



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

---

FACULTAD DE QUÍMICA

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO  
EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

*“REGULACIÓN DEL EJE TIROIDEO Y DE LA VÍA  
TRHÉRGICA DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL (SNC)  
EN RATAS ADULTAS CON DEFICIENCIA INTRAUTERINA DE ZINC”*

**T E S I S**  
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE :  
**MAESTRO EN CIENCIAS (BIOQUÍMICAS)**  
P R E S E N T A :  
**ELENA ALVAREZ SALAS**

Tutor: DRA. PATRICIA DE GORTARI GALLARDO



MÉXICO, D. F.

Enero 2009



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

**REGULACIÓN DEL EJE TIROIDEO Y DE LA VÍA TRHÉRGICA DEL SISTEMA  
NERVIOSO CENTRAL (SNC) EN RATAS ADULTAS CON DEFICIENCIA  
INTRAUTERINA DE ZINC**

***RECONOCIMIENTOS***

Esta tesis se realizó bajo la dirección de la Dra. Patricia de Gortari Gallardo en el laboratorio de Neurofisiología Molecular, en la Dirección de Neurociencias del Instituto Nacional de Psiquiatría "Ramón de la Fuente Muñiz".

El Comité Tutorial que asesoró el desarrollo de esta tesis estuvo formado por:

|                                   |                                   |
|-----------------------------------|-----------------------------------|
| Dra. Patricia de Gortari Gallardo | Instituto Nacional de Psiquiatría |
| Dra. Patricia Joseph Bravo        | Instituto de Biotecnología, UNAM  |
| Dra. Marta Menjívar Iraheta       | Facultad de Química, UNAM         |

El proyecto fue apoyado parcialmente por CONACYT (61410). Durante los estudios de maestría goce de una beca otorgada por CONACYT y DGAPA-UNAM para la realización de la presente tesis.

Esta tesis fue defendida en examen presentado el día 30 de enero de 2009.

El Jurado de Examen Doctoral estuvo constituido por:

|            |                             |                                       |
|------------|-----------------------------|---------------------------------------|
| Presidente | Dra. Patricia Joseph Bravo  | Instituto de Biotecnología, UNAM      |
| Secretario | Dr. Rolando Hernández Muñóz | Instituto de Fisiología Celular, UNAM |
| Vocal      | Dr. Ignacio Camacho Arroyo  | Facultad de Química, UNAM             |
| Suplente   | Dra. Marta Menjívar Iraheta | Facultad de Química, UNAM             |
| Suplente   | Dra. Rosa María Uribe       | Instituto de Biotecnología, UNAM      |

## ÍNDICE

|  | Página |
|--|--------|
| I. Abreviaturas .....                      | 3      |
| II. Resumen .....                          | 5      |
| III. Introducción .....                    | 7      |
| IV. Antecedentes .....                     | 8      |
| V. Justificación .....                     | 23     |
| VI. Hipótesis .....                        | 24     |
| VII. Objetivos .....                       | 24     |
| VIII. Material y métodos .....             | 25     |
| Análisis de resultados .....               | 35     |
| IX. Resultados .....                       | 36     |
| Peso.....                                  | 36     |
| Consumo de alimento .....                  | 37     |
| Eje tiroideo .....                         | 39     |
| Contenido de TRH y actividad de PPII ..... | 42     |
| Actividad de APN .....                     | 44     |
| Concentración de corticosterona .....      | 45     |
| Ratas sacrificadas al destete .....        | 46     |
| X. Discusión .....                         | 48     |
| Peso y consumo de alimento .....           | 49     |
| Eje tiroideo .....                         | 53     |
| Contenido de TRH y actividad de PPII ..... | 54     |
| Corticosterona .....                       | 59     |
| Ratas sacrificadas al destete .....        | 59     |
| XI. Conclusiones .....                     | 61     |
| XII. Referencias bibliográficas .....      | 63     |

## I. ABREVIATURAS

AgRP Proteína relacionada al agouti

ALP Fosfatasa alcalina

ANOVA Análisis de varianza

AP Adenohipófisis

APN Aminopeptidasa neutral

BAT Tejido adiposo pardo

BHE Barrera hematoencefálica

CC Animales alimentados con dieta control de Zn en etapas pre y postnatales.

CD Animales alimentados con dieta control de Zn en la etapa prenatal y dieta deficiente en la etapa posterior al destete.

CORT Corticosterona

CRH Hormona liberadora de corticotropina

Cu Cobre

DC Animales alimentados con dieta deficiente de Zn en la etapa prenatal y dieta control en la etapa posterior al destete.

DCT1 trasportador de cationes divalentes 1

DD Animales alimentados con dieta deficiente de Zn etapas pre y postnatales.

ESM Error estándar de la media

fT<sub>4</sub> Tiroxina libre

GABA Ácido gamma-aminobutírico

GH Hormona de crecimiento

HPT Eje hipotálamo-pituitaria-tiroides

HT Hormonas tiroideas

IGF-I Factor de crecimiento similar a la insulina I

MT Metalotioneína

NMDA N-metil-D-aspartato

NPV Núcleo paraventricular del hipotálamo

NPY Neuropeptido Y

PPII Piroglutamil aminopeptidasa II

RIA Radioinmunoensayo

rT<sub>3</sub> Triyodotironina reversa

T<sub>3</sub> Triyodotironina

T<sub>4</sub> Tiroxina

TRH Hormona liberadora de tirotrópina

TSH Hormona estimulante de la tiroides o tirotrópina

UCP-I Proteína desacopladora I

UCPs Proteínas desacopladoras de la fosforilación oxidativa

ZIP Proteína tipo ZRT1, IRT1

Zn Zinc

ZnT Familia de proteínas transportadoras de Zn

βNA β-naftilamina

## II. RESUMEN

El TRH es uno de los principales reguladores del eje HPT, además tiene un papel como neuromodulador, se encuentra en diferentes regiones del sistema límbico donde participa en el control de la locomoción, memoria, aprendizaje y conducta alimentaria. El TRH se degrada de manera específica mediante la ectoenzima piroglutamil aminopeptidasa II (PPII). La PPII es una metalopeptidasa dependiente de zinc que se encuentra en la membrana de diferentes tejidos pero principalmente en cerebro, donde tiene una distribución heterogénea. La deficiencia de Zn es un problema a nivel mundial: en México, la deficiencia moderada de este mineral es del 30% en niños en edad escolar y en mujeres en edad reproductiva. El Zn es un metal esencial para la actividad de centenares de enzimas.

El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de una alimentación deficiente en Zn durante las etapas pre y/o postnatal sobre el funcionamiento del eje tiroideo y conducta alimentaria de ratas adultas. Se estudiaron los cambios sobre el contenido de TRH y la actividad de la PPII en el sistema límbico.

Ratas Wistar hembras en edad adulta, fueron alimentadas desde el inicio de la gestación y hasta el final de la lactancia con una dieta control (C: 20 ppm Zn) o deficiente de Zn (D: 1-2 ppm Zn). Se seleccionaron: 20 crías de las madres con dieta C y 20 de las madres con dieta D, se dividieron en los siguientes grupos: C-C: Crías de madres alimentadas con dieta control durante la gestación y mantenidas con la misma alimentación después del destete; C-D: Crías de madres alimentadas con la dieta C, y que después del destete fueron sometidas a la dieta D; D-D: Crías cuyas madres fueron alimentadas con la dieta D y mantenidas con esa misma dieta después del destete; D-C: Crías de madres alimentadas con una dieta D reemplazada por una dieta C después del destete.

Las crías fueron separadas por sexo y mantenidas en grupos bajo condiciones controladas de luz y temperatura. Alimento y agua fueron proporcionados *ad libitum*. Los animales fueron pesados cada semana. Las crías fueron sacrificadas por decapitación a los dos meses y medio de edad. Se determinó en suero la concentración de hormonas tiroideas, TSH, corticosterona y la actividad de la tiro liberinasa. Se extrajeron los cerebros y se disecaron el hipotálamo medio basal, núcleo accumbens, corteza frontal, amígdala, hipocampo y eminencia media. En el hemisferio izquierdo (excepto de la eminencia media, donde se utilizó todo el tejido) se cuantificó el contenido de TRH por RIA y en el hemisferio derecho la actividad de PPII por fluorometría. En ratas sacrificadas inmediatamente después del destete se procedió a la disección de las mismas regiones para la cuantificación de TRH en el hemisferio izquierdo y de la actividad de PPII en el hemisferio derecho.

El peso de los grupos experimentales fue menor vs el control, esto en ambos sexos y sin importar la etapa de la vida en la que sometieron a la deficiencia de Zn. El efecto anorexigénico de la deficiencia de Zn fue más evidente en machos; al final del experimento, los grupos experimentales de hembras, consumieron la misma cantidad de alimento que el grupo control (CC). Es probable que los machos sean más susceptibles a las alteraciones en el comportamiento alimentario inducidos por una dieta deficiente en Zn durante la etapa postnatal logrando mantener la homeostasis del Zn si la deficiencia

se da en la etapa prenatal. La disminución del peso y consumo de alimento, son capaces de regresar a la normalidad cuando se sustituye la dieta deficiente de Zn administrada durante la etapa prenatal, por una dieta completa después del destete. En hembras, el peso del grupo con alimentación deficiente de Zn en la etapa prenatal (DC) no presentó diferencias hacia el final del experimento vs DD; el grupo con deficiencia postnatal (CD) alcanzó un peso significativamente mayor vs DD y se mantuvo con un peso similar al de ratas CC. Esto que indica que en hembras, la deficiencia de Zn en etapas tempranas del desarrollo es más deletérea que la que ocurre en etapas más tardías de la vida.

La disminución en la concentración de  $T_4$  en machos y de  $T_3$  en hembras, es evidencia de que la deficiencia de Zn tiene un efecto supresor sobre las hormonas tiroideas.

En machos, el contenido de TRH disminuyó, en núcleo accumbens y amígdala, por la deficiencia postnatal de Zn (tanto en DD como en CD). Las alteraciones fueron revertidas por la introducción de Zn en la dieta (grupo DC), lo que indica especificidad del efecto, siendo más sensible el contenido de TRH a la deficiencia postnatal de Zn. Las consecuencias fisiológicas que tienen tales cambios en el contenido del TRH en el núcleo accumbens podrían alterar la locomoción, mientras que el TRH de la amígdala ha sido relacionado con la conducta de ansiedad. En hembras, el único cambio observado en el contenido de TRH fue un aumento evidente en el hipocampo de ratas con deficiencia prenatal (CD) y que no regresó a valores control en DC.

Alteraciones en la actividad de PPII en hembras se presentaron en dos de las regiones con mayor contenido de Zn en el cerebro: en hipocampo y amígdala; los cambios fueron región específicos dependiendo de la etapa de deficiencia del mineral. En machos los cambios se observaron en el hipotálamo; la deficiencia prenatal de Zn fue responsable de las alteraciones en la actividad de la PPII.

La deficiencia dietética de Zn provoca alteraciones en los parámetros que se analizaron en este trabajo: peso, consumo de alimentos, eje tiroideo contenido de TRH y actividad de la enzima PPII en sistema límbico, durante las etapas pre y/o postnatales, los cambios son dependientes de género.

### III. INTRODUCCIÓN

El Zn es un metal esencial para centenares de procesos biológicos y debe consumirse en la dieta para mantener una salud óptima. La importancia de la biodisponibilidad del Zn en la dieta se demostró inicialmente en estudios con animales de laboratorio (O'Dell y Savage, 1960). El riesgo de deficiencia de Zn (moderada o severa) aumenta por factores tales como malabsorción intestinal, alcoholismo, cirrosis, anemia, falla renal, consumo de algunos medicamentos (diuréticos, esteroides), y pérdidas excesivas por el sudor (Prasad *et al.*, 1963; Prasad, 1988).

La deficiencia de Zn aguda (Henkin *et al.*, 1975) y crónica (Prasad, 1991) es conocida dentro de la población humana y probablemente es más común de lo que se reconoce generalmente. La prevalencia de deficiencia de Zn es alta en países que consumen una importante cantidad de cereales, los cuales tienen alto contenido de fitatos (Sandström y Lönnerdal, 1989). Estos compuestos, presentes en los vegetales y granos de cereales que forman parte de la dieta mexicana, inhiben la absorción de Zn (Rosado, 1998). Este metal forma complejos insolubles con el ácido fítico a un pH alcalino, que son aún más insolubles cuando forman complejos de Zn-Ca-fitato (Sandström *et al.*, 1987).

La deficiencia de Zn se refleja en síndromes clínicos que afectan a ambos sexos, a todos los grupos de edad y nivel socioeconómico y cultural. Ésta no se encuentra asociada con ningún marcador bioquímico específico, lo cual dificulta su identificación. En cuanto a la evaluación del estado nutricional del Zn en población mexicana, los estudios publicados son escasos. Hunt *et al.*, observa que la ingestión promedio de Zn en el embarazo es baja ( $7.8 \pm 3.3$  mg/d), y 57% de las mujeres presentan concentraciones bajas de Zn en plasma ( $<8.1$   $\mu\text{mol/l}$ ) (Hunt *et al.*, 1987). Rosado estudió los indicadores bioquímicos asociados con el estado nutricional del Zn en preescolares; 20% de los niños evaluados presentan concentraciones bajas de Zn en plasma ( $<10.7$   $\mu\text{mol/l}$ ) (Rosado *et al.*, 1995). Recientemente, la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (ENSANUT, 2006) determinó que la deficiencia de Zn sigue siendo uno de los problemas más importantes de salud pública, presentándose una afectación del 30%, es decir, uno de cada tres niños o mujeres la padecen (Olaiz-Fernández *et al.*, 2006).

El Zn se encuentra ampliamente distribuido en el cuerpo, los tejidos que presentan mayor contenido del mineral son la próstata, retina, riñón y músculo (Prasad, 1976). En el

cerebro, la concentración intracelular de Zn permanece constante a pesar de incrementos o decrementos en los niveles extracelulares (Prohaska, 1987).

Entre los efectos de la deficiencia de Zn se incluyen infecciones, hipogonadismo, pérdida de peso, deterioro emocional, dermatitis, retardo en la cicatrización de heridas, alopecia, alteraciones del gusto, ceguera nocturna, anorexia, hipoleptinemia, disminución en la sensibilidad a la insulina, disminución en la concentración sérica de  $T_3$  y de la desyodasa 1 hepática (Prasad, 1985), exacerba la respuesta al estrés, deterioro de procesos cognitivos como la memoria y el aprendizaje y resulta en una mayor propensión a la epilepsia y a la enfermedad de Alzheimer (Cuajungco y Lees, 1997).

El Zn se requiere para la función óptima de más de 300 enzimas (Vallee y Auld, 1990), El papel del Zn en estas metaloenzimas incluye su participación en funciones catalíticas, estructurales y regulatorias. Este trabajo se centra en la posible regulación de la enzima piroglutamil aminopeptidasa II (PPII), una metaloenzima dependiente de Zn, secundaria a deficiencia de este mineral en la dieta de roedores.

#### IV. ANTECEDENTES

En México, el 10 por ciento de las madres embarazadas sufren desnutrición y los principales factores que inciden en este problema son el bajo nivel socioeconómico, enfermedades previas o durante el embarazo y el estilo de vida de la madre (Valero De Bernabe, 2004). Si la demanda nutricional del feto es mayor que el aporte placentario, se originará una desnutrición fetal. La desnutrición intrauterina provoca bajo peso al nacer debido a alteraciones en la circulación placentaria (Leis-Marquez, 1999) y predice de manera importante la mortalidad infantil.

El fenotipo de un adulto es la suma de los factores genéticos así como de la influencia del ambiente fetal y postnatal. Un ambiente intrauterino subóptimo tiene consecuencias negativas en la función neuroendocrina (Nathanielsz, 1999; Hoet y Hanson, 1999). En humanos, durante los últimos días de gestación y los primeros días de vida, ocurre la diferenciación neuronal en el hipotálamo (Yew y Chan, 1999), periodo en el que las condiciones nutricionales y el metabolismo tienen gran impacto en el feto y el recién nacido.

Es ampliamente reconocido que la desnutrición intrauterina predispone a los organismos a presentar un conjunto de padecimientos crónicos en la etapa adulta conocidos como el síndrome metabólico (Stocker *et al.*, 2005; Reusens y Remacle, 2006; Ozanne y Hales, 2002; Zambrano, 2002). Éste incluye anomalías como: obesidad abdominal, resistencia a la insulina, hiperinsulinemia, hipertensión, diabetes tipo 2, hiperglucemia e hipertrigliceridemia (Mota *et al.*, 2004). Esta hipótesis es conocida como la hipótesis de Barker y propone que el feto se adapta a la desnutrición provocando cambios metabólicos y endocrinos permanentes que forman la base de las patologías en la etapa adulta (de Boo y Harding, 2006). Estos cambios incluyen adaptaciones en los sistemas que controlan el peso corporal y el apetito (Jackson *et al.*, 1996).

Por otro lado, se sabe que el eje tiroideo madura a lo largo de la etapa intrauterina, lo que está controlado intrínsecamente por la edad gestacional y no por las hormonas tiroideas (HT). Aunque hay variaciones individuales en el proceso de maduración, la regulación por retroalimentación del eje tiroideo madura aproximadamente en la semana gestacional 37 (Hashimoto *et al.*, 1991). Las concentraciones elevadas de tirotrópina (TSH) en presencia de niveles altos de HT en el feto, sugieren que la sensibilidad de la

hipófisis a la retroalimentación negativa está limitada o compensada por un aumento en la estimulación de la hormona liberadora de tirotrópina (TRH) hipotalámica (Thorpe-Beeston *et al.*, 1991).

Uno de los principales reguladores del eje hipotálamo-pituitaria-tiroides (HPT) es el tripéptido TRH (pGlu-his-proNH<sub>2</sub>) sintetizado en el núcleo paraventricular del hipotálamo (NPV); es liberado de la eminencia media al sistema portahipofisario, y estimula la síntesis y liberación de TSH en la adenohipófisis, ésta a su vez estimula la síntesis y liberación de las HT en la glándula tiroides (Guillemin, 1978), las cuales por retroalimentación negativa inhiben la síntesis de TSH y de TRH en la adenohipófisis y en el NPV, respectivamente (Nillni & Sevarino, 1999; Yen, 2001).

El TRH se degrada eficientemente y de manera específica mediante la ectoenzima piroglutamil aminopeptidasa II (PPII) o su forma soluble que se encuentra en suero (tiroliberinasa). La PPII es una metalopeptidasa dependiente de zinc que se encuentra en la membrana de diferentes tejidos pero principalmente en cerebro, donde tiene una distribución heterogénea (Vargas *et al.*, 1987; Vargas *et al.*, 1992) (Fig. 1). Está presente en neuronas, en las terminales nerviosas (Cruz *et al.*, 1991); su actividad es mayor en bulbo olfatorio, cerebelo e hipocampo. Un estudio sobre la ontogenia de la actividad de la PPII, reveló que el desarrollo de ésta en el cerebro, está asociado a la sinaptogénesis, lo que sugiere que la distribución regional de la PPII en adultos es resultado de eventos que ocurren en etapas tempranas del desarrollo de las ratas (Vargas *et al.*, 1992). En la adenohipófisis, la PPII se localiza en lactótrofos donde degrada al TRH que actúa como neurohormona proveniente de la eminencia media. La evidencia de su papel en la degradación del TRH liberado viene de su gran especificidad, el incremento en la recuperación del TRH liberado al medio con un inhibidor de la PPII y su respuesta a reguladores de la acción del TRH en adenohipófisis, como las hormonas tiroideas (Ponce, 1988).

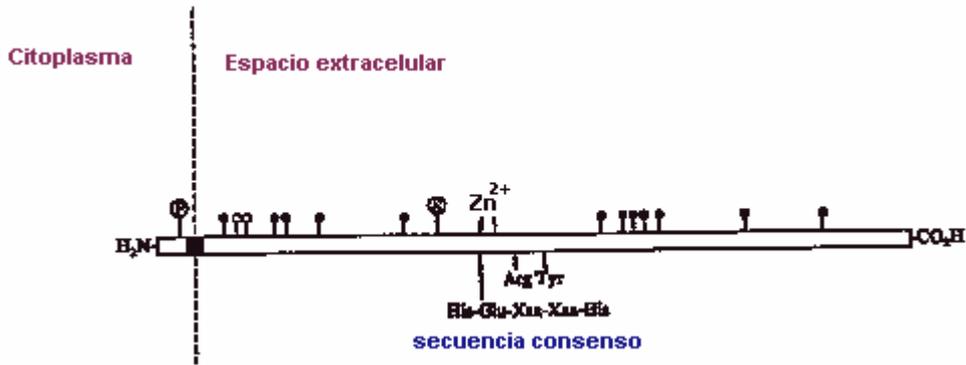


Fig 1. Estructura de la ectoenzima que degrada al TRH. Contiene una pequeña región citoplasmática en el amino terminal. El gran dominio extracelular contiene la secuencia consenso de la familia de las metalopeptidasas dependientes de Zn. (Bauer., 1995)

La regulación tan estricta de la PPII adenohipofisiaria por las hormonas periféricas (Bauer, 1988; Schomburg y Bauer, 1995) y por el TRH (Vargas, *et al.*, 1994) sugiere que esta enzima puede ser un elemento adicional dentro de los mecanismos de control neuroendocrino que afectan la intensidad del estímulo hipotalámico y/o de la duración de la acción de la molécula señal. La regulación de la PPII es tejido específica; las hormonas tiroideas incrementan la actividad de la PPII de adenohipófisis mientras que en diversas regiones cerebrales no tienen efecto alguno (Ponce, 1988; Bauer, 1990). Por otra parte, su actividad está sujeta a regulación negativa por el  $17\beta$ -estradiol en adenohipófisis (Bauer, 1988).

El TRH se libera en respuesta a estímulos ambientales como el frío, activándose el eje tiroideo, o a la succión (como en la lactancia) para promover la liberación de prolactina (Joseph-Bravo *et al.*, 1998). El frío es un estímulo ambiental que provoca la activación del HPT, aumentando el RNAm de proTRH en el NPV (Uribe *et al.*, 1993), y la concentración sérica de TSH y de las hormonas tiroideas, las cuales actúan sobre el tejido adiposo pardo (BAT), junto con el sistema simpático, para aumentar la termogénesis (Silva, 2003).

El eje tiroideo se regula de manera diferencial a distintos niveles y depende de la etapa del desarrollo, edad, sexo y etapas fisiológicas de los animales. El control puede ocurrir a nivel de la síntesis, liberación y degradación del TRH, regulador principal del eje.

La desnutrición en la etapa intrauterina, provoca cambios en el funcionamiento del eje tiroideo, aumento en los niveles de tiroxina ( $T_4$ ) en la sangre del cordón umbilical y una correspondiente disminución de la concentración de triyodotironina ( $T_3$ ) y triyodotironina reversa ( $rT_3$ ) (Mahajan *et al.*, 2005). Las alteraciones en el eje HPT provocan adaptaciones benéficas a las condiciones intrauterinas hostiles de la desnutrición. Una dieta deficiente en proteína en etapas tempranas de la vida conlleva a alteraciones en el eje HPT evidenciadas por una disminución en las concentraciones séricas de  $T_3$  y  $T_4$  totales,  $T_3$  libre, disminución en la captación de yodo y, ya sea un ligero aumento o disminución en la concentración de TSH. Esto se ha reportado tanto en ratas lactantes y recién destetadas (Ramos *et al.*, 1997; Ramos *et al.*, 2000; Cox, 1984) como en niños con desnutrición calórico-proteica (Orbak *et al.*, 1998; Laditan, 1983; Onoura *et al.*, 1983). Sin embargo, los efectos de una dieta baja en proteína en el eje tiroideo dependen de la duración de la desnutrición, ya que ratas con consumo de una dieta con 9% de proteína a corto plazo, aumenta la concentración de  $T_3$  total con  $T_3$  libre normal, pero en períodos más largos de 4 semanas, se observa una disminución de  $T_3$  libre. Esto probablemente se debe a cambios inducidos por la dieta en la unión proteica a  $T_3$  (Smallridge *et al.*, 1982).

La relevancia de estos cambios inducidos por la alimentación en el eje HPT radica en que las HT aumentan el gasto de energía, en parte mediante la reducción de la eficiencia metabólica, con control a nivel transcripcional de genes específicos (Lanni *et al.*, 2001). El descubrimiento de las proteínas desacopladoras (UCPs) en casi todos los tejidos ha abierto nuevas perspectivas en el entendimiento de los mecanismos involucrados en la regulación del metabolismo energético por las hormonas tiroideas (Silva, 1995).

Las HT también son esenciales para la formación del esqueleto y el mantenimiento de la masa ósea en la etapa adulta (Galliford *et al.*, 2005).  $T_3$  y  $T_4$  son necesarias para un crecimiento y desarrollo adecuados durante la etapa intra y extrauterina (Ares *et al.*, 2005), debido a que la secreción normal de las HT y de la hormona del crecimiento (GH) son interdependientes (Laron, 2003). Los neonatos (ovejas) con hipotiroidismo congénito

presentan retraso en el crecimiento intrauterino, no así los humanos. Tanto la secreción como la acción normal de GH en la etapa postnatal, depende de un estado eutiroideo.

En ratas adultas, una disminución del contenido proteico de la dieta aproximadamente al 50% del consumo control, altera el eje HPT a diferentes niveles (de Gortari *et al.*, 2005): en machos se observa hipotiroidismo secundario a corto plazo (3 semanas), TSH disminuida; y primario a largo plazo (8 semanas), evidenciado por concentraciones elevadas de TSH. Diversas alteraciones del eje HPT también se han demostrado en hembras que consumen una solución de glucosa al 28% (disminuye el consumo de alimento y por tanto de proteína) durante el embarazo y la lactancia, y en sus crías (de Gortari *et al.*, 2002). En las madres hay un aumento en el contenido de TRH hipotalámico, y una disminución sérica de TSH; en las crías sucede lo opuesto, la concentración de TSH aumenta y disminuye el contenido de TRH hipotalámico (sólo en hembras).

