



# Universidad Nacional Autónoma de México

FACULTAD DE CIENCIAS

EFFECTOS DE UNA DIETA BAJA EN PROTEINA EN EL NUCLEO  
RAFE DORSAL, ESTUDIO MORFOMETRICO MEDIANTE LA TECNICA  
DE GOLGI RAPIDO EN RATAS DE TRES EDADES

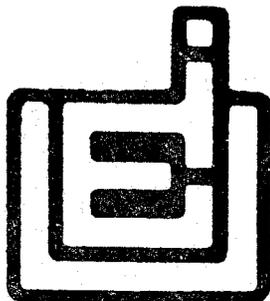
## Tesis Profesional

Que para obtener el título de

B I O L O G O

Presenta

OMAR MORALES ALVAREZ



México, D. F.

1985



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**

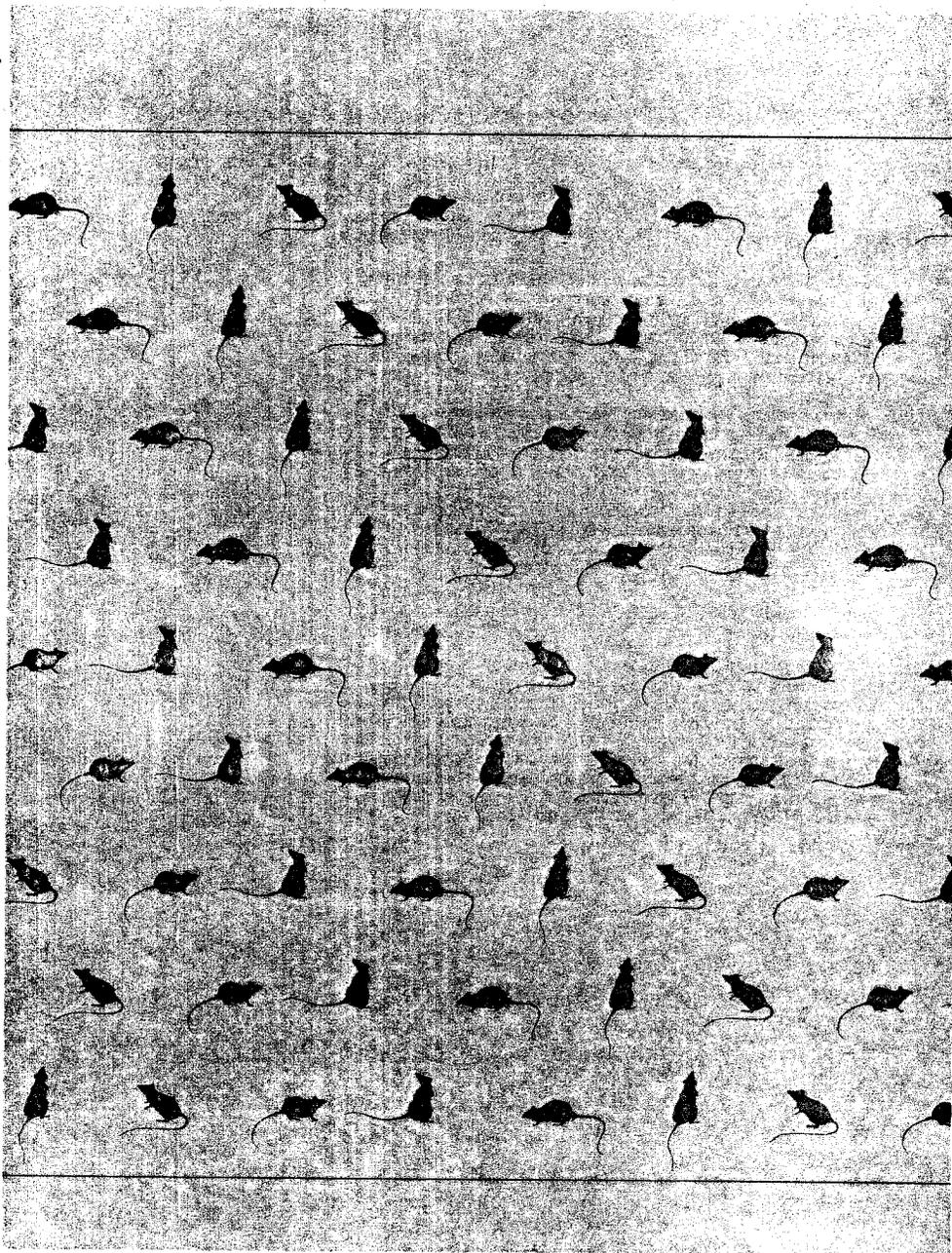


**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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



El presente trabajo se llevó  
a cabo en el laboratorio del  
Dr. León Cintra Mc Glone del  
departamento de fisiología--  
del Intituto de Investigaciones  
Biomédicas. U.N.A.M.

CON CARIÑO, RESPETO Y GRATITUD

A MIS

PADRES

Y

HERMANOS

CON AMOR Y PROFUNDA ADMIRACION

A MI ESPOSA

Y A MIS HIJOS

OMAR Y DEITE

## AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mi más sincero agradecimiento a las personas-  
que con su estímulo y apoyo incondicional, participaron di-  
recta ó indirectamente en la realización de la presente tesis:

Ricardo Pérez García  
Cuauhtemoc Aguirre Cerecero  
Marco Antonio Rios Mercado  
Magdalena López Torres  
Aurelio Cervantes Navarro  
Aracelí Cisneros García

Ma. de la Luz Miranda de Díaz  
Elena Díaz Miranda de Ruiz  
Maria de la Luz Miranda de Martinez  
Alejandro Martínez Arámburu  
Elena García Cruz

Yolis Laura Zendejas Paredes  
Patricia Cabrera Casillas  
Arturo Ayala García

Agradezco las facilidades otorgadas por el personal del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM para -- llevar a cabo este trabajo.

Agradezco al grupo del Dr. Peter J. Morgane de la-- Worcester Foudation for Experimental Biology, M.A. y al Dr. Thomas Kemper de Neurobiology of Boston City Hospital U.S.A. por sus valiosas sugerencias, críticas y material- proporcionado para la elaboración de la presente tesis.

A la Dra. Sofía Y. Díaz-Cintra por su entusiasmo, comprensión y acertada dirección.

Al Dr. León F. Cintra Mc Glone por sus consejos y adecuada asesoría.

# Contenido

---

Introducción	<u>1</u>
Objetivos	<u>9</u>
Material y Métodos	<u>10</u>
Resultados	<u>18</u>
Discusión	<u>32</u>
Conclusiones	<u>36</u>
Bibliografía	<u>38</u>



## R E S U M E N

En las últimas décadas se ha dado un gran interés a la investigación en el área de la nutrición, principalmente al aspecto de la deficiencia de nutrientes en la dieta y el efecto que produce en el organismo, con este fin se han trazado diferentes estrategias para su estudio y una de ellas considerada muy importante, conocer las alteraciones provocadas por la falta de proteína a nivel del sistema nervioso central dado su carácter integrador, de esta forma se pretende encontrar las relaciones anatómo-fisiológicas de las modificaciones más sutiles en las células nerviosas; los métodos para producir desnutrición pueden variar, pero el objetivo es el mismo, encontrar las relaciones entre causa y efecto, existen muchos otros grupos de investigación que trabajan en aspectos bioquímicos, fisiológicos y conductuales, con este panorama es probable en un futuro próximo establecer los perfiles nutricionales dentro de los cuales el sistema nervioso central alcanza su desarrollo más óptimo; pues se ha considerado que en determinadas fases del crecimiento, la falta de proteína provoca daños que son permanentes y, por consiguiente, posibles deficiencias intelectuales y conductuales en humanos.

Se sabe también que los animales desnutridos presentan elevación de las aminas biogénicas, principalmente la serotonina. En base a estos hallazgos, el objeto del presente trabajo, fue el estudio morfométrico mediante la técnica de Golgi rápido de las modificaciones neuronales ocurridas en las células del núcleo rafe dorsal, en animales desnutridos pre y posnatalmente con una dieta 6% de caseína en tres edades diferentes. Los resultados más sobresalientes, del estudio en general, fue observar que los animales desnutridos muestran una tendencia a reducir sus parámetros celulares, con excepción de la densidad de espinas dendríticas y somáticas, incrementadas en los tres tipos celulares que configuran al núcleo; este parámetro fue el más alterado a la edad de 220 días en las células multipolares presumiblemente productoras de serotonina, del presente estudio se puede concluir, en general, que las células del núcleo rafe dorsal en los animales desnutridos presentan un patrón de desarrollo diferente al de los animales

control, reflejado por el aumento en la densidad de espinas dendríticas, -  
pudiendo ser éste un mecanismo adaptativo del animal desnutrido como res-  
puesta a la deficiencia de nutrientes.

## INTRODUCCION

El estudio del sistema nervioso central, (SNC) es un campo de investigación tan antiguo como complejo, pero solo hasta finales del siglo XIX se le ha podido estudiar de manera sistemática y ello se debe al avance de nuevas técnicas de investigación y tecnología disponible. Durante las últimas décadas el estudio del SNC se ha enfocado desde los puntos de vista anatómico, bioquímico y fisiológico. Así, el SNC se le divide en: cerebro, cerebelo, tallo cerebral y médula espinal, estas estructuras se encuentran complejamente coordinadas y cada una de ellas están constituidas por regiones o zonas que contienen grupos neuronales específicos y no específicos para una determinada función.

En América Latina, Africa y Asia, viven millares de niños, con distensión abdominal, mejillas enrojecidas, piel áspera y manchada, pelo descolorido y sin brillo, estos síntomas se presentan por la falta de alimentación adecuada, a esta enfermedad se le llamo "Kwashiorkor" y va acompañada por lo general de pérdida de apetito, diarrea, el hígado aumenta mucho su tamaño, poco después caen en una apatía profunda y que se interrumpe sólo por ataques de irritabilidad, en su mayoría estos niños mueren. -- Otra enfermedad similar que se da por falta de proteína y calidad de la alimentación que se presenta muy comunmente, como una desnutrición crónica es la llamada "Marasmo", siendo una enfermedad muy grave y extendida en el mundo actual ya que es causa de un alarmante índice de mortalidad entre los niños de las sociedades preindustriales.

En las últimas décadas se ha dado interés a los efectos que la desnutrición causa en el organismo principalmente en el sistema nervioso central (SNC). Desde los estudios de Sugita (1918), se han realizado numerosas investigaciones sobre los efectos de la desnutrición durante el período del desarrollo cerebral en los roedores. Algunos investigadores han estudiado los efectos que causa la desnutrición en animales como la rata, durante la fase de lactancia en la cual suceden cambios en el desarrollo, maduración, migración y diferenciación, de los elementos neuronales, a este período se le ha denominado "período crítico" por Dobbins y Sands (1971),

dadó que durante esta fase el efecto de la desnutrición suele ser más severa, tal como lo indican los estudios sobre la cantidad de DNA (índice del número de células que contiene el cerebro), lo que permite observar, el crecimiento de las estructuras cerebrales, las que a su vez están limitadas en todos sus casos, en los animales desnutridos, según Fish y Winick - (1969). Esto concuerda con los estudios de Castilla y Cravioto (1979), -- quienes trabajando con niños desnutridos, encontraron en determinaciones del DNA, RNA y proteínas, que las diferencias más marcadas corresponden a las deficiencia del DNA en un 50% o más, en niños con bajo peso al nacer, los que además manifestaron tener desnutrición grave durante la época de -- lactancia; la respuesta que se obtiene durante este período es que en la madre hay reducción en la cantidad de leche disponible para las crías, lo que puede causar su desnutrición y por ende, daños perdurables a largo plazo, en este sentido es de esperar que los alcances que puede tener la desnutrición involucre al nivel de maduración del SNC (Winick y Noble, 1966; Patel 1983).

La desnutrición tiene un efecto dramático en el desarrollo dendrítico de las células del cerebro, pero se ha observado que cuando existe desnutrición prenatal y si al nacimiento se proporciona una rehabilitación nutricional, muchas de las deficiencias son corregidas (Hammer y Marthens, 1981).

