

00343

4
24.



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

**FACULTAD DE CIENCIAS
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO**

EFFECTOS DE LA PRIVACION DE ALIMENTO SOBRE
EL ESTADO METABOLICO, EL APRENDIZAJE Y LA
MEMORIA EN RATONES MACHO ADULTOS Y SU
RELACION CON LA HORMONA DE CRECIMIENTO

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE
**MAESTRA EN CIENCIAS
(BIOLOGIA ANIMAL)**
P R E S E N T A
ROSALINDA DIAZ PEREZ

DIRECTORA DE TESIS: M. EN C. FRANCISCA VAZQUEZ PEREYRA

MEXICO, D. F.

1997.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



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.

**ESTA TESIS SE DESARROLLO
EN EL DEPARTAMENTO DE FISILOGIA
DE LA FACULTAD DE MEDICINA
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO**

AGRADECIMIENTOS

Con especial agradecimiento a la M en C. Francisca Vázquez Pereyra, por su valiosa asesoría académica y dirección de esta tesis y al Dr. Juan Antonio Roig Várela por el apoyo que me brindó para la realización de este trabajo.

También expreso mi agradecimiento a la Sra. Alicia Mondragón Hurtado por su constante apoyo, y por su fina comprensión.

Además quiero expresar mi agradecimiento a la Dra. Nora Galindo Miranda y a la Dra. Sara Cruz Morales por sus valiosas aportaciones en la revisión de este trabajo.

A mis sinodales, por sus comentarios y cuestionamientos, que me permitieron asumir una actitud mas crítica hacia mi trabajo y a su vez lo enriquecieron. Muchas gracias.

SINODALES

DRA.	MARGARITA VICTORIA GARCIA GARDUÑO
DRA.	MARIA LUISA FANJUL PEÑA DE MOLES
DR.	FRUCTUOSO AYALA GUERRERO
DR.	ROBERTO AGUSTIN PRADO ALCALA
M. EN C.	FRANCISCA VAZQUEZ PEREYRA
DR.	RENE DE JESUS CARDENAS VAZQUEZ
DRA.	SELVA RIVAS ARANCIBIA

INDICE

RESUMEN

INTRODUCCION.....	1
ANTECEDENTES	
Generalidades	2
Ritmos biológicos	4
Alimentación y metabolismo	5
Privación de alimento	8
Desnutrición	10
Efectos de la privación de alimento y la desnutrición sobre el sistema nervioso central	11
Aprendizaje y memoria	16
Memoria y hormona de crecimiento	18
Síntesis	26
OBJETIVOS	28
HIPOTESIS	29
MÉTODOS	
Primera etapa experimental	
Patrón de alimentación	30
Variaciones diarias del peso, la temperatura y de la actividad motora en ratones	31
Segunda etapa experimental	
Efectos de la privación de alimento sobre el peso, la temperatura y la actividad motora en ratones	32
Tercera etapa experimental	
Aprendizaje y memoria en ratones con privación de alimento	32
Tratamientos	33
Prueba de prevención pasiva	34
Análisis estadístico	36

RESULTADOS	37
DISCUSION	54
CONCLUSIONES	65
APORTACIONES	67
Apendice 1	
Actividad motora	68
Apendice 2	
Delimitación de la intensidad de estímulo	71
REFERENCIAS	76

RESUMEN

El objetivo de esta tesis fue determinar el efecto de la privación de alimento sobre el metabolismo y la retención de la memoria de corto y de largo plazo en ratones macho adultos, sometidos a una tarea de prevención pasiva, así como evaluar la participación de la hormona de crecimiento en los procesos de aprendizaje y memoria.

El trabajo se realizó en tres etapas experimentales: en la primera se sometió a un grupo de ratones a ciclos de luz natural (13:11) y otro a ciclos de luz controlada (12:12) y se observaron cada hora para establecer su patrón de alimentación; con otros grupos de ratones expuestos a luz natural se midió la temperatura rectal, el peso y la actividad motora cada 4 hrs. En la segunda etapa se midió la temperatura, el peso y la actividad motora de grupos de ratones con 0, 12, 20, 28, 36, 44, 52 y 60 hrs de privación de alimento. En la tercera etapa se evaluó la retención de la memoria de corto (MCP) y largo plazo (MLP) en ratones inyectados con solución salina y otros inyectados con hormona de crecimiento. En ambos casos se utilizaron grupos de ratones con 0, 28, 36, 44 y 52 hrs de ayuno. Durante el entrenamiento, se aplicó un estímulo nociceptivo de 1.5 mA durante 2 segundos y se midió la MCP 10 minutos después del entrenamiento y la MLP se midió 24 hrs después del entrenamiento. (En la 2ª y 3ª etapa los ratones estuvieron sometidos a ciclos de luz invertida 12:12).

Los resultados sugieren que los periodos de alimentación de los ratones dependen de los ciclos luz-obscuridad y varían según se use luz natural o luz controlada, además utilizan 4 hrs para su alimentación durante la fase de obscuridad. La temperatura no varía a lo largo del día, mientras que, el peso decrece y la actividad motora aumenta antes de iniciarse la alimentación. Durante la privación de alimento el peso y la temperatura se mantienen sin cambios significativos entre las 36 y 52 hrs de ayuno, con un aumento de la actividad motora a las 44 y 52 horas de ayuno. En cuanto a la retención de la memoria se observó un efecto favorable en la retención de la MCP en las primeras horas de ayuno y un deterioro de la retención de corto y largo plazo en los ratones con 52 horas de ayuno. En lo que se refiere a la hormona de crecimiento, se observó que ésta ejerce un efecto favorable en la retención de la MCP solamente cuando los ratones tienen alimento disponible, mientras que en situaciones de privación de alimento, la GH no tiene efectos sobre la retención de la memoria de corto y largo plazo.

SUMMARY

This thesis is focus in establishing the effect of food deprivation on the metabolism and the retention of short and long-term memory in adult male mice submitted to a task of pasive prevention, as well as to evaluate the participation of the growth hormone in the learning and memory process.

The work was done in three experimental stages: in the first one, a group of mice was submitted to natural light cycles (13:11) and another group to controlled light cycles (12:12), both being observed every hour so as to establish their feeding pattern; rectal temperature, weight and motor activity were measured every 4 hours in the group exposed to natural light. In the second stage, the temperature, weight and motor activity were measured in groups of mice with 0, 12, 20, 28, 36, 44, 52 and 60 hours of food deprivation. In the third stage, retention of the short-term memory (STM) and long-term memory (LTM) was evaluated in mice injected with a saline solution as well as in mice injected with growth hormone. In both cases, groups of mice with 0, 28, 36, 44 and 52 hours of fasting were used. During the training, a nociceptive stimulus of 1.5 mA was applied for 2 seconds, measuring the STM 10 minutes after and the LTM 24 hours after the training. In the 2nd and 3rd stages, mice were submitted to reverse lighth cycles (12:12).

Results suggest that the feeding periods of mice depend on lighth-darkness cycles and vary according to the type of lighth used, natural or controlled. Furthermore, they take 4 h feeding when in the darkness phase. Temperature does not vary along the day, while the weight decreases and motor activity increases before feeding begins. During food deprivation, weight and temperature have no significant changes between the 36 and 52 h of fasting, and an increase of motor activity is observed at the 44 and 52 h of fasting. As for memory retention, a favorable effect was observed in the retention of STM in the first hours of fasting and a deterioration in STM and LTM in mice with 52 h of fasting. Regarding the growth hormone, it was observed that this hormone has a favorable effect on the retention of STM only when mice have available food, while in food deprivation situations GH has no effects on the retention of short and long-term memory.

INTRODUCCION

Los trastornos que produce la malnutrición y el hambre en humanos, nos llevó a buscar algún mecanismo normal del organismo que pudiera contrarrestar el deterioro causado por el hambre sobre el aprendizaje y la memoria.

Elegimos a la hormona de crecimiento (GH) como un elemento que pudiera favorecer la retención en animales privados de alimento, ya que ésta se ha usado con bastante éxito en alteraciones de la memoria producidas por la vejez. Además se reportaron mejoras en el aprendizaje de niños con deficiencias de GH cuando se trataron con esta hormona (Laron y Galatzer, 1985).

En nuestro caso elegimos como sujetos de estudio a ratones macho adultos, ya que por su tamaño y peso resultó ser la especie mas adecuada para probar la hormona de crecimiento. Debido a la carencia de información decidimos establecer en primer lugar, sus hábitos y su dependencia fisiológica a los ciclos luz-obscuridad; en segundo término establecer las diferencias que presentan los ratones con alimentación normal y con privación de alimento frente a un paradigma de prevención pasiva.

Además, fue necesario establecer si la privación de alimento produce alteraciones fisiológicas que pudieran interferir en la posibilidad de aprender o recordar en los ratones.

Con estos elementos, estuvimos ya en condiciones de probar los efectos de la hormona de crecimiento en ratones con alimentación normal y otros con privación de alimento.

ANTECEDENTES

Generalidades.

La historia evolutiva de los animales muestra la estrecha relación que éstos establecen con su medio ambiente natural. Su adaptación y supervivencia dependen de los mecanismos que permiten mantener su homeostasis funcional. En muchas especies la presencia de un complejo sistema neural les confiere la capacidad de aprender y memorizar experiencias nuevas que favorecen su supervivencia como individuo y como especie.

Se ha demostrado que la conducta y las características fisiológicas de los animales, están reguladas por factores ambientales como la luz, la temperatura y la humedad; estos parámetros limitan la distribución de la vida en el planeta (Krebs, 1978) y son capaces de actuar como estímulos sincronizadores de diversas funciones cíclicas o fluctuaciones periódicas del organismo. El número de ciclos por unidad de tiempo son variables, pueden presentarse desde un ciclo por milisegundo (ultradianos) a un ciclo por año (circanuales), sin embargo, se ha comprobado que la mayoría de los procesos fisiológicos, muestran variaciones cíclicas relacionadas con la duración del día por lo que a éstos se les denomina ritmos circadianos o circádicos (Aschoff, 1960).

La persistencia de los ritmos circádicos en los mamíferos tiene un origen endógeno (Richter, 1922) y por su participación en la ciclicidad de los procesos fisiológicos, se conoce como reloj fisiológico. Posteriormente, Moore y Eichler (1972) identificaron como el reloj fisiológico a una estructura

denominada núcleo supraquiasmático, que se ubica en el hipotálamo anterior del cerebro. La señal sincronizadora ambiental más importante en el sistema circádico de mamíferos es el ciclo luz-obscuridad, el cual juega un papel fundamental en la adaptación del sujeto a su ambiente.

La temperatura ambiental es otro de los factores que influyen sobre la actividad y la distribución geográfica de los organismos. Para hacer frente a los cambios térmicos de su hábitat, los organismos desarrollaron diferentes mecanismos de adaptación fisiológicos como la endotermia, ectotermia, crecimiento de pelo y acumulación de grasa. Otros organismos desarrollaron mecanismos conductuales como la construcción de madrigueras, la hibernación y la migración.

Otro factor importante que limita la distribución de los organismos en el planeta es la presencia o ausencia de recursos alimenticios. Se sabe que todos los organismos que comparten un mismo espacio físico, establecen relaciones interespecíficas e intraespecíficas que les permiten regular sus patrones de alimentación y de predación. En el mejor de los casos logran una alimentación suficiente, para restituir el gasto energético debido a funciones vitales y búsqueda de alimento.

La importancia de estos factores sobre la homeostasis funcional de los organismos ha sido valorada con diversas investigaciones. Para los propósitos de este trabajo, presentamos los reportes que relacionan a la luz, la temperatura, la alimentación y la actividad motora con el aprendizaje y la memoria.

Ritmos biológicos

Si bien, los ritmos circádicos han sido estudiados en diversos sistemas biológicos desde el siglo XVI (Jean Jacques d'Ortous de Mairan 1729, citado por Zhang, 1992), los primeros antecedentes que se tienen de la relación entre los ciclos luz-obscuridad y el patrón alimentario en ratón, rata, mono y cabra fueron expuestos por Bruce (1960) y Aschoff (1964). Con sus resultados, estimularon el interés de los investigadores para estudiar los ritmos circádicos. Entre ellos, se encuentran Bolles y De Lorge (1962) quienes trataron de establecer si el incremento de actividad que se anticipa a la alimentación es producido por estímulos internos como lo postularon Reid y Finger (1955), o está condicionado a los cambios ambientales en el laboratorio (iluminación, temperatura, presencia de personas o actividad de otros animales). Para ello expusieron a ciclos luz-obscuridad natural a tres grupos de ratas, al primero se le alimentaba cada 19 horas, al segundo cada 24 horas y al tercero cada 29 horas. Observaron que al variar la hora de alimentación, no se presentó la actividad que se anticipaba a la misma, por lo que sugirieron que la actividad de la rata está controlada por el reloj biológico de las 24 horas y que esta actividad se sincroniza con la hora de la alimentación.

Posteriormente, Edmonds y Adler (1977) confirmaron la relación entre los ciclos de luz-obscuridad y el patrón de alimentación, ya que observaron que ratas con alimentación *ad libitum* y ciclos luz-obscuridad 12:12, desarrollaron básicamente un patrón nocturno de actividad que está asociado con la presencia del alimento. Cuando someten a las ratas a iluminación constante, éstas mantienen un ritmo de actividad relacionado con la alimentación, por lo que estos investigadores aseguran que la

presencia de alimento fué un estímulo más potente que los ciclos luz-obscuridad, en el control de la actividad de las ratas.

Otro aspecto estudiado, fué la relación cíclica de la ingestión de agua y el consumo alimentario en ratas expuestas a ciclos de luz-obscuridad natural. Mori et al. (1983) reportaron que las ratas ingerían mayor volumen de agua a la hora en que se les permitía comer (14:00 - 16:00 hrs), este evento lo relacionaron con los ritmos circádicos. También observaron que al dejar a la rata con alimento ad libitum, éstas mantuvieron el patrón de consumo de agua previamente adquirido, por lo que concluyeron que la persistencia en la memoria de la hora y tiempo del consumo de agua y la alimentación, es dependiente del reloj biológico.

Alimentación y metabolismo

En relación a la alimentación y a la temperatura corporal, Brobeck (1948) propuso que el alimento provee de la energía necesaria para aumentar el calor interno y la estabilidad metabólica de un organismo, a ésta se le conoce como hipótesis termorregulatoria. En ella plantea que los animales comen para ganar calor y dejan de comer para prevenir la hipertermia y explica que el exceso de calor produce una elevación de la temperatura cerebral que estimula al hipotálamo y de esta manera regula la temperatura corporal por mecanismos de retroalimentación nerviosa. Esta hipótesis enfatiza la relación entre el gasto de energía para la termorregulación y el control de esta energía por el consumo de alimento.

Por otra parte, existe controversia para determinar si el contenido calórico de la dieta y la actividad son factores que influyen en la elevación de la temperatura corporal y cerebral. En los siguientes trabajos se marca esta controversia: Rampone y Shirasu (1964) realizaron trabajos en ratas sometidas a diferentes dietas, midieron la temperatura cerebral y rectal. Observaron un incremento de la temperatura cerebral y un decremento en la temperatura rectal con todas las dietas, y explican que las diferencias de temperatura responden a un reflejo vasomotor que resulta de la propagación y dirección del flujo sanguíneo y concluyeron que los cambios de temperatura no están correlacionados con una propiedad específica del alimento, ni con la cantidad de comida ingerida. A su vez, Abrams y Hammel (1964) realizaron un trabajo en ratas sometidas a dietas con diferente contenido calórico y demostraron que en todos los grupos, el inicio de la alimentación está asociado con un incremento de la temperatura del área preóptica, la corteza cerebral y la cavidad abdominal; simultáneamente registraron un incremento del 60 - 70 % de la tasa metabólica; sin embargo, estos autores no reportaron ninguna relación entre el tipo de dieta y el incremento de la temperatura, en cambio asociaron la actividad durante la alimentación con el incremento de la temperatura del cuerpo y del cerebro.

