



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

***PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS***

**ESTUDIO INTEGRAL SOBRE LOS EFECTOS DE LA RESTRICCIÓN  
PROLONGADA DE L-TRIPTÓFANO EN DIFERENTES ETAPAS DE  
DESARROLLO DE LA RATA**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE:**

**DOCTORA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**

**PRESENTA:**

**M. C. LEYLA GUADARRAMA LÓPEZ**

**DIRECTORA DE TESIS: DRA. EN C. LIMEI ZHANG**



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.

## AGRADECIMIENTOS Y RECONOCIMIENTOS

Este estudio se ha realizado en el Laboratorio de Comunicación Intercelular del Departamento de Fisiología de la Facultad de Medicina, UNAM, a cargo de la Dra. Limei Zhang. Ha sido posible realizar este estudio gracias al financiamiento principal del CONACyT a través del donativo 41694–M, con el Dr. Alfonso Escobar como responsable y la Dra. Limei Zhang como co-responsable, y las becas de posgrado tanto del CONACyT como de la Dirección General de Estudios de Posgrado (DGEP) de la UNAM.

Quiero hacer patente mi reconocimiento a los Dres. Aleph A. Corona Morales, Joaquín García Estrada, Luisa Rocha y Arturo Vega González, además de mis tutores Alfonso Escobar y Limei Zhang, quienes han contribuido a los resultados reportados en esta tesis.

Agradezco sinceramente a los miembros del comité tutorial, Dr. Alfonso Escobar y Dr. Gabriel Roldán; así como los Dres. Rafael Salín (FM, UNAM), Raúl Aguilar (IFC, UNAM), Qi Pei (Univ. Oxford), Arturo Vega (FM, UNAM), Carlos Galindo (FM, UNAM), además de mis colegas del laboratorio.

Agradezco también al CIMMYT por la donación del maíz usado en todos mis experimentos y al Dr. Mauricio Bellon, coordinador del proyecto: “*CG Maize Diversity Conservation: A Farmer-Scientist Collaborative Approach*”.

***A mis adorados micos:  
por ser y existir.***

***A papá, mamá,  
hermana, hermano,  
primos, tíos, amigos,  
tutores, maestros, compañeros,  
y todo aquel damnificado por este proyecto:  
gracias por estar.***

## REPORTES CIENTÍFICOS Y PUBLICACIONES DERIVADOS DEL PRESENTE ESTUDIO

### **Presentaciones en Congresos Internacionales:**

- ◆ *Guadarrama L, Ortiz A, Corona-Morales AA, Castell A, Escobar A, Zhang L. Functional and developmental analysis of endogenous depression using low tryptophan diet. An experimental model in the rat. 33rd Annual Meeting, Society for Neuroscience. New Orleans, Nov. 8 - 12, 2003.*
- ◆ *Zhang, L, Guadarrama, L, Corona-Morales A. A., Escobar, I. An animal model for endogenous depression. FENS Forum 2004. (Published in FENS Forum Abstracts, vol. 2, 2004).*
- ◆ *Guadarrama, L., Corona-Morales, A. A., Escobar, A. y Zhang, L., Tryptophan depleted diet alters number of dendritic tree spines in CA<sub>1</sub> pyramidal neurons. 35<sup>th</sup> Annual Meeting, Society for Neuroscience, Washington, D. C., 2005*

### **Presentaciones en congresos nacionales:**

- ◆ *Guadarrama L., Corona-Morales A.A., Escobar A., Zhang L. Alteraciones neuroanatómicas inducidas por la depleción dietética de triptófano durante el desarrollo en rata. 1er. Congreso Académico, Facultad de Medicina, UNAM. México, 2005.*

### **Artículo en revista Nacional:**

- ◆ *Guadarrama L, Escobar A. Zhang, L. Bases neuroquímicas y neuroanatómicas de la depresión. Rev. Fac Med. UNAM 49: 66 – 72 (2006).*

### **Artículos en revistas internacionales:**

- ◆ *Zhang L\*, Guadarrama L\*, Corona-Morales AA, Rocha L, Vega-González A, and Escobar A. Rats subjected to extended tryptophan restriction during early postnatal stage exhibit anxious depressive features and structural changes. J Neuropathol Exp Neurol. (JNEN) 65(6):562-570, 2006. \* primeros autores*

# INDICE

1. RESUMEN	7
2. <i>ABSTRACT</i>	8
3. INTRODUCCIÓN	9
3.1. GENERALIDADES	9
3.1.1 La serotonina (5-hidroxitriptamina, 5-HT): aspectos neurobioquímicos básicos	10
3.1.2. Desarrollo del sistema serotoninérgico	14
3.2 ANTECEDENTES DIRECTOS	17
3.2.1 La restricción de L-triptofano dietético induce depresión	17
3.2.2. El maíz como base de la dieta experimental	17
4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	18
5. HIPÓTESIS	19
6. OBJETIVOS	19
7. DISEÑO EXPERIMENTAL	20
8. MATERIAL Y MÉTODOS	24
8.1 Elaboración de dieta a base de maíz con bajo contenido de triptófano	24
8.2 Sujetos experimentales y esquema de aplicación de la dieta	24
8.3 Pruebas conductuales	25
8.3.1 Prueba de nado forzado (FST)	25
8.3.2 Prueba del laberinto elevado en cruz (EPM)	27
8.3.3 Prueba de enterramiento defensivo	29
8.3.4 Laberinto acuático de Morris (MWM)	30
8.3.5 Prueba de anhedonia (ingesta de sacarosa)	32
8.4 Estudios de la citoestructura con tinción de Golgi - Cox	32
8.5 Perfusión y fijación del tejido cerebral para inmunohistoquímica	33
8.6 Inmunohistoquímica	33
8.6.1 Medición de la activación neuronal después de una prueba conductual marcando la expresión de la proteína Fos del oncogen c-fos.	33

8.6.2	Medición de neurogénesis/proliferación celular a través de la incorporación de 5-bromo-2 deoxiuridina y su inmunocitoquímica	35
8.7.	Determinación de contenidos de 5-HT (serotonina) en tejido cerebral homogeneizados de diversas regiones relacionadas con la emocionalidad, con cromatografía líquida de alto rendimiento	36
8.8	Análisis de datos	37
9	RESULTADOS	38
9.1	Generación del modelo animal	38
9.1.1	Dieta baja en triptófano a base de tortilla	38
9.2	Efectos de la restricción dietética de triptófano a corto plazo	38
9.2.1.	Conducta de desesperanza aprendida y ansiedad	38
9.2.2.	Determinación del contenido de serotonina en diversas regiones cerebrales	39
9.2.3	La expresión de la proteína Fos en diversas regiones cerebrales de los sujetos experimentales	40
9.2.4	Inmunorreacción a la enzima triptófano hidroxilasa	41
9.2.5	Inmunorreacción contra BrdU	42
9.2.6	Densidad de espinas dendríticas	45
9.3	Efectos a largo plazo: los efectos de la restricción dietética de triptófano durante el desarrollo persisten en la adultez	45
9.3.1	Conducta de tipo ansiedad y desesperanza aprendida persistentes 6 meses después de la suspensión de la dieta deficiente de triptófano	46
9.3.2	Efectos en la actividad neuronal en el hipocampo	46
10.	DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES	48
11.	BIBLIOGRAFIA	55
12.	Lista de pies de figuras	59
12.	APÉNDICE I Análisis nutricional de la dieta de tortilla	60
13.	APÉNDICE II Publicación 1	61
14.	APÉNDICE III Publicación 2	70

# 1. RESUMEN

El triptófano (Trp) es un aminoácido esencial que solamente se adquiere en la dieta. Su principal función, como otros aminoácidos, es construir bloques en la biosíntesis de proteínas. El Trp también funciona como un precursor bioquímico para la biosíntesis de la serotonina (5-hidroxitriptamina, 5-HT) a través de la enzima triptófano hidroxilasa. La restricción de Trp en la dieta podría conducir al bajo nivel de la serotonina en el cerebro, que se ha relacionado con la morbilidad de la depresión. En este trabajo de investigación, reportamos efectos tanto de corto como de largo plazo de la restricción dietética de triptofano sobre la emocionalidad y algunos aspectos bioquímicos del cerebro, en un modelo en rata. Los resultados de esta tesis se resumen a continuación: La aplicación de una dieta basada en maíz, con bajas concentraciones de triptófano (80% menos que la dieta normal) durante los días posnatales 30–60 (que corresponden al periodo adolescente-juvenil de la rata) produce: 1) Una disminución del contenido de serotonina en varias regiones cerebrales relacionadas directamente con la emocionalidad. 2) Una disminución significativa en la neurogénesis de la zona subgranular de la formación hipocámpica. 3) Anormalidades en la citoestructura de las neuronas piramidales que incluyen una disminución de la arborización dendrítica y una pérdida significativa de la densidad de espinas dendríticas. 5) Comportamientos de tipo ansiedad y depresión en los sujetos sometidos a esta restricción, no solo inmediatamente posterior a la suspensión de la dieta, sino también 6 meses después de la suspensión de la misma. Los resultados obtenidos a partir de este proyecto indican claramente que la restricción dietética de triptofano durante etapas tempranas del desarrollo puede causar hiposerotoninergia en el sistema nervioso central y producir fenómenos anatomofuncionalmente aberrantes a corto y largo plazo, los cuales podrían contribuir a la etiología de trastornos de ansiedad y depresión en poblaciones expuestas a dietas con bajo contenido en triptófano, tanto en la adolescencia como en la adultez.

## **2. ABSTRACT**

*Tryptophan (Trp) is an essential aminoacid involved in the supply of many organisms, including humans. Its main function, like other aminoacids, is the building blocks of protein biosynthesis. Trp also functions as a biochemical precursor for the biosynthesis of serotonin (5-hydroxytryptamine, 5-HT) by tryptophan hydroxylase. Restriction of Trp in the diet could lead to low serotonin in the brain, which has been associated with morbidity of depression. In this research, we report the effects of both short- and long-term dietary restriction of tryptophan on emotional and biochemical aspects of the brain in a rat model. The results of this thesis are summarized as follow: the application of a low tryptophan diet based on corn, (80% less to normal rodent diet) during postnatal days 30-60 (adolescence -youthful in the rat) produces 1) a decrease in serotonin content in several brain regions directly related to emotionality; 2) significantly reduced neurogenesis in the subgranular zone of the hippocampal formation; 3) abnormalities in the cytoplasmic structure of pyramidal neurons including a decrease of dendritic arborization and a significant loss of density of dendritic spines; 4) behaviors such as anxiety and depression in subjects undergone this restriction not only immediately after the suspension of the diet but also six months after the suspension. The results from this project clearly indicate that dietary tryptophan restriction during early stages of development may produce a hyposerotoninergic environment in the central nervous system and produce aberrant short and long terms anatomic and functional changes, which could contribute as etiologic factors in disorders such as anxiety and depression in low Trp diet exposed populations both in adolescence and adulthood.*

# 3. INTRODUCCIÓN

## 3.1 Generalidades

El triptófano es un aminoácido esencial que solamente se obtiene a través de la dieta. Este aminoácido es el precursor de la serotonina (5-hidroxitriptamina o 5-HT). Varios estudios han demostrado que la concentración de serotonina en el cerebro es directamente proporcional a la concentración del triptófano en el plasma. La ingesta dietética de triptófano influye en la cantidad de serotonina en el plasma, en el cerebro y en el resto del cuerpo (Siegel y cols., 1999).

La serotonina, en conjunto con otros sistemas de neurotransmisión como los de la norepinefrina (NE) y la dopamina, tienen una fuerte influencia en patrones de conducta y algunos eventos de la actividad cerebral que se manifiestan en la actividad mental. Estas tres sustancias son fundamentales para un buen funcionamiento del cerebro, además, se vincularon desde la década de los años sesenta del siglo XX en las primeras hipótesis bioquímicas de los trastornos afectivos (Blows, 2000).

La disfunción serotoninérgica desempeña un papel importante en la etiología de la depresión, en la cual la desesperanza, la ansiedad y la anhedonia (incapacidad para experimentar placer) son los síntomas cardinales. Hay datos que apoyan la existencia de fallas en los mecanismos de regulación de las monoaminas serotonina (5-HT), norepinefrina (NE) y dopamina (DA), en la depresión mayor y en trastornos bipolares. Uno de los posibles mecanismos es la baja disponibilidad de estas moléculas en la hendidura sináptica (Baldwin y Birtwistle, 2002). La interacción de estos 3 neurotransmisores es crucial para un estado emocional equilibrado, por lo que desde hace 50 años existe lo que se ha llamado la “hipótesis de las monoaminas en la depresión” (Schildkraut y Seymour 1967), que describiremos más adelante.

Los mecanismos propuestos para explicar la disminución de serotonina y su metabolito, incluyen factores como la disponibilidad del precursor triptófano, la tasa de síntesis de 5-HT, la recaptura o metabolismo de 5-HT, el funcionamiento de los receptores de 5-HT pre- y post-sinápticos, y una interacción alterada entre la 5-HT y otros neurotransmisores (Mazer y cols, 1997; Kalyanasundaram, 1976; Bell y cols., 2001; Shibata y cols., 1996; Fadda y cols., 2000).

Aunque se ha establecido una fuerte relación entre una disfunción del sistema serotoninérgico y el origen de la depresión, recientemente han surgido hipótesis en una de las cuales se piensa que una alteración en la plasticidad neuronal está relacionada con la depresión. Esta hipótesis ha sido ampliamente difundida y apoyada con evidencias experimentales (Duman y cols. 1997).

El desarrollo temprano del sistema serotoninérgico y sus extensas conexiones sugieren que la serotonina puede desempeñar un papel muy importante en el desarrollo del cerebro, por lo tanto, la hipótesis que propone el presente proyecto de investigación es que una deficiencia en el sistema serotoninérgico en estadios cruciales del desarrollo puede inducirse por una falta de sustrato (triptófano), lo cual a su vez causará cambios estructurales que traerán como consecuencia patrones conductuales alterados.

### 3.1.1 La serotonina (5-hidroxitriptamina, 5-HT): aspectos neurobioquímicos básicos

La serotonina es producida a partir del aminoácido esencial triptófano (Fig 1), el L-triptófano es el aminoácido esencial (Tabla 1) menos abundante en los alimentos. Tiene una distribución inusual en los alimentos y la mayoría de este aminoácido proviene de la carne, así como del huevo, las almendras, lácteos, legumbres (soya), frutos (plátano, piña, aguacate y algunos secos), en contraste en los cereales la concentración de este aminoácido es muy baja (Sargar 2001).

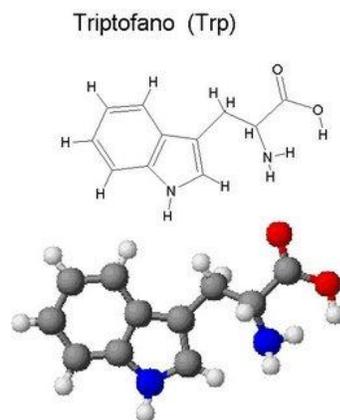


Figura 1. Estructura química del triptófano, un aminoácido esencial. Las esferas representan la localización teórica de los átomos. Rojo: oxígeno; azul: nitrógeno, gris: carbono; blanco: hidrógeno.

<b>Aminoácidos esenciales</b>	<b>Aminoácidos no esenciales</b>
Fenilalanina	Alanina
Isoleucina	Arginina
Leucina	Asparagina
Lisina	Aspartato
Metionina	Cisterna
Treonina	Glicina
Triptófano	Glutamato
Valina	Glutamina
<u>En niños:</u>	Histidina
Arginina*	Prolina
Histidina*	Serina
	Tirosina

\*Los aminoácidos histidina y arginina no son sintetizados en los niños pequeños, por lo tanto son esenciales en esta etapa del desarrollo, pero no en la etapa adulta.

Tabla 1.- Aminoácidos. Lista de los aminoácidos clasificados en esenciales y no esenciales para el ser humano. Los aminoácidos esenciales cuya ausencia genera más problemas en humanos son: el triptófano, la lisina y la metionina. Su carencia es típica en poblaciones en las que los cereales o los tubérculos constituyen la base de la alimentación. El déficit de aminoácidos esenciales afectan mucho más a los niños que a los adultos.

El triptófano es un aminoácido aromático. La parte aromática está unida al carbono  $\alpha$  a través de un carbono metilénico (Fig. 1). La parte aromática o grupo R del triptófano tiene una estructura heterocíclica llamada indol.

Bajo situaciones fisiológicas el triptófano se metaboliza por tres vías principales:

1. Incorporación a las proteínas de tejido
2. Conversión en 5-hidroxitriptamina (5-HT o serotonina)
3. Catabolismo produciendo  $\text{CO}_2$  y agua

Para que el metabolismo del triptófano se lleve a cabo adecuadamente, requiere de una cantidad adecuada de bipterina, vitamina  $\text{B}_6$  y magnesio. La vitamina  $\text{B}_6$  está involucrada como un cofactor en la conversión de triptófano en serotonina.

En condiciones fisiológicas, la enzima limitante de la síntesis de serotonina, la triptófano hidroxilasa, no está completamente saturada, por lo tanto, la vía de síntesis, por

lo menos en el sistema nervioso central, está fuertemente influenciada por la disponibilidad del substrato - L-triptófano (Fernstrom, 1983). Se sabe que el triptófano es transportado a través de la barrera hematoencefálica por acarreadores, que también transportan otros aminoácidos grandes neutros (*Large Neutral Amino Acids* LNAAs, sus siglas en inglés): isoleucina (ile), leucina (leu), fenilalanina (phe), tirosina (tyr), valina (val), histidina (his) y metionina (met). El triptófano debe competir con estos otros aminoácidos por el transporte hacia el cerebro (ilustrado en la figura 2), por lo tanto, la cantidad de triptófano transportado depende tanto de su concentración como de la concentración de los otros aminoácidos en el plasma (Blows, 2000). Ya dentro de la neurona, se lleva a cabo el proceso para la síntesis de serotonina el cual se describe en la figura 3.

El nivel de triptofano intracerebral aumenta o disminuye dependiendo tanto de nivel de triptófano en el plasma como de la concentración de otros LNAAs. Cabe señalar que la serotonina periférica (sintetizada fuera del SNC), no puede por si misma atravesar la barrera hematoencefálica.

La síntesis de la serotonina incluye una conversión inicial a la molécula de 5-hidroxitriptófano (5-HTP) por medio de la enzima triptófano hidroxilasa. Posteriormente el 5-HTP es descarboxilado por la descarboxilasa de los L-aminoácidos aromáticos, para formar 5 Hidroxitriptamina (5-HT), o sea la serotonina. El principal metabolito de la degradación de la 5-HT es el ácido 5-hidroxi-indol-acético (5-HIAA), el cual se puede medir en el liquido cefalorraquídeo (LCR), plasma y la orina (Shatzberg y cols., 2002).

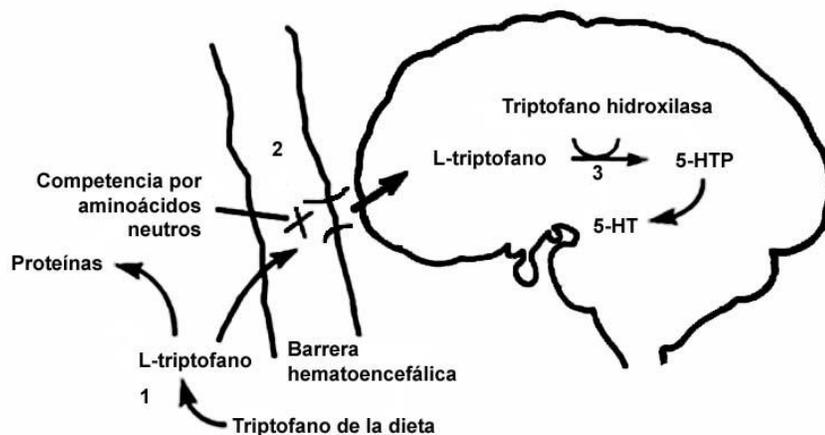


Figura 2. Resumen del proceso desde la absorción de triptófano a partir de la dieta hasta la conversión en serotonina intracerebral.

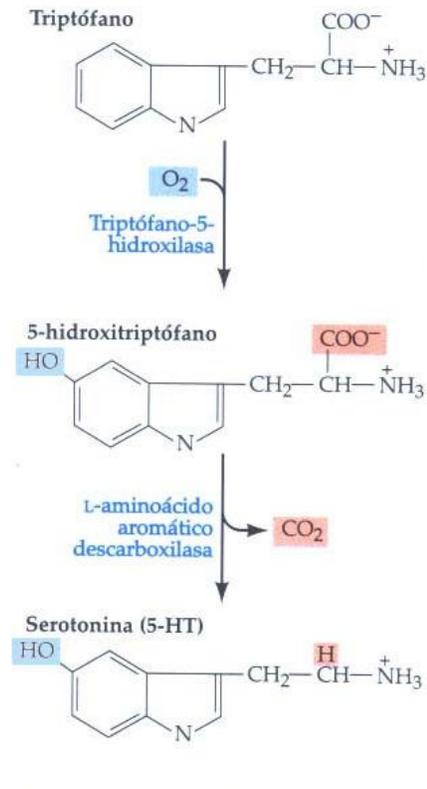


Figura 3. Biosíntesis de la serotonina. La síntesis de la serotonina incluye una conversión inicial a la molécula de 5-hidroxitriptófano (5-HTP) por medio de la enzima triptófano hidroxilasa. Posteriormente el 5-HTP es descarboxilado por la descarboxilasa de los L-aminoácidos aromáticos, para formar 5 Hidroxitriptamina (5-HT), o sea la serotonina.

La serotonina es una indolamina (Fig. 4). Fue aislada por primera vez en el año 1948 por Maurice M. Rapport, Arda Green, e Irvine Page de la Clínica de Cleveland, (Rapport y cols 1948) quienes acuñaron el nombre "serotonina" que refleja las circunstancias en las que se descubrió el compuesto - fue inicialmente identificado como una sustancia vasoconstrictora en el plasma sanguíneo (o serum) – de ahí su nombre serotonina - un agente sérico que afecta al tono vascular. Este agente fue posteriormente identificado químicamente como la 5-hidroxitriptamina y desde entonces se le han asociado una amplia gama de propiedades fisiológicas. El 5-HT ha sido el nombre más adoptado por la industria farmacéutica.

Este neurotransmisor, del tipo de las monoaminas, está involucrado en muchas funciones fisiológicas en el sistema nervioso. Entre las más relevantes se encuentran: el

desarrollo cerebral, maduración neuronal, la regulación del estado de ánimo, el ciclo sueño-vigilia y el apetito. La serotonina es sintetizada en el cerebro y en otros sitios del cuerpo, como es la pared intestinal.

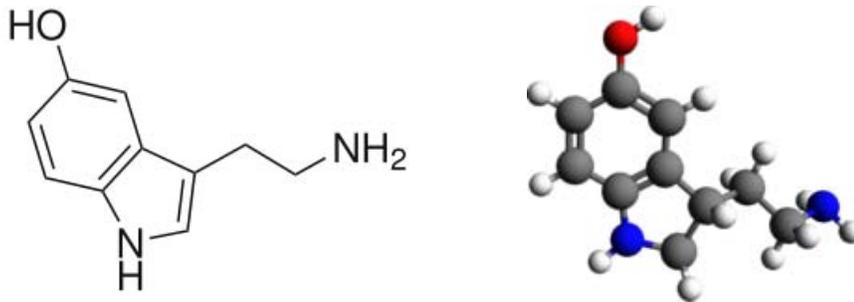


Figura 4. Estructura química de la serotonina. Las esferas representan la localización teórica de los átomos: rojo: oxígeno, azul: nitrógeno, gris: carbono, blanco: hidrogeno.

En el cerebro, es en el rafe medio del puente en donde hay una gran densidad de cuerpos neuronales. Las neuronas del rafe dorsal están conectadas a la mayor parte del sistema nervioso central (cerebro, tronco del encéfalo, la médula espinal). La serotonina se libera en la sinapsis y se une a receptores situados en la membrana de la neurona postsináptica, pudiendo modular sus propiedades eléctricas.

La serotonina ejerce una importante acción en el talante, la conducta, el movimiento, la apreciación del dolor, la actividad sexual, el apetito, las secreciones endocrinas, las funciones cardiacas y el ciclo de sueño-vigilia. La mayoría de la serotonina cerebral se genera de los núcleos del rafe (Fig. 5), principalmente en el noveno núcleo del rafe, que se localiza entre la línea media del puente y el bulbo raquídeo, estructuras que forman parte del tallo cerebral (Blows, 2000).

### 3.1.2. Desarrollo del sistema serotoninérgico

La serotonina es uno de los primeros sistemas de neurotransmisión en aparecer en el cerebro de los mamíferos y eventualmente se convierte en uno de los sistemas más distribuidos en el cerebro, el cual contacta a la mayoría de las células de la corteza. De esta forma, el sistema serotoninérgico se desarrolla de una manera eficiente y temprana,

y se extiende de tal forma que puede tener influencia en la maduración de muchas otras células en el cerebro. Aparte de influir en el desarrollo de regiones blanco, la serotonina también desempeña un papel en la retroalimentación negativa en las mismas neuronas serotoninérgicas (Whitaker-Azmitia, 2005).

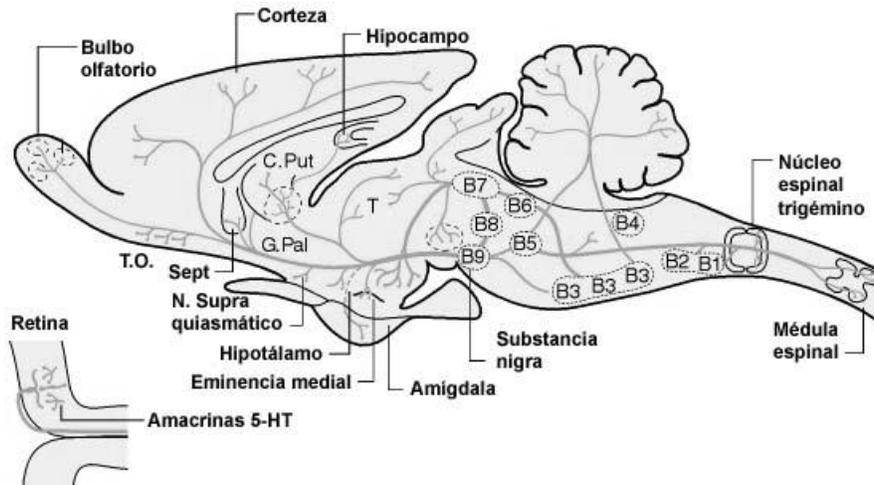


Figura 5. Grupos de los cuerpos celulares serotoninérgicos. Dibujo esquemático describiendo la localización de los grupos de los cuerpos celulares serotoninérgicos en una sección sagital del sistema nervioso central de la rata y sus principales proyecciones. TO, tubérculo olfatorio; Sept, septum; C.Put, núcleos del caudado-putamen; G.Pal, globo pálido; T, tálamo (modificado de Siegel et al 1999).

