



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE PSICOLOGÍA DIVISIÓN DE ESTUDIOS PROFESIONALES

“Efecto de la depuración dietética de triptófano en diferentes periodos embrionarios sobre la morfología y estructura final de las neuronas piramidales del hipocampo y la corteza cerebral en rata”

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

LICENCIADA EN PSICOLOGÍA

PRESENTA: ROCÍO VALLE BAUTISTA

DIRECTORA: DRA. MARIA GUADALUPE FLORES CRUZ

REVISOR: DR. OCTAVIO CÉSAR GARCÍA GONZÁLEZ

SINODALES: DRA. MARTHA LILIA ESCOBAR RODRÍGUEZ

DRA. PILAR DURÁN HERNÁNDEZ

DRA. CORINNE JENNIFER MONTES RODRÍGUEZ

Ciudad de México, 2016





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Este trabajo se desarrolló en el laboratorio del Dr. Alfonso Escobar Izquierdo, en el Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México. Fue dirigida por la Dra. María Guadalupe Flores Cruz, con el apoyo económico de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico, UNAM. Proyecto PAPIIT IN2007510-3: “Efectos de la depuración farmacológica y dietaria de serotonina en el periodo prenatal sobre la estructura y función serotoninérgica” y el proyecto IN210113 “Participación del sistema serotoninérgico en el desarrollo cortical: migración neuronal, polaridad celular y mantenimiento del árbol dendrítico”

Agradecimientos

A la Universidad Nacional Autónoma de México, mi casa, un segundo hogar al que siempre regresaré. Por el conocimiento adquirido y las ganas de transmitirlo, infinitamente gracias.

A mi directora de tesis, la Dra. María Guadalupe Flores Cruz, por ser un ejemplo, por mostrarme el maravilloso mundo de las Neurociencias, por compartir experiencias de vida dentro y fuera del laboratorio, por creer en mí y sobre todo por formarme como investigadora.

A mi revisor el Dr. Octavio Cesar García Gonzáles, y a mis sinodales: Dra Martha Lilia Escobar Hernández, Dra. Pilar Duran Hernández, Dra. Corinne J. Montes Rodríguez, quienes dedicaron su tiempo a la lectura y revisión de esta tesis e hicieron los comentarios pertinentes a la misma.

A mi compañera de laboratorio Alma Delia Chávez Arrieta, por las experiencias compartidas, por el trabajo en equipo, por las dificultades experimentadas, pero sobre todo por el apoyo mutuo para continuar con nuestros respectivos proyectos.

Agradezco especialmente a mis padres Lidia Bautista Rivera y Vicente Valle Torres quienes me impulsaron desde niña para alcanzar mis metas y a no darme por vencida, por su amor y ejemplo de vida.

Dedicatorias

Con amor a Lidia y Vicente, mis papás, quienes me educaron en un hogar con valores, cariño y respeto, sin su apoyo y comprensión la realización de este trabajo no hubiera sido posible. Por todo, gracias.

A mis hermanos Male, Fernando y Sergio quienes me han acompañado toda la vida y junto a ellos he sido muy feliz, por aguantar mis malos ratos, pero sobre todo por los recuerdos compartidos y por el cariño recibido.

A Ramón Letipichia, por nuestras interminables discusiones sobre la ciencia, el amor, la música y la vida, por aparecer en el momento menos indicado, por esas reflexiones nocturnas, por tu pasión y determinación, por tu amor y entrega, por acompañarme en este camino y ser parte de mi vida, gracias.

A mis amigas de la facultad de psicología Ángel, Aketzali y Janin, mujeres excepcionales a quienes admiro profundamente y que me enseñaron diferentes maneras de ser y de sentir, por compartir la pasión por la ciencia y una amistad sin fronteras, las quiero.

A mis hermanos de la prepa 9, Aketzali, Alejandro, Rodrigo y Juan Manuel, por ser mis compañeros de vida, por su amistad y apoyo incondicional, por crecer juntos y seguir compartiendo experiencias, risas, miedos, alegrías y sobre todo ganas de vivir. Los quiero!!!

A Atza Salazar por brindarme su amistad, apoyo y compañía en los momentos difíciles, por ayudarme a realizar los dibujos de las neuronas, pero sobre todo por tu nobleza y cariño incondicional, gracias.

A mis amigos del museo UNIVERSUM, Atza, Marisela, Naye, Isela y Judith por brindar alegría y conocimiento a las personas que nos visitaban, por la maravillosa época que compartimos, pero sobre todo por ser un semillero de amor y esperanza.

A Isabel Romero Maldonado, por acompañarme durante la elaboración final de este trabajo, por escuchar mis disertaciones sobre el sistema serotoninérgico, por conservar la calma y siempre tener una sonrisa y una taza de té para mí, te quiero bonita.

TABLA DE ABREVIATURAS

AADC	Descarboxilasa de ácidos aromáticos
ADH	Deshidrogenasa de aldehídos
AVP	Ácido valpróico
CPP	Capa plexiforme primordial o preplaca
CR	Células de Cajal-Retzius
D-Trp	Dieta deficiente de triptófano
D+Trp	Dieta deficiente de triptófano + triptófano
E	Día embrionario
IZ	Zona intermedia
MAO	Oxidasa de monoaminas
MZ	Zona Marginal
NICD	Fragmento intracelular de Notch
OF	Open Field Test (Campo abierto)
P	Día postnatal
PCPA	Para-cloro-fenilalanina
PC	Placa cortical
RD	Núcleo del Rafe Dorsal
Sert	Transportador de serotonina
SNC	Sistema Nervioso Central
SP	Subplaca
TAL	Talidomida
Tph	Hidroxilasa de Triptófano
Trp	Triptófano
Vmat	Transportador vesicular de monoaminas
5-MT	5-metoxitriptamina
5-HT	Serotonina
5-HTP	5-hidroxitriptófano
5-HIAA	Ácido 5-hidroxindolacético

ÍNDICE

RESUMEN	- 4 -
1. INTRODUCCIÓN	- 5 -
1.1. Serotonina.....	- 5 -
1.2. Desarrollo embrionario del sistema serotoninérgico.....	- 6 -
1.3. Serotonina y neurodesarrollo	- 8 -
Proliferación.....	- 8 -
Diferenciación	- 9 -
Migración	- 9 -
Establecimiento de vías.....	- 10 -
1.4. Desarrollo cortical embrionario.	- 11 -
1.4.1. Células de Cajal-Retzius	- 13 -
1.4.2. Establecimiento de polaridad neuronal.....	- 15 -
1.5. Microdisgénesis cortical.....	- 16 -
1.6. Depuración de 5-HT	- 17 -
2. JUSTIFICACIÓN	- 20 -
3. OBJETIVOS	- 21 -
4. HIPÓTESIS	- 21 -
5. MÉTODO	- 22 -
5.1. Sujetos	- 22 -
5.2. Diseño experimental	- 22 -
5.3. Aparatos.....	- 23 -
6. PROCEDIMIENTO	- 24 -
6.1. Gestaciones.....	- 24 -
6.2. Dieta deficiente de triptófano/ dieta experimental (D-Trp)	- 24 -
6.3. Dieta deficiente de triptófano + triptófano / Control de dieta (D+ Trp)	- 24 -
6.4. Camadas.....	- 24 -
6.5. Sacrificios	- 24 -
6.6. Cromatografía Líquida de Alta Eficacia (HPLC).....	- 25 -
6.7. Tinción histológica Golgi – Cox modificada	- 25 -
6.8. Captura de fotomicrografías Golgi-Cox.....	- 26 -
6.9. Análisis conductual, prueba en campo abierto (<i>Open Field Test</i>)	- 27 -
7. RESULTADOS	- 28 -
7.1. Efecto de la privación dietética de triptófano sobre el peso corporal de las crías.....	- 28 -
7.2. Efecto de la privación dietética de triptófano sobre el peso cerebral de las crías	- 28 -
7.3. Efecto de privación dietética de triptófano sobre la cantidad de 5-HT central	- 29 -
7.4. Efecto de privación dietética de triptófano sobre la morfología de las neuronas piramidales del hipocampo.-	- 32 -
7.5. Efecto de privación dietética de triptófano sobre la morfología de las neuronas piramidales neocorticales ...-	- 37 -
7.6. Efecto de la privación dietética de triptófano sobre la conducta en campo abierto	- 41 -
8. DISCUSIÓN	- 44 -
9. CONCLUSIONES	- 51 -
10. REFERENCIAS	- 53 -
11. ANEXO I	- 61 -
12. ANEXO II	- 62 -

RESUMEN

La serotonina o 5-hidroxitriptamina (5-HT) aparece en el día embrionario (E) doce (E12) en el sistema nervioso central (SNC) de los roedores, por lo que se ha propuesto que actúa como una señal de desarrollo. Se sabe que al modificar la disponibilidad de 5-HT en distintos momentos del desarrollo, se afecta la maduración de los blancos del sistema serotoninérgico, entre ellos a la corteza cerebral (Cx).

Debido a que el triptófano (Trp) es el precursor de la 5-HT, en el presente trabajo se propuso estudiar el efecto que tiene administrar una dieta deficiente de Trp durante dos periodos críticos del desarrollo del sistema serotoninérgico de la rata: diferenciación (E8-E12) y establecimiento de vías primarias (E13-E17), sobre: 1) la cantidad de 5-HT presente en la Cx y en el tallo cerebral; 2) la morfología de las neuronas piramidales de la neocorteza y del hipocampo (arquicorteza) 3) el comportamiento de los roedores en la prueba de campo abierto.

La privación dietética de Trp en ambos periodos produjo: 1) la disminución en la concentración de 5-HT en el tallo cerebral en el día postnatal veinte (P20); 2) un mayor porcentaje de alteraciones en la polaridad de las neuronas piramidales de las cortezas motora y somatosensorial en P20 y P40; 3) un mayor número de alteraciones en el árbol dendrítico de las neuronas piramidales del hipocampo en P20 y P40 y 4) un aumento en la conducta de levantamiento vertical y en la producción de bolos fecales en el campo abierto en P40.

