. Hammer, R.P. Jr. and Marthens E., Morphological development of brain stem reticular core in prenatally undernourished rats, Develop. Brain Res., 1 (1981) 203-212.
13. Jones, D.G. and Dyson, S.E., The influence of protein restriction, rehabilitation and changing nutritional status on synaptic development: a quantitative study in rat brain, Brain Research, 208 (1981) 97-111
14. Kemper, T.L., Pasquier, D.A. and Drazen, S., Effect of a low protein diet on the anatomical development of subcortical formations, Brain Research, Bull., 3 (1978) 443-450.
15. Lauder, J.M. and Bloom, F.E., Ontogeny of monoamine neurons in the locus coeruleus, raphe nuclei and substantia nigra of the rat. I. Cell differentiation, J.Comp. Neur., 155 (1974) 469-482.
16. Léger, L. and Henández-Nicaise M., The cat locus coeruleus, Anat. Embryol. 159 (1980) 181-198.
17. Léger, L., Wiklund, L., Descarries, L. and Persson, M., Description of an indolaminergic cell component in the cat locus coeruleus: a fluorescence histochemical and radioautographic study, Brain Research, 168 (1979) 43-56.
18. Leuba G. and Rabinowicz, Th., Long-term effects of post-natal undernutrition and maternal malnutrition on mouse cerebral cortex. I. Cellular densities, cortical volume and total numbers of cells, Exp. Brain Research, 37, (1979a) 283-298.
19. Leuba, G. and Rabinowicz, Th., Long-term effects of post-natal undernutrition and maternal malnutrition on mouse cerebral cortex. II. Evolution of dendritic branchings and spines in the visual region, Exp. Brain Research, 37 (1979b) 299-308.
20. Maeda, T., Pin, C., Salvat, D., Ligier, M. and Jouvét, M. Les neurones contenant des catecholamines du tegmentum pontique et leurs voies de projection chez le chat, Brain Research, 57 (1973) 119-152.
21. McConell, P., Berry, M., The effect of undernutrition on Purkinje cells growth in the rat, J.Comp. Neur., 177 (1978) 159-172.

22. McConell, P. and Berry, M., The effects of refeeding after varying periods of neonatal undernutrition on the morphology of Purkinje cells in the cerebellum of the rat, J. Comp. Neur., 200 (1981) 463-479.
23. Morgane, P.J. Miller, M., Kemper, T., Stern, W. Forber, W., Hall, R., Bronzino, J., Kissane, J., Hawrylewicz, E. and Resnick, O., The effect of protein malnutrition on the developing central nervous system in the rat, Neurosci. Biobehav. Rev. 2, (1978) 137-230.
24. Morgane, P.J., Kemper, T., Cintra, L. and Díaz-Cintra, S., Out-of-phase development of dendritic spines in locus coeruleus and nucleus raphe dorsalis in rats of three age groups. Dev. Brain Research, 4 (1982) 487-490.
25. Paxinos, G., Watson, CH., The rat brain in stereotaxic coordinates. Academic Press, Sydney (1982).
26. Pfister, V.C. and Danner, H., Fluoreszenzhistochemische und neurohistologische unterchungen am locus coeruleus der ratte, Acta Histochem., 66 (1980) 101-113.
27. Ramón y Cajal, S., Regions de la calotie eu étage intermédiaire du ceveau moyen. En: Histologie du systeme nerveus de l'homme et des vertebres, Vol. II. Maloine, Paris 1909- 1911, pp, 871-886 (Reprinted by C.S.I.S., Madrid, 1952).
28. Ramón Molinere, E. and Dansereau, J.A., The peribrachial region of the cat. I.A topographical study with special reference to the locus coeruleus, Cell Tiss. Res., 149, (1974) 173-190.
29. Ramón Molinere, E., The locus coeruleus of cat III. Light and electron microscopic studies. Cell Tiss. Res., 149, (1974) 205-221
30. Resnick, O., Miller, M., Forbes, W., Hall, R., Kemper, T., Bronzino, J. and Morgane P.J. Developmental protein malnutrition influences on the central nervous system of the rat, Neurosci., Biobehav. Rev., 3. (1979) 233-246.
31. Resnick O., Morgane, P.J. Hasson, R., Miller, M., Overt and Hidden forms of chronic malnutrition in the rat and their relevance to man, Neurosci., Biobehav. Rev., 6 (1982) 55-75.
32. Roussel, G.V., The nucleus locus coeruleus, Tex. Rep.Biol. Med., 13 (1955) 939-988.

33. Salas, M., Effects of early undernutrition on dendritic spines of cortical pyramidal cells in the rat, Dev. Neurosc., 3 (1980) 109-117.
34. Salas, M., Díaz, S., and Nieto, A., Effects of neonatal food deprivation on cortical and dendritic development of the rat, Brain Research., 73 (1974) 139-144.
35. Schönheit, B., Über den Einfluß einer frühen postnatalen Mangelernährung auf die Reifung kortikaler Neurone bei der Ratte, J. Hirnforsch., 23 (1982) 681-692.
36. Shepherd, G. M., Neurobiology, Oxford University Press, New York, 1983, pp. 164-183.
37. Shimizu, N., and Imamoto, K., Fine structure of the locus coeruleus on the rat, Arch. Histol. Jap., 31 (1970) 229-246.
38. Shimizu, N., Katoh, Y. T., and Satoh, K., The fine structural organization of locus coeruleus in the rat with reference to noradrenaline contents, Exp. Brain Res., 37, (1979) 139-148.
39. Swanson, L.W., The locus coeruleus: a cytoarchitectonic, Golgi and immunohistochemical study in the albino rat. Brain Research, 110 (1976) 39-56.
40. West, C.D. and Kemper, T., The effects of a low protein diet on the anatomical development of the rat brain, Brain Research, 107 (1976) 221-237.
41. Winick, M., and Noble, A., Cellular response in rats during malnutrition at various ages, J. Nutr. 89 (1966) 300-306.