En el cerebro humano, las neuronas serotoninérgicas se hacen evidentes alrededor de las 5 semanas de gestación y las fibras serotoninérgicas continúan creciendo hacia la corteza durante el desarrollo prenatal. En el momento del nacimiento, un ritmo serotoninérgico diurno y altamente regulado está presente. Los niveles serotoninérgicos en el cerebro continúan incrementándose durante los primeros 2 años de vida, edad en la cual empiezan a declinar hasta alcanzar los niveles de adulto, los cuales son el 50% de los valores pico que se presentan en la infancia. En el cerebro de la rata, se observa un patrón similar de desarrollo. Las células serotoninérgicas se pueden identificar por primera vez en el día 12 de la gestación como dos grupos de células en la línea media del rombencéfalo. Aunque los axones serotoninérgicos alcanzan sus regiones blanco al nacimiento, la arborización para la innervación final se completa alrededor del día 21 posnatal (PN). Es durante el tiempo de arborización final que la serotonina alcanza sus niveles máximos en los roedores, muy similar al patrón que presenta entre los dos y los cinco años el humano en su desarrollo. El hecho de que las concentraciones de

serotonina cerebral lleguen a su máximo el día 21 PN en la rata y entre los 2 y 5 años en el humano, podría reflejar el doble papel de la serotonina en el cerebro, tanto como una señal para el desarrollo del sistema nervioso central, así como de neurotransmisor. En el cerebro inmaduro, se requieren altos niveles de serotonina para llevar a cabo el papel que ésta tiene ya definido para el desarrollo. También se ha mostrado que durante el desarrollo, la serotonina tiene influencia en la maduración de los tejidos incluyendo su participación en la arborización dendrítica, en la sinaptogénesis, en la neurogénesis y en la organización de la corteza. Sin embargo, la función más importante de la serotonina en el desarrollo es su efecto de retroalimentación negativa en el desarrollo de las neuronas serotoninérgicas: a medida que las neuronas serotoninérgicas se desarrollan y los niveles de neurotransmisor se elevan, se alcanza un punto en el cual la inervación serotoninérgica es mayor a la requerida por un cerebro adulto, y el crecimiento es interrumpido por un mecanismo de retroalimentación negativa. Este mecanismo de retroalimentación negativa está mediado por el receptor serotoninérgico 5-HT<sub>1A</sub>, el cual se localiza con mayor densidad en las dendritas y somas neuronales (receptores somato-dendríticos) (Whitaker-Azmitia, 2005).

En animales adultos, la pérdida de serotonina tiene como consecuencia pérdida de algunas proteínas y marcadores moleculares los cuales han sido asociados con un fenotipo de maduración neuronal. En ratas adultas en las cuales se aplicó PCPA (Paraclorofenilalanina: inhibidor específico de la enzima limitante de la conversión de Trp a 5-HT: la triptófano-hidroxilasa) durante 8 días, se produjo un decremento de hasta un 50% en el número de sinápsis no-monoaminérgicas en la corteza somatosensorial. Este tratamiento también produjo una marcada reducción tanto en la inmunorreacción a MAP-2 como en la reacción anti-sinaptofisina en el hipocampo de la rata adulta. Administrando PCA (P-Cloroanfetamina) un liberador de 5-HT que lesiona los axones serotoninérgicos, aparecieron neuronas en degeneración vistas en toda la corteza, produciendo también una reducción importante en la inmunorreacción a MAP-2 y sinaptofisina en todo el cerebro. Estos estudios indican que la 5-HT no solo promueve la maduración neuronal durante el desarrollo, sino que también mantiene el proceso de maduración en el adulto (Azmitia y cols, 1995, Whitaker-Azmitia, 2001). Se ha demostrado que la disminución de MAP2 se acompaña de una reducción en la densidad de espinas dendríticas en el

hipocampo (Zetterström y cols. 1999). Por lo tanto, la serotonina ha sido catalogada como un factor de crecimiento (Seuwen y Pouyssegur 1990).

## 3.2 ANTECEDENTES DIRECTOS

### 3.2.1 La restricción de L-triptofano dietético induce depresión

El desafío fisiológico de restricción de L-triptófano (TRP) ha proporcionado una herramienta para examinar el sistema de 5-HT en la depresión (Flugge y cols. 2004). La restricción induce síntomas depresivos en sujetos humanos controles sanos con alto riesgo familiar para la depresión (Glaser y cols. 1981, Hoyer y cols. 2002). Por otra parte, recaídas a la depresión se observaron en pacientes con historias clínicas de depresión quienes habían sido "curados" por los inhibidores de recaptura de serotonina. Estas recaídas fueron inducidas administrando un cóctel de aminoácidos que no contenía L-triptófano. (Delgado y cols. 1999)

### 3.2.2. El maíz como base de la dieta experimental

El maíz (*Zea mays*) ya era cultivado por las poblaciones autóctonas cuando se "descubrió" el continente americano. Actualmente la importancia de este cereal en la nutrición de millones de personas en todo el mundo es ampliamente reconocida. Sin embargo se ha descubierto que los granos de maíz tienen una baja concentración de proteínas y la calidad de éstas se halla limitada por la deficiencia de algunos aminoácidos esenciales. La deficiencia de lisina, triptófano e isoleucina en el maíz ha sido demostrada mediante numerosos estudios en animales (Howe y cols. 1965) y en un número reducido de estudios con seres humanos (Bressani, 1990).

Distintos investigadores han descrito el modo en que se cocina el maíz en las zonas rurales de los países consumidores de tortillas. Illescas (1943) fue el primero en describir el proceso tal como se lleva a cabo en México. La transformación del maíz en tortillas requiere de un proceso en el que se utiliza agua, calor e hidróxido de calcio. Estos tres elementos influyen en la composición química del maíz elaborado, dando lugar a modificaciones en su contenido de nutrientes. Los cambios se deben a las pérdidas materiales de grano y a las pérdidas químicas, que pueden derivar de la destrucción de algunos elementos nutritivos y de la transformación química de otros (Bressani, 1990).

El maíz ha sido el componente dietético principal de las poblaciones indígenas americanas por muchos siglos. Se ha documentado (incluyendo reportes en la pagina oficial de las Naciones Unidas, Cohen 1999) que estas poblaciones sufren altos índices de depresión, ansiedad, abuso de sustancias químicas y suicidio. La etiología de estos trastornos afectivos reportados puede ser multifactorial y el ambiente sociocultural desempeña un papel predominante; sin embargo, si existe alguna posible relación entre la nutrición y la salud mental no está claro, ya que este aspecto ha sido investigado muy poco.

La reducción de triptófano ha proporcionado una herramienta fisiológica para examinar el sistema serotoninérgico en una forma indirecta. La reducción aguda de triptófano disminuye los niveles de serotonina en el cerebro. Esto se logra por medio de la administración de una mezcla de aminoácidos sin triptófano pero con un alto contenido de “aminoácidos neutros” y otros aminoácidos. La mezcla estimula la síntesis de proteínas que requieren triptófano, entonces el poco triptófano circulante es utilizado. Más aún, se origina una competencia a nivel de la barrera hematoencefálica entre el poco triptófano y los demás aminoácidos que utilizan el mismo transportador (isoleucina, leucina, valina, treonina, tirosina y fenilalanina). Debido a esta competencia entre los aminoácidos, menos triptófano cruza la barrera hematoencefálica. En humanos, la ingestión de 50-100 gramos de una mezcla de aminoácidos sin triptófano después de 4 a 6 horas genera una reducción del 75 al 90% del triptófano en plasma (Riedel y cols. 2002), por lo que una reducción en la ingesta de triptófano es una herramienta útil para examinar el sistema serotoninérgico.

## 4.- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La mayoría de los estudios sobre la reducción del triptófano se han reportado en las tres últimas décadas y han sido realizados en el campo de la depresión. Esto refleja el intenso interés acerca del papel que juega la serotonina (5-HT) en la patogénesis y tratamiento de los padecimientos afectivos. En estudios mas recientes el reto de la reducción de triptófano ha sido utilizado como una herramienta para examinar el sistema serotoninérgico con lo cual se ha podido considerar a la serotonina como un factor clave asociado a algunos padecimientos afectivos. Por otro lado sabemos que el maíz nativo

(conocido popularmente como "criollo") contiene bajas cantidades de algunos aminoácidos esenciales, entre ellos, el triptófano, y que ha sido el principal componente dietético en América durante muchos siglos. Basándonos en estos antecedentes importantes, nos preguntamos: Si durante una etapa del desarrollo posnatal, el sujeto se somete a una dieta deficiente en triptófano, ¿podríamos observar algunos cambios en la citoestructura y la funcionalidad del sistema nervioso central? Si la respuesta a esta pregunta fuese afirmativa, ¿el sujeto tendría algunos trastornos emocionales a corto y/o a largo plazo?

## 5.- HIPÓTESIS

Una dieta baja en contenido de triptófano durante la etapa postnatal del desarrollo de la rata produce cambios en la citoestructura y la conectividad del sistema nervioso central. Estos cambios son reflejados a nivel conductual manifestando conductas tipo ansiedad y depresión, tanto a corto como a largo plazo.

## 6.- OBJETIVOS

### 6.1 General:

Determinar los efectos de una dieta prolongada con bajo contenido de triptófano administrada en las etapas postnatal P0 a P30 y P30 a P60 sobre la conducta relacionada con depresión, ansiedad y cambios en la citoestructura durante el desarrollo y en la edad adulta de ratas.

### 6.2 Específicos:

6.2.1. Elaboración de la dieta a base de maíz nativo de Mesoamérica:

6.2.1.1 Obtención del maíz

6.2.1.2 Caracterización de los contenidos de triptófano en maíz crudo, antes y después de la nixtamalización.

6.2.2. Generación de grupos experimental y control

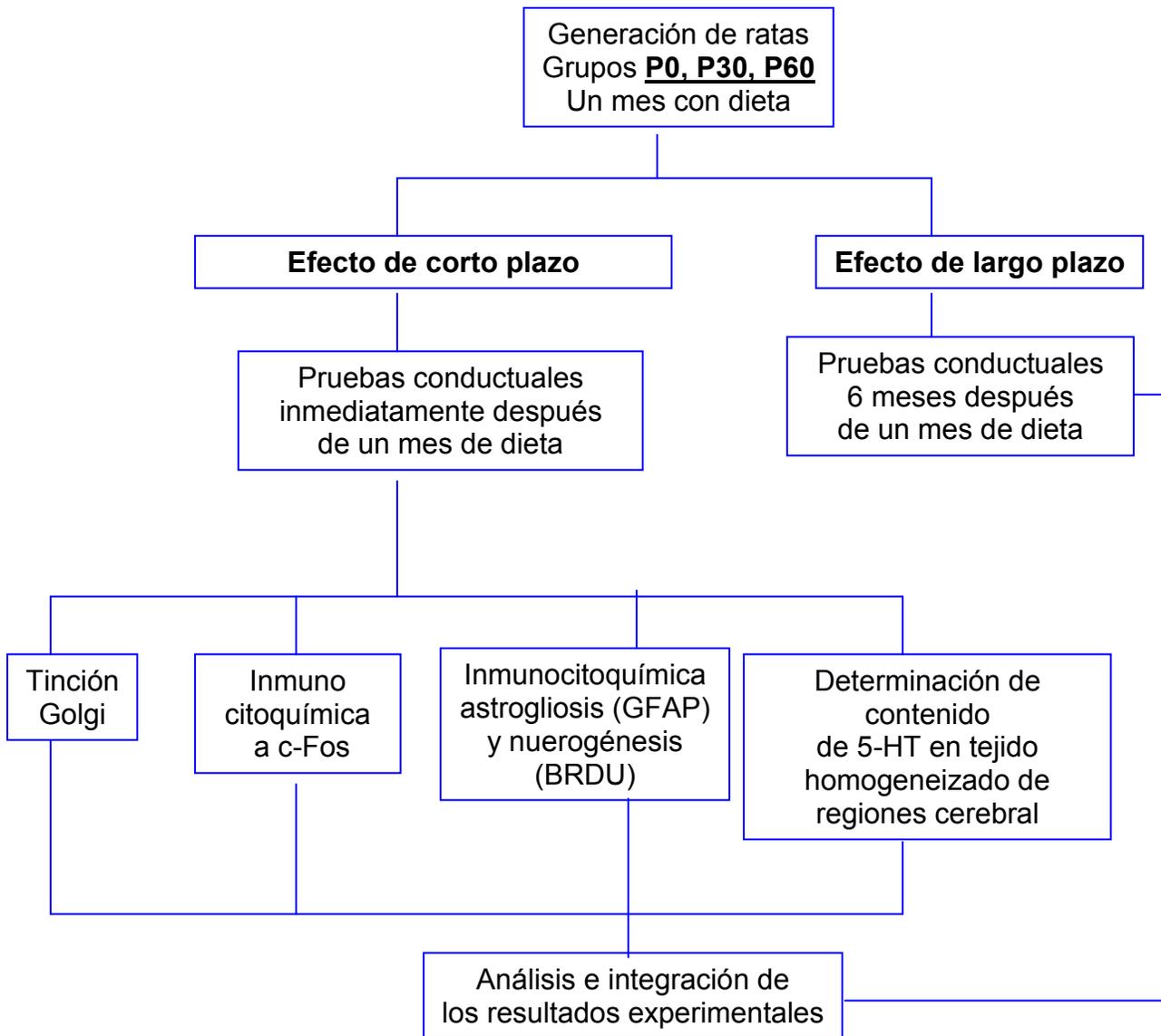
- 6.2.2.1 Grupos experimentales (E): ratas alimentadas con la dieta de tortilla baja en TRP adicionada con complejos vitamínicos en dos etapas de desarrollo. Del día posnatal 0 (P0) al P30 (Grupo E0-30) y del día P30 al P60 (Grupo E30-60)
- 6.2.2.2 Grupos controles (C): ratas alimentadas con la dieta de tortilla baja en TRP adicionada con complejos vitamínicos y triptófano al nivel de la dieta normal de bioterio en las mismas etapas de desarrollo: Grupo C0-30 y Grupo C30-60.
- 6.2.3 Caracterización conductual usando pruebas validas para ansiedad, depresión y aprendizaje espacial a corto plazo y largo plazo.
  - 6.2.3.1 Prueba de nado forzado (*Forced Swimming Test*, FST).
  - 6.2.3.2 Prueba de laberinto elevado en cruz (*Elevated Plus Maze*, EPM)
  - 6.2.3.3 Prueba de enterramiento defensivo
  - 6.2.3.4 Prueba de laberinto acuático de Morris
- 6.2.4 Caracterización de la citoarquitectura hipocámpica con tinción de Golgi.
- 6.2.5 Determinación de la proliferación celular en el giro dentado del hipocampo.
- 6.2.6 Caracterización de la activación neuronal posterior a una prueba conductual
  - 6.2.6.1 Determinación de la expresión de c-Fos después de las pruebas conductuales, en diferentes estructuras cerebrales.

## 7.- DISEÑO EXPERIMENTAL

Para la determinación de los efectos conductuales y anatómicos durante el desarrollo en ratas sometidas a una dieta prolongada con bajo contenido de triptófano se planeó un estudio dividido en dos partes:

1. Estudio Integral de los efectos conductuales y anatómicos durante las etapas P0 a P30 y P30 a P60 (dieta administrada por 30 días).
2. Estudio Integral de los efectos conductuales en animales sometidos a la restricción durante P30-P60, evaluados a los 8 meses de edad.

El diseño experimental se puede resumir en el diagrama de flujo siguiente:



**Estudio Integral de los efectos conductuales y anatómicos a corto plazo durante las etapas P0 a P30 y P30 a P60 (30 días de dieta)**

El protocolo experimental para el primer estudio se muestra en la tabla 2. El diseño experimental contempló un total de cuatro grupos. Dos grupos para la etapa postnatal P0 y dos para la etapa postnatal P30. Cada par de grupos consiste de un grupo experimental y un grupo control. Ambos grupos fueron alimentados con una dieta baja en contenido de triptófano a base de tortilla adicionada con complejos vitamínicos. La dieta del grupo

control fue además adicionada con triptófano para igualar el contenido de una dieta comercial utilizada en el bioterio.

Los parámetros evaluados fueron la densidad de arborización dendrítica y espinas dendríticas para todos los grupos bajo estudio. Las evaluaciones conductuales se realizaron solo para los animales en la etapa de desarrollo P30 un mes después de haber comenzado la dieta. También para este grupo se realizaron estudios de Inmunohistoquímica y determinación de contenido de serotonina para diferentes regiones del cerebro (tabla 2).

### **Estudio Integral de los efectos conductuales y anatómicos a largo plazo (60 días) durante las etapas P0 a P30 y P30 a P60**

El diseño experimental para este estudio se llevó a cabo de la misma forma que el estudio anterior, donde también se contemplaron un total de cuatro grupos. Dos grupos para la etapa postnatal P0 y dos para la etapa postnatal P30. Cada etapa de desarrollo consistió de un grupo experimental y un grupo control. Ambos grupos fueron alimentados con una dieta baja en contenido de triptófano a base de tortilla adicionada con complejos vitamínicos. La dieta del grupo control fue además adicionada con triptófano para igualar el contenido de una dieta comercial utilizada en el bioterio. Al concluir esta etapa los animales fueron alimentados durante 30 días con dieta comercial y posteriormente se llevaron a cabo diferentes pruebas para la caracterización de estos grupos.

Tabla 2. Diseño experimental

Etapa postnatal	Semana postnatal	Procedimientos experimentales	Parámetro evaluado
P0	1 <sup>a</sup>	Comienzo de la dieta basada en tortilla (DBT) <sup>1</sup> n=5 para cada grupo (Ctrl. y Exp.)	Peso corporal
	2 <sup>a</sup>	DBT	Peso corporal
	3 <sup>a</sup>	DBT	Peso corporal
	4 <sup>a</sup>	DBT Sacrificio de los animales Tinción de Golgi-Cox comenzando en P30	Peso corporal  Densidad de arborización dendrítica y número de espinas dendríticas
P30	5 <sup>a</sup>	Comienzo de la DBT <sup>1</sup> n=20 para cada grupo (ctrl. y exp.)	Peso corporal
	6 <sup>a</sup>	DBT	Peso corporal
	7 <sup>a</sup>	DBT	Peso corporal
	8 <sup>a</sup>	DBT	Peso corporal
	9 <sup>a</sup>	<u>Subgrupo 1</u> (n=10 para cada grupo) Laberinto en cruz elevado (EPM de sus siglas en ingles) Preparación de muestras para HPLC  <u>Subgrupo 2</u> (n=10 para cada grupo) Prueba de nado forzado (FST de sus siglas en ingles) Inyección de 5-Bromodesoxiuridina (BrdU) Inmunohistoquímica (n=5)  Tinción de Golgi-Cox (n=5)	Número de entradas a los brazos abiertos Contenido de serotonina en diferentes regiones del cerebro  Inmovilidad  Inmunorreactividad a BrdU, c-Fos y TPH  Densidad de arborización dendrítica y número de espinas dendríticas.

1. Dieta basada en tortilla (DBT): Ctrl: DBT + 0.2% L – Tryptophan (Sigma, St Louis MO T-0254); Exp: DBT. TPH: Enzima Triptófano hidroxilasa.

# 8. MATERIAL Y MÉTODOS

## 8.1 Elaboración de la dieta a base de maíz con bajo contenido de triptófano

La dieta baja en contenido de triptófano se elaboró a base de maíz *landrace* de raza Bolita proveniente del centro de la valle de Oaxaca (donado del Centro Internacional para la Mejora del Maíz y Trigo, CIMMYT). La dieta de tortilla (DT) fue preparada de acuerdo al proceso de Nixtamalización descrito por Illescas en 1943. El proceso de Nixtamalización consistió en mezclar una parte de maíz con dos partes de una solución acuosa al 1% de cal. La mezcla se calienta a 80° C de 20 a 45 minutos y luego se deja reposar toda la noche. Al día siguiente, se decanta el líquido y el maíz, denominado entonces nixtamal. Se lava dos o tres veces con agua para eliminar las cubiertas seminales, las pilorizas, la cal sobrante y las impurezas del grano. Una vez eliminadas las impurezas se muele varias veces hasta obtener una masa suave a la cual se le adiciona complejo B (*Berocca T*, Roche, dosis estimada de 8.4 mg/100grs de peso de la rata) y con la cual se elaboraron las croquetas.

Los sujetos control fueron alimentados con la misma DT con suplemento de L-triptófano (Sigma, St. Louis, MO) para igualar el contenido de triptófano al nivel de la dieta comercial para ratas. Se pesa un kilo de masa y se agregan 3.0 gramos de Triptófano (teniendo la concentración final de aproximadamente de 0.2%, después de la cocción). Se revuelve muy bien la masa para homogeneizar el triptófano y se hacen croquetas similares a las de la comida que normalmente se les da en el bioterio. Para elaborar la dieta con la que se alimentó al grupo experimental se utilizó la masa sin adición de triptófano y se hicieron croquetas semejantes a las de la dieta comercial.

## 8.2. Sujetos experimentales y esquema de aplicación de la dieta

Se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar criadas en el bioterio de la Facultad de Medicina. Los animales fueron mantenidos en el bioterio del laboratorio con ventilación y

temperatura adecuada (20-24°C) con el ciclo de luz oscuridad 12:12 invertido con respecto al ciclo solar.

El primer grupo fue denominado grupo de etapa 1 (S1: P0 a P30) el cual consistió en 5 camadas con 5 crías machos lactantes cada una y sus respectivas ratas madre tanto para el grupo control como para el grupo experimental. Se mantuvieron en jaulas individuales para cada camada. Las ratas madre fueron alimentadas con la DT correspondiente y agua *ad libitum*.

El segundo y el tercer grupo fueron denominados grupo etapa 2 (S2, n=10) y grupo de etapa adulta (SA, n=10). Las ratas machos para ambos grupos fueron alimentados con la dieta antes mencionada durante el periodo de P30 a P60 y se mantuvieron alojados en jaulas individuales (este procedimiento fue determinado para poder monitorear la cantidad de alimento ingerido).

### 8.3. Pruebas conductuales

Estas pruebas y procedimientos se describen en las siguientes secciones:

#### 8.3.1 Prueba de nado forzado (FST por sus siglas en inglés *Forced Swimming Test*)

La prueba de nado forzado consiste en colocar a la rata en un cilindro de acrílico transparente con medidas 40 cm de alto y 18 cm de diámetro (Fig. 6) conteniendo una columna de 18 cm de agua (temperatura de 24° C). Los roedores forzados a nadar en un espacio pequeño sin escapatoria, después de un periodo inicial de actividad vigorosa, adoptan una postura de inmovilidad característica, en la cual realizan sólo los movimientos necesarios para mantener la cabeza fuera del agua. Se ha planteado que la inmovilidad refleja una “conducta de desesperanza” aprendida. Es decir, el animal aprende que no hay posibilidad de escapar, por lo que se queda inmóvil (Crawley y cols. 2001). Se han desarrollado numerosos modelos de conducta para el estudio de los cambios neuroquímicos asociados con la depresión. Las características comunes entre todos los modelos es que sus condiciones ambientales están ligadas al estrés para inducir conductas de depresión simulada. Un mecanismo psicológico que puede ser considerado en términos específicamente fisiológicos ha sido deducido del modelo de

“desesperanza aprendida”. Estudios farmacológicos han sugerido que los componentes de la “desesperanza aprendida” incluyen algunos sistemas neuroreguladores los cuales se piensa están involucrados con la depresión. Además, en específico los antidepresivos son capaces de disminuir el tiempo de inmovilidad,

Para el presente protocolo, se llevaron a cabo 2 sesiones de nado: una prueba previa inicial de 15 minutos, seguida de una prueba de 5 minutos 24 horas después. Ambas sesiones fueron videograbadas para su posterior análisis.

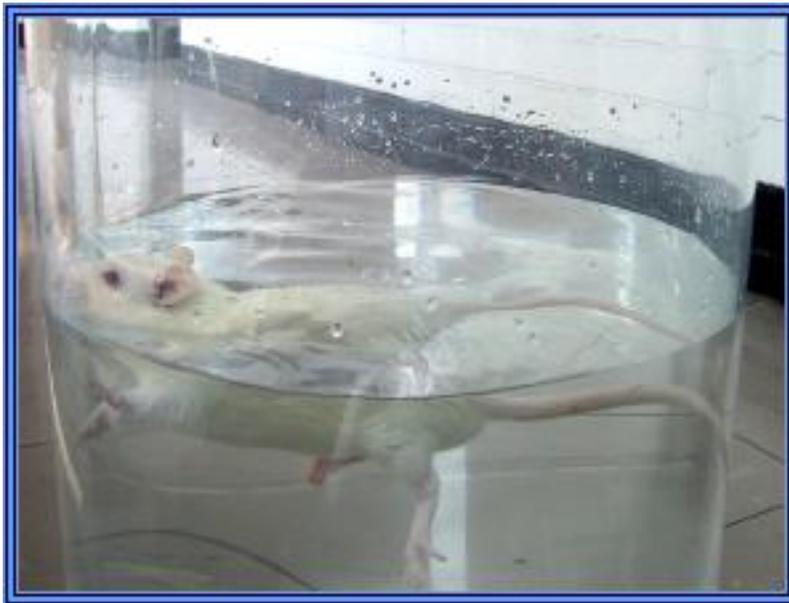


Figura 6. Prueba de nado forzado. La prueba fue sugerida y validada por Porsolt y cols. en 1977. Su confiabilidad se evaluó principalmente con antidepresivos (Detke y cols., 1995). El cilindro de acrílico transparente tiene una altura de 45 cm y un diámetro de 30 cm. La altura de agua del llenado es de 18 cm y la temperatura de la misma es de 24°C.

La técnica de registro se empleó para calificar algunas conductas durante la revisión del video. Este método ha sido descrito y demostró ser confiable y válido para detectar los efectos de diferentes medicamentos antidepresivos (Detke y cols., 1995). Al

final de cada periodo de 5 segundos durante la prueba de 5 minutos, el evaluador anota la conducta de la rata incluyéndola en una de las siguientes categorías:

- 1) Inmovilidad - flotando pasivamente en el agua y solo haciendo movimientos ligeros para mantener la cabeza por encima de la línea del agua (Porsolt et al., 1977)
- 2) Movilidad - haciendo movimientos de nado activo, mas de lo necesario para solamente mantener la cabeza por encima de la línea del agua (Ej. moviéndose alrededor del cilindro o escalándolo).

Las calificaciones para cada conducta se expresaron como cuentas totales de las para cada conducta (movilidad o inmovilidad) por sesión de 5 minutos. El número de cuentas de inmovilidad representa el número de veces que la conducta de inmovilidad fue detectada.

### 8.3.2 Prueba del laberinto elevado en cruz (*Elevated Plus Maze EPM*)

El laberinto elevado en cruz (EPM) ha sido usado para evaluar el nivel de ansiedad inducido por nuestro protocolo de investigación. La confiabilidad de esta prueba conductual yace en el conflicto inherente que contiene la prueba para la rata, entre la exploración de un área nueva y la evasión de las características aversivas de la prueba - lugares abiertos y elevados. El análisis de esta prueba ha mostrado que los mejores indicadores de ansiedad son el porcentaje de tiempo que permanece la rata en los brazos abiertos y el número de entradas en los brazos abiertos (el cual aumenta con tratamiento con ansiolíticos y se reduce con tratamientos ansiogénicos). De la misma, forma el mejor parámetro para medir la actividad locomotora es el número de entradas a los brazos cerrados. El EPM fue diseñado para proporcionar datos cuantitativos que indiquen conducta similar a la ansiedad y que no estén relativamente contaminados por cambios en la actividad motora total. Esta prueba ha sido extensivamente validada por Pellow et al (1985) usando para su validación parámetros conductuales, fisiológicos y farmacológicos (Crawley y cols., 1997) (Fig. 7).