La privación prenatal de Trp generó a largo plazo alteraciones en la morfología de las neuronas piramidales, lo que sugiere que la 5-HT podría participar en la regulación de la migración neuronal durante la corticogénesis, así como en el mantenimiento del árbol dendrítico postnatal de las neuronas piramidales.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Serotonina

La serotonina o 5-hidroxitriptamina (5-HT), es una indolamina que se sintetiza a partir del aminoácido esencial triptófano (Trp). La 5-HT puede ser de dos tipos: el primer tipo o periférica que corresponde a la 5-HT que producen las células cromafines del intestino, las células neuroepiteliales de los pulmones y las células parafoliculares tiroideas, y el segundo tipo o central que corresponde a la 5-HT que producen las neuronas serotoninérgicas que integran al núcleo del Rafe Dorsal (RD) en el tallo cerebral. Cerca del 95% de la 5-HT total es periférica y se sintetiza y almacena en las células cromafines del intestino y únicamente el 2% corresponde a la 5-HT central (Jonnakuty *et al.*, 2008).

El Trp se obtiene únicamente de la dieta y se encuentra en alimentos como el huevo, la leche, los cereales integrales, etc., que son fuente natural de Trp. Una vez ingerido, el Trp es el sustrato de una cadena de reacciones enzimáticas que producen 5-HT. La hidroxilasa de triptófano (Tph, por sus siglas en inglés) es la enzima que se encarga de transformar al Trp en 5-hidroxitriptófano (5-HTP), esta enzima sólo se encuentra en las células productoras de 5-HT, por lo que se utiliza como marcador molecular de dicho linaje celular; finalmente la enzima descarboxilasa de aminoácidos aromáticos (AADC, por sus siglas en inglés) se encarga de transformar al 5-HTP en 5-HT (Jonnakuty *et al.*, 2008). **Fig. 1.**

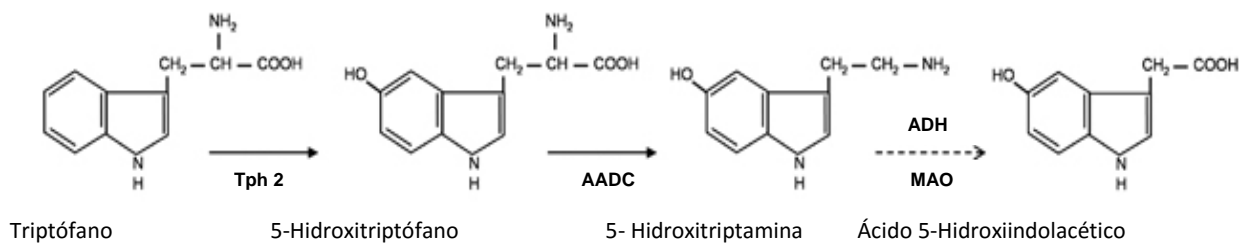


Figura 1. Síntesis central de serotonina. En el cerebro, el triptófano (Trp) es hidroxilado por la Tph tipo dos (Tph2), posteriormente, la enzima descarboxilasa de aminoácidos aromáticos (AADC) cataliza la descarboxilación del 5-Hidroxitriptófano (5-HTP) en 5-Hidroxitriptamina (5-HT). Las enzimas monoamino oxidasa (MAO) y aldehído deshidrogenasa (ADH) se encargan de degradar a la 5-HT en ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA). Modificado de Donkelaar, 2011.

La barrera hematoencefálica es impermeable a la 5-HT que se sintetiza en la periferia; sólo el Trp y el 5-HTP pueden atravesarla, de esta manera la síntesis central de 5-HT depende únicamente de la cantidad de Trp que esté disponible en la periferia (Fernstrom y Wurtman 1971; Biggio *et al.*, 1974; Partridge y Oldendorf, 1975).

La 5-HT central es un neurotransmisor que participa en la regulación de diferentes procesos biológicos esenciales durante la ontogenia del sistema nervioso central (SNC). El procesamiento sensorial, la regulación emocional, el control de respuestas autónomas y motoras son ejemplo de la participación serotoninérgica durante

la vida adulta. Sin embargo, la 5-HT está presente en etapas muy tempranas del neurodesarrollo, por lo que se sugiere participa en la regulación de diferentes eventos que ocurren en este periodo, como son: la proliferación, migración y diferenciación neuronal así como el establecimiento de sinapsis (Lesh *et al.*, 2012; Trakhtenberg *et al.*, 2012).

1.2. Desarrollo embrionario del sistema serotoninérgico

El sistema serotoninérgico es uno de los primeros sistemas de neurotransmisión en aparecer durante el desarrollo del SNC de los mamíferos. Las neuronas serotoninérgicas se distribuyen a lo largo del tallo cerebral en nueve núcleos conocidos como B1-B9 o núcleos del Rafe, que a su vez se dividen en dos porciones: rostral (B6-B9) y caudal (B1-B5). La porción rostral se integra por los núcleos dorsal y mediano, mientras que la porción caudal incluye los núcleos pálido, magno, oscuro y pontino (Dahlström y Fuxe 1964).

Los estudios realizados por Lidov y Molliver (1982), sobre el desarrollo del sistema serotoninérgico en roedores permitieron establecer que la ontogenia de este sistema puede dividirse en cuatro etapas con algunos traslapes temporales: 1) Día embrionario (E) E12-E17, es el periodo de diferenciación de las neuronas serotoninérgicas que coincide con la formación de los núcleos del RD, con un pico de proliferación entre el E13 y E14; 2) E13-E16 es el periodo de formación de vías primarias que concluye con la llegada de las fibras emergentes del RD a la porción más caudal del mesencéfalo; 3) E17-E21 en este periodo tiene origen la distribución selectiva de los haces serotoninérgicos que se extienden a lo largo del diencefalo hasta alcanzar el polo más frontal del telencefalo y (4) E21-día postnatal 21 (P21) es el periodo en el que ocurre la inervación y arborización de estructuras blanco, incluyendo la corteza cerebral y el hipocampo.

Las primeras neuronas serotoninérgicas adquieren el compromiso celular entre el E10 y el E12 en roedores, dicho evento está ligado con ciertas señales moleculares presentes en el neuropilo que inducen el fenotipo serotoninérgico. Durante la embriogénesis el rombencéfalo se divide en varios segmentos llamados rombomeras, las rombomeras 1, 2 y 3 dan origen a los núcleos serotoninérgicos rostrales, mientras que las rombomeras 5, 6 y 7 originan a los núcleos caudales (Gaspar *et al.*, 2003).

Una vez que se han especificado los precursores neuronales serotoninérgicos es necesaria la acción de factores que establecen el fenotipo neuroquímico, es decir que promueven la síntesis de la maquinaria enzimática para producir 5-HT. El factor de transcripción Pet-1 en combinación con otros factores como Nkx2.2 y Lmbx son necesarios y suficientes para inducir y mantener el fenotipo neuronal serotoninérgico (Hendricks *et al.*, 1999).

Pet-1 se expresa únicamente en las neuronas serotoninérgicas en el tallo cerebral y está relacionado directamente con la activación de los genes que codifican la maquinaria enzimática para metabolizar 5-HT: Tph2, AADC, el transportador de 5-HT (Sert) y el transportador vesicular de monoaminas (Vmat) (Hendricks *et al.*, 1999; Pfaar *et al.*, 2002).

En roedores, alrededor del E10 se observa que los precursores neuronales serotoninérgicos comienzan a expresar Pet-1, dichas neuronas aún no poseen el fenotipo característico de neurona serotoninérgica, en esta etapa

son células bipolares ovoides cuyos procesos se extienden de forma radial hacia las superficies ventricular y pial, es en este estadio cuando los precursores neuronales serotoninérgicos comienzan a migrar del ventrículo hacia la superficie pial mediante translocación somática (Hawthorne *et al.*, 2010). **Fig. 2.**

En el tallo cerebral en desarrollo, las neuronas que se originan en las rombomeras 1 a 3 se desplazan en dirección rostral para conformar a los núcleos B6-B9, mientras que las neuronas que se originan en las rombomeras 5 a 7 migran en dirección caudal para conformar a los núcleos B1-B5 (Wallace *et al.*, 1983; Lauder *et al.*, 1990). La migración de las neuronas que conforman a los núcleos B6-B9 comienza un día antes del desplazamiento de las neuronas que migran en dirección caudal (Lauder *et al.*, 1990).

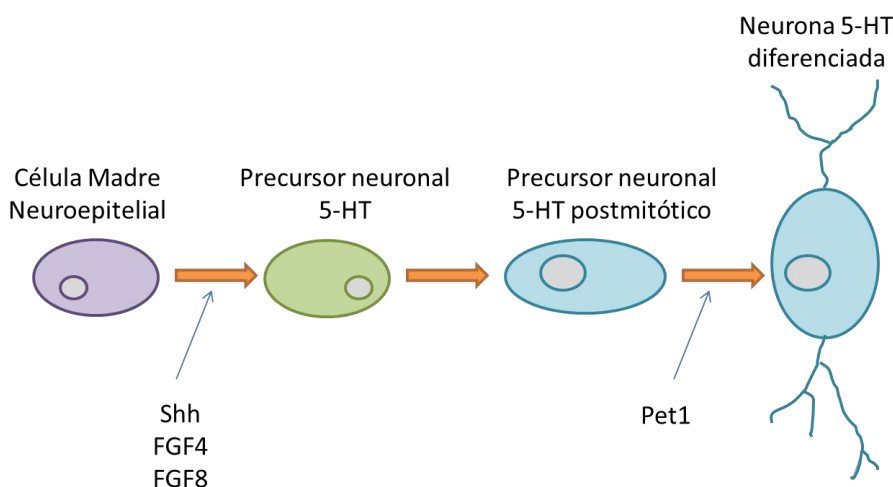


Figura 2. Factores intrínsecos y extrínsecos relacionados con la diferenciación de las neuronas serotoninérgicas. La especificación serotoninérgica requiere de la interacción de los factores de transcripción Shh, FGF4 y FGF8 que proporcionan las señales ambientales indispensables para inducir la especificación de los precursores neuronales serotoninérgicos. Pet-1 es un factor de transcripción específico de las neuronas productoras de serotonina y es necesario y suficiente para inducir y mantener dicho fenotipo neuronal. Modificado de Gordis *et al.*, 2002.

La llegada de los primeros precursores neuronales serotoninérgicos a la superficie pial coincide con la expresión de 5-HT por parte de los mismos, a partir del E12 se pueden observar en la línea media del rombencéfalo las primeras neuronas serotoninérgicas completamente diferenciadas. A partir de este momento tiene lugar la síntesis y liberación de 5-HT y también la mitosis final de dichas neuronas, eventos que ocurren antes del establecimiento de sinapsis maduras en el SNC. Las neuronas serotoninérgicas presentan su pico de proliferación en el E13 (Lauder *et al.*, 1974; Lauder *et al.*, 1990; Hawthorne *et al.*, 2010).