Posteriormente, Adachi et al. (1991) realizaron un trabajo en ratas alimentadas con dietas con bajo y alto contenido protéico, midieron la temperatura en el hígado y la vena porta y observaron que la participación de la termogénesis hepática junto con el tejido adiposo, son los que causan el incremento de la temperatura corporal y esta elevación está determinada por la composición del alimento.

Esta controversia no ha sido aclarada por lo que existe la posibilidad de que tanto la actividad alimentaria y el tipo de dieta sean factores que influyen en el incremento de la temperatura cerebral y corporal durante la alimentación.

Hasta el momento sólo mencionamos la relación que establecen la alimentación, la temperatura corporal y la actividad motora, pero aún falta por explicar los mecanismos implicados en este proceso. Para ello nos remitimos a los trabajos de Mayer (1955), quien propuso la hipótesis glucostática para explicar la regulación del consumo de alimento. En ella plantea que el decremento de los niveles de glucosa en plasma dan inicio a la alimentación. Basándose en esta hipótesis Depocas (1962), demuestra que la gluconeogénesis puede satisfacer los elevados requerimientos de glucosa en ratas expuestas al frío. Lo anterior demuestra que la termogénesis inducida por exposición al frío, implica un incremento en la oxidación de la glucosa corporal, la cual es proporcional al incremento en el CO₂ producido. De manera similar, las ratas con 24 horas de ayuno incrementan su producción de calor por oxidación de glucosa.

Otra hipótesis que plantea la regulación de la alimentación es la hipótesis lipostática, ésta establece que el grado global de ingestión de alimento varía en proporción inversa a la cantidad de tejido adiposo que hay en la economía. Cuando aumenta la cantidad de tejido adiposo, la ingestión de alimento disminuye (Guyton, 1988). Su mecanismo de acción está recíprocamente relacionado con la actividad simpática hacia el tejido adiposo pardo. Esta relación recíproca se demostró con lesiones en el hipotálamo y

por uso de drogas como la 2-deoxi-D-glucosa, que incrementa el consumo de alimento y la Fenilfuramina que disminuye el consumo de alimento; o por la acción de algunos péptidos que modulan el consumo de nutrientes específicos, como el neuropéptido Y que estimula el consumo de carbohidratos y la hormona liberadora de la hormona de crecimiento reduce el consumo de proteínas (Bray, 1993).

Los reportes mencionados demuestran ampliamente la relación entre la alimentación, la actividad motora y la temperatura corporal y cerebral en animales expuestos a condiciones ambientales naturales y controladas. De sus resultados podemos resumir que el incremento de la temperatura del cerebro y del cuerpo están asociados a la alimentación y al incremento de la actividad motora que se anticipa a la alimentación (Bolles y de Lorge, 1962); también es claro que la actividad máxima que desarrollan las ratas durante la fase de obscuridad, está sincronizada con el período de alimentación (Edmonds y Adler, 1977). Esta actividad está controlada por lo menos en parte por el reloj biológico (núcleo supraquiasmático), el cual se encarga de sincronizar la actividad de los animales en ciclos que corresponden a las 24 horas del día.

Privación de alimento

Otra manera de abordar la relación entre alimentación, temperatura y actividad, se logró con estudios de privación de alimento y desnutrición en roedores y humanos.

La privación de alimento produce efectos drásticos sobre el organismo los cuales se evidencian a corto plazo, mientras que los efectos de la desnutrición se manifiestan a largo plazo; no obstante, sus efectos sobre el metabolismo son similares en varios parámetros fisiológicos, tal como lo demuestran los siguientes trabajos.

Westertep (1977), realizó un estudio en ratas con privación parcial y total de alimento y analizó las adaptaciones de estos roedores con su consumo de energía: Observó que las ratas sometidas a 12 días de ayuno presentaban un decremento total del 59% de energía, de éste, el 12-13% se debía a la supresión de alimento; el 12% por reducción de la actividad y el 34-35% a la caída de la tasa metabólica debida a los 12 días de ayuno. Estos datos son consistentes con lo reportado por Ma y Foster (1986), quienes demostraron una disminución del 26% de la tasa metabólica en ratas con 5 días de ayuno. Estos autores también observaron, que la disminución de la tasa metabólica está asociada con un decremento del consumo de oxígeno y disminución de la temperatura cerebral y rectal.

Sin embargo, la reducción de la tasa metabólica no siempre predice los cambios debidos al consumo de alimento, tal como lo demostraron Munch et al. (1993) quienes realizaron estudios en ratas bajo las siguientes condiciones de experimentación: grupos de ratas con reducción alimentaria, otras con privación de alimento y otras expuestas a dietas con diferente contenido calórico. Sus resultados mostraron que las ratas con reducción de alimento desarrollaron el mismo decremento del consumo de oxígeno que las ratas con privación de alimento, a pesar de que presentaron una

diferencia en la reducción de la masa corporal. Las ratas alimentadas con diferentes variedades de alimento, mostraron diferentes consumos de oxígeno, pero tuvieron los mismos cambios en la masa corporal. Estos datos indican que la reducción en el consumo de oxígeno, no siempre predice los cambios en el consumo de alimento o en la masa corporal.

Otro método para determinar la tasa metabólica, consiste en medir la emisión de bióxido de carbono (CO_2). Empleando este método, Stupfel et al. (1986) demostraron la persistencia de las variaciones circadianas y ultradianas por medio de la emisión del volumen de CO_2 en ratas; observaron que sus niveles se deprimieron grandemente durante el ayuno, pero mantuvieron las variaciones circádicas entre luz-obscuridad. También observaron que el decremento del CO_2 está acompañado por un rápido decremento en la actividad de las ratas, sin embargo, ha sido difícil establecer una correlación entre actividad motora y respiratoria.

Desnutrición

Por otra parte, se puede afirmar que el aporte insuficiente de proteínas, minerales y vitaminas, son la causa más frecuente de la desnutrición; si la dieta diaria está disminuida de forma considerable en alguno de ellos, su carencia se manifiesta con diferentes grados de desnutrición, la cual depende del tiempo transcurrido y del grado de escasez del nutriente requerido. Algunas de los efectos de la desnutrición en ratones son, propensión a las enfermedades, disminución del trabajo muscular y de la capacidad de defensa contra el frío (Good et al. 1976 y Leto et al. 1976).

Los efectos de la desnutrición sobre el metabolismo de ratones y ratas se han medido con diferentes métodos, pero los que a nosotros nos interesan son los relacionados con temperatura, peso y actividad motora, por ello examinamos los siguientes trabajos: Weindruch et al. (1979), propusieron que el decremento de la temperatura rectal, está asociado con la disminución de la tasa metabólica basal y consecuentemente con la disminución del consumo de oxígeno en ratones desnutridos. Escobar y Salas (1988) observaron que la desnutrición en ratas debida a la separación parcial de la madre y las recién nacidas (12 hrs), provoca una mayor frecuencia del juego, principalmente en las categorías donde se despliegan actividades de dominancia y rudeza. Posteriormente, Arauz-Contreras et al. (1989), reportaron un incremento en la conservación de posturas de reposo y un incremento en su actividad exploratoria en ratas que fueron desnutridas con una dieta del 8% de proteína y Almeida et al. (1993), observaron que las ratas con 70 días de edad, que fueron desnutridas sólo durante su lactancia, (sometiendo a la madre a una dieta del 6% de proteína), presentaron un alto nivel de exploración en comparación a las ratas con nutrición normal.

Efectos de la privación de alimento y la desnutrición sobre el sistema nervioso central.

También se han estudiado los efectos de la desnutrición y la privación de alimento, sobre el desarrollo morfológico y funciones del Sistema Nervioso Central (SNC) en humanos y ratas. Entre algunos de los reportes sobre desnutrición en ratas, están los de Pulido et al. (1982) y Parra et al. (1994). Los primeros, observaron que las ratas que fueron desnutridas neonatalmente, presentan un trastorno en el seguimiento de la luz, asimismo

que el proceso de la habituación siguió un curso más atenuado que aquel observado en los animales testigo. Estos investigadores sugieren que estas alteraciones pudieran quizás estar relacionadas con el deterioro del crecimiento neuronal, que han observado en varias estructuras relacionadas con el control sensorial aferente. Por otra parte, Parra et al. observaron una reducción de la densidad de las espinas dendríticas en el *Cornu ammonis 3* (CA3) en los diferentes paradigmas de desnutrición que estudiaron y plantearon que esto es especialmente importante si consideramos al campo CA3 como el principal integrador de la actividad intrahipocámpal, por lo que cualquier alteración citoarquitectural compromete las funciones asociadas con la memoria y el aprendizaje.

En general se ha observado que si la desnutrición ocurre durante fases tempranas del desarrollo cerebral, se altera la maduración neural y esto trae efectos irreversibles sobre la conducta y el desarrollo intelectual del sujeto (Zeisel, 1986). Otro ejemplo es que la desnutrición durante la lactancia y etapas del desarrollo temprano de los niños, generan deficiencias en su capacidad cognitiva y causan alteraciones en sus patrones de conducta (Allen, 1993).

Los efectos de la privación de alimento sobre el SNC se han determinado por los niveles de glucosa y hormonas en plasma y cerebro. Steffens et al. (1988), realizaron un análisis del contenido de glucosa e insulina en plasma y líquido cefalorraquídeo en ratas macho adultos, con 24 y 72 horas de privación de alimento: observaron que con 24 horas de ayuno se produce una disminución de las concentraciones de insulina y glucosa en

plasma y líquido cefalorraquídeo; con 72 horas de ayuno, se intensifica la utilización de glucosa y fructosa en el hipotálamo ventromedial y lateral.

Estos autores, también registraron el tiempo que tardan en recuperarse los niveles normales de glucosa e insulina en el plasma y líquido cefalorraquídeo, registrando incrementos de glucosa e insulina en el plasma, a los 10 minutos de reiniciarse la alimentación; mientras que en el líquido cefalorraquídeo la glucosa se eleva 40 minutos después que se inició la alimentación y la insulina se eleva hasta los 85 minutos, alcanzando su nivel basal después de 4 horas de iniciada la alimentación.

Garriga y Cusso (1992), estudiaron los cambios en la concentración de glucógeno, glucosa y la bifosforilación de azúcares (glucosa 1,6-P2 y fructosa 2-6-P2) en algunas regiones del cerebro de ratas que fueron sometidas a 5, 24, 48 y 72 horas de privación de alimento. Midieron la concentración de glucógeno en diferentes áreas del cerebro de las ratas con ayuno y las compararon con la concentración de glucógeno de ratas con alimento. Sus resultados indicaron que no hubo cambios en la concentración del glucógeno con 5 horas de ayuno; a las 24 horas de ayuno registraron un decremento de glucógeno ($p < 0.002$) en cerebelo y ($p < 0.01$) en corteza, estriado, hipocampo e hipotálamo. Después de 48 horas de ayuno el glucógeno retornó parcialmente a su concentración, sin llegar al nivel basal.

También observaron que los niveles de glucosa cerebral, decrecieron con la privación de alimento, siendo más marcado a las 24 horas de ayuno al mostrar un decremento significativo ($p < 0.004$) en cerebelo, corteza, estriado,

hipocampo e hipotálamo con respecto a 0 horas de ayuno. Los niveles bajos de glucosa se mantuvieron durante las siguientes 48 y 72 horas de ayuno. La concentración de los azúcares bifosforilados sólo se incrementó significativamente ($p < 0.05$) en el cerebelo e hipocampo de las ratas con 5 horas de ayuno, con respecto a las ratas con alimento. Estos resultados sugieren que al iniciarse el ayuno se incrementa la glucólisis, utilizando como una importante fuente de energía la glucosa del plasma. Por último, Garriga y Cusso (1992) hicieron una valoración de la síntesis y fosforilación del glucógeno, y observaron diferente actividad entre todas las áreas del cerebro estudiadas y estas diferencias se mantuvieron durante la privación del alimento.

Por otra parte, estudios realizados por Alvarez-Buylla y Roces de Alvarez-Buylla (1992) mencionan que el cerebro es un órgano particularmente sensible a la falta de oxígeno y glucosa. En el humano, el cerebro constituye el 2% del peso corporal y consume el 20% de glucosa total. Para regular este alto consumo de glucosa, estos investigadores postulan la existencia de una neurohormona secretada por el cerebro que participa en la retención de glucosa por el Sistema Nervioso Central. Esto es relevante para los estudiosos de la fisiología del aprendizaje y la memoria, ya que se ha confirmado que la glucosa es un importante regulador de los procesos de memoria (Gold, 1986), como lo demostraron los siguientes trabajos.

Fourrest-Fontecave et al. (1986), estudiaron la influencia de la hipoglucemia y el hambre sobre las funciones mentales en hombres sanos. Para ello, reclutaron a 8 estudiantes entre 25 y 34 años, con un peso corporal

ideal del 99.9%. La hipoglucemia fué inducida al azar con insulina-glucosa (insulina 2.4 U/kg/h más glucosa con tasa variable), manteniéndolos en 2.2 mmol/l de glucosa en sangre venosa. La insulina y la glucosa se aplicaron en sujetos con ayuno de la noche anterior y en sujetos con 72 horas de privación de alimento. La agudeza mental fué valorada midiendo el tiempo de reconocimiento entre el tiempo de la reacción total de visualización de una señal, un examen verbal de claridad mental y una prueba de sinónimos aprendida en condiciones normales de alimentación y con hipoglucemia. Los resultados mostraron que la hipoglucemia de 12 horas de ayuno, incrementó significativamente ($p < 0.05$) el tiempo de reacción total; el tiempo requerido para la claridad mental también tuvo un incremento significativo ($p < 0.05$). Comparando estos resultados con el estudio control (glucemia normal), se observó que la hipoglucemia disminuyó el aprendizaje de sinónimos. Cuando la hipoglucemia se produjo por 72 horas, no se incrementó el tiempo de reacción total ni se modificó la claridad mental. No obstante, el efecto sobre la prueba de sinónimos sí registró deterioro.

En conclusión, la agudeza mental fué reducida por la hipoglucemia moderada después de 12 horas de ayuno nocturno, pero la hipoglucemia en el ayuno prolongado no redujo la agudeza mental. Esto puede ilustrar la no dependencia del SNC por la glucosa plasmática, durante el ayuno prolongado, y apoya la propuesta de Henry et al. (1988) que sugieren que durante el ayuno prolongado, el SNC desarrolla la habilidad para utilizar cuerpos cetónicos, o como afirma Alvarez-Buylla y Roces de Alvarez-Buylla (1992) que secreta una neurohormona que retiene la glucosa para el SNC.

Aprendizaje y memoria

En cuanto al aprendizaje y memoria son conceptos que pueden ser definidos de manera diversa; en este trabajo incluimos dos definiciones: a) de acuerdo a Ganong (1996), el aprendizaje se define como la capacidad de alterar el comportamiento basándose en la experiencia, mientras que memoria es la capacidad para recuperar acontecimientos pasados, a nivel consciente o inconsciente. Ambos fenómenos están estrechamente relacionados y deben considerarse en conjunto; b) para Hilgard y Bower (1975), el aprendizaje es el proceso en virtud del cual una actividad se origina o se cambia a través de la reacción a una situación encontrada. Estos cambios en la ejecución deben excluir aquellos ocasionados por el desarrollo normal del sujeto, drogas, fatiga, adaptación sensorial, etc., por lo que, la memoria es la persistencia del aprendizaje en un estado que puede ser recuperado.