El EPM está hecho de madera y consiste en dos brazos abiertos opuestos de 50 cm de largo por 10 cm de ancho, y dos brazos opuestos de las mismas dimensiones pero estos rodeados por paredes de 40 cm de alto sin techo (Fig. 7). Los brazos se conectan por un cuadro central de 10 x 10 cm. El aparato se encuentra elevado 50 cm del piso y alumbrado uniformemente por luz blanca. Las ratas se colocaron con la cara dirigiéndose

hacia el brazo cerrado y se les dejó explorar libremente por 5 minutos. Una cámara de video fue montada verticalmente sobre el laberinto, y la conducta fue grabada y analizada posteriormente. El porcentaje de tiempo que se mantuvieron en el brazo abierto del laberinto proporciona información acerca de los niveles de ansiedad. (Pellow y cols.1985)



Figura 7. Laberinto elevado en cruz es una prueba conductual ampliamente utilizada para la medición de ansiedad en modelos animales con roedores. La rata tiene la naturaleza exploratoria a nuevos sitios. Sin embargo, una de las características de la ansiedad es la evitación a explorar sitios nuevos por miedo a diversas amenazas potenciales. Al colocar la rata en el laberinto elevado en cruz, un ambiente nuevo, ella se somete al conflicto entre la exploración y el miedo (de caerse o vulnerable a alguna presa). En los sujetos ansiosos, prevalece el miedo sobre las ganas de exploración. Los indicadores de la prueba son porcentajes del tiempo que la rata pasa en los brazos abiertos en el tiempo total de la prueba y los números de entrada a los brazos abiertos Esta prueba fue originalmente propuesta y validada por Pellow y cols., 1985. Se ha propuesto que la prueba es sensible a las modificaciones del sistema serotoninérgico. (Pellow & File, 1986).

### 8.3.3 Prueba de enterramiento defensivo

La prueba requiere que el animal en experimentación no haya sido expuesto a este protocolo con anterioridad, ya que normalmente la conducta a medir se presenta después de una experiencia única con el choque eléctrico.

En una jaula, una de las paredes tiene en su cara interna un electrodo que al ser tocado por la rata, le provoca un choque eléctrico de baja intensidad, pero suficiente para causarle molestia y evitarlo. La rata que ha sufrido el choque, por reflejo, primero se aleja del electrodo, pero después vuelve a acercarse lentamente, con el hocico por delante en una postura corporal estirada con movimientos abruptos de retirada. Posteriormente comienza a rociar hacia y sobre el electrodo el material con el que previamente se ha cubierto el suelo de la caja (aserrín, paja, etc.) utilizando movimientos rápidos y alternantes de las patas delanteras. Esta conducta, llamada enterramiento defensivo, puede suprimirse en una manera dosis dependiente con drogas ansiolíticas, y a veces se acompaña por un aumento en el número de choques eléctricos. Se sabe que esta disminución de la conducta defensiva con ansiolíticos no es secundaria a un impedimento motriz, deficiencias de aprendizaje asociativo o analgesia. Por otra parte, fármacos ansiogénicos incrementan la conducta de enterramiento del electrodo.

Las ratas se habitúan a la jaula de la prueba colocándolas 30 minutos al día por cuatro días consecutivos. En este periodo, el electrodo no está presente. Al final de cada día, las ratas se regresan a su jaula original. Al día siguiente del último día de habituación, se coloca a la rata en la jaula de la prueba y el experimentador activa el electrodo únicamente cuando el hocico y las patas delanteras del animal hacen claro contacto con el electrodo (de lo contrario, el animal solo recibe un pequeño choque eléctrico y su respuesta conductual estará aminorada). La intensidad del choque eléctrico es de 1 mA. Después del primer choque, se mantiene activo el electrodo para que posteriores contactos continúen dando choques.

El tiempo que el sujeto experimental pasa enterrando el electrodo es usado como el parámetro operacional para la conducta ansiosa.

Después de 15 minutos del primer choque, se retira la rata a su jaula original y se limpia la jaula de registro (incluyendo electrodo) para el siguiente animal.

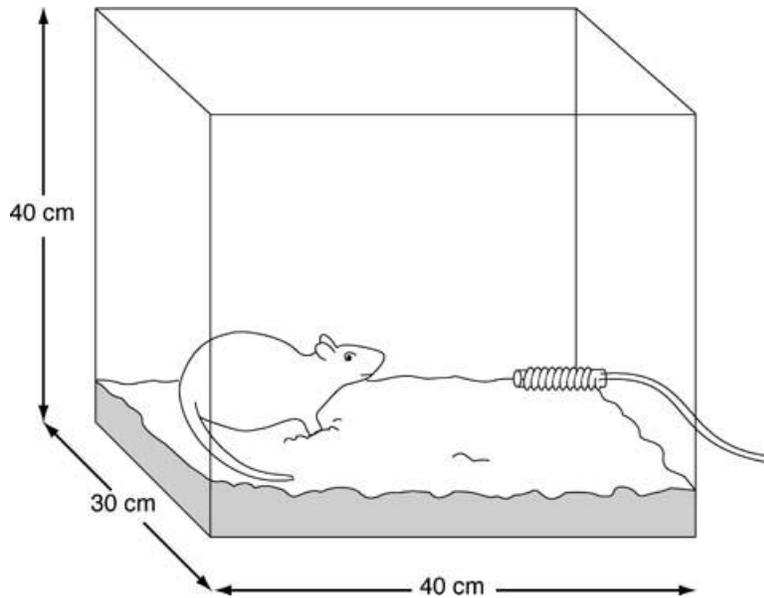


Fig. 8 Un ejemplo de una jaula para la prueba de enterramiento defensivo. La caja está hecha de plexiglas transparente (aunque la de aparatos Costall tiene paredes de metal) con el techo abierto. El piso está cubierto (5 cm) uniformemente de aserrín. En el centro de una de las paredes laterales, se inserta un electrodo 7 cm por arriba del suelo. El electrodo se conecta a una fuente de corriente eléctrica de 1 mA con un multímetro. (Dibujo tomado de *Current Protocols on Neuroscience*, 2005).

#### 8.3.4 Laberinto acuático de Morris (MWM, siglas en inglés de Morris Water Maze).

El laberinto acuático de Morris (MWM) es una de las pruebas más utilizadas en la neurociencia conductual para el estudio de los procesos cognoscitivos y los mecanismos neuronales del aprendizaje y la memoria espacial. La tarea básica es muy simple: Los animales, por lo general ratas o ratones, se colocan en una piscina circular con agua y se les obliga a encontrar el único escape posible, una plataforma oculta cuya localización sólo puede ser ubicada por un conjunto de señales fijas fuera de la alberca, por lo que el animal tiene que emplear su memoria espacial (Fig. 9). Conceptualmente, la tarea se deriva de las células de lugar (*place cells*) que son neuronas en el hipocampo que identifican o representan determinados puntos en un espacio (O'Keefe, 1971). La prueba del laberinto acuático fue desarrollada por Richard Morris de la Universidad de St. Andrews en Escocia, describiéndola por primera vez en dos publicaciones en la década de 1980 (Morris, 1984).

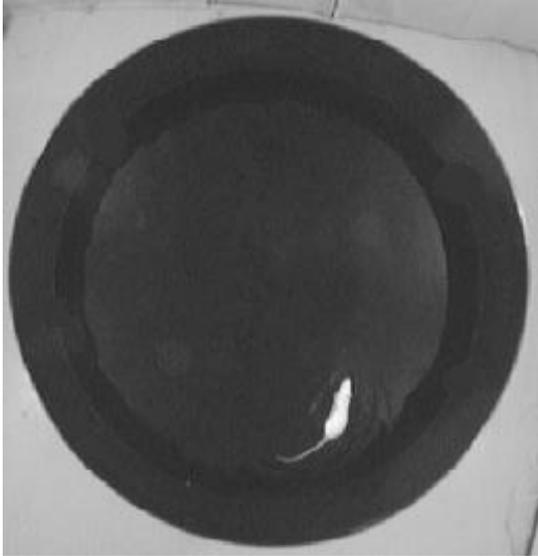


Fig. 9 El laberinto acuático de Morris (MWM, Morris, 1984) evalúa el aprendizaje espacial y la retención de memoria. Una piscina circular blanca o negra (diámetro de 156 cm y altura de 80 cm) rellena con 30 cm de agua (25°C aproximadamente) con señales visuales externas se utilizó para este prueba, incluyendo una plataforma circular de escape (diámetro 12 cm) sumergida 1 cm por debajo de la superficie del agua. A las ratas se les permitió nadar hasta 120 segundos para localizar la plataforma de escape. Si los sujetos experimentales no habían encontrado la plataforma en el tiempo permitido, se les guiaba a la plataforma. Una vez allí, las ratas permanecieron durante 5 segundos para que pudieran observar el lugar y ubicación.

La prueba de MWM fue realizada cuando las ratas del grupo SA cumplieron 6 meses de edad. La alberca consiste en una tina con diámetro de 158 cm pintada de negro y llena de agua con 30 cm de alto ( $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) Algunas pistas visuales fueron colocadas alrededor de la pared de la alberca para esta prueba cognitiva. Una plataforma de 12 cm de diámetro y de 28.5 cm de altura pintada de negro fue colocada en uno de los 4 cuadrantes en los que se dividió la alberca. La latencia de escape fue medida como el tiempo que se tarda el animal en encontrar la plataforma. Las ratas fueron sometidas a una prueba previa con dos sesiones de nado. En la prueba previa la plataforma fue situada en un cuadrante distinto al que se le colocó en la prueba definitiva. La prueba definitiva consiste en 8 corridas de nado para cada individuo con un intervalo de 5 minutos entre cada corrida. Cada corrida tiene una duración de 60 segundos o hasta que la rata encuentre la plataforma (lo que suceda primero). Si la rata no encuentra la

plataforma en 60 segundos el experimentador la guía hasta la plataforma y la deja 5 segundos para que observe la localización de ésta.

#### 8.3.5 Prueba de anhedonia

Esta prueba fue descrita inicialmente por Willner y cols. en 1987. A los animales experimentales se les colocaron dos bebederos, uno al lado del otro. Uno de ellos contenía agua de garrafón y el otro una solución de sacarosa al 5 % de en el agua del garrafón. A cada animal se le permitió que consumiera libremente cualquiera de los dos bebederos por 24 horas. Las botellas fueron pesadas antes de la prueba y se registra en una tabla los pesos precisos de cada una de ellas. Al terminar el periodo de 24 horas se volvieron a pesar todas las botellas y se calculó el peso restante que corresponde al líquido ingerido. La cantidad de líquido azucarado ingerido se ha interpretado como un parámetro operacional para la medición de anhedonia.

#### 8.4 Estudio de la cito-estructura con la Tinción de Golgi-Cox

Como los procedimientos de tinción de células a base de hematoxilina que habían sido introducidos a mediados del siglo XIX eran inadecuados, Camilo Golgi desarrolló sus propias técnicas de tinción. En 1873 publicó el breve artículo en la Gaceta Medica "Sobre la estructura de la materia gris del cerebro" en el que describía diversos procedimientos de tinción con nitrato de plata y bicromato potásico. Con este procedimiento revolucionario, conocido como tinción de Golgi y todavía empleado hoy día, Golgi tuvo por primera vez una clara visualización del cuerpo de las células nerviosas en diferentes áreas; por ejemplo, de las células piramidales del hipocampo, de las células de Purkinje del cerebelo mostrando sus terminaciones dendríticas, de la estructura del bulbo olfatorio, etc. Cox en 1891 hizo una modificación a la técnica de Camilo Golgi en la cual fijó el tejido con una solución que contiene tanto dicromato de potasio como cloro mercurio seguido de una inmersión en dicromato de potasio para obtener un endurecimiento adicional. La ventaja de esta técnica es que solo se revela un número pequeño de las neuronas en el área de estudio (del 5 al 10%), Sin embargo la impregnación permite visualizar sus dendritas con gran detalle.

La tinción Golgi-Cox ha sido una de las técnicas más efectivas para estudiar tanto la morfología normal y anormal de neuronas así como de glía. Usando la técnica de Golgi, se han descubierto sutiles alteraciones morfológicas en dendritas neuronales y en espinas dendríticas de animales tratados con fármacos así como en cerebros postmortem de pacientes con enfermedades neurológicas. Sin embargo, los mayores obstáculos de la aplicación generalizada de la tinción de Golgi han sido la confiabilidad y los procesos dependientes de tiempo.

La tinción rápida de Golgi está basada en el principio de los métodos descritos por Ramón-Moliner, Glaser y Van der Loos (1958). Esta técnica no solo ha mejorado dramáticamente la técnica Golgi-Cox, sino que además ha probado ser extremadamente confiable y sensible para mostrar ciertos detalles morfológicos de las neuronas y glía, especialmente espinas dendríticas, y ha sido usado extensivamente en cerebros de varias especies animales así como en muestras postmortem de cerebros humanos.

Bajo anestesia con pentobarbital sódico las ratas fueron decapitadas y el cerebro extraído rápidamente, lavado en pb 0.1 M y posteriormente incluidos en las soluciones que marca el protocolo del equipo de tinción de Golgi.

### 8.5 Perfusión y fijación del tejido cerebral para inmunohistoquímica

Las ratas se inyectaron con una sobredosis de tiopental sódico y perfundidas transcárdialmente con una solución salina al 0.9%, seguido por paraformaldehído 4% en 0.1 M de fosfato de sodio (PB) tampón (pH 7.4) más 15% (v / v) de solución saturada de ácido pícrico por 15 min. Los cerebros se extrajeron y lavaron con PB. Secciones coronales (50  $\mu$ m) de la amígdala y el hipotálamo se obtuvieron en un vibratomo (Leica VT1000, Heidelberg, Alemania). Las rebanadas cerebrales en libre flotación se incubaron con peróxido de hidrógeno al 3% en PB durante 10 min.

### 8.6 Inmunohistoquímica (IH)

#### 8.6.1 Medición de la activación neuronal después de una prueba conductual marcando la expresión de la proteína Fos del oncogen c-fos.

El oncogen c-fos es uno de los genes de la familia de genes de expresión temprana (*immediate early gens*, IEGs). Estos genes están presentes en muchos tejidos pero bajo condiciones basales usualmente se encuentran en muy bajos niveles. Toda variedad de estímulos que produzcan actividad neuronal iniciarán el incremento en los niveles de RNA mensajero (RNAm) de c-fos en tan solo minutos. El gen c-fos es un gen que produce una proteína con el mismo nombre: c-Fos. La proteína funciona a su vez como un factor de transcripción. En otras palabras, c-Fos puede controlar la transcripción de una hilera de DNA en RNAm. Usualmente la expresión de C-fos es muy baja en la mayoría de las células hasta que la célula es activada por un estímulo, como el estrés por ejemplo. Después de que la célula es activada, los niveles de C-fos se incrementan. Este aumento puede ser detectado relativamente rápido: 15-30 minutos después de la activación se puede detectar el RNAm de c-fos, y 30-60 minutos después podemos detectar a la proteína c-Fos teniendo el valor pico entre los 90-120 minutos posteriores a la exposición del estímulo. Por esto es que la presencia de c-Fos puede usarse como un marcador para activación celular generada por estímulos.

La detección de la proteína c-Fos puede hacerse usando una técnica llamada inmunohistoquímica. Esta técnica utiliza anticuerpos que se ligan en áreas específicas de una proteína mediante la incubación del tejido en una serie de diferentes soluciones químicas, incluyendo una que contenga un anticuerpo anti c-Fos. Los núcleos celulares que contengan c-Fos se marcan con un precipitado café oscuro.

#### Protocolo para la IH

- a. Lavado con PB 0.1M 3 veces durante 10min.
- b. Bloquear peroxidasa endógena incubando en 1% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por 10 minutos.
- c. Bloqueo con suero normal de cabra (*Normal Goat Serum* NGS) al 20% en PB 0.1 M y 0.3 % de Tritón 100X (PBT) por una hora.
- d. Aplicar anticuerpo primario: conejo anti c-Fos (Santa Cruz) 1;1000 (para **α-c-Fos**), Rata anti BrdU (Accurate) 1:1000 (para **α-BrdU**). Incubar en PBT con 1% de suero normal de cabra toda la noche en 4 °C.
- e. Lavar 3 veces durante 10 min con PBT.
- f. Aplicar anticuerpo secundario: cabra anti conejo 1:50 (Vector ABC kit) en PBT (para **α c-Fos**) y cabra anti rata 1:150 (Vector ABC kit) en PBT (para **α-BrdU**) con 1 % de suero normal de cabra. Incubar toda la noche a 4 °C.

- g. Lavar 3 veces durante 10min con PB 0.1 M
- h. Preparar complejo usando el kit ABC de Vector: 1 gota de A en 5 ml de PB, agitar en vórtex. 1 gota de B, agitar en vórtex. Preparar esta solución 30 minutos antes de agregar a la muestra.
- i. Incubar a temperatura ambiente 1 hora o a 4 °C toda la noche.
- j. Revelar con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y Diaminobencidina (DAB) usando Zymed kit.

### 8.6.2 Medición de neurogénesis/proliferación celular a través de la incorporación de 5-bromo-deoxiuridina y su inmunohistoquímica

Con el fin de caracterizar el fenómeno de la neurogénesis, se necesita una manera de marcar las células en proliferación. Una forma ampliamente utilizada actualmente es incorporar la molécula 5'-bromodeoxiuridina (BrdU) en la fase S del ciclo celular. En esta fase, las nuevas copias de ADN se sintetizan de manera que la célula puede llegar a dividirse en dos células hijas, cada una con una copia de ADN. El BrdU es un análogo sintético de la timidina, por lo que también se incorpora en las células durante la replicación del ADN, lo que nos permite identificar las células en división. En esencia, el BrdU proporciona a los científicos una manera de tinción de las células que están proliferando en el cerebro.

Se inyecta por vía intraperitoneal BrdU 3 días previos de la perfusión a una dosis de 50 mg/kg.

Los procedimientos para las reacciones inmunohistoquímicas se resumen a continuación:

Para la reacción inmunohistoquímica contra BrdU, secciones de hipocampo dorsal se incubaron en HCl 2N durante 30 minutos a 37-C para la desnaturalización del ADN. Después de este paso, las secciones se lavaron dos veces con tampón borato 0,1 M (PH 8,5) seguido de un enjuague con tampón fosfato. Todas las inmunorreactivas secciones se incubaron con 0,3% de Tritón X-100 (Sigma, T-7878) y el 0,3% de albúmina de suero bovino (Sigma, A2153) en tampón fosfato durante 1 hora a temperatura ambiente temperatura. Esta solución fue utilizado en los siguientes pasos menos que se especifique. Los siguientes anticuerpos primarios se utilizaron: anti-BrdU de ratas (Accurate Scientific, OBT003, 1:1000); ratón anti-c-Fos (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA; SC52, 1:1000), anti-GFAP de conejo (Biocare Medical, Cat. CP040C, 1:200) y

anti-hidroxilasa-tryptophan oveja (Chemicon Internacional, Temecula, CA; AB1541, 1:1000). Después de la incubación durante una noche con anticuerpos primarios, las secciones se lavaron 3 veces durante 10 minutos y luego se incuban durante 4 horas a temperatura ambiente con la siguientes anticuerpos secundarios biotinilados: anti rata/conejo (Vector Labs, Burlingame, CA; 1:200) para BrdU, anti ratón/caballo (Vector Laboratorios, 1:200) para c-Fos, y anti oveja/conejo (Vector Labs1:200) para triptófano hidroxilasa. Por último, las secciones fueron incubados en el complejo avidina/biotina/ peroxidase (Elite ABC kit, Vector Labs) durante 1 hora a temperatura ambiente. La reacción para peroxidasa fue realizada con diaminobencidina (DAB) como cromógeno. Las secciones fueron desarrolladas utilizando Kit de sustrato DAB-Plus (Francisco Zymed Laboratories, San, CA, 2000).

8.7. Determinación de contenidos de 5-HT (serotonina) en tejido cerebral homogeneizados de diversas regiones relacionadas con la emocionalidad, con cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC, por sus siglas en inglés - *High performance liquid chromatography*).

El contenido de serotonina en áreas específicas del cerebro se midió con HPLC con detector de fluorescencia. Inmediatamente después de la elevación más prueba del laberinto, 10 ratas de cada grupo fueron sacrificados por decapitación; la corteza prefrontal, el cuerpo estriado, el hipocampo, y el tronco cerebral fueron disecados con rapidez en una placa de Petri enfriada con hielo. Los tejidos se mantuvieron en la etiqueta microtubos Eppendorf, pesados y de congelación rápida con nitrógeno líquido y se mantienen en el congelador J70-C hasta su transformación. La serotonina contenidos (ng de 5-HT/mg de proteína) fueron medidos por HPLC acoplado a un detector de fluorescencia (Waters 474; excitación L 290-nm y de emisión L 330-nm) de acuerdo a la turba y Gibb (36). En resumen, 100 KL de icecooled 0,1 M de ácido perclórico con 4 mM de sodio metabisulfito/30 mg de tejido húmedo se han añadido a todas las muestras. Después de la homogeneización, el extracto se centrifugó a 15.000g durante 10 minutos a 4-C. Los sobrenadantes se pasaron través de un filtro Millipore HV de 0,45 Km de tamaño de poro y KL 20 de esta solución se inyecta directamente en un revés columna de fase (simetría C-18, 150 de 3,9 mm interior de diámetro) con un tamaño de partícula de 5 mm y se mantiene en 30-C. La fase móvil consistió en una mezcla de metanol, doble de agua

destilada desionizada (3:2), y 0,02 mM de fosfato de potasio monobásico con 1 g / L de heptan ácido sulfónico sal de sodio (pH 3,5 ajustado con fosfórico ácido). El índice de flujo fue de 1 mL / minuto. La serotonina concentración se cuantificó con Aguas del Milenio 32 (versión de software 3,20; Waters, Milford, MA). Los niveles de proteína en el extracto se medido por el método de Lowry (37).

### 8.8 Análisis de datos

La comparación de los resultados obtenidos por las diferentes pruebas se realizó mediante una ANOVA usando la prueba t-Student -Newman-Keuls. Los niveles de significancia estadística se fijaron en  $p < 0.05^*$ ,  $p < 0.01^{**}$  y  $p < 0.001^{***}$ . En las gráficas se presenta el valor promedio  $\pm$  SEM (error estándar del promedio)

# 9.- RESULTADOS

## 9.1 Generación del modelo animal

### 9.1.1 Dieta baja en triptófano a base de tortilla

El análisis de contenido de triptófano en las croquetas para el grupo control (con adición de 3.0 g/Kg de triptófano) y para el grupo experimental, después de la nixtamalización, se muestran en la tabla 3; el análisis completo se muestra en el apéndice I. El contenido de triptófano en la dieta de maíz administrada correspondió aproximadamente a una quinta parte de la dieta normal del bioterio, lo cual se consideró satisfactorio para los objetivos del estudio.

Identificación	% de triptófano
Maíz de la raza "bolita" de los Valles Centrales de Oaxaca	0.053
Croqueta de maíz sin adición de Triptófano	0.051
Croqueta de maíz con adición de 3.0 g / Kg de masa	0.351

Tabla 3. Contenido de triptófano de 3 muestras en maíz crudo, después de la nixtamalización.

Todos los grupos experimentales se alimentaron *ad libitum* solo con TD a partir de maíz criollo raza Bolita del Valle Central de Oaxaca, México (donado por el Dr. M. Bellon, del Centro Internacional para el Mejoramiento del Maíz y el Trigo, CIMMYT).

### 9.2 Efectos de la restricción dietética de triptófano a corto plazo

#### 9.2.1. Conducta de desesperanza aprendida y ansiedad

Los animales con la dieta baja en contenido de triptófano mostraron un aumento significativo en la cuenta de inmovilidad durante la prueba de nado forzado:  $38.4 \pm 3.2$  contra  $23.4 \pm 2.1$  ( $n = 10$ ,  $F: 2.119$ ,  $p < 0.01$ ). Los resultados se muestran en la figura 10A. En la prueba de laberinto elevado en cruz para medir la conducta de ansiedad,

conducta de evitación en situaciones que existe un conflicto de gratificación y riesgo (en este caso es la exploración en el brazo abierto y el peligro de caerse). El grupo experimental permaneció menos tiempo en los brazos abiertos que el grupo control ( $14.5\% \pm 5.7\%$  vs  $33.3\% \pm 6.3\%$ ,  $F, 1.38, p < 0.05$ , Fig. 10B).

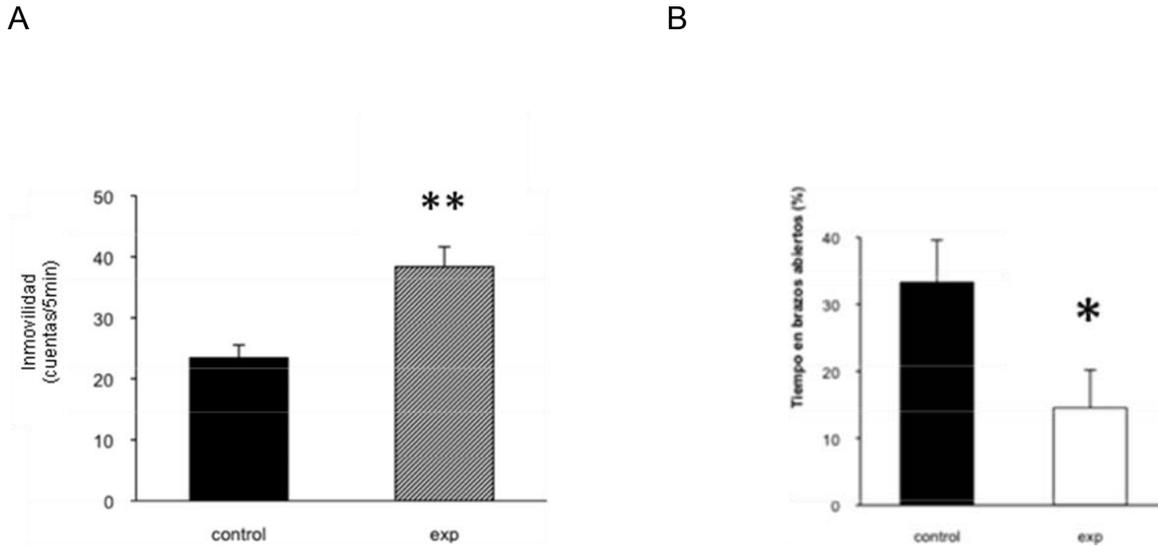


Figura 10. Inmovilidad mostrada por los sujetos experimentales y control en la prueba de nado forzado (a) y tiempo de permanencia en los brazos abiertos en la prueba de laberinto en cruz elevado (b). Los animales con la dieta baja en triptófano mostraron un aumento significativo en la inmovilidad durante la prueba de nado forzado:  $38.375 \pm 3.246$  vs.  $23.44 \pm 2.102$  del grupo control. En la prueba de laberinto elevado en cruz (EPM), el grupo experimental mostró una diferencia significativa contra el control. Los animales experimentales duraron menos tiempo ( $14.5\% \pm 5.7\%$ ) que el grupo control ( $33.3\% \pm 6.3\%$ ) en el brazo abierto del laberinto en cruz.  $n = 10$ . \*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$ .

### 9.2.2. Determinación del contenido de serotonina en diversas regiones cerebrales.

La determinación del contenido de serotonina por HPLC en la corteza prefrontal, estriado, hipocampo y tallos cerebral mostró una disminución significativa en los grupos experimentales (Fig. 11). En el caso de la corteza prefrontal (Pfc) que existieron mas diferencias en los tejidos provenientes de diferentes sujetos, el contenido promedio de 5-HT fue de  $3.32 \pm 0.39$  (ng de 5-HT / mg de tejido) versus  $5.24 \pm 0.58$  (ng de 5-HT / mg de tejido),  $F, 2.212, P < 0.001$ .