Entre el E12 y E14 las neuronas serotoninérgicas comienzan a desarrollar múltiples neuritas a partir del proceso pial (Hawthorne *et al.*, 2010). En el E14 las primeras fibras serotoninérgicas surgen de los núcleos rostrales en donde se aprecia la presencia del neurotransmisor a lo largo de toda la neurona, en el E16 el conjunto de fibras serotoninérgicas alcanza el mesencéfalo, en donde una porción se dirige hacia el telencéfalo por medio de la incorporación al haz prosencefálico medial, mientras que otro grupo asciende al telencéfalo a través de la cápsula

interna. La Cx (neocorteza) y el hipocampo (arquicorteza) son estructuras prosencefálicas que reciben aferentación prenatal por parte del sistema serotoninérgico a partir del E17 en rata (Lidov y Molliver 1982; Deng *et al.*, 2007).

En el caso de la corteza cerebral en el periodo E17-E21, los axones provenientes del RD ascienden en conjunto con el haz prosencefálico medial hasta la parte más basal del telencéfalo, en donde un primer conjunto de fibras forma dos bandas que recorren toda la superficie del polo frontal de la corteza, posteriormente estas fibras se extienden lateralmente hasta incluir una pequeña porción de la superficie cortical lateral. Un segundo grupo de fibras entra a la corteza lateral atravesando ventralmente la capsula interna y la eminencia ganglionar, finalmente un tercer grupo asciende ventralmente hacia la corteza distribuyéndose de manera radial en un patrón rostro caudal (Lidov y Molliver 1982).

Un haz de fibras serotoninérgicas diferente a los ya mencionados proyecta hacia la formación hipocámpica en este mismo periodo. En el hipocampo las fibras se distribuyen por ambos lados de las neuronas piramidales del campo CA1, adquiriendo una formación bilaminar semejante a la que se encuentra en la neocorteza (Lauder *et al.*, 1990).

En el E21 se observan las primeras fibras serotoninérgicas innervando al cerebelo, mientras que estructuras como el estriado, el núcleo supraquiasmático y la sustancia negra son blanco de innervación postnatal (Lidov y Molliver 1982; Jacobs y Azmitia 1992; Deng *et al.*, 2007).

1.3. Serotonina y neurodesarrollo

Debido a que la 5-HT está presente en el neuropilo a partir del E12 y a que el sistema serotoninérgico cuenta con la maquinaria para sintetizar 5-HT antes de que se establezcan sinapsis maduras, se ha propuesto que la 5-HT ejerce una función reguladora en el desarrollo de su propio sistema y también sobre la maduración de sus blancos tempranos. Procesos como la proliferación, diferenciación y migración celular, así como el establecimiento de vías primarias de las estructuras blanco, podrían verse afectados si se altera el sistema encargado de modular su correcto desarrollo (Gaspar *et al.*, 2003; Hornung *et al.*, 2003; Deng *et al.*, 2007; Vitalis *et al.*, 2013).

Proliferación

Uno de los primeros estudios en los que se depuró la 5-HT central para conocer el efecto que tiene dicha manipulación durante la proliferación celular, demostró que cuando se utiliza el fármaco paraclorofenilalanina (PCPA), que bloquea irreversiblemente a la Tph2, se produce una disminución en la tasa de división celular (Lauder y Krebs, 1978). Sin embargo, en un estudio similar en el que se privó al SNC de 5-HT del E12 al E17 utilizando el mismo fármaco no se encontraron diferencias en la tasa de proliferación de las neuronas corticales (Vitalis *et al.*, 2007).

Diferenciación

La diferenciación es un proceso en el cual una célula no especializada adquiere una morfología y una función particular que le permiten especializarse. Se ha descrito que la 5-HT participa en la diferenciación astrocítica a través del receptor 5-HT_{1A}.

En estudios realizados con cultivos celulares en los que se utilizó un agonista para el receptor 5-HT_{1A}, se encontró un incremento en la aparición de astrocitos maduros capaces de secretar la proteína S100 β , que está relacionada con el mantenimiento del árbol dendrítico y con la prevención de muerte celular. De esta manera se comprobó que la 5-HT participa en la diferenciación de las células astrocitarias (Whintaker-Azmitia *et al.*, 1986).

Migración

La migración neuronal se refiere al desplazamiento que emprenden las neuronas a partir de su sitio de origen hasta alcanzar su posición final en el SNC, dicho evento se efectúa antes de que las neuronas sufran cambios morfológicos y estructurales que las diferencien por completo. Se ha sugerido que la 5-HT desempeña un papel regulador sobre la migración de las mismas neuronas serotoninérgicas, por lo que se ha propuesto que la 5-HT modula el desarrollo de su propio sistema y también podría participar en la regulación del desarrollo de sus blancos tempranos actuando como una señal morfogénica (Vitalis *et al.*, 2013).

Miyazaki *et al.*, (2005), demostraron que al administrar ácido valpróico (AVP) y talidomida (TAL) en el E9, produce un aumento en la concentración de 5-HT en el cerebro embrionario de rata, lo que ocasiona cambios en la distribución de las neuronas serotoninérgicas a lo largo del RD, observándose una “caudalización” del núcleo, dichos cambios se atribuyen a un retraso en la maduración de las neuronas productoras de 5-HT durante el proceso de migración, ocasionados por la administración de TAL/AVP en un periodo crítico para el desarrollo del sistema serotoninérgico. Un estudio previo mostró que cuando el cerebro embrionario de rata es expuesto a etanol del E8 al E15, las neuronas serotoninérgicas permanecen en la línea media y en su mayoría no diferenciadas, mientras que las neuronas serotoninérgicas del grupo control migran en dirección lateral y dorsal hasta su posición final en donde adquieren el fenotipo característico de neuronas productoras de 5-HT en el E15 (Zhou *et al.*, 2001a).

Flores-Cruz y Escobar (2012), realizaron un estudio para conocer el efecto que tiene la administración crónica de una dieta deficiente de Trp durante la gestación sobre la ontogenia del sistema serotoninérgico en rata. Los resultados de este estudio señalan una disminución del 30% de las neuronas productoras de 5-HT en el RD, además de observar cambios en la distribución de dichas neuronas, presentándose una “rostralización” del núcleo. Al igual que Miyazaki *et al.*, Flores-Cruz y Escobar, señalan que los cambios en la arquitectura del núcleo del RD se deben a errores durante el proceso de migración neuronal, ya que cuando hay una concentración mayor de 5-HT las neuronas se distribuyen más caudalmente, en cambio cuando se les administra una dieta deficiente de Trp las neuronas serotoninérgicas se distribuyen más rostralmente.

Establecimiento de vías

La vía tálamo-cortical constituye la principal entrada de información sensorial en el SNC, y tiene como principal blanco de innervación prenatal a la corteza somatosensorial en mamíferos. La expresión de los receptores 5-HT_{1B} y 5-HT_{1D} para 5-HT en neuronas del tálamo dorsal coexiste con el inicio del establecimiento de la vía tálamo-cortical en el E14.5 (Bonnin *et al.*, 2006); a su vez, este evento coincide con la expresión de los receptores DCC y Unc5c para netrina-1, que es una molécula que se encarga de guiar o repeler el crecimiento axonal (Braisted *et al.*, 2000). En un estudio *in vivo* en el cual se manipuló la expresión de los receptores 5-HT_{1B} y 5-HT_{1D} de las neuronas dorsales del tálamo, muestra que la 5-HT modula la respuesta axonal de dichas neuronas a la señal emitida por netrina-1 mediante la disminución de AMPc intracelular en el E16.5 (Bonnin *et al.*, 2007). Los hallazgos anteriores permitieron comprobar que la 5-HT modula indirectamente el patrón de posicionamiento final de los axones tálamo-corticales en la corteza somatosensorial durante el desarrollo embrionario.

La corteza somatosensorial posee una representación uno a uno de las vibrisas faciales de los roedores, cada vibrisa está perfectamente representada en el mapa cortical por estructuras denominadas barriles en la capa IV de la corteza somatosensorial. Cada barril está constituido por una región de la corteza somatosensorial ampliamente inervada por aferencias tálamo-corticales y neuronas granulares posicionadas alrededor de dichas aferencias (Erzurumlu y Gaspar 2012).

La formación de barriles constituye un periodo crítico del desarrollo de los mapas sensoriales en roedores durante los primeros días posteriores al nacimiento P0-P4 (Vitalis *et al.*, 1998), durante este periodo SERT, 5-HT_{1B} y 5-HT_{1D} se expresan temporalmente en los axones tálamo-corticales (Persico *et al.*, 1998; Bonnin *et al.*, 2007). En ratones *knockout* para SERT o MAOA, en los cuales la concentración de 5-HT extracelular es elevada, la estructura de barriles no se forma, en cambio cuando se administra PCPA se rescata la formación de los barriles corticales (Cases *et al.*, 1996; Salichon *et al.*, 2001; Persico *et al.*, 2001), lo anterior sugiere que la síntesis y liberación de 5-HT por los axones provenientes del RD y la captura y almacenamiento transitorio del neurotransmisor por los axones de la vía tálamo-cortical son eventos críticos en la formación de la corteza somatosensorial y potencialmente de otras estructuras corticales (Lesch *et al.*, 2012).

La proteína S100 β es un homodímero que pertenece a una gran familia de proteínas de unión a calcio, denominada S100. En el cerebro de los mamíferos, el homodímero S100 β es un factor neurotrófico que es producido por los astrocitos y que se encarga del crecimiento y maduración de las dendritas, por lo que desempeña un papel importante en la plasticidad cortical (Whintaker-Azmitia *et al.*, 1990 y 1993).

Durante el desarrollo embrionario se observa la presencia de S100 β en células GFAP positivas del hipocampo en E18, y en P7 el 90% de los astrocitos también expresan al receptor 5-HT_{1A} de manera transitoria, pues en el P16 únicamente el 25% de los astrocitos expresan dicho receptor (Patel y Zhou *et al.*, 2005).

Estos antecedentes sugieren que la 5-HT regula el desarrollo neuronal de manera indirecta a través del receptor 5-HT_{1A} presente en los astrocitos, ya que se sabe que la estimulación farmacológica del receptor 5-HT_{1A}

produce la liberación de S100 β que a su vez promueve el crecimiento de las dendritas y la formación de sinapsis, y en este caso la co-localización temporal del receptor 5-HT_{1A} con S100 β coincide con el periodo de rápido crecimiento dendrítico y con la maduración de sinapsis (Whintaker-Azmitia *et al.*, 1990 y 1993; Patel y Zhou 2005).