Las HT están sujetas a regulación fisiológica durante la transición de un estado de buena nutrición al ayuno; este último suprime rápidamente los niveles de  $T_3$  y  $T_4$  con una reducción subsecuente de la utilización de las reservas energéticas (Flier *et al.*, 2000). Los niveles de TSH también están disminuidos en el ayuno, causando un hipotiroidismo secundario pero paradójicamente, el mRNA del TRH está disminuido (Blake *et al.*, 1991; van Haasteren *et al.*, 1995). En ratas macho adultas, un ayuno de 48 h aumenta el contenido de TRH en la eminencia media y disminuye la concentración sérica de TSH, en contraste, ratas recién destetadas y bajo las mismas condiciones de ayuno, sólo presentan una disminución en el contenido de la piroglutamil aminopeptidasa II (PPII) adenohipofisiaria (de Gortari *et al.*, 2000). Debido a que la PPII varía a la par de las alteraciones en el contenido de TRH en diferentes situaciones, i.e., consumo de alcohol, glucosa, ayuno y desnutrición (de Gortari *et al.*, 2000), esto refuerza la idea de un papel de la PPII en la regulación de las acciones del neuropéptido. La consecuencia fisiológica de la inhibición de la actividad de PPII puede conllevar a una transmisión TRHérgica más eficiente.

La leptina es otro factor que pudiera estar mediando los cambios en el eje tiroideo a través de sus receptores en la eminencia media (Huang *et al.*, 1996), o a través de

neuronas del núcleo arcuato que expresan neuropéptido Y (NPY) y la proteína relacionada al agouti (AgRP) (Legradi y Lechan, 1999) y que innervan las neuronas TRHérgicas en el NPV (Toni *et al.*, 1990; Legradi y Lechan, 1998). La producción de esta hormona disminuye a la par del funcionamiento del eje tiroideo durante la desnutrición. En ratas ayunadas, el reemplazo con leptina impide parcialmente la reducción de TRH hipotalámico, TSH y HT inducidas por el ayuno (Ahima *et al.*, 1996; Seoane *et al.*, 2000).

El eje HPT se regula de manera diferencial en la anorexia al compararlo con la restricción alimentaria. Durante la restricción alimentaria disminuye la actividad del eje tiroideo: disminuye la síntesis y liberación de TRH del NPV, lo que conlleva a una disminución de la concentración sérica de TSH y de las hormonas tiroideas. Sin embargo, en las ratas con anorexia se observa lo contrario, ya que el RNAm de TRH no disminuye como en el caso de la restricción alimentaria y su liberación está aumentada, al igual que la concentración sérica de TSH y T<sub>4</sub> (Jaimes-Hoy *et al.*, 2008), lo que apoya el papel anorexigénico de TRH propuesto.

Además de su función hipofisiotrópica, el TRH se sintetiza en diversas regiones del Sistema Nervioso Central (SNC) donde ejerce una función neuromoduladora; esta función está apoyada por su amplia distribución (Lechan y Toni, 1992), la de sus receptores TRH-R1 y TRH-R2, y de la enzima responsable de su inactivación, la PPII (Horita, 1998; Tang y Man, 1991). La PPII se localiza en cerebro y adenohipófisis, se ha propuesto que está cerca de donde están los receptores de TRH (Heuer *et al.*, 1998; Heuer *et al.*, 2000). La administración de TRH tiene efectos ansiolíticos, antiepilépticos, antidepresivos y altera la conducta alimentaria (Horita, 1998).

Una disminución de la proteína en la dieta de ratas macho y hembra provoca, en ambos sexos, un aumento en el contenido de TRH en amígdala y núcleo accumbens; en machos, a largo plazo, se observa una disminución del contenido de esta hormona en hipocampo e hipotálamo (probablemente por un aumento en su liberación) (de Gortari *et al.*, 2005). En hembras gestantes con una disminución en el contenido proteico de la dieta (al 50% del control) durante el embarazo y la lactancia, se observa un aumento en el contenido de TRH en amígdala y núcleo accumbens; en cambio en las crías hay una disminución del contenido de este péptido en el hipocampo en ambos sexos y en la corteza frontal y núcleo accumbens sólo de los machos (de Gortari *et al.*, 2002).

En lo que respecta al contenido de TRH en áreas extrahipotalámicas durante un ayuno de 48 h, también se encontraron diferencias específicas dependientes de la edad: machos adultos presentan disminución en el contenido de esta hormona en la amígdala, mientras que en ratas jóvenes la disminución se observa en el núcleo accumbens (de Gortari *et al.*, 2000).

## ZINC

El zinc (Zn) es un mineral que juega un papel relevante en el crecimiento y diferenciación celular, y en el metabolismo de plantas superiores y animales. Participa en diversas funciones biológicas como la síntesis de ADN, la división celular, expresión de genes y en la actividad de varias enzimas.

La estabilidad redox y la habilidad del Zn de formar complejos de coordinación con una variedad de ligandos, le confieren propiedades que son explotadas ampliamente en la biología, tanto de manera estructural como catalítica. Dedos y “clusters” de Zn son motivos estructurales que ocurren repetidamente en sistemas biológicos en el dominio de unión al DNA de las proteínas, incluyendo factores de transcripción y receptores hormonales (Coleman, 1992).

La importancia del Zn en humanos fue reconocida a principios de la década de 1960. Las causas de deficiencia de Zn incluyen desnutrición, alcoholismo, malabsorción (por factores luminales y gastrointestinales); o bien factores sistémicos que favorecen una mayor utilización de zinc y aumentan los requerimientos como quemaduras extensas, insuficiencia renal crónica, algunos diuréticos, el uso de agentes quelantes como la penicilamina, y trastornos genéticos como la acrodermatitis enteropática (Ackland y Michalczyk, 2006; Andrews, 2008). El requerimiento de Zn aumenta durante el embarazo y el periodo de crecimiento (Osendarp *et al.*, 2003).

Las manifestaciones clínicas de deficiencia de Zn incluyen, anorexia, retardo en el crecimiento, dermatitis, alopecia, diarrea, trastornos emocionales, pérdida de peso, infecciones recurrentes, hipogonadismo en machos, y es letal si no se corrige (Prasad, 1985). Algunas de estas manifestaciones son comunes entre la desnutrición calórico-

proteica y la deficiencia de zinc entre las que se encuentran: dermatitis, retraso del crecimiento y bajo peso. Las principales fuentes de este nutrimento inorgánico son: carnes, vísceras y huevo. Aunque los vegetales y cereales también contienen zinc, tienen ácido fítico, celulosas y fibras que disminuyen su absorción (Reinhold *et al.*, 1976; Turnlund *et al.*, 1984; Sandström *et al.*, 1987; Hurrell, 2003).

### *Absorción*

Diversos estudios funcionales en el transporte intestinal y captura del Zn, han demostrado componentes saturables y no saturables del transporte de este mineral (Seal y Mathers, 1989; Tacnet *et al.*, 1990). Se han reportado incrementos en la tasa máxima de absorción de Zn en preparaciones de intestino de rata después de una depleción de Zn en la dieta (Hoadley *et al.*, 1987), lo cual coincide con el incremento en el flujo transepitelial de Zn en células CACO-2 después de un tratamiento de 5  $\mu\text{m-Zn}$  comparado con uno de 25  $\mu\text{m-Zn}$  (Reeves *et al.*, 2001).

La mayor parte de la absorción del Zn se lleva a cabo en el epitelio proximal (Lee, 1989), y este fenómeno es debido al incremento en la presentación del nivel de Zn en esta región. Hay dos familias principales de proteínas en mamíferos que contribuyen al transporte de este mineral: 1) Facilitador de la difusión de cationes (ZnT) y 2) Proteínas de la familia tipo irt o zrt (ZIP) (Fig. 2).

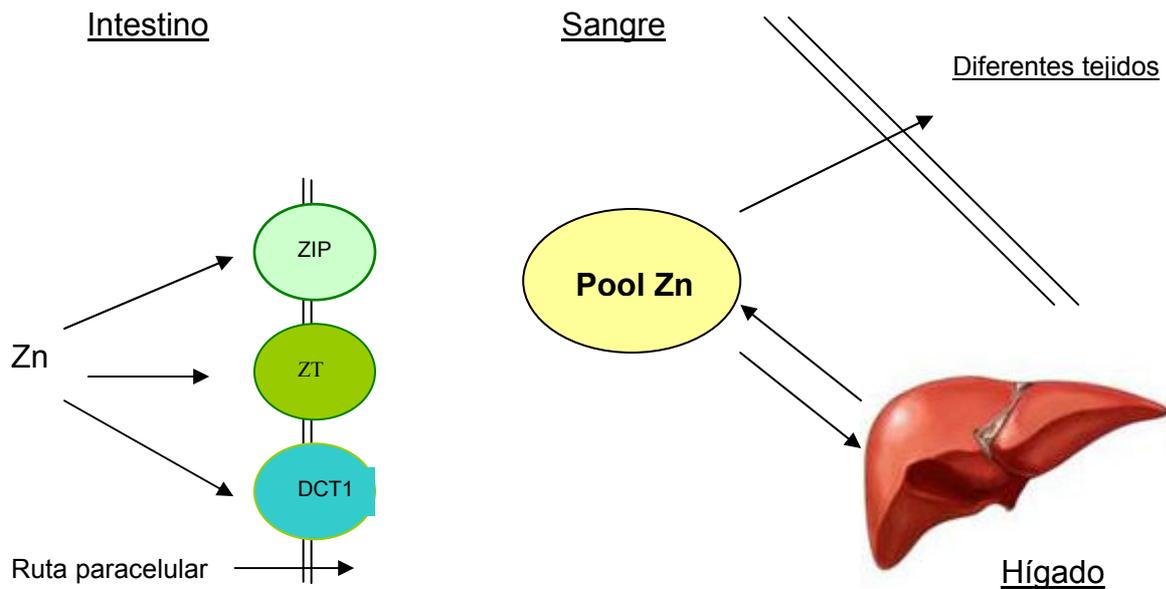


Figura 2. Representación simplificada del mecanismo de absorción de Zn. Adaptado de: Richelle M. *et al.*, Br J Nutr 2006; 96:227-38.

En el funcionamiento apropiado de los procesos que dependen del Zn no sólo está involucrada la ingestión adecuada de este mineral, sino la presencia de las metalotioneínas (Feldman y Cousins, 1976). Se conocen 4 tipos de metalotioneínas, proteínas ricas en cisteína que son capaces de unir zinc con gran afinidad y que funcionan en la regulación y la detoxificación de los metales (Palmiter, 1998). Las isoformas MT-1 y -2 tienen una distribución ubicua en los tejidos pero son particularmente abundantes en páncreas, intestino y riñón. La MT-3 está sólo en el SNC; se expresa en neuronas glutamatérgicas que contienen zinc, en particular en las células granulosas del giro dentado, cuyas proyecciones de fibras musgosas contienen las más altas concentraciones de zinc en el cerebro, y en las neuronas piramidales del hipocampo (Masters, 1994). La MT-3 le puede conferir a las neuronas que la expresan y a las que tienen gran concentración de Zn, un medio para distribuir, reciclar, o amortiguar la concentración de Zn. Además MT-3 proporciona resistencia a la citotoxicidad provocada por este mineral en células en cultivo (Cai *et al.*, 2000). Los animales deficientes de MT-3 son más sensibles al daño en las células CA3 hipocampales, provocado por las convulsiones epilépticas (Cole *et al.*, 2000). Por su parte la MT-4 es más abundante en la piel (Davies y Cousins, 2000). No existen índices o marcadores específicos para la evaluación del estado nutricional del Zn en los animales. Debido a que los genes de las MT están bien caracterizados y son sensibles a cambios en la

ingestión dietética de Zn (Cousins y Lee-Ambrose, 1992), pueden servir como indicadores del estado del Zn junto con la determinación sérica o plasmática del mineral.

Por otra parte, durante la gestación, existe un aumento en las demandas del Zn, las cuales deben ser cubiertas por el incremento en la ingestión del metal o por ajustes en la homeostasis del mismo. Uno de estos ajustes en el metabolismo es el aumento en la absorción intestinal de Zn durante el embarazo y la lactancia (Davies y Williams, 1977; Moser-Veillon, *et al.*, 1995). La deficiencia severa de Zn en las madres provoca retraso del crecimiento intrauterino, anomalías orgánicas, teratogénesis y muerte fetal o embrionaria. La sobreexpresión constitutiva de la MT-1 pancreática en ratones gestantes sometidos a deficiencia de Zn atenúa, mas no previene los efectos de la deficiencia materna o embrionaria de Zn (Lee *et al.*, 2003).

El Zn es necesario para la maduración y funcionamiento adecuados del cerebro. A diferencia de lo que ocurre en tejidos periféricos (Williams y Mills, 1970), la falta de Zn en la dieta difícilmente causa algún decremento en la concentración cerebral de Zn. Sin embargo, las funciones cerebrales sí se afectan por la falta del mineral (Golub *et al.*, 1995; Sandstead *et al.*, 2000). Por ejemplo, el aprendizaje en animales adultos está deteriorado por la deficiencia de Zn (Takeda *et al.*, 2000). En ratas adultas, el consumo de una dieta deficiente de Zn por 12 días únicamente causa una disminución en el contenido del mineral en el hipocampo, más no en otra región (Takeda *et al.*, 2000). La administración de una dieta baja en Zn por 45 días a ratas después del destete, provoca un aumento en la captura de  $^{65}\text{Zn}$  por el cerebro (Kasarskis, 1984). El incremento en la tasa de captura de Zn en cerebro después de un período de deficiencia es de aproximadamente 150% (Takeda *et al.*, 2001). Así, es probable que la deficiencia de Zn en la dieta afecte la homeostasis de éste en el cerebro.

La vía principal de llegada del Zn al cerebro es a través de la barrera hematoencefálica (BHE). En plasma, la albúmina es el componente más importante de Zn intercambiable. A pesar de que la albúmina no es esencial para el transporte de Zn al cerebro (Takeda *et al.*, 1997), ésta participa como un gran almacén de Zn intercambiable en los animales. Los complejos de aminoácidos (histidina y cisteína) son los siguientes componentes de Zn intercambiable en plasma (Hallman *et al.* 1971; Harris & Keen, 1989). La His puede servir para transferir el Zn al transportador de cationes divalentes 1 (DCT1). También

existe la posibilidad de que otros transportadores de Zn (p. ej., ZIP) estén involucrados en el transporte de Zn a través de la BHE (Grotz *et al.* 1998; Gaither y Eide, 2000). Se desconoce el mecanismo de secreción del Zn de las células endoteliales de los capilares al fluido extracelular del cerebro. Como se mencionó anteriormente, la deficiencia de Zn produce alteraciones en la expresión de transportadores, lo que facilita la captura cerebral de Zn y la conservación del Zn en cerebro durante periodos de deficiencia.

### *Apetito y Metabolismo*

El Zn es un micronutriente esencial que participa en el control de apetito (McClain *et al.*, 1993). Su deficiencia provoca pérdida del apetito (anorexia) y está acompañada de un incremento compensatorio en la síntesis de NPY (un potente orexigénico) debido a la disminución en el consumo de alimento (Lee *et al.*, 1998). La ingestión de alimentos inducida por NPY puede ser atenuada por la suplementación con Zn (Cheng *et al.*, 2000). Además, individuos con deficiencia de Zn presentan hipoleptinemia que puede ser restaurada con la reposición del mineral (Mantzoros *et al.*, 1998); la suplementación con Zn en ratones obesos, puede incrementar la concentración sérica de leptina y aminorar el desarrollo de la obesidad inducida por ingestión de sacarosa y algunos de sus defectos metabólicos (Chen & Lin, 2000). Lo anterior quizá se deba a un efecto directo del Zn en la expresión del gen de la leptina o a los efectos conocidos del Zn similares a la insulina; al aumentar la captación de glucosa por el tejido adiposo incrementa la producción de leptina. La concentración de leptina sérica, se ha correlacionado positivamente con el peso y grasa corporales y negativamente con la concentración de Zn en tejido adiposo. La concentración reducida de Zn en el tejido adiposo de ratones alimentados con una dieta alta en grasa y la correlación negativa entre leptina sérica y la concentración de Zn en tejido adiposo, apoyan la interrelación entre obesidad, leptina y metabolismo del Zn (Tallman y Taylor, 2003).

Sujetos obesos, presentan frecuentemente bajas concentraciones de Zn en sangre e hiperzincuria (Chen, *et al.*, 1997; 1998). La prevalencia de la deficiencia severa o leve de Zn en la dieta ha aumentado en muchos países, y la obesidad puede desarrollarse debido a una reducción en la producción de leptina observada en la deficiencia de este mineral (Gu, *et al.*, 1999). En lo que se refiere a la obesidad y resistencia a la insulina, se han detectado alteraciones en la concentración de Zn y su distribución en los tejidos, así como una mejoría en la sensibilidad a la insulina después de la suplementación con este

elemento (Marreiro, *et al.*, 2004). La deficiencia severa de Zn está asociada con hiperglucemia e hipoinsulinemia, lo que sugiere que la ingestión de Zn puede ser un regulador sensible de la homeostásis de la glucosa (Hall, *et al.*, 2005). Además, la suplementación con Zn puede contribuir a prevenir algunas complicaciones en las ratas diabéticas (Bolkent *et al.*, 2006) y con síndrome metabólico (Adachi *et al.*, 2006).

La insulina se almacena en las células  $\beta$  del páncreas acompañada con el Zn, el cual aumenta el estado de fosforilación del receptor de insulina y por consiguiente la cascada de señalización por fosforilación corriente abajo de esta vía (Tang y Shay, 2001; Haase y Maret, 2005) La relación que existe entre el Zn y la diabetes proviene del desbalance en el metabolismo redox en esta enfermedad. Tal estrés oxidativo puede liberar al Zn de algunos de sus ambientes de coordinación en las proteínas e interferir con los mecanismos homeostáticos de éste (Maret, 2004). El Zn liberado puede afectar la transducción de señales, generación de energía metabólica, producción mitocondrial de especies reactivas y tal vez incluso programas genéticos. El Zn disponible puede tener diferentes efectos en el metabolismo redox; dependiendo de la cantidad en la que esté disponible, este puede aumentar la capacidad antioxidante de la célula o producir estrés oxidativo.

### *Eje tiroideo*

El receptor de  $T_3$  requiere de Zn para estar activo; entonces a pesar de la existencia de esta hormona en cantidades suficientes, ésta no lleva a cabo su función adecuadamente cuando existe deficiencia de Zn. Es por esto que se ha hipotetizado que algunos de los efectos de la deficiencia de Zn pueden deberse a la pérdida del mineral del receptor de  $T_3$  y al consiguiente deterioro en la acción de esta hormona. Sin embargo, las alteraciones en el crecimiento debidas a la deficiencia de Zn no parecen ser causa de un mal funcionamiento de  $T_3$  (Freake, *et al.*, 2001).

Tanto la restricción calórica como la deficiencia en el consumo de Zn disminuyen la concentración sérica de  $T_3$  cuando se comparan con animales alimentados con dieta adecuada *ad libitum*, además la concentración de  $T_3$  es aún más baja en el grupo deficiente de Zn comparado con el de la restricción calórica. El contenido de TRH hipotalámico también se encuentra disminuido en las ratas deficientes de Zn. Debido a que la deficiencia de Zn disminuye aún más la concentración de  $T_3$  que la restricción

calórica, parece que la deficiencia de Zn puede deteriorar la producción extratiroidea de  $T_3$  (Morley, *et al.*, 1980). Otro estudio que reafirma el efecto negativo de una alimentación deficiente en Zn en el eje tiroideo reporta concentraciones más bajas de  $T_3$  y  $T_4$  libre ( $fT_4$ ) en suero de aproximadamente 30% cuando se comparan con los controles con dieta adecuada en Zn. La actividad de la desyodasa tipo 1 en hígado disminuye un 67% por la deficiencia de Zn. Estos datos demuestran que la deficiencia de Zn afecta el metabolismo de las hormonas tiroideas (Kralik, *et al.*, 1996).

### *Crecimiento*

La deficiencia humana de Zn secundaria a errores innatos del metabolismo, está asociada con deterioro del crecimiento, aumento en la susceptibilidad a infecciones y otras anomalías funcionales. El deterioro en el crecimiento puede ser debido a una inhibición en la síntesis proteica y a un aumento en la respuesta catabólica a la deficiencia de Zn (Giugliano y Millward, 1987). Diversos estudios se han llevado a cabo para evaluar el efecto de la suplementación con Zn en el crecimiento infantil, los resultados apoyan la intervención para mejorar la ingestión del mineral en niños de poblaciones en riesgo de deficiencia de Zn, especialmente en aquellas con tasas elevadas en baja talla y peso (Rivera *et al.*, 2001; Brown *et al.*, 2002).

Ratas en la etapa de destete presentan, al ser sometidas a una deficiencia de Zn por 14 días, una reducción de la tasa de crecimiento de 60%, lo cual está asociado con una concentración significativamente más baja del factor de crecimiento similar a la insulina I (IGF-I) comparada con la de ratas con restricción calórica y también vs el grupo control (alimentado *ad libitum*). También se encontró disminuido el mRNA del receptor para la GH y el mRNA de la proteína de unión a GH tanto en el hígado de las ratas deficientes en Zn como las de restricción calórica (McNall, *et al.*, 1995).

### *Actividad neuronal*

Diversos estudios sugieren que el Zn tiene un papel en la función mental. Por ejemplo, la suplementación con Zn mejora la cognición de niños en edad escolar (Sandstead, *et al.*, 1998). Infantes con bajo peso al nacer presentan una mejora en la tasa de crecimiento y desarrollo motriz debido a la suplementación con este mineral (Friel, *et al.*, 1993).

A nivel molecular, el Zn se encuentra principalmente en el bulbo olfatorio y en el hipocampo (Ono y Cherian, 1999). En este último, participa como neurotransmisor. Vesículas glutamatérgicas contienen iones de  $Zn^{2+}$  que son liberados junto con el glutamato cuando las neuronas son estimuladas (Frederickson *et al.*, 2000). Estudios *in vitro*, señalan que el Zinc participa en la modulación de NMDA y GABA actuando sobre NMDA-R y GABA-A. Sin embargo, los ratones knock out (KO) para el transportador de Zn 3 (ZnT-3), no tienen Zn vesicular, o KO para la MT-3 (proteína de unión del Zn producida en neuronas que contienen este mineral y en neuronas hipocampales piramidales), presentan una cognición (memoria y aprendizaje espacial) normal (Cole *et al.*, 2001).

El estrés fisiológico induce ansiedad y modifica el desempeño cognitivo de los animales. Se ha mostrado que la deficiencia de Zn exagera la respuesta al estrés en roedores. La deficiencia dietética de Zn afecta el estrés y la memoria de ratas, provoca un aumento en el peso de las glándulas adrenales, lo cual es indicativo de un estrés crónico. Además, las ratas sometidas a una dieta deficiente de Zn, presentan una elevada concentración de corticosterona y comportamiento de tipo ansioso en la prueba del laberinto de agua (water maze) (Chu, *et al.*, 2003).

Se ha implicado a este mineral en desórdenes neurológicos como la epilepsia por varias razones: a) su papel en la modulación de la actividad neuronal (Brown y Dyck, 2004); b) por la acumulación de Zn en neuronas de regiones en donde aparecen convulsiones (Cote *et al.*, 2005); c) por alteraciones en la concentración de zinc en el cerebro de animales epilépticos (Takeda *et al.*, 2005); y d) por los efectos de la manipulación de zinc en la susceptibilidad a convulsiones (Takeda *et al.*, 2006). Se le considera neurotóxico porque su acumulación intracelular contribuye a la muerte neuronal provocada por convulsiones y por isquemia cerebral transitoria (Capasso *et al.*, 2005); los iones de  $Zn^{2+}$  inducen la agregación de la proteína B-amiloidea, que puede provocar la enfermedad de Alzheimer (Zirah *et al.*, 2006; Opazo *et al.*, 2006; Maynard *et al.*, 2005).

Debido a que en mamíferos más de 200 enzimas contienen Zn, cualquier efecto del Zn en la dieta puede traducirse en defectos metabólicos y funcionales por falla en la actividad de las metaloenzimas dependientes de este mineral. El efecto que tiene una alimentación deficiente de Zn en la actividad de diferentes enzimas ha sido objeto de

diversos estudios (Reeves y O'Dell, 1985; Meftah *et al.*, 1991; Lukaski, 2005). En general, una alimentación sin Zn causa una disminución en la actividad de enzimas dependientes de este metal, mientras que se observa una recuperación de la función seguida de la administración de Zn. Las consecuencias de la restricción de Zn en la dieta dependen del estado fisiológico del sujeto, el contenido y biodisponibilidad del Zn ingerido y de la duración y etapa de inicio de la ingestión baja de Zn.

## V. JUSTIFICACIÓN

El eje tiroideo está involucrado en procesos como el control de la homeostasis energética, cambios de peso, respuesta al estrés y crecimiento. Este eje es regulable por restricción calórica, ayuno y restricción proteica; la degradación del TRH, por la PPII de adenohipófisis, es un punto clave de esta regulación.

El TRH es inactivado por una enzima específica de la familia de las metalopeptidasas: la PPII. Esta es una metaloenzima de 260 KD, se localiza en membranas de neuronas y en lactótrofos de adenohipófisis, cerca de donde están los receptores de TRH (Heuer *et al.*, 1998; Heuer *et al.*, 2000). La actividad degradativa de la PPII es específica para TRH (Km 40µM), hace una escisión en la unión piroGlu-His inactivando al tripéptido. La forma soluble de esta enzima también se encuentra en suero, la cual recibe el nombre de tiroliberinasasa (Cummins, 1998).