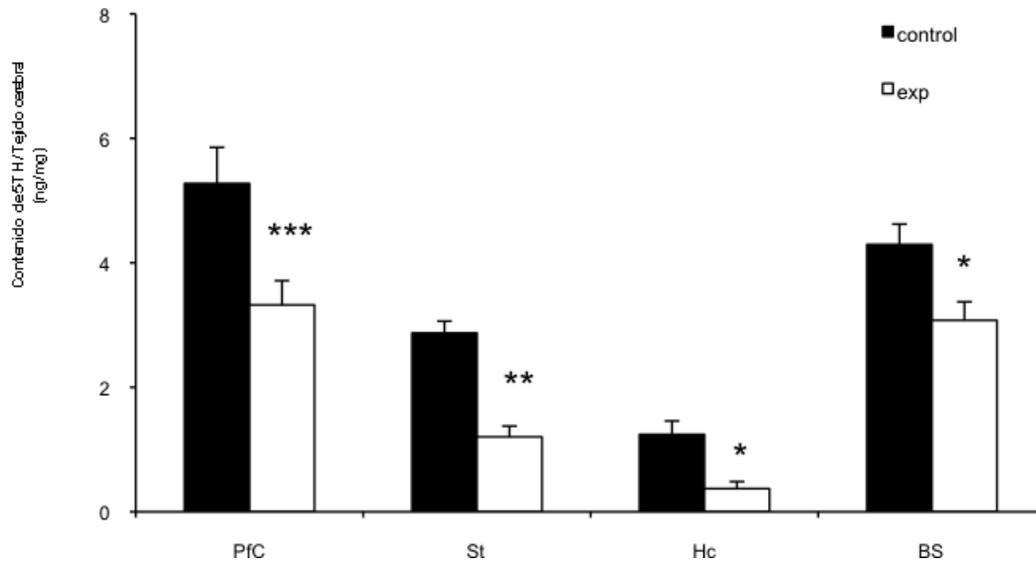


Figura 11. Contenido de serotonina en tejido cerebral determinado con HPLC con detector fluorométrico. PFC: corteza prefrontal, St. estriado, Hc: hipocampo, BS: tallo cerebral.  $n = 10$ . \*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$ ; \*\*\*\*,  $p < 0.001$ .

### 9.2.3 La expresión de la proteína Fos en diversas regiones cerebrales de los sujetos experimentales.

Noventa minutos después de completar la prueba de nada forzado, se perfundieron las ratas para detectar la expresión del gen de la expresión temprana *c-fos* a través de la inmunohistoquímica contra la proteína Fos, producto proteico de la transcripción de este gen. Medimos la expresión de *c-Fos* en la corteza prefrontal, hipocampo, núcleos amigdalinos. Estas son las regiones principales sabidas que reciben proyecciones serotoninérgicas de los núcleos del rafe dorsal. Observamos una reducción global de la densidad de núcleos positivos a Fos en todas las regiones estudiadas (Fig. 12A). En el caso de la capa granular del giro dentado (DG) que existieron mas diferencias en las rebanadas provenientes de diferentes sujetos, la densidad de núcleos Fos-positivos por  $0.1 \text{ mm}^2$  fue de  $14.14 \pm 1.14$  versus  $37.87 \pm 3.97$ ,  $F, 12.13, P < 0.001$ . Los paneles B y C de la figura 12 muestran fotomicrografías para ejemplificar este fenómeno.

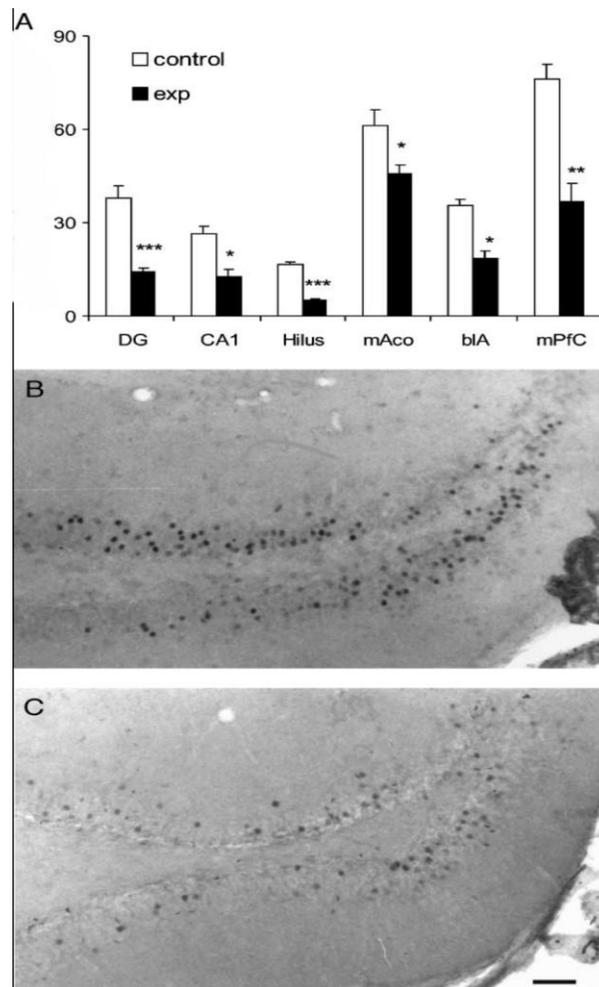


Figura 12. Expresión de la proteína Fos 90 min después de la prueba de nado forzado. (A): Histograma que muestra la densidad (por 0.1 mm<sup>2</sup>) de núcleos positivos a Fos en diversas regiones cerebrales. DG: giro dentado; CA1 y hilus: regiones del hipocampo; mAco: amígdala medial cortical, bIA: amígdala basal lateral; mPFC, corteza prefrontal medial.  $n = 5$ . \*\*\*,  $p < 0.001$ ; \*\*,  $p < 0.01$ ; \*,  $p < 0.05$ . (B) y (C): fotomicrografías de ejemplos de la expresión de Fos en el giro dentado de sujetos control y experimental, respectivamente. Barra de escala igual a 50  $\mu\text{m}$ .

#### 9.2.4 Inmunorreacción a la enzima triptófano hidroxilasa

Con el propósito de indagar cómo se ha afectado la maquinaria enzimática de la síntesis de serotonina, realizamos reacciones inmunohistoquímicas contra la enzima

limitante de la síntesis de la serotonina, triptófano hidroxilasa, en los núcleos de rafe dorsal de los sujetos experimentales. No se observó diferencia significativa en cuanto al número de células que expresan esta enzima los grupos experimental y control en el número de células serotoninérgicas en el rafe dorsal (Fig. 13, F, 1.288).

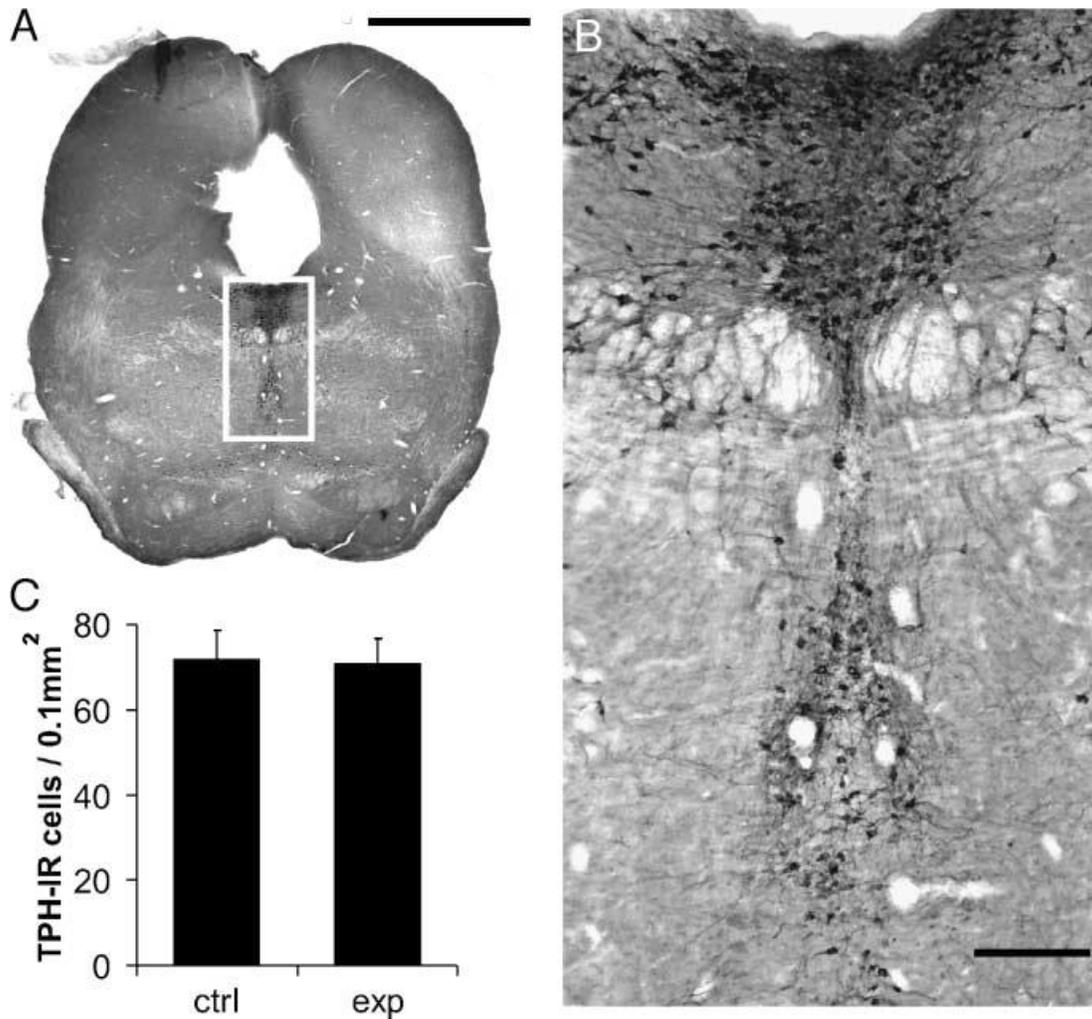


Figura 13. Inmunorreactividad a Triptofano Hidroxilasa. El tratamiento con la dieta baja en triptófano no produjo una diferencia aparente en la densidad de células inmunorreactivas a triptófano hidroxilasa en el rafe dorsal. (A) Corte coronal a nivel del tallo cerebral en el que se muestran las neuronas del rafe dorsal en un animal experimental. (B) Ampliación de (A) donde se muestran células inmunopositivas a triptófano hidroxilasa. (C) Histograma del conteo de las células inmunopositivas. Barra = 1mm en (a), Barra = 200 $\mu$ m en (b).

### 9.2.5 Inmunorreacción contra BrdU

Para investigar los mecanismos subyacentes de estas observaciones conductuales, diseñamos experimentos en dos aspectos: la neurogénesis y la citoestructura de las células piramidales del hipocampo. El grupo experimental mostró una reducción significativa en el número de células positivas a BrdU en la zona subgranular del giro dentado ( $F, 2.767, p < 0.001$ ). La figura 14 muestra los resultados de inmunohistoquímica y análisis estadística.

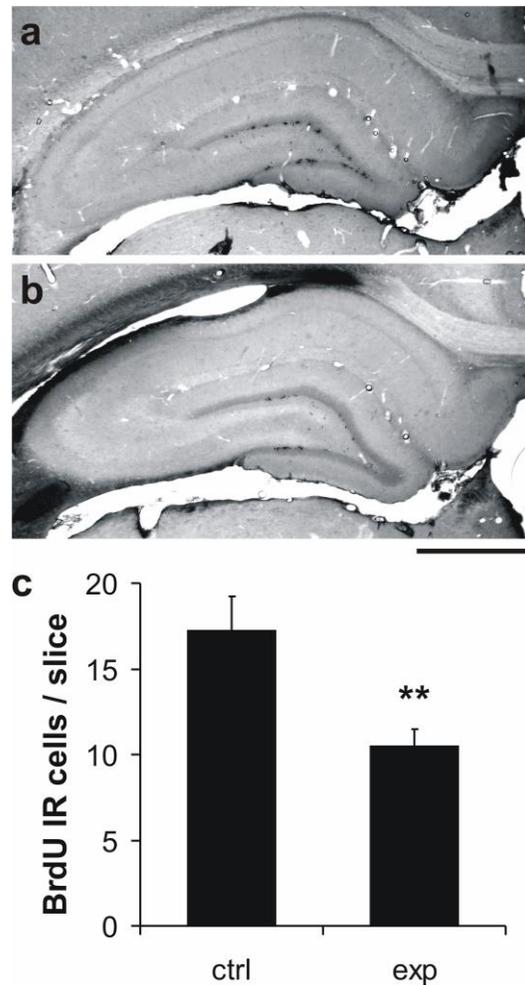


Figura 14. Figura donde se muestra una disminución significativa de células positivas a BrdU en la zona subgranular del giro dentado. (A y B) Fotomicrografías con ejemplos de cortes con las células positivas a BrdU en la zona subgranular y capa granular del giro dentado, de un animal control (A) y uno experimental (B). (C) Histograma del conteo de de células inmunopositivas a BrdU.

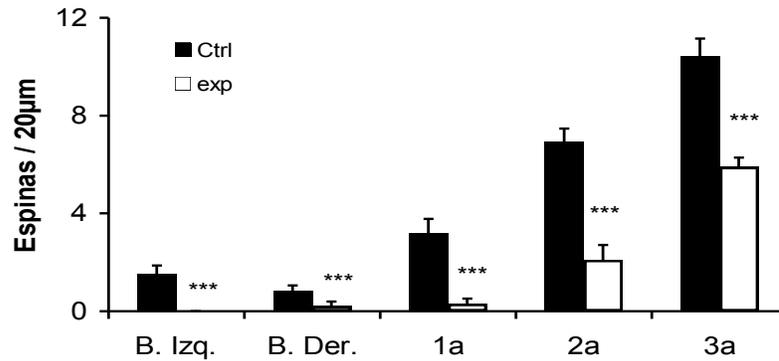
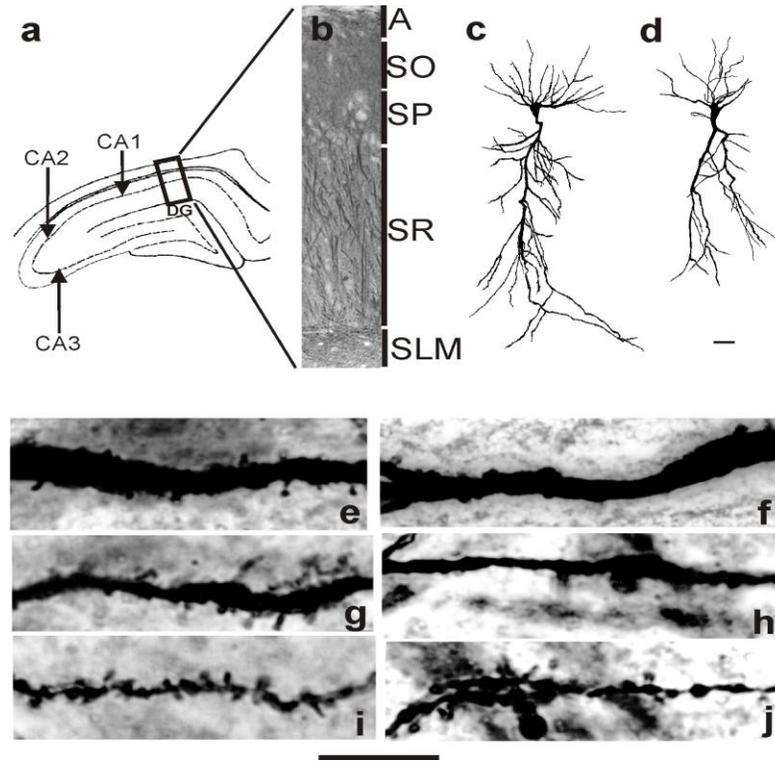


Figura 15. Cambios en la densidad de espinas dendríticas. (a) Esquema del hipocampo en donde el recuadro indica la región CA1 donde se hizo el análisis. (c, d) dibujos con cámara lúcida de neuronas piramidales de la región CA1 de un animal control (c) y uno experimental (d). (e-j) fotomicrografías de dendritas primarias de neuronas piramidales teñidas con Gligi-Cox, de un animal control (e, g, i) y uno experimental ( f, h, j). (h) el histograma muestra el análisis del conteo de las espinas dendríticas contadas en una longitud de 20 µm a lo largo de las dendritas de las células piramidales de la región CA1 del Hipocampo. “B. Izq.” y “B. Der.” se refieren al conteo en las ramas basales primarias de las dendritas. “1ª, 2ª y 3ª” se refieren al conteo en las ramas apicales primaria, secundaria y terciaria, respectivamente. En todos los casos, el grupo experimental mostró una reducción en el número de espinas dendríticas ( $p < 0.001$ ).

### 9.2.6 Densidad de espinas dendríticas

La figura 15 muestra los conteos de la densidad de espinas dendríticas en una longitud de 20  $\mu\text{m}$  sobre cinco diferentes segmentos dendríticos (dendrita basal primaria izquierda, dendrita basal primaria derecha, dendrita apical primaria, dendrita apical secundaria y dendrita apical terciaria) de las neuronas piramidales de la región CA1 del hipocampo. En todos los casos se observó una reducción significativa en la densidad de espinas dendríticas en el grupo experimental (F, 9.209,  $p < 0.001$ ).

### 9.3 Efectos a largo plazo: los efectos de la restricción dietética de triptófano durante el desarrollo persisten en la adultez

La restricción dietética del triptófano (TRP) se ha utilizado para estudiar la neurotransmisión serotoninérgica. Hemos reportado con los resultados anteriores que la deficiencia dietética de este aminoácido esencial durante las primeras etapas postnatal puede producir depresión y las conductas como la ansiedad, que se correlacionaron con varios hallazgos anatómicos y neuroquímicos aberrantes. Sin embargo, es importante determinar la reversibilidad de estas modificaciones en la edad adulta. Con el fin de aclarar esta cuestión, hemos realizados estudios preliminares sobre los efectos de la restricción dietética de triptofano en la edad postnatal temprana en este modelo experimental en el periodo 180 a 210, días postnatales los aspectos de aprendizaje espacial, ansiedad y conductas depresivas. Estos aspectos conductuales fueron evaluados con el laberinto acuático de brazos radiales, la prueba de enterramiento defensivo (DBT) y una versión modificada de la prueba de nado forzada estrés (FSST), respectivamente. Las ratas fueron perfundidos 90 minutos después de la última prueba de FSST y fue la expresión de c-fos medida en el hipocampo.

### 9.3.1 Conducta de tipo ansiedad y la desesperanza aprendida persistentes 6 meses después de la suspensión de la dieta deficiente de triptófano

En la prueba de enterramiento defensivo, los animales experimentales mostraron mayor tiempo de enterramiento, comparados al grupo control (Fig. 17 A, F, 1.693). Respecto a la prueba del nado forzado, las ratas experimentales mostraron mayor inmovilidad que las controles (Fig. 17 B, F, 1.266).

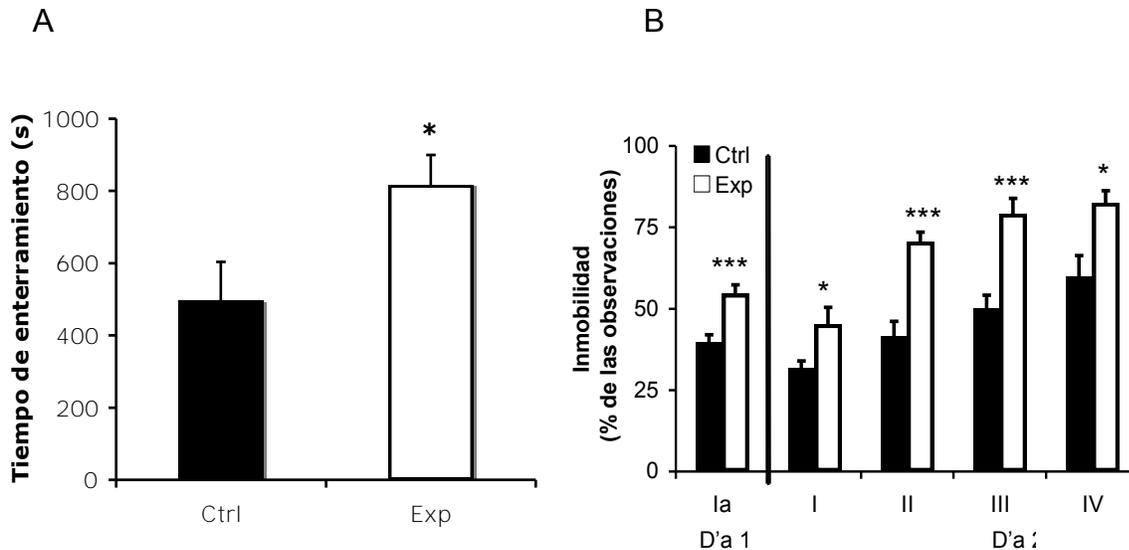


Fig. 16. Persistencia de alteraciones conductuales en los animales experimentales. A, Histograma de la prueba de enterramiento defensivo aplicado a los 210 PN, después de un mes de dieta baja en triptófano seguido por seis semanas de dieta normal. (B) La prueba de nado forzado se realizó en dos días, días PN 216 y 217, con una duración de 15 min en el primer día y seis en el segundo (se analizó la inmovilidad únicamente del segundo al sexto minuto). Se grafica el porcentaje de: observaciones de inmovilidad / observaciones totales. \*\*\*P<0.001, \*P<0.05.

### 9.3.2 Efectos en la actividad neuronal en el hipocampo

El análisis de la inmunorreactividad de c-Fos después de la prueba de nado forzado encontró una reducción en el Giro Dentado y en el área CA1 del hipocampo (Fig. 18). Estos resultados sugieren que la disminución transitoria de triptófano durante la etapa crítica del desarrollo postnatal podría tener consecuencias sobre las respuestas emocionales en los adultos.

-

---

Figura 17. Número de núcleos positivos a c-Fos en el giro dentado (DG) y el área CA1 (CA1) del hipocampo. n=5. \*\*\* P<0.001. F, 1.124.

# 10. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

La hipótesis de este estudio fue “una dieta baja en triptófano durante la etapa postnatal del desarrollo de la rata podría producir cambios fisiopatológicos en los sistemas de neurotransmisión dependiente de serotonina.” Para comprobar esta hipótesis se determinaron los efectos conductuales y anatómicos durante el desarrollo en ratas sometidas a una dieta prolongada (30 días) con bajo triptófano administrada en la etapa postnatal P0 a P30 o P30 a P60.

Las observaciones experimentales indican que el grupo experimental comparte algunas características con las alteraciones afectivas de depresión y ansiedad. Estos hallazgos indican que la hiposerotoninergia inducida por una dieta baja en triptófano, administrada en esta etapa del desarrollo, está involucrada en estos trastornos emocionales y sugiere que esto puede estar mediado por cambios en la plasticidad neuronal.

Los grupos control y experimental presentaron una disminución de peso de alrededor del 20 % en comparación con ratas de la misma edad alimentadas con dieta comercial. La dieta con bajo contenido en triptófano también tuvo una reducción en el contenido de grasas, proteínas y otros aminoácidos, como lisina. Esto podría generar la duda de si existe algún efecto de desnutrición y éste a su vez tener un efecto en las pruebas realizadas. Sin embargo, esto no necesariamente implica que la función del cerebro esté afectada. Con la finalidad de resolver esta incertidumbre se llevaron a cabo pruebas conductuales y anatómicas con animales alimentados con la dieta comercial empleada en el bioterio correspondientes a la edad postnatal P60 y con ratas con un peso de 120 g.

El número de espinas observadas en una impregnación de Golgi-Cox y el número de cuentas de inmovilidad en la prueba de nado forzado no reportaron diferencia significativa cuando se compararon con el grupo control alimentado con la dieta de tortilla. Estos resultados confirman que no hay ningún efecto por la diferencia de peso observada y que las comparaciones entre el grupo control y grupo experimental son válidas, por lo que no fue necesario incluir un tercer grupo control alimentado con dieta comercial

empleada en el bioterio. Los resultados se pueden observar en las figuras siguientes, 19 y 20.

El grupo experimental mostró algunas características asociadas a las alteraciones afectivas de ansiedad y depresión. Un aumento en la inmovilidad en la prueba de nado forzado y una disminución en la exploración en el laberinto elevado en cruz han sido reportados en varios estudios de depresión y ansiedad.

Los resultados también muestran un cambio de la expresión del gen *c-fos* de expresión temprana en las principales regiones del cerebro que reciben aferencias serotoninérgicas tales como corteza prefrontal (PFC), estriado dorsal y ventral y amígdala. Fadda y col. (2000) reportaron una disminución en la liberación de 5-HT en la región frontocortical después de una dieta sin triptófano durante cinco días. Por lo tanto, una consecuencia potencial de una dieta baja en TRP que cause hiposerotoninergia, es una alteración en la regulación de las respuestas fisiológicas neuronales mediadas por la 5-HT.

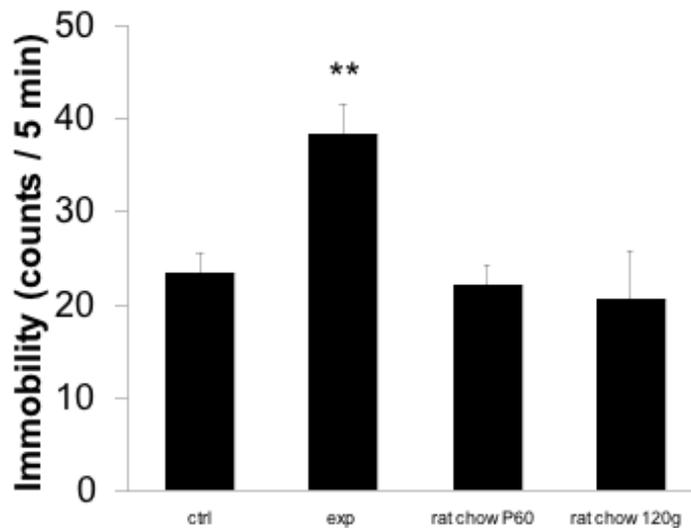


Figura 18. Cuentas de inmovilidad para la prueba de nado forzado. El grupo experimental (exp) fue significativamente diferente ( $P < 0.01$ ) a los otros grupos. El grupo control (ctrl) no mostró diferencia significativa con los grupos rat chow P60 y rat chow 120g alimentados con dieta comercial.

Se acepta, de manera general, que los cambios en la morfología y en el número de células representan mecanismos de plasticidad neuronal que permiten al animal adaptarse a estímulos ambientales y farmacológicos. Se observó que las ratas alimentadas con una dieta baja en triptófano presentaron cambios estructurales en las

neuronas piramidales de CA1 y en las células del giro dentado. También se observó afectada la producción de células, mostrando una disminución en la neurogénesis.