Los efectos que S100 β tiene sobre la maduración de las dendritas, se deben a su interacción con el citoesqueleto. S100 β estabiliza a las proteínas asociadas a microtúbulo (MAP's) como Tau y MAP-2, inhibiendo su fosforilación. S100 β también inhibe la fosforilación de la proteína asociada al crecimiento GAP-43, lo que permite un aumento en el crecimiento y en la plasticidad de los conos de crecimiento (Whintaker-Azmitia *et al.*, 2001).

1.4. Desarrollo cortical embrionario.

La corteza cerebral es una estructura que se origina a partir del neuroepitelio dorsal del telencéfalo. Durante el desarrollo prenatal de la corteza se pueden distinguir cuatro estadios: 1) Formación de la capa plexiforme primordial (CPP); 2) Formación de la placa cortical (PC); 3) Morfología inicial común de las neuronas de la PC y 4) Maduración morfológica y funcional específica de las neuronas de la PC y estratificación ascendente (Marin-Padilla, 2001).

La laminación cortical comienza con la división de la pared telencefálica dorsal en dos regiones: la capa interna que contiene células progenitoras también llamada zona ventricular; y la capa externa conocida como la CPP. La CPP se origina entre el E11 y el E12 en roedores, y surge como resultado de la migración de las primeras neuronas postmitóticas provenientes de la zona ventricular (Supèr *et al.*, 1998; Bystron *et al.*, 2008).

La población neuronal que integra la CPP es la primera en diferenciarse y en recibir conexiones sinápticas antes de que comience la formación de otras capas corticales. Las células de Cajal-Retzius (CR) son de las primeras neuronas en diferenciarse en este estrato, por lo que se considera que forman una organización cortical primitiva que provee señales de posicionamiento para los neuroblastos recién formados, por lo que se ha sugerido que las células de CR solamente operan durante el desarrollo embrionario, ya que desaparecen dos semanas después del nacimiento (Bayer y Altman 1990; Marin-Padilla 2001; Soriano *et al.*, 2005).

A partir del E14 en rata, se originan otras dos capas por encima de la zona ventricular: la zona intermedia (IZ) y la PC. El desarrollo de la PC ocasiona que la CPP se divida en dos: zona marginal (MZ) y subplaca (SP). La MZ formará la capa I de la corteza adulta, mientras que la SP es una estructura temporal. En este estadio, la IZ alberga una cantidad reducida de neuronas polimórficas, mientras que la PC se origina como resultado de la migración ascendente de millones de neuroblastos a través de la glía radial (Supèr *et al.*, 2000).

Al comenzar la formación de la PC del E13 al E14 los neuroblastos corticales se originan a partir de la glía radial, mas tarde del E15 al E17 estos se originan a partir de células progenitoras intermedias derivadas de la glía radial. El periodo de migración neuronal en la corteza cerebral abarca del E13 al E17, durante esta etapa las neuronas piramidales se van colocando progresivamente en un patrón de "dentro hacia afuera" en la PC hasta conformar las capas II a VI de la corteza. El patrón de "dentro hacia afuera" se refiere a que las primeras neuronas

que se generan migran primero hasta poblar las capas más profundas, en cambio las que se generan más tarde migran a través de las capas ya existentes hasta conformar las capas superiores (Noctor *et al.*, 2004).

En el caso del hipocampo (arquicorteza), las neuronas piramidales de la región CA1 se originan cerca del subículo entre el E16 y el E17 con un pico de proliferación que tiene lugar entre el E18 y E19. En el E18 se observa que las neuronas piramidales se extienden hasta la porción media del estrato piramidal y en el E19 se aprecia el alineamiento de dichas neuronas así como la formación de la fimbria y de la fisura hipocámpica, en el E20 la proliferación celular disminuye hasta su punto más bajo y para el E21 el estrato piramidal está totalmente formado (Schlessinger *et al.*, 1978; Altman y Bayer 1990).

Al final de esta etapa, la PC es una capa compacta de neuronas indiferenciadas con una dendrita apical de longitud variable anclada en la ZM y aún sin contactos sinápticos. Todas las neuronas piramidales que forman la PC alcanzan la ZM por medio de la dendrita apical, de este modo establecen contacto con las células de CR. Las células de CR controlan la migración neuronal hacia la capa I, la disposición de dentro hacia afuera de las neuronas dentro de la PC y la morfología de las neuronas piramidales (Bayer y Altman *et al.*, 1990; Marin-Padilla *et al.*, 2001). **Fig. 3.**

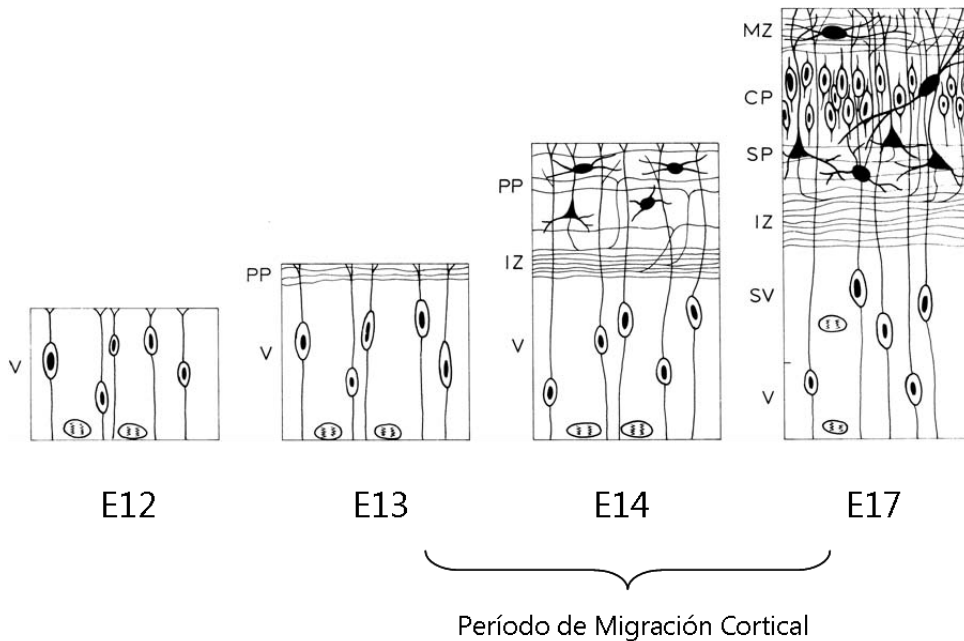


Figura 3. Desarrollo prenatal de la corteza cerebral en rata. Las células que se encargan de poblar a la neocorteza surgen del neuroepitelio dorsal del telencéfalo o zona ventricular (V), las primeras neuronas postmitóticas que alcanzan la superficie pial forman la preplaca (PP) o capa plexiforme primordial, las neuronas piramidales que pertenecen a las capas II-VI de la corteza cerebral adulta, emergen de la placa cortical (CP), dichas neuronas se generan y migran a partir de la PP hasta separarla en una capa superficial o zona marginal (MZ), que formará la capa I de la corteza cerebral adulta y que durante el desarrollo embrionario alberga a las células de Cajal–Retzius, y una capa profunda o subplaca (SP) que es una estructura temporal. Las células de la PP se generan primordialmente entre el E12 y el E14. En el E14 la superficie de la zona ventricular únicamente se compone del neuroepitelio y de la PP, la presencia de una CP rudimentaria se identifica por primera vez en el E15 en las regiones más maduras de la neocorteza. La neurogénesis cortical en rata termina en el E20. Abreviaturas: IZ zona intermedia; SV zona subventricular. Modificado de Uylings *et al.*, 1994.

La corteza cerebral y el hipocampo son estructuras prosencefálicas que reciben aferenciación prenatal por parte del sistema serotoninérgico entre el E16 y E17 en rata (Lidov y Molliver 1982), existe evidencia que indica que las neuronas corticales en desarrollo tienen receptores, transportadores y enzimas catabólicas para 5-HT cuya expresión coincide mayormente con la llegada de los haces serotoninérgicos al prosencéfalo basal, incluso existen reportes que indican la presencia de dichos elementos antes de este periodo (Vitalis y Parnavelas 2003). Debido a la concurrencia de los eventos anteriores se ha sugerido que la 5-HT podría desempeñar una función morfogénica sobre las neuronas piramidales de la corteza cerebral (Lauder *et al.*, 1990; Vitalis *et al.*, 2007) y el hipocampo (Zhang *et al.*, 2006) en desarrollo.

En un estudio en el que se evaluó el efecto del fármaco PCPA durante el periodo de migración neuronal de los roedores (E12-E17), se demostró que la depuración farmacológica de 5-HT altera la maduración estructural y la complejidad del árbol dendrítico de las neuronas piramidales ubicadas en las capas III y V de la corteza somatosensorial observándose un menor número de dendritas (Vitalis *et al.*, 2007), dichos cambios morfológicos en las neuronas piramidales coinciden con los que se observan en roedores cuando se administran dietas restringidas en Trp, el aminoácido precursor de la 5-HT. Se sabe que la restricción de Trp durante los primeros días del desarrollo postnatal genera una considerable disminución en los niveles de 5-HT, lo cual está relacionado con cambios en la morfología de neuronas presentes en el hipocampo, la amígdala, el giro dentado y la corteza prefrontal (Zhang *et al.*, 2006). Los cambios registrados en dichas neuronas incluyen una reducción significativa del número de dendritas, y en algunos casos también se ha observado tumefacción en los cuerpos celulares (Zhang *et al.*, 2006).

1.4.1. Células de Cajal-Retzius

La célula de CR es una neurona multipolar con varias dendritas horizontales y un axón del que irradian numerosas colaterales que se distribuyen por un territorio funcional circular que se expande progresivamente durante el desarrollo cortical. El axón terminal de las células de CR se expande a lo largo de toda la superficie del cerebro. Del axón y de sus colaterales emanan numerosas terminales cortas ascendentes y descendentes que establecen contactos funcionales con los penachos dendríticos de las células piramidales de todas las regiones y de todos los estratos corticales (Marin-Padilla 2001).

La importancia de las células de CR radica en que son la principal fuente de reelina durante el desarrollo de la Cx. La reelina es una proteína involucrada en la regulación de la migración neuronal durante el desarrollo embrionario (E13-E17), ya que la carencia de la misma produce el fenotipo “*reeler*” que se caracteriza por la inversión en el orden de migración de las neuronas corticales, es decir que las neuronas pierden el patrón de migración de dentro hacia afuera y se posicionan incorrectamente en la PC, por lo que se ha sugerido que la reelina desempeña una señal de “alto” para los neuroblastos migratorios durante la corticogénesis (D’Arcangelo *et al.*, 1995; Frotsher *et al.*, 1997).