Katz y Davies (1982, 1983), observaron que tanto la desnutrición como la deprivación ambiental producen reducciones en las dimensiones de las estructuras cerebrales, Patel (1983), mostró que la combinación de ambos insultos producen los efectos más dramáticos tanto anatómicos como bioquímicos (Castilla y cols., 1979). Por otra parte, estos mismos estudios sugie



ren que la estimulación ambiental es capaz de contrarestar estos efectos. En este sentido Mohan y Narashinga (1983), estudiando la adaptación al -- crecimiento de las ratas sometidas a desnutrición encontraron que dicha re lación en los animales desnutridos, fué proporcional a la restricción de - energía en la ingesta y que además provoca una reducción en el metabolis- mo basal. La desnutrición y sus características exactas en el humano va- rían de situación a situación y la forma en que se presenta, es caracteri zada por su naturaleza crónica, y la ausencia de una cantidad adecuada - de proteína, así como la calidad de ésta en la dieta es lo que determina su efecto sobre el organismo.

Utilizando un modelo de desnutrición pre y posnatal, en donde se desnutre a la madre cinco semanas previas al apareamiento, así como la composición de la dieta que es baja en proteína y alta en carbohidratos y grasas, indudablemente constituyen un considerable estres metabólico en comparación con la dieta comercial para ratas, el período de prealimentación permite a las hembras sistemáticamente establecer un equilibrio metabólico antes de la preñez, Morgane y cols., (1978), Resnick y cols., (1982), han apli- cado este modelo en ratas provocando la desnutrición pre y posnatal, y en contraron en los animales desnutridos con 8% de caseína, que los cambios producidos en el SNC de la rata se manifestaron como una elevación de las aminas biogénicas en todo el cerebro, y durante toda la vida del animal, así como la elevación del aminoácido triptófano, precursor de la formación de la serotonina.

Dias-Cintra y Col., (1981), estudiando los efectos de la desnutrición pro teínica con dieta 8% de caseína pre y posnatalmente, mostraron cambios - en el núcleo rafe dorsal (NRD) en sus tres tipos celulares descritos. - De los parámetros medidos en cada una de las células, como las espinas - dendríticas en las ratas control, presentaron un incremento significativo entre los 30 y 90 días de edad y un decremento entre los 90 y los 220 -- 220 días Dyson y Jones (1976), han reportado que la restricción de la die ta durante la gestación y la vida posnatal temprana tiene efectos sobre la densidad de las sinapsis y sus contactos, siendo estos específicos pa ra cada tipo celular.



## Cambios Metabólicos por efecto de la Desnutrición

Philbrick y Hill (1974), han mostrado que el efecto de una dieta con 5% de proteína, suplementada con L-metionina se elevó el contenido de Glucógeno del hígado durante varias semanas y regresando a los niveles normales a la 5a. semana, por otra parte encontraron también que en el nivel de albúmina plasmática fué normal durante tres semanas, después de este lapso, el nivel empezó a declinar, esto refleja que se dispone de proteínas de reserva de los cuales el organismo puede obtener durante 40 días después de la restricción de proteína según Allison y Wannemacher (1965).

Otro factor que puede contribuir al retraso del desarrollo de hipoalbuminemia, puede ser el desgaste de tejido corporal asociado a la restricción de la dieta (Coward, Whitnea y Lunn 1977), además la falta adecuada de proteína en la dieta dá como resultado un aumento en la absorción intestinal de aminoácidos y puede tomarse a lo largo de 4 semanas de desarrollo (Wapnir y Lifshitz 1974).

Esto se puede considerar un período de tiempo suficiente para el ajuste metabólico a la dieta de baja proteína, el método propuesto en este trabajo permite que se alcance un estado de equilibrio al instalar las dietas y aún en este modelo permite semejar las condiciones de desnutrición que se presentan en forma crónica en el hombre (Resnick y Col., 1982):

El efecto de estos procedimientos nutricionales en el estatus metabólico de la madre resulta secundario pero para considerar el efecto en el feto y en lactantes varios investigadores han postulado que el feto sobrevive a los estragos de la desnutrición en virtud de su acceso preferencial a las reservas disponibles de proteína a expensas de los requerimientos de la madre. Por lo tanto Rosso (1975) reportó que la dieta de restricción proteica aguda resulta en una disminución en la transferencia de aminácidos de la sangre materna al feto esto puede servir para explicar algunos de los efectos bioquímicos que han encontrado Morgane, P.J. y Col.(1978) en las crías recién nacidas de ratas desnutridas.



Durante la fase de lactancia Mueller y Cox (1946) reportaron que el contenido de proteína en la leche materna de rata fue afectado por cambios en el porcentaje de proteína de la dieta, variando los niveles de proteína de 4 a 50%, resultados similares fueron encontrados en vacas, Perkins (1932) y en humanos, Lindblad y Col. (1947) así la cantidad total de leche disponible en las madres para amamantar a sus crías tubo un decremento significativo; por este motivo la cantidad total de proteínas presente en la leche para las crías de madres desnutridas es baja tal como en el modelo del presente trabajo.

Como podemos observar la desnutrición en el desarrollo de la rata causa daños característicos al sistema neuronal, tanto en su número celular - (Cuantificación de DNA) como en la composición (tipos celulares), las manifestaciones del desarrollo estructural y bioquímico cerebral son retrazadas por la desnutrición, esto es relevante sin duda dadas las posibles alteraciones en los patrones normales de coordinación de sistemas de transmisión que causa a los procesos morfológicos reflejándose en posibles distorsiones causadas a la función cerebral.

Uno de los aspectos más importantes para comprender la organización y - función de la formación reticular (FR) incluida en el tallo cerebral, - ha ocupado la atención de los investigadores en este campo, durante los últimos 30 años, en particular del estudio del sistema monoaminérgico, este sistema de neuronas no solamente se le ha clasificado en base a un criterio convencional de su morfología neuronal, organización nuclear y conexiones, sino también a partir de los neurotransmisores que son producidos por las neuronas del sistema. En el cerebro de diferentes mamíferos se han identificado 4 tipos de neuronas monoaminérgicas por su -- fluorescencia de colores característicos; células productoras de dopamina, noradrenalina, GABA y serotonina, las neuronas de este sistema se localizan virtualmente en el tallo cerebral, de la rata y otros mamíferos, para la identificación de estas células los estudios clásicos de - Dahlstrom y Fuxe quienes en 1964, desarrollaron una modificación a la - técnica de histofluorescencia con resultados de alta sensibilidad específica, está técnica la utilizan para revelar la localización de grupos -



específicos aminérgicos del tallo cerebral y mesencéfalo.

Los estudios de Andén y Col. en 1966 confirmaron los hallazgos de Dahlstrom y Fuxe, identificaron proyecciones eferentes del núcleo Rafe Dorsal (NRD) hacia el núcleo Locus Coeruleus (MLC) lo cual nos da una idea de la gran variedad de relaciones neurofisiológicas que pueden tener estos núcleos antagónicos puesto que se ha demostrado que el NRD es productor de serotonina (Azmitia, E.C., 1978).

Danner y Pfister en 1980 estudiaron el NRD con la técnica de Golgi rápido con el propósito de encontrar alguna característica opticoluminosa de las neuronas de esta área cerebral y diferenciaron 3 tipos que son: neuronas tipo I o poligonales con espinas somáticas, las cuales pueden ser equivalentes morfológicos de las neuronas productoras de 5HT esto ha sido corroborado por otros autores implementando diferentes técnicas de autoradiografía y de microscopia electrónica (Dyson y Jones 1976, Felten y Harrigan 1980, Descarries y Col. 1979, Klein, A.W. 1983), por métodos de Histofluorescencia (Dahlstrom y Fuxe 1964, Felten y Harrigan 1980) y por inmunohistoquímica (Tekeuchi y Col. 1983).

Las neuronas del tipo II o fusioformes y células del tipo III o piriformes que fueron identificadas como posibles interneuronas a este respecto Steinbusch y Col. (1981) llevaron a cabo un estudio del NRD y sus proyecciones combinando técnicas inmunohistoquímicas y de transporte retrógrado mostrando que la citoarquitectura del NRD se encuentra formada por células que reaccionan a pruebas de serotonina inmunoreactiva con fluorescencia positiva, y Serotonina inmunoreactiva con fluorescencia negativa, células inmunoreactivas a noradrenalina situada en los bordes del núcleo y células que sólo reaccionan a la fluorescencia negativa, este mapeo nos indica que existen 4 subregiones celulares dentro del NRD además menciona que otros autores han encontrado células productoras de neurotransmisores en el núcleo, tales como Dopamina, Noradrenalina, GABA y encefalinas, con esto el NRD de la rata parece ser estructuralmente más complejo de lo que se había supuesto (Felten y Cummins 1979) así, su participación en las diferentes funciones cerebrales que son facilitadas, reguladas ó en las que intervienen, las neuronas del Rafe, no son una respuesta exclusiva a la actividad de la serotonina.



## Organización y Citoarquitectura del Sistema del Rafe.

Por los estudios citoarquitectónicos en el gato por Taber y Col. (1961) se define a este complejo del rafe formado por 8 núcleos distribuidos en forma caudo-rostral de la siguiente manera:

Núcleo rafe obscurus (NRO), Núcleo rafe Pallidus (NRP), Núcleo rafe Magnus (NRM), Núcleo rafe Pontis (NRPO), Núcleo central superior o medial (NRCS), Núcleo rafe dorsal (NRD), Núcleo linearis caudalis (NLS), Núcleo linearis intermedio (NLI).

Los estudios de Dahlstrom y Fuxe (1964) definieron la presencia de neuronas, este complejo rafe y las definieron como el grupo B1 al B9, así para el NRP como B1, NRO como grupo B2, NRM como B3, NRPO como grupo B5, NRD como B6 y B7, NRCS como B8 y B9. Los núcleos linear caudal e intermedio son considerados catecolaminérgicos y corresponden al grupo A10. Por métodos inmunoquímicos usando anticuerpos y antagonistas, Takeuchi y Col., (1983), han descrito la distribución de las neuronas serotoninérgicas en el tallo cerebral de la rata y del gato.

Por estudios recientes, de Descarries y Col., (1979), se sabe que más o menos la mitad de la población celular del NRD no posee serotonina, y -- estas células se encuentran en las mismas regiones en donde se localizan las serotoninérgicas.

### Patrones de proyección del NRD:

Cinco sistemas de fibras del NRD se han descrito 1) patrón dorsal ascendente paleoestriatal; 2) patrón ascendente medial; 3) sistema ventral ascendente o mesolímbico; 4) proyección descendente hacia LC; 5) patrón -- bulbo espinal descendente.

Las proyecciones del complejo del rafe se han identificado con histofluorescencia por Felten y Cummins (1979) y Azmitia (1978), y sus conexiones serotoninérgicas se les ha involucrado en numerosas funciones entre las que se encuentran; el ciclo sueño-vigilia, la actividad motora, la supresión del dolor agresividad, actividad sexual, funciones endócrinas entre otras.