El aprendizaje y algunas formas de memoria ocurren probablemente en todos los animales que poseen un sistema nervioso, que tiene la capacidad de cambiar de acuerdo a la experiencia y de generar nuevos comportamientos, que les permiten adaptarse a un medio ambiente dinámico. La propiedad de cambio del sistema nervioso de organismos superiores, se ha denominado plasticidad cerebral y bajo estos términos se puede definir como una propiedad fundamental del sistema nervioso que permite que un estímulo o combinación de estímulos, produzcan una modificación morfológica y funcional duradera.

Rosenzweig y Bennett (1996) hacen una revisión sobre el uso-inducción de la plasticidad del sistema nervioso, para ello se basan en

trabajos realizados en su grupo de investigación: Observaron que el entrenamiento y la combinación de las experiencias producen cambios neuroquímicos en la corteza cerebral de las ratas, así como cambios en el peso de la corteza; otros estudios indicaron cambios en el grosor cortical, en el tamaño de los contactos sinápticos, en el número de las dendritas y de las ramas de las dendritas. De acuerdo a estos autores, el enriquecimiento de la experiencia y el entrenamiento inducen una cascada de eventos neuroquímicos, que causan cambios plásticos en el cerebro. Las investigaciones sobre plasticidad cerebral, se están utilizando para promover el desarrollo intelectual de los niños, para lograr la recuperación de daño cerebral y además se empieza a usar en beneficio de los animales de laboratorio.

En general los datos de aprendizaje y memoria con que se cuenta, se han obtenido de estudios aplicados tanto en humanos como en animales, utilizando para ello diferentes estrategias de investigación. Los métodos más antiguos consistían en definir el sitio y extensión de lesiones en el encéfalo del humano durante las necropsias y establecer una correlación con observaciones clínicas; de estudiar los efectos de la estimulación de la corteza cerebral expuesta durante maniobras neuroquirúrgicas hechas con anestesia local o la estimulación de estructuras subcorticales con electrodos crónicamente implantados en pacientes que presentan enfermedades como el parkinson, esquizofrenia, epilepsia y cáncer incurable. Además se ha obtenido considerable información de humanos y animales, al medir las variaciones regionales del flujo sanguíneo cortical durante las actividades mentales y al realizar estudios de reflejos condicionados (Ganong, 1996)

Memoria y hormona de crecimiento

McGaugh (1983), plantea que ciertas hormonas y neurotransmisores ejercen efectos moduladores no específicos sobre la memoria y que algunos efectos se ejercen a través de estructuras cerebrales específicas que se ligán a funciones de la memoria, o probablemente estos efectos no tienen relación con la memoria, sino con otros factores como la atención. Sin embargo, hay evidencias que indican que las hormonas participan en el almacenamiento de la información como moduladores endógenos de los procesos neurobiológicos que subyacen a la memoria. Las hormonas gonadales tienen un papel importante en el aprendizaje y la memoria; se ha reportado que la testosterona facilita el proceso de extinción de una respuesta de prevención pasiva en ratas jóvenes intactas, cuando la testosterona se administra durante todo el proceso de extinción (Rivas-Arancibia y Vázquez-Pereyra, 1994).

Por otra parte, se postula que el sistema somatotropinérgico integrado por la hormona liberadora de la hormona de crecimiento (GRH o también conocida como GRF), la somatostatina (GIH), la hormona de crecimiento (GH) y las somatomedinas, desarrollan un importante papel en la neuromodulación de las actividades del sistema nervioso central. La administración de GRH en jóvenes saludables, demostró que ésta puede actuar como neurotransmisor sobre sitios específicos del cerebro regulando en parte la consolidación de la memoria, en asociación con otros factores neuromoduladores ligados al sistema neuroendocrino (Cacabelos, 1990).

La hormona de crecimiento como parte del sistema somatotropinérgico debe jugar un papel importante en procesos de aprendizaje y memoria. Aunque se conoce poco del control y secreción de GH en especies no-primates, se ha confirmado que el estrés causa un decremento de la hormona en ratas y ratones (Schindler et al. 1972) y la hipoglucemia no influye en la secreción de GH en estas especies (Tannenbaum et al. 1976).

Schindler et al. (1972), registraron los niveles de GH en plasma y pituitaria de ratones hembra y macho sometidos a 24 horas de privación de alimento, otros con aplicación de glucosa y otros expuestos a situaciones de estrés. Sus resultados indicaron que 24 horas de ayuno, no modifican los niveles de GH en el plasma ni en la pituitaria en ratones de ambos sexos; que la glucosa no está involucrada en el control de la secreción de la GH en ratones, y el estrés que sí causa secreción de GH en primates, no reproduce los mismos resultados en ratones.

En los trabajos de Tannenbaum et al. (1976) los autores demostraron que la secreción de GH en ratas está regulada por ritmos endógenos ultradianos, los cuales no dependen de los cambios de glucosa en plasma, o de los niveles de insulina inmunoreactiva, y afirman que es improbable que la GH sea un importante regulador fisiológico de la homeostasis de la glucosa en esta especie. Mientras que en el hombre la glucosa actúa como una retroalimentación negativa sobre la liberación de GH, a su vez, los bajos niveles de glucosa inducida por hambre así como el incremento de insulina y probablemente el ejercicio, estimulan la liberación de la hormona de

crecimiento. Estos resultados enfatizan las diferencias que existen en la interacción glucosa-GH entre las especies.

La hormona de crecimiento es esencial para lograr un crecimiento normal en sujetos jóvenes. Las causas de su liberación o inhibición no están totalmente esclarecidas; no obstante, se conocen dos neuroreguladores encargados de la liberación de la GH, el factor liberador de la hormona de crecimiento, denominada GRH y el factor inhibidor de la liberación de la hormona de crecimiento, la somatostatina (GIH).

El factor liberador de la hormona de crecimiento, estimula la transcripción del gen GH y libera GH in vivo e in vitro; por su parte, la somatostatina puede ejercer su efecto inhibitorio sobre la secreción de GH, al interferir con la producción de cAMP o al actuar sobre subsecuentes eventos intracelulares.

El GRH inmunoreactivo se localiza en las células del núcleo arcuato y del área media perifornical del hipotálamo lateral, también se localiza GRH en neuronas diseminadas en el hipotálamo lateral basal (Merchenthaler et al. 1984 y Sawchenko et al. 1985). En contraste, las células que secretan GIH, están ampliamente distribuidas en el SNC, incluyendo el hipotálamo, tálamo, hipocampo, neocorteza y algunos núcleos subcorticales (Ibata et al., 1983 y Morrison et al., 1983). Ambos neuropéptidos actúan como neurotransmisores en el SNC ejerciendo diversos tipos de acción central.

Otros factores que modifican los niveles circulantes de GH en humanos, ratas y ratones incluyen, a las hormonas sexuales y la edad del sujeto. En relación a las hormonas sexuales Shina et al. (1972), observaron que cuando los estrógenos son removidos por ovariectomía, se produce un incremento de GH circulante en ratones. Los humanos muestran cambios en los niveles de GH en plasma, que están relacionados con la edad (Corpas et al. 1993).

Además, Friedman y Reichlin (1965) y Dickerman et al. (1969), demostraron que 7 días de privación de alimento en ratas, causan un decremento significativo de GH en plasma, así como su concentración en la pituitaria y un decremento de los niveles de GRH en el hipotálamo. Por otra parte, Tannenbaum et al. (1979), registraron los niveles de GH en grupos de ratas con alimentación y en grupos de ratas con 24 a 72 horas de privación de alimento. Observaron una marcada disminución de los niveles de GH, en el plasma de todos los animales privados de alimento y además, observaron que durante la fase de obscuridad, los niveles de GH se mantuvieron en cero en todas las ratas privadas de alimento.

Posteriormente Challa et al. (1993), postularon que un insuficiente consumo calórico puede interrumpir el patrón de secreción normal de la hormona de crecimiento en ratas. Para demostrar esto, analizaron y cuantificaron su tasa de secreción y encontraron una inhibición significativa de la secreción pulsátil de GH en ratas acidóticas, además registraron decrementos en la amplitud de los pulsos y una correlación entre el

decremento de la concentración de GH en plasma y los cambios de peso del cuerpo.

Por otra parte, los efectos del incremento o decremento de la hormona de crecimiento sobre el SNC han sido estudiado en humanos y ratas. Por ejemplo, Sara y Lazarus (1974), administraron diferentes dosis de GH en ratas preñadas, cuando se iniciaba la formación del tubo neural en el producto. Las dosis se aplicaron diariamente hasta los 20 días de gestación. Posteriormente observaron que los productos presentaban un incremento en el número y longitud de las dendritas, un aumento en el peso del cerebro, en el contenido de DNA, de la densidad de las células corticales, el radio de las neuronas gliales y además incrementaron su capacidad discriminativa.

Laron y Galatzer (1985), estudiaron un grupo de niños con deficiencia de hormona de crecimiento, y observaron que la administración de hormona de crecimiento humana (hGH) induce un crecimiento significativo en la circunferencia de la cabeza y observan una tendencia a elevar su coeficiente intelectual, mejorando su capacidad escolar e interacción social.

Una manera indirecta de estudiar los efectos del decremento o incremento de la GH, se da por un seguimiento del factor liberador de la hormona de crecimiento (GRH) y de las somatomedinas que actúan como agentes hormonales secundarios de la GH. Para esto, Alvarez y Cacabelos (1990) realizaron estudios en humanos y observaron que el GRH exógeno, aumenta la ejecución de la memoria de corto plazo (MCP) en sujetos jóvenes saludables. Por lo anterior sugieren que el GRH puede estar involucrado en

el mecanismo central implícito en la consolidación y recuperación de la memoria, ya que la MCP mejora después de la inyección de GRH, y es mejor en los sujetos con bajos niveles basales de GH, que en aquellos jóvenes con altos niveles de GH. De estos resultados se concluye que el GRH parece aumentar la MCP, aunque aparentemente este mecanismo no está relacionado con el sistema somatotropinérgico y factores periféricos.

Además, Alvarez y Cacabelos (1990) reportaron que la administración periférica de GRF(1-29)NH₂ en dosis de 150 µg/ml i.v. en humanos, induce un ligero incremento en la alimentación sólida y líquida; aumenta la ejecución mental e incrementa la actividad bioeléctrica del cerebro y los potenciales evocados. Estas dosis de GRH han sido utilizadas terapéuticamente en niños de corta estatura, con deficiencia de GH o GRH; sus padres y maestros han informado que mejoran su conducta social, su ejecución mental y las actividades escolares. Debido a que estos parámetros no han sido bien evaluados, se siguen realizando trabajos en este campo.

Posteriormente Alvarez y Cacabelos (1993) observaron el efecto de la aplicación intraperitoneal de hormona de crecimiento recombinante humana (r-hGH) y la aplicación intravenosa de GRF(1-29)NH₂ sobre la actividad locomotora de la rata. Reportaron que la r-hGH causa un decremento de la actividad locomotora, mientras que la GRF (1-250 µg/kg) produce un incremento de la actividad locomotora e inhibe la habituación. Además reportaron que los efectos del GRF o GRH, sobre la actividad locomotora no están mediados por la liberación periférica de GH, lo que sugiere que el GRF

puede influir sobre la conducta psicomotora en la rata por un mecanismo central.

Los efectos de la GH se ejercen a través de las somatomedinas; estudios realizados en humanos y ratas confirman que las somatomedinas dependen de la GH y del estado nutricional del organismo (Almqvist et al. 1961; Daughaday et al. 1968; Phillips y Young, 1976; Takano et al. 1978).

Las somatomedinas fueron purificadas del plasma humano, y por su función se clasificaron en somatomedinas A, B y C. La somatomedina A, estimula la incorporación del sulfato en el cartilago de gallina (Hall, 1972 y Uthne, 1973) y también ejerce una acción parecida a la acción de la insulina sobre el tejido adiposo de la rata (Hall, 1971); la somatomedina B estimula la síntesis del DNA en células gliales (Uthne, 1973) y la somatomedina C, realiza ambas funciones ya que estimula la incorporación del sulfato y capta timidina en el cartilago de la rata (Van Wyk et al. 1974).

Takano et al. (1978), realizaron un estudio complejo de la relación GH-somatomedina A en ratas macho de 28 días de edad. Midióron las concentraciones de GH en el plasma de ratas bajo las siguientes condiciones: 1) en ratas normales; 2) en ratas hipofisectomizadas; 3) en ratas con tres días de ayuno y por último, 4) en ratas sometidas a diferentes dietas. Con técnicas de radioinmunoensayo (Hall et al. 1974), determinaron las concentraciones de somatomedina A en los cuatro grupos. Sus resultados indicaron que la concentración basal de la somatomedina A en ratas normales, varía entre 6.20 y 6.44 U/ml y observaron que la vida media de la somatomedina A es

de 6 horas e inmediatamente después los niveles decrecieron en ratas con hipofisectomía. También observaron que la aplicación de hormona de crecimiento humana (hGH) en las ratas con hipofisectomía, produjo un incremento significativo de la somatomedina A después de 4 hrs y alcanza su máxima concentración después de 8-24 horas, para retornar a su nivel basal después de 48 horas de su aplicación. En relación al ayuno Takano observó una reducción del 27.2% del peso en las ratas con 72 horas de ayuno, mientras que la concentración de somatomedina A decreció en un 74% del valor normal con 24 horas de ayuno y del 85 - 86% del valor normal con 48 - 72 horas de ayuno. En cuanto a las dietas, observaron una correlación positiva entre el porcentaje del incremento del peso y la concentración de somatomedina A en plasma. El nivel de somatomedina A decrece al 40% cuando el consumo de calorías se reduce al 82% de la dieta control. Como el consumo calórico en 4 dietas diferentes no es el mismo, la diferencia en la concentración de somatomedina A en plasma puede explicarse por la diferencia cualitativa de la dieta, pero también a la cantidad de alimento ingerido.

En un trabajo previo Takano e Hisuka, (1977; citado por Takano et al. 1978) registraron los efectos de la aplicación de hGH en hombres adultos saludables, sometidos a tres días de ayuno. Observaron que la concentración de la somatomedina A retornó a su nivel basal, después de 72 horas de la aplicación de hGH. Con estos trabajos demostraron que la concentración de la somatomedina A no decrece tan drásticamente en el hombre como en la rata, pero el retorno a las concentraciones basales, es más prolongado en el hombre. Estas diferencias pueden ser explicadas por la diferencia en la

cantidad y calidad de las proteínas en el suero de rata y humano. Lo anterior indica que los niveles de somatomedina A en suero está influenciado por la nutrición.

En estos antecedentes hemos dado prioridad a la interrelación entre ciclos de luz-obscuridad, alimentación, termorregulación, actividad motora y aprendizaje. En la ultima parte hemos buscado una asociación o un posible control ejercido por la hormona de crecimiento sobre estas variables.

Síntesis

El motivo de esta parcialización impuesta a los antecedentes se basa en nuestro interés por presentar de manera ordenada la información sobre variaciones de peso, temperatura y actividad motora, así como el efecto del ayuno sobre el aprendizaje. En segundo término, sabemos que en la realidad, ni aún en las mejores condiciones se brinda la comida en cantidad, calidad y tiempo tal cual lo necesitan los organismos. Si pensamos en los animales en su ambiente natural y aún en el hombre, la búsqueda de la alimentación adecuada y la lucha por la misma es una realidad constante. Si la supervivencia depende de poder lograr a tiempo la alimentación, entonces el organismo debe tener uno o varios mecanismos capaces de mantener activos los medios para lograrlo, aún en casos de falta absoluta de nutrientes. El sucumbir ante la falta de alimento debe ocurrir solamente después de fracasar todos los mecanismos protectores de la integridad física frente a la falta de alimento.

Como deseamos involucrar a la hormona de crecimiento como un posible elemento que intervenga para mantener los mecanismos de defensa que genera la privación de alimento y además determinar si la hormona de crecimiento interviene en los procesos de aprendizaje y memoria, necesitamos previamente discernir si la privación de alimento produce alteraciones capaces de interferir en el aprendizaje y la memoria.