La regulación diferencial de la PPII se ha evidenciado secundaria al ayuno (de Gortari *et al.*, 2000), y a la restricción alimentaria dependiendo de la edad (de Gortari *et al.*, 2002); la forma soluble se regula por el peso corporal (Friedman *et al.*, 1995), y en el SNC por el modelo de epilepsia llamado kindling amigdalino (de Gortari *et al.*, 1995), donde el TRH se ha propuesto como antiepiléptico (Kubek *et al.*, 1989), neuroprotector en casos de hipoxia (Barbieri y Nistri, 1997), ansiolítico, antiepiléptico, antidepresivo (Horita, 1998) y anorexigénico (Jaimes-Hoy *et al.*, 2008).

La deficiencia de Zn modifica el funcionamiento del eje tiroideo, el peso, y aspectos de la conducta o procesos biológicos en los que la vía TRHérgica está alterada y en zonas donde se ha implicado al péptido con participación como neuromodulador; aún más, la actividad y la expresión de la PPII en regiones del sistema límbico de ratas sometidas a modelos de epileptogénesis, ansiedad, deficiencia proteica (por consumo de alcohol) y depresión también está modificada, y podría tener relación con cambios en la concentración de TRH y de su acción prolongada, en situaciones donde disminuye la expresión y actividad de la PPII.

Sin embargo, no se ha identificado si la deficiencia de Zn modifica la actividad de PPII y tiroliberinasasa y, si el efecto es dependiente de la etapa de la vida en la cual se presente la deficiencia.

Dada la participación de la regulación de la PPII en el funcionamiento del eje tiroideo, y en procesos donde TRH actúa como neurotransmisor es posible suponer que la deficiencia de Zn en la dieta de las ratas alterará de alguna manera la transmisión TRHérgica.

El presente estudio se enfoca en el efecto que tiene la deficiencia de Zn en la etapa intrauterina y postnatal en el funcionamiento del eje tiroideo, en la actividad de la enzima PPII, y las consecuencias a largo plazo en la vía TRHérgica del sistema límbico en ratas. Debido a su alta especificidad (Heuer *et al.*, 1998), las investigaciones sobre el metabolismo de la PPII pueden revelar nuevos aspectos en la función del sistema de señalización de TRH, y de su regulación por el zinc dietético.

## VI. HIPÓTESIS

Dependiendo de la presencia de la deficiencia dietética de Zn, durante las etapas pre y/o postnatal de la rata, se presentarán cambios diferenciales en la actividad de PPII y en la regulación del eje tiroideo, peso y conducta alimentaria. También se presentarán cambios diferenciales en la regulación de la actividad de PPII y del metabolismo de TRH en el sistema límbico. La deficiencia de Zn en la dieta modificará la actividad de la PPII con una consiguiente repercusión en el contenido de TRH en las regiones cerebrales estudiadas.

## VII. OBJETIVOS

- Evaluar el efecto de una alimentación deficiente en Zn durante las etapas pre y/o postnatal sobre el funcionamiento del eje tiroideo y conducta alimentaria de ratas adultas.
- Estudiar cambios sobre el contenido de TRH en el sistema límbico y en la actividad de la metalopeptidasa que lo degrada en cerebro (PPII) y en suero (tiroliberinas), causados por la deficiencia de Zn, durante las etapas pre y/o postnatal, en ratas sacrificadas inmediatamente después del destete, así como en machos y hembras adultos.

## VIII. MATERIALES Y MÉTODOS

### **a) Animales y dietas experimentales**

Ratas Wistar hembras en edad adulta (250-300 g de peso) del bioterio del Instituto Nacional de Psiquiatría, fueron alimentadas desde el inicio de la gestación y hasta el final de la lactancia con una de las siguientes dietas:

- a) Dieta control **C** (Zinc control diet, 20 ppm, - egg white base de la marca LabDiet™ dieta especial TestDiet, cat.5887, PMI Nutrition International).
- b) Dieta deficiente **D** (Low zinc diet, 1-2 ppm - egg white base de la marca LabDiet™ dieta especial TestDiet, cat.5888, PMI Nutrition International).

El alimento deficiente es isocalórico al control y sólo difiere de éste en el contenido de Zn.

Se seleccionaron 40 crías en total: 20 crías de las madres con dieta C y 20 de las madres con dieta D, se dividieron en los siguientes grupos:

**C-C** (n=9: 4♂, 5♀): Crías cuyas madres fueron alimentadas con la dieta control durante la gestación y mantenidas en las mismas condiciones de alimentación que éstas después del destete.

**C-D**: (n=9: 4♂, 5♀): Crías de madres alimentadas con la dieta C, y que después del destete fueron sometidas a la dieta D.

**D-D**: (n=10: 4♂, 6♀): Crías cuyas madres fueron alimentadas con la dieta D y mantenidas con esa misma dieta después del destete.

**D-C**: (n=10: 4♂, 6♀): Crías de madres alimentadas con una dieta D reemplazada por una dieta C después del destete.

Las crías fueron separadas por sexo y mantenidas en grupos para evitar estrés por aislamiento, se mantuvieron en un ciclo regular de luz-oscuridad de 12 + 12 horas (7:00-19:00 h) a una temperatura de  $24\pm 1^{\circ}\text{C}$ . El alimento correspondiente y el agua fueron proporcionados *ad libitum*. El consumo de alimento fue registrado diariamente por diferencia del alimento proporcionado el día anterior y dividido entre el número de ratas por caja. Los animales fueron pesados cada semana.

Las crías fueron sacrificadas por decapitación a los dos meses y medio de edad. Se colectó la sangre de cada rata en tubos de centrifugación para obtener el suero. Se extrajeron los cerebros y se almacenaron a  $-70^{\circ}\text{C}$  hasta su disección. Éstos se disecaron

manualmente, utilizando como referencia el atlas de cerebro de rata de Paxinos y Watson (2005), se obtuvo el hipotálamo medio basal, núcleo accumbens, corteza frontal, amígdala, hipocampo y eminencia media. En el hemisferio izquierdo (excepto de la eminencia media, donde se utilizó todo el tejido) se realizó la extracción de TRH, para su posterior determinación por radioinmunoensayo (RIA); el contenido de TRH está expresado por mg. de proteína, determinada por el método de Lowry. En el hemisferio derecho de las regiones disecadas, se realizó la extracción de membranas neuronales, para posteriormente utilizarlas en la determinación de las actividades enzimáticas de la PPII y de la aminopeptidasa neutral (APN), por ensayo fluorométrico, en las mismas regiones cerebrales; la actividad enzimática está reportada por mg. de proteína, determinada por el método de Lowry. El suero se utilizó para medir la actividad de la tiro liberina (ensayo fluorométrico), y las concentraciones de T<sub>3</sub> y T<sub>4</sub> totales, TSH y corticosterona por RIA. En las ratas sacrificadas inmediatamente después del destete se procedió a la disección de las mismas regiones para la cuantificación de TRH en el hemisferio izquierdo y de la actividad de PPII en el hemisferio derecho. La determinación de proteínas para el RIA de TRH se realizó por el método de Lowry y para el ensayo de PPII se realizó por el método de Bradford.

#### Extracción de TRH

La extracción de TRH se realizó de acuerdo a lo reportado previamente (de Gortari *et al.*, 1995). El lado izquierdo de las regiones cerebrales disecadas fue homogeneizado con un sonicador (Vibra cell VC.130) en el siguiente volumen de ácido acético al 20%: hipotálamo, núcleo accumbens-250µl, corteza frontal, amígdala e hipocampo-500 µl; eminencia media-150µl. De este homogenado, se tomaron alícuotas de 30µl para la cuantificación de proteínas por el método de Lowry. El resto del homogenado fue centrifugado a 14,000 revoluciones por minuto (rpm) durante 15 min. a 4°C (Eppendorf Centrifuge 5810 R). Se extrajo y cuantificó el sobrenadante de cada muestra, colocándolo en otros tubos de microcentrifuga. Al hipotálamo y núcleo accumbens se les agregaron 400µl de metanol al 100%; a la corteza frontal, amígdala e hipocampo, 800µl; y a la eminencia media 240µl. Se agitaron las muestras con un vórtex (Daigger Vortex Genie 2) y se guardaron a -20°C durante 12 hrs. Las muestras fueron centrifugadas a 10,000 rpm durante 15 min a 4°C. Se extrajo el sobrenadante y se colocó en otros tubos de microcentrifuga para someterlo a evaporación del líquido (Vacufuge concentrador

5301) por un periodo de 3 horas, para así obtener el pellet para la cuantificación de TRH por RIA.

### **Radioinmunoensayo de TRH**

El TRH fue cuantificado utilizando un anticuerpo previamente caracterizado (Joseph-Bravo *et al.*, 1979). La curva estándar se realizó por triplicado con tubos que contenían concentraciones de 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500, 1000, 2000 y 4000pg de TRH en 100µl de buffer RIA (Buffer de fosfatos 50mM pH 7.5 + BSA grado RIA al 0.25% + 150mM NaCl + azida de sodio al 0.02% en agua desionizada). Se preparó un estándar interno hipotalámico con tubos por triplicado con 10, 25, 50 y 100µl de un extracto de tejido evaporados a sequedad y resuspendidos en 100µl de amortiguador RIA. Las muestras de TRH fueron evaporadas y resuspendidas en el amortiguador RIA de acuerdo al contenido esperado de TRH. Para el hipotálamo y la corteza frontal se agregaron 500µl; y para el n. accumbens, amígdala, hipocampo y eminencia media se agregaron 250µl de amortiguador RIA. Las muestras se agitaron en el vórtex y se centrifugaron por 5 min. a 10,000 rpm a 4°C. Se tomaron 100µl de cada muestra por duplicado y se colocaron en tubos de 12 x 75mm. Posteriormente se prepararon por triplicado los tubos controles: los totales (T), que se refiere a las cuentas por minuto (cpm) totales, los NSB (unión no específica), a los cuales se adicionaron 200µl de buffer RIA; finalmente, se prepararon los tubos Bo (ausencia de TRH) adicionándoles 100µl de buffer RIA. A todos los tubos, excepto a los T y NSB, se les agregó 100µl de anticuerpo contra TRH (R<sub>2</sub> dilución de trabajo 1:100,000) (Joseph-Bravo *et al.*, 1979), seguido lo cual se les adicionaron a todos los tubos 100µl (5,000 cpm) de I<sup>125</sup>TRH. Se incubaron 36 hrs. a 4°C. Terminando el tiempo de incubación, se precipitaron todas las muestras, excepto los T, con 1ml de etanol absoluto, se centrifugaron (Beckman J-6B) a 4,000 rpm durante 25 min. a 4°C. Se aspiró el sobrenadante con un extractor de vacío y se realizó la lectura de las cpm en un instrumento de conteo de radiaciones gamma (LKB Wallace Minigamma Counter). Se realizó la transformación de los valores de cpm de la curva estándar y de las muestras a pg de TRH utilizando el software "Enri" de transformación matemática a través de una regresión logit-log (de Gortari *et al.*, 1995).

Cuantificación de proteínas por el método de Lowry (**Lowry *et al.*, 1951**)

A las alícuotas tomadas del homogenado de cerebro, se les agregó 30µl de NaOH 1N y se dejaron hidrolizando por 12 hrs a temperatura ambiente. Se centrifugaron a velocidad máxima por 5 min y se tomaron 2 alícuotas de 25µl de cada muestra; éstas fueron completadas a un volumen de 200µl con NaOH 0.5N, se añadieron 900µl de solución E (98ml Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> + 1ml de tartrato de Na y K al 2% [KNaC<sub>4</sub>H<sub>4</sub>O<sub>6</sub>] + 1ml CuSO<sub>4</sub> al 1%) y se incubaron 10min a temperatura ambiente; posteriormente se adicionaron 100µl de Folin 1N (Folin 2N + H<sub>2</sub>O destilada, 1:1). Todas las muestras se agitaron con el vórtex y se dejaron incubando por 30 min a temperatura ambiente.

Simultáneamente, se preparó la curva estándar utilizando albúmina sérica bovina (BSA, 1 mg de albúmina/ml de agua destilada), se prepararon 8 tubos por duplicado con las siguientes concentraciones de albúmina: 0 (blanco), 5, 10, 20, 40, 60, 80 y 100µl, completándolos a 100µl con agua destilada, se agregaron 100µl de NaOH (1N) y 100µl de solución E. Las muestras se agitaron con el vórtex y se incubaron a temperatura ambiente por 10 min. Posteriormente, se agregaron 100µl de la solución Folin 1N, se agitaron con el vórtex y se incubaron por 30min a temperatura ambiente. La curva estándar y las muestras se leyeron en un espectrofotómetro (Eppendorf BioPhotometer).

#### Extracción de membranas cerebrales

Al hemisferio derecho de las regiones disecadas se le agregó la siguiente cantidad de buffer de fosfatos 50mM pH 7.4: hipotálamo 200µl, n. accumbens 400µl, corteza frontal 900µl, amígdala 450µl, hipocampo 950µl. Se homogeneizaron las muestras con un sonicador (Vibra cell VC.130) y se centrifugaron a 5,400 rpm durante 15 min. a 4°C. Se extrajo el sobrenadante de todos los tubos y se guardó en tubos nuevos de microcentrífuga. El sedimentó que quedó de la primera centrifugación, se resuspendió en la mitad del volumen original del buffer de fosfatos y se sonicó por 5 segundos. Las muestras se centrifugaron a 5,400 rpm durante 15 min. a 4°C. Se extrajo el sobrenadante y se juntó con el obtenido de la primera centrifugación; ambos se centrifugaron a 12,000 rpm durante 15 min. a 4°C. Finalmente, se desechó el sobrenadante y se obtuvo el pellet para la medición posterior de la actividad de la enzima en membranas por fluorimetría (de Gortari *et al.*, 1995).

### **Ensayo fluorométrico para determinación de la actividad de la enzima piroglutamil aminopeptidasa II (PPII)**

El pellet de cada muestra que se obtuvo en la extracción de las membranas se resuspendió en 200 $\mu$ l de buffer de fosfatos 50mM pH 7.4. Se tomaron 40 $\mu$ l de membranas para determinación de proteínas por el método de Lowry previamente descrito y 80 $\mu$ l para el ensayo fluorométrico. Se preparó la siguiente mezcla de reacción por duplicado: 40 $\mu$ l de membranas, 50 $\mu$ l de los inhibidores bacitracina y N-etilmaleimida (BAC-NEM; 1mM cada uno), 20 $\mu$ l de dipeptidil amino peptidasa IV (DAP IV; 17 $\mu$ g/ $\mu$ l) (elimina la  $\beta$ -naftilamida [ $\beta$ NA] después de la acción degradativa de la PPII sobre el enlace piroglutamil-histidil del TRH- $\beta$ NA) y 130 $\mu$ l del buffer de fosfatos. Esta mezcla se incubó en baño maría por 5 min. a 37°C, posteriormente se adicionaron 10 $\mu$ l del sustrato fluorogénico TRH- $\beta$ NA (considerado como tiempo cero). De esta mezcla se tomaron 50 $\mu$ l por duplicado y se añadieron a tubos que previamente contenían 50 $\mu$ l metanol absoluto para detener la reacción enzimática, lo anterior se realizó en los tiempos 30, 60, 90 y 120 min. posteriores a la adición del sustrato. Las muestras se completaron a 400 $\mu$ l con metanol al 50% a 4°C (metanol 100% + buffer de fosfatos 50mM pH 7.4, 1:1). Se centrifugaron a 12,000 rpm durante 15 min a temperatura ambiente. Simultáneamente se preparó una mezcla de reacción con membranas control de cerebro completo y la siguiente curva estándar: se prepararon tubos con un volumen de  $\beta$ NA (0.001 $\mu$ g/ $\mu$ l) de 0, 1.79, 3.58, 7.16, 14.32, 28.64, 57.28, 114.56, 143.20 $\mu$ l. Posteriormente se completaron estos volúmenes a 400 $\mu$ l con metanol al 50%. La lectura de las muestras se realizó en un espectrofotómetro (Perkin-Elmer LS 50 Luminescence Spectrometer) a una longitud de onda de emisión de 410nm a 20 "slit" y una excitación de 335nm a 15 "slit". La actividad de la enzima fue lineal con respecto al tiempo, se obtuvo la pendiente de cada muestra (unidades de fluorescencia vs tiempo) y los valores se ajustaron al contenido de proteína en las membranas para obtener la actividad específica de la enzima (Vargas *et al.*, 1998).

### **Ensayo fluorométrico para determinación de la actividad de la enzima aminopeptidasa neutral (APN)**

Dependiendo de la cantidad de proteínas de las muestras determinadas previamente en cada una de las regiones cerebrales, se tomaron volúmenes diferentes de membranas, por duplicado, que contuvieran  $\sim 40\mu\text{g}$  de proteínas. Como control se utilizaron membranas extraídas de cerebro completo, tomando  $4\mu\text{l}$  ( $\sim 20\mu\text{g}$  de proteína). Muestras y controles se llevaron a  $240\mu\text{l}$  con buffer de fosfatos  $50\text{mM}$  pH 7.4. Esta mezcla se incubó en baño maría por 5 min. a  $37^\circ\text{C}$ , posteriormente se adicionaron  $10\mu\text{l}$  del sustrato fluorogénico Ala- $\beta\text{NA}$  (considerado como tiempo cero). De esta mezcla se tomaron  $50\mu\text{l}$  por duplicado y se añadieron a tubos que previamente contenían  $50\mu\text{l}$  metanol absoluto para detener la reacción enzimática, lo anterior se realizó en los tiempos 30, 60, 90 y 120 min. posteriores a la adición del sustrato. Las muestras se completaron a  $400\mu\text{l}$  con metanol al 50% a  $4^\circ\text{C}$  (metanol 100% + buffer de fosfatos  $50\text{mM}$  pH 7.4, 1:1). Se centrifugaron a 10,000 rpm durante 15 min a temperatura ambiente. Simultáneamente se prepararon dos curvas estándar: con los siguientes volúmenes de  $\beta\text{NA}$   $10^{-4}$  y  $10^{-5}\text{M}$ : 0, 1.79, 3.58, 7.16, 14.32, 28.64, 57.28, 114.56,  $143.20\mu\text{l}$ . Posteriormente se completaron estos volúmenes a  $400\mu\text{l}$  con metanol al 50%. La lectura de las muestras se realizó en un espectrofotómetro (Perkin-Elmer LS 50 Luminescence Spectrometer) a una longitud de onda de emisión de 410nm a 20 "slit" y una excitación de 335nm a 15 "slit". La actividad de la enzima fue lineal con respecto al tiempo, se obtuvo la pendiente de cada muestra (unidades de fluorescencia vs tiempo) y los valores se ajustaron al contenido de proteína en las membranas para obtener la actividad específica de la enzima (de Gortari *et al.*, 2007).

### **Ensayo fluorométrico para la determinación de la actividad de la enzima tiroliberinasa**

Por duplicado, se tomaron  $50\mu\text{l}$  del suero de los animales experimentales y de un control, y se les añadieron  $200\mu\text{l}$  de buffer de fosfatos  $50\text{mM}$  pH 7.4. Esta mezcla se incubó en baño maría por 5 min. a  $37^\circ\text{C}$ , posteriormente se adicionaron  $10\mu\text{l}$  del sustrato fluorogénico TRH- $\beta\text{NA}$  (considerado como tiempo cero). De esta mezcla se tomaron  $50\mu\text{l}$  por duplicado y se añadieron a tubos que previamente contenían  $50\mu\text{l}$  metanol absoluto para detener la reacción enzimática, lo anterior se realizó en los tiempos 0 y 60 min. posteriores a la adición del sustrato. Las muestras se completaron a  $400\mu\text{l}$  con metanol al 50% a  $4^\circ\text{C}$  (metanol 100% + buffer de fosfatos  $50\text{mM}$  pH 7.4, 1:1). Se centrifugaron a 10,000 rpm durante 15 min a temperatura ambiente. Simultáneamente se prepararon dos

curvas estándar: con los siguientes volúmenes de  $\beta$ NA  $10^{-6}$  M: 0, 1.79, 3.58, 7.16, 14.32, 28.64, 57.28, 114.56, 143.20 $\mu$ l. Posteriormente se completaron estos volúmenes a 400 $\mu$ l con metanol al 50%. La lectura de las muestras se realizó en un espectrofotómetro (Perkin-Elmer LS 50 Luminescence Spectrometer) a una longitud de onda de emisión de 410nm a 20 “slit” y una excitación de 335nm a 15 “slit”. Para obtener la actividad de la enzima, se sustrajo el tiempo cero del tiempo 60 (pmol de  $\beta$ NA producidos en una hora), se convirtieron los valores a ml/hr, y finalmente se hizo una transformación de unidades para reportar la actividad de la tiroliberinasa en nmol  $\beta$ NA/ml/hr (Schmitmeier *et al.*, 2002).

#### Radioinmunoensayo de $T_3$

La determinación de la concentración de  $T_3$  en suero se realizó con un kit comercial (Kit de radioinmunoensayo  $I^{125}$  de fase sólida Coat-A-Count<sup>®</sup> Total  $T_3$  DPC<sup>®</sup>:TKT31, Los Angeles CA, USA) diseñado para la determinación cuantitativa de triyodotironina total circulante. Todos los componentes se llevaron a temperatura ambiente antes de su uso.

Se marcaron cuatro tubos de polipropileno de 17x75mm: tubos T = cuentas totales y NSB = unión no específica, por duplicado. Se realizó una curva de calibración por duplicado con concentraciones crecientes desde 0 hasta 600 ng/dl utilizando 12 tubos recubiertos con anticuerpo, marcados con A (unión máxima) y con B a F (para el resto de los calibradores). Se marcaron tubos recubiertos adicionales, también en duplicado, para las muestras del suero de rata. Se pipetearon, directamente en el fondo del tubo, 100 $\mu$ l del calibrador cero A en los tubos NSB y A, y 100 $\mu$ l de cada uno de los calibradores restantes y suero de las ratas en los tubos preparados para tal efecto. Se agregó 1.0 ml de  $I^{125}$   $T_3$  Total a todos los tubos, los cuales se agitaron breve y suavemente en el vórtex. Los tubos T se reservaron aparte para su conteo. Los demás tubos (excepto los tubos T) se incubaron durante 2 horas a 37°C en baño María. Se decantaron completamente, aspirando su contenido (excepto los tubos T). Se contaron durante 1 minuto en el contador gamma (LKB 1275 Minigamma).

#### *Cálculo de resultados*

Se obtuvieron los resultados de la curva de calibración y de las muestras en términos de concentración en pg/ $\mu$ l utilizando el software “Enri” de transformación matemática a través de una regresión logit-log de la curva de calibración. Los valores de  $T_3$  en suero se expresan en ng/dl.

### **Radioinmunoensayo de tiroxina (T<sub>4</sub>)**

La cuantificación de la concentración sérica de T<sub>4</sub> se realizó con un kit comercial (Kit de radioinmunoensayo I<sup>125</sup> de fase sólida Coat-A-Count<sup>®</sup> Total T4 DPC<sup>®</sup> TKT41, Los Angeles CA, USA) diseñado para la medición cuantitativa de la tiroxina circulante total en suero.

Todos los componentes se llevaron a temperatura ambiente antes de su uso. Se marcaron cuatro tubos de ensayo de polipropileno de 17x75mm: tubos T (cuentas totales) y NSB (unión no específica) por duplicado. Se realizó una curva de calibración por duplicado con concentraciones crecientes desde 0 hasta 24 ng/dl utilizando 12 tubos recubiertos con anticuerpo anti-T<sub>4</sub> Total, marcados con A (unión máxima) y con B a F (para el resto de los calibradores). Se marcaron tubos recubiertos adicionales, también en duplicado para las muestras del suero de rata. Se pipetearon, directamente en el fondo del tubo, 25 µl del calibrador cero A en los tubos NSB y A, y 25µl de cada uno de los calibradores restantes y suero de las ratas en los tubos preparados para tal efecto.

Se agregó 1.0 ml de T<sub>4</sub> Total I<sup>125</sup> a todos los tubos y se mezclaron en el vórtex. Los tubos T se reservaron aparte para su conteo. Los demás tubos (excepto los tubos T) se incubaron durante 60 minutos a 37°C en baño María. Posteriormente los tubos se decantaron completamente, aspirando su contenido (excepto los tubos T). Se contaron durante 1 minuto en el contador gamma. (LKB 1275 Minigamma).

#### *Cálculo de resultados*

Se obtuvieron los resultados de la curva de calibración y de las muestras en términos de concentración en pg/µl utilizando el software "Enri" de transformación matemática a través de una regresión logit-log de la curva de calibración. Los valores de T<sub>4</sub> en suero se expresan en µg/dl.

#### Radioinmunoensayo de TSH

Se utilizaron TSH de rata y anti-TSH de conejo.

### *Curva estándar*

Se preparó la curva estándar por triplicado con 50, 100, 250, 500, 1000, 2000, y 4000 pg de TSH en 200µl de buffer RIA (50 mM, pH 7.4, BSA grado RIA al 0.25%, 150 mM de NaCl, 50 mM EDTA).

### *Controles internos*

Se prepararon por duplicado tubos con suero de rata control (eutiroidea) con 10, 20, 50 y 100pg de TSH en 200µl de buffer RIA y 100 µl de anticuerpo contra TSH (dilución 1:370 000 en buffer RIA).

Se prepararon por duplicado tubos con suero de ratas mantenidas una hora a 4°C con 10, 20, 50 y 100pg de TSH en 200µl de buffer RIA.