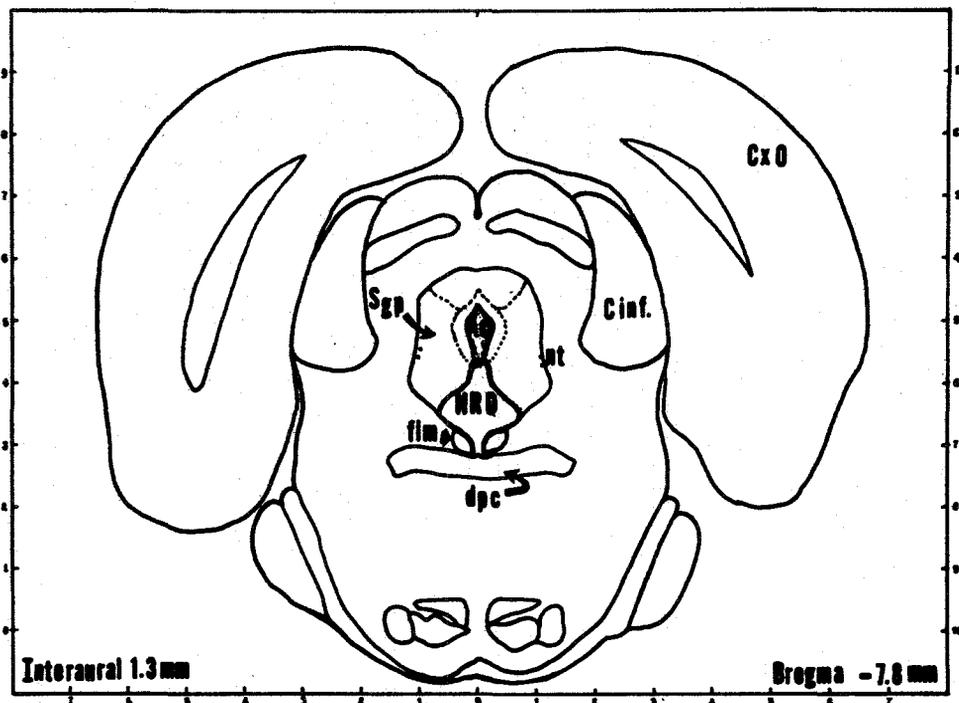


Fig. 1A.- Localización de NRD en las coordenadas estereotáxicas en donde se efectuaron las mediciones, abreviaciones: DPC, Decusación del pedúnculo cerebeloso; FLM, fascículo longitudinal medial; NT núcleo trigemino; SGP substancia gris periventricular; CINFL, colículos inferiores; CXO, corteza occipital; AC, Acueducto

## Localización del Núcleo Rafe Dorsal (NRD)

El NRD es el más grande de los núcleos del complejo del rafe. Se encuentra localizado en la parte dorsal del Tegmentum pontino y en la parte caudal del tegmentum mesencefálico. Se extiende desde el nivel anterior --- 1,400 al posterior 2,000 según el atlas de Steinbusch, H.W.M. (1982), y - según el atlas de Paxions y Watson (1982) en la línea interaural 2.2mm a 0.8mm anterior y Bregma a 6.8mm. El núcleo se sitúa dorsal al FLM y ventral al cuarto ventrículo y al acueducto cerebral. Anteriormente se encuentra bordeado por el núcleo de Edding Westphal, y caudalmente se extiende hacia el nivel del polo rostral del núcleo tegmental dorsal de G~~u~~dden. La porción dorsal del núcleo se extiende en abanico lateralmente dentro - de la GP al nivel del núcleo troclear, y un grupo ventromedial, uno dorso medial y dos alas bilaterales de células.

La otra parte del núcleo es un conjunto de células situadas cerca del plano medial. En varios planos, sus bordes son distintivos y en otros las - células forman masas que se confunden con otros grupos de células, esto - sucede en el borde del branquium conjuntivum y en los bordes dorsales de las alas laterales, y en la porción dorsal en donde alcanza a la substancia gris.

Con el objeto de establecer las bases que permitan comprender las implicaciones funcionales de los efectos producidos por la desnutrición principal mente proteínica en la fase posnatal del desarrollo cerebral en las ratas, se han estudiado algunos de los efectos anatómicos, algunos de ellos aparentemente irreversibles que han constituido uno de los mayores problemas para evaluar las alteraciones de los mecanismos funcionales del cerebro.

### OBJETIVOS.

El presente trabajo constituye un intento para contribuir a esclarecer los efectos de la desnutrición en el SNC. Dentro de este contexto los objetivos son:

1. Establecer el patrón morfométrico normal en las neuronas del NRD en organismos con dieta de 25% de caseína.
2. Comparación del patrón morfométrico de los organismos desnutridos con una dieta del 6% caseína.
3. Interpretar los efectos causados y de ser posible establecer los correlatos anatómo-funcionales en animales desnutridos y normales, y en consecuencia comprender la regulación del sistema serotoninérgico en funciones el ciclo sueño-vigilia, entre otros.
4. Continuar sustentando la hipótesis de que si existe deficiencia proteínica, entonces habrá modificaciones importantes en el SNC.

#### MATERIAL Y METODOS

Los procedimientos utilizados para la alimentación y la crianza de animales, que son privados experimentalmente de proteína, con el fin de provocar una desnutrición crónica, se han desarrollado como un intento de simular las condiciones alimenticias que prevalecen en las poblaciones humanas.

El uso de estos métodos para implementar la desnutrición, al suministrar las dietas a las ratas reviste 4 aspectos importantes que cabe señalar:

1. La dieta baja en proteína implantada (6% de caseína) se suministra dentro de un período previo al apareamiento de los progenitores.
2. La deficiencia en calorías por falta de proteína se ha compensado con carbohidratos.
3. La dieta control (25% de caseína) y la experimental (6% de caseína) tienen un alto contenido en grasas.
4. La administración de la dieta se inicia cinco semanas previas al apareamiento y se mantienen durante: gestación, lactancia y vida de cada sujeto experimental.

✓

TABLA 1

COMPOSICION Y PORCENTAJE NUTRICIONAL DE LAS DIETAS

<u>COMPONENTE</u>	<u>DIETA 25% CASEINA</u>	<u>DIETA 6% CASEINA</u>	<u>DIETA COMERCIAL</u>
PROTEINA	21.8	5.3	26.3
GRASA	15.4	15.0	7.1
CARBOHIDRATO	50.9	68.9	42.9
SALES	4.7	4.0**	3.5
VITAMINAS	1.0	1.0	0.3
AGUA	2.2	1.2	9.6
COMPONENTE NO NUTRITIVO (FIBRA)	4.2	4.2	10.3
KCAL/g	4.3	4.3	3.0

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

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



Las dietas utilizadas varian en el porcentaje de protefina y su composici3n, como se describe en detalle en la tabla 1. Las caracterfsticas m1s sobresalientes de la composici3n de las dietas experimentales son:

1. Isocal3ricas
2. Tienen alto contenido en grasas
3. La casefina se utiliza como fuente de protefina en las dos dietas.
4. Estan suplementadas con L-metionina debido a que la casefina es deficiente en amino1cidos sulfurados.
5. Tienen menor cantidad de agua que el producto comercial.
6. La dieta baja en protefina (6% de casefina) es marcada con -- colorante inerte, verde oscuro para diferenciarla de la - dieta control color amarillo.

Las dietas se obtuvieron del laboratorio proveedor en polvo y a pesar de que tienen poca cantidad de agua, el alto contenido en grasa insaturada -- (aceite de mafz) les da una consistencia blanda lo cual hace imposible la elaboraci3n de croquetas. Se administraron en cantidades suficientes en - las cajas de malla de alambre por medio de un surtidor.

T

El material biol3gico para el presente trabajo se obtuvo de ratas hembras virgenes de la variedad Sprague Dawley de los laboratorios Charles - River Co., las ratas hembras iniciales con un peso corporal de 175-200 grs. correspondiendo a la edad de 50 d1as, se distribuyeron 4 ratas por caja y -- fu3 libre su acceso al agua y a la dieta respectiva, cinco semanas previas al apareamiento, las cajas donde se colocaron, midieron 28 X 46 X 31 cm. y en la base se coloc3 una charola con una capa de aserrfın aproximadamente - de 3 a 5 cms., el cuarto de la colonia se mantuvo en 12 hrs. luz y 12 hrs. obscuridad a una temperatura de 22° C ± 3° C durante todo el tiempo. Los machos de 325-350 grs. de peso fueron alimentados con la dieta respectiva una semana previa al apareamiento y se dispuso 1 macho por 3 hembras en - cada caja durante 10 d1as permanecieron juntos y para determinar el d1a - de preñez se examinaron frotis vaginales diariamente para detectar espermatozoides, al d3cimo d1a los machos fueron separados y para el d1a vein-



tiuno después del apareamiento las hembras fueron puestas cada una en cajas de plástico de 23 X 46 X 21 cm. y se revisaron diariamente a las 12 hrs. durante los días siguientes hasta el momento de los nacimientos. El sexo se determinó por la distancia anal-uretral, tratando de que cada una de las poblaciones alimentadas con la dieta respectiva fueran más homogéneas, se escogieron los neonatos nacidos en el mismo día para cada dieta y en un recipiente se mezclaron cuidadosamente, luego al azar fueron seleccionados cuatro machos y cuatro hembras neonatos, de esta manera las camadas quedaron estandarizadas a 8 crías por hembra durante los cuatro días siguientes las crías no fueron perturbadas y en el transcurso del período de lactancia el aserrín de las cajas fué cambiado dos veces por semana así como las dosificaciones de agua y revisión de la cantidad de alimento para que en todo momento fueran suficientes, en los días previos al destete las crías tuvieron libre acceso a las dietas respectivas, con que fueron alimentadas las madres en la fase de gestación y lactancia.

La cual se administró a cada uno de los grupos de ratas durante el resto de su vida siguiendo con el paradigma propuesto por el Dr. Morgane, P.J. y Col. 1978, Resnick y Col. 1979 y estudios previos sobre efectos de la desnutrición en los núcleos Rafe Dorsal (NRD) y el locus coeruleus (NLC) Díaz-Cintra y Col., 1981, Cintra, L. y Col. 1982.

Al llegar el día 21 postnatal la madre fué separada de la camada y eliminada del estudio, después los neonatos fueron separados, las hembras de los machos para evitar la cruce de esta forma, una vez que los machos alcanzaron la edad requerida (30, 90 y 220 días) fueron preparados para la obtención de cortes histológicos cerebrales como sigue:

Para anestesiar a las ratas jóvenes de 30 días se les administró un dosis de hidrato de cloral a razón de 350 mg/kg de peso con una concentración de 30 mg/ml para los animales de 90 y 220 días una dosis de pentobarbital sódico de 55 mg/kg de peso la inyección se efectuó intraperitoneal según Morest y Morest (1966), una vez anestesiados los animales fueron preparados para la perfusión del cerebro por vía intracardiaca se dispone de dos botellas de 5 litros cada una y una de ellas se llena con formalina 10% -



amortiguada a PH 7.2 preparada de la manera siguiente:

Formalina 37% _____	100 ml
Fosfato de sodio monobásico _____	4 gr
Fosfato de sodio dibásicoanhidro _____	6.5 gr
Agua bidestilada _____	900 ml

La otra botella contiene solución salina

Cloruro de sodio _____	127.5 gr
Agua bidestilada _____	15 lt

Las dos botellas estan conectadas con una llave de entrada doble y salida única a ésta, se conecta un sistema de venclisis "Veno pack" y se ajusta el goteo a 170 gotas por minuto. Se procedió entonces a montar al animal en la tabla de disección y se efectuó una incisión en la zona ventral en la línea media por debajo del cartilago xifoides, se cortó el externón y se posicionan las pinzas retractoras para separar y exponer el corazón el cual se tomó del ápice con pinzas hemostáticas para hacer la perfusión, - la aguja de la venoclisis se introdujo en el ventriculo izquierdo, se hizo pasar la solución salina para lavar y al momento se cortó la aurícula derecha para drenar, se dejó aproximadamente de 1 a 3 minutos, luego se hizo pasar la solución de formalina al 10% para fijar el tejido cerebral por espacio de 5 a 10 minutos hasta que en las extremidades, la lengua, la nariz y las orejas del animal tomaron un color blanco, después se decapitó al animal y la cabeza se colocó en un frasco con solución de formalina amortiguada y se dejó por espacio de 24 hrs. Transcurrido este tiempo el cerebro se removió por medio de una craneotomía, entonces se seleccionó la zona del tallo cerebral para el estudio obteniéndose pequeños bloques de tejido nervioso cuyo tamaño no excedió de 4 mm. por lado, enseguida se procedió a tratar los bloques con la técnica de golgi rápido modificada por Díaz-Cintra, S., y Col., (1981) como sigue:



Los bloques obtenidos se pasaron a una solución de Dicromato de Potasio al 4.5% en solución buffer PH 7 por espacio de 5 hrs. aproximadamente (por fijación) después los bloques fueron transferidos a una solución (que se preparó al momento de usar) que contiene 1 parte de ácido ósmico al 1% por 4 partes de dicromato de potasio al 4.5% en esta solución los bloques permanecieron de 6 a 12 días, después se procedió a la diferenciación con nitrato de plata al 0.75% por una hora, se efectuó un cambio de la misma solución y se dejaron por un espacio de 18 a 24 horas después de este tiempo - los bloques teñidos y diferenciados se lavaron con agua destilada y con un pincel fino se limpió el exceso de cristales que se formaron en las superficies de los bloques una vez efectuado lo anterior se procedió a la deshidratación con alcoholes etílicos graduados (50%, 70%, 80% y 95%) se hicieron dos cambios cada 30 minutos en cada alcohol, prosiguiendo con dos cambios de alcohol etílico absoluto de 1 hora cada uno, al término de la deshidratación se procedió a la inclusión en nitrocelulosa de baja viscosidad (la nitrocelulosa en escamas se disolvió según el porcentaje requerido en una solución 50:50% de éter anhidro y etanol absoluto) como sigue: cada -- bloque fue puesto e- nitrocelulosa al 1% durante 24 horas, transcurrido este tiempo el bloque se retiró y se pasó a otra concentración y así sucesivamente 5%, 7% y 12% permaneciendo 24 horas en cada solución finalmente en una concentración de 30% se dejó por un tiempo de 48 horas, una vez que -- los bloques están embebidos en nitrocelulosa, se colocaron en pequeños moldes de plástico de 8 X 12 mm. y puestos en un desecador conectado al vacío con el fin de extraer el aire contenido en el tejido y la nitrocelulosa, - al terminar esta operación los moldes son puestos en otro desecador que -- contiene cloroformo puro, en estos vapores se dejaron durante 12 horas para su endurecimiento, después de separados los moldes y la nitrocelulosa - con el tejido incluido se procedió a cortar en el microtomo de deslizamiento marca Leitz para obtener los cortes frontales del tallo cerebral donde se localiza el NRD, se efectuaron cortes entre 100 a 160 micras de grosor para contener a las neuronas completas ya que estas miden más de 100 micras, las preparaciones fueron observadas con un microscopio de luz marca Zeiss usando porta objetos y cubreobjetos de óptima densidad así como un montaje que ayuda a tener una mejor resolución del microscopio a pesar de lo grueso del tejido se utilizó un objetivo planapocromático de inmersión



40 X, los cortes se encontraron dentro del límite de observación ya que el microscopio permite como máximo hasta cortes de 200 micras de grosor (Cintra, L. y Col. 1982). La colecta de los cortes se efectuó en recipientes de plástico con 50 divisiones conteniendo alcohol etílico al 70% y siguiendo una correcta seriación, cada corte se deshidrató en alcoholes etílicos graduales 50%, 80% y 96% alcohol etílico absoluto isopropílico, por un espacio de 20 minutos en cada uno al término, se procedió al aclaramiento de los cortes en aceite de terpinol de 20 a 30 minutos, después se pasaron a xileno y se hicieron dos cambios de 5 minutos cada uno; finalmente los cortes seriados fueron montados con resina permount en porta objetos de 77 X 53 X 1.7 mm y cubreobjetos de 48 X 60 mm. una vez obtenidas las preparaciones estas fueron seleccionadas para el estudio cuantitativo.

Considerando los cortes que involucran el NRD; los límites de este núcleo y su área fueron delimitados de acuerdo a estudios previos (Felten, y -- Col. 1979 y Díaz Cintra y Col. 1981) así como los tipos celulares (Cintra, L. y Col. 1982) las mediciones de cada célula se efectuaron con el objetivo 40X usando retículas oculares micrométricas calibradas, la observación se llevó a cabo con iluminación Kheler y condensador de campo. Para el estudio se dispuso de 10 animales por edad (30, 90 y 220 días).

Por cada condición experimental (25% y 6% dieta de caseína) que hicieron un total de 60 animales, de los cuales se obtuvieron el siguiente número de células: 35 fusiones, 40 multipolares y 25 ovoides, es decir 100 células por edad y por condición experimental lo cual hizo un total de 600 neuronas para el estudio. Para cada neurona se determinaron los siguientes parámetros (1) eje mayor y menor del cuerpo celular, (2) número de espinas perisomáticas (3) número de dendritas primarias y secundarias (4) extensión lineal de la dendritas primarias y secundarias (5) diámetro de las dendritas primarias y secundarias en el punto medio de su extensión lineal (6) número de espinas dendríticas primarias y secundarias a lo largo de un segmento de 50 micras. Los 6,600 datos obtenidos de esta manera fueron procesados estadísticamente en una computadora PDP11 de sistema de disco interactivo de análisis bioestadístico (SIAB) y se aplicó la prueba paramétrica de "T" student para los parámetros 1, 4 y 5 y la prueba no paramétrica "U" de Mann Whitney para los parámetros 2, 3 y 6. La interpretación se ba



só en la determinación de la significancia estadística entre los dos grupos experimentales (25% y 6% de caseína) así como entre los diferentes grupos de edad 30, 90 y 220 días, los resultados se presentan en las tablas y gráficas que a continuación se analizan.



## RESULTADOS.

El NRD fué estudiado en ratas macho en tres edades (30, 90 y 220 días) un grupo normalmente nutrido con una dieta de 25% de caseína considerado con control y un grupo experimental desnutrido con una dieta isocalórica de 6% - de caseína.

Por estudios previos, se sabe que el NRD, está formado por tres tipos de células reticulares y que han sido clasificadas como fusiformes, multipolares y ovoide, cada tipo celular se estudió morfométricamente en 11 parámetros (eje mayor y menor, densidad de espinas somáticas, número de dendritas primarias y secundarias, extensión lineal de las dendritas primarias y secundarias, diámetro de las dendritas primarias y secundarias y número de espinas dendríticas primarias y secundarias). Los resultados obtenidos se muestran en las tablas I, II, III y IV y en las figuras 1-6 que ha continuación se describen.

Las células fusiformes, (tabla I), de los animales experimentales presentaron cambios significativos respecto a los controles solo en los siguientes parámetros: las espinas somáticas se incrementaron a los 220 días, el número de dendritas primarias presentaron una disminución a los 90 y 220 días. El grosor dendrítico, se encontró aumentado en las dendritas secundarias a los 30 días y disminuido a los 220 días, así como el de las dendritas secundarias a esta misma edad. En la extensión lineal las dendritas primarias, se decrementaron a los 220 días y las secundarias a los 30 días. El número de las espinas dendríticas mostró incrementos altamente significativos a los 220 días en las dendritas primarias y secundarias.

Las células multipolares (tabla II), del desnutrido mostraron un cambio significativo en el eje menor a los 90 y 220 días de edad. Las espinas somáticas, de las dendritas primarias se decrementaron significativamente, a los 90 días en tanto que a los 220 días se incrementaron. El número de dendritas secundarias en el desnutrido se observó incrementado a los 220 días de edad. El grosor dendrítico, de las dendritas primarias del desnutrido se decrementó significativamente a los 220 días, en tanto que las -



TABLA I

EFFECTO DE UNA DIETA BAJA EN PROTEINA 6% DE CASEINA EN LAS CELULAS FUSIFORMES DEL NUCLEO RAPE DORSALIS EN RATAS DE TRES EDADES (30, 90 y 220 dias).

NUMERO DE CELULAS	EJE MAYOR (MICRAS)	EJE MENOR (MICRAS)	ESPINAS SOMATICAS	NUMERO DE DENDRITAS		TOTAL DE DENDRITAS	DIAMETRO DE LAS DENDRITAS		EXTENSION LINEAR		NUMERO DE ESPINAS DENDRITICAS/SOMICRAS	
				P	S		P	S	P	S	P	S
<b>30 DIAS</b>												
CONTROL	25.89	14.04	4.11	2.74	3.0	70	1.99	1.58	288.26	177.05	8.69	7.53
35	+5.15	+2.83	+2.56	+0.61	+0.87		+0.37	+0.36	+89.18	+70.28	+4.89	+4.27
EXPERIMENTAL	24.44	13.75	4.80	2.71	3.43		2.17	1.57	273.91	148.20	9.01	8.07
35	+6.37	3.30	+3.40	+0.67	+1.38	70	+0.37	+0.41	+84.55	+59.29	+3.82	+4.98
CONTROL Vs EXPERIMENTAL												
% DE CAMBIO	-6 %	-2%	-17%	-1%	14%		+ 49%	-6%	-5%	-16%**	+4%	+7%
<b>90 DIAS</b>												
CONTROL	25.99	14.83	5.03	3.11	2.74	70	2.03	1.62	297.42	180.75	10.46	10.23
35	+5.53	+3.77	+4.40	+0.63	+0.98		+0.41	+0.38	+100.58	+81.04	+3.93	+3.91
EXPERIMENTAL	24.91	14.45	5.26	2.49	3.17	70	2.12	1.65	290.24	175.59	9.50	9.57
35	+3.94	+1.78	+7.06	+0.56	+1.12		+0.35	+0.37	+84.80	+49.62	3.32	+3.92
CONTROL VS EXPERIMENTAL												
% DE CAMBIO	-4%	-3%	+5%	-20%**	+16%*		+4%	+2%	-2%	-3%	-9%	-6%
<b>220 DIAS</b>												
CONTROL	24.16	14.08	2.77	3.48	3.20	70	2.49	1.49	337.63	164.42	7.83	6.76
35	+4.32	+2.92	+1.65	+0.78	+1.60		+0.48	+0.33	+ 87.03	+49.74	+1.61	2.34
EXPERIMENTAL	24.34	13.62	4.26	2.66	2.86	70	2.11	1.85	308.28	169.93	10.80	11.04
35	+4.66	+2.92	+2.09	+0.48	+0.91		+0.26	+0.21	+103.85	+57.44	+2.95	+3.24
CONTROL VS EXPERIMENTAL												
% DE CAMBIO	+7%	-3%	+54%**	-23%***	-11%		-14%***	+24%***	-9%*	- .3%	+38%***	-63%***

P=DENDRITAS PRIMARIAS S=DENDRITAS SECUNDARIAS LOS RESULTADOS SON  $\bar{X} \pm D.S.$   
 $P < 0.05^*$ ;  $P < 0.01^{**}$ ;  $P < 0.001^{***}$  PARA PRUEBAS DE "T" STUDENT Y "U" DE MANN WHITNEY

TABLA II

EFFECTO DE UNA DIETA BAJA EN PROTEINAS 6 % DE CASEINA EN LAS CELULAS MULTIPOLARES DEL NUCLEO RAFA DORSALIS EN RATAS DE TRES EDADES ( 30, 90 y 220 DIAS )

NUMERO DE CELULAS	EJE MAYOR (MICRAS)	EJE MENOR (MICRAS)	ESPINAS SOMATICAS	NUMERO DE DENDRITAS		TOTAL DE DENDRITAS	DIAMETRO DE DENDRITAS		EXTENSION LINEAR		NUMERO DE ESPINAS DENDRICAS /50 MICRAS	
				P	S		P	S	P	S	P	S
<u>30 DIAS</u>												
CONTROL	24.15	17.32	4.00	4.33	3.70	80	2.12	1.64	305.17	176.33	9.56	7.68
40	+5.29	+3.60	+3.01	+0.66	+1.22		+0.49	+0.36	+101.89	+ 68.56	+7.37	+3.79
EXPERIMENTAL	25.30	17.80	4.25	4.55	4.80	80	2.15	1.58	288.22	138.26	7.59	7.43
40	+6.54	+3.95	+2.90	+0.75	+1.49		+0.32	+0.44	+ 92.93	+ 55.41	+4.57	+5.17
CONTROL EXPERIMENTAL												
% DE CAMBIO	+ 5%	3%	+6%	+5%	+30%***		+ 1%	-1%	-6%	-23%***	-20%**	-2%
<u>90 DIAS</u>												
CONTROL	24.82	19.43	5.60	4.20	4.05	80	2.15	1.72	197.53	288.53	10.99	10.44
40	+5.85	+4.60	+3.26	+0.76	+1.50		+0.39	+ 0.37	+66.64	+67.94	+ 4.59	+ 4.29
EXPERIMENTAL	24.49	17.61	4.25	4.25	4.23	80	2.17	1.81	239.36	209.67	9.59	11.25
40	+4.45	3.19	+2.68	+0.49	+1.25		+0.26	+ 0.35	+79.96	+71.60	+ 4.27	+ 5.50
CONTROL VS EXPERIMENTAL												
% DE CAMBIO	-1%	-9%	-24%*	+1%	+4%		+ .9%	+5%	-1%	+11%*	-13%*	+ 8%
<u>220 DIAS</u>												
CONTROL	23.03	18.66	2.38	4.58	4.88	80	2.23	1.41	368.97	159.56	7.56	6.81
40	+4.79	+3.71	+1.84	+0.64	+1.09		+0.53	+0.38	+ 79.87	+ 46.12	+1.81	+2.14
EXPERIMENTAL	22.55	15.86	4.65	4.40	4.40	80	2.05	1.80	311.68	167.55	10.65	11.05
40	+3.42	+3.23	+2.32	+0.67	+1.03		+0.17	+0.26	+109.51	+ 49.16	+3.65	+3.77
CONTROL VS EXPERIMENTAL												
% DE CAMBIO -	-2%	-15%***	+95%***	-4%	-10%		-8%**	+28%***	-16%***	+ 5 %	+41%***	+62%***