Para dilucidar lo anterior nos planteamos tres preguntas:

¿ Cuáles son las variaciones diarias de la alimentación, del peso, de la temperatura y de la actividad motora en ratones con alimento ad libitum?.

¿Cuál es el efecto de la privación de alimento sobre el peso, la temperatura y la actividad motora de ratones?.

¿Cuál es el efecto de la privación de alimento sobre la memoria de corto y largo plazo en ratones, así como la participación que pueda ejercer la hormona de crecimiento (GH) sobre los mismos?.

OBJETIVOS

1.- Establecer el patrón de alimentación y variaciones diarias del peso, de la temperatura corporal y la actividad motora en ratones macho adultos.

2.- Determinar como influye la privación de alimento en los ratones, sobre la temperatura corporal, el peso y la actividad motora.

3.- Determinar el efecto de la privación de alimento sobre la memoria de corto y largo plazo en ratones sometidos a un condicionamiento de prevención pasiva.

4.- Dilucidar si las alteraciones producidas por la privación de alimento sobre la memoria de corto y largo plazo responden a la administración de hormona de crecimiento.

HIPOTESIS

1.- Si el ciclo de luz-obscuridad regula varios ritmos biológicos, entonces, los hábitos alimentarios, la temperatura rectal, el peso y la actividad motora en ratones adultos, pueden presentar variaciones relacionadas con estos ciclos.

2.- El ayuno prolongado causa un deterioro metabólico en los organismos, que se refleja en la pérdida de peso y decrementos de la temperatura y de la actividad motora en ratones.

3.- La privación de alimento en ratones producirá cambios que se pueden reflejar en la memoria de corto y largo plazo.

4.- La administración de la hormona de crecimiento pudiera revertir el efecto del ayuno sobre la memoria de corto y largo plazo en ratones.

METODOS

El trabajo se realizó en tres etapas experimentales, en las cuales se utilizaron un total de 670 ratones machos adultos de la especie *Mus musculus* cepa CD1, de 50 a 55 días de nacidos y con un peso entre 32 y 35 gramos en el momento de realizar cada prueba.

Al iniciar cada etapa se colocó a los ratones en cajas individuales de acrílico transparente (20x15x10 centímetros) y se dejaron con libre acceso al agua y al alimento. Todos los ratones se mantuvieron expuestos a temperatura ambiental de 24 a 27 °C.

Las condiciones de iluminación y las variables a medir se especifican en cada prueba.

Primera etapa experimental.

Patrón de alimentación

Para determinar el período de alimentación de los ratones en relación con los ciclos de luz-obscuridad, se usaron dos grupos de 30 ratones machos. El primer grupo fué sometido a 13 hrs de luz natural (el sol salía a las 6:00 hrs y se ponía a las 19:00 hrs) y el segundo a 12 hrs de luz controlada (la luz se prendía a las 21:00 horas y se apagaba a las 9:00 horas). Todos los ratones permanecieron 30 días con el ciclo luz-obscuridad correspondiente para su adaptación. Inmediatamente después se separaron en cajas individuales y fueron observados cada hora durante 24 horas, para cuantificar y establecer el

porcentaje de animales que se encontraban comiendo. El conteo se realizó de manera independiente para cada grupo durante tres días.

Variaciones diarias del peso, de la temperatura y de la actividad motora en ratones.

Para determinar las posibles variaciones diarias de peso, de la temperatura rectal y de la actividad motora en ratones con alimento y agua ad libitum, se realizaron registros de cada parámetro a la 1:00, 5:00, 9:00, 13:00, 17:00 y 21:00 hrs del día. Se usaron 50 ratones previamente adaptados a 30 días de luz natural y se dividieron en dos lotes.

El primer lote de 30 ratones, se utilizó para medir el peso, utilizando una balanza Ohaus (serie 700). Con este mismo lote se midió la temperatura durante 5 minutos, introduciendo en la zona rectal el bulbo del termómetro previamente impregnado de aceite. Se utilizó un termómetro rectal marca Termex, con escala de 35 a 41 °C y para temperaturas menores a 35 °C, se usó un termómetro Brannann con escala de -10 a 110 °C.

Con el segundo lote de 20 ratones se midió la actividad motora, para esto se utilizó un monitor electrónico de Actividad, Stoelting Co. Wood Dale, Ill, que consta de una plataforma electrónica que capta todos los movimientos de los ratones y los registra con un contador automático. La prueba consistió en colocar un ratón con su jaula sobre la plataforma electrónica y registrar el número de movimientos que ejecuta en un lapso de 5 minutos (Apéndice 1).

Segunda etapa experimental.

Efectos de la privación de alimento sobre el peso, la temperatura y la actividad motora en ratones.

Para establecer las diferencias del peso, la temperatura y la actividad motora entre los ratones con alimento ad libitum y ratones con privación de alimento, utilizamos 80 ratones que fueron previamente adaptados a luz-obscuridad invertida (luz de 21:00 a 9:00 horas).

Para medir las variaciones de peso, temperatura y actividad motora se estudiaron ocho lotes de 10 ratones con: 0, 12, 20, 28, 36, 44, 52 y 60 horas de privación de alimento, siguiendo el procedimiento descrito anteriormente.

El registro del peso, la temperatura y la actividad motora de cada lote experimental, se inició a las 13:00 hrs del día, momento en que culminó el periodo de ayuno para cada lote. El registro de los 3 parámetros se finalizó a las 14:00 hrs del día.

Tercera etapa experimental.

Aprendizaje y memoria en ratones con privación de alimento

Con el propósito de determinar si la privación aguda de alimento afecta el aprendizaje o la memoria, medimos la latencia de retención de la memoria de corto y largo plazo en grupos de ratones ($n= 20$), sometidos a 0, 28, 36, 44 y 52 horas de privación de alimento. Además, para saber si la falta de hormona de crecimiento es la responsable de los cambios ocurridos durante el ayuno, estudiamos la latencia de retención de la memoria de corto y largo plazo en

ratones (n=20) sometidos a 0, 28, 36, 44 y 52 horas de privación de alimento e inyectados con hormona de crecimiento. (Más adelante se especifica en que consisten, las latencias de retención de la memoria de corto y largo plazo)

En esta etapa se utilizaron 400 ratones, que tuvieron 30 días de adaptación a luz-obscuridad invertida (luz de 21:00 a 9:00 hrs del día). Posteriormente los ratones fueron colocados al azar en cajas individuales y se les aplicó uno de los siguientes tratamientos a lotes de 20 individuos.

Tratamientos

Como está probado que una inyección intraperitoneal e intracerebral de solución salina isotónica, no ejerce ningún efecto sobre el aprendizaje o la memoria en ratas (Cruz-Morales, 1992 y Quirarte, 1993), se aplicó por vía intramuscular una dosis de 0.02 ml de esta solución, tanto en los animales con alimentación normal como en los ratones con privación de alimento; también fue utilizada como solvente para la hormona de crecimiento de la cual se aplicaron dosis intramusculares de 0.016 UI/Kg de hormona recombinante humana (rhGH) (Saizen, 4 Serono) a los grupos experimentales. A esta dosis responden favorablemente ratas wistar hipofisectomizadas (Shiro, 1992).

En todos los casos se inyectó a los ratones una dosis de solución salina u hormona de crecimiento, 52 horas antes de su entrenamiento y se repitió la dosis 4 horas antes de concluir cada período de ayuno y de realizar el entrenamiento con la prueba de prevención pasiva. Se aplicaron dos dosis debido a que se requiere un tiempo mínimo de 4 horas para que la hormona de

crecimiento actúe sobre el organismo a través de las somatomedinas, después de esta dosis, se mantiene en niveles basales durante 48 hrs (Takano et al. 1978).

El entrenamiento de los ratones se inició a las 13:00 hrs del día (momento en el que culminó cada periodo de ayuno) y se finalizó a las 15:00 hrs del día.

Prueba de prevención pasiva

La prueba de prevención pasiva consistió en colocar a cada ratón en una caja de condicionamiento, que consta de dos compartimientos de iguales dimensiones (22 x 22 x 22 cm), separados por una puerta deslizable tipo guillotina; un compartimiento es el de seguridad y el otro es el de castigo. Las tapas de los dos compartimientos son de acrílico transparente para poder observar la conducta del sujeto. El piso del compartimiento de seguridad está formado por barras de tubo de aluminio de 0.7 cm de diámetro, separadas 0.7 centímetros una de la otra. El compartimiento de castigo tiene las paredes laterales y el piso formado por dos láminas opuestas de acero inoxidable, inclinadas hacia el centro, separadas en la mitad del piso por una distancia de 0.5 cm, de modo que al encontrarse un ratón en este compartimiento debería pisar las dos láminas a la vez. Cada lámina del compartimiento de castigo estaba conectada a un estimulador Grass S88 a través de una unidad de corriente constante CCU1A.

El entrenamiento consistió en una sesión de adquisición, en la cual se colocó al animal en el compartimiento de seguridad de la caja de condicionamiento, y después de 10 segundos se abrió la puerta tipo guillotina.

Se midió el tiempo que tardó el ratón en pasar del compartimiento de seguridad al compartimiento de castigo, éste fué considerado como **latencia de adquisición**. Una vez dentro del compartimiento de castigo se cerró la puerta y se aplicó un estímulo nociceptivo de 1.5 mA durante 2 segundos (Apéndice 2). Inmediatamente después de aplicar el estímulo, se abrió la puerta y se dejó que el ratón pasara al compartimiento de seguridad, este lapso se midió como **latencia de escape**. El ratón permaneció en el compartimiento de seguridad durante 30 segundos y se retiró a su jaula individual.

Para estudiar la memoria de corto plazo (**MCP**), se midió la **latencia de retención** de la experiencia aversiva 10 minutos después del entrenamiento, de esta manera sabemos si el animal aprendió a no pasar al compartimiento de castigo.

Para estudiar la memoria de largo plazo (**MLP**), se midió la **latencia de retención** de la experiencia aversiva, 24 horas después del entrenamiento. En ambos casos la prueba consistió en colocar al ratón en el compartimiento de seguridad, a los 10 segundos se abrió la puerta tipo guillotina y se midió el tiempo que tarda en pasar al compartimiento de castigo, este lapso es al que se denomina latencia de retención. En esta etapa decidimos esperar un máximo de 600 segundos, después de transcurrido este tiempo o inmediatamente después que el ratón pasó al compartimiento de castigo, se dió por concluída la prueba.

Análisis estadístico

Los datos de cada grupo experimental fueron procesados con el programa estadístico Statgrafic versión 4.2, para obtener las medidas de tendencia central que fueron utilizadas en las gráficas. Además se determinó la distribución normal de los datos con la prueba de Kolmogorov-Smirnov (K-S) y la igualdad de varianzas con la prueba de Bartlett. Estas pruebas aportaron datos que nos permitieron hacer uso adecuado de pruebas paramétricas o no paramétricas. Se aplicó un análisis de varianza (ANOVA) a los datos de ratones con variaciones diarias de peso, temperatura y actividad motora, así como a los datos de los ratones con privación de alimento, y se realizó una comparación múltiple con la prueba de Duncan.

Los datos de los experimentos de memoria de corto y largo plazo, no presentaron una distribución normal y además se dió un corte arbitrario (600 segundos) a la "latencia de retención", por lo que se aplicaron pruebas no paramétricas, como el análisis de varianza de Kruskal-Wallis (H) para determinar las diferencias entre todos los grupos y la U de Mann-Whitney (U) para determinar las diferencias significativas entre un grupo y el control o entre dos grupos.

RESULTADOS

Patrón de alimentación

El comportamiento de los ratones sometidos a un régimen de luz natural, es diferente del comportamiento de los ratones con luz controlada 12:12 horas. En la gráfica 1 se puede observar que la luz natural podría sincronizar mejor la alimentación de los ratones, ya que un mayor porcentaje de ellos se encuentra comiendo en el mismo período. Esta gráfica también muestra que los ratones expuestos a luz natural, presentan su período máximo de alimentación después de 5 horas de oscuridad, mientras que los ratones de luz controlada presentan su actividad alimentaria máxima después de 2 horas de que se apaga la luz.

Los datos indican que los ratones de ambos grupos, desarrollan su alimentación principal durante 4 horas.

Además como se puede observar en la gráfica 1 entre el 10 y el 20% de los ratones de ambos grupos, se alimentan dos horas antes que el resto del grupo.

Variaciones diarias:

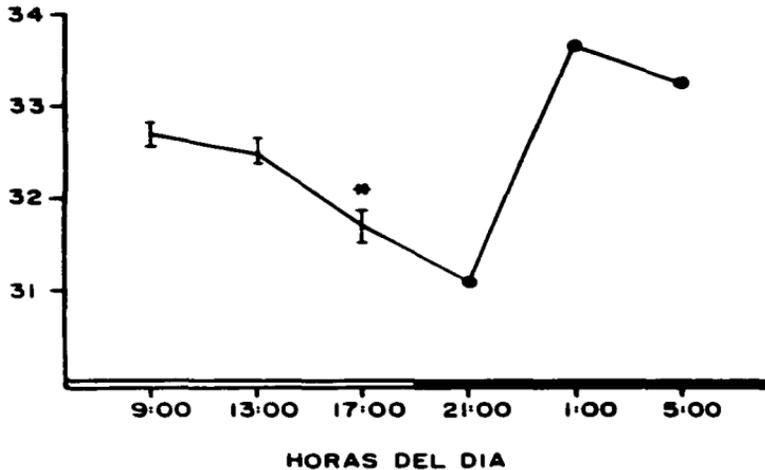
Peso

El análisis de varianza (ANOVA) no indica diferencias significativas de peso en los ratones con alimentación ad libitum y bajo régimen de luz natural. Sin embargo, al aplicar la prueba de Duncan revela un decremento de peso ($p < 0.05$) a las 17:00 hrs con respecto a 9:00 hrs (gráfica 2). Los grupos de 21:00, 1:00 y 5:00 hrs, no pudieron ser comparados por tener solo el peso promedio de los ratones.

PATRON DE ALIMENTACION DURANTE LA FASE DE OSCURIDAD



Gráfica 1. La gráfica muestra el ritmo de alimentación de los ratones durante la fase de oscuridad. Se puede observar que la luz natural sincroniza mejor la alimentación, alcanzando un máximo 5 horas después de que se inicia el periodo de oscuridad. Con luz controlada (luz de 9:00 a 21:00 hrs), los ratones alcanzan su máxima alimentación dos horas después de que se apaga la luz. Ambos grupos desarrollan su principal actividad alimentaria durante cuatro horas en la fase de oscuridad.

VARIACIONES DIARIAS DEL PESO EN RATONES

Gráfica 2. La gráfica representa el promedio y el error estandar de las variaciones diarias del peso en ratones con alimento ad libitum. El registro se realizó cada cuatro horas durante un día. La barra sombreada en la abscisa corresponde a las horas de obscuridad. Hay un decremento ($p < 0.05$) del peso a las 17:00 hrs con respecto a las 9:00 hrs.

Temperatura

El análisis de varianza (ANOVA) indica que no hay diferencias significativas en el registro de la temperatura de los ratones (gráfica 3). La prueba de Duncan confirma que no hay diferencias significativas de temperatura entre 1:00, 5:00, 9:00, 13:00, 17:00 y 21:00 hrs del día.