### *Muestras*

En tubos marcados de vidrio de 17 x 75mm se colocaron por duplicado 50µl de cada muestra y se completaron a 200µl con buffer RIA.

A cada tubo (excepto unión específica y totales) se le agregó 100µl de anti-TSH de conejo y 100µl de I<sup>125</sup> –TSH (7000 cpm/tubo) y se mezclaron con el vórtex. Se incubaron durante 24 horas a temperatura ambiente en la oscuridad. Se agregaron 100µl de anti-IgG de conejo, producido en cabra (dilución 1:240) y 100µl de suero normal de conejo (dilución 1:300). Se mezclaron e incubaron a temperatura ambiente durante 24 horas. Se agregó a cada tubo 1ml de polietilenglicol (0.04g de PEG/ml buffer RIA) y se mezclaron con el vórtex. Se centrifugaron los tubos a 5000 cpm durante 30 min. a 4°C. Se aspiró el sobrenadante y se contó el residuo en un contador gamma (LKB 1275 Minigamma).

### *Cálculo de resultados*

Se obtuvieron los resultados de las curvas estándar o de calibración y de las muestras, en términos de concentración en pg/µl utilizando el software "Enri" de transformación matemática a través de una regresión logit-log de la curva estándar o de calibración. Los valores de TSH se expresan en ng/ml.

## **Radioinmunoensayo de corticosterona (CORT)**

Se utilizó el kit comercial para radioinmunoensayo I<sup>125</sup> de fase sólida Coat-A-Count<sup>®</sup> Rat Corticosterone DPC<sup>®</sup> TKRC1, Los Angeles CA, USA. Todos los componentes se llevaron a temperatura ambiente antes de su uso. Se marcaron cuatro tubos de ensayo de polipropileno de 17x75mm: tubos T (cuentas totales) y NSB (unión no específica) por duplicado. Se realizó una curva de calibración por duplicado con concentraciones

crecientes desde 0 hasta 2,000 ng/ml utilizando 16 tubos recubiertos con anticuerpo anti-CORT, marcados con A (unión máxima) y con B a H (para el resto de los calibradores). Se marcaron tubos recubiertos adicionales, también en duplicado para las muestras del suero de rata. Se pipetearon, directamente en el fondo del tubo, 50µl del calibrador cero (A) en los tubos NSB y A, y 50µl de cada uno de los calibradores restantes y suero de las ratas en los tubos preparados para tal efecto.

Se agregó 1.0 ml de CORT de rata I<sup>125</sup> a todos los tubos y se mezclaron en el vórtex. Los tubos T se reservaron aparte para su conteo. Los demás tubos (excepto los tubos T) se incubaron durante 120 min. a temperatura ambiente. Posteriormente los tubos se decantaron completamente, aspirando su contenido (excepto los tubos T). Se contaron durante 1 minuto en el contador gamma (LKB 1275 Minigamma).

#### *Cálculo de resultados*

Se obtuvieron los resultados de la curva de calibración y de las muestras, en términos de concentración en pg/µl utilizando el software "Enri" de transformación matemática a través de una regresión logit-log de la curva de calibración. Los valores de corticosterona en suero se expresan en ng/ml.

#### **Cuantificación de proteínas por el método de Bradford** (Bradford., 1976).

Se preparó una curva estándar por duplicado en tubos de vidrio 12 x 75 mm, con una solución base de albúmina (BSA 0.2µg/ml) para obtener las siguientes concentraciones de proteína: 0 (blanco), 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 y 20µg. Se completaron a 800µl con agua destilada. Las muestras se trabajaron por duplicado, fueron diluidas de manera apropiada (dependiendo del tejido se tomaron entre 5-20µl de membranas) con agua destilada hasta llegar a un volumen de 800µl. Posteriormente, se añadieron 200µl del reactivo colorante de Bradford (Bio-Rad®). Se vortexearon los tubos evitando que se formaran burbujas. Transcurridos 5 minutos a temperatura ambiente, se procedió a la lectura de las muestras en el espectrofotómetro (Beckman DU 650 Spectrophotometer) a una densidad óptica de 595nm (OD<sub>595</sub>) vs el blanco.

### **Ratas sacrificadas inmediatamente después del destete**

Paralelamente al experimento descrito anteriormente, se obtuvieron diez crías de madres alimentadas con dieta control durante el embarazo y la lactancia, y ocho crías de madres alimentadas con dieta deficiente de Zn, las cuales fueron sacrificadas inmediatamente después de la etapa de destete (21 días). Lo anterior con el objetivo de estudiar el efecto de la deficiencia de Zn durante la etapa perinatal en el contenido de TRH y la actividad de PPII en el hipotálamo y regiones del sistema límbico (núcleo accumbens, corteza frontal, amígdala e hipocampo).

### **Análisis de resultados**

Se calculó la media y el error estándar de la media (E.S.M.) para todos los datos. Se utilizó para comparaciones entre géneros en cuanto a peso y consumo de alimento un análisis de varianza de tres vías (ANOVA); para el resto de los resultados, se realizó un análisis de varianza de 2 y una vía. Cuando la  $p < 0.05$ , se realizó la prueba post-hoc de Fisher y se considera la diferencia significativa (software Stat View, SAS Institute).

## IX. RESULTADOS

### *Peso*

La pérdida de peso por la deficiencia de Zn prenatal y su recuperación con la suplementación postnatal no tuvo diferencias entre géneros, (ANOVA de tres vías: género  $F_{(1,330)} = 1.71$ ,  $p = 0.1913$ ). Sin embargo, tanto en tiempo como entre grupos si existieron diferencias significativas (ANOVA de tres vías: grupos  $F_{(3,330)} = 117.45$ ,  $p < 0.0001$ ; tiempo  $F_{(10,330)} = 4.7$ ,  $p < 0.0001$ ; tiempos-grupo  $F_{(30,330)} = 3.006$ ,  $p < 0.0001$ ).

### *Machos*

Desde el tiempo cero (48 hr postnatal), el peso del grupo DD, con alimentación deficiente pre y postnatal, fue significativamente menor vs CC y CD, tendencia que permanecería constante casi hasta el final del experimento (semana 10). CD tuvo cambios de peso, presentando una disminución de aproximadamente 15% vs el control, sólo en la semana 7 y en las dos últimas semanas de tratamiento. El grupo sometido a deficiencia prenatal de Zn (DC), mantuvo un peso menor vs CC desde la semana 1 y hasta la 8, posteriormente alcanzó el peso del grupo control. De la semana 2 y hasta la semana 7, el peso de este grupo (DC) fue, en promedio, 30% menor vs el peso de animales con deficiencia postnatal (CD). Finalmente, los animales con deficiencia prenatal de Zn (DC), lograron tener un peso mayor de 27% aproximadamente, vs el grupo DD a partir de la semana 6 y hasta el final del experimento (ANOVA de dos vías: grupos-tiempo  $F_{(30,128)} = 1.976$ ,  $p < 0.01$ ) (Fig. 3).

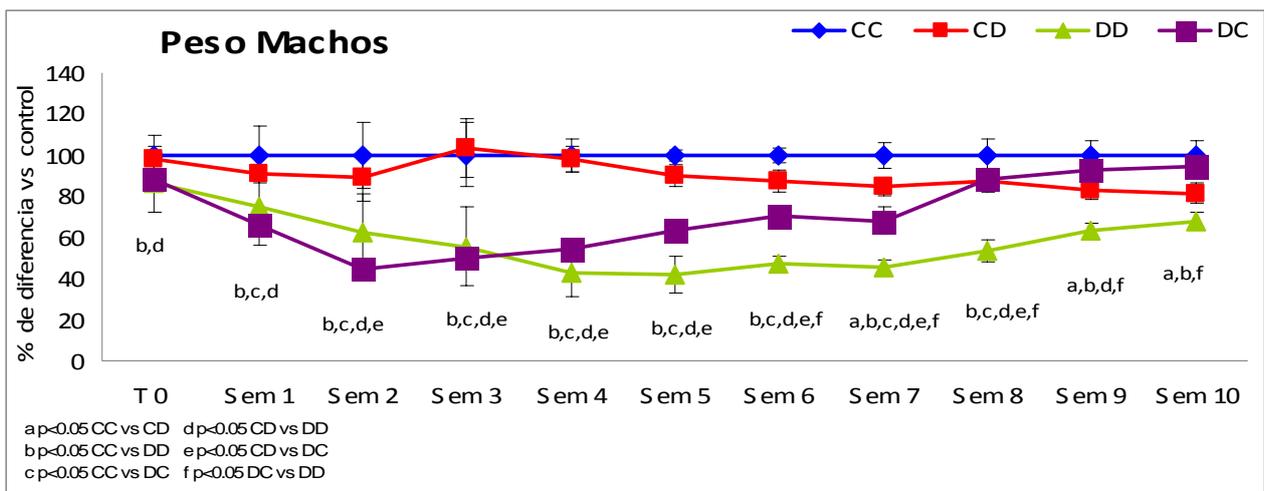


Fig. 3. Peso de ratas macho. Los animales fueron pesados cada semana, desde las 48 horas de vida hasta la semana 10. Valores expresados en % de diferencia vs control. Media  $\pm$  EEM. Análisis ANOVA de 3 (grupo-tiempo-género), 2 (tiempo-grupos) y una vía (grupos) se usó la prueba post-hoc de Fisher, las diferencias se consideraron significativas cuando  $p < 0.05$  (CC: n=4; DD: n=4; DC: n=4; CD: n=4).

## Hembras

Las hembras presentaron cierta similitud con los machos, sin embargo, éstas no presentaron diferencias entre grupos al inicio del experimento. El peso de los animales DD fue significativamente más bajo vs CC (~42%) y vs CD (~36%) desde la semana 1 y 2 respectivamente, y permaneció así hasta el final del experimento. Los animales con deficiencia prenatal (DC) tuvieron un peso, en promedio, 34% menor vs CC desde la semana 1 y hasta la semana 9, después de la cual alcanzaron el peso del grupo control. Al igual que lo observado en machos, este grupo (DC) tuvo también un peso 33% más bajo que los animales con deficiencia postnatal (CD). Éste último, tuvo un peso significativamente menor en un 25% vs CC únicamente en la semana 1. El grupo con deficiencia prenatal fue significativamente mayor en un 20% vs DD de la séptima a la novena semanas (ANOVA de dos vías: grupos-tiempo  $F_{(30,202)} = 1.602$ ,  $p < 0.05$ ) (Fig. 4).

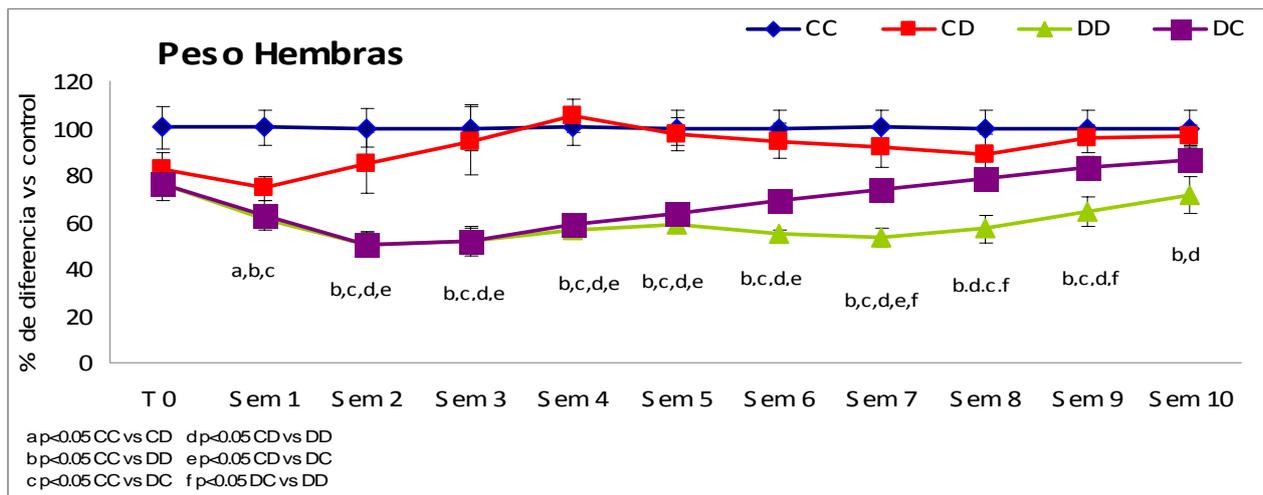


Fig. 4. Peso de ratas hembra. Los animales fueron pesados cada semana, desde las 48 horas de vida hasta la semana 10. Valores expresados en % de diferencia vs control. Media  $\pm$  EEM. Análisis ANOVA de 3 (grupo-tiempo-género), 2 (tiempo-grupos) y una vía (grupos) se usó la prueba post-hoc de Fisher, las diferencias se consideraron significativas cuando  $p < 0.05$  (CC:  $n=5$ ; DD:  $n=6$ ; DC:  $n=6$ ; CD:  $n=5$ ).

## Consumo de alimento

A lo largo del experimento, existieron diferencias significativas entre géneros, tiempo y grupo; las hembras consumieron mayor cantidad de alimento al compararlas con los machos (ANOVA de tres vías: género-tiempo-grupos  $F_{(18,306)} = 1.83$ ,  $p < 0.05$ ).

## Machos

Desde la 4ª y 5ª semanas, y hasta la 10ª, el consumo de alimento de los grupos DD y CD, respectivamente, fue significativamente menor vs la ingesta del grupo control (CC). Los animales con deficiencia prenatal de Zn (DC), consumieron menor cantidad de alimento vs CC desde la semana 4 y hasta la 7, después de lo cual, como se esperaba, alcanzaron el consumo de alimento del grupo CC. El grupo con deficiencia de Zn postnatal (CD) tuvo un consumo de alimento mayor vs DD en las primeras semanas de experimento, sin embargo, hacia la semana 8 el consumo fue disminuyendo e igualó al del grupo DD. Además, este grupo con deficiencia postnatal (CD) tuvo diferencias significativas del consumo de alimento vs los animales con deficiencia de Zn prenatal (DC) excepto en la semana 7; antes de ésta el consumo fue mayor y después de ésta fue significativamente menor (ANOVA de dos vías: grupos-tiempo  $F_{(18,150)}=9.27$ ,  $p<0.0001$ ) (Fig. 5).

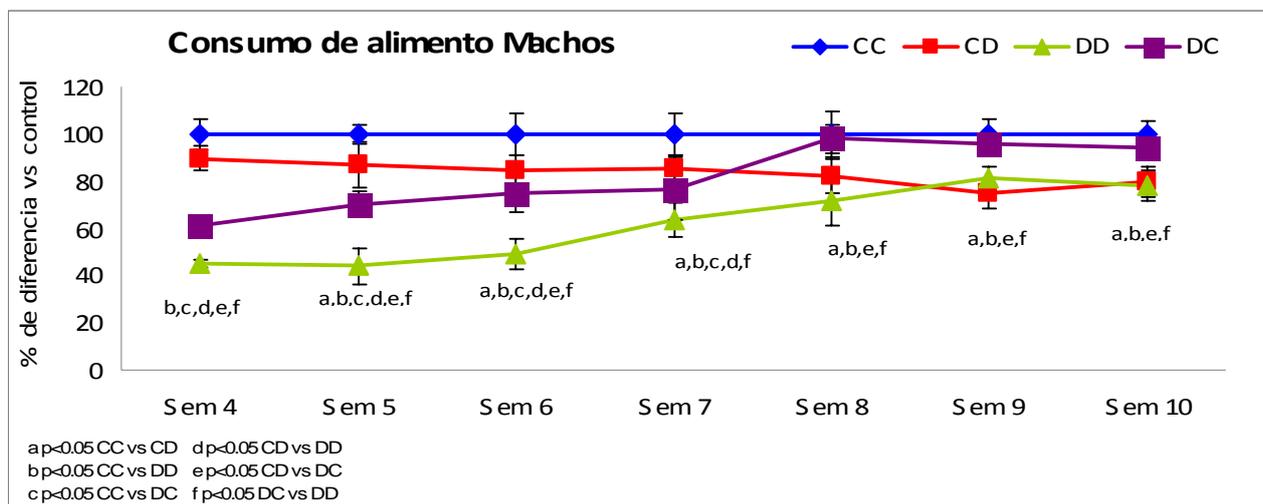


Fig. 5. Consumo de alimento de machos a lo largo del experimento. El consumo de alimento fue registrado diariamente, desde el destete y hasta la décima semana. Valores expresados en % de diferencia vs control, media  $\pm$  EEM. Análisis ANOVA de 3 (grupo-tiempo-género), 2 (tiempo-grupos) y una vía (grupos) se usó la prueba post-hoc de Fisher, las diferencias se consideraron significativas cuando  $p<0.05$  (CC: n=4; DD: n=4; CD: n=4; DC: n=4).

### Hembras

En las hembras, el grupo DD tuvo un consumo menor de alimento que se mantuvo casi hasta el final del experimento vs los grupos CC, CD y DC. El grupo con deficiencia postnatal (CD) únicamente tuvo un consumo de alimento 14% menor vs CC en las semanas 6 y 7. El grupo con deficiencia prenatal (DC) presentó una ingestión menor de alimento vs el CC desde el inicio y hasta la semana 8 del experimento y fue también menor vs CD hasta la 6ª semana. En la última semana de experimentación, no existieron diferencias significativas entre grupos. (ANOVA de dos vías: grupos-tiempo  $F_{(18,156)}=4.81$ ,  $p<0.0001$ ) (Fig.6).

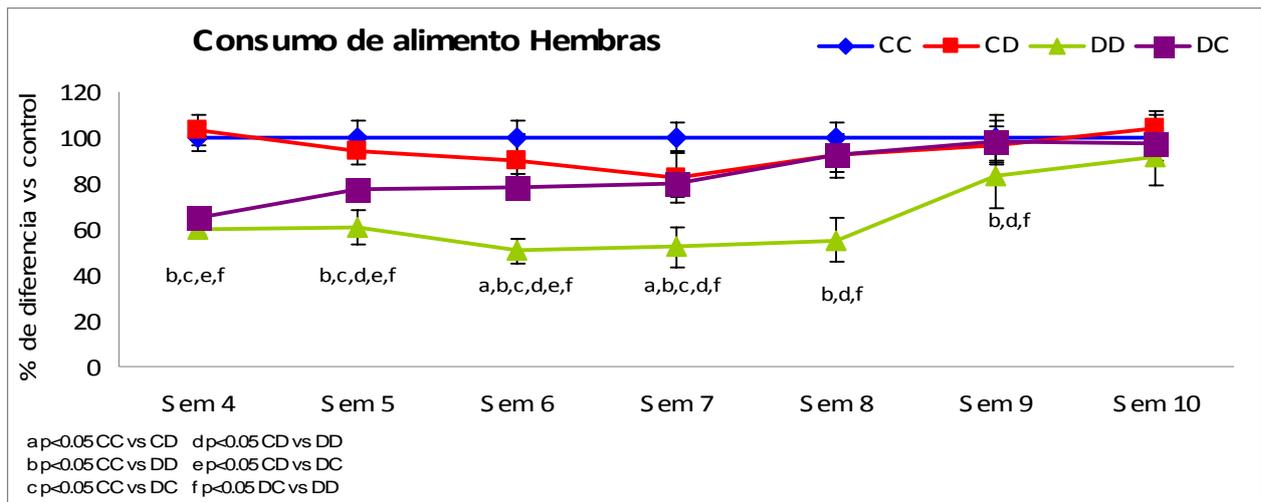


Fig. 6.. Consumo de alimento de hembras a lo largo del experimento. El consumo de alimento fue registrado diariamente, desde el destete y hasta la décima semana. Valores expresados en % de diferencia vs control, media  $\pm$  EEM. Análisis ANOVA de 3 (grupo-tiempo-género), 2 (tiempo-grupos) y una vía (grupos) se usó la prueba post-hoc de Fisher, las diferencias se consideraron significativas cuando  $p < 0.05$  (CC:  $n=5$ ; DD:  $n=6$ ; DC:  $n=6$ ; CD:  $n=5$ ).

### Eje tiroideo (Fig. 7 y 8)

#### ➤ Contenido de TRH hipotalámico

En el hipotálamo de machos, el contenido de TRH aumentó en el grupo DD ( $11.2 \pm 0.9$  pg/mg prot,  $p < 0.05$ ) y en CD ( $14.7 \pm 1$  pg/mg prot,  $p < 0.05$ ) vs CC ( $6.5 \pm 0.6$  pg/mg prot). Además, CD y DC ( $7.1 \pm 1.7$  pg/mg prot,  $p < 0.05$  vs DD) presentaron cambios contrarios con respecto a DD, aumento y disminución, respectivamente. En DC el contenido de TRH fue también significativamente menor vs CD. En hembras no se presentaron diferencias significativas, es decir, los cambios fueron específicos para el género de los animales (ANOVA de dos vías: género-grupos  $F_{(3,31)} = 12.086$ ,  $p < 0.0001$ ) (Fig. 7).

#### ➤ Concentración sérica de TSH

Al cuantificar la concentración de TSH, se observó una disminución en machos CD ( $370.04 \pm 3.415$  ng/ml) vs el grupo CC ( $123.084 \pm 22.78$  ng/ml,  $p < 0.05$ ). En hembras el grupo DC presentó una concentración significativamente más alta que los otros tres grupos experimentales (DC:  $129.69 \pm 9.56$  ng/ml vs CC:  $80.67 \pm 4.07$  ng/ml; vs CD:  $71.3 \pm 4.61$  ng/ml; vs DD:  $75.8 \pm 6.25$  ng/ml,  $p < 0.05$ ). Es decir hubo cambios específicos relacionados con el género de los animales (ANOVA de dos vías: género-grupos  $F_{(1,31)} = 10.042$ ,  $p < 0.01$ ) (Fig. 7 y 8).

➤ Concentración sérica de T<sub>4</sub>

La concentración de T<sub>4</sub> en machos de los grupos DD (3.9±0.5 µg/dl, p<0.05) y CD (4.4±0.35 µg/dl, p<0.05) disminuyó vs el grupo CC (5.7±0.5 µg/dl) (ANOVA 1 vía: grupos F<sub>(3,19)</sub> =3.4, p<0.05). En hembras no se presentaron diferencias significativas y no hubo diferencia de género en cuanto al contenido de T<sub>4</sub> (ANOVA de dos vías: género-grupos F<sub>(3,31)</sub> =2.26, p=0.1) (Fig. 7 y 8).

➤ Concentración sérica de T<sub>3</sub>

En lo que se refiere a la concentración de T<sub>3</sub>, en los machos el grupo DD presentó concentraciones mayores vs CC (48.9±3.11 vs 37.02±1.78 ng/dl, p<0.05) y también vs CD (48.9±3.11 vs 34.5±3.4 ng/dl, p<0.05). Por su parte, las hembras del grupo DC presentaron una mayor concentración de esta hormona al compararlo con los otros tres grupos experimentales (DC: 69.9±4.3 vs CC: 56.5±3.9; vs CD: 50.8±3.9; vs DD: 46.6±5.03 ng/ml, p<0.05). . Es decir hubo cambios específicamente relacionados con el género de los animales (ANOVA de dos vías: género-grupos F<sub>(3,28)</sub> =3.46, p<0.05) (Fig. 7 y 8).

➤ Actividad de tiroliberinasa

Al determinar la actividad de la tiroliberinasa, el único cambio que se observó, fue un aumento en la actividad de la enzima en los machos con deficiencia de Zn postnatal (CD) (52.7±6.4 nmol βNA/ml/hr) vs CC (40.0±5.6 nmol βNA/ml/hr, p<0.05). En hembras no existieron diferencias significativas entre grupos. Los cambios fueron específicos relacionados con el género de los animales (ANOVA de dos vías: género-grupos F<sub>(3,24)</sub> =0.182, p<0.01) (Fig. 7 y 8).

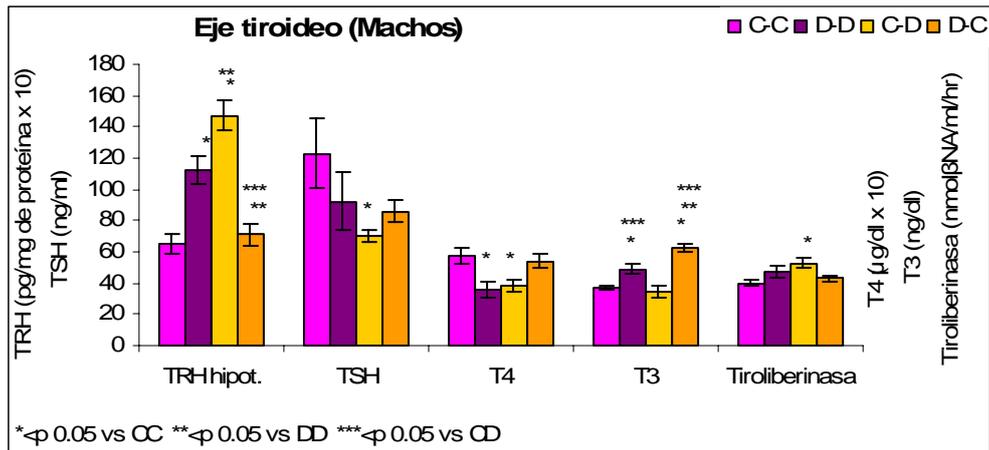


Fig. 7. Contenido de TRH en hipotálamo de machos adultos. Valores expresados en pg/mg de proteína (media  $\pm$  EEM) Concentración sérica de TSH. Valores expresados en ng/ml (media  $\pm$  EEM). Concentración sérica de T<sub>4</sub>. Valores expresados en  $\mu$ g/dl (media  $\pm$  EEM). Concentración sérica de T<sub>3</sub> Valores expresados en ng/dl (media  $\pm$  EEM) Concentración sérica de tiroliberinasa. Valores expresados en nmol $\beta$ NA/ml/hr (media  $\pm$  EEM) Análisis ANOVA, se usó la prueba post-hoc de Fisher, las diferencias se consideraron significativas cuando  $p < 0.05$ . (CC: n=4; DD: n=4; CD: n=4; DC: n=4).