P=DENDRITAS PRIMARIAS S-DENDRITAS SECUNDARIAS, LOS RESULTADOS SON  $\bar{x} \pm D.S.$   
 P<0.05\*; P<0.01\*\*, P<0.001\*\*\* PARA PRUEBAS DE "T" STUDENT Y "U" DE MANN WHITNEY

20

dendritas secundarias mostraron un incremento significativo. La extensión lineal, se decrementó significativamente, en la dendrita primaria a los -- 220 días y en las dendritas secundarias se decrementó significativamente a los 30 y luego, a los 90 se incrementaron. El último de los parámetros es tudiados, el número de espinas dendríticas de las ramas primarias en los - animales desnutridos se decrementaron significativamente a los 30 y 90 días y en los 220 el incremento fué en las dos ramas primarias y secundarias.

Las células ovoides (tabla III) de los animales desnutridos presentaron po cos cambios. El eje mayor y el menor se redujeron a los 90 días, y luego se incrementaron a los 220 días, en esta misma edad el número de espinas so máticas se incrementaron también. El número de ramas primarias se redujo, en los animales desnutridos a la edad de 220 días. El grosor dendrítico - se incrementó significativamente a los 220 días en la dendrita secundaria. El grosor dendrítico se incrementó significativamente a los 220 días en la dendrita secundaria. La extensión lineal, se redujo, en la dendrita prima ria a los 30 días y aumentó en la secundaria a los 220 días de edad. El - último parámetro medido, el número de espinas dendríticas, mostró, en gene ral, una reducción en el desnutrido a los 30 y 90 días en las dendritas -- primarias y secundarias con respecto a los controles, a la edad de 220 -- días ambas dendritas mostraron un incremento significativo.

La tabla IV muestra los porcentajes de aumentos y decrementos, relaciona- dos con el factor edad, de los 11 parámetros medidos en los tres tipos ce- lulares estudiados, los animales control, mostraron un incremento signifi- cativo en el eje menor de las células multipolares, entre 30 vs 90 días y las células ovoides mostraron un decremento significativo entre 90 y 220 - días, en ambos ejes, mayor y menor. Los animales desnutridos, presentaron un solo decremento en el eje menor entre 90 y 220 días de edad. Las espi- nas somáticas, en los animales control, se incrementaron entre 30 y 90 -- días y entre 90 y 220 días presentaron un decremento, en las células fusi- formes y multipolares y decrementos entre 30 y 90 días y en las células -- ovoides entre 90 y 220 días. Los animales desnutridos, mostraron cambios entre 90 y 220 días en las células fusiformes que fueron significativamen- te decrementadas y en las ovoides incrementadas. El número de dendritas - en los animales control se incremento significativamente en la dendrita -- primaria entre 30 y 90 días para las células fusiformes y entre 90 y 220 -



TABLA III

EFFECTO DE UNA DIETA BAJA EN PROTEINAS 6 % DE CASEINA EN LAS CELULAS OVOIDES DEL NUCLEO RAPE DORSALIS EN RATAS DE TRES EDADES ( 30, 0- y 220 DIAS)

NUMERO DE CELULAS	EJE MAYOR (MICRAS)	EJE MENOR (MICRAS)	ESPINAS SOMATICAS	NUMERO DE DENDRITAS		TOTAL DE DENDRITAS	DIAMETRO DE LAS DENDRITAS		EXTENSION LINEAR		NUMERO DE ESPINAS DENDRITICAS/50 MICRAS	
				P	S		P	S	P	S	P	S
<b>30 DIAS</b>												
CONTROL	19.95	16.86	3.92	2.84	3.16	50	2.04	1.60	291.94	169.75	10.04	9.04
25	+4.84	+4.23	+3.39	+0.47	+1.28		+0.44	+0.34	+90.45	+74.56	+4.99	+4.48
EXPERIMENTAL	18.72	15.89	3.28	2.72	3.40	50	2.10	1.54	243.88	153.79	8.86	6.60
25	+4.23	+3.62	+2.44	+0.46	+1.04		+0.40	+0.39	+86.74	+66.30	+4.43	+4.47
CONTROL VS EXPERIMENTAL												
% DE CAMBIO	-6%	-6%	-16%	-4%	+8%		+3%	-4%	-16%*	-9%	-12%	-27%***
<b>90 DIAS</b>												
CONTROL	21.01	18.36	3.24	2.60	3.12	50	2.00	1.59	308.26	174.95	10.22	9.82
25	+4.19	+4.32	+1.27	+0.65	+0.88		+0.26	+0.39	+112.18	+81.47	+3.77	+3.93
EXPERIMENTAL	18.76	16.44	3.12	2.68	3.40	50	2.07	1.68	290.53	170.71	8.48	8.68
25	+3.21	+3.06	+1.81	+0.69	+0.91		+0.25	+0.37	+ 97.50	+72.10	+4.13	+3.95
CONTROL VS EXPERIMENTAL												
% DE CAMBIO	-11%*	-10%*	-4%	+3%	+9%		+4%	+7%	-6%	-2%	-17%**	-12%
<b>220 DIAS</b>												
CONTROL	17.84	15.18	2.24	3.12	2.84	50	2.04	1.33	274.85	250.22	6.80	6.12
25	+2.91	+3.13	+1.90	+0.60	+0.85		+0.38	+0.37	+76.26	+54.50	+2.34	+2.00
EXPERIMENTAL	19.31	17.16	4.40	2.56	2.56	50	2.01	1.82	290.52	156.82	10.88	10.74
25	+2.81	+2.31	+1.66	+0.58	+0.58		+0.11	+0.14	+83.96	+47.54	+3.61	+3.03
CONTROL VS EXPERIMENTAL												
% DE CAMBIO	+8%*	+13%***	+96%***	-18%**	-10%		-1%	+37%***	+6%	+4%***	+60%***	+75%***

22

P=DENDRITAS PRIMARIAS S -DENDRITAS SECUNDARIAS, LOS RESULTADOS SON  $\bar{X} \pm$  D.S.

P<0.05\*; P<0.01\*\*; P<0.001\*\*\* PARA PRUEBAS DE "T" STUDENT Y "U" DE MANN WHITNEY

TABLA IV

PORCENTAJES DE CAMBIOS RELACIONADOS CON LA EDAD (30, 90 y 220 DÍAS) DE LOS II PARAMETROS MORFOMETRICOS EN LOS TRES TIPOS CELULARES DEL NUCLEO RAFA DORSAL DE RATAS TRATADAS CON DIETAS DE 6% DE CASEINA Y 25 % DE CASEINA

TIPOS DE CELULAS	EJE MAYOR (MICRAS)	EJE MENOR (MICRAS)	ESPINAS SOMATICAS	NUMERO DE DENDRITAS		DIAMETRO DE LAS DENDRITAS		EXTENSION LINEAR		NUMERO DE ESPINAS DENDRITICAS/50 MICRAS.		
				P	S	P	S	P	S	P	S	
FUSIFORMES												
CONTROL	+4%	+6%	+23%*	+14%**	-9%	-2%	+3%	+3%	+2%	+20%*	+36%**	
30 VS 90												
EXPERIMENTAL	+2%	+5%	+10%	-8%	-8%	-8%	-2%	+5%	+6%*	+5%	+10%	
CONTROL	-7%	+0.6%	-45%**	+12%**	+93%***	+23%***	-8%*	+14%*	-9%	-25%**	-34%**	
90 VS 220												
EXPERIMENTAL	-2%	-6%	-19%	+7%	-10%	-5%	+12%**	+6%	-7%	+14%*	+15%*	
MULTIPOLAR												
CONTROL	+3%	+12%*	+40%**	-3%	+9%	+1%	+5%	-3%	+7%	+15%*	+38%**	
30 VS 90												
EXPERIMENTAL	-3%	-1%	0%	-7%	-12%*	+9%	+15%*	+2%	+52%***	+23%*	+51%**	
CONTROL	-7%	-4%	-50%***	+9%*	+20%**	+4%	-18%***	+24%**	+15%**	-31%**	-35%**	
90 VS 220												
EXPERIMENTAL	-8%*	-10%*	+9%	+4%	+4%	-6%	-.6%	+6%	-20%**	+11%*	-2%*	
OVOIDES												
CONTROL	+5%	+9%	-17%*	-8%	-1%	-2%	-.6%	+6%	+3%	+2%	-6%	
30 VS 90												
EXPERIMENTAL	+2%	+3%	-5%	-2%	0%	-1%	+9%	+19%*	+11%*	+11%	+32%**	
CONTROL	-15%*	-17%*	-31%**	+20%*	-9%	+2%	-16%*	-11%*	-14%	-33%**	-28%**	
90 VS 220												
EXPERIMENTAL	+3%	+4%	+41%**	-5%	-25%*	-3%	-8%	0%	-8%	+11%	+24%*	

23 = DENDRITA PRIMARIA S= DENDRITA SECUNDARIA P<-.05\* P<0.01\*\* P<0.001\*\*\* PARA LAS PRUEBAS "T" STUDENT Y "U" DE MANN WHITNEY

días, el incremento se encontró en las dos dendritas, primaria y secundaria en las células multipolares, a estas mismas edades las células ovoides, mostraron aumentos significativos sólo en la dendrita primaria. Los animales desnutridos presentaron en sus células multipolares un decremento significativo del número de las dendritas secundarias entre los 90 y 90 días, y entre 90 y 220 días, las células ovoides mostraron este mismo decremento en ambas dendritas. El grosor dendrítico, de las células fusiformes, de los animales control, en la primaria, se encontró incrementado, en tanto que las dendritas presentaron decrementos, y un aumento en la dendrita secundaria entre 90 y 220 días de edad. Las células multipolares mostraron disminución del grosor dendrítico de las ramas secundarias entre 90 y 220 días de edad y los animales desnutridos disminución entre 30 y 90 días de las ramas primarias y secundarias. Las células ovoides en los controles, mostraron decrementos de la dendrita secundaria entre 90 y 220 días. La extensión lineal, en los animales control entre 90 y 220 días se encontró incrementada en la dendrita primaria, particularmente en las células fusiformes y multipolares, además estas últimas células presentaron un incremento de la dendrita secundaria. Los animales experimentales, mostraron entre los 90 y 220 días un incremento significativo de la dendrita secundaria en las células fusiformes, en tanto que las células multipolares mostraron incremento significativo de la dendrita secundaria entre 90 y 220 días de edad. Las células ovoides, presentaron incrementos de las dos ramas entre 30 y 90 días. En el último parámetro medido del número de espinas dendríticas, se observó que en los controles, sus ramas primarias y secundarias, se encontraron incrementadas entre 30 y 90 días en las células multipolares y fusiformes y disminuidas significativamente entre 90 y 220 días en los tres tipos celulares: Los animales experimentales por el contrario entre los 30 y 90 días mostraron incrementos en el número de espinas dendríticas en ambas ramas primarias y secundarias en las células multipolares y en la ovoides, entre 90 y 220 días hubo incrementos en las dos ramas primarias y secundarias en las células fusiformes, en las multipolares, solo las primarias y en las células ovoides sólo en las dendritas secundarias.