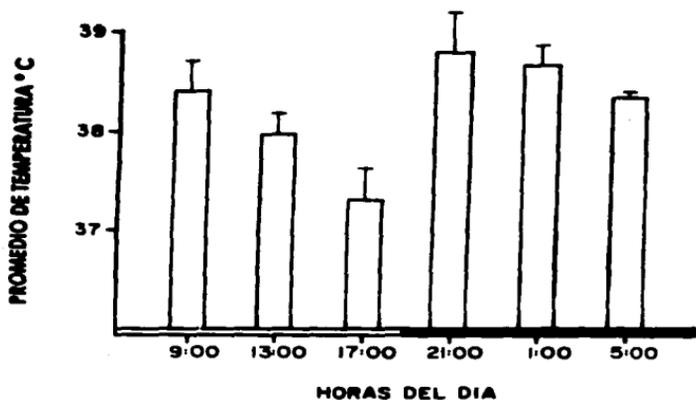
Actividad Motora

Con respecto a la actividad motora de los ratones, el análisis de varianza (ANOVA) indica diferencias significativas ($p=0.046$). Estas diferencias se deben a un incremento de la actividad motora a las 21:00 hrs (gráfica 4). Mostrando incrementos significativos ($p<0.05$) con respecto a 1:00, 5:00, 9:00, 13:00 y 17:00 horas del día.

Efectos de la privación de alimento sobre el peso, la temperatura y la actividad motora en ratones.

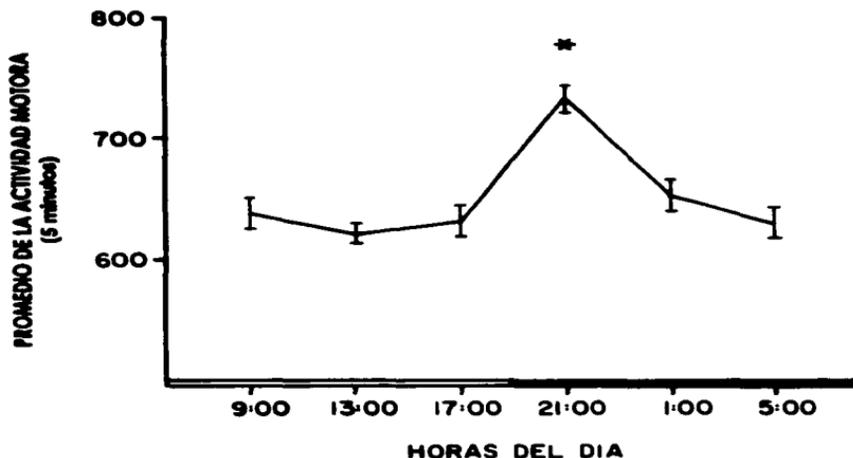
Peso

Los resultados de los ratones con privación de alimento, indican que la pérdida de peso se acentúa al prolongar las horas de ayuno (gráfica 5). El análisis de varianza ANOVA indica diferencias ($p=0.001$) entre los grupos. Estas diferencias fueron determinadas con la prueba de Duncan que indican decrementos significativos del peso ($p<0.01$) a las 20 hrs, 28 hrs, 36 hrs, 44 hrs, 52 hrs y 60 hrs con respecto a 0 y 12 hrs de ayuno; decrementos ($p<0.01$) en los grupos de 36 hrs, 44 hrs, 52 hrs y 60 hrs con respecto al grupo de 20 hrs de

VARIACIONES DIARIAS DE LA TEMPERATURA EN RATONES

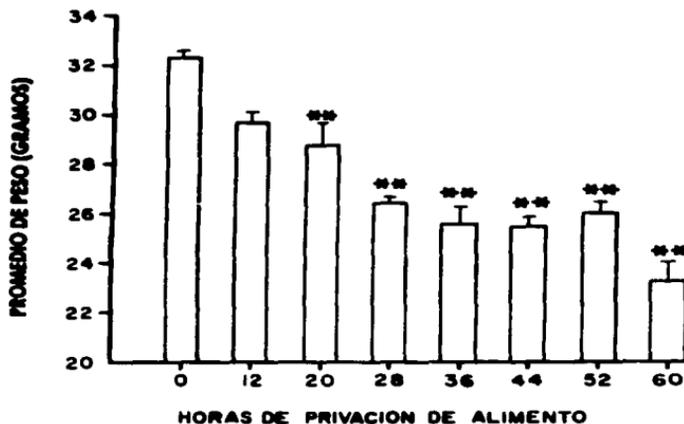
Gráfica 3. La gráfica representa el promedio y el error estandar de las variaciones diarias de la temperatura rectal de los ratones, con alimento ad libitum y expuestos a una temperatura ambiental de 24 a 27 °C y con ciclos de luz natural. La barra sombreada en la abscisa corresponde a las horas de oscuridad. No se registraron diferencias significativas de la temperatura en un ciclo de 24 horas.

VARIACIONES DIARIAS DE LA ACTIVIDAD MOTORA EN RATONES



Gráfica 4. La gráfica muestra el promedio y el error estandar de las variaciones diarias de la actividad motora de ratones con alimento ad libitum y expuestos a ciclos de luz-obscuridad natural. Los registros se realizaron cada cuatro horas durante un día. La barra sombreada en la abscisa corresponde a las horas de obscuridad. Cada intervalo representa el promedio ($n=20$) de la actividad motora registrada durante 5 minutos. Los ratones presentaron su máxima actividad a las 21:00 hrs y es significativa ($p<0.05$) con respecto a la actividad que desarrolla en los otros intervalos.

PESO DE RATONES CON DIFERENTES HORAS DE PRIVACION DE ALIMENTO



Gráfica 5. La gráfica muestra el peso promedio y el error estandar de los ratones (n=10) sometidos a diferentes horas de privación de alimento. Registramos decrementos ($p < 0.01$) en los grupos de 20, 28, 36, 44, 52 y 60 hrs de ayuno con respecto a los grupos de 0 y 12 hrs de ayuno. Pero al comparar a los grupos entre sí, observamos que en 36, 44 y 52 hrs de ayuno no presentan cambios significativos entre sí. (Los asteriscos representan sólo los decrementos con respecto a 0 y 12 hrs).

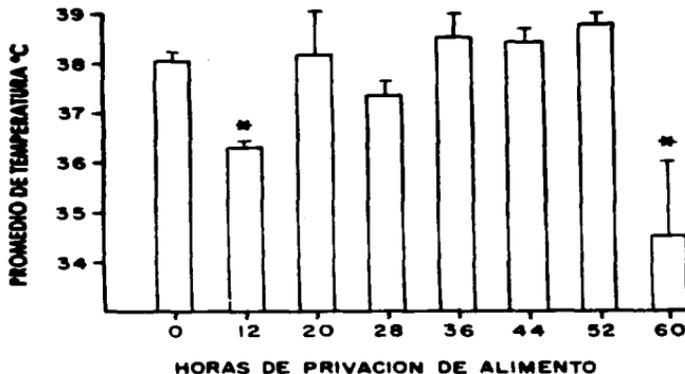
ayuno; decrementos ($p=0.05$) en los grupos de 36 hrs y 44 hrs con respecto a 28 hrs de ayuno; decrementos ($p<0.01$) de 52 hrs y 60 hrs con respecto a 28 hrs de ayuno y por último se localizó un decremento ($p<0.01$) en el grupo de 60 hrs con respecto a 36 hrs y 44 hrs de ayuno. No hay diferencias significativas entre los grupos de 36 hrs, 44 hrs y 52 hrs de ayuno.

Temperatura

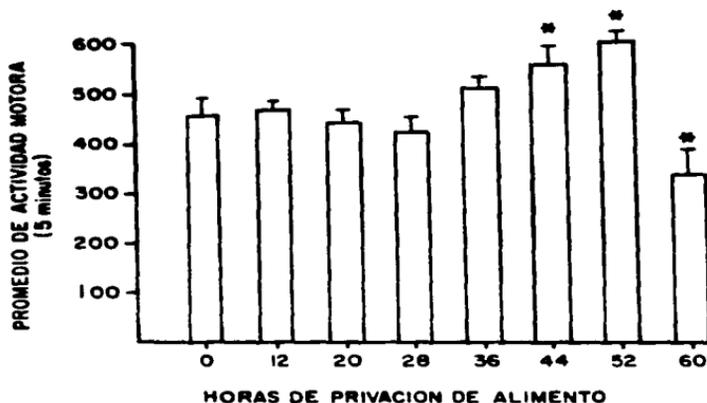
En la gráfica 6 se observan los efectos de la privación de alimento sobre la temperatura rectal de los ratones. El análisis de varianza (ANOVA) indica diferencias de temperatura ($p=0.001$) entre los grupos experimentales. La prueba de Duncan muestra que estas diferencias, se deben a un decremento de la temperatura ($p<0.05$) a las 12 hrs de ayuno con respecto al grupo de 0 hrs y un decremento de la temperatura en el grupo de 12 hrs ($p<0.01$) con respecto a 20 hrs, 36 hrs, 44 hrs y 52 hrs de ayuno. También se localizó un decremento significativo ($p<0.05$) a las 60 hrs de ayuno con respecto a todos los grupos.

Actividad Motora

En la gráfica 7 se pueden observar los efectos de las diferentes horas de privación de alimento, sobre la actividad motora de ratones macho adultos. El análisis de varianza (ANOVA) indica diferencias ($p=0.001$) en el registro de la actividad motora de los grupos experimentales. La prueba de Duncan muestra un incremento de la actividad ($p<0.05$) en los grupos de 44 hrs y 52 hrs de ayuno con respecto a 0, 12, 20 y 28 hrs de ayuno. Por último, el grupo de 60 hrs de ayuno muestra un decremento de la actividad ($p<0.05$) con respecto a los grupos con 36, 44 y 52 hrs de ayuno.

TEMPERATURA DE RATONES CON PRIVACION DE ALIMENTO

Gráfica 6. La gráfica muestra el promedio y el error estandar de la temperatura rectal registrada en los ratones (n=10), con diferentes horas de privación de alimento. Registramos un decremento significativo ($p<0.05$) a las 12 hrs de ayuno y un decremento significativo ($p<0.01$) a las 60 hrs de ayuno, con respecto a los demas grupos.

ACTIVIDAD MOTORA DE RATONES CON PRIVACION DE ALIMENTO

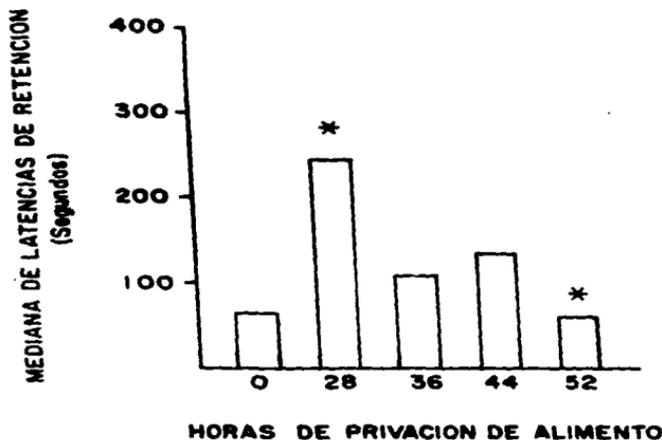
Gráfica 7. La gráfica muestra el promedio y el error estandar de la actividad motora de ratones (n=10) sometidos a diferentes horas de privación de alimento. Observamos incrementos de la actividad ($p < 0.05$) en los grupos de 44 y 52 hrs de ayuno con respecto a los demás grupos y un decremento ($p < 0.05$) en el grupo de 60 hrs de ayuno con respecto a 36, 44 y 52 hrs de ayuno.

Aprendizaje y memoria en ratones con privación de alimento e inyectados con hormona de crecimiento.

En todos los experimentos de memoria de corto y largo plazo se llevó a cabo el análisis estadístico sobre las latencias de adquisición y escape para determinar diferencias entre los grupos inyectados con solución salina y los inyectados con hormona de crecimiento. El análisis de varianza Kruskal Wallis sobre las latencias de adquisición y de escape no indicó diferencias significativas entre estos grupos. Por otra parte, la prueba U de Mann-Whitney (U) aplicada a las latencias de adquisición y de escape, tampoco indicaron diferencias significativas entre los grupos de ratones inyectados con solución salina, ni los inyectados con hormona de crecimiento, por lo que tratamos a estos grupos como provenientes de una misma población.

Memoria de corto plazo en ratones inyectados con solución salina.

En la gráfica 8 se pueden observar las latencia de retención de la MCP en los ratones con 0, 28, 36, 44 y 52 hrs de privación de alimento. El análisis de varianza Kruskal Wallis indica diferencias ($H=19.27$, $gl=9$, $p=0.023$) en la latencia de retención de los grupos estudiados. La prueba U de Mann-Whitney muestra un incremento significativo ($U=84.5$ $p=0.038$) de la latencia de retención en los ratones con 28 hrs de ayuno con respecto a los ratones con 0 hrs de ayuno. Además la prueba muestra un decremento de la retención en el grupo de 52 hrs de ayuno con respecto a: 28 hrs ($U=61.0$, $p=0.0068$), 36hrs ($U=102.2$, $p=0.018$) y 44 hrs ($U=84.5$, $p=0.0339$). El resto de los grupos no muestran diferencias significativas.

MEMORIA DE CORTO PLAZO EN RATONES CON SOLUCION SALINA

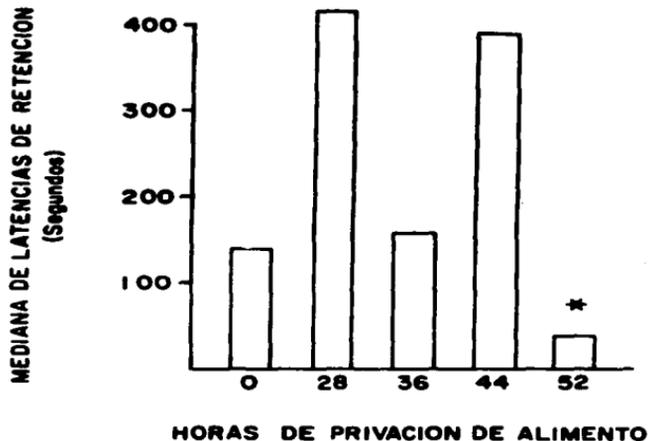
Gráfica 8. Las barras representan la mediana de latencias de retención medida a los 10 minutos, en ratones ($n=20$) inyectados con solución salina y sometidos a diferentes horas de privación de alimento. Como muestra la gráfica, hay un incremento significativo ($p<0.05$) en la latencia de retención de ratones con 28 hrs de ayuno con respecto al grupo de 0 hrs de ayuno. Además se observa un decremento ($p<0.05$) en el grupo de 52 hrs de ayuno respecto a los grupos de 28, 36 y 44 hrs de ayuno.

Memoria de largo plazo en ratones inyectados con solución salina

Los animales inyectados con solución salina y sometidos a diferentes horas de ayuno, presentaron un análisis de varianza ($H=26.59$, $gl=9$, $p=0.0016$). Esta diferencia se debe al decremento de la latencia de retención de los ratones sometidos a 52 horas de ayuno con respecto a 0 hrs ($U=444.0$, $p=0.0174$); 28 hrs ($U=147.5$, $p=0.0032$), 36 hrs ($U=178.0$, $p=0.0095$) y 44 hrs ($U=152.5$, $p=0.0022$) horas de ayuno.. En el resto de los grupos no se observan diferencias significativas (gráfica 9).