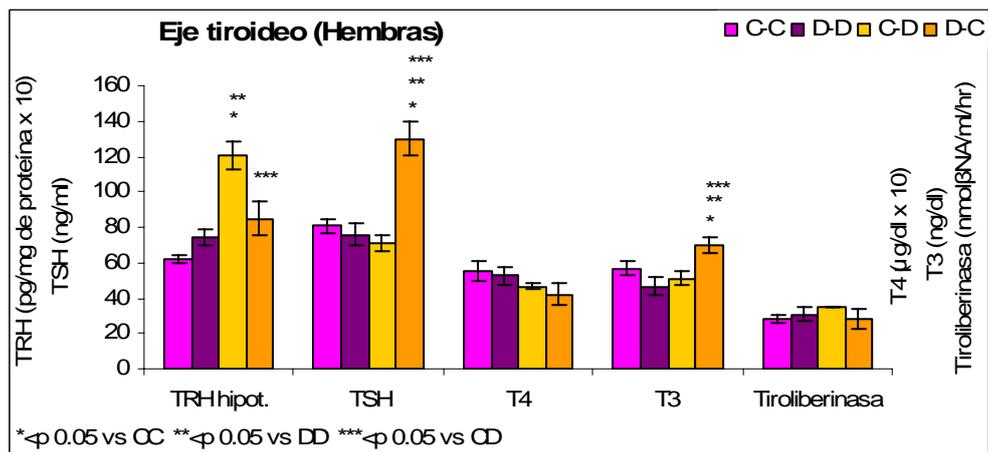


Fig. 8. Contenido de TRH en hipotálamo de hembras adultas. Valores expresados en pg/mg de proteína (media  $\pm$  EEM) Concentración sérica de TSH. Valores expresados en ng/ml (media  $\pm$  EEM). Concentración sérica de T<sub>4</sub>. Valores expresados en  $\mu$ g/dl (media  $\pm$  EEM). Concentración sérica de T<sub>3</sub> Valores expresados en ng/dl (media  $\pm$  EEM) Concentración sérica de tiroliberinasa. Valores expresados en nmol $\beta$ NA/ml/hr (media  $\pm$  EEM) Análisis ANOVA, se usó la prueba post-hoc de Fisher, las diferencias se consideraron significativas cuando  $p < 0.05$ . (CC: n=5; DD: n=6; DC: n=6; CD: n=5).

## Contenido de TRH y actividad de PPII en el hipotálamo y regiones del sistema límbico

### A) Contenido de TRH (Fig. 9 y 10).

Respecto al contenido de TRH, en el núcleo accumbens no existieron diferencias significativas entre género, pero sí entre grupos (ANOVA de 2 vías: género  $F_{(1,30)}=0.32$ ,  $p=0.57$ ; grupos  $F_{(3,30)}=9.431$ ,  $p<0.001$ , género-grupo  $F_{(3,30)}=4.706$ ,  $p<0.01$ ) En machos, el contenido de TRH fue menor en DD ( $1.6\pm 0.5$  pg/mg prot,  $p<0.05$ ) y CD ( $1.3\pm 0.3$  pg/mg prot,  $p<0.05$ ) vs CC ( $5.5\pm 1.2$  pg/mg prot) y también vs DC ( $4.8\pm 0.7$  pg/mg prot,  $p<0.05$ ). En hembras, no existieron diferencias significativas.

En la corteza frontal tampoco existieron diferencias entre géneros pero sí existieron entre grupos (ANOVA de 2 vías: género  $F_{(1,31)}=1.395$ ,  $p=0.24$ ; grupos  $F_{(3,31)}=4.806$ ,  $p<0.01$ , género-grupo  $F_{(3,31)}=0.326$ ,  $p=0.8067$ ). En machos, se observó un aumento en el contenido de TRH en CD vs CC ( $4.3\pm 0.7$  pg/mg prot vs  $2.6\pm 0.4$  pg/mg prot,  $p<0.05$ ) y una disminución en DC ( $1.6\pm 0.3$  pg/mg prot,  $p<0.05$ ) vs CD. En hembras, no existieron diferencias significativas.

En lo que se refiere a la amígdala, machos y hembras se comportaron de la misma manera, sin embargo hubo diferencias entre grupos (ANOVA de 2 vías: género  $F_{(1,29)}=0.044$ ,  $p=0.83$ ; grupos  $F_{(3,29)}=5.633$ ,  $p<0.01$ , género-grupo  $F_{(3,29)}=0.34$ ,  $p=0.794$ ). En machos, se observó una disminución importante en el contenido del péptido en los grupos DD y CD vs CC ( $2.7\pm 0.3$  y  $3.2\pm 0.5$  vs  $36.9\pm 17.3$ ,  $p<0.05$ ). En hembras, no existieron diferencias significativas.

Finalmente, en el hipocampo existieron diferencias entre géneros y grupos (ANOVA de 2 vías: género  $F_{(1,29)}=4.91$ ,  $p<0.05$ ; grupos  $F_{(3,29)}=10.304$ ,  $p<0.0001$ , género-grupo  $F_{(3,29)}=2.71$ ,  $p=0.06$ ). En machos, no se observaron diferencias entre grupos. En hembras, el hipocampo fue la única región cerebral en la que se observaron cambios en el contenido de TRH, ya que se presentó un aumento en CD ( $22.5\pm 0.9$  pg/mg prot,  $p<0.05$ ) con respecto a los otros 3 grupos. Por su parte el contenido del péptido en DC ( $9.8\pm 2.4$  pg/mg prot,  $p<0.05$ ) fue mayor vs CC ( $5.1\pm 1.1$  pg/mg prot.).

### B) Actividad de PPII.

En lo referente a la actividad de PPII, en hipotálamo de machos, se observaron cambios, evidenciados por un aumento en la actividad específica de PPII en el grupo DD vs CC ( $7.8\pm 0.7$  vs  $2.7\pm 1.5$  pmol/min/mg prot;  $p<0.05$ ) aumento que también fue observado vs CD ( $2.7\pm 0.7$  pmol/min/mg prot;  $p<0.05$ ).

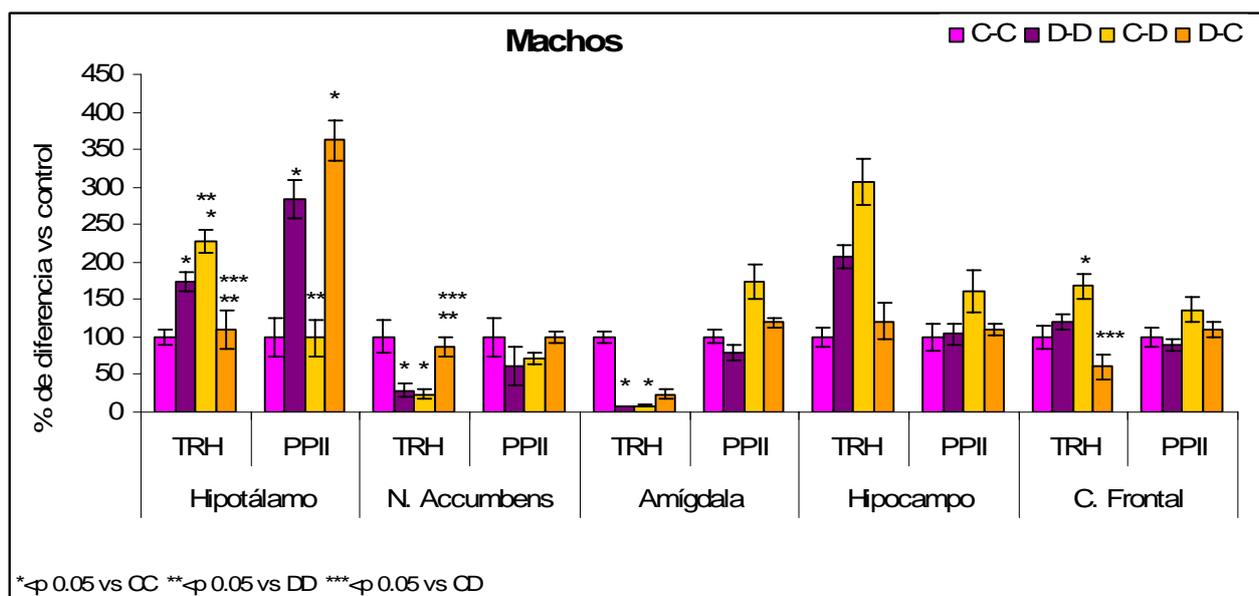


Fig. 9. Contenido de TRH y actividad específica de PPII en regiones del sistema límbico de machos adultos. Valores expresados en % de diferencia vs control (media  $\pm$  EEM). Análisis ANOVA, se usó la prueba post-hoc de Fisher, las diferencias se consideraron significativas cuando  $p < 0.05$ . (CC: n=4; DD: n=4; CD: n=4; DC: n=4).

En amígdala de machos, no se observaron cambios entre grupos. En hembras, el grupo DC ( $3.0 \pm 0.14$  pmol/min/mg prot) presentó un aumento vs CC ( $2.3 \pm 0.1$  pmol/min/mg prot;  $p < 0.05$ ) y también vs CD ( $2.2 \pm 0.05$  pmol/min/mg prot;  $p < 0.05$ ).

En hipocampo de machos, no se observaron cambios entre grupos. En hembras el grupo CD ( $46.8 \pm 3.4$  pmol/min/mg prot;  $p < 0.05$ ) presentó un aumento en la actividad de la enzima vs CC ( $25.7 \pm 6.1$  pmol/min/mg prot;  $p < 0.05$ ).

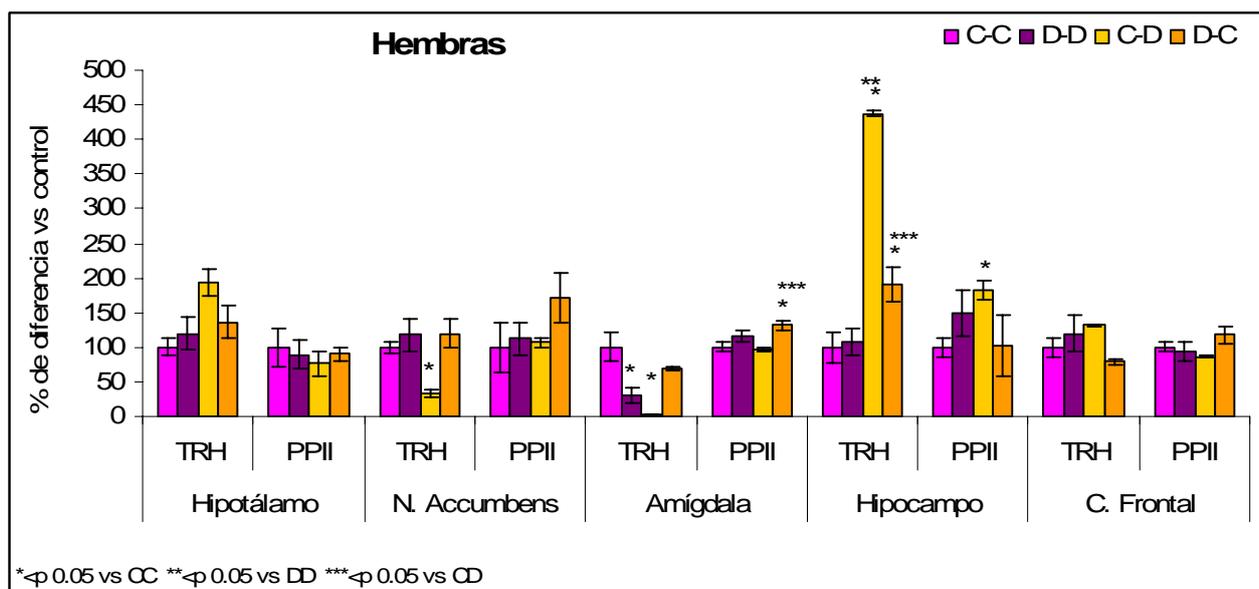


Fig. 10. Contenido de TRH y actividad específica de PPII en regiones del sistema límbico de hembras adultas. Valores expresados en % de diferencia vs control (media  $\pm$  EEM). Análisis ANOVA, se usó la prueba post-hoc de Fisher, las diferencias se consideraron significativas cuando  $p < 0.05$ . (CC: n=5; DD: n=6; DC: n=6; CD: n=5).

Actividad de aminopeptidasa N (APN) en hipotálamo y regiones del sistema límbico (Fig. 11 y 12)

Se determinó la actividad de la enzima APN como un control de la especificidad del efecto de la deficiencia de Zn sobre la PPII y el metabolismo de TRH, ya que esta es una enzima que al igual que la PPII es dependiente de Zn, pero no se relaciona con el eje HPT. Esta enzima inactiva péptidos que tienen aminoácidos neutros del lado amino terminal, colaborando en la digestión de las proteínas de la dieta y en la inactivación de péptidos neuroactivos como las encefalinas (Roques *et al.*, 1993).

No se observaron similitudes en el comportamiento de la actividad de PPII y APN en respuesta a una dieta deficiente de Zn. En amígdala no existieron cambios entre género ni entre grupos (ANOVA de 2 vías: género  $F_{(1,28)}=0.101$ ,  $p=0.75$ ; grupos  $F_{(3,28)}=0.37$ ,  $p=0.76$ , género·grupo  $F_{(3,28)}=1.25$ ,  $p=0.31$ ). En hipocampo no existieron cambios entre género pero sí entre grupos (ANOVA de 2 vías: género  $F_{(1,24)}=0.117$ ,  $p=0.73$ ; grupos  $F_{(3,24)}=4.62$ ,  $p<0.05$ , género·grupo  $F_{(1,24)}=2.506$ ,  $p=0.08$ ). En machos fue evidente una disminución en la actividad de APN en la amígdala del grupo DD ( $55.1\pm 8.3$  pmol  $\beta$ NA/min/mg prot.,  $p<0.05$ ) y en hipocampo del grupo DC ( $9.7\pm 2.5$  pmol  $\beta$ NA/min/mg prot.,  $p<0.05$ ) vs el control (Amígdala:  $85.2\pm 1.0$  pmol  $\beta$ NA/min/mg prot.; hipocampo:  $29.0\pm 5.0$  pmol  $\beta$ NA/min/mg prot.).

En hembras, al igual que lo observado en la actividad de PPII, la actividad de APN se encuentra alterada en amígdala e hipocampo, pero el comportamiento es diferente. En la amígdala se observó un aumento en la actividad en el grupo CD vs control ( $98.9\pm 3.9$  vs  $71.6\pm 5.0$  pmol  $\beta$ NA/min/mg prot.,  $p<0.05$ ). Al contrario, en el hipocampo existió una disminución en la actividad específica de la enzima en DD ( $13.4\pm 1.7$  pmol  $\beta$ NA/min/mg prot.) y DC ( $7.1\pm 2.0$  pmol  $\beta$ NA/min/mg prot) vs control ( $28.9\pm 6.4$  pmol  $\beta$ NA/min/mg prot.,  $p<0.05$ ).

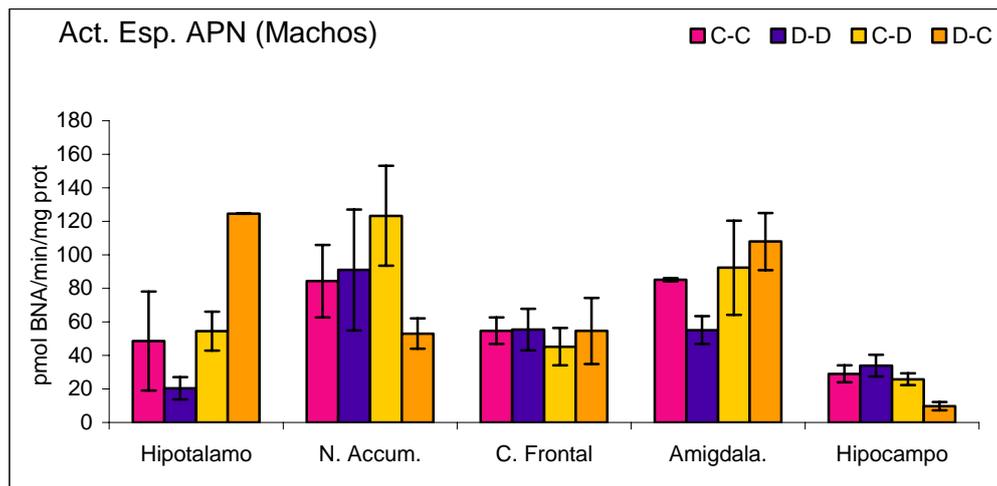


Fig. 11. Actividad específica de APN en regiones del sistema límbico de machos adultos. Valores expresados en pmol  $\beta$ NA/min/mg prot (media  $\pm$  EEM). Análisis ANOVA, se usó la prueba post-hoc de Fisher, las diferencias se consideraron significativas cuando  $p < 0.05$ . (CC: n=4; DD: n=4; CD: n=4; DC: n=4).

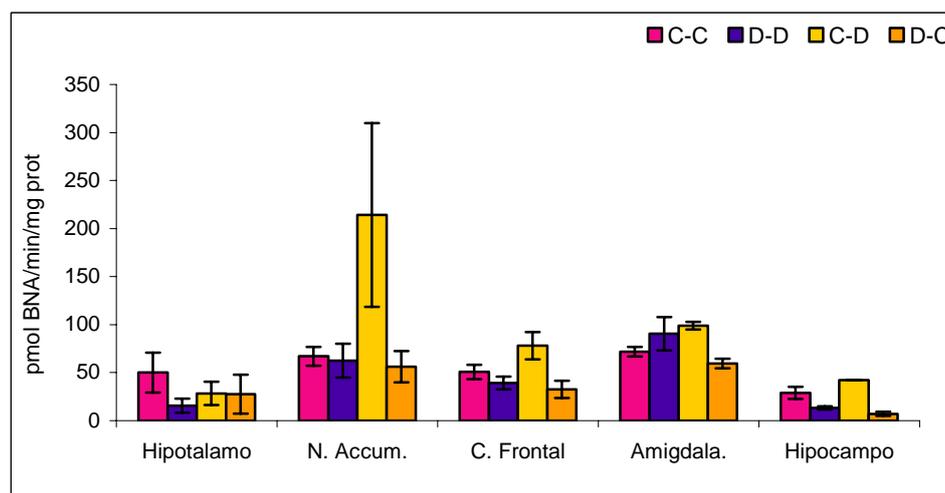


Fig. 12. Actividad específica de APN en regiones del sistema límbico de hembras adultas. Valores expresados en pmol  $\beta$ NA/min/mg prot (media  $\pm$  EEM). Análisis ANOVA, se usó la prueba post-hoc de Fisher, las diferencias se consideraron significativas cuando  $p < 0.05$ . (CC: n=5; DD: n=6; DC: n=6; CD: n=5).

➤ Concentración sérica de corticosterona (Fig. 13)

La corticosterona es un parámetro para conocer el estado de estrés agudo de las ratas, además esta hormona está involucrada en la regulación del eje tiroideo.

No existieron cambios entre género pero sí entre grupos en la concentración sérica de corticosterona (ANOVA de 2 vías: género  $F_{(1,31)}=3.17$ ,  $p=0.08$ ; grupos  $F_{(3,31)}=15.64$ ,  $p < 0.0001$ , género-grupo  $F_{(3,31)}=11.32$ ,  $p < 0.0001$ ).

### Machos

Los machos del grupo DD presentaron una menor concentración de corticosterona vs el grupo CC ( $120.1 \pm 34.2$  vs  $609.3 \pm 126.9$  ng/ml,  $p < 0.05$ ). Asimismo, la concentración de esta hormona en DD fue menor vs CD ( $533.7 \pm 71.2$  ng/ml,  $p < 0.05$ ) y vs DC ( $522.3 \pm 68.5$  ng/ml,  $p < 0.05$ ).

### Hembras

Las hembras presentaron un perfil de CORT similar a los machos. El grupo DD ( $549.6 \pm 68.9$  ng/ml,  $p < 0.05$ ) tuvo una menor concentración de esta hormona vs CC ( $1032.9 \pm 117.9$  ng/ml); además los grupos CD ( $330.0 \pm 55.3$  ng/ml,  $p < 0.05$ ) y DC ( $273.5 \pm 11.5$  ng/ml,  $p < 0.05$ ) presentaron una menor concentración de CORT comparados con DD y CC.

En general, parece que la condición de deficiencia de Zn en la dieta, ya sea en la etapa pre o postnatal tiende a disminuir este parámetro de estrés crónico.

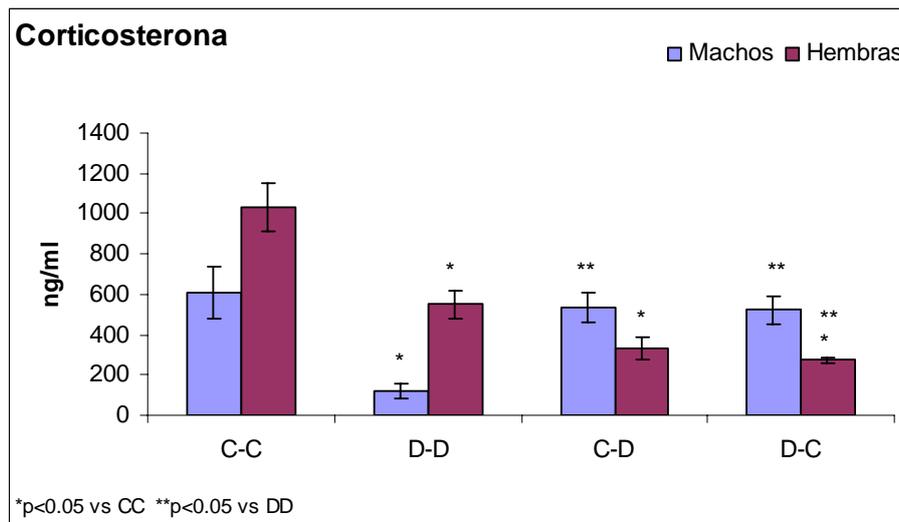


Fig. 13. Concentración sérica de corticosterona en machos y hembras adultos. Valores expresados en ng/ml (media  $\pm$  EEM) Machos C-C  $609.3 \pm 126.9$  ng/ml; hembras C-C  $1032.9 \pm 117.9$  ng/ml. Análisis ANOVA, se usó la prueba post-hoc de Fisher, las diferencias se consideraron significativas cuando  $p < 0.05$ . (Machos: (CC:  $n=4$ ; DD:  $n=4$ ; CD:  $n=4$ ; DC:  $n=4$ ; Hembras: CC:  $n=5$ ; DD:  $n=6$ ; DC:  $n=6$ ; CD:  $n=5$ ).

## RATAS SACRIFICADAS DESPUÉS DEL DESTETE

### Contenido de TRH (Fig. 14)

La deficiencia de Zn no afectó de manera significativa el contenido de TRH en las regiones estudiadas de ratas sacrificadas inmediatamente después del destete (día 21 postnatal).

### Actividad específica de PPII (Fig. 15)

Las crías de madres alimentadas con dieta deficiente de Zn presentaron un aumento en la actividad de la PPII en hipotálamo y amígdala comparadas con las crías de madres sometidas a la dieta control (Hipotálamo:  $164.5 \pm 23.96$  vs  $103.33 \pm 11.4$  pmol  $\beta$ NA/min/mg prot; amígdala:  $95.3 \pm 4.47$  vs  $77.17 \pm 2.54$  pmol  $\beta$ NA/min/mg prot.,  $p < 0.05$ ).

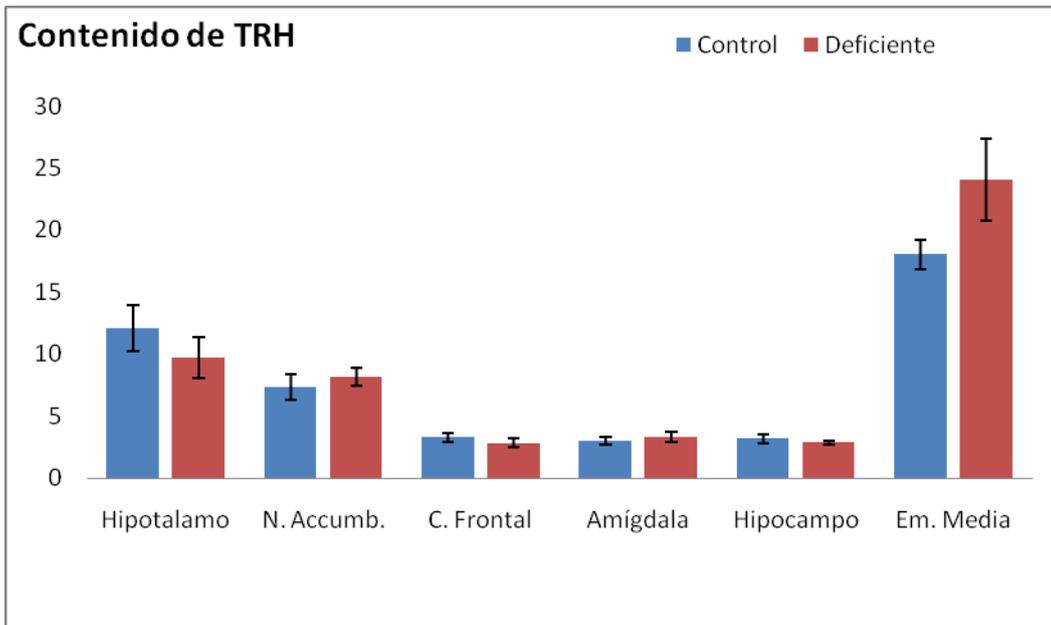


Fig. 14. Contenido de TRH en regiones del sistema límbico de ratas sacrificadas al destete, crías de madres alimentadas con dieta control o deficiente de Zn. Valores expresados en pg de TRH/mg prot. (media  $\pm$  EEM). Análisis ANOVA, se usó la prueba post-hoc de Fisher, las diferencias se consideraron significativas cuando  $p < 0.05$ . (Control  $n=10$ ; Deficiente:  $n=8$ ).