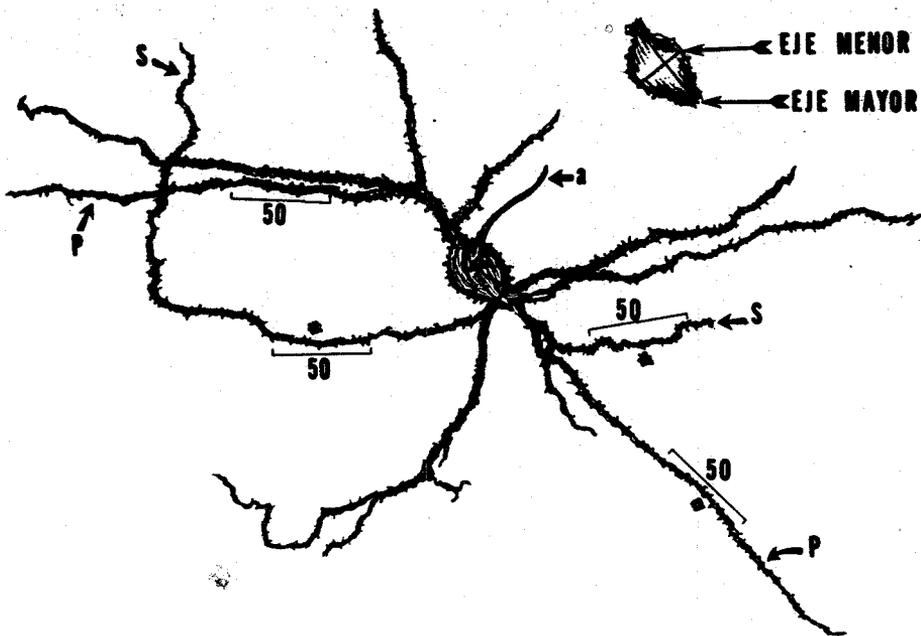


Fig. 2A.- Dibujo a Cámara lúcida de una célula multipolar del MRD. Mediciones: eje mayor y menor del soma. P, dendrita primaria en su máxima extensión, S, dendrita secundaria. Los paréntesis indican las 50 micras en donde se contó el número de espinas y los asteriscos muestran el sitio en donde se midió el diámetro del drítico. A, axón. Rata control a los 220 días de edad 400X.

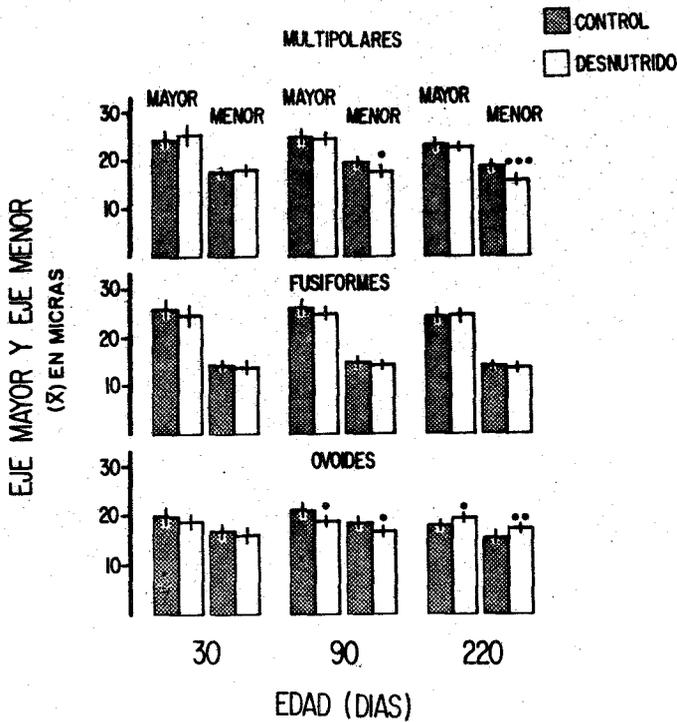
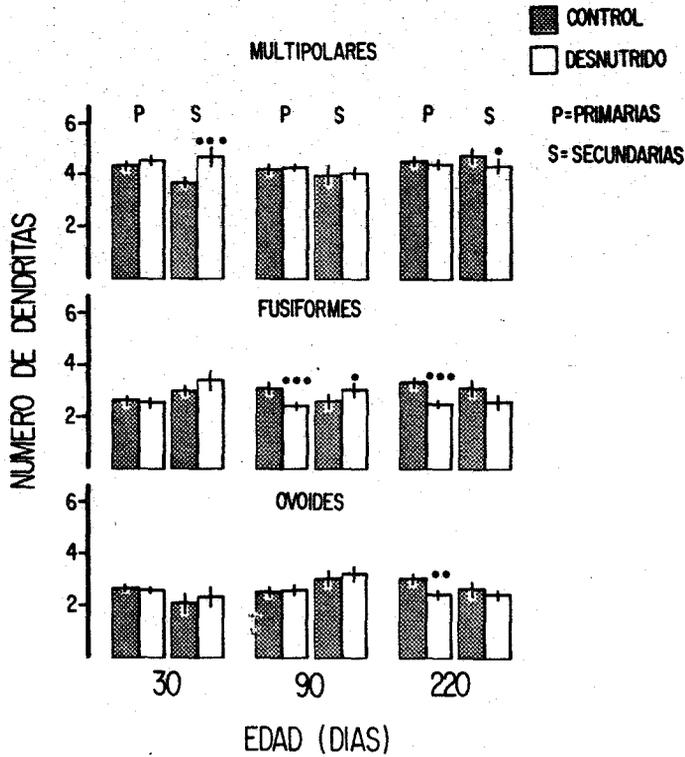


FIGURA 1. Efecto de la dieta. 25% de caseína (barra punteada) y de la dieta 6% de caseína (barra blanca) se aprecia una pequeña disminución en el eje de las células multipolares en los animales desnutridos a los 90 días de edad.

También en las células ovoides de animales desnutridos a los 90 días de edad, el punto más significativo se observa a los 220 días una disminución en el eje de las células multipolares y ovoides.

La células fusiformes no mostraron cambios en las 3 edades estudiadas los datos a la  $\bar{X} \pm$  el error estándar \*  $P < 0.05$ .



**FIGURA No. 2.** El efecto causado por la desnutrición con dieta isocalórica, 6% de caseína (barras blancas) en el número de dendritas a los 30, 90 y 220 días, se observa un decremento en el número de dendritas primarias en las células ovoides. La  $\bar{X} \pm$  el error estándar \*  $P < 0.05$ . \*\*  $P < 0.01$  \*\*\*  $P < 0.001$ .



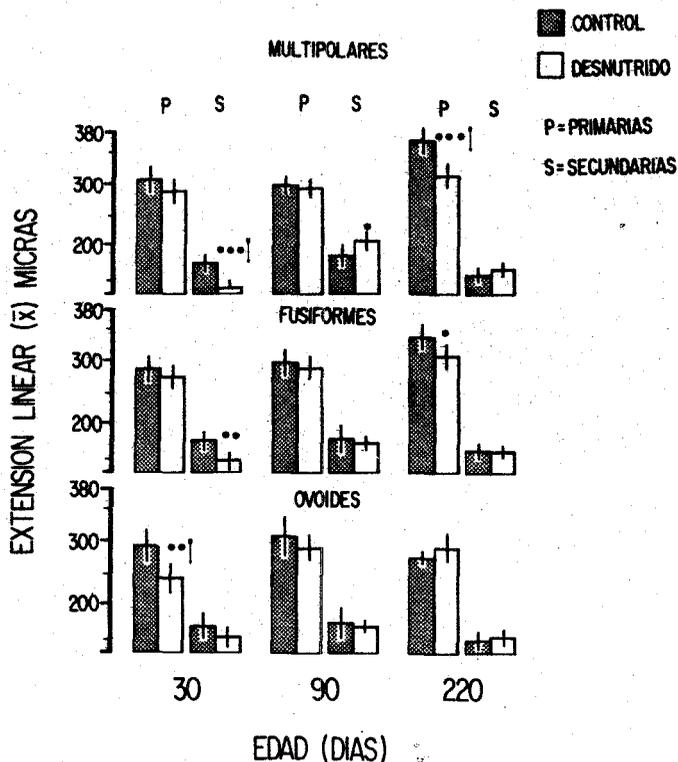


FIGURA No. 3. Efecto de la dieta implantada de 6% de caseína (barras blancas) en comparación a la control de 25% de caseína, en la extensión lineal como se ve a los 30 días en las células multipolares y fusiformes presentan un decremento significativo en sus dendritas secundarias, en las células ovoides a los 30 días hay un decremento, a los 220 días en las células multipolares se aprecia un decremento en la extensión lineal de las dendritas primarias.

$\bar{X} \pm$  error estandar \* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$  \*\*\* $P < 0.001$ .



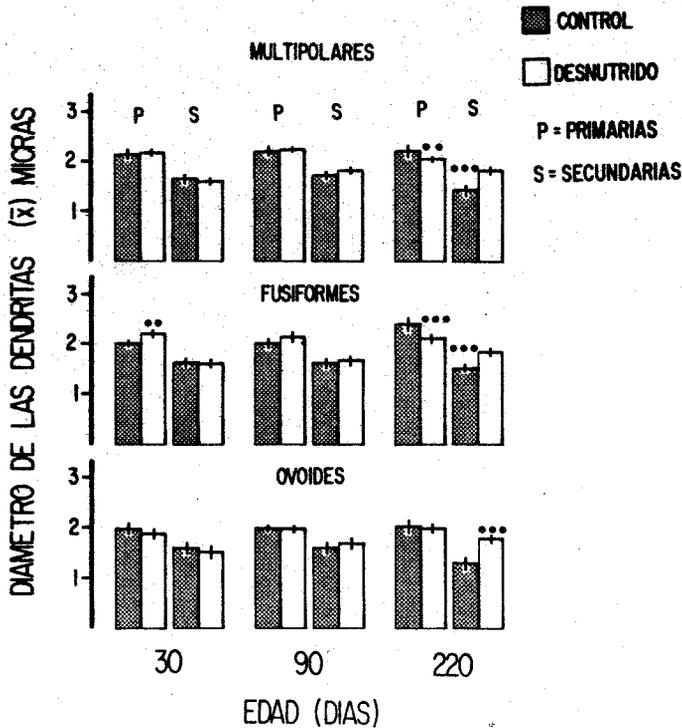


FIGURA No. 4. Efecto de la dieta baja en proteínas 6% de caseína (barras blancas) en comparación con la del control 25% de caseína (barras oscuras), las células multipolares y fusiformes muestran en el diámetro de las dendritas primarias un decremento y a los 220 días se observa un incremento en las ramas secundarias para los tres tipos celulares  $\bar{x} \pm$  error estándar \*\* $P < 0.01$  \*\*\* $P < 0.001$ .



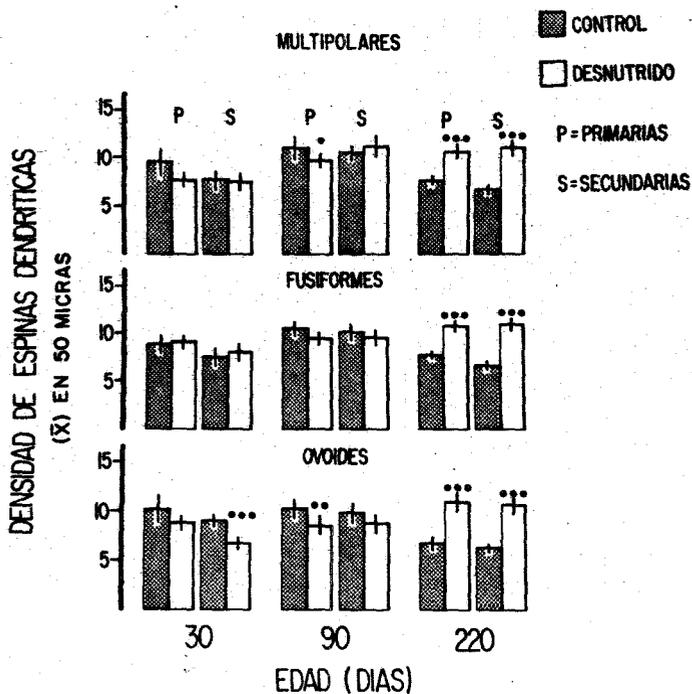


FIGURA No. 5 Incremento en la densidad de espinas dendríticas para los tres tipos . En la gráfica se observa el celulares a la edad de 220 días en respuesta al insulto de la dieta baja en calorías 6% de caseína (barras oscuras)  $\bar{X} \pm$  error estándar \*  $P < 0.05$  \*\*  $P < 0.01$  \*\*\*  $P < 0.001$ .