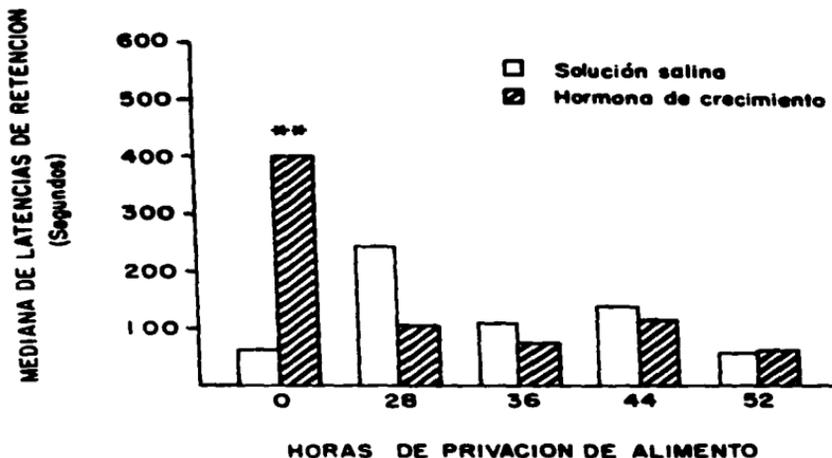
Memoria de corto plazo en ratones inyectados con hormona de crecimiento

El análisis de varianza Kruskal Wallis indica diferencias entre los grupos de ratones inyectados con hormona de crecimiento ($H=10.90$, $gl=9$, $p=0.027$). Esta diferencia se debe a un incremento de la latencia de retención ($U=94.0$, $p=0.009$) en los ratones con alimento y GH con respecto a su control (grupo de ratones con alimento e inyectado con solución salina) y a las diferencias significativas que se localizan entre los grupos de ratones inyectados con GH: el grupo de 36 hrs tiene un decremento de retención ($U=91.0$, $p=0.0123$) con respecto al de 0 hrs; el grupo de 52 hrs presentó un decremento de retención con respecto a 0 hrs ($U=73.0$, $p=0.0024$), 28hrs ($U=115.0$, $p=0.0444$) y 44 hrs ($U=87.5$, $p=0.0256$). El resto de los grupos no presentan diferencias significativas (gráfica 10).

MEMORIA DE LARGO PLAZO EN RATONES CON SOLUCION SALINA

Gráfica 9. Las barras representan la mediana de latencias de retención medida a las 24 hrs, en ratones ($n=20$) inyectados con solución salina y sometidos a diferentes horas de privación de alimento. Como muestra la gráfica, hay un decremento de la retención ($p<0.05$) en el grupo con 52 hrs de ayuno con respecto a 0, 28, 36 y 44 hrs de ayuno.

MEMORIA DE CORTO PLAZO EN RATONES CON HORMONA DE CRECIMIENTO

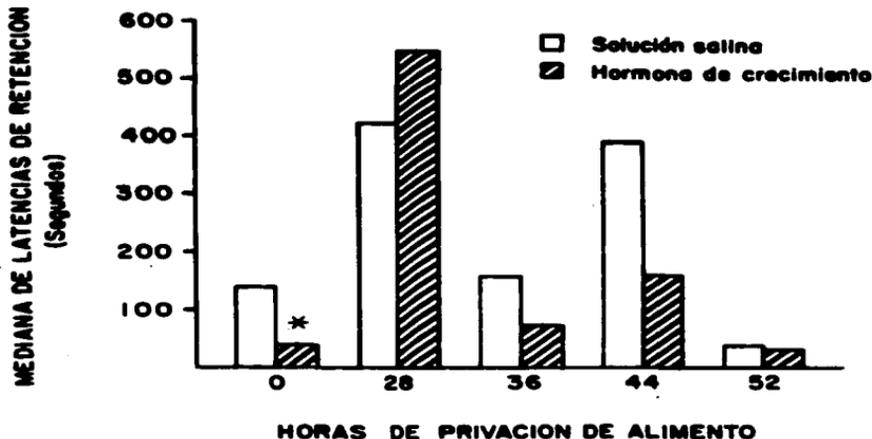


Gráfica 10. Las barras representan la mediana de latencias de retención de grupos de ratones ($n=20$) que fueron sometidos a diferentes horas de privación de alimento. La gráfica muestra un incremento ($p<0.01$) de la retención del grupo de ratones con alimento-GH con respecto a su control de 0 hrs de ayuno (grupo de ratones inyectados con solución salina). El resto de los grupos no muestra diferencias significativas respecto a su control.

Memoria de largo plazo en ratones inyectados con hormona de crecimiento.

En la memoria de largo plazo de los ratones inyectados con hormona de crecimiento, se registró un análisis de varianza significativa ($F=13.24$, $gl=9$, $p=0.01$). Esta diferencia se debe al decremento de retención en los ratones con alimento ad libitum-GH ($U=228.5$, $p=0.012$), con respecto a su control. La comparación entre los grupos con privación de alimento-GH y su respectivo control no muestran diferencias significativas (gráfica 11). En cuanto a la comparación entre los grupos con GH, se localizó un incremento de retención en el grupo de 28 hrs con respecto a 0 hrs ($U=75.5$, $p=0.0019$), 36 hrs ($U=75.0$, $p=0.0463$) y 52 hrs ($U=78.0$, $p=0.0067$); y un incremento de retención en el grupo de 44 horas de ayuno con respecto a 0 hrs ($U=99.5$, $p=0.009$) y 52 hrs ($U=97.0$, $p=0.0205$).

MEMORIA DE LARGO PLAZO EN RATONES CON HORMONA DE CRECIMIENTO



Gráfica 11. Las barras representan la mediana de latencias de retención de grupos de ratones ($n=20$), que fueron sometidos a diferentes horas de privación de alimento. La gráfica muestra un decremento ($p<0.05$) de la retención en el grupo de ratones con alimento- GH con respecto a su control (ratones inyectados con solución salina). El resto de los grupos no muestran diferencias significativas con su control.

DISCUSION

Patrón de alimentación

De acuerdo a nuestros resultados planteamos que los animales expuestos a ambientes naturales adoptan ritmos diarios con un patrón más regular o por lo menos diferentes que los animales que están expuestos a condiciones de luz-obscuridad invertida. Lo anterior podría deberse a que la luz natural es de intensidad variable con dos períodos de penumbra que tienen importancia en el reloj biológico de los ratones y se refleja en un patrón más regular en su ritmo de alimentación. Esto puede ser explicado si tenemos en cuenta que el sistema circadiano está organizado de tal manera, que la intensidad y duración de la luz, son captados por los receptores del sistema visual de los ratones, y transmitidos por las vías aferentes al núcleo supraquiasmático (NSQ), el cual regula la información y la envía por las vías eferentes hasta los órganos efectores para expresarla en este caso en los ritmos de alimentación que se observan en la gráfica 1.

Si bien, los roedores se alimentan fundamentalmente durante la fase de obscuridad (Bruce, 1960 y Aschoff, 1960), nosotros tratamos de hacer notar las diferencias que se aprecian en los períodos de alimentación, cuando variamos las condiciones de luz obscuridad. Los ratones expuestos a luz natural alcanzan su período de máxima alimentación 4 horas después de que entra la fase de obscuridad y los ratones con luz controlada lo hacen dos horas después de que se apaga la luz. Nuevamente observamos en este caso la importancia que ejerce el ciclo de luz obscuridad sobre el patrón de alimentación de los ratones.

También se observó que un porcentaje de ratones de ambos grupos, se alimentan dos horas antes que el resto de los animales. Esta característica la atribuímos a la jerarquía que hay entre los roedores y que aún después de ser separados en cajas individuales, pueda persistir su propio ritmo de alimentación. En este caso, la jerarquía es otro factor externo que influye en el patrón de alimentación de los ratones y posiblemente de muchos otros organismos donde se establecen jerarquías.

Variaciones diarias del peso, la temperatura y la actividad motora.

Peso

Cuando observamos las variaciones diarias de peso, en condiciones de luz natural y alimento ad libitum los ratones presentan un decremento significativo antes de iniciarse la fase de oscuridad. Esta caída del peso se debe a los hábitos alimenticios de los ratones, donde está implícito el gasto de carbohidratos, lípidos y proteínas acumulados en los tejidos. La disminución de peso se da a medida que el alimento empieza a ser metabolizado y se recupera después de la alimentación. Esto se pudo constatar, al comparar las gráficas del peso y del patrón de alimentación de los ratones expuestos a luz natural (gráficas 1 y 2). Además no podemos olvidar que en este proceso, está implícita la actividad anabólica y catabólica en la regulación del metabolismo de los carbohidratos, lípidos y proteínas, por lo que debemos considerar a la alimentación y el metabolismo como un solo proceso, que se manifiesta con variaciones diarias reflejadas en el peso de los ratones.

Temperatura

Las variaciones diarias de la temperatura en ratones con alimento ad libitum, pueden ser analizadas desde dos puntos de vista. En el primero habría que entender que las variaciones de la temperatura son independientes de las variaciones de peso diario y de la alimentación (ver gráficas 3) y el segundo es que el decremento no significativo de la temperatura registrado a las 17:00 horas, parece ser una característica en los ratones.

Nuestros resultados discrepan con lo expuesto por Brobeck (1948) en su hipótesis termorregulatoria, donde plantea que los animales comen para ganar calor y dejan de comer para prevenir la hipertermia. El único decremento no significativo de la temperatura que nosotros observamos, aparece 9 horas antes de que se presente el período de máxima alimentación. De cualquier manera este decremento de temperatura es pasajero y se normaliza al iniciarse el ciclo de oscuridad, tal vez el incremento de la actividad motora ayude para que se dé esta normalización.

Actividad motora

La actividad motora también presenta variaciones diarias expresadas con un incremento de la misma, enseguida de iniciado el ciclo de oscuridad. Tampoco este incremento de la actividad motora se relaciona con la hora de alimentación máxima, ya que se presenta 3 horas antes de la misma. Estos datos cuestionan los planteamientos de Abrams y Hammel (1964), quienes asociaron la actividad motora con el incremento de la temperatura, y ambas como

producto de la actividad alimenticia. Por otra parte, nuestros datos coinciden con el reporte de Bolles y de Lorge (1962), quienes afirmaron que hay un incremento de la actividad motora que se anticipa a la alimentación y en este caso, nuestros datos indican claramente que el incremento de la actividad se origina antes de la alimentación y no como producto de la acción de comer.

Como podemos apreciar, las variaciones diarias del peso, la temperatura y la actividad motora y su influencia en procesos fisiológicos como los examinados en este trabajo nos indican su relevancia en el análisis de fenómenos biológicos, por lo que sería necesario que los investigadores informaran de las condiciones experimentales bajo las que trabajan, especificando en qué período del ciclo luz-obscuridad se realizan sus experimentos, sobre todo si éstos se relacionan con conducta y aprendizaje.

Efectos de la privación de alimento sobre el peso, la temperatura y la actividad motora.

Peso

Si bien el planteamiento de nuestra hipótesis indicaba un decremento del peso en condiciones de privación de alimento, no se tenía previsto que este decremento se presentara en tres momentos importantes: El primero con una caída en las primeras 20 horas de ayuno (gráfica 5), la cual podría ser una condición fisiológica normal debida a variaciones diarias tal como fué expresado anteriormente al demostrar que los ratones comen cada 24 horas. Un segundo momento en el que se presenta la estabilización del peso de los ratones con 36, 44 y 52 horas de ayuno, lo que sugiere que los ratones tienen

mecanismos de adaptación al consumo de energía para conservación de su masa corporal. Aparece un tercer momento en el que registramos un decremento a las 60 horas de ayuno.

Nuestros resultados apoyarían el mecanismo propuesto por Best y Taylor (1985); con él explicó la pérdida de peso en términos del valor calórico del tejido acumulado. Estos reportes indican que existe alrededor de 1g/kcal para carbohidratos y proteínas y 0.1g/kcal para la grasa. Estos datos se obtuvieron de registros en humanos, quienes catabolizaron más carbohidratos y proteínas durante el primero y segundo día de ayuno y perdieron peso rápidamente. Cuando el ayuno se prolongó, disminuyó la pérdida de peso, debido a que las necesidades metabólicas se cubrieron con el catabolismo de los ácidos grasos.

Los ratones como mamíferos, presentan características fisiológicas similares a los humanos, pero con un metabolismo mucho más alto (Pearson, 1947), por lo que suponemos que los efectos de la privación de alimento se manifiestan en un lapso más corto. Por lo mismo, sus mecanismos de adaptación al consumo de energía, se ponen en marcha en el momento de concluir su ritmo normal para posteriormente llegar a su límite de tolerancia en el cual se presenta un marcado decremento en el peso.

Temperatura

En relación al registro de la temperatura rectal nuestros resultados mostraron que la temperatura no decrece en relación a la horas de privación de alimento, si bien, hay un decremento significativo en las primeras 12 hrs de ayuno, lo que llama la atención es la elevación no significativa de la temperatura rectal cuando están en periodos avanzados de ayuno. Este incremento de la temperatura evidentemente no está relacionado con la alimentación, ya que han transcurrido 52 horas sin recibir alimento.

Estos resultados podrían estar de acuerdo con la propuesta de Rampone y Shirasu (1964), en la que plantean que los cambios de temperatura cerebral y rectal, no están correlacionados con una propiedad específica del alimento ni con la cantidad de comida ingerida. Por otra parte estos cambios en la temperatura podrían estar relacionados con el incremento de actividad motora, que se observa a las 52 horas de ayuno y que posteriormente discutiremos.

Al parecer las 52 horas marcarían los límites de tolerancia metabólica de los ratones, ya que con 60 horas de ayuno se presenta un descenso significativo de la temperatura, como indicador de que las alteraciones metabólicas no se restablecen, y por consecuencia se presenta una tendencia a la rápida descompensación del organismo. En los ratones esta descompensación se observaría antes que en las ratas, por tener éstos mayor tasa metabólica.

Actividad Motora

En nuestros experimentos observamos que la actividad motora permanece estable durante las primeras 36 horas de ayuno y se incrementa con 44 y 52 hrs de ayuno. Este incremento de la actividad podría estar relacionado con un mecanismo de defensa contra la inanición, que los prepararía para mejorar la búsqueda de alimento. Esta hiperactividad también se manifiesta en ratas con desnutrición neonatal (Escobar y Salas, 1988; Arauz-Contreras et al 1989 y Almeida et al. 1993).

Teóricamente estos incrementos conllevan un gasto de energía, sin embargo el peso se mantiene estable y la temperatura aumenta durante estos periodos de ayuno, por lo que nos planteamos la existencia de mecanismos de defensa contra la falta de alimentos que podrían ponerse de manifiesto en animales sometidos a ayuno prolongado.

Además planteamos que como la temperatura corporal y la actividad motora tienen control central, entonces estos incrementos deben responder a mecanismos de defensa que presentan su origen en el sistema nervioso central.

Aprendizaje y Memoria

En el estudio de la memoria de corto plazo se registró un incremento significativo de la retención después 28 horas de ayuno, incremento que no estamos en condiciones de explicar con los parámetros que utilizamos. Sin embargo, si nos remitimos al trabajo de Fourest-Fontecave et al (1986), podemos relacionar la importancia de la hipoglucemia con el incremento de la retención en los ratones con 28 hrs de ayuno. Ellos observaron que la hipoglucemia producida por 72 horas de ayuno en jóvenes de 25-34 años, no modificó su claridad mental ni redujo su agudeza mental. En el caso de los ratones creemos que la hipoglucemia podría considerarse como un elemento que pone en marcha mecanismos de defensa para la búsqueda de alimento y que en un primer momento sensibilizan los sentidos favoreciendo la retención de la memoria de corto plazo. Si de acuerdo al paradigma de éste trabajo, los animales realmente consiguieran alimento para saciar su hambre, esta experiencia debiera consolidarse de manera significativa en la memoria de largo plazo. En cuanto al decremento de la retención a las 52 hrs, podría estar asociado a un aumento de la actividad motora (gráfica 7) que incita al ratón a pasar a la cámara de castigo. Sin embargo, no se presenta la misma situación con la hiperactividad de los ratones con 44 horas de ayuno.