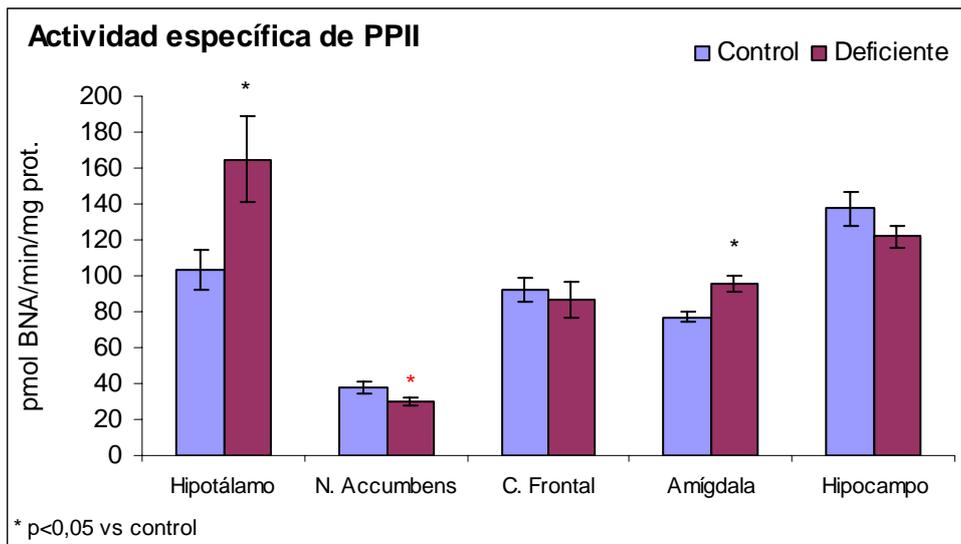


Fig. 15. Actividad específica de PPII en regiones del sistema límbico de ratas sacrificadas al destete, crías de madres alimentadas con dieta control o deficiente de Zn. Valores expresados en pmol  $\beta$ NA/min/mg prot. (media  $\pm$  EEM). Análisis ANOVA, se usó la prueba post-hoc de Fisher, las diferencias se consideraron significativas cuando  $p < 0.05$ . (Control  $n=10$ ; Deficiente:  $n=8$ ).

## X. DISCUSIÓN

A pesar de los eventos encargados del mantenimiento de la homeostasis del Zn, que involucran la actividad de al menos 10 proteínas de la familia ZnT (Liuzzi y Cousins, 2004), 15 miembros de la familia ZIP (Eide, 20004), y 4 distintas isoformas de las metalotioneínas (Maret, 2003), la deficiencia aguda (3 días) de este mineral en la dieta disminuye rápidamente la concentración plasmática de Zn, aproximadamente a valores 5 veces menores que un grupo con alimentación adecuada (Reeves y O'Dell, 1985); y si esta dieta se mantiene por algunos días o semanas, la concentración de Zn en los diferentes órganos también empieza a disminuir (Hurley *et al.*, 1982). Esta reducción en la concentración plasmática de Zn se refleja en la menor actividad de metaloenzimas dependientes de este mineral, por ejemplo de la enzima convertidora de angiotensina (Reeves y O'Dell, 1985), fosfatasa alcalina y Cu-Zn superóxido dismutasa (Sun *et al.*, 2005), convirtiéndolas en candidatas para evaluar el estado del Zn en los organismos.

La edad y la duración de la deficiencia de Zn tienen efectos diferentes sobre la expresión de sus transportadores. La deficiencia de Zn por dos semanas, aumenta el mRNA de ZIP4 y promueve el tráfico de la proteína hacia el lado apical de la membrana de enterocitos de ratones (Dufner-Beattie *et al.*, 2003), eventos encaminados a aumentar la captación del mineral en situaciones de deficiencia. En contraste, bajo condiciones de deficiencia de Zn desde el día embrionario 8, se regula a la baja el mRNA de MT-1 en el intestino y saco embrionario de ratones con una velocidad alta, observándose después de 3 días en el intestino y, después de 6 días en el saco embrionario (Dufner-Beattie *et al.*, 2003). Una dosis aguda de Zn por vía oral aumenta aproximadamente 8 veces el mRNA del transportador ZnT1 en el intestino. (Mcmahon y Cousins, 1998). Por lo que un aporte adecuado de Zn en la dieta y una tasa de absorción intestinal eficiente son esenciales para el mantenimiento de un estado normal de este mineral en el cuerpo.

## Peso y Consumo de alimento

Al igual que en otros estudios (McNall *et al.*, 1995; Hall *et al.*, 2005), el peso de los grupos experimentales de ambos sexos, ya fuera con deficiencia de Zn prenatal, postnatal o ambas, fue menor vs el control, lo que apoya el hecho de que la deficiencia de Zn durante la gestación provoca retraso en el crecimiento intrauterino y menor ganancia de peso en la etapa postnatal (Golub *et al.*, 1984; Dura Trave *et al.*, 1986; Jameson, 1993). La falta de este metal en la dieta, induce un deterioro del metabolismo proteico evidenciado por alteraciones en la tasa de síntesis de DNA y RNA, reducción de la actividad de la RNA polimerasa (Terhune y Sandstead, 1972) y formación anormal o inestabilidad de los poliribosomas (Fosmire, *et al.*, 1976), entre otras.

La falta de Zn en la alimentación, provoca anorexia, este efecto se observa después de 3 a 5 días de seguir una dieta deficiente en el metal, (Shay y Manigan, 2000) y se debe a la alteración en el metabolismo de diversas moléculas periféricas o centrales, señales que en última instancia son integradas por centros que controlan el apetito y la saciedad en el sistema nervioso central, para reducir el consumo de alimento. Dentro de estas moléculas involucradas en la regulación de la conducta alimentaria que se afectan por la deficiencia de Zn se encuentran: NPY, leptina, noradrenalina, galanina y la hormona liberadora de corticotropina (CRH) (Mangian *et al.*, 1998; Lee *et al.*, 1998; Huntington *et al.*, 2002; Selvais *et al.*, 1997; Kwun *et al.*, 2007); este efecto anorexigénico fue más evidente en machos; al final del experimento, los grupos experimentales de hembras, consumieron la misma cantidad de alimento que el grupo control (CC).

Debido a que en machos, al final del experimento, el consumo de alimento del grupo CD se mantuvo más bajo que el de CC, pero no así DC, es probable que los animales sean más susceptibles a las alteraciones en el comportamiento alimentario inducidos por una dieta deficiente en Zn durante la etapa postnatal y que de alguna manera logran mantener la homeostasis del Zn si la deficiencia se da en la etapa prenatal; tal vez debido a que durante la etapa embrionaria, los animales expuestos a una alimentación baja en Zn, aumentan la absorción del mineral (Walsh *et al.*, 1994), por una elevación en la expresión del transportador ZIP4 en enterocitos y células del endodermo (Dufner-Beattie *et al.*, 2003). Además de la inducción del mRNA de ZIP4 en enterocitos, también hay una acumulación mayor de la proteína en la superficie apical durante periodos de

deficiencia de Zn. En estudios *in vitro* se ha observado un aumento en la absorción del Zn en el lado apical y transporte hacia el lado basolateral de células Caco-2, secundario a bajas concentraciones del mineral en el medio de cultivo (Reeves *et al.*, 2001). En preparaciones de células intestinales del borde en cepillo de ratas deficientes de Zn, la tasa de captura del mineral de células es mayor al compararla con células derivadas de ratas con consumo adecuado de Zn (Menard y Cousins, 1983), esto confirma que al menos un componente de la absorción del Zn es regulable por la dieta. Es posible que los cambios inducidos por la concentración de Zn en el medio en las tasas de transporte, se deba a la regulación a la alta y/o a la baja de proteínas de salida o entrada de Zn pertenecientes a las familias ZIP y ZnT (Reeves *et al.*, 2001). Sin embargo, aún se desconoce el efecto que pudiera tener la etapa de la vida en la que se presenta la deficiencia de Zn, sobre la regulación de estos mecanismos de absorción, aunque sí hay evidencia de una regulación diferencial del metabolismo del Zn en crías de madres expuestas a consumo de etanol en la etapa de gestación o lactancia (Murillo-Fuentes *et al.*, 2007).

Como se comentó anteriormente, los machos de los grupos con alimentación deficiente de Zn, presentaron un peso menor vs el control debido a la disminución en el consumo de alimento a lo largo del estudio. Además, la deficiencia de Zn afecta el metabolismo de la hormona del crecimiento y puede ser un factor limitante en la regulación del crecimiento (Nishi, 1996); la pérdida de peso de ratas sometidas a una dieta deficiente de Zn pudo también deberse a deshidratación (Norii, 2008). En etapas tempranas del experimento, el grupo con deficiencia postnatal (CD) consumió mayor cantidad de alimento comparado con el grupo con deficiencia prenatal (DC) pero esta tendencia se revirtió a partir de la semana 7, lo que indica que la disminución tanto del peso como del consumo de alimento, son capaces de regresar a la normalidad cuando se sustituye la dieta deficiente de Zn administrada durante la etapa prenatal, por una dieta completa después del destete.

En machos, a pesar de que en la mayor parte del experimento, el grupo CD mantuvo un peso mayor vs DD, al final no hubo diferencia entre ambos, lo que indica que la deficiencia postnatal de Zn no afecta inmediatamente el peso de los animales, probablemente debido a que los efectos de la deficiencia de Zn en el crecimiento pueden ser compensados por el contenido de este mineral en el músculo.

En hembras, al final del experimento, no existieron diferencias entre grupos en cuanto a consumo de alimento, sin embargo, el grupo con alimentación deficiente (DD), mantuvo un peso menor comparado con los animales que siguieron la dieta control en la etapa prenatal (CC y CD). La falta de ganancia de peso en animales deficientes en Zn ha sido reportada en otros estudios, en donde animales que son pareados al consumo de alimento de las ratas deficientes de Zn, pero con ingestión de un alimento balanceado, tienen una mayor ganancia de peso (Roth, 2003) comparados con los animales deficientes de Zn. Esto es debido probablemente a que estos últimos padecen de una reducción en la digestibilidad por falta de proteasas, disminución en la utilización intermedia del alimento y una malabsorción de nutrimentos (Taneja y Arya, 1992). Además, ratas macho en crecimiento (3 semanas de edad), sometidas a tres semanas de dieta deficiente en Zn, presentan un desarrollo óseo deficiente que no es revertido por un periodo de alimentación *ad libitum* con una dieta completa durante tres semanas (Hosea, *et al.*, 2003); lo cual resulta en deterioro en el crecimiento de los animales y aumenta el riesgo de la aparición de osteoporosis en etapas posteriores de la vida ya que la deficiencia de Zn limita el pico de masa ósea alcanzada en etapas tempranas de la vida (Javaid y Cooper, 2002). Cabe mencionar que en hembras, el peso del grupo con alimentación deficiente de Zn en la etapa prenatal (DC) no presentó diferencias hacia el final del experimento vs DD, lo que indica que la deficiencia de Zn en etapas tempranas del desarrollo es más deletérea que la que ocurre en etapas más tardías de la vida. Además, el grupo con deficiencia postnatal (CD) alcanzó un peso significativamente mayor vs DD y se mantuvo con un peso similar al de ratas CC. Esto habla de la diferencia de género en cuanto a la regulación del peso secundario a deficiencia pre y/o postnatal de Zn.

Las hembras de los grupos DD y CD, perdieron menos peso que los machos comparados con su respectivo grupo control. Esto pudo deberse a que las hembras poseen mecanismos de regulación homeostática más eficientes que los machos; las hembras parecen afectarse menos en términos de crecimiento y pérdida de tejido corporal cuando son sometidas a períodos crónicos de balance energético negativo (Cortright y Koves, 2000). En las diferencias de género en el control de la homeostasis energética está involucrada la sensibilidad diferencial del cerebro a los efectos catabólicos de la leptina e insulina (Woods *et al.*, 2003), hormonas que estimulan

receptores específicos en el núcleo arcuato del hipotálamo (Niswender y Schwartz, 2003; Woods, 1998), disminuyen la ingestión de alimentos y aumentan el gasto de energía (Cone *et al.*, 2001). El cerebro de ratas macho es más sensible a la insulina, mientras que el cerebro de las hembras es más sensible a la leptina. Esto se debe a que los estrógenos actúan en el cerebro incrementando la sensibilidad a la leptina, disminuyendo la sensibilidad a la insulina, favoreciendo el depósito de grasa subcutánea en lugar de la visceral (Clegg *et al.*, 2006). La deficiencia de Zn en la dieta afecta el metabolismo de ambas hormonas: se relaciona con bajos niveles de leptina sérica (Mangian *et al.*, 1998) secundarios a la pérdida de tejido adiposo por disminución de la ingestión de alimentos (Gaetke *et al.*, 2002), y una disminución del mRNA de leptina en tejido adiposo blanco epididimal (eWAT) independiente de la ingestión de alimentos (In-Sook, 2007). Por su parte, durante periodos de deficiencia dietética de Zn, hay una disminución de los efectos periféricos de la insulina (Tallman y Taylor, 1999).

Por otro lado, la inactivación de la termogénesis dependiente del género, en el tejido adiposo pardo (BAT), se ha propuesto como uno de los posibles mecanismos para la conservación de energía en respuesta a la restricción de alimentos (Valle *et al.*, 2007); las hembras son capaces de modular su gasto energético mediante una disminución en el contenido de la proteína desacopladora 1 (UCP1) en el BAT (Valle *et al.*, 2005). Las hembras alimentadas *ad libitum* tienen menor eficiencia energética (gastan más energía) vs los machos, diferencia que desaparece cuando ambos sexos son sometidos a restricción calórica (Valle *et al.*, 2005). Esta tendencia en la eficiencia energética ha permitido a las hembras una mayor habilidad de conservar la energía en períodos de restricción de alimentos (Hill *et al.*, 1986; Mohan *et al.*, 1983). En las diferencias de género en la respuesta termogénica en el BAT en ratas, se ha implicado a la relación entre los receptores adrenérgicos  $\alpha_2/\beta_3$  con efectos antagónicos en la regulación de la termogénesis (Rodríguez *et al.*, 2001). El receptor inhibitorio adrenérgico  $\alpha_{2A}$ -AR tiene mayor afinidad por las catecolaminas, la relación más alta de  $\alpha_{2A}/\beta_3$ -AR en hembras sometidas a restricción de alimentos, parece indicar que las catecolaminas tienen un umbral más alto para poder desencadenar respuestas termogénicas y lipolíticas (Valle *et al.*, 2007). El BAT y su innervación simpática son importantes para los cambios en el gasto energético mediados por estrógenos (Bartness y Wade, 1984). Las hormonas

sexuales alteran las señales lipolíticas y termogénicas al modificar la respuesta y/o densidad de los receptores  $\beta$ - y  $\alpha_{2A}$ -AR en el adipocito (Pedersen *et al.*, 2001).

### Eje tiroideo

La deficiencia de Zn causa hipotiroidismo primario, evidenciado por menores concentraciones séricas  $T_3$ ,  $T_4$  y disminución en el contenido de TRH hipotalámico (Baltaci *et al.*, 2003; Lukaski *et al.*, 1992; Morley *et al.*, 1980). La deficiencia de Zn inhibe la síntesis de TRH (Morley *et al.*, 1980; Pekary *et al.*, 1993); sin embargo esto no coincide con nuestros resultados, ya que observamos aumento en el contenido de TRH hipotalámico de machos deficientes de Zn. Es probable que la disminución en las concentraciones de  $T_4$  se deban a lesiones en la glándula tiroides inducidas por la deficiencia de Zn (Gupta *et al.*, 1997). En machos DD y CD se observó una disminución en la concentración de  $T_4$  que se revirtió en animales con dieta control postnatal (DC); probablemente esta disminución de  $T_4$  provocó un aumento en el contenido hipotalámico de TRH en estos grupos experimentales. Sin embargo, la concentración de  $T_3$  (normal en CD y alta en DD), indica una retroalimentación negativa adecuada en los animales deficientes postnatalmente, no así en los mantenidos con dieta deficiente durante toda su vida, en los cuales también parece no haber respuesta de TSH a la elevación de TRH, es probable que la falta de Zn haya provocado un mal funcionamiento del receptor de  $T_3$ , afectando así la retroalimentación negativa. TRH, TSH y  $T_4$ , regresaron a valores similares a los del grupo control en animales DC, lo que implica que el hipotiroidismo inducido por una alimentación deficiente en Zn puede revertirse una vez que éste es regresado a la dieta. Esto coincide con estudios realizados en humanos (Licastro *et al.*, 1992; Maxwell y Volpe, 2007; Nishiyama, 1994; Wada y King, 1986) y animales de laboratorio (Baltaci *et al.*, 2004) sometidos a una dieta deficiente en Zn y posterior reposición del contenido de este mineral en la dieta, donde se observa normalización de las concentraciones de las hormonas tiroideas y la tasa metabólica basal. Por otro lado, la elevación de la concentración de  $T_3$  en DD y DC evidencia que la deficiencia prenatal de Zn puede causar de un hipertiroidismo primario y una regulación funcional en DC pero no en DD.

Las hembras presentaron menos alteraciones en el funcionamiento del eje HPT por la deficiencia de Zn lo cual ayuda a explicar la menor pérdida de peso de este género. En los animales DD y CD se normalizaron los parámetros analizados, sin embargo la

deficiencia prenatal fue causa de hipertiroidismo secundario. Se ha observado una disminución de TSH después de la administración intravenosa de Zn (Farooqi *et al.*, 2000), por lo que es probable que la deficiencia de Zn tenga el efecto contrario sobre la concentración de TSH, sin embargo, se desconoce la causa de la diferencia de género en este efecto. Es claro que la desnutrición materna durante el embarazo y la lactancia están relacionados con un retraso en el desarrollo y maduración del eje HPT de las crías.

### Contenido de TRH y actividad de PPII en regiones del sistema límbico

La deficiencia de Zn durante el desarrollo prenatal, período de crecimiento rápido del cerebro, tiene los mismos efectos que la desnutrición calórico-proteica (Gibson *et al.*, 1991). Enzimas dependientes de Zn están afectadas en procesos críticos para la proliferación celular. Sin embargo, la proliferación celular extensa en el cerebro ocurre sólo durante el desarrollo temprano, y la concentración de Zn durante el desarrollo postnatal parece estar muy regulada (Golub *et al.*, 1995). Entonces, el estado cerebral del Zn está afectado de manera importante por la deficiencia de Zn en la dieta (Szerdahelyi *et al.*, 1982; Wallwork *et al.*, 1983), aunque esto no ha sido confirmado en otros estudios (Prohaska, 1977; Prohaska *et al.*, 1974).

La deficiencia de Zn altera la regulación del sistema nervioso autónomo y el desarrollo hipocampal y cerebelar (Georgieff, 2007). En ratas, la deficiencia de Zn por 12 semanas, disminuye en un 30% la concentración de Zn en fibras musgosas del hipocampo (Wensink *et al.*, 1987), región cerebral que es más susceptible a la deficiencia de Zn en la dieta (Takeda *et al.*, 2001). Estas alteraciones pueden traducirse en deterioro del aprendizaje y la memoria (Frederickson *et al.*, 1990). Por otro lado, la deficiencia de Zn también disminuye de manera importante la concentración del metal en la amígdala, lo cual deteriora la apreciación de los olores en humanos y animales (Mackay-Sim y Dreosti, 1989). Las alteraciones fisiológicas en estas regiones del sistema límbico son reversibles cuando se repone el Zn en la dieta (Ducray *et al.*, 2002).

Una ingestión baja de Zn durante el embarazo y la lactancia se ha asociado con déficit de atención en neonatos y disminución de las funciones motoras a los 6 meses de edad. La suplementación con Zn produce un mayor desarrollo motor en infantes con bajo peso

al nacer (Bhatnagar y Taneja, 2001). Sin embargo aún no se conocen con exactitud los mecanismos biológicos que subyacen a estas alteraciones, así como los períodos críticos y efectos a largo plazo de la deficiencia de Zn en el desarrollo cerebral.

El procesamiento postraducciona de precursores de TRH puede ser el paso más vulnerable en la biosíntesis del TRH, y en éste están involucradas las actividades de varias enzimas entre ellas, la carboxipeptidasa H, la cual es dependiente de Zn (Pekary *et al.*, 1991); sin embargo, en tal estudio no se encontraron alteraciones en el contenido de TRH en hipotálamo y regiones extrahipotálamicas, como resultado de la deficiencia de Zn.

En machos, el contenido de TRH se vio afectado por la deficiencia postnatal de Zn (tanto en DD como en CD) en regiones del sistema límbico como el núcleo accumbens y amígdala, en donde el contenido del péptido disminuyó. Cabe señalar que esas alteraciones fueron revertidas por la introducción de Zn en la dieta (grupo DC), lo que indica especificidad del efecto. Las consecuencias fisiológicas que tienen tales cambios en el contenido del TRH en el núcleo accumbens podrían alterar la locomoción (Horita, 1998), mientras que el TRH de la amígdala ha sido relacionado con la conducta de ansiedad (Ray *et al.*, 1989; Gutiérrez-Mariscal *et al.*, 2008). La relación de la concentración de TRH en regiones del sistema límbico con cambios conductuales, se ha evidenciado previamente en machos sometidos a otros paradigmas, como en la etapa V del kindling amigdalino (de Gortari *et al.*, 1995); estos resultados son relevantes ya que la deficiencia de Zn está relacionada con una mayor susceptibilidad a padecer ataques epilépticos en ratas, las cuales cuando son sometidas a una dieta deficiente de Zn presentan un aumento en la excitabilidad de neuronas glutamatérgicas hipocampales que favorece la susceptibilidad de los animales a presentar ataques epilépticos inducidos por kainato (Takeda *et al.*, 2005). Por el contrario, un aumento en el contenido de TRH en ambas regiones se observó en ratas de ambos sexos sometidas a consumo de glucosa y menor contenido proteico en la dieta por 6 semanas, en hembras que consumieron glucosa durante el embarazo y lactancia y, en machos después de ingestión crónica de etanol (de Gortari *et al.*, 2002; 2005), lo cual demuestra la mayor susceptibilidad del TRH en núcleo accumbens y la amígdala a responder a diferentes condiciones experimentales de deficiencia nutricional. Por otro lado, el consumo crónico de etanol en ratas durante las etapas del embarazo o lactancia, causa alteraciones en el

metabolismo del Zn que permiten un aumento en la absorción y mejor conservación del metal en las crías (Murillo-Fuentes *et al.*, 2007). No hay reportes acerca de la relación que existe entre el consumo de glucosa y el metabolismo del Zn, pero se sabe que la deficiencia de Zn provoca que las ratas disminuyan el consumo de hidratos de carbono cuando se someten a un sistema de tres opciones de selección de alimentos, que permite a las ratas elegir libremente su comida de tres recipientes diferentes que contienen esencialmente sólo hidratos de carbono, proteína o grasa (Rains y Shay, 1995).

De igual manera, en hembras, disminuyó el contenido de TRH en núcleo accumbens y amígdala de animales deficientes de Zn en la etapa postnatal, además se observó un aumento en el contenido de TRH en el hipocampo en este mismo grupo de animales (CD) (tendencia observada también en machos pero que no llegó a ser significativa), y que no regresó a valores control en DC; esto revela una respuesta género específica del TRH en el sistema límbico en respuesta a la deficiencia dietética de Zn. Alteraciones específicas de género derivadas de una alimentación deficiente de Zn han sido reportadas anteriormente; la falta de Zn durante los días 15 a 20 de la gestación altera de manera diferencial el comportamiento de machos y hembras en la etapa adulta (Halas *et al.*, 1975; Halas y Sandstead, 1975).

La deficiencia de cobre durante la gestación y la lactancia se encuentra acompañada de una disminución en la concentración de Cu en cerebro, lo que provoca una reducción en el crecimiento cerebral y menor contenido de metaloenzimas dependientes de Cu (Prohaska y Wells, 1974). El efecto de la restricción de Zn durante la gestación y/o lactancia no induce disminución de las concentraciones del metal en cerebro de ratas y por consiguiente, no se observan cambios en las actividades de las tres enzimas dependientes de Zn estudiadas: deshidrogenasa glutámica, superóxido dismutasa y 3'-fosforilasa (Prohaska *et al.*, 1974). Aunque el contenido de Zn no cambia en cerebro de ratas adultas sometidas a deficiencia de Zn por 3 semanas, los cerebros de ratas sometidas a tal deficiencia, adquirieron un mayor porcentaje de la dosis inyectada de <sup>65</sup>Zn que animales control o pareados al consumo de alimentos de las ratas deficientes de Zn (O'Neal *et al.*, 1970). Con base en esto y debido a lo mencionado anteriormente acerca de los efectos en cerebro de la deficiencia de Zn durante la gestación y la lactancia, se esperaban alteraciones en la actividad de la metaloenzima dependiente de

Zn, PPII, que serían dependientes de la etapa del desarrollo en la que se sometieran a la deficiencia del Zn.