La reelina es una glicoproteína que se une a los receptores membranales ApoER2 y VLDL-R formando un oligómero que desencadena una cascada de señales intracelulares que comienzan con la fosforilación (p) de la

proteína adaptadora Dab-1. pDab-1 activa a la familia de cinasas de tirosina SRK que a su vez estimulan otras cinasas y fosfatasas citosólicas, eventos que promueven la desfosforilación de la proteína Tau y la fosforilación de la proteína MAPB1. Tau y MAPB1 pertenecen a la familia de proteínas asociadas a microtúbulo que después de ser activadas promueven el crecimiento axonal, el crecimiento de las espinas dendríticas y la formación de sinapsis (Lakatosova y Ostatnikova 2011).

Tanto en el hipocampo como en la Cx, los haces serotoninérgicos establecen contactos primitivos con las células de CR ubicadas en la zona marginal, antes de que la migración neuronal termine en el E16 (Janušonis *et al.*, 2004), y dado que estas neuronas regulan la migración de las neuronas piramidales a través de la secreción de rielina, se ha sugerido que la 5-HT podría participar indirectamente en el proceso antes mencionado a través de la regulación de las células de CR. **Fig. 4**

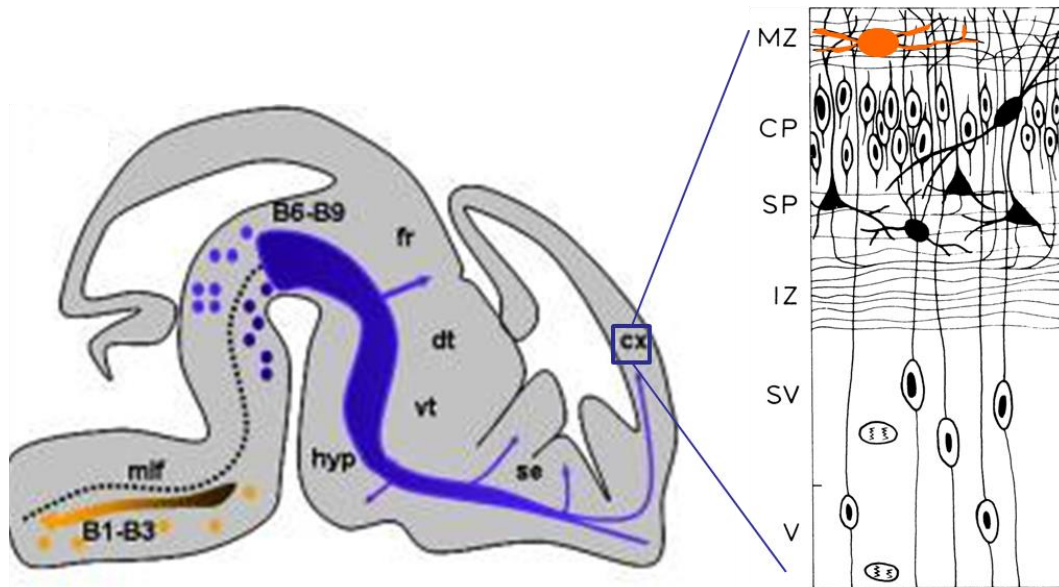


Figura 4. Migración cortical y sistema serotoninérgico. La llegada de los axones serotoninérgicos provenientes del núcleo del RD (B6-B9) a la zona marginal, ocurre en paralelo con la migración de las neuronas piramidales corticales, durante este periodo (E15-E16) los axones serotoninérgicos establecen contactos primitivos con las células de CR (en naranja), que son las células encargadas de dirigir la migración de las neuronas piramidales por medio de la secreción de la glicoproteína rielina. Se sabe que la 5-HT activa a los receptores 5-HT_{3A} que se localizan en las células de CR, lo que induce que dichas células secreten rielina, de esta manera el sistema serotoninérgico podría estar participando indirectamente en la regulación de la migración de las neuronas piramidales por medio del contacto establecido con las células de CR durante la corticogénesis. Abreviaturas *mif* fascículo medial longitudinal; *fr* fascículo retroflexus; *dt* tálamo dorsal; *vt* tálamo ventral; *hyp* hipotálamo; *se* septum; *cx* corteza; *MZ* zona marginal; *CP* placa cortical; *SP* subplaca; *IZ* zona intermedia; *SV* zona subventricular; *V* zona ventricular. Modificado de Uylings *et al.*, 1994 y de Vitalis *et al.*, 2013.

Janušonis *et al.*, (2004), demostraron que durante la embriogénesis tardía, la secreción de rielina está controlada en parte por la concentración de 5-HT presente en el SNC, ya que si se administra 5-metoxitriptamina (5-MT) que es un agonista serotoninérgico, se observa reducción en la cantidad de rielina circulante en sangre en P0, en el mismo trabajo se observó que la organización columnar de la corteza presubicular dependiente de rielina, se pierde en las crías tratadas con 5-MT durante la gestación.

Cerca del 80% de las células de CR expresan el receptor 5-HT_{3A} en P0 y su activación es suficiente para producir potenciales de acción en las células de CR, por lo que se ha sugerido que mediante la estimulación del receptor 5-HT_{3A} la 5-HT regula la secreción de rielina (Chameau *et al.*, 2009).

En un trabajo realizado por Flores-Cruz (2012), se demostró la presencia del receptor 5-HT_{1A} en las células de CR. El receptor 5-HT_{1A} es de tipo metabotrópico acoplado a una proteína G inhibitoria (G_i) que al ser activada disminuye la actividad de la adenilato ciclasa, de esta manera también se disminuye la producción de adenosín monofosfato cíclico (AMP_c), lo cual se asocia con la disminución de la actividad metabólica de la neurona. En dicho estudio se depuró al sistema de 5-HT con una dieta deficiente de Trp que se administró de manera crónica a ratas gestantes, los resultados muestran un aumento en la expresión de rielina, lo que permitió concluir que al disminuir la cantidad de 5-HT, la estimulación a los receptores 5-HT_{1A} sería menor, de esta manera las células de CR secretarían mayor cantidad de rielina al no ser inhibidas por el sistema serotoninérgico. En el mismo trabajo se observaron alteraciones en la migración de las neuronas piramidales en el hipocampo, al igual que en el establecimiento de polaridad de las neuronas piramidales corticales de las crías del grupo de dieta deficiente de Trp.

1.4.2. Establecimiento de polaridad neuronal

Una de las principales características de la corteza cerebral de los mamíferos es su formación laminar, la neocorteza está compuesta por seis capas con características citoarquitectónicas únicas atribuidas a las neuronas piramidales y no piramidales que la conforman. Las neuronas no piramidales que integran a la neocorteza representan entre el 15 y 30% de las neuronas corticales, la mayoría de las neuronas no piramidales forman circuitos locales que contribuyen con el procesamiento de información intracortical (Marin-Padilla 2001).

Las neuronas piramidales son el principal tipo celular que se encuentra en la corteza cerebral, ya que se localizan en casi todas las capas a excepción de la capa I. Las neuronas piramidales son células excitatorias que contribuyen con la transmisión y procesamiento de información proveniente de estructuras subcorticales y de otras áreas corticales. De los dos tipos de células que componen a la Cx, las neuronas piramidales son células con estructuras altamente polarizadas, la característica principal de dichas neuronas es que poseen una única dendrita apical que se extiende por encima del soma hasta alcanzar la capa I o MZ, múltiples dendritas basales y un solo axón que se extiende de la base del soma hasta la superficie ventricular (Marin-Padilla 2001).

El establecimiento de polaridad neuronal es un evento crucial durante el desarrollo del SNC, la polarización neuronal se refiere a los cambios morfológicos que sufre una neurona después de migrar a su posición final para desarrollar dos estructuras celulares completamente distintas tanto en forma como en funcionalidad: el axón y las dendritas, que le permitirán establecer conexiones funcionales (Arimura *et al.*, 2007).

Los estudios realizados por Dotti *et al.*, (1988), en donde se caracterizó el desarrollo de la polarización celular *in vitro* utilizando neuroblastos provenientes del hipocampo en el E18, permitieron establecer por vez primera que dicho proceso puede dividirse en cinco etapas: 1) Formación de pequeñas protusiones en la periferia

del soma (lamelipodio); 2) Surgimiento de las primeras neuritas inmaduras a partir de los conos de crecimiento del lamelipodio; 3) Formación y desarrollo del axón a partir del crecimiento acelerado de una de las neuritas inmaduras, dicho evento termina con la simetría de la etapa 2 y establece la polaridad celular; 4) Crecimiento de las dendritas a partir de las neuritas restantes, posterior al surgimiento del axón y 5) Formación de contactos sinápticos entre las espinas dendríticas y los axones.

Un estudio *in vivo* demostró que el establecimiento de la polaridad celular en las neuronas piramidales se determina cuando los neuroblastos postmitóticos poseen una morfología bipolar y migran hacia su posición final en la placa cortical, es decir que en un principio existe un mecanismo intrínseco que define el surgimiento del axón a partir de una de las dos neuritas primarias que el neuroblasto utiliza para desplazarse a través de la glía radial, dicha especificación se produce antes de que los neuroblastos migratorios alcancen la placa cortical, esto es en la IZ (Calderon de Anda *et al.*, 2008).

El receptor transmembranal Notch al ser activado por sus ligandos Delta y Serrato (Jagged en mamíferos), sufre transformaciones proteolíticas que culminan con la generación de dos fragmentos de la proteína Notch, el fragmento intracelular (NICD) se traslada al núcleo en donde actúa como un factor de transcripción al unirse a las proteínas CSL adaptadoras Rbpj o CBF-1. Durante el desarrollo del SNC, la vía de señalización de Notch participa en la regulación de la neurogénesis, la apoptosis y la morfología dendrítica (Louvi y Artavanis-Tsakonas 2006).