Por otra parte, no se presentó un deterioro de la memoria de corto plazo en los ratones con 36 y 44 horas de ayuno, lo cual indica que se mantuvieron intactos los mecanismos centrales de la regulación de la memoria. Gold (1986), demostró que la glucosa es un importante regulador de los procesos de la memoria y Fourest-Fontecave et al. (1986) demostraron que el ayuno

prolongado no modificó la agudeza mental de jóvenes universitarios; éstos argumentos son suficientes para comprender la baja dependencia del sistema nervioso central para utilizar la glucosa plasmática en situaciones de privación de alimento. Por otra parte, Alvarez-Buylla y Roces de Alvarez-Buylla (1992), demostraron la existencia de una neurosecreción que participa en la retención de la glucosa por el sistema nervioso central. Estos planteamientos podrían explicar porqué 36 y 44 hrs de privación de alimento no afectan la retención de la memoria de corto plazo de los ratones.

Los decrementos significativos de la retención en los ratones con 52 horas de privación de alimento en memoria de corto y largo plazo, podría deberse al incremento de la actividad motora registrado previamente. A pesar de que el incremento de la actividad motora en ratones con 52 horas de ayuno, indicaban una respuesta adecuada al mismo, esta falta de retención estaría justificada por la insignificancia que desde el punto de vista fisiológico representa el estímulo nociceptivo ante la hiperactividad del ratón.

Por otra parte, al comparar la retención de los grupos de ratones con privación de alimento-GH y su respectivo control con salina, no se registraron diferencias significativas. Sin embargo se observaron las mismas fluctuaciones que en su control, suponemos que estas variaciones se deben a manifestaciones cíclicas normales que ya han sido observadas en registros neurofisiológicos como el que reporta Tellez (1981), quien observó que los registros de la estimulación eléctrica del núcleo caudado medial, muestran decrementos de la magnitud del 1º y 3º pico y un incremento del 2º pico, esto fue después de la

microinyección de picrotoxina (6 o 18 μg) en ambos núcleos caudados. Las fluctuaciones se mantienen a lo largo de 180 minutos de registro. Estos datos y los obtenidos en este trabajo, indican que estas fluctuaciones cíclicas podrían ser eventos biológicos normales.

En cuanto a la latencia de retención en la memoria de largo plazo en ratones con GH, disminuye significativamente cuando los ratones poseen alimentación ad libitum. Este hecho es difícil de explicar porque en trabajos previos (Rivas-Arancibia y Vázquez-Pereyra, 1994), han encontrado incrementos en la latencia de retención de la memoria de largo plazo de ratas inyectadas con GH a altas dosis. Con base en esto, podríamos suponer que los efectos de la GH sobre la memoria de largo plazo en animales bien nutridos es dependiente de la dosis de esta hormona

De acuerdo a nuestros resultados planteamos que lo más llamativo de nuestros experimentos consiste en que durante la privación de alimento no se observaron los resultados esperados; al contrario, algunos datos resultan contradictorios si pensamos que los ratones no están recibiendo aportes externos por la alimentación. El comportamiento fisiológico durante la privación de alimento muestra una meseta que se manifiesta con la no pérdida del peso entre las 36 y 52 hrs de ayuno, la temperatura no se modifica entre la 20 y 52 hrs de ayuno; mientras que la actividad motora se incrementa a las 44 y 52 hrs de ayuno. El que se manifieste esta meseta en peso y temperatura indica una estabilización del organismo. Posteriormente, cuando ya van 44 y 52 horas sin alimentación se observa una reactivación de la actividad motora

alcanzando un máximo en estos períodos. Paradojicamente cuando se presenta esta reactivación física (hiperactividad) aparentemente produce un déficit en la memoria de largo plazo.

Cuando tratamos de buscar los mecanismos involucrados para la defensa del organismo ante el ayuno prolongado, encontramos una inhibición parcial del sistema endócrino producido por el ayuno ya descrito por Campbell et al. (1977). Dentro de esta inhibición neuroendocrina se destaca la marcada disminución de niveles séricos de los factores liberadores de la prolactina, de hormona tiroidea, de hormona luteinizante y foliculoestimulante, de hormona de crecimiento y la casi desaparición de las hormonas correspondientes, unidos a aun descenso de la glucosa e insulina en plasma (Steffens et al. 1988).

Planteamos por lo tanto un complejo mecanismo neuroendocrino de defensa que incluye la reactivación física de los ratones en las primeras 52 hrs de ayuno. No creemos que este mecanismo sea privativo al ayuno porque ya se había reportado incremento de la actividad en ratas desnutridas (Arauz-Contreras et al. 1989 y Almeida et al. 1993). Para esta reacción orgánica se hace necesaria la presencia de otra hormona que aparece frente a la hipoglucemia prolongada, que ya ha sido aislada y estudiadas sus funciones por Alvarez-Buylla y Roces de Alvarez-Buylla (1992). Por lo tanto planteamos este otro componente neuroendocrino como responsable de esta segunda etapa del mecanismo de lucha frente al ayuno prolongado.

CONCLUSIONES

Los periodos de alimentación de los ratones dependen de los ciclos de luz obscuridad y varían según se use la luz natural o luz controlada.

El registro realizado en ciclos de 24 horas indican que los ratones se alimentan principalmente en la fase de obscuridad, utilizando un período máximo de 4 horas.

El peso, la temperatura y la actividad motora en ratones presenta variaciones diarias. El peso decrece y la actividad motora aumenta antes de iniciarse la alimentación.

Durante el ayuno se presenta un mecanismo de defensa contra la falta de alimento que se evidencia por el peso y temperatura mantenidos y un aumento de la actividad motora hasta las 52 horas de ayuno.

A las 60 horas de ayuno los ratones presentan un deterioro drástico que puede representar el fracaso de sus mecanismos de defensa.

La privación de alimento tiene un efecto favorable sobre la retención de la memoria de corto plazo en las primeras horas de ayuno.

Con 52 horas de ayuno se deteriora la retención de corto y largo plazo en ratones.

La hormona de crecimiento favorece la retención de la memoria de corto plazo en los ratones solamente cuando tienen alimento disponible.

La hormona de crecimiento no tiene efectos sobre la retención de la memoria de corto y largo plazo en ratones privados de alimento.

APORTACIONES

En ratones con privación de alimento observamos características muy similares a los reportados en estudios con desnutrición, por lo tanto debieran completarse los estudios de ayuno para determinar si se pueden sustituir los experimentos con dietas hipoprotéicas o hipocalóricas por otros con privación de alimento. Esta sugerencia se basa en la dificultad para obtener animales desnutridos y el costo tan elevado que tienen estas dietas especiales.

La principal aportación de estos experimentos fue establecer que existe un mecanismo neuroendocrino de defensa frente a la falta de nutrientes que parece ser el mismo que se ha observado en hipoglucemias de diversos orígenes tales como desnutrición pre y posnatal con ratas.

Potr otra parte, queda claramente demostrado que la hormona de crecimiento ejerce su efecto solo con la presencia de nutrientes en el organismo, por lo tanto la GH no mejora la memoria de los sujetos mientras permanezcan en ayuno.

Queda como interrogante si usando otro tipo de paradigma como sería el aprendizaje en el laberinto, con comida como reforzador aumente la retención en los ratones con privación de alimento.

APENDICE 1

ACTIVIDAD MOTORA EN RATONES

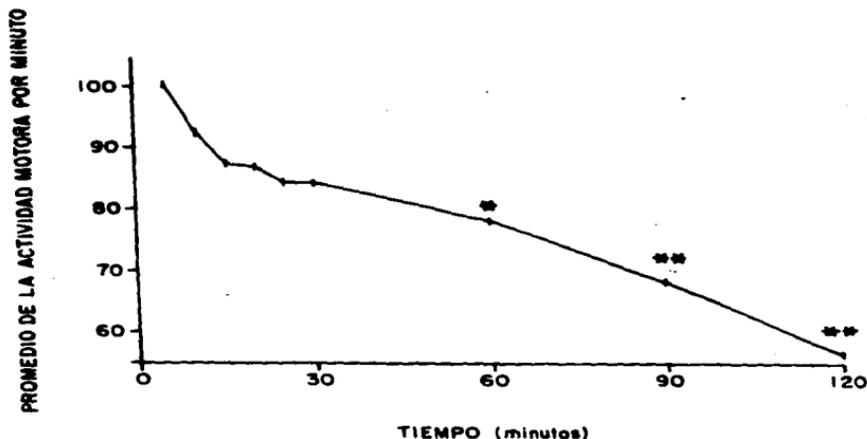
Se realizó una prueba preliminar de actividad motora con el propósito de determinar el período óptimo para registrar la actividad en ratones. Para ello se utilizaron 10 ratones macho adultos de la especie *Mus musculus* cepa CD1, con un peso de 32 a 35 gramos al momento de medir su actividad. Todos los ratones fueron previamente adaptados a 30 días de luz natural y temperatura ambiental de 24 - 27 °C.

La actividad motora se registro durante 120 minutos con los siguientes intervalos, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 60, 90 y 120 minutos. En el registro se utilizó un monitor electrónico de actividad Stoelting Co. Wood Dale III, siguiendo el procedimiento descrito en la página 31.

Se aplicó un analisis de varianza (ANOVA) a los datos obtenidos y se realizo una comparación multiple utilizando la prueba de Duncan, para determinar las diferencias estadísticas entre los intervalos de registro.

Hay un decremento de la actividad motora (gráfica 1) que se acentúa a medida que transcurre el tiempo de exposición del ratón a un ambiente específico como lo es la cámara de registro, sin embargo, este decremento no es significativo en los primeros 30 minutos. Sólo se observan decrementos significativos ($p < 0.05$) a los 60 minutos, con respecto a la actividad a los 5 y 10

ACTIVIDAD MOTORA DE RATONES CON ALIMENTO AD LIBITUM



Gráfica 1. La gráfica muestra el promedio de la actividad motora en ratones macho adultos ($n=10$). Cada punto corresponde a la actividad motora registrada a los 5, 10, 15, 20, 25, 30, 60, 90 y 120 minutos. Se observó un decremento ($p<0.05$) a los 60 minutos con respecto a los primeros 5 y 10 minutos de registro y decrementos ($p<0.01$) a los 90 y 120 minutos con respecto a 5, 10, 15, 20, 25 y 30 minutos de registro de la actividad motora.

minutos y decrementos ($p < 0.01$) en los intervalos de 90 y 120 minutos, con respecto a 5, 10, 15, 20, 25 y 30 minutos de registro.

La caída de la actividad motora en los primeros 30 minutos de registro, no muestra diferencias estadísticamente significativas lo que nos permitiría considerar como parámetro adecuado a cualquier intervalo dentro de este rango. Sin embargo, la máxima actividad motora de los ratones se registro en los primeros 5 minutos por lo que elegimos a este intervalo como el adecuado para medir la actividad motora en ratones.

APENDICE 2

DELIMITACION DE LA INTENSIDAD DE ESTIMULO

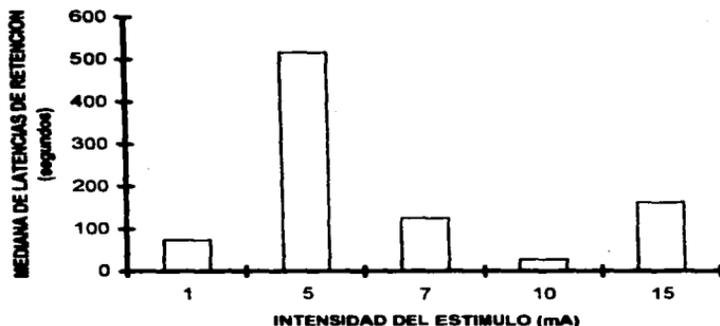
Como carecemos de información acerca de la intensidad del estímulo nociceptivo que debemos usar en ratones macho adultos, se realizaron pruebas preliminares, que nos permitieron determinar la intensidad del estímulo que se aplicó en las pruebas de prevención pasiva descrita en las páginas 34 y 35.

Para esta prueba se usaron 100 ratones macho adultos de la cepa CD1, especie *Mus musculus* con peso de 32 a 35 gramos. Todos los ratones estuvieron expuestos a luz-obscuridad natural y temperatura ambiental 24 - 27 °C. Las pruebas se realizaron de 11:00 a 13:00 hrs del día.

A grupos de 10 ratones se aplicaron estímulos nociceptivos en pulsos con un estimulador Grass S88 a través de una unidad de corriente constante CCU1A y estímulos con corriente continua con el mismo estimulador. En ambas situaciones se usó una prueba de prevención pasiva, cuya retención se midió a las 24 horas (memoria de largo plazo).

Estímulo en pulsos

Los estímulos nociceptivos aplicados en pulsos son de 30 estímulos por segundo con una duración de 30 milisegundos cada estímulo, durante 5 segundos con intensidades de 1.0, 5.0, 7.0, 10.0 y 15.0 miliamperes (mA) en una prueba de prevención pasiva, cuya retención se midió a las 24 horas.

ESTIMULO NOCICEPTIVO EN PULSOS

Gráfica 2A. Las barras representan la mediana de la latencia de retención medida 24 horas después de la aplicación de diferentes intensidades de estímulos en pulsos (30 estímulos/seg y duración de 30 mseg cada uno). No se registraron diferencias significativas con la aplicación de estímulos en pulsos.

Estímulos con corriente continua

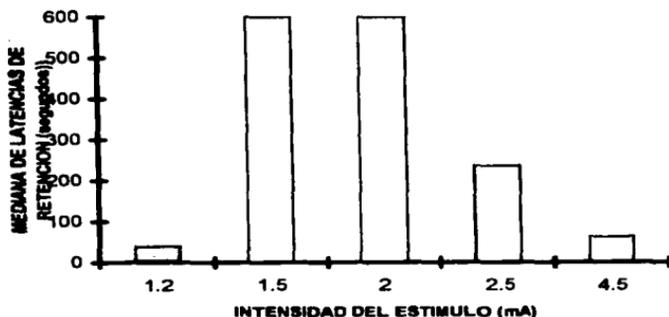
Los estímulos de corriente continua se aplicaron durante 2 segundos, con intensidades de 1.2, 1.5, 2.0, 2.5 y 4.5 mA en una prueba de prevención pasiva cuya retención se midió a las 24 horas.

Se aplicó un análisis de varianza (ANOVA) a las latencias de retención y se realizó una comparación múltiple utilizando la prueba de Duncan.

El análisis estadístico del estímulo aplicado en pulsos indicó que no se presentaron diferencias significativas, en la retención de la memoria de largo plazo de los ratones estimulados con diferentes intensidades (gráfica 2A). Esto lo atribuimos a los saltos que ejecuta el ratón al momento de aplicar el estímulo y nos hace dudar si efectivamente el ratón recibe la intensidad de estímulo planeada.

Si bien, el estímulo eléctrico más usado en electrofisiología es el de pulsos de ondas rectangulares, en los que se considera a la intensidad, duración y frecuencia como factores de importancia primordial para que el estímulo alcance su umbral. Nosotros optamos por probar la estimulación con corriente continua, con el propósito de que cada vez que el ratón colocó sus patas sobre las laminas de la caja de condicionamiento, podríamos asegurar que recibe un estímulo con la intensidad especificada.

De los estímulos de corriente continua aplicados durante 2 segundos, el de intensidad de 2.0 mA permitió que todos los ratones llegaran a una

ESTIMULO NOCICEPTIVO CON CORRIENTE CONTINUA

Gráfica 2B. Las barras representan la mediana de la latencia de retención medida 24 horas después que se aplicaron estímulos de corriente continua con diferente intensidad. Con 2.0 mA se registro un incremento de la retención ($p < 0.05$) con respecto a 1.2, 2.5 y 4.5 mA, otro incremento de la retención se registro con la intensidad de 1.5 mA, mostró una diferencia ($p < 0.05$) con respecto a los estímulos de 1.2 y 4.5 mA.

retención de 600 segundos mostrando una diferencia ($p < 0.05$) con respecto a los estímulos con intensidades de 1.2, 2.5 y 4.5 mA (gráfica 2B). Otras diferencias significativas se localizaron en el estímulo con intensidad de 1.5 mA (lo que se observa en la gráfica 2B es la mediana de la latencia de retención), que mostró un incremento ($p < 0.05$) con respecto a los estímulos con intensidades de 1.2 y 4.5 mA. Como en nuestra hipótesis de trabajo, planteamos la posibilidad de que se mejoraría la memoria usando hormona de crecimiento, entonces no podemos utilizar la intensidad de 2.0 mA porque no se apreciaría el efecto de la hormona. Además, cuando usamos intensidades de 1.2, 2.5 y 4.5 mA la retención es demasiado baja, por lo tanto elegimos la intensidad de 1.5 mA como la más aceptable para poder apreciar los efectos de la hormona de crecimiento.