Las alteraciones en la actividad de PPII en hembras se presentaron en dos de las regiones con mayor contenido de Zn en el cerebro: en hipocampo y amígdala (Takeda *et al.*, 1995) y en machos los cambios se observaron en el hipotálamo lo que indica una respuesta diferencial dependiendo del sexo, a la deficiencia de Zn en la dieta. En machos DD el aumento en la actividad de la enzima en hipotálamo se dio a la par del contenido del TRH. Es necesario realizar mediciones del mRNA de la PPII y el TRH para saber si los cambios observados se están dando a nivel de síntesis o liberación. Si el TRH se encuentra principalmente en el compartimiento intracelular, entonces lo que estamos observando probablemente sea una falta de liberación lo que podría ser causa del aumento en la actividad de la PPII. Otra posibilidad del aumento en la actividad de la PPII en hipotálamo de machos DD, es el intercambio de Zn por otro metal en el sitio activo de la enzima, esto se ha observado en otras enzimas dependientes de Zn como la fosfatasa alcalina, en donde el Cd(+), Mg(2+), o Co(2+) pueden reemplazar al Zn en *E. coli* (Coleman *et al.*, 1983); o puede intercambiarse por Mn(2+), Mg(2+), o Co(2+) en la leucil-aminopeptidasa (Capiello *et al.*, 2006), si esto puede ocurrir con la PPII *in vivo*, aún no se ha estudiado. Se desconoce si el Cu puede tener un efecto similar que estos cationes para sustituir al Zn y permitir actividad enzimática, sin embargo, está comprobado que la deficiencia de Zn en ratas post destete a pesar de que tiene poco efecto en la concentración cerebral de Zn, aumenta el contenido de Cu (Wallwork *et al.*, 1983).

La aminopeptidasa N (APN) también es una metaloproteasa dependiente de Zn (Luciani *et al.*, 1998) de amplia distribución y con numerosas funciones. En cerebro está involucrada en el metabolismo de precursores de neuropéptidos; APN remueve los aminoácidos neutros NH<sub>2</sub> terminales de sustratos peptídicos como las encefalinas (Roques *et al.*, 1993). La actividad de esta enzima fue determinada en este estudio como un control para diferenciar los efectos específicos de la deficiencia de Zn en la actividad de la PPII, y en efecto, los cambios en la actividad de estas dos enzimas fueron región y género específicos: en machos las alteraciones en la PPII se observaron en el hipotálamo y parecen deberse a la deficiencia prenatal del mineral, mientras que los cambios en la actividad de APN ocurrieron en el hipocampo; en las hembras,

alteraciones en la actividad de ambas enzimas se observaron en amígdala e hipocampo, pero sin relación aparente entre ellas.

Tales diferencias de género en cuanto a los efectos de una dieta deficiente en Zn en la actividad de enzimas dependientes de Zn como la fosfatasa alcalina han sido reportados (Yousef *et al.*, 2002). Los transportadores ZnT5 y ZnT7 (Suzuki *et al.*, 2005) se requieren para la activación de las fosfatasas alcalinas, enzimas dependientes de Zn. Para transportar el Zn hacia el aparato de Golgi y los compartimientos vesiculares donde se localizan las ALPs, convirtiendo apoALPs en holo ALPs.

El cerebro responde a cambios de Zn en la dieta y el hipocampo es la región más susceptible (Takeda *et al.*, 2001). La deficiencia de Zn altera la regulación del sistema nervioso autónomo y el desarrollo hipocampal y cerebelar (Georgieff, 2007). La deficiencia de Zn afecta el desarrollo cognitivo por medio de alteraciones en la atención, actividad, comportamiento neuropsicológico y desarrollo motor. Sin embargo, aún no se conocen con exactitud los mecanismos biológicos que subyacen a estas alteraciones, así como los períodos críticos y efectos a largo plazo y posible reversibilidad de los efectos de la deficiencia de Zn en el desarrollo cerebral.

Las alteraciones en amígdala pueden indicar un aumento en el estado depresivo del animal debido a un menor consumo de alimento (en DD y CD esto es verdadero para la semana 9) (Sattin *et al.*, 1999). Además, la amígdala está involucrada en la regulación de la conducta alimentaria, control del peso corporal y el hambre (Morris y Dolan, 2001; O'Doherty *et al.*, 2000). En el n. accumbens el TRH está involucrado en los mecanismos de recompensa y responde al estrés inducido por alteraciones metabólicas (Carelli *et al.*, 2000; Tzschentke y Schmidt, 2000; Hajnal *et al.*, 2000). Los cambios observados en el hipocampo se dieron en sentido opuesto, hubo un aumento en el contenido de TRH en hembras CD y DC. El hipocampo es una región involucrada en procesos de aprendizaje y memoria (Toide *et al.*, 1993; Horita *et al.*, 1989), y es una región susceptible al estrés (Meaney *et al.*, 1993). Un mal funcionamiento cognitivo ocurre tanto en restricción alimentaria (Strupp y Levitsky, 1983; Pollit 1996) como en la deficiencia de Zn.

## Corticosterona

La deficiencia de Zn provoca una respuesta exagerada al estrés en roedores (Park *et al.*, 1989). La anorexia inducida por la deficiencia de Zn puede elevar la concentración de corticosterona (García-Belenguer *et al.*, 1993). Sin embargo, a diferencia de lo reportado (Chu *et al.*, 2003), en el presente estudio, la concentración sérica de corticosterona disminuyó en ratas de ambos sexos sometidas a la deficiencia de Zn. Es probable que el estrés crónico bajo el que se mantiene a las ratas deficientes de Zn desde la etapa prenatal, haya alterado de manera permanente el eje adrenal (HPA) reduciendo la respuesta a posteriores estímulos estresantes; en condiciones de estrés crónico en la etapa neonatal, se ha demostrado una disminución de la unión de glucocorticoides a sus receptores en adenohipófisis en ratas adultas (Felszeghy *et al.*, 2000).

## Ratas sacrificadas inmediatamente después del destete

El Zn tiene un papel importante en el metabolismo de ácidos nucleicos, replicación celular, reparación de tejidos y crecimiento. La deficiencia materna de Zn afecta profundamente el desarrollo de las crías: está asociada con varias condiciones patológicas, incluyendo desórdenes del desarrollo cerebral. A pesar de que el organismo materno es capaz de movilizar depósitos corporales de Zn para cubrir las necesidades de los embriones en crecimiento, éste es insuficiente. Es por esto que se esperaban cambios tempranos en el contenido de TRH y de PPII secundarios a la deficiencia de Zn en ratas sacrificadas a los 21 días de vida. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas en lo que se refiere al contenido de TRH hipotalámico. El contenido elevado de Zn en la leche de madres alimentadas con dieta deficiente de Zn durante la gestación promueve concentraciones altas de Zn en sangre de los neonatos (Prohaska, 1974). Debido a que la concentración plasmática de Zn de crías de madres que tuvieron una dieta deficiente de Zn durante la gestación, no difiere con la de las crías de madres con alimentación control, indica que las crías experimentales tienen una capacidad adecuada de utilizar y absorber el Zn disponible.

Al igual que en ratas adultas, las regiones en donde se observaron cambios en la actividad de PPII en respuesta a una dieta deficiente de Zn fueron el hipotálamo, la amígdala y el núcleo accumbens, reforzando la idea de que estas regiones son más

susceptibles a falta de Zn en la dieta y que las alteraciones se dan desde etapas tempranas del desarrollo en la rata. La deficiencia de Zn en la etapa de lactancia afecta la maduración cerebral y se ha implicado en diferencias en el comportamiento de las ratas (Lokken *et al.*, 1973). Las alteraciones en la actividad de la PPII coinciden con lo reportado acerca de que la deficiencia gestacional de Cu, lo que resulta en menor crecimiento cerebral y en menor contenido de las metaloenzimas dependientes de Cu (Prohaska *et al.*, 1974b).



## XI. CONCLUSIONES

En consideración a la extraordinaria variedad de funciones biológicas del Zn, es muy difícil asociar la bioquímica de este mineral con los aspectos clínicos y funcionales debidos a su deficiencia. Sin embargo, es claro que el aporte de este nutrimento por debajo de las cantidades apropiadas, en etapas críticas del desarrollo, puede interferir con la función del eje tiroideo y de la vía TRHérgica del SNC.

La disminución de peso de las ratas deficientes de Zn, se presentó sin importar la etapa de la vida en la cual fueron sometidas a la deficiencia; este efecto fue más evidente en machos que en hembras. La disminución del peso y del consumo de alimento, son capaces de regresar a la normalidad cuando se sustituye la dieta deficiente de Zn administrada durante la etapa prenatal, por una dieta completa después del destete. La falta de Zn en la dieta durante la etapa postnatal, provoca menor consumo de alimentos únicamente en ratas macho. Es probable que los animales sean más susceptibles a las alteraciones en el comportamiento alimentario inducidos por una dieta deficiente en Zn durante la etapa postnatal y mantienen la homeostasis del Zn si la deficiencia se da en la etapa prenatal; tal vez debido a que durante la etapa embrionaria, los animales expuestos a una alimentación baja en Zn, aumentan la absorción del mineral.

La desnutrición materna durante el embarazo y la lactancia parecen estar relacionados con un retraso en el desarrollo y maduración del eje HPT de las crías, sin embargo, en machos, el hipotiroidismo inducido por una alimentación deficiente en Zn puede revertirse una vez que éste es regresado a la dieta.

Las áreas del cerebro donde se presentaron cambios en el contenido de TRH debido a la deficiencia de Zn durante la etapa postnatal en machos fueron el hipotálamo, núcleo accumbens y amígdala. Al parecer la deficiencia postnatal altera más el contenido del péptido; sin embargo los efectos resultaron ser género específicos ya que en hembras, el único cambio observado en el contenido de TRH fue un aumento evidente en el hipocampo de ratas con deficiencia prenatal y que no regresó a valores control en DC. Por otra parte, la actividad de la PPII se afectó tanto por la deficiencia prenatal como postnatal de Zn en amígdala, hipocampo e hipotálamo.

La deficiencia dietética de Zn provoca alteraciones en los parámetros que se analizaron en este trabajo: peso, consumo de alimentos, eje tiroideo contenido de TRH y actividad de la enzima PPII en sistema límbico, durante las etapas pre y/o postnatales, los cambios son dependientes de género.

Aún no se ha estudiado el efecto de una dieta deficiente de Zn en el contenido de TRH en el sistema límbico de ratas, y para evaluar el efecto de estas alteraciones en el contenido del neuropéptido, tanto en la locomoción como en los niveles de ansiedad de ratas sometidas a deficiencia de Zn, sería conveniente aplicar una prueba conductual como la de enterramiento defensivo, paradigma que sirve para evaluar el estado de ansiedad en las ratas. Además, sería importante medir la concentración de Zn en cerebro para saber si las alteraciones en la actividad de la PPII se deben a cambios en la concentración del metal en regiones específicas.

## XII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ackland ML, Michalczyk A. Zinc deficiency and its inherited disorders -a review. *Genes Nutr.* 2006; 1:41-9.
- Adachi Y, Yoshida J, Kodera Y., *et al.* Oral administration of a zinc complex improves type 2 diabetes and metabolic syndrome. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006; 351:165-70.
- Ahima RS, Prabakaran D, Mantzoros C., *et al.* Role of leptin in the neuroendocrine response to fasting. *Nature.* 1996;382:250-252.
- Andrews GK. Regulation and function of Zip4, the acrodermatitis enteropathica gene. *Biochem Soc Trans.* 2008; 36(Pt 6):1242-6.
- Ares S, Quero J, Morreale de Escobar G. Neonatal iodine deficiency: clinical aspects. *J Pediatr Endocrinol Metab.* 2005; Suppl 1:1257-64.
- Baltaci AK, Mogulkoc R, Bediz CS, Kul A, Ugur A. Pinealectomy and zinc deficiency have opposite effects on thyroid hormones in rats. *Endocr Res* 2003; 29:473-81.
- Barbieri M, Nistri A. Effects of the neuropeptide thyrotropin-releasing hormone on GABAergic synaptic transmission of CA1 neurons of the rat hippocampal slice during hypoxia. *Peptides.* 1997; 18:585-91.
- Bartness TJ, Wade GN. Effects of interscapular brown adipose tissue denervation on body weight and energy metabolism in ovariectomized and estradiol-treated rats. *Behav Neurosci* 1984; 98:674-685.
- Bauer K. Degradation and biological inactivation of thyrotropin releasing hormone (TRH): regulation of the membrane-bound TRH-degrading enzyme from rat anterior pituitary by estrogens and thyroid hormones. *Biochimie.* 1988; 70:69-74.
- Bauer K, Carmeliet P, Schulz M., *et al.* Regulation and cellular localization of the membrane-bound thyrotropin-releasing hormone-degrading enzyme in primary cultures of neuronal, glial and adenohypophyseal cells. *Endocrinol* 1990; 127:1224-33.
- Bauer K. Inactivation of thyrotropin-releasing hormone (TRH) by the hormonally regulated TRH-degrading ectoenzyme: a potential regulator of TRH signals? *Trends Endocrinol Metab.* 1995; 6:101-105.
- Baum AE, Solberg LC, Churchill GA., *et al.* Test- and behavior-specific genetic factors affect WKY hypoactivity in tests of emotionality *Behav Brain Res* 2006; 169:220-230.
- Blake NG, Eckland DJ, Foster OJ & Lightman SL. Inhibition of hypothalamic thyrotropin-releasing hormone messenger ribonucleic acid during food deprivation. *Endocrinology.* 1991; 129:2714-8
- Bolkent S, Yanardag R, Mutlu O., *et al.* The effect of Zinc supplementation on Ghrelin-Immunoreactive Cells and lipid parameters in gastrointestinal tissue of streptozotocin-induced female diabetic rats. *Mol Cell Biochem.* 2006; 286:77-85.
- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976; 72:248-54.
- Brown KH, Peerson JM, Rivera J. Effect of supplemental zinc on the growth and serum zinc concentrations of prepubertal children: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Am J Clin Nutr.* 2002; 75:1062-71.
- Brown CE y Dyck RH. Distribution of zincergic neurons in the mouse forebrain. *J Comp Neurol.* 2004; 479:156-67.
- Cai L, Cherian MG, Iskander S., *et al.* Metallothionein induction in human CNS in vitro: neuroprotection from ionizing radiation. *Int J Radiat Biol.* 2000; 76:1009-17.
- Capasso M, Jeng JM, Malavolta M. Zinc dyshomeostasis a key modulator of neuronal injury. *J Alzheimer Dis.* 2005; 8:93-108.
- Carelli RM, Ijames SG, Crumling AJ. Evidence that separate neural circuits in the nucleus accumbens encode cocaine versus "natural" (water and food) reward *J Neurosci* 2000; 20:4255-66.
- Caulfield LE, Zavaleta N, Shankar AJ & Meriardi M Potential contribution of maternal zinc supplementation during pregnancy to maternal and child survival *Am J Clin Nutr* 1998; 68:499S-508S

Charlí JL, Vargas MA, Cisneros M., *et al.* TRH inactivation in the extracellular compartment: role of pyroglutamyl peptidase II. *Neurobiol.* 1998; 6:45-57.

Chen MD, Lin PY, Sheu WH. Zinc status in plasma of obese individuals during glucose administration. *Biol Trace Elem Res.* 1997; 60:123-9.

Chen MD, Liou SJ, Lin PY, Yang VC., *et al.* Effects of zinc supplementation on the plasma glucose level and insulin activity in genetically obese (ob/ob) mice. *Biol Trace Elem Res.* 1998; 61:303-11.

Chen MD, Lin PY. Zinc-induced hyperleptinemia relates to the amelioration of sucrose-induced obesity with zinc repletion. *Obes Res.* 2000; 8:525-9.

Cheng CW, Lin PY, Chen MD. Zinc and nitric oxide synthase inhibitor L-NAME attenuate NPY-induced feeding in mice. *Biol Trace Elem Res.* 2000; 75:21-7.

Chu Y, Mouat MF, Harris RBS., *et al.* Water maze performance and changes in serum corticosterone levels in zinc-deprived and pair-fed rats. *Physiol Behav.* 2003; 569-578.

Clegg DJ. Gonadal hormones determines sensitivity to central leptin and insulin *Diabetes* 2006; 56:1051-1058.

Cole TB, Robbins CA, Wenzul HJ., *et al.* Seizures and neuronal damage in mice lacking vesicular zinc. *Epilepsy Res.* 2000; 39:153-69.

Cole TB, Martyanova A, Palmiter RD. Removing zinc from synaptic vesicles does not impair spatial learning, memory, or sensorimotor functions in the mouse. *Brain Res.* 2001; 891:253-65.

Coleman JE. Zinc proteins: enzymes, storage proteins, transcription factors, and replication proteins. *Ann Rev Biochem* 1992; 61:897-946.

Cone RD, Cowley MA, Butler AA., *et al.* The arcuate nucleus as a conduit for diverse signals relevant to energy homeostasis *Int J Obes Relat Metab Disord* 2001; 25(suppl 5):S63-S67.

Cote A, Chiasson M, Peralta MR., *et al.* Cell type-specification of seizure-induced intracellular zinc accumulation in the rat hippocampus. *J Physiol.* 2005; 566:821-37.

Cousins RJ y Lee-Ambrose LM: Nuclear zinc uptake and interactions and metallothionein gene expression are influenced by dietary zinc in rats. *J Nutr* 1992; 122:56-64

Cox GC. Metabolic rate and thyroid status in rats fed diets of different protein-energy value: the importance of free T<sub>3</sub>. *J Nutr.* 1984; 114:1609-1616.

Cruz C, Charlí JL, Vargas MA y Joseph-Bravo P. Neuronal localization of pyroglutamate aminopeptidase II in primary cultures of fetal mouse brain. *J Neurochem* 1991; 56:1594-1601.

Cuajungco MP, Lees GJ. Zinc and Alzheimer's disease: is there a direct link? *Brain Res Rev.* 1997; 23:219-236.

Czekay G y Bauer K. Identification of the thyrotropin-releasing-hormone-degrading ectoenzyme as a metallopeptidase. *Biochem J.* 1993; 290:921-926.

Davies SR y Cousins RJ. Metallothionein expression in animals: a physiological perspective on function *J Nutr* 2000; 130:1085-1088.

Davies NT, Williams RB. The effect of pregnancy and lactation on the absorption of zinc and lysine by the rat duodenum in situ *Br J Nutr* 1977; 38:417-23.

de Boo HA y Harding JF. The development origins of adult disease (Barker) hypothesis *J Obstet Gynaecol.* 2006; 46:4-14.

de Gortari P, Fernández-Guardiola A, Martínez A, Cisneros M, Joseph-Bravo P. Changes in TRH and its degrading enzyme pyroglutamyl peptidase II, during the development of amygdaloid kindling. *Brain Res.* 1995; 679:144-50.

de Gortari P, González-Alzati ME, Cisneros M y Joseph Bravo P. Effect of fasting in the content of thyrotropin-releasing hormone and its mRNA in the central nervous system and piroglutamyl peptidase II activity in the anterior pituitary of pot-weaned and adult rats. *Nutr Neurosci.* 2000; 3:255-265.

- de Gortari P, Cisneros M, Medellín MA y Joseph-Bravo P. Chronic ingestion of ethanol or glucose solutions affects hypothalamic and limbic TRH metabolism in dams and their pups. *Neurochem Internac.* 2002; 41:237-249.
- de Gortari P, Cisneros M y Joseph-Bravo P. Chronic ethanol or glucose consumption alter TRH content and pyroglutamyl aminopeptidase II activity in rat limbic regions. *Regulatory Peptides.* 2005; 127:141-150.
- de Gortari P, Vargas MA, Martínez A, García-Vázquez AI, Uribe RM, Chávez-Gutiérrez L, Magdaleno V, Boileau G, Charli JL, Joseph-Bravo P. Stage-specific modulation of neprilysin and aminopeptidase N in the limbic system during kindling progression. *J Mol Neurosci.* 2007; 33:252-61.
- Ducray A, Bondier JR, Michel G, Bon K, Millot JL, Propper A, Kastner A. Recovery following peripheral destruction of olfactory neurons in young and adult mice. *Eur J Neurosci.* 2002; 15:1907-17. Erratum in: *Eur J Neurosci* 2002 ; 16:365.
- Duffner-Beattie J, Wang F, Kuo YM., et al. The Acrodermatitis Enteropathica gene ZIP4 encodes a tissue-specific, zinc-regulated zinc transporter in mice *J Biol Chem*, 2003; 33474-81.
- Dura Trave T, Puig Abuli M, Monreal I., et al. Plasmatic concentrations during pregnancy in zinc-deficient rats in relation to neonatal outcome *Gynecol Obstet Invest* 1986; 22:134-9.
- Farooqi L, Mazeto GM, Shuhama T, Brandão-Neto J. Effects of a single venous dose of zinc on thyroid status in healthy individuals and patients with graves' disease. *Met Based Drugs* 2000;7:151-5.
- Feldman SL y Cousins RJ. Degradation of hepatic zinc-thionein after parenteral zinc administration. *Biochem J.* 1976; 160:583-8.
- Felszeghy K, Bagdy G, Nyacas C. Blunted pituitary adrenocortical stress response in adult rats following neonatal dexamethasone treatment. *J Neuroendocrinol.* 2000; 12:1014-21.
- Flier JS, Harris M y Hollenberg AN. Leptin, nutrition, and the thyroid: the why, the wherefore, and the wiring. *Clinical Physiol.* 2000; 105:859-861.
- Ford D. Intestinal and placental zinc transport pathways *Proc Nutr Soc.* 2004; 63:21-29.
- Freake HD, Govoni KE, Guda K., et al. Actions and interactions of thyroid hormone and zinc status in growing rats. *J Nutr.* 2001; 131:1135-1141.
- Frederickson CJ, Suh SW, Silva D, Frederickson CJ, Thompson RB. Importance of zinc in the central nervous system: the zinc-containing neuron. *J Nutr.* 2000;130:1471S-83S.
- Friedman TC, Yanovski JA, Jayasvasti V, Yanovski SZ, Koenig RJ, Wilk S. Pyroglutamyl peptidase-II ("thyroliberinase") activity in human serum: influence of weight and thyroid status. *J Clin Endocrinol Metab.* 1995; 80:1086-9.
- Friel JK, Andrews WL, Matthew JD., et al., Zinc supplementation in very-low-birth-weight infants. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 1993; 17:97-104.
- Gaetke LM, Frederich RC, Ox HS, McClain CJ. Decreased food intake rather than zinc deficiency is associated with changes in plasma leptin, metabolic rate, and activity levels in zinc deficient rats. *J Nutr Biochem* 2002, 13:237-244.
- Gaither LA y Eide DJ. Functional expression of the human HZIP2 transporter. *J Biol Chem.* 2000; 130:1471S-1483S.
- Galliford TM, Murphy E, Williams AJ., et al. Effect of thyroid status on bone metabolism: a primary role for thyroid stimulating hormone or thyroid hormone? *Minerva Endocrinol.* 2005; 30:237-46.
- Georgieff MK. Nutrition and the developing brain. *Am J Clin Nutr.* 2007; 85:614S-620 S.
- Giugliano R y Millward DJ. The effects of severe zinc deficiency on protein turnover in muscle and thymus. *Br J Nutr.* 1987; 57:139-55.
- Golub M, Gershwin ME, Hurley LS., et al. Studies on marginal zinc deprivation in rhesus monkeys: IV. Growth of infants in the first year of life *Am J Clin Nutr* 1984; 40:1192-1202.
- Golub MS, Keen CL, Gershwin ME, Hendrickx AG, Developmental zinc deficiency and behavior *J Nutr* 1995; 125:2263-2271.
- Grotz N, Fox T, Connolly E., et al. Identification of a family of zinc transporter genes from Arabidopsis that respond to zinc deficiency. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1998; 95:7220-7224.

Guillemin R. Peptides in the brain: the new endocrinology of the neuron. *Science.* 1978; 202:390-402.

Gupta RP, Verma PC, Garg SL. Effect of experimental zinc deficiency on thyroid gland in guinea-pigs. *Ann Nutr Metab.* 1997; 41:376-81.

Hajnal A, Székely M, Gálosi R, Lénárd L. Accumbens cholinergic interneurons play a role in the regulation of body weight and metabolism *Physiol Behav* 2000; 70:95-103.

Hall AG, Kelleher SL, Lonnerdal B, Philipps AF. A graded model of dietary zinc deficiency: effects on growth, insulin-like growth factor-I, and the glucose/insulin axis in weanling rats. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2005; 41:72-80.

Hallman PS, Perrin DD, Watt AE. The computed distribution of copper (II) and zinc (II) ions among seventeen amino acids in human blood plasma. *Biochem J.* 1971; 121:549-555.

Hamdidge KM, Casey CE, Krebs NF., *et al.* Zinc. In: Mertz W, editor. Trace elements in human and animal nutrition, vol 2. Orlando FL: Academic Press; 1986. p. 1-137.

Harris WR y Keen CL. Calculations of the distribution of zinc in a computer model of human serum. *J Nutr.* 1989; 119:1677-1682.

Hashimoto H, Sato T, Horita S., *et al.* Maturation of the pituitary-thyroid axis during the perinatal period. *Endocrinol Jpn.* 1991; 38:151-7.

Hasse H y Maret W. Protein tyrosine phosphatases as targets of the combined insulinomimetic effects of zinc and oxidants *Biometals* 2005; 18:333-338

Henkin RI, Patten BM, Re PK., *et al.* A syndrome of acute zinc loss. Cerebellar dysfunction, mental changes, anorexia, and taste and smell dysfunction. *Arch Neurol.* 1975; 32:745-751.

Heuer H, Schafer MK & Bauer K. The thyrotropin-releasing hormone-degrading ectoenzyme: the third element of the thyrotropin-releasing hormone-signaling system. *Thyroid.* 1998; 8:915-20.