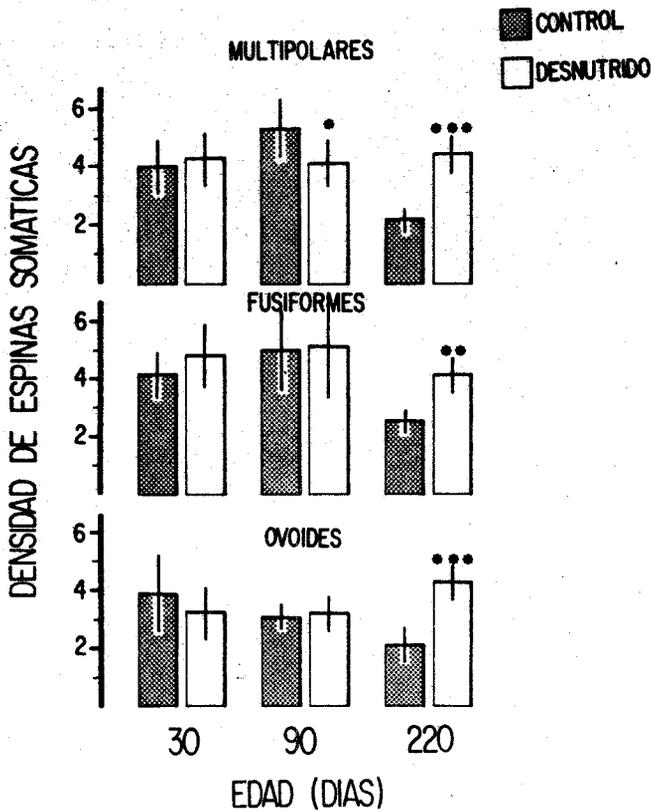


FIGURA No. 6. Efecto de la desnutrición al administrar la dieta baja en proteína 6% caseína (barras blancas) y dieta control 25% de caseína (barras oscuras) se describe claramente una tendencia a incrementar el número a los 220 días en los 3 tipos celulares  $\bar{x} \pm$  error estándar \*\*  $P < 0.01$  \*\*\*  $P < 0.001$



## DISCUSION

A la luz de los resultados, se puede interpretar que las células del núcleo rafe dorsal (NRD), siguen patrones heterogéneos en su desarrollo celular durante la vida del animal. El modelo experimental, utilizado en la presente tesis, en ratas control nutridas con 25% de caseína, y las ratas desnutridas pre y posnatales con dieta conteniendo 6% de caseína, nos permiten comparar, por un parte el patrón de desarrollo normal de las células del NRD de la rata a tres edades diferentes, y por otra parte comparar este patrón normal con aquel mostrado por los animales desnutridos, en las mismas edades. Los resultados se discuten en términos de la edad y el efecto de la desnutrición en cada uno de los tres tipos celulares del núcleo.

En el presente estudio hemos encontrado cambios en la estructura de las dendritas y en la densidad de las espinas dendríticas y somáticas que representarían la entrada sináptica de las células nerviosas.

La desnutrición pre y posnatal produce efectos a largo plazo en estructuras de reciente aparición filogenética como, cerebelo, corteza cerebral y particularmente en las células piramidales cuyo desarrollo diferenciación ocurre tempranamente (Leuba y Rabinowicz 1979 a, b.) así como también en estructuras filogenéticamente más antiguas que se sabe su maduración es prenatal, como es el caso del tallo cerebral, bulbo olfatorio e hipocampo, por otra parte sería necesario considerar en otro estudio si el efecto que se produce selectivamente en cada tipo de celular es susceptible de rehabilitación para recuperar el daño causado por este tipo de desnutrición, se han hecho otros estudios de las células no piramidales de la cor-



CONTROL  
DIETA 25% CASEINA

DESNUTRIDO  
DIETA 6% CASEINA

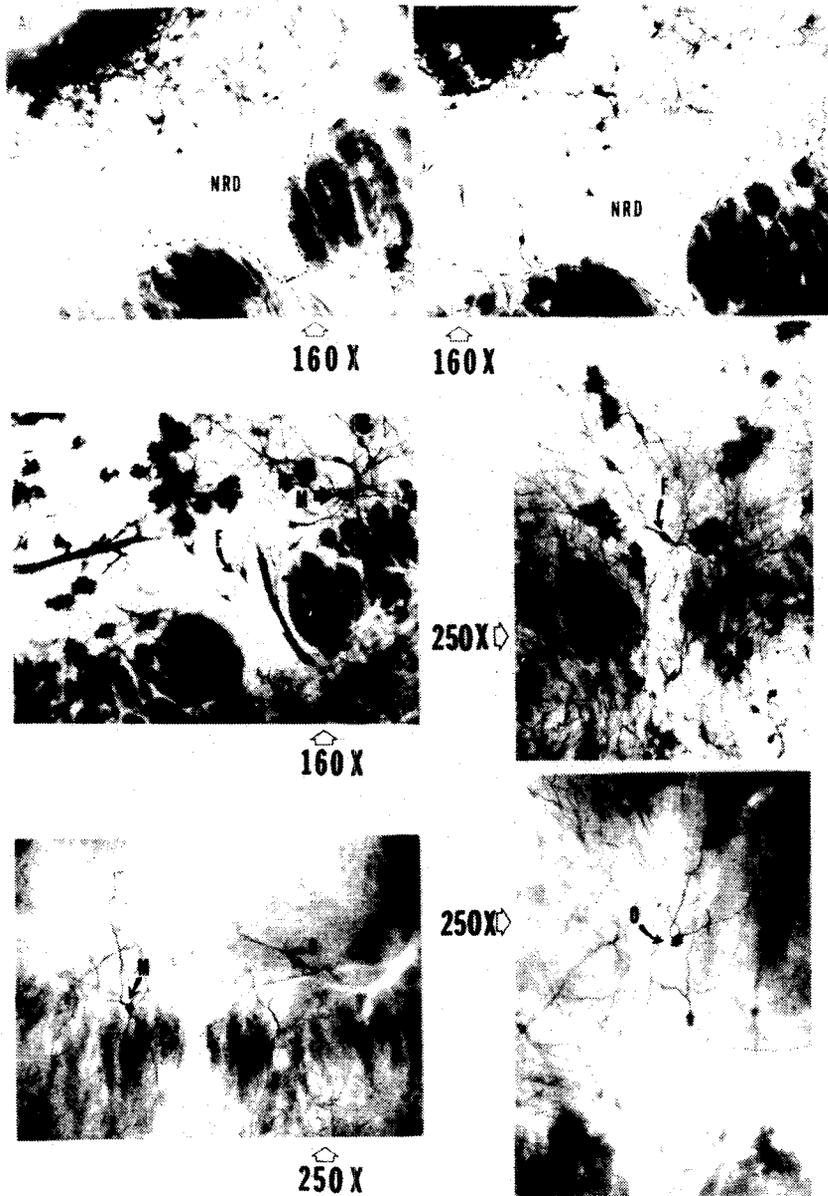


FIG. 5A.- CÉLULAS DEL NRD IMPREGNADAS CON GOLGI-RÁPIDO A 160X Y 250X EN ANIMALES CONTROL Y DESNUTRIDOS. OBSÉRVESE EL DIFERENTE EMPAQUETAMIENTO CELULAR. ABREVIACIONES, AC ACUEDUCTO, FLM, FASCÍCULO LONGITUDINAL MEDIAL. F, FUSIFORMES, M, MULTIPOLARES Y O, OVOIDES. RATAS DE 90 DÍAS DE EDAD.



teza visual de la rata, utilizando el mismo modelo de desnutrición y de cuantificación neuronal, en las mismas edades y con 8% y 6% de caseína, Díaz-Cintra y Col., (comunicación personal) han encontrado un efecto contrario en la densidad de las espinas dendríticas en las células no piramidales corticales (similares a las del NRD), este hecho pudiera relacionarse en términos de la inervación serotoninérgica en la corteza cerebral, proveniente del NRD, estas proyecciones actúan sobre las células no piramidales de la corteza para su desarrollo y maduración, y presentan un patrón de maduración diferente al mostrado por las células piramidales de la misma área cortical (Lader y Col., 1982); el incremento que tienen las espinas dendríticas y somáticas en el NRD como respuesta a la desnutrición podría relacionarse como un posible mecanismo adaptativo y podríamos apoyar los hallazgos de otros investigadores (Resnick y Col., 1978, Morgane y Col. 1978), que afirman haber encontrado elevación de la serotonina en animales desnutridos, entonces, probablemente el aumento en las espinas (entrada sináptica) demande mayor producción de su neurotransmisor serotonina.

Otro efecto que podemos observar en las gráficas es que la tendencia en los animales controles es aumentar el número de espinas a los 90 días y decrementarlas a los 220 días y en los animales desnutridos el incremento se da a los 220 días, esto podría interpretarse, como un posible desfase, en las curvas de crecimiento de las espinas dendríticas de los animales desnutridos para confirmar este fenómeno será entonces necesario extender el estudio hacia edades más tardías y poder sugerir la posible relación funcional.



Por otra parte podríamos suponer que si la presencia de serotonina es acosta de las protefmas de los tejidos periféricos, con la consiguiente reducción del tamaño del cuerpo y de su peso, en una porporción del 50 al 70% en estos animales desn<sup>u</sup>tridos con 6% de casefna (Forbes, y Col., 1977) y esto explica un tanto como el peso cerebral no varfa más de 10% a un 15% - solamente, esto hace que en relación al peso cerebral y el -- corporal, los animales desnutridos presentan una relativa macrocefalia, además explica el porqué las madres desnutridas - presentan la misma calidad de leche pero en menor cantidad - (Muller y Cox 1947; Perkins 1932 Lindbland y Col., 1974) conduciéndo a una desnutrición a las crfas (Shoemaker 1971); en este sentido, la importancia de este conocimiento, nos llevará al establecimiento adecuado de la dieta en madres gestantes. para mantener el correcto desarrollo cerebral de los fetos, y garantizar su óptima funcionalidad.

De acuerdo con Dobbing y Col., (1971-1973), el crecimiento - mayor del cerebro de la rata es esencialmente posnatal y coincide con el perfodo de lactancia. En el hombre, el crecimiento y maduración cerebral, ocurren durante el tercer trimestre de gestación y termina al final de los dos años de vida. Así, la desnutrición de la rata, es comparable con la desnutrición durante los dos primeros trimestres de gestación en el hombre. La desnutrición durante la lactancia, en la rata, es comparable con la desnutrición al final del último trimestre de gestación y los dos primeros años de vida en el hombre. De esta manera, la deficiencia, especialmente de protefna durante el primero y segundo trimestre en la gestación en el hombre podría seriamente dañar el desarrollo cerebral posnatal. Por lo tanto, estos efectos nocivos de la desnutrición en el hombre, pudieran prevenirse a través de un adecuado aporte de - protefmas durante este perfodo de la gestación.