REFERENCIAS

- Abrams R. and H.T. Hammel, (1964). Hypothalamic temperature in unanesthetized albino rats during feeding and sleeping. *Am J Physiol* 206(3):641-646.
- Adachi A., M. Funahashi and J. Ohga, (1991). Hepatic thermogenesis relation to food intake in the conscious rat. *Brain Res. Bull.* 27(3/4):529-533.
- Almeida S.S., R.A. García and L.M. de Oliveira, (1993). Effects of early protein malnutrition and repeated testing upon locomotor and exploratory behaviors in the elevated plus-maze. *Physiol. Behav.* 54(4):749-752.
- Almqvist S., D. Ikkos and R. Luft, (1961). Studies on sulfation factor (SF) activity of human serum. *Acta Endocrinol.* 36:577-595.
- Allen L.H., (1993). The nutrition CRSP: what is marginal malnutrition, and does it affect human function. *Nutr. Rev.* 51(9):255-267.
- Alvarez-Buylla R. y E. Rocas de Alvarez-Buylla, (1992). Nueva neurohormona en la regulación del consumo de glucosa por el sistema nervioso central. XXXV Congreso Nacional de Ciencias Fisiológicas.
- Alvarez X.A. and R. Cacabelos, (1990). Effects of GRF (1-29)NH₂ on short-term memory: neuroendocrine and neuropsychological assessment in healthy young subjects. *Meth. Find. Exp. Clin. Pharmacol.* 12(7):493-499.
- Alvarez X.A. and R. Cacabelos, (1993). Influence of growth hormone (GH) and GH-releasing factor on locomotor activity in rats. *Peptides* 14(4):707-712.
- Arauz-Contreras J., I. González-Burgos, M.E. Flores-Villavicencio, G. Garibay-Chaves, M.A. Gonzalez-Alvarez, y P. Aranda-Belica (1989). Actividad exploratoria y variabilidad conductual en ratas experimentalmente desnutridas con maíz y frijol. XXXII Congreso Nacional de Ciencias Fisiológicas. Oaxtepec, Mor. México
- Aschoff J., (1960). Exogenous and endogeneous components in circadian rhythms. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 25:11-28.
- Aschoff J., (1964). Survival value at diurnal rhythms. *Symposia of the zoological Society of London* 13:79-98.

- Best y Taylor, Bases Fisiológicas de la Práctica Médica.** John R. Brobeck. Eds. William & Wilking. 11 Ed. Panamericana, 1985.
- Bolles R.C. and J. de Lorge, (1962).** The rat's adjustment to a-diurnal feeding cycles. *J. Comp. Physiol. Psychol.* 55(5):760-762.
- Bray G.A., (1993).** Food intake, sympathetic activity and adrenal steroids. *Brain Res. Bull.* 32(5):537-541.
- Bruce V.G., (1960).** Environmental entrainment of circadian rhythms. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 25:2-48.
- Brobeck J.R., (1948).** Food intake as mechanism of temperature regulation. *Yale J. Biol. Med.* 20:545-552.
- Cacabelos R., (1990).** Growth hormone-releasing factor in mental disorders: A diagnostic marker and therapeutic alternative. *Meth. Find. Exp. Clin. Pharmacol.* 12(7):421-436
- Campbell G.A., M. Kurcz, S. Marshall and J. Meites, (1977).** Effects of starvation in rats on serum levels of follicle stimulating hormone, luteinizing hormone, thyrotropin, growth hormone and prolactin; response to LH-releasing hormone and thyrotropin-releasing hormone. *Endocrinol.* 100:580-588.
- Challa A., R.J. Krieg, Jr., M.A. Thabet, J.D. Veldhuis and J.C.M. Chan, (1993).** Metabolic acidosis inhibits growth hormone secretion in rats: mechanism of growth retardation. *Am. J. Physiol.* 265 (Endocrinol. Metab. 28): E547-E553.
- Corpas E., S.M. Harman and Blackman, (1993).** Human growth hormone and human aging. *Endocrine Rev.* 14(1):20-39.
- Cruz-Morales S.E., M. Duran-Arevalo, M. A. Díaz del Guante, G. Quirarte y R.A. Prado-Alcala, (1992).** A threshold for the protective effect of over-reinforced passive avoidance against scopolamine-induced amnesia. *Behav. Neural Biol.* 57:256-259.
- Daughaday W.H., J.N. Heins, L. Srivastava and C. Hammer, (1968).** Sulfation factor: studies of its removal from plasma and metabolic fate in cartilage. *J. Lab. Clin. Med.* 72(5):803-814.

- Depocas F., (1962). Body glucose as fuel in white rats exposed to cold: results with fasted rats. *Am. J. Physiol.* 202(5):1015-1018.
- Dickerman E., A. Negro-Vilar and J. Meites, (1969). Effects of starvation on plasma GH activity, pituitary GH and GH-RF levels in the rat. *Endocrinol.* 84:814-819.
- Edmonds S.C. and N.T. Adler, (1977). Food and light as entrainers of circadian running activity in the rat. *Physiol. Behav.* 18:915-919.
- Escobar C. y M. Salas, (1988). Desarrollo del juego en ratas neonatalmente desnutridas. XXXI Congreso Nacional de Ciencias Fisiológicas. Queretaro, Qro. México.
- Fourest-Fontecave S., U. Adamson, P.E. Lins, B. Ekblom, C. Sandahl and L. Strand, (1986). Mental alertness in response to hypoglycemia in normal man: the effect of 12 hours and 72 hours of fasting. *Diabete Metab.* 12(5):239-245.
- Friedman R.C. and S. Reichlin, (1965). Growth hormone content of the pituitary gland of starved rats. *Endocrinol.* 76:787-788.
- Ganong W.F., (1996). Fisiología médica. 15ª Edición. Editorial "El manual moderno" pp 297-298
- Garriga J. and R. Cussó, (1992). Effect of starvation on glycogen and glucose metabolism in different areas of the rat brain. *Brain Res.* 591:277-282.
- Gold P.E., (1986). Glucose modulation of memory storage processing. *Behav. Neural Biol.* 45:342-349.
- Good R.A., G. Fernandez, E.J. Yunis, W.C. Cooper, D.C. Jose, T.R. Kramer, and M.A. Hansen, (1976). Nutritional deficiency, immunologic function and disease. *Am. J. Pathol.* 84:599-614.
- Guyton A.C., (1988). Tratado de fisiología médica, 7a ed. Editorial Interamericana McGraw-Hill pp 857.
- Hall K. (1971). Effect of intravenous administration of human growth on sulphation factor activity in serum of hypopituitary subjects. *Acta Endocrinol.* 66:491-497

- Hall K., (1972). Human somatomedin: determination, occurrence biological activity and purification. *Acta Endocrinol Suppl* 163:1-16.
- Hall K., K. Takano and L. Fryklund, (1974). Radioreceptor assay for somatomedin A. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 39:973-976.
- Henry C.J., J.P. Rivers and P.R. Payne, (1988). Protein and energy metabolism in starvation reconsidered. *Eur. J. Clin. Nutr.* 42(7):543-549.
- Hilgard E. y G.H. Bower, (1975). *Teorías del aprendizaje*. Editorial Trillas, México. p 14.
- Ibata Y., H.L. Obata, S. Kubo, K. Fukui, H. Okamura, T. Ishigami, K. Imagawa and S. Sin, (1983). Some cellular characteristics of somatostatin neurons and terminals in the periventricular nucleus of the rat hypothalamus and median eminence. *Electron microscopic immunohistochemistry. Brain Res.* 258: 291-295.
- Krebs Ch.J., (1978). *Ecología: estudios de la distribución y la abundancia*. 2a. Edición., Ed. Harla Harper Row Latinoamerica. pp 21, 71 y 115.
- Laron Z and Galatzer A., (1985). Growth hormone somatomedin and prolactin-relationship to brain function. *Brain Dev.* 7:559-567.
- Leto S., G.C. Kokkonen and CH. Jr. Barrows, (1976). Dietary protein life span and physiological variables in female mice. *J. Gerontol* 31:149-154.
- Ma S.W.Y. and D.O. Foster (1986). Starvation-induced changes in metabolic rate, blood flow and regional energy expenditure in rats. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 64:1252-1258.
- Mayer J., (1955). Regulation of energy intake and body weight: glucostatic theory and lipostatic hypothesis. *Ann. Acad. Sci.* 63:15-43.
- McGaugh J.L., (1983). Hormonal influences on memory. *Ann. Rev. Psychol.* 34:297-323
- Mercenthaler I., S. Vigh, A.V. Schally and P. Petrusz, (1984). Immunocytochemical localization of growth hormone-releasing factor in the rat hypothalamus. *Endocrinol.* 114:1082-1085.

- Moore R.Y. and V.B. Eichler, (1972). Loss of circadian adrenal corticosterone rhythm following suprachiasmatic nucleus lesions in the rat. *Brain. Res.* 42:201-206.
- Mori T., K. Nagai and H. Nakagawa, (1983). Dependence of memory of meal time upon circadian biological clock in rats. *Physiol. Behav.* 30(2):259-265.
- Morrison J.H., R. Benoit, P.J. Magistretti and F.E. Bloom, (1983). Immunohistochemical distribution of pro-somatostatin-related peptides in cerebral cortex. *Brain Res.* 262:344-351.
- Munch I.C., N.H. Markussen and N.A. Oritsland, (1993). Resting oxygen consumption in rats during food restriction, starvation and refeeding. *Acta Physiol. Scand.* 148:335-340.
- Parra G., L. García-Ruiz, M. Díaz, G. Corkidi y S. Díaz-Cintra, (1994). Malnutrición hipoproteica en la densidad de espinas de las células piramidales del cornu ammonis 3 (CA3). XXXVII Congreso Nacional de Ciencias Fisiológicas. Mérida, Yucatán México.
- Pearson, O.P., (1947). The rate of metabolism of some small mammals. *Ecology.* 28:127-145.
- Phillips L.S. and H.S. Young, (1976). Nutrition and somatomedin. I. Effect of fasting and refeeding on serum somatomedin activity and cartilage growth activity in rats. *Endocrinol.* 99:304-314.
- Pulido S., H. Pérez-Herrera, C. Torrero y M. Salas, (1982). Seguimiento a la fotoestimulación en ratas normales y desnutridas durante el periodo neonatal. XXV Congreso Nacional de Ciencias Fisiológicas. Guadalajara, Jal. México.
- Quirarte G.L., S.E. Cruz-Morales, M.A. Díaz del Guante, M. García y R.A. Prado-Alcala, (1993). Protective effect of under-reinforcement of passive avoidance against scopolamine-induced amnesia. *Brain Res. Bull.* 32:521-524.
- Rampone A.J. and M.E. Shirasu, (1964). Temperature changes in the rat in response to feeding. *Science* 144:317-319.

- Reid L.S. and F.W. Finger, (1955). The rat's adjustment to 23-hrs food deprivation cycles. *J. Comp. Physiol Psychol* 48:110-113.
- Richter C. P., (1922). A behavioristic study of the activity of the rat. *Comp. Psychol. Monographs* 1:1-5.
- Rivas-Arancibia S. and F. Vázquez-Pereyra, (1994). Hormonal modulation of extinction responses induced by sexual steroid hormones in rats. *Life Sci.* 54(21):363-367.
- Rosenzweig M. R. and E. L. Bennett, (1996). Psychobiology of plasticity: effects of training and experience on brain and behavior. *Behav. Brain Res.* 78:57-65.
- Sara V.R. and L. Lazarus, (1974). Prenatal action of growth hormone on brain and Behav. *Nature* 250:257-258.
- Sawchenko P.E., L.W. Swanson, J. Rivier and W.W. Vale, (1985). The distribution of growth-hormone-releasing factor (GRF) immunoreactivity in the central nervous system of the rat: an immunohistochemical study using antisera directed against rat hypothalamic GRF. *J Comp. Neurol.* 237:100-115.
- Schindler W.J., M.O. Hutchins, and E.J. Septimus, (1972). Growth hormone secretion and control in the mouse. *Endocrinol.* 91(2):483-490.
- Shiro M., J. Kamegai, H. Sugihara, O. Hasegawa and I. Wakabayashi, (1992). Systemic administration of recombinant human growth hormone induces expression of the c-fos gene in the hypothalamic arcuate and periventricular nuclei in hypophysectomized rats. *Endocrinol.* 131:247-253.
- Sinha Y.N., F.W. Selby, U.J. Lewis and W.P. Vanderlaan, (1972). Studies of GH secretion in mice by a homologous radioimmunoassay for mouse GH. *Endocrinol.* 91(3):784-792.
- Steffens A.B., A.J.W. Scheurink, D. Porte, and S.C. Wooda, (1988). Penetration of peripheral glucose and insulin into cerebrospinal fluid in rats. *Am. J. Physiol.* 255(24):R200-R204.

- Stupfel M., V. Gourlet, L. Court and V.H. Demaria Pesce, (1986). Starvation and respiratory rhythmic behavior in groups of light-dark synchronized sprague-dawley rats. *Physiol. Behav.* 38(2):265-274.
- Takano K., N. Hizuka, K. Kawai and K. Shizume, (1978). Effect of growth hormone and nutrition on the level of somatomedin a in the rat. *Acta Endocrinol.* 87:485-494.
- Tannenbaum G.S., J.B. Martin and E. Colle, (1976). Ultradian growth hormone rhythm i the rat: Effects of feeding, hyperglycemia, and insulin-induced hypoglycemia. *Endocrinol.* 99(3): 720-727.
- Tannenbaum G.S., O. Rorstad and P. Brazeau, (1979). Effects of prolonged food deprivation on the ultradian growth hormone rhythm and immunoreactive somatostatin tissue levels in the rat, *Endocrinol.* 104(6):1733-1738.
- Tellez-Villagra C., (1981). Mecanismos neurofisiológicos del aprendizaje: Modelo neural intracaudado, que probablemente actua como integrador de una respuesta condicionada. Tesis de Maestría en Ciencias Biomédicas (Fisiología). Facultad de Medicina UNAM.
- Uthene K., (1973). Human somatomedians. Purification and some studies on their biological actions. *Acta Endocrinol. Suppl. (Copenh).* 175: 1-35.
- Van Wyk J.J., L.E. Underwood, R.L. Hintz, D.R. Clemmons, S.J. Voina and R.P. Weaver, (1974). The somatomedins: a family of insulin-like hormones under growth hormone control. *Recent Prog. Horm. Res.* 30:259-318.
- Weindruch R.H., J. Kristie and A. Chercy, (1979). Influence of controlled dietary restriction on immunologic function and aging. *Fed. Proc. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 38:2007-2016.
- Westerterp K., (1977). How rats economize - energy loss in starvation. Zoological laboratory, University of Groningen, The Netherlands. Ed. New York Spriger-Verlang
- Zeisel S.H., (1986). Dietary influences on neurotransmission. *Adv. Pediatr.* 33:23-47.

Zhang L., (1992). Modelo del ritmo circadiano basado en la actividad eléctrica del núcleo supraquiasmático. Tesis de Doctorado en Ciencias Fisiológicas. Universidad Nacional Autónoma de México. Colegio de Ciencias y Humanidades. Unidad Académica de los ciclos profesionales y de posgrado.