Un estudio realizado en 2008 demostró que tanto en ratones *reeler* como en ratones carentes de NICD, los neuroblastos postmitóticos de la corteza cerebral exhiben procesos primarios ectópicos que incluyen dendritas mal orientadas así como múltiples procesos protruyendo desordenadamente del soma durante el periodo de migración, debido a lo anterior sugirieron que tanto la morfología como la migración de los neuroblastos postmitóticos en la corteza cerebral están reguladas por la interacción de rielina y Notch, dicha hipótesis se comprobó cuando se logró rescatar el fenotipo dendrítico normal migratorio de las neuronas del ratón *reeler* sobre-expresando NICD. El mecanismo molecular sugerido para la interacción rielina-Notch indica que la rielina puede modular los niveles del fragmento NICD por medio de la degradación ubiquitina-proteosoma mediante la proteína efectora Dab1 (Hashimoto-Torii *et al.*, 2008).

1.5. Microdisgénesis cortical

La fisiopatología de varios desórdenes neurológicos que se originan durante el desarrollo embrionario puede atribuirse a errores en la señalización de los sistemas de neurotransmisión presentes durante la corticogénesis, incluso se sabe que si se altera un sistema de neurotransmisión en un periodo crítico para el desarrollo de sus blancos, dicho evento puede afectar la maduración de los blancos (Levitt *et al.*, 1997). En este sentido, el sistema serotoninérgico es uno de los primeros sistemas de neurotransmisión en aparecer durante la ontogenia del SNC en el E12, y sus aferencias arriban a la corteza cerebral en el E15, evento que coincide con el periodo de migración de las neuronas piramidales corticales (Lidov y Molliver *et al.*, 1982; Supèr *et al.*, 2000). Cabe mencionar que durante el desarrollo cortical embrionario la 5-HT no actúa como un neurotransmisor clásico puesto que aún no hay sinapsis establecidas, lo que permite hipotetizar que durante el periodo de migración cortical,

la 5-HT podría modular el desarrollo de ciertos procesos histogenéticos de las neuronas piramidales tales como el acomodo final de dichas neuronas en sus capas correspondientes por medio de la regulación de las células de CR y su posterior polarización que incluye el desarrollo de una única dendrita apical direccionada hacia la zona marginal y múltiples procesos basales orientados hacia los ventrículos (Whitaker-Azmitia *et al.*, 2001; Vitalis y Parnavelas 2003; Janušonis *et al.*, 2004).

En la tabla I se resumen algunos hallazgos que demuestran que la 5-HT interviene en el establecimiento del árbol dendrítico de las neuronas piramidales en diferentes periodos dentro del desarrollo cortical, dichos hallazgos evidencian que si se modifica el funcionamiento normal de un sistema de neurotransmisión, en este caso el sistema serotoninérgico, durante periodos específicos en el desarrollo de la corteza cerebral, se puede alterar la formación del árbol dendrítico de las neuronas piramidales, lo que podría propiciar un mal funcionamiento en los circuitos que lleguen a establecer estas neuronas durante la ontogenia.

1.6. Depuración de 5-HT

En la actualidad existen diferentes métodos para disminuir la concentración de 5-HT en el SNC, dichos procedimientos se utilizan para estudiar los procesos fisiológicos en los que se considera que participa la 5-HT.

Históricamente se han empleado dietas deficientes de Trp (D-Trp) con la finalidad de disminuir la síntesis de 5-HT central. A partir de 1970 se demostró que la función cerebral podría ser influida por la disponibilidad de varios nutrientes presentes en la dieta. Gessa *et al.*, (1974) demostraron por primera vez que la administración aguda de una mezcla de aminoácidos carente de Trp, reduce la concentración sérica de Trp y que dicho fenómeno se relaciona directamente con la disminución en el nivel de Trp, 5-HT y 5-HIAA cerebral.

Cabe mencionar que tanto en los roedores como en el humano, una vez que el Trp se ingiere puede circular en la sangre de forma libre o unido a la albúmina; la forma libre representa del 10 al 20% del total de Trp ingerido. El porcentaje de Trp libre o unido a la albúmina depende de tres factores: 1) la tasa de lipólisis; 2) la actividad de la pirrolasa de Trp hepática, que es la principal enzima responsable de regular los niveles circulantes de Trp y que determina tanto el flujo de la ruta de la quineurina, como el nivel de Trp remanente disponible para la síntesis central de 5-HT y; 3) la tasa de captura de Trp en tejido central o periférico (Chaouloff, 1993).

Uno de los mecanismos por el que la administración de una D-Trp, disminuye la concentración de Trp plasmático y consecuentemente el Trp cerebral y la síntesis de 5-HT fue sugerido por Gessa *et al.*, (1975). Estos investigadores postularon que la síntesis de proteínas es el principal mecanismo por el que se genera la depuración de Trp en sangre. Los aminoácidos que se consumen en la dieta favorecen la síntesis de proteínas en los tejidos, por lo tanto, el Trp extracelular libre es utilizado para la síntesis de proteínas, evento que reduce la concentración del Trp sistémico.

Para verificar la suposición anterior, se realizó un estudio en el que se evaluó el efecto de suministrar un inhibidor de la síntesis de proteínas previo a la administración de una D-Trp, los resultados mostraron que en esta condición se previene la depuración de Trp plasmático que normalmente induce la D-Trp (Rahman *et al.*, 1982).

Otro mecanismo que contribuye con la reducción del Trp cerebral después de la ingesta aguda de una D-Trp, es que el Trp compite con los aminoácidos de cadena larga como valina, leucina e isoleucina por el transportador de aminoácidos tipo L para atravesar la barrera hematoencefálica, ésta es impermeable a la 5-HT periférica, por lo que la cantidad de 5-HT cerebral depende de la cantidad de Trp disponible en la periferia (Oldendorf, 1971; Yunwiler *et al.*, 1977).

González-Burgos, *et al.*, (1996), reportaron que la administración de una D-Trp durante el desarrollo postnatal, produjo cambios plásticos en el patrón de arborización dendrítica de las neuronas piramidales en la corteza frontal. Las neuronas piramidales del grupo experimental presentaron una menor arborización apical en P40 y procesos apicales más alargados con un mayor número de espinas dendríticas en P60. Los resultados sugieren los niveles de Trp y 5-HT podrían modular la citoarquitectura de las neuronas piramidales durante el desarrollo y que la D-Trp produce cambios en el patrón de arborización dendrítica.

Por otro lado también se ha descrito que la restricción de Trp durante los primeros días de nacimiento, genera cambios en la morfología de las neuronas piramidales de la región CA3 del hipocampo, incluyendo la reducción del número de dendritas (Zhang *et al.*, 2006).

Flores-Cruz (2012), al generar una privación crónica de Trp durante toda la gestación, encontró que en la corteza somatosensorial, las neuronas piramidales presentaron defectos en la polaridad neuronal, es decir, en la disposición de sus procesos dendríticos. Debido a que también se observó que la expresión de rielina y Notch1 en los animales privados de Trp durante la gestación fue mayor, se sugirió que los desarreglos citoarquitectónicos en la corteza somatosensorial podrían explicarse por la alteración en la señalización de dichas moléculas.

Tipo de Manipulación	Periodo	Señal de 5-HT	Estructura	Descripción	Referencia
Inhibición Farmacológica (PCPA)	E12-E17	↓	Neuronas Piramidales de las capas III y V de la Corteza Somatosensorial.	Reducción del árbol dendrítico. Reducción en la complejidad del árbol dendrítico.	Vitalis <i>et al.</i> , 2007
Genética 5-HT _{3A} Knockout	P0	↓	Neuronas piramidales de las capas II y III de la corteza.	Incremento del árbol dendrítico apical.	Chameau <i>et al.</i> , 2009
Genética 5-HT _{1A} Knockout	P14-P35	↓	Neuronas piramidales del la región CA1 del hipocampo	Incremento del número de dendritas apicales proximales.	Ferreira <i>et al.</i> , 2010
Inhibidores Selectivos de la Recaptura de 5-HT (ISRS) Fluoxetina	E8-E18	↑	Neuronas piramidales de las capas II y III de la Corteza Somatosensorial	Reducción del árbol dendrítico apical.	Smit-Rigter <i>et al.</i> , 2012
	P0-P6		Neuronas piramidales de la capa IV de la corteza somatosensorial en la región de barriles.	Reducción del árbol dendrítico. Dendritas de menor longitud. Reducción en la complejidad del árbol dendrítico Disminución del número de espinas dendríticas.	Lee <i>et al.</i> , 2009
Depuración Dietética de Trp	P0-P28	↓	Neuronas piramidales de la región CA1 del hipocampo.	Reducción del árbol dendrítico. Disminución del número de espinas dendríticas	Zhang <i>et al.</i> , 2006

Tabla I. Efectos de la manipulación del sistema serotoninérgico en diferentes periodos del desarrollo cortical sobre la morfología de las neuronas piramidales.

2. JUSTIFICACIÓN

El correcto desarrollo del SNC requiere que múltiples eventos celulares ocurran integralmente en un tiempo y espacio determinados. El sistema serotoninérgico tiene un origen temprano durante la ontogenia del SNC, se sabe que la 5-HT regula la migración de las propias neuronas serotoninérgicas (Miyazaki *et al.*, 2005, Flores-Cruz y Escobar 2012) y que participa indirectamente en el establecimiento de la vía tálamo cortical (Bonin *et al.*, 2007) durante el desarrollo embrionario. También se sabe que la presencia de 5-HT es necesaria para la formación de los barriles corticales durante los primeros días posteriores al nacimiento (Cases *et al.*, 1996; Salichon *et al.*, 2001; Persico *et al.*, 2001), dicha formación representa un periodo crítico en el desarrollo de los mapas sensoriales de la corteza somatosensorial (Vitalis *et al.*, 1998).

La alteración prenatal del sistema serotoninérgico puede afectar periodos críticos en el desarrollo de los blancos tempranos de inervación, como son la migración y el establecimiento de la polaridad celular en las neuronas piramidales del hipocampo (arquicorteza) y de la neocorteza, por lo que se ha sugerido que la 5-HT desempeña un papel morfogénico durante el desarrollo de sus blancos, en este sentido el estudio del desarrollo del sistema serotoninérgico permite evaluar que tanto afectan las alteraciones realizadas a un sistema de neurotransmisión en el desarrollo de sus blancos y en su caso si dichas afecciones dependen del momento en el que se produce la alteración al sistema.

Debido a que se desconoce la susceptibilidad del sistema serotoninérgico a la privación dietética de Trp en diferentes periodos críticos del desarrollo de este sistema de neurotransmisión, y debido a que se ha involucrado a la 5-HT con la regulación de algunos procesos que guían el establecimiento y acomodo final de las neuronas piramidales corticales, en la presente tesis se caracterizó el efecto que tiene administrar una dieta libre de Trp durante los periodos de proliferación y establecimiento de vías primarias del sistema serotoninérgico sobre la morfología y estructura final de las neuronas piramidales del hipocampo (arquicorteza) y de la neocorteza en la rata.