## CONCLUSIONES

Por los resultados obtenidos en el presente trabajo de Tesis, se puede concluir lo siguiente:

- I. El modelo de desnutrición utilizado para el estudio se implantó crónicamente (pre y posnatalmente) y es capaz de modificar los patrones de desarrollo de las neuronas en diferente forma y por tanto provocar cambios individuales en las diferentes poblaciones celulares.
- II. Fué posible observar los cambios anatómicos por la desnutrición en el núcleo rafe dorsal del tallo cerebral de la rata y considerar que las células de esta región presentaron un patrón de desarrollo diferente de las tres edades estudiadas; lo cual probablemente indique un desfase en la maduración anatómica del núcleo y las neuronas que la configuran, faltaría extender el estudio a edades más tempranas y más tardías para comprobar estos resultados a lo largo de toda la vida del animal.
- III. Las modificaciones en algunos de los parámetros no son muy claros, en términos de la entrada de información, para el establecimiento de las diferencias del desarrollo entre animales control y desnutridos con el fin de comprender la plasticidad del SNC y sus mecanismos de adaptación-compensación para las diferentes fases de madurez cerebral.
- IV. En general los tres tipos celulares del NRD presentaron efectos heterogéneos y esto podría confirmar la posible



subdivisión del mismo núcleo, lo cual se encuentra apoyado por trabajos de diferentes autores (Dahlstrom y Fuxe 1964, Felten y Cummins 1979, Felten y Herrigan 1980, Steinbusch y Col. 1981, Descarries y Col. 1982) quienes afirman que existen subconjuntos celulares, en estos términos, podría hablarse de una diferencia anatómica y funcional de las neuronas en el sistema.

- V. Finalmente, en base a la composición de elementos neuronales con diferente producción de neurotransmisiones en el NRD, podemos decir que posiblemente las alteraciones anatómicas pueden acaso correlacionarse con estudios neuroquímicos y fisiológicos, ya que al observar los resultados podemos notar que los efectos más marcados se presentaron en las células fusiformes y multipolares de las que se tiene la certeza producen noradrenalina y serotonina respectivamente y debido a que las células ovoides no presentan cambios tan dramáticos, podemos apoyar la tesis que dice, que estas neuronas son funcionalmente interneuronas.



## B I B L I O G R A F I A

Allison, J. B. and Wannemacher, R. W. The Concept and Significance of -- Labile and Over-all Protein Reserves of the Body. AM. J. Clin. Nutr., 16 (1965) 445-452.

Anden, N.E., Dahlstrom, A., Fuxe, K., Larson, K., Olson, L. and Ungerstedt, U. Ascending Monoamine Neurons to the Telencephalon and Diencephalon, Acta Physiol. Scand., 67 (1966) 313-326.

Azmitia, E. C., The Serotonin-Producing Neurons of the Midbrain Median -- and Dorsal Raphe Nuclei. In L. L. Iversen, S. D. Iversen and S. H. Snyder (EDS), Handbook of Psychopharmacology, Plenum Press, New York, (1978) -- 233-314.

Barnes, D. Y Altman, J., Effects of two Levels of Gestational Lactational Undernutrition on the Postweaning Growth of the Rat cerebellum, Exp. Neurol. 38 (1973) 420-428.

Castilla, L., Cravioto, A. Cravioto, J., Efectos a Corto Plazo de la Interacción Estimulación-Desnutrición Proteico Calorica sobre el Desarrollo -- Bioquimico del Sistema Nervioso Central, Gaceta Med. de Méx., 115.5 (1979) 225-233.

Cintra, L., Diaz-Cintra, S. Kemper, T. and Morgane, P. J. Nucleus Locus - Coeruleus: A Morphometric Golgi Study in Rats of Three age Groups, Brain Res. 247 (1982) 17-28.

Coward, W. A., Whitnea, R.G., and Lunn, P.G. Reasons Why Hypoalbuminemia may not Appear in Protein-energy Mainutrition BR.J.Nutr. 38 (1977) 115-126.

Dahlstrom, A. and Fuxe, K., Evidence for the Existence of Monoamine neurons in the Central Nervous System I. Demonstration of Monoamines in the cell - Bodies of Brain Stem Neurons., Acta Physiol Scand., 62 Suppl. 232 (1964) - 1-55.

Danner, H. and Pfister, C. Unter Suchinger Sur Cytoarchitektonikdes Nucleus Raphe Dorsal is der Rate J. Hirnforsch., 21 (1980) 655-664

Descarries, L., Beaudet, A., Watkins, K.C. and Garcia, S., The Serotonin - Neurons in Nucleus Raphe Dorsalis of Adult Rat, Anat.Rec., 193 (1979) 520.

Diaz-Cintra, S., Cintra, L., Kemper, T., Resnick, O. and Morgane, P. J., -- Nucleus Raphe Dorsalis: A Morphometric Golgi Study in Rats of Three age -- Groups, Brain Res. 207, (1981) 1-16.

Diaz-Cintra, S., Cintra, L., Jemper, T., Resnick, O. and Morgane, P. J., - The Effects of Protein Deprivation on the Nucleus Raphe Dorsalis: A Morphometric Golgi Study in Rats of three age Groups. Brain Res. 221 (1981) 243-255.

Diaz-Cintra, S., Cintra, L., Kemper, T., Resnick, O. and Morgane, R. J., - The Effects od Protein Deprivation on the Nucleus Locus Coeruleus: A Morphometric Golgi Study in Rats of three age Groups Brain Res., 304 (1984) - 243-253.

Dobbing, J. and Sands, J., Vulnerability of Developing Brain; IX. The effect of Nutritional Growth Retardation on the Timing of the Brain Growthspurt, - Biol. Neonate., 19 (1971) 363-378.



Dyson, S. E. and Jones, D.G., Some Effects of Undernutrition on Synaptic - Development a Quantitative Ultrastructural Study, Brain Res. 114 (1976) - 365-378.

Felten, D.L. and Cummings, J.P. The Raphe Nuclei of the Rabbit Brainstem, J., Comp. Neur., 187 (1979) 199-224.

Felten, D.L. and Harrigan, P., Seritonerpic Dendrite Bundles in nuclei -- Raphe Dorsalis and Centralis Superior of the Rabbit, Anat. Rec., 196 (1980)

Felten, D.L. and Harrigan, P., Dendrite Bundles in Nuclei Raphe Dorsalis and Centralis Superior of the Habbit: A Possible Substrate for Local Control of Serotonergic Neurons, Neurosci Lett., 16 (1980) 275-280.

Fisch, I., and Winick, M., Effect of Malnutrition of Regional Growth of the Developong Rat Brain Exp. Neuro1., 25 (1969) 534-540.

Hammer, R.P. Jr. and Marthens, E., Van Morphological Development of the -- Brain Stem Reticular core in Prenatally Undernourished rats, Dev. Brain, - Res., 1 (1981) 203-212.

Kats, H.B. and Davies, C.A., The Effects of Early-Life Undernutrition and Subsequent Environment on Morphological Parameters of the Rat Brain Behav. Brain Res., 5 (1982) 53-64.

Kats, H.B. and Davies, C.A., The Separated and Combined Effects of Early Undernutrition and Environmental Complexity at Different ages on Cerebral Measures in Rats. Dev. Psychobiol., 16. (1983) 47-58.



Kemper, T.L., Pasquier, D.A. and Drazen, S. Effect of a Low Protein Diet - on the Anatomical Development of Subcortical Formations. Brain Res. Bull., 3 (1978) 443-450.

Klein, A.W. Synaptic Density Correlated with Maze Performance in Young and Aged Rats, A. Preliminary Study. Mech. Ageing, Dev. 21 (1983) 245-255

Lauder, J.M., Wallace, J.A. Kuler, H., Petrusz, P. and McCarty, K. in Vivo and in Vitro Development of serotonergic neurons. Brain Research Bull., 9 (1982) 605-625.

Leuba, G. and Rabinowicz, TH. Long-Term Effects of Postnatal Undernutrition and Maternal Malnutrition on Mouse Cerebral Cortex, II. Evolution of dendritic Branching and Spinos in the Visual Region. Exp. Brain. Res., 37 -- (1979) 299-309

Lindbland, B.S. and Rahimtoola, R.A. Pilot Study of the Quality of Human Milk in a Lower Socio-economic Group in Karachi Pakistan, Acta Paed. Scand. 63. (1974) 125-128.

Mohan, P.F. and Narasinga Rad, B.S. Adaptation to Underfeeding in Growing, Rats. Effect of Energy Restriction Dietary Protein Levels on Growth, Feed Efficiency, Basal Metabolism and Body Composition J. Nutr. 113 (1983) 79--85.

Morest, D.K., and Morest, R.R. Perfusion-Fixation of the Brain With chrome Osmium Solutions for the Rapid Golgi Method. Amer. J. Anat. 118 (1966) 811-832.

Morgane, P.J., Miller, M., Kemper, T., Stern, W. Forbes, W. Hall, R., --  
Bronzino, J., Kissane, J.L., Hawrylewicz, E. and Resnick, O. The Effect of  
Protein Malnutrition on the Developing Central Nervous System in the Rat,  
Neurosci. Biobehav. Rev., 2 (1978) 137-230.

Muller, A.J. and Cox, W.M., The Effect of Changes in Diet on the Volume -  
and Composition of Rat Milk J. Nutr., 31 (1946) 249-259.

Neville, H.E., and Chase, H.P. Undernutrition and Cerebellar Development.  
Exp. Neuro., 33. (1971) 483-497

Patel, A.J. Undernutrition and Brain Development Trends. In Neurosci. 6 -  
(1983) 151-154.

Paxinos, G., Watson, CH., The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates Atlas -  
Academic Press, Sydney (1982).

Perkins, A.E. The Chemical Composition and Nutritive Properties of Milk -  
as Affected by the Level of Protein Feeding. Ohio. Agr. Exp., Sta. Bull. 1  
(1932) 515.

Philbrick, D.J. and Hill, D.C. Development of Malnutrition in Rats AM. J.  
Clin. Nutr., 27 (1974) 813-818. ✓

Resnick, O., Miller, M., Forbes, W. Hall, R., Kemper T. Bronzino, J. and  
Morgane. Developmental Protein Malnutrition: Influences on the Central --  
Nervous System of the Rat. Neurosci, And Biobehav. Re., 3 (1979) 233-246.

Resnick, O., Morgane, P.J., Hasson, R. and Miller, M. Over and Hidden forms of Chronic Malnutrition in the Rat and Their Relevance to man. Neurosci. - And. Biobehav. Rev., 6 (1982) 55-75.

Rosso, P. Maternal Malnutrition and Placental Transfer of Alphamino-Iso--butyric acid in the Rat Science, 187 (1975) 648-650

Shoemaker, W.J. and Wurtman, P.J., Perinatal Undernutrition: Accumulation of Catecholamines in Rat Brain. Science 171 (1971) 1017-1019.

Steinbusch, H.W.M. Nieuwenhuys R., Verhofstad, A.A.J. and Van Der Kooy, - D., The Nucleus Raphe Dorsalis of the Rat Its Projection Upon the cauda--toputamen, a Combined Cytoarchitectonic, Immunohistochemical and Retro--grade Transport study J. Physiol. (Paris) 77 (1981) 157-174.

Stern, W.C., Morgane, P.J., Miller, M. and Resnick, O. Protein Malnutri--tion in Rats: Response of Brain Amines and Behavior to Foot sock Stress. Exp. Neurol., 47 (1975) 56-67.

Sugita, N., Comparative Studies in the Growth of the cerebral Cortex. VII On the Influence of Starvation at an Early Age Upon the Development of -- the Cerebral Cortex, Albino Rat, J. Comp. Neurol., 29 (1918) 177-240.

Taber, E., The Cytoarchitecture of the Brain Stem of the Cat. I Brain Nu--clei of Cat, J. Comp. Neurol., 116 (1961) 27-69.

Tekeur, Y., KIMURA, H. and Sano, y Immunohistochemical Demonstration of the Distribution of Serotonin Neurons in the Brainstem of the Rat and cat. Cell. Tissue Res. 224 (1983) 247-267.

Wapnir, R.A. and Lifshitz, F. Absorption of amino acids in Malnourished Rats J. Nutr., 104 (1974) 843-849.

West, C.D. and Kemper, T.L. The effect of a Low protein diet on the Anatomical Development of the Rat Brain, Brain. Res., 107 (1976) 221-237.

Wnick M., and Noble, A., Cellular response in Rats During Malnutrition at Various Ages, J. Nutr., 89 (1966) 300-306.