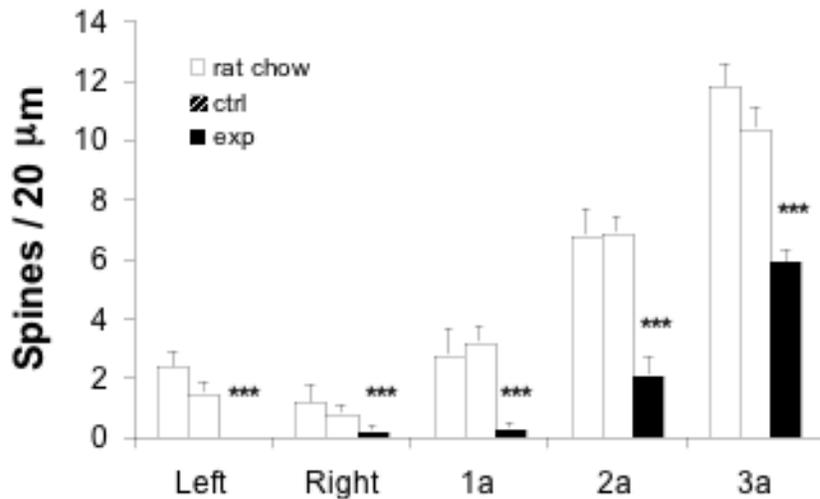
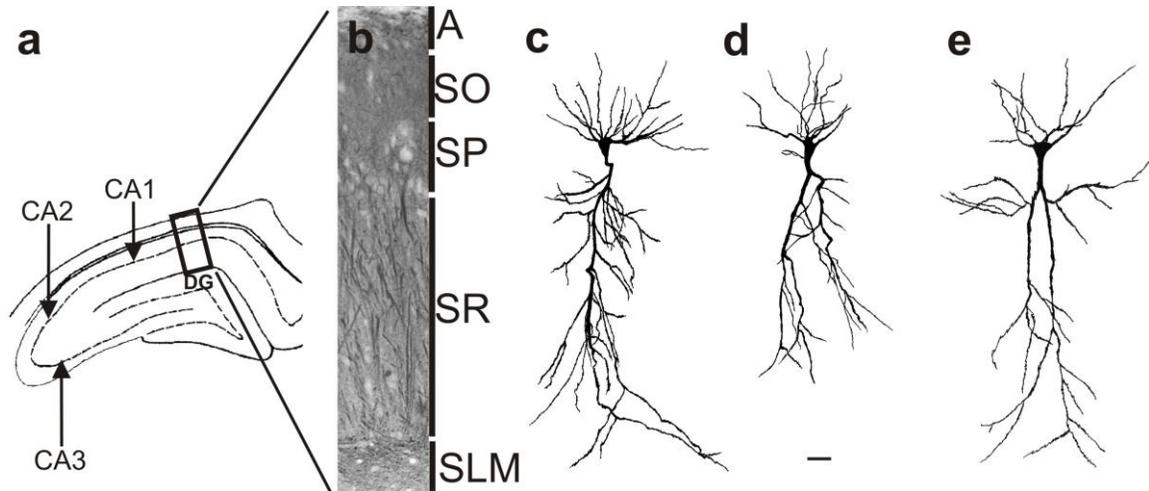


Figura 19. Conteo del número de espinas dendríticas. Panel superior, en a) y b) se muestra el lugar de donde se obtuvieron algunas células para realizar dibujos mediante un tubo de dibujo en el microscopio c) en el grupo control d) en el grupo experimental y e) en un animal del mismo peso del bioterio (rat chow). Escala en c) d) y e) igual a 40  $\mu\text{m}$ . En el panel inferior “Left b” y “Right b” se refiere a las cuentas de espinas en las ramificaciones basales primarias. 1a, 2a y 3a se refieren a ramificaciones apicales primarias, secundarias y terciarias respectivamente. La densidad de espinas no mostró una diferencia significativa entre el grupo control alimentado con dieta de tortilla y animales alimentados con dieta del bioterio.

En los resultados de la inmunorreacción a BrdU se observó una diferencia en el marcaje de las células, el grupo experimental mostró una reducción significativa en el número de células marcadas con BrdU en comparación con el grupo control ( $p < 0.001$ ). Sin embargo, el número de células marcadas es menor que el mencionado en algunos estudios reportados en la literatura, los cuales muestran un mayor número de células positivas a BrdU. Estas diferencias podrían estar relacionadas con la actividad física o bien con la dosis de BrdU administrada. Aún cuando no se evaluó la actividad física directamente, la observación general indica que ambos grupos tenían el mismo nivel de actividad física. Es decir, observaciones regulares en el desempeño y comportamiento de ambos grupos no revelaron ningún trastorno motor o hiperactividad que influyera en su desempeño o conducta. Debido a que el grupo experimental mostró más episodios de inmovilidad en la prueba de nado forzado, se podría inferir que éste tiene menos actividad física. Sin embargo, la actividad física no se puede evaluar en esta prueba, debido a que: no es su medio ambiente habitual, la prueba es de corta duración y está diseñada para evaluar otras características relacionadas con la desesperanza. Más aún, algún trastorno motor sería evidente en una prueba de este tipo, por lo que se puede concluir que las diferencias encontradas en la cantidad de neurogénesis no están relacionadas con la actividad física.

La reducción en el número total de células marcadas con BrdU podría tener relación con la dosis empleada (50 mg/kg), sin embargo la dosis de BrdU utilizada en la mayoría de los estudios de neurogénesis en roedores es de 50 a 100 mg/kg (Burns y Kuan, 2005; Miller y Novakowski, 1988; Perez-Martin *et al*, 2003). Algunos estudios recientes muestran que se necesita una inyección sistémica de BrdU en una dosis cercana a los 300 mg/kg para detectar la extensión de neurogénesis completamente en el cerebro adulto; por otro lado, se sabe que la BrdU no sólo se incorpora durante la división celular (fase "S") sino también en la reparación celular o en la apoptosis. Cooper-Kuhn y col. (2001) reportaron que el uso de BrdU en 50 mg/kg/día es suficiente para su incorporación durante la fase "S" del ciclo celular, evitando así marcar otros eventos en la síntesis de ADN. Altas dosis de BrdU podrían resultar en falsos-positivos, es decir se marcarían eventos de síntesis de ADN involucrados en la reparación celular o bien muerte celular (Zucconi y cols., 2002, Rakic, 2002).

El número de células positivas a BrdU podría usarse como un indicador del número de nuevas neuronas, sin embargo estas nuevas células bien podrían ser células gliales. Al no tener evidencia experimental sobre el tipo de células, el resultado obtenido sólo nos indica que hay diferencias en la proliferación celular. Sin embargo, al conjuntar los datos morfológicos (la ubicación de los núcleos marcados con BrdU) con los datos conductuales, la probabilidad de que el número de células positivas a BrdU esté relacionado con la neurogénesis aumenta considerablemente.

La producción normal de nuevas células granulares en el giro dentado se observó afectada en este modelo experimental. Los núcleos del rafe dorsal (DRN) y medial (MnR) proyectan extensivamente al hipocampo, en las regiones CA1 y CA2 recibiendo la innervación más densa. Todos los subtipos del receptor 5-HT están virtualmente presentes en las neuronas hipocámpicas. Esta innervación es modificada dependiendo de la etapa de desarrollo (modificación temporal) y la actividad (modificación conductual). Se ha observado que hay una disminución en la densidad (alrededor de 37 %) de las neuronas serotoninérgicas de ambos núcleos DNR y MnR durante las primeras ocho semanas postnatales (Koh, 1991) También se ha reportado que la serotonina por si misma puede funcionar como un factor neurotrófico (Djavadian, 2004) y una deficiencia en el hipocampo muy probablemente afecte la neurogénesis en el giro dentado. Los cambios morfológicos y la reducción de células marcadas con BrdU (que es muy probable que indique una disminución en la neurogénesis en el giro dentado) en el grupo experimental, apoyan estos reportes y sugieren que el sistema serotoninérgico juega un papel muy importante en los periodos críticos del desarrollo. Más aun, una alteración en la transmisión de 5-HT, causada por la restricción del substrato en estados postnatales tempranos, puede modificar los circuitos neuronales del hipocampo, así como la plasticidad neuronal, lo cual a su vez puede influir en la neurogénesis de la capa granular del giro dentado.

La deficiencia en el sistema de neurotransmisión de las monoaminas ha sido aceptada ampliamente como el factor principal en la patogénesis del trastorno de depresión mayor o desorden de depresión mayor (MDD de sus siglas en ingles, Major Depression Disorder). Estas teorías están basadas principalmente en el principio de "ingeniería reversible" de los antidepresivos. Sin embargo, esta hipótesis ha sido retada por la hipótesis de plasticidad neuronal adaptable, la cual surge de la observación en el retardo significativo que los antidepresivos muestran para comenzar a funcionar en

pacientes deprimidos (Skolnick, 2005). Duman y cols.(1997) propusieron que la depresión puede ser el resultado de una incapacidad de generar la respuesta apropiada al estrés como consecuencia de una disfunción del mecanismo normal que subyace a la plasticidad neuronal. El tratamiento crónico con diferentes clases de antidepresivos, incluyendo inhibidores de recaptura de la 5-HT y noradrenalina, efectúa una regulación hacia arriba en la transducción de AMPc originando la activación de proteínas cinasas A dependientes de cAMP (PKA), las cuales fosforilan proteínas que desempeñan un papel importante en el señalamiento celular. La dieta con bajo contenido de triptófano y los cambios conductuales y neuroquímicos observados, coinciden con las hipótesis previas sobre trastornos depresivos basadas en concentraciones anormales de neurotransmisores, principalmente serotonina y noradrenalina. Sin embargo, los cambios estructurales en las dendritas de las células piramidales y la reducción en el recambio celular en el giro dentado sugieren una incapacidad estructural en la plasticidad neuronal. Esta incapacidad pudiese ser temporal o de larga duración y contribuiría parcialmente al desorden conductual observado. En este contexto, los mecanismos celulares y moleculares subyacentes en el presente estudio, requieren una investigación más profunda.

## CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos sugieren que las ratas sometidas a una alimentación prolongada (30 días) con una dieta con bajo contenido de triptófano a base de maíz pueden desarrollar:

- ◆ Niveles bajos de serotonina en diferentes estructuras cerebrales.
- ◆ Características similares a la depresión y/o ansiedad inferidas por el aumento en las cuentas de inmovilidad en la prueba de FST en el grupo experimental y una disminución en el porcentaje de permanencia en el brazo abierto en la prueba del EPM.
- ◆ Disminución en las espinas dendríticas de las células piramidales de la región CA1 en el hipocampo así como una disminución en la proliferación de las células de la capa subgranular del giro dentado del hipocampo.
- ◆ Cambios en la expresión del gen de expresión temprana *c-Fos* en las diferentes estructuras cerebrales que reciben proyecciones de las células del rafe dorsal.

Aunque es ingenuo esperar que la disfunción de un solo neurotransmisor pueda ser responsable de la constelación de síntomas que comprenden la depresión y que el modelo animal utilizado para estudiar una enfermedad que involucra las emociones humanas más elevadas no puede ser validado completamente, este intento experimental representa un nuevo enfoque para los efectos prolongados de una restricción alimenticia específica y podría utilizarse como un modelo animal para estudiar los efectos de hiposerotoninergia durante el desarrollo en los mecanismos de la actividad del cerebro relacionada con comportamientos que pueden ser evaluados cuantitativa y cualitativamente. En este sentido, estos resultados ayudan a comprender la influencia de la cultura alimenticia en los estereotipos afectivos y comportamiento social. Sin embargo, se hace hincapié que no se pretende hacer ninguna conclusión acerca del cerebro humano y mucho menos alguna conexión en el contexto cultural y social de los indígenas mesoamericanos.

## 11. BIBLIOGRAFIA

1. Azmitia EC, Rubinstein VJ, Strafaci JA, *et al.* 1995. 5-HT 1A agonist and dexamethasone reversal of parachloroamphetamine induced loss of MAP2 and synaptophysin immunoreactivity in adult rat brain. *Brain Res*: 181-192.
2. Baldwin D, Birtwistle J. *An Atlas of Depression*. 2002. Southampton UK. The Parthenon Publishing group (ISBN I-85070-942-4).
3. Bell C, Abrams J, Nutt D. 2001. Tryptophan depletion and its implications for psychiatry. *Brit J Psych*. Vol. 178:399-405.
4. Blows WT. 2000. Neurotransmitters of the brain: serotonin, noradrenaline (norepinephrine), and dopamine. *J Neurosci Nursing*. Vol. 32:234-238.
5. Bressani R. 1990. Chemistry, technology and nutritive value of maize tortillas. *Food Rev Int*: 225–264.
6. Burns KA, Kuan CY. 2005. Low doses of bromo- and iododeoxyuridine produce near-saturation labeling of adult proliferative populations in the dentate gyrus. *Eur J Neurosci*. Vol. 21:803-807.
7. Crawley J, Gerfen Ch, Rogawski M, Sibley D, Skolnick P, Wray S. *Current Protocols in Neuroscience*. Ed. John Wiley & Sons, Inc. 2001.
8. Cooper-Kuhn CM, Kuhn HG. Is it all DNA repair? 2002. Methodological considerations for detecting neurogenesis in the adult brain. *Brain Res Dev Brain Res*. Vol. 134:13-21.
9. Delgado PL, Miller HL, Salomon RM, Licinio J, Krystal JH, Moreno FA, Heninger GR, Charney DS. 1999. Tryptophan-depletion challenge in depressed patients treated with desipramine or fluoxetine: implications for the role of serotonin in the mechanism of antidepressant action. *Biol Psychiatry* Vol. 46, 212-20
10. Detke MJ, Rickels M, Lucki I. 1995. Active behaviours in the rat forced swimming test differentially produced by serotonergic and noradrenergic antidepressants. *Psychopharmacology*, Vol. 121: 66-72.
11. Djavadian RL. 2004. Serotonin and neurogenesis in the hippocampal dentate gyrus of adult mammals. *Acta Neurobiol Exp (Wars)* Vol. 64:189-200.
12. Duman RS, Heninger GR, Nestler EJ. 1997. A molecular and cellular theory of depression. *Arch Gen Psychiatry*. Vol. 54:597-606.

13. Fadda F, Cocco S, Stancampiano RA. 2000. Physiological method to selective decrease brain serotonin release. *Brain Res Protoc* Vol. 5: 201-222.
14. Fernstrom JD. 1983. Role of precursor availability in control of monoamine biosynthesis in brain. *Physiol* Vol. 63:484-546
15. Glaser EM, Van der Loos H. 1981. Analysis of thick brain sections by obverse-reverse computer microscopy: application of a new, high clarity Golgi-Nissl stain. *J Neurosci Methods*. Vol. 4:117-125.
16. Harvey BH, McEwen BS, Stein DJ. 2003. Neurobiology of antidepressant withdrawal: implications for the longitudinal outcome of depression. *Biol Psychiatry*. Vol. 54:1105-1117.
17. Howe EE, Jansen GR, Gilfillan EW 1965. Amino acid supplementation of cereal grains as related to the world food supply. *Am J Clin Nutr*; Vol. 16:315-320.
18. Hoyer D, Hannon JP, Martin GR. 2002. Pharmacological and functional diversity of 5-HT receptors. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*. 71:533-554.
19. Illescas R. 1943. La teoría química de la formación de nixtamal. *Rev Soc Mex Hist Nat*. Vol. 4:129-136.
20. Kalyanasundaram S. 1976. Effect of dietary protein and calorie deficiency on tryptophan levels in the developing rat brain. *J Neurochem*. Vol. 27:1245-1247.
21. Koh T, Nakazawa M, Kani K, Maeda T. 1991. Significant non-serotonergic raphe projection to the visual cortex of the rat. An immunohistochemical study combined with retrograde tracing. *J Hirnforsch*. Vol. 32:707-714
22. Mazer C, Muneyyirci J, Taneny K, Borella A, Whitaker-Azmitia P. 1997. Serotonin depletion during synaptogenesis leads to decreased synaptic density and learning deficit in the adult rat: a possible model of neurodevelopmental disorders with cognitive deficits. *Brain Res*. Vol. 760:68-73.
23. Miller MW, Nowakowski RS. 1988. Use of bromodeoxyuridine-immunohistochemistry to examine the proliferation, migration and time of origin of cells in the central nervous system. *Brain Res*. Vol. 457:44-52.
24. Morris, R. 1984. Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *J. Neurosci Method*, Vol. 11: 47 - 60

25. Pellow S, Chopin P, File SE, et al. 1985. Validation of open-closed arm entries in an elevated plus maze as a measure of anxiety in the rat. *J Neurosci Methods*. Vol.14:149–167.
26. O'Keefe, J.; Dostrovsky, J. 1971. The hippocampus as a spatial map: Preliminary evidence from unit activity in the freely-moving rat. *Brain Res* Vol. 34: 171-175.
27. Perez-Martin M, Azcoitia I, Trejo JL, Sierra A, Garcia-Segura LM. 2003. An antagonist of estrogen receptors blocks the induction of adult neurogenesis by insulin-like growth factor-I in the dentate gyrus of adult female rat. *Eur J Neurosci*. Vol. 18:923-930.
28. Porsolt RD, Anton G, Blavet N, et al. 1978. Behavioral despair in rats: a new model sensitive to antidepressant treatments. *Eur J Pharmacol*: Vol. 47: 379– 391.
29. Rakic P. 2002. Adult neurogenesis in mammals an identity crisis. *J. Neurosci*. Vol. 22: 614-618.
30. Ramon-Moliner EA. 1958. Tungstate modification of the Golgi-Cox method. *StainTechnol*. Vol. 33:19-29.
31. Rapport MM, Green AA, Page IH (1948). Serum vasoconstrictor, serotonin; isolation and characterization. *J. Biol. Chem*. Vol. 176: 1243–51.
32. Riedel WJ, Klaassen T, Schmitt AJ. 2002. Tryptophan, mood, and cognitive function. *Brain, Behavior, and Immunity*. Vol. 16: 581-589.
33. Sargar W. 2001. Influence of tryptophan supplementation of soy-based infant formulas on protein quality and on blood and brain tryptophan and brain serotonin in the rat model. *Plant Foods for Human Nutrition*. Vol. 56:275-284.
34. Schildkraut J. J. Seymour S. K. 1967. Biogenic Amines and Emotion. *Science* Vol. 156: 21-30.
35. Seuwen K, Pouysségur J. 1990. Serotonin as a growth factor. *Biochem Pharmacol*. Vol. 39:985-90.
36. Shatzberg AF, Garlow SJ, Nemeroff C.B. Molecular and cellular mechanisms in depression. In Davis KL, Charney D, Coyle JT, et al. eds. *Neuropsychopharmacology: The Fifth Generation of Progress*. PA: Lippicott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2002: 1039-1050.

37. Shibata K, Shimada H, Kondo T. 1996. Effects of feeding tryptophan - limiting diets on the conversion ratio of tryptophan to niacin in rats. *Biosci Biotechnol Biochem.* Vol. 60: 1660-1666.
38. Siegel GJ, Agranoff BW, Albers RW, Fisher SK, Uhler MD. *Basic Neurochemistry: Molecular, cellular and medical aspects.* Ed. Lippincott-Raven, 1999. Sixth edition.
39. Skolnick P. Dopamine and depression. In: Schmidt WJ, Reith ME, eds.. *Dopamine and glutamate in psychiatric disorders.* Totawa: Humana Press, 2005:199-214.
40. Whitaker-Azmitia PM. 1991. Role of serotonin and other neurotransmitter receptors in brain development: basis for developmental pharmacology. *Pharmacol Rev:* 533-561.
41. Whitaker-Azmitia PM. 2001. Serotonin and brain development: role in human developmental diseases. *Brain Res Bull:* Vol. 56, 479-85
42. Whitaker-Azmitia PM. 2005. Behavioral and cellular consequences of increasing serotonergic activity during brain development: a role in autism? *Int J Dev Neurosci.* Vol. 23, 75-83
43. Willner P., Towell A., Sampson S., Sophokleous S., Muscat R. 1987. Reduction of sucrose preference by chronic unpredictable mild stress, and its restoration by a tricyclic antidepressant. *Psychopharmacology* Vol. 93: 358 – 364
44. Zucconi GG, Giuditta A. 2002. Is it only neurogenesis? *Rev Neurosci* Vol.13:375–382.

Lista de pies de figuras:

Figura 1: Estructura química del triptófano

Figura 2: Transporte y conversión de triptófano a serotonina en el cerebro

Figura 3: Biosíntesis de la serotonina

Figura 4: Estructura química de la serotonina

Figura 5: Localización de los cuerpos celulares serotoninérgicos

Figura 6: Resultados de la prueba de nado forzado en grupo experimental y control

Figura 7: Resultados de la prueba de laberinto en cruz elevado

Figura 8: Resultados de la prueba de enterramiento defensivo

Figura 9: Resultados del laberinto acuático de Morris

Figura 10: Resultados de la prueba de nado forzado y laberinto en cruz elevado

Figura 11: Contenido de serotonina en tejido de diferentes áreas cerebrales

Figura 12: Expresión de la proteína Fos

Figura 13: Inmunorreactividad a triptófano hidroxilasa

Figura 14: Inmunorreactividad a Brdu

Figura 15: Cambios en la densidad de espinas dendríticas

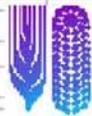
Figura 16: Persistencia de alteraciones conductuales en animales experimentales

Figura 17: Inmunorreactividad a c-Fos en animales adultos

Figura 18: Prueba de nado forzado

Figura 19: Conteo de espinas dendríticas en diferentes grupos experimentales

# Apéndice I



**CENTRO INTERNACIONAL DE MEJORAMIENTO DE MAIZ Y TRIGO**

**LABORATORIO DE SUELOS Y NUTRICION VEGETAL / QPM**

Leyla Guadarrama  
C.Exp.: Valle Central de Oaxaca / UNAM

Recibido: Febrero 24, 2005  
Entregado: Marzo 16, 2005

**Grano y Croquetas de Ma'z**

LAB. No. (2005)	IDENTIFICACION	Try %	Lis %	N %	Prote'na %	Indice de Calidad
3846	Ma'z de la raza bolita de los Valles Centrales de Oaxaca	0.053	0.318	1.39	8.68	0.61
3847	Croqueta de Ma'z sin adici-n de Triptofano	0.051	0.286	1.56	9.73	0.52
3848	Croqueta de Ma'z con adici-n de 3.0 g / Kg de masa	0.351	0.336	1.64	10.24	4.51

\* Indice de Calidad =  $\frac{\% \text{ Try}}{\% \text{ Prote'na}} \times 100$

## Apéndice I



**CENTRO INTERNACIONAL DE MEJORAMIENTO DE MAIZ Y TRIGO**

**LABORATORIO DE SUELOS Y NUTRICION VEGETAL / QPM**

Leyla Guadarrama  
C.Exp.: Valle Central de Oaxaca / UNAM

Recibido: Febrero 24, 2005  
Entregado: Marzo 16, 2005

### Grano y Croquetas de Ma'z

LAB. No. (2005)	IDENTIFICACION	Try %	Lis %	N %	Prote'na %	Indice de Calidad
3846	Ma'z de la raza bolita de los Valles Centrales de Oaxaca	0.053	0.318	1.39	8.68	0.61
3847	Croqueta de Ma'z sin adici3n de Triptofano	0.051	0.286	1.56	9.73	0.52
3848	Croqueta de Ma'z con adici3n de 3.0 g / Kg de masa	0.351	0.336	1.64	10.24	4.51

$$* \text{Indice de Calidad} = \frac{\% \text{Try}}{\% \text{Prote'na}} \times 100$$

ORIGINAL ARTICLE

# Rats Subjected to Extended L-Tryptophan Restriction During Early Postnatal Stage Exhibit Anxious–Depressive Features and Structural Changes

Limei Zhang, MD, DSc, Leyla Guadarrama, MD, Aleph A. Corona-Morales, DSc, Arturo Vega-Gonzalez, DPhil, Luisa Rocha, MD, DSc, and Alfonso Escobar, MD

## Abstract

Serotonin transmission dysfunction has been suggested to play an important role in depression and anxiety. This study reports the results of a series of experiments in which rats were subjected to extended maize-based tortilla diets during early postnatal stages. This diet contains only approximately 20% of the L-tryptophan in normal diets of laboratory rodents. Compared with controls, experimental rats displayed a significant increase of immobility counts in the forced swimming test and exhibited anxiety-like behavior in the elevated plus maze test after 1 month of diet treatment. Low levels of serotonin contents were found in prefrontal cortex, striatum, hippocampus, and brainstem using high-performance liquid chromatography. Immunocytochemical reactions against 5-Bromo-2-deoxyuridine revealed a significant decrease in the proliferation rate for the subgranular zone of dentate gyrus. *c-Fos* expression after the forced swimming test was found reduced in prefrontal cortex, dentate gyrus, CA1, and hilus of hippocampus and amygdala. Moreover, dendrite arbor atrophy and decreased spine density were evident in Golgi-Cox-impregnated CA1 pyramidal neurons. Abnormal dendrite swelling in dentate gyrus granule cells was also observed. These findings indicate an involvement of *hyposerotoninergia* in emotional disturbance produced by L-tryptophan restriction during critical developmental stages and suggest that neuroplasticity changes might underlie these changes.

**Key Words:** Animal model of depression, BrdU, *c-Fos*, Dendrite spines, Dendrite varicosities, Golgi-Cox, Serotonin.

## INTRODUCTION

It is generally believed that serotonin (5-HT) neurotransmission dysfunction plays an important role in the etiology of depression, in which despair, anxiety, and

anhedonia are the central symptoms. This hypothesis is mostly supported by the findings of reduced 5-HT and its metabolite 5-hydroxyindoleacetic acid (5-HIAA) in post-mortem studies of brain areas and cerebrospinal fluid of suicide victims (1). The postmortem studies also suggested an upregulation of 5-HT<sub>2</sub> and 5-HT<sub>3</sub> receptors and abnormal reductions of brain 5-HT transporter sites (2). That serotonin plays a role in depression was suggested earlier from the observed depressed mood after drug administration depleting this biogenic amine (3, 4). This observation led to development of pharmacologic drugs that increase 5-HT levels such as selective serotonin reuptake inhibitors (5, 6).

Serotonin also acts as a regulator of brain development and neuroplasticity. There are several experimental evidences suggesting this regulation: 1) serotonin autoregulates development of neurons producing serotonin (7); 2) serotonin exerts effects on the development of target tissue (8); 3) changes in serotonergic transmission alter gene expression of brain derived neurotrophic factor (9, 10); 4) depletion of brain 5-HT by the tryptophan hydroxylase inhibitor parachlorophenylalanine decreases expression of MAP2, a dendritic protein (11) as well as synaptic density (12); and 5) the immediate early gene *c-Fos*, a transcriptional factor, has been shown to be induced by increase in brain 5-HT (13–15) and the expression of immediate early gene *Arc* (activity-related cytoskeleton-associated protein), a so-called “effector” immediate early gene, can be induced in the cortical neuronal dendrites by increasing extracellular 5-HT (16).

L-tryptophan (TRP) depletion challenge has provided a physiological tool to examine the 5-HT system in depression (17). TRP depletion induces depressive symptoms in healthy controls at high familial risk for depression (18–21). Moreover, relapses were observed in depressed patients who had previous improvements by serotonin reuptake inhibitors and were later administered a cocktail of amino acids without L-tryptophan (22).

Maize corn has been a main dietary component for American indigenous populations for many centuries. The native maize possesses low contents of several essential amino acids, among them TRP (23), the precursor of 5-HT. The *Nixtamal* process to prepare *tortilla*, which is a traditional method used in Mexico and Central America, depletes further tryptophan contents (24). It has also been documented that American indigenous populations have high

From the Department Physiology (LZ, LG, AAC, AV), Faculty of Medicine, Department of Cell Biology and Physiology (AE), Institute for Biomedical Research, National Autonomous University of Mexico, and Department Pharmacobiology (LR), CINVESTAV-IPN, Mexico City, Mexico.