3. OBJETIVOS

Objetivo General

Caracterizar el efecto que tiene la depuración prenatal de 5-HT en diferentes periodos del desarrollo del sistema serotoninérgico en la rata utilizando una dieta deficiente de triptófano, sobre la morfología de las neuronas piramidales corticales.

Objetivos Específicos

- Estudiar el efecto que tiene la administración de una dieta deficiente de triptófano durante los periodos de diferenciación (E8-E12) y establecimiento de vías primarias (E13-E17) del sistema serotoninérgico sobre:
 - La cantidad de 5-HT presente en los días P0, P20 y P40 en tallo y corteza cerebral.
 - La morfología de las neuronas piramidales del hipocampo (arquicorteza) y neocorteza en los días P20 y P40.
 - La conducta en campo abierto de las ratas juveniles (P40) bajo las condiciones de luz tenue y luz intensa en cada caso.

4. HIPÓTESIS

H1: La depuración prenatal de triptófano durante el periodo de diferenciación (E8-E12) y establecimiento de vías primarias (E13-E17) del sistema serotoninérgico disminuirá la concentración de 5-HT presente en la corteza y tallo cerebral.

H2: La depuración prenatal de triptófano durante el periodo de establecimiento de vías primarias (E13-E17) del sistema serotoninérgico ocasionará un mayor número de alteraciones en la morfología de las neuronas piramidales de la corteza cerebral.

H3: En caso de encontrarse alteraciones en la morfología de las neuronas piramidales de la corteza cerebral en los roedores sometidos a depuración prenatal de triptófano durante los periodos de diferenciación (E8-E12) y establecimiento de vías primarias (E13-E17) del sistema serotoninérgico, podrían observarse alteraciones conductuales en la prueba de campo abierto.

5. MÉTODO

5.1. Sujetos

Se utilizaron 54 ratas hembra nulíparas de la cepa Wistar con un peso de 250g., con sus respectivas camadas, repartidas aleatoriamente a cada una de las condiciones experimentales. Las hembras se obtuvieron del bioterio del Instituto de Investigaciones Biomédicas (IIB) UNAM. Las madres y sus crías permanecieron alojadas en el bioterio de la institución antes mencionada bajo condiciones de luz /oscuridad de 12 horas (la luz se encendía a las 6:00 am), temperatura (20-22°C) y humedad (45-55%) constantes. El alimento y el agua para todos los roedores durante el experimento fue *ad libitum*, de acuerdo a su condición experimental. Las manipulaciones aquí descritas fueron aprobadas por la Comisión de Bioética para la Investigación en Animales del IIB.

5.2. Diseño experimental

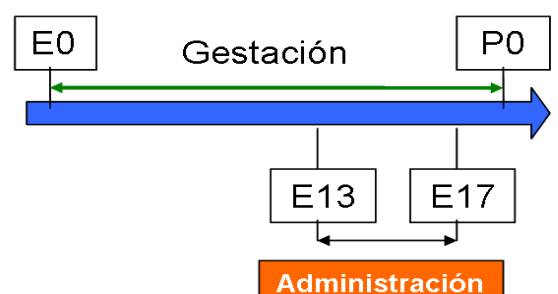
Dieciocho ratas gestantes fueron distribuidas en dos grupos para ser alimentadas con diferentes tipos de dieta: el grupo (D+Trp) fue alimentado con una dieta deficiente de triptófano a la que se le añadió triptófano y el grupo (D-Trp) fue alimentado con una dieta deficiente de triptófano. Las dietas se administraron en diferentes ventanas temporales durante la gestación de acuerdo a los periodos de diferenciación (E8-E12) y establecimiento de vías (E13-E17) del sistema serotoninérgico.



*Diferenciación



*Establecimiento de Vías



5.3. Aparatos

Para histología:

- Bomba de Perfusión
- Sonicador
- Centrifuga
- Balanza
- Micrótopo
- Microscopio
- Camara CCD-coupled charged device AxioCam MRC (Carl Zeiss)
- Escáner

Para cuantificación de serotonina:

- Cromatógrafo de detección flourométrica (Waters Co. Milford, Mass)
- Columna analítica de fase reversa de 4.6mmx100mm 100mmHypersil 116 100^oA ODS (tamaño de partícula: 3 μ m, Evolution)

Para Evaluación Conductual:

- Cámara (Digimax S600, Samsung)
- Campo Abierto (caja elaborada con acrílico 90x90x40 con piso cuadrulado 10cm x cuadro, color blanco)
- Foco 500W

Software:

- Image J 1.47v (Wayne Rasband , National Institutes of Health , USA)
- SPSS 20 para Windows
- Photoshop
- GraphPad Prism 6

Materiales

- Caseína hidrolizada C2 (19582, Organotechnie)
- Kit FD Rapid GolgiStain (PK 401 FD NeuroTechnologies)
- Kit de cuantificación de proteínas (RCDCProtein Assay, BIO-RAD)

6. PROCEDIMIENTO

6.1. Gestaciones

Se colocó un grupo de cuatro hembras con un macho sexualmente maduro dentro de una caja-habitación para que cohabitaran durante la fase oscura, a la mañana siguiente se realizó un frotis vaginal para determinar la concepción. Se consideró como día embrionario 0 (E0) el día que se encontraron espermatozoides y células cornificadas en el frotis vaginal (Marcondes *et al.*, 2002). Se siguió el procedimiento descrito con todas las hembras designadas para gestación independientemente del grupo experimental al que fuesen designadas. Una vez que se determinó la concepción, las hembras fueron separadas del macho y colocadas en grupos de dos habitantes por caja y se transfirieron a una caja individual en el E20 para esperar el parto.

6.2. Dieta deficiente de triptófano/ dieta experimental (D-Trp)

Se utilizó una dieta libre de Trp modificada por Flores-Cruz y Escobar (2012), para llevar a cabo la depuración de 5-HT (**Anexo I**). Se elaboraron pellets cuya fuente de proteína fue la caseína hidrolizada (19582, Organotechnie), al desnaturalizar la caseína con el procedimiento de hidrólisis ácida se consigue eliminar el Trp sin afectar la disponibilidad de los otros aminoácidos. La aclaración plasmática de Trp tarda aproximadamente dos horas a partir del consumo de la D-Trp en ratas gestantes, de esta manera se impide la disponibilidad de Trp para las crías (Blazek y Shaw 1978).

6.3. Dieta deficiente de triptófano + triptófano / Control de dieta (D+Trp)

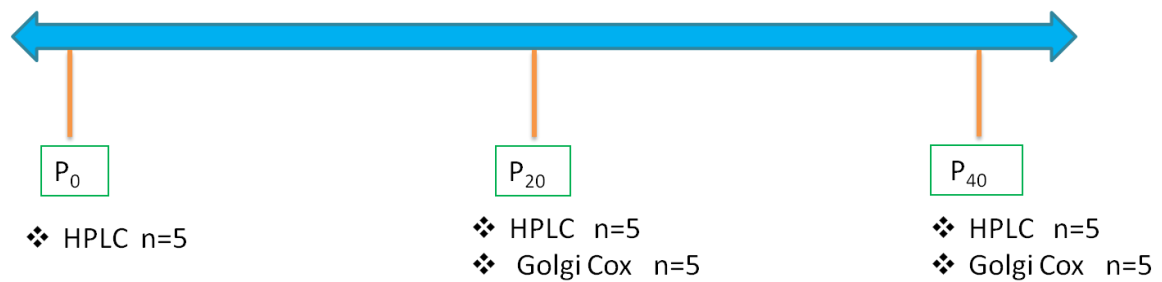
Los componentes de esta dieta fueron los mismos que se utilizaron en la D-Trp, solo que esta vez se añadió proporcionalmente la cantidad de Trp correspondiente, de acuerdo a la tabla de nutrientes presentes en la dieta Harlan Teklad Global 19% Protein Extruded Rodent Diet 2019S, Teklad (**Anexo II**).

6.4. Camadas

Al nacimiento, las camadas fueron estandarizadas aproximadamente a 8 crías (debido a los sacrificios efectuados en P0). Las crías permanecieron sin manipulación y con su madre durante toda la lactancia. Se separaron hembras y machos después del destete en el P21.

6.5. Sacrificios

Los sacrificios se realizaron en los días P0, P20 y P40 con la finalidad de obtener el tejido necesario para llevar a cabo los siguientes procedimientos: HPLC (n =5), y tinción argéntica de Golgi-Cox (n= 5) por grupo.



6.6. Cromatografía Líquida de Alta Eficacia (HPLC)

Con la finalidad de conocer la concentración de 5-HT cerebral, esta se cuantificó utilizando la técnica de HPLC con sistema de detección UV. Se sacrificó a las crías con pentobarbital sódico (Anestosal, Smith Kline; 0.063 g/1ml, c.b.p.), posteriormente se realizó una perfusión transcardiaca con amortiguador de fosfatos-salina (PBS 0.1M), a una velocidad de 0.9mL/min para P₀ durante 3 min, 1.7 mL /min para P₂₀ y 2mL/min para P₄₀, ambas durante 5 min. Las crías fueron decapitadas y su cerebro rápidamente removido para ser homogenizado en 300 μ L de ácido perclórico con EDTA al 0.05 % (w/v) (4 pulsos de 15 seg. en el sonicador). Se utilizó el cerebro completo en el caso de P₀ y en las edades P₂₀ y P₄₀ la corteza y el tallo cerebral por separado. Una vez homogenizado el tejido se centrifugó a 12 000 rpm durante 20 min a 4°C, se colectó el sobrenadante y se repitió el centrifugado y recolección de la muestra. Se recolectó el sobrenadante de las muestras y se pasó por papel filtro de 0.22 μ m (Millipore), la concentración de proteína fue determinada antes de que se inyectara la muestra en el sistema HPLC (Waters Model 474 scanning fluorescence detector; Waters). Se utilizó una columna analítica 4.6mm x 100mm Hypersil ODS (3- μ m particle size; Evolution) de fase reversa (2000 psi, 0.8ml/ min). La columna fue eluida con una fase móvil consistente en 50mM de acetato de amonio al 90% pH 3.5 y acetonitrilo al 10%, se inyectó un volumen de muestra de 10 μ L, con un flujo de fase móvil de 1.0mL/min La 5-HT fue detectada con un detector UV (Waters Co, Milford, Mass) con excitación y emisión de longitudes de onda de 270 y 345nm respectivamente. La cuantificación de 5-HT se realizó obteniendo la razón entre el área bajo la curva del pico estándar (5-hydroxytryptamine hydrochloride) y el área bajo la curva del pico observado en la muestra. La concentración de 5-HT se expresó como μ g de 5-HT/ μ g de proteína.