Heuer H, Schafer MK, O'Donnell D., *et al.* Expression of thyrotropin-releasing hormone receptor 2 (TRH-R2) in the central nervous system of rats. *J Comp Neurol.* 2000; 428:319-36.

Hill JO, Talano CM, Nickel M., *et al.* Energy utilization in food-restricted female rats *J Nutr* 1986; 116:2000-2012

Hoet JJ y Hanson MA. Intrauterine nutrition: its importance during critical periods for cardiovascular and endocrine development *J Physiol* 1999; 514:617-27.

Horita A, Carino MA y Lai H Pharmacology of thyrotropin-releasing hormone *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 26:311-332

Horita A. An update on the CNS actions of TRH and its analogs. *Life Sci.* 1998; 62:1443-8.

Hosea HJ, Taylor CG, Wood T., *et al.* Zinc-deficient rats have more limited bone recovery during repletion than diet-restricted rats *Soc Exp Biol Med* 2003; 303-311.

Huang XF, Koutcherov I, Lin S., *et al.* Localization of leptin receptor mRNA expression in mouse brain. *Neuroreport.* 1996; 7:2635-2638.

Hunt I, Murphy M, Martner P., *et al.* Zinc, vitamin B6, and other nutrients in pregnant women attending prenatal clinics in Mexico. *Am J Clin Nutr.* 1987; 46:563-569.

Huntington CE, Shay NF, Grouzmann E *et al.* Zinc status affects neurotransmitter activity in the paraventricular nucleus of rats. *J Nutr* 2002; 132:270-275.

Hurley LS, Gordon PR, Keen CL., *et al.* Circadian variation in rat plasma zinc and rapid effect of dietary zinc deficiency. *Proc Soc Exp Biol Med* 1982; 170:48-52.

Hurrell RF. Influence of vegetable protein sources on trace element and mineral bioavailability. *J Nutr.* 2003; 133:2973S-7S.

Jackson AA, Langley-Evans SC, McCarthy HD. Nutritional influences in early life upon obesity and body proportions. *Ciba Found Symp* 1996; 201:118-29.

Jaimes-Hoy L, Joseph-Bravo P y de Gortari P. Differential response of TRHergic neurons of the hypothalamic paraventricular nucleus (PVN) in female animals submitted to food-restriction or dehydration-induced anorexia and cold exposure. *Horm Behav* 2008; 53:366-77.

- Jameson S. Zinc status in pregnancy: the effect of zinc therapy on perinatal mortality, prematurity and placental ablation *Ann NY Acad Sci* 1993; 678:37-47.
- Javaid MK, Cooper CC. Prenatal and childhood influences on osteoporosis. *Best Pac Res Clin Endocrin Met* 2002; 16:349-367.
- Joseph-Bravo P, Charli JL, Palacios M, Cordón C. Effect of neurotransmitters on the *in vitro* release of immunoreactive thyrotropin-releasing hormone from a rat mediobasal hypothalamus. *Endocrinol.* 1979; 104:801-806.
- Joseph-Bravo P, Uribe RM, Vargas MA., *et al.* Multifactorial regulation of TRH metabolism. *Cell Mol Neurobiol.* 1998; 18:231-247.
- Kasarskis EJ. Zinc metabolism in normal and zinc-deficient rat brain. *Exp Neurol.* 1984; 85:114-127.
- Kralik A, Eder K y Kirchgessner M. Influence of zinc and selenium deficiency on parameters relating to thyroid hormone metabolism. *Horm Metab Res.* 1996; 28:223-6.
- Kubek MJ, Low WC, Sattin A, Morzorati SL, Meyerhoff JL, Larsen SH. Role of TRH in seizure modulation. *Ann N Y Acad Sci.* 1989; 553:286-303.
- Kwon IS, Cho, YE, Lomeda RA *et al.* Marginal zinc deficiency in rats decreases leptin expresión independently of food intake and corticotrophin-releasing hormone in relation to food intake. *Br J Nutr* 2007; 98:485-489.
- Laditan AA. Hormonal changes in severely malnourished children. *Afr J Med Sci.* 1983; 12:125-35.
- Lanni A, Moreno M, Lobardi A., *et al.* Control of energy metabolism by iodothyronines. *J Endocrinol Invest.* 2001;24:897-913.
- Laron Z. Interactions between the thyroid hormones and the hormones of the growth hormone axis. *Pediatr Andocrinol Rev.* 2003; Suppl 2:244-9.
- Lechan RM y Toni R. Thyrotropin releasing hormone neuronal systems in the central nervous system. En: Demeroff, C.V. (Ed.), *Neuroendocrinology*. CRC Press, Boca Raton.
- Legradi G y Lechan RM. The arcuate nucleus is the major source for neuropeptide-Y innervation of TRH neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus. *Endocrinology.* 1998; 139:3262-3270.
- Lee DK, Geiser J, Dufner-Beattie J y Andrews GK. Pancreatic Metallothionein-I may play a role in zinc homeostasis during maternal dietary zinc deficiency in mice *J Nutr.* 2003; 133:45-50.
- Lee HH, Prasad AS, Brewer GJ. Zinc absorption in human small intestine *Am J Physiol* 1989; 256:G87-G91.
- Lee RG, Rains TM, Tovar-Palacio C., *et al.* Zinc deficiency increases hypothalamic neuropeptide Y and neuropeptide Y mRNA levels and does not block neuropeptide Y-induced feeding in rats. *J Nutr.* 1998; 128:1218-23
- Legradi G y Lechan RM. Agouti-related protein containing nerve terminals innervate thyrotropin-releasing-hormone neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus. *Endocrinology.* 1999; 140:3643-3652.
- Leis-Marquez MT y Guzmán-Huerta E. Maternal nutrition effect on fetus development and pregnant women's health *Ginecol Obstet Mex.* 199; 67:113-28.
- Lokken P, Halas M, Sandstead H, Influence of zinc deficiency rats. *Poc Soc Exp Biol Med.* 1973; 144:680-682.
- Lowry OH, Rosebrouh NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951; 193:265-75.
- Lukaski HC, Hall CB, Marchello MJ. Impaired thyroid hormone status and thermoregulation during cold exposure of zinc-deficient rats. *Horm Metab Res.* 1992; 24:363-6.
- Mackay-Sim A, Dreosti IE. Olfactory function in zinc-deficient adult mice. *Exp Brain Res.* 1989; 76:207-12.
- Mangian HF, Lee RG, Paul GL., *et al.* Zinc deficiency suppresses plasma leptin concentrations in rats. *J Nutr Biochem* 1998; 9:47-51.
- Mahajan SD, Aalinkeel R, Singh S., *et al.* Thyroid hormone dysregulation in intrauterine growth retardation associated with maternal malnutrition and/or anemia. *Horm Metab Res.* 2005; 37:633-40.

Mantzoros CS, Prasad AS, Beck FW., et al. Zinc may regulate serum leptin concentrations in humans. J Am Coll Nutr. 1998; 17:270-5.

Maret W. Zinc and Diabetes *Biometals*. 2005; 18:293-4.

Marreiro Ddo N, Fisberg M y Cozzolino SM. Zinc nutritional status and its relationships with hyperinsulinemia in obese children and adolescents. Biol Trace Elem Res. 2004; 100:137-49.

Masters BA, Quaife CJ y Erickson JC. Metallothionein III is expressed in neurons that sequester zinc in synaptic vesicles. J Neurosci. 1994; 14:5844-57.

Maynard CJ, Bush AI, Masters CL. Metals and amiloid-beta in Alzheimer's disease. Int J Exp Pathol. 2005; 86:147-59.

McClain CJ, Humphries LL, Hill KK y Nickl NJ. Gastrointestinal and nutritional aspects of eating disorders. J Am Coll Nutr. 1993; 12:466-74.

McMahon RJ y Cousins RJ. Regulation of the zinc transporter ZnT-1 by dietary zinc. Proc Natl Acad Sci. 1998; 95:841-6.

McNall AD, Etherton TD, Fosmire GJ. The impaired growth induced by zinc deficiency in rats is associated with decreased expression of the hepatic insulin-like growth factor I and growth hormone receptor genes J Nutr 1995; 125:874-9.

Mohan PF y Rao BS. Adaptation to underfeeding in growing rats. Effect of energy restriction al two dietary protein levels on growth, feed efficiency, basal metabolism and body composition. J Nutr 1983; 113:79-85.

Morley JE, Gordon J y Hershman JM. Zinc deficiency, chronic starvation, and hypothalamic-pituitary-thyroid function. Am J Clin Nutr. 1980; 33:1767-70.

Morris JS, Dolan RJ. Involvement of human amygdala and orbitofrontal cortex in hunger-enhanced memory for food stimuli. J Neurosci 2001; 21:5304-10.

Moser-Veillon PB, Patterson KY, Veillon C. Zinc absorption is enhanced during lactation FASEB J 1995; 9:A729.

Mota M, Panus C, Mota E., et al. The metabolic syndrome: a multifaced disease. Rom J Intern Med. 2004; 42:247-55.

Murillo-Fuentes ML, Artillo R, Ojeda ML, Delgado MJ, Murillo ML, Carreras O. Effects of prenatal or postnatal ethanol consumption on zinc intestinal absorption and excretion in rats. Alcohol Alcohol 2007; 42:3-10.

Nathanielsz PW. Life in the womb: the origin of health and disease New York: Promethean Press, 1999.

Nillni, E. A., y Sevarino, K. A. The biology of pro-thyrotropin-releasing hormone-derived peptides. Endocr Rev, 1999; 20:599-648.

Nishi Y. Zinc and growth. J Am Coll Nutr. 1996; 15:340-4.

Niswender KD y Schwartz MW. Insulin and leptin revisited: adiposity signals with overlapping physiological and intracellular signalling capabilities Front Neuroendocrinol 2003; 24:1-10.

Norii T. Growth of zinc-deficient rats during intra-gastric tube feeding. Biol Trace Elem Res, 2008; 122:266-75.

O'Dell BL y Savage JE. Effect of phytic acid on zinc availability. Proc Soc Exp Biol Med. 1960; 103:304-306.

O'Doherty J, Rolls ET, Francis S, Bowtell R, McGlone F, Kobal G, Renner B, Ahne G. Sensory-specific satiety-related olfactory activation of the human orbitofrontal cortex Neuroreport 2000; 11:893-7

Olaiz-Fernández, Rivera-Dommarco J, Shamah-Levy T., et al. Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2006. Cuernavaca, México: Instituto Nacional de Salud Pública. 2006.

Ono S, Cherian MG. Regional distribution of metallothionein, zinc, and copper in the brain of different strains of rats. Biol Trace Elem Res. 1999; 69:151-9.

Onoura C. Maharajan S, Singn J., et al. Thyroid status in various degrees of protein-calorie malnutrition in children. Clin Endocrinol. 1983; 18:87-93.

- Opazo C, Luza S, Villemagne VL., *et al.* Radioiodinated dioquinolas a biomarker for beta-amyloid Zn complexes in Alzheimer's disease. *Aging Cell.* 2006; 5:69-79.
- Orbak Z, Akin Y, Varoglu E., *et al.* Serum Thyroid hormone and thyroid gland weight measurements in protein-energy malnutrition. *J Pediatr Endocrinol Metab.* 1998; 11:719-24.
- Osendarp S, West CE y Black RE. The need for maternal zinc supplementation in developing countries: an unresolved issue. *J Nutr.* 2003; 133:817S-827S.
- Ozanne SE y Hales CN. Early programming of glucose-insulin metabolism. *Trends Endocrinol Metab.* 2002; 13:368-73.
- Palmiter RD. The elusive function of metallothioneins. *Proc Natl Acad Sci.* 1998; 95:8428-8430.
- Pedersen SB, Bruun JM, Kristensen K, Richelsen B. Regulation of UCP1, UCP2, and UCP3 mRNA expression in brown adipose tissue, white adipose tissue, and skeletal muscle in rats by estrogen. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 288:191-197.
- Pekary AE, Lukaski HC, Mena I, Hershman JM. Processing of TRH precursor peptides in rat brain and pituitary is zinc dependent. *Peptides* 1991; 12:1025-32.
- Pekary AE, Lukaski HC, Mena I, *et al.* Testosterone increases TRH biosynthesis in epididymis but not heart of zinc-deficient rats. *Peptides.* 1993;14:315-24.
- Ponce G, Charli JL, Pasten JA., *et al.* Tissue specific regulation of pyroglutamate aminopeptidase activity by thyroid hormones *Neuroendocrinology* 1988; 48:211-213.
- Prasad AS, Schuler AR, Sandstead HH., *et al.* Zinc, iron and nitrogen content of sweat in normal and deficient subjects. *J Lab Clin Med.* 1963; 62:84-89.
- Prasad AS. Zinc. *En: Trace elements and iron in human metabolism.* New York:Plenum Press. 1976; 251-346.
- Prasad AS. Clinical, endocrinological and biochemical effects of zinc deficiency. *Clin Endocrinol Metab.* 1985; 14:567-89.
- Prasad AS. Clinical spectrum and diagnostic aspects of human zinc deficiency. *En: Essential ant toxic trace elements in human health and disease (Prasad, ed.).* New York:Alan R. Liss. 1988; 3-53.
- Prasad AS. Discovery of human zinc deficiency and studies in an experimental human model. *Am J Clin Nutr.* 1991; 53:403-412.
- Prohaska J, Luecke R, Jasinski R. Effect of zinc deficiency from day 18 of gestation and/or during lactation on the development of some rat brain enzymes. *J Nutr* 1974; 104:1525-1531.
- Prohaska J, Clark D, Wells W. Copper deficiency in the developing rat brain: a possible model of Menkes' steely-hair disease. *J Neurochem* 1974b; 23:91-98.
- Prohaska J. Functions of trace elements in brain metabolism. *Physiol. Rev.* 1987; 67:858-901.
- Ramirez Mayans JA, Garcia Campos M, Cervantes Bustamante R., *et al.* Dietary changes in Mexico *An Pediatr (Barc).* 2003; 58:568-73.
- Ramos CF, Lima AP, Teixeira CV., *et al.* Thyroid function in post-weaning rats whose dams were fed a low-protein diet during suckling. *Braz J Med Biol Res.* 1997; 30:133-7.
- Ramos CF, Teixeira CV, Passos MC., *et al.* Low-protein changes thyroid function in lactating rats. *Proc Soc Exp Biol Med.* 2000; 224:256-63.
- Reeves PG y O'Dell BL. An experimental study of the effect of zinc on the activity of angiotensin converting enzyme in serum *Clin Chem* 1985; 31:581-584.
- Reinhold JG, Faradji B, Abadi P, Ismail-Beigi F. Decreased absorption of calcium, magnesium, zinc and phosphorus by humans due to increased fiber and phosphorus consumption as wheat bread. *J Nutr.* 1976; 106:493-503.
- Reusens B y Remacle C. Programming of the endocrine páncreas by the early nutritional environment. *Int J Biochem Cell Biol.* 2006; 38:913-22.

- Rivera JA, González-Cossío T, Flores M, Romero M, Rivera M, Téllez-Rojo MM, Rosado JL, Brown KH. Multiple micronutrient supplementation increases the growth of Mexican infants. *Am J Clin Nutr.* 2001; 74:657-63.
- Rodríguez AM, Quevedo-Coli S, Roca P., *et al.* Sex-dependent dietary obesity, induction of UCPs, and leptin expression in rat adipose tissues *Obes Res* 2001; 9:579-588
- Roques BP, Noble F, Daugé V., *et al.* Neutral endopeptidase 24.11: structure, inhibition, and experimental and clinical pharmacology. *Pharmacol Rev* 1993; 45:87-146.
- Rosado JL, Bourges H y Saint-Martin B. Deficiencia de vitaminas y minerales en México. Una revisión crítica del estado de la información: I. Deficiencia de minerales. *Salud Pública Mex.* 1995; 37:130-139.
- Rosado JL. Deficiencia de zinc y sus implicaciones funcionales. *Salud Pública Mex.* 1998; 40:181-188.
- Sandstead HH, Frederickson CJ, Penland JG. History of zinc as related to brain function. *J Nutr* 2000; 130:496S-502S.
- Sandstead HH, Penland JG, Alcock NW., *et al.* Effects of repletion with zinc and other micronutrients on neuropsychologic performance and growth of Chinese children. *Am J Clin Nutr.* 1998; 68:470S-475S.
- Sandström B, Almgren A, Kivisto B., *et al.* Zinc absorption in humans from meals based on rye, barley, oatmeal, triticale, and whole wheat. *J Nutr.* 1987; 117:1898-1902.
- Sandström B y Lönnerdal B. Promoters and antagonists of zinc absorption. En: *Zinc in human biology (Mills CF, ed.) International Life Sciences Institute Human Nutrition Reviews.* Berlín:Springer Verlag. 1989; 57-78.
- Sattin A, Pekary AE, Lloyd RL. TRH in therapeutic vs. nontherapeutic seizures: affective and motor functions *Pharmacol Biochem Behav* 1999; 62:575-83.
- Seal CJ y Mathers JC. Intestinal zinc transfer by everted gut sacs from rats given diets containing different amounts and types of dietary fibre *Br J Nutr* 1989; 62:151-163
- Seoane LM, Carro E, Tovar S., *et al.* Regulation of *in vivo* TSH secretion by leptin. *Regul Pept* 2000;92:25-29.
- Shay NF y Manigan HF. Neurobiology of zinc-influenced eating behavior *J Nutr* 2000; 130:1493S-1499S.
- Silva JF. Thyroid hormone control of thermogenesis and energy balance. *Thyroid.* 1995; 6:481-92.
- Silva JF. The thermogenic effect of thyroid hormone and its clinical implications. *Ann Intern Med.* 2003; 139:205-13.
- Schmitmeier S, Thole H, Bader A, Bauer K. Purification and characterization of the thyrotropin-releasing hormone (TRH)-degrading serum enzyme and its identification as a product of liver origin. *Eur J Biochem.* 2002; 269:1278-86.
- Schoumburg L y Bauer K, Thyroid hormone rapidly and stringently regulate the messenger RNA levels of the thyrotropin-releasing hormone (TRH) receptor and the TRH-degrading ectoenzyme *Endocrinology.* 1995; 136:3480-3485.
- Smallridge RC, Glass AR, Wartofsky L., *et al.* Investigations into the etiology of elevated serum T<sub>3</sub> level in protein-malnourished rats. *Metabolism.* 1982; 31:538-542.
- Stocker CJ, Arch JR, Cawthorne MA. Fetal origins of insulin and obesity. *Proc Nutr Soc.* 2005; 64:143-51.
- Sun JY, Jing MY, Weng XY., *et al.* Effects of dietary zinc levels on the activities of enzymes, weights of organs, and the concentrations of zinc and copper in growing rats *Biol Trace Elem Res* 2005; 107:153-165.
- Tacnet F, Watkins DW y Ripoche P. Studies of zinc transport into brush-border membrane vesicles isolated from pig small intestine *Biochimica et Biophysica Acta* 1990; 1024:323-330.
- Tallman DL, Taylor CG. Effects of dietary fat and zinc on adiposity, serum leptin and adipose fatty acid composition in C57BL/6J mice. *J Nutr Biochem.* 2003; 14:17-23.
- Tallman DL, Taylor CG. Potential interactions of zinc in the neuroendocrine-endocrine disturbances of diabetes mellitus type 2. *Can J Physiol Pharmacol* 1999; 7:919-933.
- Takeda A, Kawai M, Okada S. Zinc distribution in the brain of Nagase albuminemic rat and enlargement of the ventricular system. *Brain Res.* 1997; 769:193-195.

- Takeda A, Takefuta S, Okada S, Oku N. Relationship between brain zinc and transient learning impairment of adult rats fed zinc-deficient diets. *Brain Res.* 2000; 859:352-357.
- Takeda A, Minami A, Takefuta S., *et al.* Zinc homeostasis in the brain of adult rats fed zinc-deficient diets. *J Neurosci Res.* 2001; 63:447-452.
- Takeda A, Tamano H, Oku N. Involvement of unusual glutamate release in kainate-induced seizures in zinc-deficient adult rats. *Epilepsy Res.* 2005; 66:137-43.
- Takeda A, Itoh H, Hirate M. Region-specific loss of zinc in the brain in pentylen tetrazole-induced seizures and seizure susceptibility in zinc deficiency. *Epilepsy Res.* 2006; 17:211-18.
- Tang F & Man WS. The regional distribution of thyrotropin releasing hormone, leu-enkephalin, met-enkephalin, substance P, somatostatin and cholecystokinin in the rat brain and pituitary. *Neuropeptides.* 1991; 19:287-92.
- Tang X y Shay NF. Zinc has an insulin-like effect on glucose transport mediated by phosphoinositol-3kinase and Akt in 3T3-L1 fibroblasts and adipocytes. *J Nutr* 2001; 131:1414-1420.
- Thorpe-Beeston JG, Nicolaidis KH, Felton CV., *et al.* Maturation of the secretion of thyroid hormone and thyroid-stimulating hormone in the fetus. *N Eng J Med.* 1991; 324:532-6.
- Toni R, Jacson IM y Lechan RM. Neuropeptide Y-immunoreactive innervation of thyrotropin-releasing hormone-synthesizing neurons in the rat hypothalamic paraventricular nucleus. *Endocrinology.* 1990; 126:2444-2453.
- Treit D, Pinel J, Fibiger H. Conditioned defensive burying: a new paradigm for the study of anxiolytic agents. *Pharmac Biochem Behav.* 1981;15:619-626.
- Turnlund JR, King JC, Keyes WR, Gong B, Michel MC. A stable isotope study of zinc absorption in young men: effects of phytate and alpha-cellulose. *Am J Clin Nutr.* 1984; 40:1071-7.
- Tzschenke TM, Schmidt WJ. Functional relationship among medial prefrontal cortex, nucleus accumbens, and ventral tegmental area in locomotion and reward. *Crit Rev Neurobiol* 2000; 14:131-42.
- Uribe RM, Redondo JL, Charli JL. & Joseph-Bravo P. Suckling and cold stress rapidly and transiently increase TRH mRNA in the paraventricular nucleus. *Neuroendocrinology.* 1993; 58:140-5.
- Valero De Bernabe J, Soriano T, Albaladejo R., *et al.* Risk factors for low birth weight: a review. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2004; 116:3-15.
- Valle A, Catalá-Niell A, Colom B., *et al.* Sex-related differences in energy balance in response to caloric restriction. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2005; 289:E15-E-22.
- Valle A, García-Palmiter FJ, Oliver J, Roca P. Sex differences in brown adipose tissue thermogenic features during caloric restriction. *Cell Physiol Biochem* 2007; 19:195-204.
- Vallee BL y Alud DS. Zinc coordination, function, and structure of zinc enzymes and other proteins. *Biochemistry.* 1990; 29:5647-5659.
- van Haasteren GA, Linkels E, Klootwijk W., *et al.* Starvation-induced changes in the hypothalamic content of prothyrotrophin-releasing hormone (proTRH) mRNA and the hypothalamic release of proTRH-derived peptides: role of the adrenal gland. *J Endocrinol.* 1995; 145:143-53.
- Vargas MA, Méndez M, Cisneros M., *et al.* Regional distribution of the membrane bound pyroglutamate aminopeptidasa degrading thyrotropin releasing hormone in rat brain. *Neurosci Lett* 1987; 79:311-314.
- Vargas MA, Herrera J, Uribe RM., *et al.* Ontogenesis of piroglutamyl peptidase II activity in rat brain, adenohipofisis and páncreas *Dev Brain Res* 1992; 66:251-256.
- Vargas MA, Joseph-Bravo P, Charli JL. Thyrotropin-releasing hormone downregulates pyroglutamyl peptidase II activity in adenohipofyseal cells. *Neuroendocrinology* 1994; 60:323-30.
- Vargas MA, Bourdais J, Sanchez S, Uriostegui B, Moreno E, Joseph-Bravo P, Charli JL. Multiple hypothalamic factors regulate pyroglutamyl peptidase II in cultures of adenohipofyseal cells: role of the cAMP pathway. *J Neuroendocrinol.* 1998; 10:199-206.

Wensink J, Longlet WJ, Vis RD, Van den Hamer CJ. The effect of dietary zinc deficiency on the mossy fiber zinc content of the rat hippocampus. A microbeam PIXE study. Particle Induced X-Ray Emission. Histochemistry. 1987; 87:65-9.

Williams RB y Mills CF. The experimental production of zinc deficiency in the rat. *Br J Nutr.* 1970; 24:989–1003.

Woods SC, Seeley RJ, Porte D Jr, Schwartz MW. Signals that regulate food intake and energy homeostasis. *Science* 1998; 280:1378-1383.

Woods SC, Gotoh K y Clegg DJ. Gender differences in the control of energy homeostasis *Exp Biol Med* 2003; 228:1175-1180.

Yen, P. M. Physiological and molecular basis of thyroid hormone action. *Physiol Rev.* 2001; 81:1097-142.

Yew DT y Chan WY. Early appearance of acetylcholinergic, serotonergic, and peptidergic neurons and fibers in the developing human central nervous system. *Microsc Res Tech* 1999; 45:389-400.

Yousef MI, Hendy HA, El-Demerdash FM., *et al.* Dietary zinc deficiency induced-changes in the activity of enzymes and the levels of free radicals, lipids and protein electrophoretic behavior in growing rats *Toxicology* 2002; 175:223-234.

Zambrano E y Guzmán C. Desnutrición intrauterina y factores de riesgo de la obesidad. *Nutrición Clínica* 2002; 5:241-5.

Zirah S, Kozin SA, Mazur AK. Structural changes of region 1-16 of the Alzheimer disease amyloid beta-peptide upon zinc binding and in vitro aging. *J Biol Chem.* 2006; 281:2151-61.