Send correspondence and reprints requests to: Alfonso Escobar, MD, Department of Cell Biology and Physiology, Institute for Biomedical Research, National Autonomous University of México (UNAM), Ciudad Universitaria, 04510 México D.F., Mexico; E-mail: alesiz@servidor.unam.mx

This work was supported by CONACyT 41694, 40615, 46141 and DGAPA-UNAM IN210406.

Both Drs. Zhang and Guadarrama contributed equally to this work.

**TABLE. General Experimental Design**

Postnatal Stage	Postnatal Weeks	Experimental Procedures	Parameter Measured
S1	1st	Beginning of tortilla diet (TD), n = 5 for each group (control and experimental)	Body weight
	2nd	TD	Body weight
	3rd	TD	Body weight
	4th	TD	Body weight
		Animal sacrifice Golgi-Cox impregnation starting at P28	Dendrite arborization and dendrite spine density
S2	5th	Beginning of TD, n = 20 for each group	Body weight
	6th	TD	Body weight
	7th	TD	Body weight
	8th	TD	Body weight
		Sucrose test	Sucrose preference
	9th	Subgroup 1 (n = 10 for each group)	
		Elevated plus maze test	Entries in the open arm
		Sample preparation for high-performance liquid chromatography	Serotonin contents in brain regions
		Subgroup 2 (n = 10 for each group)	
		Forced swimming test	Immobility
	Bromodeoxyuridine injection		
	Immunocytochemical procedures (n = 5)	Immunoreactivity to BrdU, c-Fos, and TPH	
	Golgi-Cox impregnation (n = 5)	Dendrite arborization and dendrite spine density	

Tortilla diet (TD), control: TD + 0.2% L-tryptophan; experimental, TD.

rates of depression, anxiety, substance abuse, and suicide (25–27). The etiology of these reported mental disorders and behavioral problems is obviously multifactorial in which the sociocultural environment plays an important role. However, the possible interrelationship between the nutrition and mental health has not been thoroughly investigated so far.

The early development of the serotonin system and its extensive brain connections suggest that the 5-HT could play an important role in the development of the brain (28). Therefore, we hypothesized that a deficit of serotonin's substrate TRP in crucial developmental stages might produce structural changes that could be reflected in the behavioral patterns. The aim of the present study was to evaluate whether a long-term, low-tryptophan tortilla diet (TD) during early postnatal stages induces depression-like and anxiety-like behaviors and, if so, ascertain if neurochemical and neuroanatomic changes after this diet restriction are involved.

## MATERIALS AND METHODS

### Diet Preparation

All experimental groups were fed ad libitum with pure TD made from maize *landrace* race *Bolita* from the Central Valley of Oaxaca, Mexico (donated by M. Bellon, International Maize and Wheat Improvement Center, CIMMYT). The *Nixtamal* procedure is described elsewhere (29). Vitamin compound (*Berocca t*; Roche, 8.4 mg tab/100 g body weight) was added to the TD to avoid malnutrition symptoms produced by deficit of vitamin B complex, which is lacking in maize, although this aspect is beyond the scope of the present study. Rats from control groups were fed with the same TD but supplemented with 0.2% L-tryptophan (Sigma, St. Louis, MO) to match the tryptophan level of the commercial diets (e.g. *LabDiet*).

### Subjects and General Procedures

Wistar male rats of 2 postnatal ages (S1: P1–P28; S2: P28–P56) from the animal house at Faculty of Medicine, UNAM, were separated into 2 experimental groups: control and experimental. For the S1 group, 2 litters of lactating pups P1 (5 each) were housed with the corresponding females. For the S2 groups, rats were housed singly in standard Plexiglas cages. In both stages, animals were fed with corresponding diets and water ad libitum. Experimental subjects were kept in artificial light–dark cycles (light on at 3:00 PM and off at 3:00 AM), with controlled temperature and adequate ventilation. Distribution of animals and experimental design is shown in the Table.

### Forced Swimming Test

After 4 weeks of TD treatment, 10 rats from each group were subjected to the forced swimming test during the late part of dark period of the artificial light–dark cycle. The original description and validation of the forced swimming test was published by Porsolt et al in 1978 (30) and modified by Detke et al in 1995 (31). For the present experiment, on day 1, as the pretest, the rats were immersed for 15 minutes in a vertical Plexiglas cylinder (45 cm height × 30 cm diameter) containing 25 cm of water kept at 24°C (32). Twenty-four hours later, the rats were immersed again and the swimming behavior was recorded by a video camera for 5 minutes. Analysis was done offline using the counting criteria described elsewhere (31). Briefly, the observer gives a score either “swimming” or “immobile” every 5 seconds. A rat was judged to be immobile when it remained floating, making only minimum movements necessary to keep its head over the surface. There were 60 counts per each record. Immobility in the forced swimming test provides a measure of behavioral despair.

### Elevated Plus Maze Test

After 4 weeks of the TD treatment, 10 rats of each group underwent the elevated plus maze test. The plus maze was made of wood and consisted of 2 open arms (50 cm × 10 cm) and 2 opposite arms of equal dimensions enclosed by 40-cm high surrounding walls. The arms were connected by a central

square of 10 cm × 10 cm. The apparatus was elevated 50 cm from the floor and lit uniformly by white light (33, 34). Rats were placed at the center of the maze heading into an enclosed arm and then left for free exploratory activity for 5 minutes. A video camera was mounted vertically over the maze, and the behavior was recorded and scored offline. The percentage of time spent in the open arms of the maze provides the measure of anxiety (33).

### The Sucrose Preference Test for Anhedonia Assessment

This test has been used for anhedonia assessment and was first described by Willner et al in 1987 (35). Briefly, the test cages were equipped with 2 liquid drop dispensers and placed next to each other. One dispenser contained plain water and another contained 1% sucrose solution. The animals were allowed to consume the fluids for a period of 24 hours. Daily consumption was determined by weighing the bottles before and after the test. A reduction of the sucrose liquid intake provides an indirect measure of desensitization of the brain reward mechanism.

### Determination of Serotonin Contents

Serotonin contents in specific brain areas were measured with high-performance liquid chromatography (HPLC) with fluorescence detector. Immediately after the elevated plus maze test, 10 rats of each group were killed by decapitation; the prefrontal cortex, striatum, hippocampus, and brainstem were dissected quickly on an ice-cooled Petri dish. Tissues were kept in labeled Eppendorf microtubes, weighed, and quickly frozen with liquid nitrogen and kept in  $-70^{\circ}\text{C}$  freezer until processed. Serotonin contents (ng of 5-HT/mg of protein) were measured by HPLC coupled to a fluorescence detector (Waters 474; 290-nm  $\lambda$  excitation and 330-nm  $\lambda$  emission) according to Peat and Gibb (36). Briefly, 100  $\mu\text{L}$  of ice-cooled 0.1 M perchloric acid containing 4 mM of sodium metabisulfite/30 mg of wet tissue were added to all samples. After homogenization, the extract was centrifuged at 15,000  $\times g$  for 10 minutes at  $4^{\circ}\text{C}$ . The supernatants were passed through a Millipore HV filter of 0.45  $\mu\text{m}$  of pore size and 20  $\mu\text{L}$  of this solution was injected directly into a reverse phase column (Simetry C-18, 150  $\times$  3.9-mm internal diameter) with a particle size of 5  $\mu\text{m}$  and maintained at  $30^{\circ}\text{C}$ . The mobile phase consisted of a mixture of methanol, double-distilled deionized water (3:2), and 0.02 mM of monobasic potassium phosphate with 1 g/L of heptan sulfonic acid sodium salt (pH 3.5 adjusted with phosphoric acid). Flow rate was 1 mL/minute. Serotonin concentration was quantified with Waters Millennium 32 (software version 3.20; Waters, Milford, MA). Protein levels in extract were measured by the Lowry method (37).

### Immunocytochemical Reactions for 5-Bromo-2-deoxyuridine (BrdU), *c-Fos*, and Tryptophan Hydroxylase

#### BrdU Injections

Rats from the subgroup of the forced swimming test received intraperitoneal injections of BrdU (Sigma, B9285), 10 mg/mL of 0.9% NaCl solution during 3 consecutive days

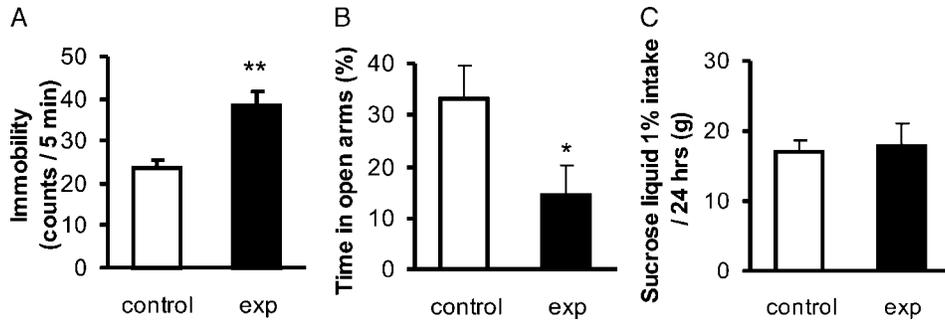
24 hours before the forced swimming test (daily dose: 50 mg/kg body weight fractionated in 3 injections per day).

### Histologic Procedures

Ninety minutes after the forced swimming test, rats were anesthetized with an overdose of sodium pentobarbital and perfused transcardially with 0.9% saline followed by cold fixative containing 4% paraformaldehyde, 0.05% glutaraldehyde in 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 7.4) plus 15% v/v of saturated picric acid for 15 minutes. Brains were removed, blocked, and then thoroughly rinsed with phosphate buffer. Coronal sections of 50  $\mu\text{m}$  of the following brain regions: prefrontal cortex (4.2–3.2 mm, rostral to bregma), striatum (2.2–1.6 mm, rostral to bregma), dorsal hippocampus and amygdala (2.56–3.80 mm caudal to bregma), and brainstem (7.30–8.30 mm caudal to bregma), according to Paxinos and Watson (38), were obtained using a vibratome (Leica VT 1000, Heidelberg, Germany). Free-floating sections were quenched by incubating brain sections in 3% hydrogen peroxide in phosphate buffer for 10 minutes. For BrdU-IR, sections from dorsal hippocampus were incubated in 2N HCl for 30 minutes at  $37^{\circ}\text{C}$  for DNA denaturalization. After this step, sections were rinsed twice with 0.1 M borate buffer (pH 8.5) followed by a rinse with phosphate buffer. All the immunoreactive sections were incubated with 0.3% Triton X-100 (Sigma, T-7878) and 0.3% bovine serum albumin (Sigma, A2153) in phosphate buffer for 1 hour at room temperature. This solution was used in the following steps unless specified. The following primary antibodies were used: rat anti-BrdU (Accurate Scientific, OBT003, 1:1000); mouse anti-*c-Fos* (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA; SC52, 1:1000); and sheep antitryptophan hydroxylase (Chemicon International, Temecula, CA; AB1541, 1:1000). After overnight incubation with primary antibodies, sections were rinsed 3 times for 10 minutes and then incubated for 4 hours at room temperature with the following biotinylated secondary antibodies: rabbit antirat (Vector Labs, Burlingame, CA; 1:200) for BrdU, horse antimouse (Vector Labs; 1:200) for *c-Fos*, and rabbit antisheep (Vector Labs; 1:200) for tryptophan hydroxylase. Finally, sections were incubated in avidin-biotin-peroxidase complex (Elite ABC kit; Vector Labs) for 1 hour at room temperature. Peroxidase was detected using diaminobenzidine (DAB) as chromogen. Sections were developed using Liquid DAB-Plus substrate kit (Zymed Laboratories, San Francisco, CA; 00-2020).

### Golgi-Cox Impregnation

For Golgi-Cox impregnation procedures, rats at P28 (S1) and P56 (S2) received an overdose of anesthesia and were decapitated. Brains were removed from the skull and their central one-third parts (along anteroposterior axes) were sliced with a sharp blade into blocks of approximately 10-mm thickness. Tissues were briefly rinsed with phosphate buffer 0.1 M (pH 7.4) and then immersed in sequenced impregnation solutions (FD Rapid GolgiStain kit; FD Neuro Technologies, Ellicott City, MD) for 2 weeks in the dark. Sections of 200  $\mu\text{m}$  were sliced using a  $\text{CO}_2$ -cooled glider microtome and mounted on gelatin-coated glass slides.



**FIGURE 1.** Effects of tryptophan restricted diet on behavior. **(A)** Forced swimming-induced immobility. **(B)** Elevated plus maze test. Data show the percentages of time that animals were in the open arms during the 5 minutes of the test. **(C)** Anhedonia assessment was performed by the sucrose intake test in a 24-hour period. Analysis revealed that both groups of animals had a similar preference for sucrose solution. Data represent mean ± standard error of mean. n = 10. \*\*, p < 0.01; \*, p < 0.05.

These sections were dried naturally at room temperature in the dark and then stained with staining solution provided by the kit mentioned previously. Dendritic patterns of 2 representative CA1 pyramidal neurons were reconstructed using a drawing tube at ×400 magnification. Spine density was calculated by tracing a length of dendrite (20 μm long) at ×1,000 from 5 randomly chosen segments of hippocampal CA1 pyramidal neurons: left primary basilar branch, right primary basilar branch, primary apical branch, secondary apical branch, and tertiary apical branch. The number of spines was counted with the help of a light microscope (Nikon T550i) equipped with a drawing tube. No attempt was made to correct for the fact that some spines were obscured from view, so the measure of spine density necessarily underestimates total spine number.

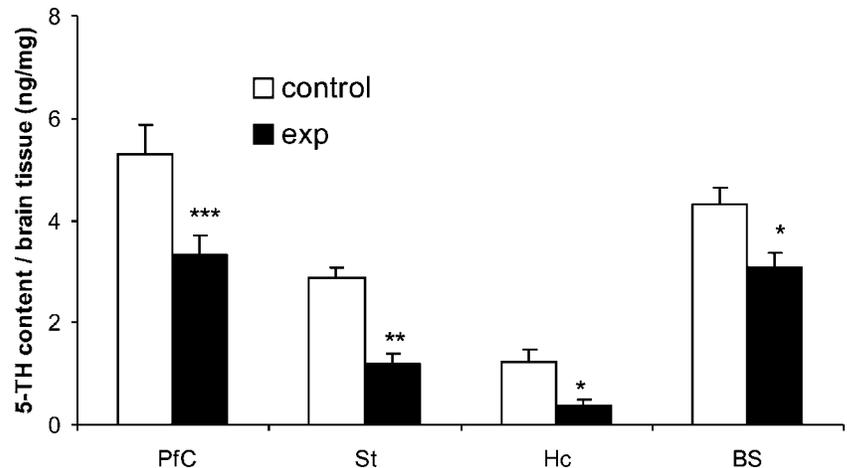
**Statistical Analyses**

Quantitative results were expressed as mean ± standard error of mean. Groups were tested for differences by performing analysis of variance followed by Student-Newman-Keuls test using InStat (GraphPad Software, San Diego, CA). Differences were considered statistically significant at a value p < 0.05 (\*, p < 0.05; \*\*, p < 0.01; \*\*\*, p < 0.001: vs control group).

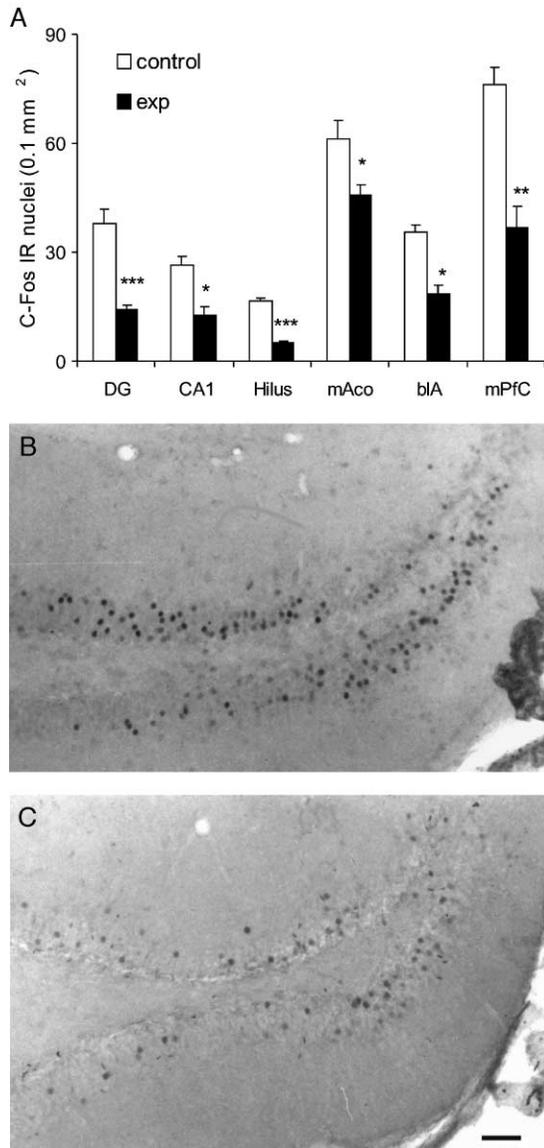
**RESULTS**

The TD prepared for this study contained 0.056% of TRP, which is approximately one fifth of the TRP for normal rodent diet (e.g. *LabDiet* contains 0.27% of TRP [www.LabDiet.com]). The fat and protein contents of TD are 1.0% and 5.4%, which represent 25% and 20%, respectively, of the commercial rat diet mentioned previously. The average amount of dried TD taken by rat per day is approximately 10 g/100 g body weight. The average body weight of the control and experimental groups was approximately 20% lower than in rats from the animal house of the same age and fed a commercial rodent diet. This weight loss is mainly attributable to low caloric consumption. Pilot studies to assess the related behavioral and anatomic aspects of rats both fed a commercial rat diet (having same weight or having same age) and fed a TD supplemented with L-tryptophan revealed no significant differences.

Animals with TRP depletion showed a significant augmentation of immobility counts during the forced swimming test: 38.375 ± 3.246 versus 23.44 ± 2.102 of the control (n = 10, p < 0.01, Fig. 1A). Also, in the test that was used to evaluate anxiety-like behavior (i.e. elevated plus maze), a significant difference was observed between both groups (Fig. 1B). Experimental animals spent less time



**FIGURE 2.** Serotonin content measured by high-performance liquid chromatography with fluorometric detector. Prefrontal cortex (PfC), striatum (St), hippocampus (Hc), and brainstem (BS). Note that in all brain areas tested, a significant decrease of 5-HT in all experimental groups was observed. Data represent mean ± standard error of mean. n = 10. \*, p < 0.05; \*\*, p < 0.01; \*\*\*, p < 0.001.



**FIGURE 3.** *c-Fos* expression. **(A)** Histogram showing number of *c-Fos*-immunoreactive nuclei in different brain areas. Values represent the mean  $\pm$  standard error of mean per tissue areas (0.1 mm<sup>2</sup>) expressing *c-Fos* immunoreactivity. DG, dentate gyrus; CA1, hilus regions of hippocampus; mAco, medial cortical amygdala; blA, basolateral amygdala; and mPFC, medial prefrontal cortex.  $n = 5$ . \*\*\*,  $p < 0.001$ ; \*\*,  $p < 0.01$ ; \*,  $p < 0.05$ . **(B, C)** *c-Fos* expression in the granule cell layer of DG in 2 representative samples from a control animal **(B)** and an experimental one **(C)**. Scale bar = 50  $\mu$ m.

(14.5%  $\pm$  5.7%) than the control group (33.3%  $\pm$  6.3%) in the open arm of the plus maze ( $p < 0.05$ ).

A loss of pleasure (anhedonia) is an important clinical feature of major depressive episodes. Anhedonia is commonly tested in rats as a decreased consumption of a sweet palatable solution. In the present experiment, rats had the opportunity to choose between water and a solution with 1% of sucrose and did not show any difference between experi-

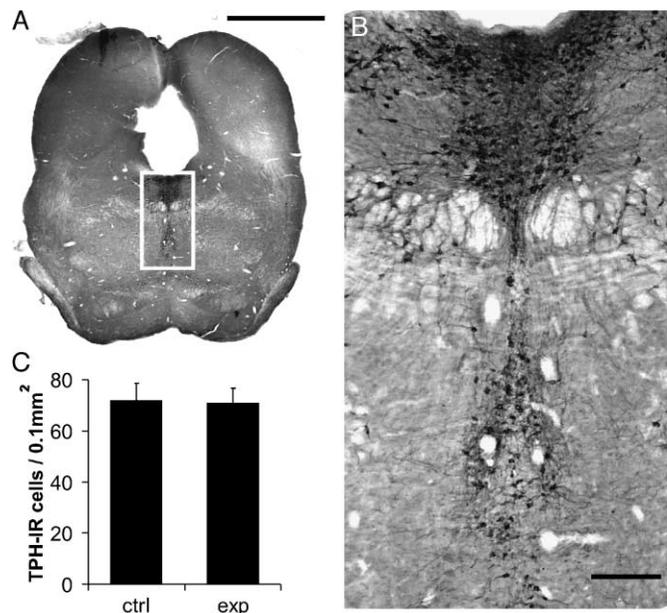
mental and control groups (17.790 g  $\pm$  3.214 g vs 17.001 g  $\pm$  1.629 of control, Fig. 1C).

Serotonin levels in the prefrontal cortex, striatum, hippocampus, and brainstem were reduced in all regions in the experimental group with a greater difference in the prefrontal cortex (Fig. 2).

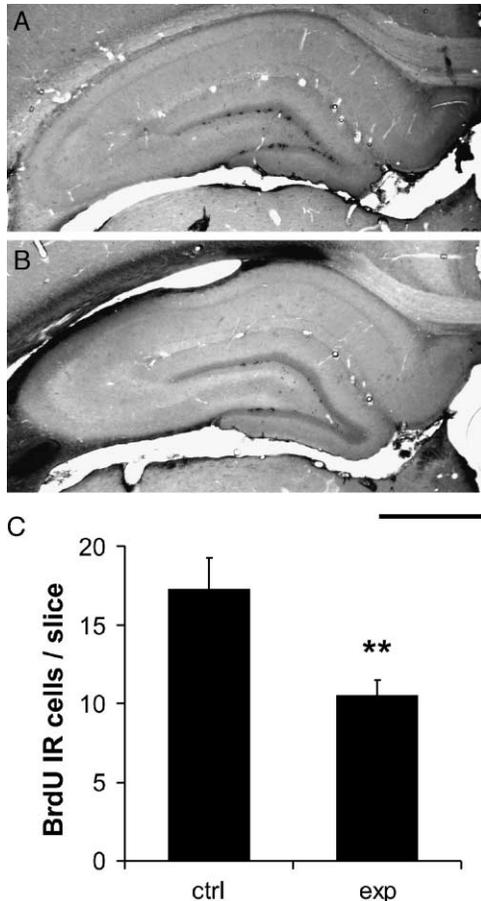
Ninety minutes after completing the forced swimming test, rats were perfused and expression of one of the immediate early genes, *c-Fos*, was measured by immunocytochemistry against *c-Fos* in prefrontal cortex, hippocampus, and amygdala nuclei, the main brain regions that receive dorsal raphe nucleus serotonergic input. An overall reduction of the *c-Fos*-positive nuclei density was observed (Fig. 3A). Figures 3B and 3C show the dramatic differences between a control animal and experimental animal in the dentate gyrus (DG) of dorsal hippocampus.

In terms of the enzymatic machinery of 5-HT synthesis, there was no significant effect in tryptophan hydroxylase-immunoreactive expression as can be seen in Figure 4, in which a pontine medium raphe area from an experimental animal is depicted in detail. This means that serotonin cells were not reduced in number as a result of the restriction of 5-HT precursor.

To elucidate the mechanisms underlying the behavioral changes, we studied the cytoarchitecture of hippocampal pyramidal neurons and DG granule cells that are related to some symptoms of major depression (e.g. memory



**FIGURE 4.** Tryptophan hydroxylase (TPH) immunoreactivity. Tryptophan restricted diet treatment did not affect the density of tryptophan hydroxylase-immunoreactive cells of dorsal raphe nucleus (DRN). **(A)** Representative immunohistochemistry from a brainstem slice containing DRN from an experimental animal. Scale bar = 1  $\mu$ m. **(B)** High magnification of **(A)** showing the tryptophan hydroxylase-immunoreactive cells in pontine medium and dorsal raphe nuclei. Scale bar = 200  $\mu$ m. **(C)** Histogram of density of TPH-immunoreactive cells in the different groups ( $n = 5$ ).



**FIGURE 5.** BrdU-IR. L-Tryptophan restriction diet significantly decreased the cell proliferation in DG of hippocampus. **(A, B)** Representative photomicrographs of BrdU-labeled cells in the subgranular zone and in the inner part of granule cells layer of DG from control and experimental groups respectively. Scale bar = 400  $\mu$ m. **(C)** Quantitative analysis of the number of BrdU-IR nuclei (n = 5). \*\*, p < 0.01.

impairment and anxiety). First, there was a significant decrease of BrdU-positive cells in the subgranular zone of DG (Fig. 5). Second, dendrite arborization and dendritic spine density were found reduced (Fig. 6). We also found structural changes such as abnormal dendrite swelling in DG granule cells of L-tryptophan-restricted animals (Fig. 6).

### DISCUSSION

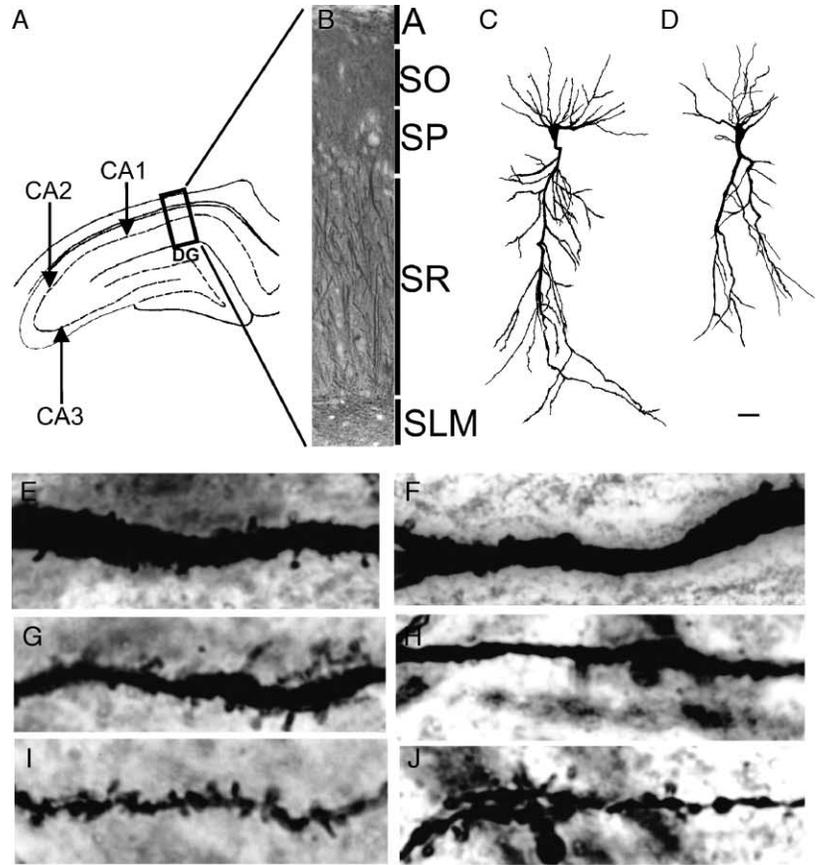
This study concerns the effects of feeding rats with a pure native maize-based TD, which contains low L-tryptophan ( $\pm 20\%$  of normal laboratory diets for rodents) in the early postnatal stages for an extended period. This tryptophan restriction produced diminished levels of brain serotonin as determined by neurochemical procedures. The behavioral consequences of this restriction were a significant increase of immobility during the forced swimming test and a decreased exploratory activity measured using elevated

plus maze. These behaviors have been reported in some animal models of both major depression and anxiety disorders (39, 40).

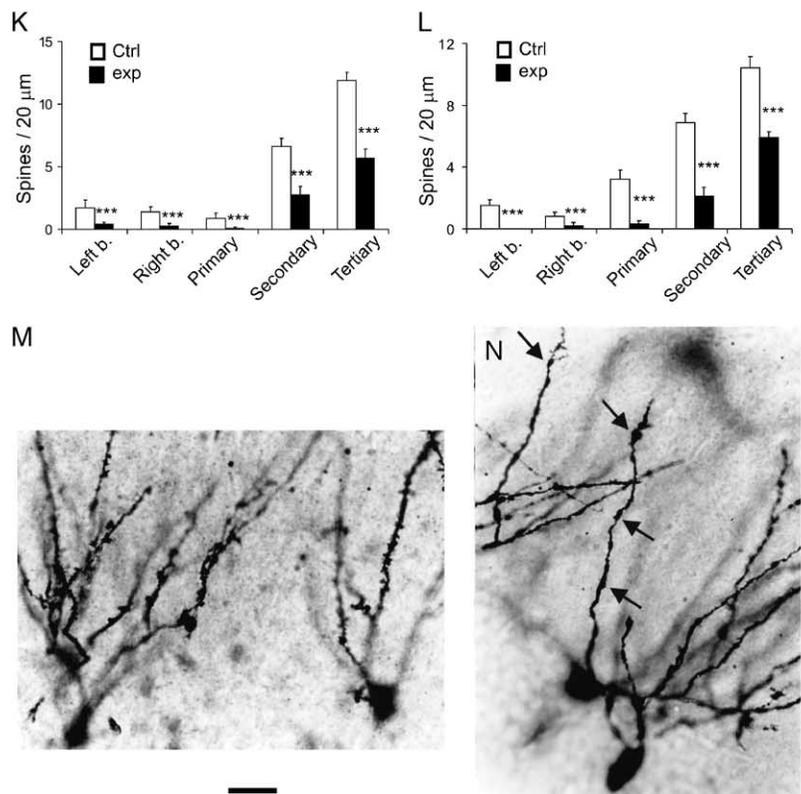
In addition to the depression/anxiety behavior-like constructs, this study also reports a change of the immediate early gene *c-Fos* expression through its induced protein *c-Fos* immunoreactivity in the main brain regions that receive dorsal raphe nucleus serotonergic input such as prefrontal cortex, dorsal and ventral striatum, and amygdala (41). Fadda et al reported a decrease in frontocortical 5-HT release after a TRP-free diet for 3 days (42). Therefore, one potential consequence of low TRP intake produced *hyposerotoninergia*, a dysregulation of 5-HT mediated neuronal physiological responses.

It is generally believed that changes in neuronal morphology and cell number represent fundamental mechanisms in neuronal plasticity that allow an animal to adapt to environmental and pharmacologic stimuli and thereby make appropriate long-term responses (43). In this study, it was observed that an extended restriction of TRP during early postnatal stages produces dendrite structural changes in pyramidal neurons of the CA1 sector and in DG granule cells of hippocampus. The normal production of new DG granule cells also seemed to be affected in this animal model. The pontine dorsal raphe nucleus and median raphe nucleus project extensively to the hippocampus (44–46) with CA1 and CA2 regions receiving the most innervation (47). Virtually all subtypes of 5-HT receptors are present in hippocampal neurons (48). This innervation should be modified in a time- and activity-dependent manner because it has been observed that there is a decrease (approximately 37%) of both dorsal raphe nucleus and median raphe nucleus serotonergic neurons during the first 8 postnatal weeks (49). Our experimental observation of the morphologic changes and the decreased BrdU labeling, which most likely indicates a decreased neurogenesis in DG when compared with controls, strengthens the hypothesis that the serotonin system plays an important role during the critical period of neural development. Furthermore, the weakening of the 5-HT transmission caused by substrate restriction in early postnatal stages could modify the hippocampus neuronal circuitry and neuronal plasticity, which in turn could influence the neuronal turnover in the granular cell layer of the DG. There is evidence indicating that serotonin itself could work as a neurotrophic factor (50) and its deficit in the hippocampus most likely affect neurogenesis in the DG.

The chronic mild stress paradigm developed by Willner et al in 1987 exhibits considerable face, construct, and predictive validity and has been widely accepted for experimental use (51). In that model, rats are exposed to daily sessions of uncontrollable, inescapable stressors. The primary behavioral expression in that model is the subsensitivity to a reward, which may reflect anhedonia, a major symptom comprising the major depression disorder. Several studies have documented that the chronic mild stress model alters mainly the mesocorticolimbic dopaminergic pathway to produce a functional *hypodopaminergia* (51–53). This is mainly related to reward and motivational processes that are



**FIGURE 6.** Golgi-Cox impregnation. Dendrite structural and spine density changes in hippocampus CA1 pyramidal neurons and granule cells impregnated with Golgi-Cox procedure. **(A)** (tracing) and **(B)** (tissue immunoreacted with MAP-2) show the region where 2 representative CA1 pyramidal neurons were traced using a drawing tube **(C)**, control and **(D)**, experimental (scale bar = 40  $\mu$ m). DG, dentate gyrus; A, alveus; SO, stratum oriens; SP, stratum pyramidale; SR, stratum radiatum; SLM, stratum lacunosum-moleculare. **(E–J)** Photomicrographs of control **(E–G)** and experimental **(H–J)** animals showing dendrite spine density on primary **(E, F)**, secondary **(G, H)**, and tertiary **(I, J)** branches at  $\times 1000$  magnification (scale bar = 10  $\mu$ m). Histograms show the analysis of dendritic spines in 20- $\mu$ m lengths along the dendrite from animals treated with tryptophan-restricted diet or controls in stage 1 **(K)** and stage 2 **(L)**. “Left b” and “right b” refer to the counting from basilar primary branches. “Primary,” “secondary,” and “tertiary” refer to the counting from apical branches,  $***, p < 0.001$  **(M, N)** Representative microphotographs illustrating dendrite structural changes on granule cells of DG: a noticeable augment of dendrite swellings (arrows) in the experimental group which is an abnormal condition in these structures. Scale bar = 40  $\mu$ m.



largely based on dopaminergic neurotransmission (54, 55). In our experiment, we found no difference between control and experimental groups with the sucrose intake test. This finding suggested that dopamine transmission-related anhedonia is not involved in the present model of serotonin precursor reduction.

Monoamine neurotransmission deficits had been widely accepted as the main factors in the pathogenesis of major depression disorder. These theories were mostly based on the principle of “reverse engineering” of antidepressants. However, this monoamine hypothesis has been challenged by the adaptive neuroplasticity hypothesis that emerged from the observation of the significant time delay before antidepressants begin to work in depressed patients (56). Duman et al proposed that depression could result from an inability to make the appropriate response to stress as a consequence of a dysfunction of the normal mechanism underlying neural plasticity (57). Chronic treatment with different classes of antidepressants, including selective 5-HT and norepinephrine reuptake inhibitors, upregulates the cyclic adenosine monophosphate transduction cascade, leading to the activation of cAMP-dependent protein kinase A, which phosphorylates proteins having a key role in cell signaling (57, 58). The diet tryptophan restriction paradigm and the behavioral and neurochemical changes observed from this study apparently were in concordance with the early hypotheses on the pathophysiology of major depression that were based on aberrant intrasynaptic concentration of mainly the neurotransmitters serotonin and norepinephrine. However, the pyramidal cells’ dendrite structural changes and the decreased cell turnover in the subgranular zone of DG observed in this study might implicate a temporal or longlasting structural neuroplasticity impairment and contribute to some, but not all, of the behavioral disturbances. In this context, the cellular and molecular mechanisms underlying the present findings still need further investigations.

Although it is naïve to expect that dysfunction of a single transmitter could be responsible for the constellation of symptoms that comprise depression and anxiety, and that an animal model for a disease involving higher human emotions cannot be fully validated, this experimental attempt represents a novel approach to the longlasting effects of a specific dietary constraint and could serve as an animal model to study the effects of *hyposerotoninergia* during development on mechanics of brain activity related to measurable behaviors. In this sense, these results might give some insights about the influences of dietary culture on affective stereotype and social behaviors. However, it is worth stressing that we do not pretend to draw any conclusions about the human brain, and in particular no connection should be made with the cultural and social context of the American indigenous people.

#### ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Dr. Mauricio Bellon from International Maize and Wheat Improvement Centre

(CIMMYT) for donation of the Maize landrace race Bolita, and Dr. Rafael Salin-Pascual for his suggestions to improve the experiments here described and his valuable criticism on the manuscript. The authors also thank Leticia Neri-Bazán, Verónica Rodríguez, Francisco Pasos, Tomás Cruz, and Guillermo Luna for technical assistance; and Drs. Qi Pei (University of Oxford), Raúl Aguilar (UNAM), Rafael Lujan (University of Castilla-la-Mancha), Francesco Ferraguti (University of Innsbruck) for discussions and critical reading of the manuscript.

#### REFERENCES

- Schatzberg AF, Garlow SJ, Nemeroff CB. Molecular and cellular mechanisms in depression. In: Davis KL, Charney D, Coyle JT, et al., eds. *Neuropsychopharmacology: The Fifth Generation of Progress*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2002:1039–50
- Mann JJ, Huang YY, Underwood MD, et al. A serotonin transporter gene promoter polymorphism (5-HTTLPR) and prefrontal cortical binding in major depression and suicide. *Arch Gen Psychiatry* 2000; 57:729–38
- Schildkraut JJ. Catecholamine hypothesis of affective disorders: A review of supporting evidence. *Am J Psychiatry* 1965;130:695–99
- Carlsson A, Fuxe K, Ungerstedt U. The effect of imipramine on central 5 hydroxytryptamine neurons. *J Pharm Pharmacol* 1968;20:150–51
- Vetulani J, Nalepa I. Antidepressant: Past, present and future. *Eur J Pharmacol* 2000;405:351–63
- Panzer MJ. Are SSRIs really more effective for anxious depression? *Ann Clin Psychiatry* 2005;17:23–29
- Whitaker-Azmitia PM. Role of serotonin and other neurotransmitter receptors in brain development: Basis for developmental pharmacology. *Pharmacol Rev* 1991;43:533–61
- Lauder JM. Ontogeny of the serotonergic system in the rat: Serotonin as a developmental signal. *Ann NY Acad Sci* 1990;600:297–313
- Vaidya VA, Merek GJ, Aghajanian GK, et al. 5-HT<sub>2A</sub> receptor-mediated regulation of brain-derived neurotrophic factor mRNA in the hippocampus and neocortex. *J Neurosci* 1997;17:2785–95
- Zetterström TSC, Pei Q, Madav TR, et al. Manipulation of brain 5-HT level affect gene expression for BDNF in rat brain. *Neuropharmacology* 1999;38:1063–73
- Azmitia EC, Rubinstein VJ, Strafaci JA, et al. 5-HT<sub>1A</sub> agonist and dexamethasone reversal of para-chloroamphetamine induced loss of MAP2 and synaptophysin immunoreactivity in adult rat brain. *Brain Res* 1995;677:181–92
- Mazer C, Munecciyirci J, Taheny K, et al. Serotonin depletion during synaptogenesis leads to decreased synaptic density and learning deficit in the adult rat: A possible model of neurodevelopmental disorders with cognitive deficits. *Brain Res* 1997;760:68–73
- Moorman JM, Jackson A, Grahame-Smith DG, Leslie RA. Induction of c-Fos in rat forebrain by pharmacological manipulation of 5-hydroxytryptamine levels. *Neuroscience* 1995;68:1089–96
- Moorman JM, Leslie RA. P-chloroamphetamine induces c-Fos in rat brain: A study of serotonin<sub>2A/2C</sub> receptor function. *Neuroscience* 1996;72:129–39
- Tilakaratne N, Friedman E. Genomic responses to 5-HT<sub>1A</sub> or 5-HT<sub>2A/2C</sub> receptor activation is differentially regulated in four regions of rat brain. *Eur J Pharmacol* 1996;307:211–17
- Pei Q, Lewis L, Sprakes ME, et al. Serotonergic regulation of mRNA expression of Arc, an immediate early gene selectively localized at neural dendrites. *Neuropharmacology* 2000;39:463–70
- Neumeister A. Tryptophan depletion, serotonin, and depression: Where do we stand? *Psychopharmacol Bull* 2003;37:99–115
- Benkelfat C, Ellenbogen MA, Dean P, et al. Mood-lowering effect of tryptophan depletion: Enhanced susceptibility in young men a genetic risk for major affective disorders. *Arch Gen Psychiatry* 1994;51: 687–97
- Klaassen T, Riedel WJ, van Someren A, et al. Mood effects of 24-hour tryptophan depletion in healthy first-degree relatives of patients with affective disorders. *Biol Psychiatry* 1999;46:489–97

20. Quintin P, Benkelfat C, Launay JM, et al. Clinical and neurochemical effect of acute tryptophan depletion in unaffected relatives of patients with bipolar affective disorder. *Biol Psychiatry* 2001;50:184–90
21. Neumeister A, Konstantinidis A, Stastny J, et al. Association between serotonin transporter gene promoter polymorphism (5HTTLPR) and behavioural responses to tryptophan depletion in healthy women with and without family history of depression. *Arch Gen Psychiatry* 2002;59:613–20
22. Delgado P, Miller HL, Salomon RM, et al. Tryptophan-depletion challenge in depressed patients treated with desipramine or fluoxetine: Implications for the role of serotonin in the mechanism of antidepressant action. *Biol Psychiatry* 1999;46:212–20
23. Bressani R. Chemistry, technology and nutritive value of maize tortillas. *Food Rev Int* 1990;6:225–64
24. Bazua CD, Guerra R, Sterner H. Extruded corn flour as an alternative to lime-treated corn flour for tortilla preparation. *J Food Sci* 1979;44:940–41
25. Cohen A. The mental health of indigenous peoples: an international overview. [World Health Organization web site] July 31, 1999. Available at: <http://www.who.int/hhr/activities/indigenous/en/>. Accessed October 20, 2005
26. Manson SM, Shore JH, Bloom JD. The depressive experience in American Indian communities: a challenge for psychiatric theory and diagnosis. In: Kleinman A, Good B, eds. *Culture and Depression: Studies in the Anthropology and Cross-Cultural Psychiatry of Affect and Disorder*. Berkeley, CA: University of California Press, 1985:331–68
27. Pedersen D. *Mental Health Amongst the Indigenous Peoples of Latin America. Working Paper No. 19. Series on International Mental and Behavioral Health*. Cambridge, MA: Center for the Study of Culture and Medicine, Program in Medical Anthropology, Harvard University, 1993
28. Aitken AR, Törk I. Early development of serotonin-containing neurons and pathways as seen in whole-mount preparations of the fetal rat brain. *J Comp Neurol* 1988;274:32–47
29. Illescas R. La teoría química de la formación de nixtamal. *Rev Soc Mex Hist Nat* 1943;4:129–36
30. Porsolt RD, Anton G, Blavet N, et al. Behavioral despair in rats: A new model sensitive to antidepressant treatments. *Eur J Pharmacol* 1978;47:379–91
31. Detke MJ, Rickels M, Lucki I. Active behaviours in the rat forced swimming test differentially produced by serotonergic and noradrenergic antidepressants. *Psychopharmacology* 1995;121:66–72
32. Heinrichs SCSwim stressor. In: Crawley JL, Gerfen CR, McKay R, et al., eds. *Current Protocols in Neuroscience*. New York: John Wiley & Sons, 1997:8.4.1–14
33. Pellow S, Chopin P, File SE, et al. Validation of open-closed arm entries in an elevated plus maze as a measure of anxiety in the rat. *J Neurosci Methods* 1985;14:149–67
34. File SE, Gonzalez LE, Andrews N. Comparative study of pre- and postsynaptic 5-HT1A receptor modulation of anxiety in two ethological animal tests. *J Neurosci* 1996;16:4810–15
35. Willner P, Towell A, Sampson D, et al. Reduction of sucrose preference by chronic unpredictable mild stress and its restoration by a tricyclic antidepressant. *Psychopharmacology (Berl)* 1987;93:358–64
36. Peat MA, Gibb JW. High-performance liquid chromatographic determination of indolamines, dopamine, and norepinephrine in rat brain with fluorometric detection. *Analytical Biochemistry* 1983;128:275–80
37. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, et al. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951;193:265–75
38. Paxinos G, Watson C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. New York: Academic Press, 1998
39. Spedding M, Jay T, Costa E, et al. A pathophysiological paradigm for the therapy of psychiatric disease. *Nat Rev Drug Discov* 2005;4:467–76
40. Seong E, Seasholtz AF, Burneister M. Mouse models for psychiatric disorders. *Trends Genet* 2002;18:643–50
41. Azmitia EC, Whitaker-Azmitia PM. Cell biology and maturation of the serotonergic system. In: Bloom FE, Kupfer DJ, eds. *Psychopharmacology: The Fourth Generation of Progress*. New York: Raven Press, 1995:443–80
42. Fadda F, Cocco S, Stancampiano R. A physiological method to selectively decrease brain serotonin release. *Brain Res Protoc* 2000;5:219–22
43. Duman RS. Depression: A case of neuronal life and death? *Biol Psychiatry* 2004;56:140–45
44. Imai H, Steindler DA, Kitai ST. The organization of divergent axonal projections from the midbrain raphe nuclei in the rat. *J Comp Neurol* 1986;243:363–80
45. Törk I. Raphe nuclei and serotonin containing system. In: Paxinos G, ed. *The Rat Nervous System*. Sydney: Academic Press, 1985:43–78
46. Vertes RP. PHA-L analysis of projections from the supramammillary nucleus in the rat. *J Comp Neurol* 1992;326:595–622
47. Törk I. Anatomy of the serotonergic system. *Ann N Y Acad Sci* 1990;600:9–34
48. Martin GR. 5-Hydroxytryptamine receptors. In: *The IUPHAR Compendium of the Receptor Characterization and Classification*. London: IUPHAR Media, 1998:167–85
49. Koh T, Nakazawa M, Kani K, Maeda T. Significant non-serotonergic raphe projection to the visual cortex of the rat. An immunohistochemical study combined with retrograde tracing. *J Hirnforsch* 1991;32:707–14
50. Djavadian RL. Serotonin and neurogenesis in the hippocampal dentate gyrus of adult mammals. *Acta Neurobiol Exp (Wars)* 2004;64:189–200
51. Willner P. Validity, reliability and utility of the chronic mild stress model of depression: A 10-year review and evaluation. *Psychopharmacology (Berl)* 1997;134:319–29
52. Papp M, Klimek V, Willner P. Parallel changes in dopamine D2 receptor binding in limbic forebrain associated with chronic mild stress-induced anhedonia and its reversal by imipramine. *Psychopharmacology (Berl)* 1994;115:441–46
53. Willner P. Dopaminergic mechanisms in depression and mania. In: Watson S, ed. *Psychopharmacology: The Fourth Generation of Progress*, PA online edition. New York: Lippincott Williams & Wilkins, 2000
54. Wise RA. Neuroleptics and operant behavior: The anhedonia hypothesis. *Behav Brain Sci* 1982;5:39–87
55. Skolnick P. Dopamine and depression. In: Schmidt WJ, Reith ME, eds. *Dopamine and Glutamate in Psychiatric Disorders*. Totowa, NJ: Humana Press, 2005:199–214
56. Del Rio J, Frechilla D. Glutamate and depression. In: Schmidt WJ, Raith EA, eds. *Dopamine and Glutamate in Psychiatric Disorders*. Totowa, NJ: Humana Press, 2005:215–34
57. Duman RS, Malberg J, Thome J. Neural plasticity to stress and antidepressant treatment. *Biol Psychiatry* 1999;46:1181–91
58. Duman RS, Heninger GR, Nestler EJ. A molecular and cellular theory of depression. *Arch Gen Psychiatry* 1997;54:597–606

## Revista de la Facultad de Medicina

Volumen **49**  
Volume

Número **2**  
Number

Marzo-Abril **2006**  
March-April

*Artículo:*

### Bases neuroquímicas y neuroanatómicas de la depresión

Derechos reservados, Copyright © 2006:  
Facultad de Medicina, UNAM

Otras secciones de  
este sitio:

-  [Índice de este número](#)
-  [Más revistas](#)
-  [Búsqueda](#)

*Others sections in  
this web site:*

-  [Contents of this number](#)
-  [More journals](#)
-  [Search](#)

## Monografía

# Bases neuroquímicas y neuroanatómicas de la depresión

Leyla Guadarrama,<sup>1,2</sup> Alfonso Escobar,<sup>3</sup> Limei Zhang<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, UNAM.

<sup>2</sup> Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, UNAM.

<sup>3</sup> Departamento de biología Celular y Fisiología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.

### Introducción

El trastorno depresivo es una enfermedad que afecta al organismo (cerebro), el ánimo y la manera de pensar. Se considera como un desorden del talante y es la forma más común de sufrimiento mental, millones de personas en todo el mundo, sin importar razas, nacionalidades o culturas sufren esta enfermedad. Es clara la importancia que este trastorno del talante tiene para la investigación científica y la población en general, por lo que el estudio para el conocimiento de sus causas y las posibles curas se ha ampliado notablemente; a pesar de eso algunos mecanismos de la fisiopatología de esta enfermedad aún permanecen desconocidos. Se han llevado a cabo estudios en pacientes con depresión a largo plazo, encontrando que existen dos formas básicas de depresión: la exógena y la endógena y que las causas pueden incluir factores: genéticos, químicos y psicosociales.

Por casi 2,500 años los desórdenes afectivos o del talante han sido descritos como enfermedades muy comunes del hombre, pero sólo recientemente han despertado interés como un problema mayor de salud pública.<sup>2</sup>

Nuestro conocimiento del cerebro en el proceso salud-enfermedad se ha incrementado desde el siglo XIX, pero comparado con los avances que hay en otras áreas de la medicina (p. ej. las enfermedades cardiovasculares) el progreso ha sido relativamente pequeño para entender la fisiopatología de la depresión

La depresión es una condición que ya fue reconocida clínicamente por los antiguos griegos, aunque fue hasta mediados del siglo XX que se iniciaron estudios sobre los neurotransmisores involucrados, estudios que aportaron conocimientos esenciales para el tratamiento exitoso de la depresión.<sup>3</sup> Es una de las formas más comunes de enfermedad mental en la población en general. En general la prevalencia es del 15%, la asociación que mantiene con morbilidad y mortalidad es sustancial, e impone una gran carga tanto en países en vías de desarrollo como en los desarrollados. De acuerdo con datos recientes la depresión es la 5a. causa de discapacidad en el mundo y es alrededor del 4% de la carga total de enfermedades en el mundo.<sup>1</sup> Los desórdenes depresivos afectan al menos al 20% de mujeres y 12% de hombres en algún momento durante su vida.<sup>2</sup> Las mujeres son doble-

mente susceptibles a sufrir depresión y los síntomas generalmente se incrementan con la edad,<sup>1</sup> pero a pesar de eso más hombres que mujeres mueren por suicidio.<sup>2</sup>

### La depresión y sus causas

¿Es básicamente la depresión un trastorno biológico o una respuesta al estrés psicosocial con incapacidad del individuo para afrontarla? La opinión generalizada es que ambos conceptos son aceptables, de ser así se deben considerar dos formas básicas de depresión, exógena y endógena. La depresión exógena (o reactiva) obedece a una causa externa generalmente bien definida (pérdida de un familiar o un ser amado, pérdida monetaria o de posición social, enfermedad invalidante, etc.). La depresión endógena, en cambio, no tiene causa externa manifiesta, lo cual lleva a considerarla una alteración biológica, como ocurre en las psicosis bipolar (maniaco-depresiva) o unipolar (depresiva), nuevamente debe uno preguntarse ¿esta división tan precisa existe realmente? En la vida diaria los estímulos que pueden generar depresión son multifactoriales, todos ellos tienen como denominador común el constituir estresores con valor afectivo sólo para el individuo afectado. Ese valor afectivo varía de individuo a individuo y, como ya se mencionó antes, la experiencia de cada individuo es la variable que introduce la diferencia en la respuesta. En otras palabras, el estrés es un factor importante para que el estado depresivo reactivo se genere y éste no puede separarse de los cambios biológicos (fisiológicos y hormonales) que normalmente son concomitantes con el estrés, asociado todo ello al eje hipotálamo-hipófisis-suprarrenal. Por lo tanto, se puede inferir que la llamada depresión exógena depende de ambos factores, la calidad y cantidad del estímulo ambiental estresor y los substratos biológicos (genéticos, bioquímicos y moleculares) que determinan las alteraciones en la homeostasis y, por ende, en la función cerebral.<sup>3</sup>

Las características claves por medio de las cuales se podrían definir los desórdenes depresivos son:

- Talante bajo
- Energía reducida
- Pérdida del interés o del disfrute

Otros síntomas comunes incluyen baja concentración, reducida autoestima, pensamientos de culpabilidad, pesimismo, ideas de autodaño o suicidio, disturbios del sueño y alteraciones del apetito.<sup>1</sup> El papel de los factores físicos o biológicos en la patogénesis de la depresión se ha sospechado desde la antigüedad. Sin embargo, sólo en la mitad tardía del siglo XX la tecnología y la metodología experimental han estado disponibles para estudiar estos procesos en los desórdenes del talante.<sup>5</sup>

La depresión tiene muchas causas, las cuales incluyen:

- Factores genéticos
- Factores químicos: alteraciones de neurotransmisores
- Factores psicosociales como: experiencias adversas en la infancia: dificultades cotidianas y crónicas, eventos indeseables en la vida, red social limitada, baja autoestima.

En la mayoría de los pacientes los episodios depresivos surgen de la combinación de factores familiares, biológicos, psicológicos y sociales, los cuales operan a través del tiempo y progresivamente incrementan su capacidad patológica.

### Factores genéticos

La influencia genética es más marcada en pacientes con formas graves de trastorno depresivo y síntomas de depresión endógena. El riesgo de morbilidad en parientes en primer grado (padres, hermanos o hijos) está incrementado en todos los estudios que se han llevado a cabo, y es independiente de los efectos del ambiente o educación. Marcadores genéticos potenciales<sup>1</sup> para los trastornos del talante han sido localizados en los cromosomas X, 4, 5, 11, 18 y 21.

En un estudio reciente se hicieron pruebas para ver por qué experiencias estresantes llevaron a la depresión a algunas personas pero no a otras. Se encontró que un polimorfismo funcional en la región promotora del gen del transportador de la serotonina (5-HTT) modulaba la influencia de los eventos estresantes cotidianos en la depresión. Los individuos con una o dos copias del alelo corto del 5-HTT mostraron más síntomas depresivos, depresión diagnosticable y tendencias suicidas con relación a eventos estresantes en comparación con individuos con un solo alelo. Ese estudio epidemiológico provee la evidencia de la interacción genético-ambiental, en la cual la respuesta de un individuo a los estímulos ambientales es moderada por la organización genética del mismo.<sup>6</sup>

### Alteraciones de neurotransmisores

Existe evidencia que niveles anormales de la serotonina (5-hidroxitriptamina, 5-HT), norepinefrina y dopamina, neu-

rotransmisores aminérgicos que actúan en las neuronas del sistema nervioso central, podrían ser importantes en la fisiopatología de la depresión.<sup>1</sup>

### Serotonina

La serotonina ejerce importante acción en el talante, conducta, movimiento, apreciación del dolor, actividad sexual, apetito, secreciones endocrinas, funciones cardíacas y el ciclo de sueño-vigilia. La mayoría de la serotonina cerebral se genera en los núcleos del rafé, principalmente en el noveno núcleo del rafé, que se localiza encordado entre la línea media del puente y el bulbo raquídeo, estructuras que forman parte del tallo cerebral.<sup>7</sup>

La serotonina es producida a partir del aminoácido triptófano, el cual es transportado a través de la barrera hemato-encefálica hasta las neuronas por el gran transportador neutral de aminoácidos (LNAA). El LNAA también mueve otros aminoácidos: tirosina, valina, leucina e isoleucina a través de la barrera hematoencefálica. El triptófano debe competir con estos otros aminoácidos para el transporte en el cerebro. Por lo tanto, la cantidad de triptófano transportado depende tanto de su concentración como de la concentración de los otros aminoácidos en el cuerpo. Ya dentro de la neurona, se lleva a cabo el proceso de síntesis de serotonina que se describe en la figura 1.

### Noradrenalina

El *Locus coeruleus* (LC) es el núcleo del encéfalo, en el tallo cerebral, que genera la noradrenalina (NA); las neuro-

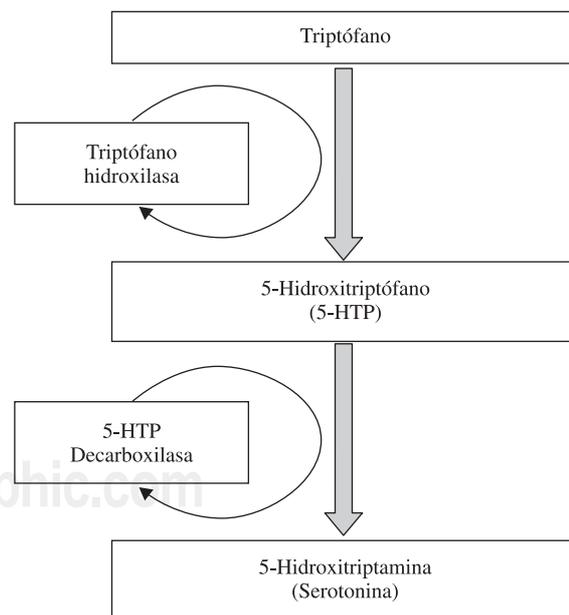


Figura 1. La neuroquímica básica de la serotonina. Ref. (1).

nas del LC envían sus axones principalmente a las estructuras límbicas, que incluyen la amígdala, la formación hipocámpica y la corteza prefrontal. El *Locus coeruleus*, estructura que forma parte de la formación reticular, posee actividad tónica como marcapaso. La actividad de las neuronas del LC aumenta significativamente en la vigilia y en episodios de estrés, en los cuales su actividad neuronal alcanza niveles de intensidad máxima, y de ese modo contribuye a alertar al organismo lo necesario para sobrevivir.<sup>8</sup> Es lógico aceptar que el estrés crónico genera depresión reactiva, como se observa en los modelos animales de depresión, y que las reservas de NA en el LC obviamente tienden a depletarse, lo que conduce a mantener el estado de depresión reactiva; en el caso de individuos con depresión secundaria al estrés crónico ocurre un fenómeno fisiológico similar.

La carencia de este neurotransmisor o su desequilibrio con la serotonina puede ser la causa de psicosis depresiva unipolar o bipolar; los medicamentos antidepresivos específicos están dirigidos a mejorar actividad de la noradrenalina en la sinapsis.<sup>7</sup>

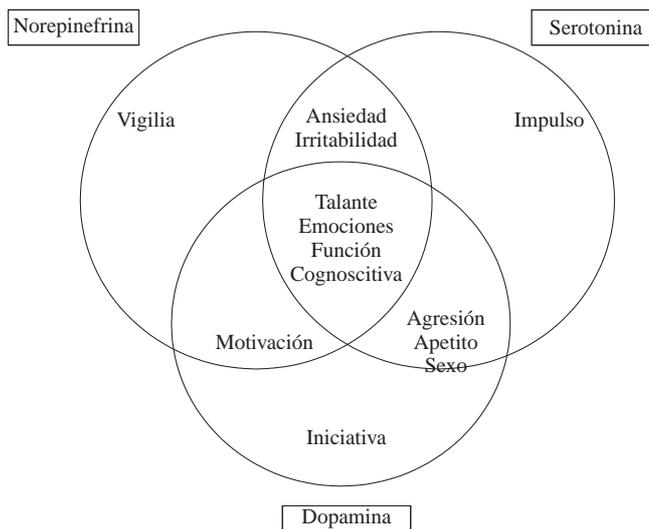
El aminoácido tirosina es el precursor indispensable para la síntesis de la NA. La tirosina es primero convertida a dopa (dihidroxifenilalanina) por la tirosina-hidroxilasa. La dopa es convertida a noradrenalina por la enzima dopamina-beta-hidroxilasa.

### Dopamina

La dopamina es una catecolamina que se genera por las neuronas pigmentadas en la *pars compacta* del *Locus níger*; y en neuronas de la parte ventral del tegmento mesencefálico; de aquí se origina la vía que existe entre la *substantia nigra* y el cuerpo estriado (*vía nigroestriada*), la vía que va del área tegmental ventral del mesencéfalo hacia el *nucleus accumbens* del sistema límbico y a la corteza prefrontal (*vía mesolímbico-cortical*).<sup>7</sup> Una tercera vía dopaminérgica se origina de neuronas del túbulo de la hipófisis a la adenohipófisis (*vía tuberohipofisaria*), aunque esta última solamente participa en la síntesis de prolactina.

La dopamina es principalmente un neurotransmisor inhibitorio. Este neurotransmisor, en las vías mesocortical y mesolímbica, participa en el mantenimiento del estado de alerta. Se deriva del aminoácido tirosina y la síntesis es por la misma vía que para la noradrenalina.<sup>7</sup>

La serotonina y la noradrenalina tienen fuerte influencia en patrones de conducta y función mental, mientras que la dopamina está involucrada en la función motriz. Estas tres sustancias son sin duda fundamentales para un funcionamiento normal del cerebro; por esta razón dichos neurotransmisores han sido el centro de estudios neurocientíficos durante muchos años.<sup>7</sup> La figura 2 ilustra la interacción de los tres neurotransmisores en la fisiopatología de la depresión.<sup>1</sup>



**Figura 2.** Los neurotransmisores y su posible influencia en la psicopatología de la depresión. Ref 1.

Es tan importante la interacción de estos tres neurotransmisores que desde hace 50 años existe lo que se ha llamado la “hipótesis de las monoaminas en la depresión”, que se ha utilizado para explicar los efectos benéficos de los antidepresivos tricíclicos y de los inhibidores de la monoaminoxidasa (MAO). En su forma original la hipótesis propuso que la depresión era causada por un déficit funcional de las monoaminas, noradrenalina y serotonina en sitios claves del cerebro, mientras que la manía era causada por el exceso funcional de éstas; y que los agentes antidepresivos ejercían su efecto facilitando la neurotransmisión monoaminérgica por medio del incremento de los niveles de las monoaminas en las terminales sinápticas.<sup>9</sup>

Se ha demostrado que el tabaquismo crónico inhibe la monoaminoxidasa B, la enzima que participa en la degradación de la dopamina y de la monoaminoxidasa A. Esta acción explica en parte la acción antidepresiva de la nicotina. Estudios clínicos y de laboratorio indican la participación de los receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChRs) en varias funciones cerebrales complejas como la memoria, atención y procesos cognoscitivos, pero también en la patogénesis de varias aflicciones neuropsiquiátricas como las enfermedades de Parkinson y Alzheimer. Éstas se caracterizan por la disminución de la densidad de nAChRs, o como en la epilepsia autosómica dominante nocturna del lóbulo frontal y posiblemente en la esquizofrenia, las cuales parecen ser producidas por alteraciones genéticas que afectan las funciones de los nAChRs.<sup>10</sup> Estudios realizados indican que el tabaquismo podría representar una forma de automedicación en enfermedades psiquiátricas como la esquizofrenia, el desorden de déficit de atención e hiperactividad así como en la depresión.

La nicotina ha sido usada con éxito ya sea como un tratamiento único o complementario en las enfermedades antes mencionadas. El uso terapéutico de la nicotina está severamente limitado por sus efectos colaterales carcinogénicos y cardiovasculares. Esta inconveniencia está próxima a superarse con la síntesis de agonistas selectivos de los nAChRs.<sup>10</sup>

En un trabajo reciente se evaluó la instalación de la depresión durante el tratamiento para la dependencia nicotínica. Monitorizaron la emergencia de depresión mayor entre 224 fumadores. El 4% (n = 10) experimentaron la instalación de la depresión durante el curso del estudio, 4 hombres y 6 mujeres. Sólo 2 de los 10 casos pudieron sobrellevar la abstinencia hasta el final del tratamiento. Aquellos que reportaron alto incremento en los síntomas de depresión entre el comienzo del estudio y el final del tratamiento tuvieron más dificultad para permanecer en abstinencia hasta la semana 26. Como se esperaba, aquellos que experimentaron un episodio de depresión durante el tratamiento volvieron a fumar rápidamente. Aunque los mecanismos de control del tabaquismo están más allá de nuestro alcance en este momento, la evidencia claramente indica que aquellos que tratan la dependencia a la nicotina deben estar preparados para monitorizar y responder a la emergencia de episodios de depresión asociados con el tratamiento.<sup>11</sup>

Otros estudios clínicos sugieren que la depresión facilita el abuso del alcohol. Sería posible que la nicotina redujera el uso de alcohol en la depresión. Para investigar esta relación potencial, se evaluó la ingesta de alcohol en un modelo animal de depresión por medio de la administración de clomipramina (CLI). En ese estudio se encontró que las ratas tratadas con CLI mostraron índices significativamente más altos en la actividad locomotora, menor agresividad y mayor ingesta de alcohol que las ratas control. La administración crónica de una baja dosis de nicotina (0.25 mg/kg/día) o una operación de control no modificó estas conductas. Sin embargo, la administración crónica de una dosis más alta (1.5 mg/kg/día) aumentó significativamente la conducta agresiva y redujo la ingesta de alcohol en las ratas con CLI. El efecto de la nicotina en la ingesta de alcohol duró al menos un mes después de haber cesado la administración de nicotina. Estos resultados indican que la nicotina revirtió algunos signos de depresión y redujo la autoadministración de alcohol en el modelo CLI de depresión.<sup>12</sup>

La serotonina desempeña un papel central en la neuroquímica del modelo animal de depresión de la desesperanza aprendida. Usando autorradiografía cuantitativa, se midió la densidad de los receptores serotoninérgicos 5-HT<sub>1A</sub> y 5-HT<sub>2A</sub> así como los sitios de transporte en la corteza prefrontal media, hipocampo dorsal, septum, hipotálamo y amígdala en ratas que adquirieron desesperanza aprendida, así como en aquellas que no la adquirieron después de exponerlas a “estrés sin escape”; también fue medido en ratas control que sólo

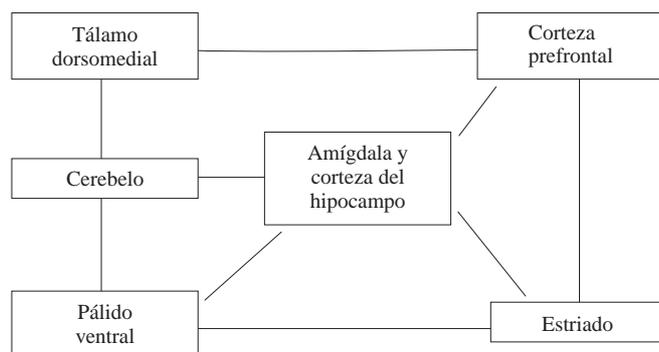
fueron sometidas a pruebas en la caja de escape (sin estrés) y en ratas control sin ningún tratamiento. No hubo cambios en la densidad del receptor 5-HT<sub>1A</sub> entre los grupos en ninguna de las regiones estudiadas. En el hipocampo dorsal la densidad del receptor 5-HT<sub>2A</sub> estaba disminuida en las ratas que no adquirieron desesperanza, mientras en la amígdala la densidad del 5-HT<sub>2A</sub> estuvo disminuida en ambos grupos de ratas estresadas con o sin desesperanza aprendida. En el hipotálamo la densidad del receptor 5-HT<sub>2A</sub> estuvo disminuida en las ratas con desesperanza aprendida, comparada con los controles. En la corteza prefrontal medial, los sitios de transporte de serotonina mostraron densidad disminuida en ratas con desesperanza aprendida en comparación con los controles, pero no en comparación con las ratas que no adquirieron la desesperanza aprendida.<sup>13</sup>

En resumen, resultaron tres hallazgos de ese trabajo. Primero, los datos sugieren que el receptor 5-HT<sub>1A</sub> podría no estar relacionado en el desarrollo de la desesperanza aprendida en las regiones estudiadas. Segundo, la disminución en los sitios de transporte de 5-HT en la corteza prefrontal medial y la disminución en la densidad del receptor 5-HT<sub>2A</sub> en la amígdala y el hipotálamo pueden deberse al estrés sin escape producido por choques eléctricos en la cola, y podría no estar funcionalmente relacionado a la conducta de desesperanza aprendida. Finalmente, la disminución en la densidad del receptor 5-HT<sub>2A</sub> en el hipocampo dorsal podría correlacionarse con la falta de desarrollo de la conducta de desesperanza aprendida posterior al estrés. La investigación en el futuro podría explorar otras áreas cerebrales para un mayor estudio de las complejas interacciones de la serotonina, estrés y la conducta de desesperanza aprendida.<sup>13</sup>

### Neuroanatomía de la depresión

Se ha propuesto un modelo neuroanatómico que comprende de la corteza prefrontal, el complejo amígdala-hipocampo, el tálamo, los ganglios basales y las abundantes conexiones entre esas estructuras. Se piensa que los dos principales circuitos neuroanatómicos involucrados en la regulación del talante son: el circuito límbico-talámico-cortical, que incluye la amígdala, los núcleos dorsomediales del tálamo, y la corteza prefrontal tanto la medial como la ventrolateral; así como el circuito límbico-estriado-pálido-talámico-cortical (figura 3). De acuerdo con este modelo las alteraciones del talante podrían ser el resultado de disfunción o anomalías en diferentes partes de esos circuitos<sup>14</sup> que podrían ser el inicio de trastornos del talante, o conferir cierta vulnerabilidad biológica, que en combinación con factores ambientales, tenga como consecuencia alguno de estos desórdenes.<sup>14</sup>

Se han reportado anomalías estructurales en ganglios basales, lóbulo frontal, lóbulo temporal y cerebelo, en estudios controlados hechos en pacientes con desórdenes del ta-



**Figura 3.** Las áreas clave que participan en la regulación del talante están representadas en esta figura. Tienen extensas interconexiones. Los dos principales circuitos neuroanatómicos que se cree están involucrados en la fisiopatología de los trastornos del talante son el circuito límbico-tálamo-cortical (circuito 1), que conecta la amígdala, el núcleo talámico dorsomedial y la corteza prefrontal medial y ventrolateral; y un circuito límbico-estriado-pálido-talámico-cortical (circuito 2), que conecta el estriado, el pálido ventral y las regiones del circuito 1. De acuerdo a este modelo, los desórdenes del talante podrían resultar de una disfunción en diferentes regiones de esos circuitos interconectados (Ref 15).

lante, que sugieren atrofia regional. El patrón de anomalías es distinto en los trastornos unipolar y bipolar, los pacientes con problemas unipolares presentan el lóbulo frontal y ganglios basales más pequeños y los pacientes bipolares muestran anomalías en el lóbulo temporal.<sup>14</sup>

Los descubrimientos con técnicas de neuroimagen han creado nuevas oportunidades para el estudio *in vivo* de la anatomía funcional del cerebro humano. La tomografía computada de emisión de fotón único (SPECT) y la tomografía por emisión de positrones (PET) han sido usadas para este propósito en los últimos 15 años. Escáneres de alta resolución y nuevos avances en el proceso de imágenes han hecho estos métodos más sensibles y útiles. El desarrollo de nuevos ligandos ha permitido un mapeo más específico de diferentes sistemas de neuro-receptores cerebrales *in vivo* en el cerebro humano. La imagen por resonancia magnética (MRI), con máquinas más rápidas y con mayor resolución ha hecho posible el desarrollo de la MRI funcional (fMRI). La resonancia magnética por espectroscopia (MRIe) ofrece nuevas formas para estudiar la neuroquímica cerebral *in vivo*.<sup>14</sup> Después de una amplia revisión Soares y Mann reportan los siguientes hallazgos.

### Anormalidades generales del cerebro

La mayoría de los estudios en pacientes con depresión unipolar o bipolar no encontraron anomalías en el flujo sanguíneo cerebral global bajo condiciones de reposo. Parece haber una reducción global en el flujo sanguíneo en ancianos

deprimidos, que podría ser el resultado de enfermedad vascular subyacente e irreversible.<sup>14</sup>

En conclusión, existen hallazgos conflictivos acerca de los cambios funcionales globales en el cerebro, pero la mayoría de los estudios no apoyan la presencia de anomalías en el flujo sanguíneo cerebral o del metabolismo en los trastornos del talante<sup>14</sup>

### Simetría cerebral

Cambios asimétricos podrían estar presentes en los desórdenes del talante.<sup>14</sup> Los estudios regionales del metabolismo cerebral de la glucosa encontraron incremento en el metabolismo en el lado derecho, y no coincidieron con hallazgos de disminución del flujo sanguíneo del lado derecho que reportan algunos estudios.<sup>14</sup> Así, en la literatura de neuroimagen funcional hay evidencia conflictiva acerca de los cambios en la lateralidad del hemisferio cerebral en pacientes con depresión unipolar y bipolar. Algunos estudios mostraron disminución en las mediciones de metabolismo o flujo sanguíneo cerebral en el hemisferio izquierdo, y otros en el derecho. Por lo tanto, es necesario que se realicen más estudios de las subregiones en ambos hemisferios.<sup>14</sup>

### Anormalidades cerebrales regionales

Los trastornos del talante podrían estar asociados con anomalías funcionales del cerebro de tipo regional o localizada, en lugar de anomalías globales. Cambios localizados independientemente de las alteraciones globales son indicadores potenciales de regiones cerebrales involucradas más directamente en la patogénesis de los trastornos del talante. Han sido investigadas varias estructuras cerebrales, entre ellas:

Regiones corticales como: lóbulo temporal, estructuras límbicas (formación hipocámpica, amígdala, uncus), lóbulo parietal, lóbulo occipital.

Regiones subcorticales: ganglios basales, tálamo; estructuras de la fosa posterior como el cerebelo; otras regiones cerebrales como la circunvolución del cíngulo.

Los estudios en neuroimagen funcional ofrecen información para el desarrollo de un modelo neuroanatómico hipotético de regulación del talante y de la fisiopatología de los trastornos del talante. El hallazgo en neuroimagen funcional más consistente ha sido la disfunción de la corteza prefrontal, como lo sugiere la disminución en el flujo sanguíneo y en el metabolismo de la glucosa de esta área. También se sugieren anomalías en los ganglios basales, el lóbulo temporal y estructuras límbicas relacionadas. La depresión unipolar parece estar caracterizada por disfunción primaria en la corteza prefrontal y los ganglios basales, mientras que la depresión bipolar podría estar asociada con disfunción en el lóbulo temporal, además de las áreas mencionadas antes.<sup>15</sup>

A partir de los avances en la investigación de la neuroanatomía del cerebro y del refinamiento de las técnicas de neuroimagen, diversas preguntas han podido ser respondidas con trabajos de investigación. Beauregard, 1998,<sup>16</sup> se pregunta si los cambios funcionales cerebrales asociados a alteraciones del talante observados en la depresión son similares a aquellos que acompañan a la tristeza transitoria en sujetos normales. Para responder esta pregunta, llevaron a cabo un estudio fMRI usando un paradigma de activación emocional. La actividad cerebral asociada con la observación pasiva de un cortometraje con alta carga emocional para inducir un estado transitorio de tristeza y fue contrastado con el estado asociado con la observación pasiva de un cortometraje emocionalmente neutral, llevado a cabo en pacientes que sufren de depresión unipolar y en sujetos normales de control. Los resultados mostraron que la tristeza transitoria producía activación significativa en la corteza medial y prefrontal anterior, la corteza temporal media, el cerebelo y el caudado en los sujetos deprimidos así como en los normales. También revelaron que la observación pasiva del cortometraje cargado emocionalmente produjo una activación significativamente mayor en la corteza medial prefrontal izquierda y en el giro cingulado derecho en los pacientes deprimidos más que en los sujetos normales. Estos hallazgos sugieren que estas dos regiones corticales podrían ser parte de una red neural implicada en la fisiopatología de la depresión.

Existe un estudio en el cual se utiliza la precisión de la imagen de resonancia magnética (MRI) para cuantificar el volumen hipocámpico en una serie de sujetos humanos con historia de depresión comparados con sujetos de control. Se tenía la hipótesis de que tanto el factor edad como la duración de la depresión estarían inversa e independientemente correlacionados con el volumen hipocámpico. Los sujetos con una historia de depresión (posdeprimidos) tuvieron volúmenes hipocámpicos bilaterales menores que los controles. Los posdeprimidos también tuvieron volúmenes menores en los núcleos centrales de la amígdala. En suma, los posdeprimidos tuvieron bajas calificaciones en memoria verbal, una medida neuropsicológica de la función hipocámpica, sugiriendo que la pérdida del volumen se relacionaba con un aspecto de la función cognoscitiva. Al contrario de su hipótesis inicial, no hubo correlación significativa entre el volumen hipocámpico y la edad entre los sujetos posdeprimidos y los controles, pero sí hubo una importante correlación con la duración total de la depresión. Esto sugiere que el estrés repetido durante episodios recurrentes podría resultar en daño acumulativo para el hipocampo reflejado como pérdida de volumen.<sup>17</sup>

Otro trabajo apoya esta hipótesis de que el daño hipocámpico se manifiesta después de repetidos episodios depresivos comparando dos grupos: pacientes con el primer episodio de depresión que nunca han sido tratados y pacientes que han tenido múltiples episodios depresivos. Se les realizaron prue-

bas de memoria, así como mediciones del volumen total del hipocampo con MRI. Ambos grupos, el del primer episodio depresivo así como el de múltiples episodios tuvieron disfunción hipocámpica aparente en varias pruebas de memoria, pero sólo los sujetos con múltiples episodios depresivos presentaron reducción en el volumen hipocámpico.<sup>18</sup>

Hay otros trabajos que han reportado diversos cambios neuroanatómicos como resultado de la depresión a largo plazo: cambios como la atrofia de dendritas apicales en las neuronas piramidales del sector CA3 del hipocampo acompañada por deficiencias cognoscitivas específicas en aprendizaje y memoria espacial. Los aminoácidos excitatorios junto con los corticosteroides y el neurotransmisor serotonina son los mediadores de esta atrofia.<sup>19</sup> También se ha utilizado tejido impregnado con la tinción de Golgi para demostrar que la exposición excesiva a glucocorticoides altera la morfología dendrítica en una población específica de neuronas en el hipocampo de la rata adulta.<sup>20</sup>

Gracias a estos trabajos podemos ver los amplios avances que se han hecho en el campo de estudio de la depresión, así como encontrar hacia dónde dirigir el camino para el hallazgo de nuevas terapias para esta enfermedad.

Mucho trabajo tiene aún que hacerse, pero los descubrimientos hechos hasta ahora irán dirigiendo la investigación futura.

Agradecemos a DGEP y CONACYT por las becas de posgrado (LG) y por el donativo 41694-M a CONACYT.

## Referencias

1. Baldwin D, Birtwistle J. An Atlas of Depression. 2002. Southampton UK. The Parthenon Publishing group.
2. Sadock BJ, Sadock VA. Kaplan & Sadock's. Comprehensive textbook of psychiatry. 1999. Ed. Lippincott Williams & Wilkins. Seventh ed.
3. Escobar A. Neurobiología de la depresión. En: Velázquez Moctezuma J, Ed. Temas Selectos de Neurociencias III. UAM, México, 2004; 181-190.
4. Ebert D, Ebmeier KP. The role of the cingulate gyrus in depression: from functional anatomy to neurochemistry. *Biol Psychiatry*. 1996; 39: 1044-1050.
5. Racagni G, Brunello N. Physiology to functionality: the brain and neurotransmitter activity. *Int Clin Psychopharmacol*. 1999; 14 Suppl 1:S3-7.
6. Caspi A, Sugden K, Moffitt TE, Taylor A, Craig IW, Harrington H, McClay J, Mill J, Martin J, Braithwaite A, Poulton R. Influence of life stress on depression: moderation by a polymorphism in the 5-HTT gene. *Science*. 2003; 301(5631): 386-389.
7. Blows WT. Neurotransmitters of the brain: serotonin, noradrenaline (norepinephrine), and dopamine. *J Neurosci Nursing*. 2000, 32: 234-238.
8. Pavcovich LA, Cancela LM, Volosin M, Molina VA, Ramirez OA. Chronic stress-induced changes in locus ceruleus neuronal activity. *Brain Res Bull*. 1990, 24: 293-296.
9. Harvey BH, McEwen BS, Stein DJ. Neurobiology of antidepressant withdrawal: implications for the longitudinal outcome of depression. *Biol Psychiatry*. 2003; 54: 1105-1117.

10. Mihailescu S, Drucker-Colin R. Nicotine, brain nicotinic receptors, and neuropsychiatric disorders. *Arch Med Res* 2000; 31: 131-144. Review.
11. Killen JD, Fortmann SP, Schatzberg A, Hayward C, Varady A. Onset of major depression during treatment for nicotine dependence. *Addict Behav.* 2003; 28: 461-470.
12. Martinez-Gonzalez D, Prospero-Garcia O, Mihailescu S, Drucker-Colin R. Effects of nicotine on alcohol intake in a rat model of depression. *Pharmacol Biochem Behav* 2002; 72: 355-364.
13. Wu J, Kramer GL, Kram M, Steciuk M, Crawford IL, Petty F. Serotonin and learned helplessness: a regional study of 5-HT<sub>1A</sub>, 5-HT<sub>2A</sub> receptors and the serotonin transport site in rat brain. *J Psychiatr Res* 1999; 33: 17-22.
14. Shiah IS, Yatham LN. GABA function in mood disorders: an update and critical review. *Life Sci* 1998; 63: 1289-1303.
15. Soares JC, Mann JJ. The functional neuroanatomy of mood disorders. *J Psychiatr Res* 1997; 31: 393-432.
16. Beauregard M, Leroux JM, Bergman S, Arzoumanian Y, Beaudoin G, Bourgouin P, Stip E. The functional neuroanatomy of major depression: an fMRI study using an emotional activation paradigm. *Neuroreport* 1998; 9: 3253-3258.
17. Sheline YI, Sanghavi M, Mintun MA, Gado MH. Depression duration but not age predicts hippocampal volume loss in medically healthy women with recurrent major depression. *J Neurosci* 1999; 19: 5034-5043.
18. MacQueen GM, Campbell S, McEwen BS, Macdonald K, Amano S, Joffe RT, Nahmias C, Young LT. Course of illness, hippocampal function, and hippocampal volume in major depression. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100: 1387-1392.
19. Magarinos AM, Verdugo JM, McEwen BS. Chronic stress alters synaptic terminal structure in hippocampus. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 14002-14008.
20. Whooley MA, Simon GE. Managing depression in medical outpatients. *N Engl J Med* 2000; 343: 1942-1950. Review.