6.7. Tinción histológica Golgi–Cox modificada

Para evaluar la morfología y estructura final de las neuronas piramidales en la neocorteza y en el hipocampo (arquicorteza), se realizó la tinción de Golgi-Cox (FD Rapid GolgiStain Kit, FD Neurotechnologies). Se sacrificó y extrajo el cerebro de las crías en P₂₀ y P₄₀. Se sacrificó intraperitonealmente con pentobarbital sódico (Anestosal, Smith Kline; 0.063 g/ 1 ml, c.b.p.gi), se extrajo el cerebro rápidamente, se lavó en PBS a 4°C y se retiraron las meninges. El cerebro fue dividido en tres fragmentos coronales de 5mm de ancho y se colocó en la solución de impregnación del Kit, la cual se renovó después de haber transcurrido 12 h. El tejido cerebral se almacenó en la solución de impregnación durante 2 semanas a temperatura ambiente y se protegió de la luz, después de este periodo, se transfirió a la siguiente solución indicada por el Kit, en donde permaneció a 4°C

durante 3 días. La modificación que se le hizo a la técnica fue realizar cortes coronales de 40µm de grosor en lugar de cortes de 100-200µm que sugiere el instructivo, los cortes se realizaron con un micrótopo de congelación y se mantuvieron en flotación en lugar de portaobjetos como sugiere el instructivo, las modificaciones se realizaron con la finalidad de mejorar la calidad de revelado y mejorar la eficiencia de los lavados. Los cortes se lavaron en agua bidestilada durante 5min y se colocaron en la solución de revelado del Kit. Finalmente los cortes fueron sumergidos en trenes de alcohol con diferente graduación (50, 75, 96 y 100 %), en donde permanecieron 5min dentro de cada una de las tres primeras concentraciones y 12min en alcohol absoluto. Finalmente los cortes fueron transferidos a Xilol y se montaron en un portaobjetos con Entellan (Merck).

6.8. Captura de fotomicrografías Golgi-Cox

Se tomaron fotomicrografías de las neuronas piramidales presentes en el hipocampo y en la neocorteza con el objetivo de evaluar su morfología general. Se utilizó una cámara CCD AxioCam MRC(Carl Zeiss) acoplada a un microscopio(Carl Zeiss–Axioimagen. A1) y se usó el software Axio Vision, versión 4.6.3(Carl Zeiss). El CCD es un dispositivo que cuenta con un sistema de detección fotoeléctrico que permite obtener imágenes con alta resolución.

Hipocampo. Debido a que los cortes coronales de cada cerebro midieron 40 µm, en el caso de las neuronas piramidales del hipocampo se capturaron varios planos focales por neurona, con la finalidad de contar con el mayor número de información para su posterior reconstrucción. Se obtuvo una muestra promedio de 30 neuronas por grupo, de ambos hemisferios, en donde solamente se seleccionaron las neuronas piramidales cuyas dendritas basales y apicales estuvieron bien teñidas. Las imágenes fueron almacenadas en formato 8-bit (TIFF) y capturadas con los objetivos 10x, 20x y 40x. Las imágenes capturadas con 10x y 20x se utilizaron para tener una vista panorámica de cada estructura, las imágenes archivadas con el objetivo 40x fueron utilizadas para realizar la reconstrucción de cada neurona y su posterior análisis. De cada neurona piramidal se realizaron las siguientes mediciones: el grosor de las dendritas apical y basal, el número de procesos apicales y basales, además de determinar si el ángulo de inserción de la dendrita apical fue $>15^\circ$.

Neocorteza. Se obtuvieron imágenes de las cortezas motora I y somatosensorial I: vibrisas, miembros anteriores y miembros posteriores, de ambos hemisferios, de 5 sujetos por cada grupo, solamente se fotodocumentaron las cortezas cuyas neuronas estuvieron bien impregnadas. Las imágenes fueron capturadas con los objetivos 10x, 20x y 40x y almacenadas en formato 8-bit (TIFF). Las imágenes capturadas con 10x y 20x se utilizaron para tener una vista panorámica de cada estructura, las imágenes archivadas con el objetivo 40x fueron utilizadas para constatar el fenotipo neuronal. La evaluación de las cortezas se realizó de la siguiente manera: primero se contó el número total de neuronas piramidales bien impregnadas por fotografía, posteriormente se registró el número de neuronas piramidales que presentaron alteración en la polaridad neuronal, de esta forma se obtuvo un porcentaje de neuronas con polaridad anormal por fotografía.

Con la finalidad de realizar imágenes representativas de las neuronas piramidales de las cortezas motora y somatosensorial, se imprimieron las fotomicrografías capturadas con el objetivo 10x, se colocó una hoja de papel

calca sobre cada impresión y se dibujó a las neuronas piramidales bien impregnadas presentes en cada fotografía. El procedimiento anterior se realizó con ayuda de una lupa con luz para escritorio y un bolígrafo de punto fino. En la imagen final, se muestra el dibujo obtenido a partir de la fotomicrografía capturada con el objetivo 10x y una ampliación de la imagen obtenida con el objetivo 40x.

6.9. Análisis conductual, prueba en campo abierto (*Open Field Test*)

Puesto que se encontraron cambios en la morfología de las neuronas piramidales en las cortezas motora, somatosensorial y también en las pirámides del hipocampo, se realizó la prueba conductual de campo abierto con la finalidad de evaluar aspectos generales de la conducta de las crías en la etapa juvenil (P40). Se utilizaron únicamente ratas macho. Las sesiones experimentales se llevaron a cabo durante la fase oscura; antes de cada ensayo se habitó a las ratas durante una hora (19:00 –20:00 hrs). La prueba de campo abierto consistió en colocar individualmente a cada rata en una esquina del campo abierto durante 5 min. El campo abierto estuvo constituido por una caja de acrílico (90 x 90 x 40cm) con el piso cuadrículado (10cm). La prueba se llevó a cabo bajo dos condiciones de iluminación: luz tenue (iluminación inferior a 10 luxes), que asemeja las condiciones naturales de navegación de los roedores y luz intensa (iluminación generada con un foco de 500W colocado 40 cm por encima del centro del campo abierto), que representa una condición aversiva para los roedores. Cada sesión fue videograbada con una cámara digital (Samsung, S600) y posteriormente se realizó la evaluación de las siguientes conductas: tiempo de inmovilidad(s), tiempo de congelamiento(s), tiempo de acicalamiento(s), desplazamiento (número de cruces), así como la frecuencia de levantarse en cuartos traseros (levantamiento vertical) y defecación. También se registró el tiempo que el sujeto pasó en la periferia y en el centro del campo.

Análisis estadísticos

Para los datos que cumplieron con los criterios de normalidad y homogeneidad de varianzas necesarios para realizar un análisis estadístico paramétrico, se utilizaron las pruebas *t* de student y ANOVA de una vía, esta última seguida de las prueba post-hoc DHS de Tukey o Sheffé en cada caso, el nivel de significancia estadístico fue fijado en $p < 0.05$.

Para aquellos datos que no cumplieron con los criterios para realizar un análisis estadístico paramétrico, se utilizó la prueba no paramétrica de U de Mann-Whitney, el nivel de significancia estadística fue fijado en $p < 0.05$.

7. RESULTADOS

7.1. Efecto de la privación dietética de triptófano sobre el peso corporal de las crías

Antes de llevar a cabo los sacrificios para obtener el tejido cerebral, las crías de cada condición fueron pesadas en los días P0(n=8), P20(n=8) y P40(n=8), con la finalidad de evaluar el efecto de la administración de la D-Trp y las dietas control sobre el incremento de peso corporal en las crías de cada condición. El análisis estadístico realizado con la prueba ANOVA de un factor mostró que el grupo D-Trp 13-17 presentó un menor peso corporal al nacimiento en P0 con respecto al grupo D+Trp 13-17 [$F(3,28)=3.040$, $p=0.045$] (**Fig. 5**).

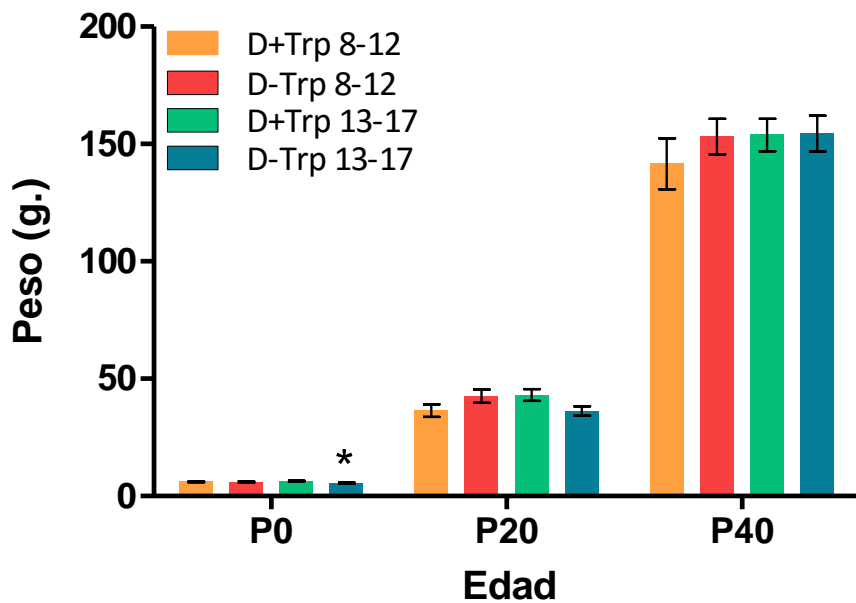


Figura 5. Ganancia de peso corporal de las crías. En los días P0(n=8), P20(n=8) y P40(n=8), se registró el peso corporal de las crías por condición. Se encontró que el grupo D-Trp 13-17 mostró un menor peso corporal al nacimiento con respecto al grupo D+Trp 13-17 (ANOVA de una vía, *post hoc* DHS de Tukey, * $p<0.05$). Se muestran media \pm error estándar.

7.2. Efecto de la privación dietética de triptófano sobre el peso cerebral de las crías

Se registró el peso cerebral en los días P0(n=8), P20(n=8) y P40(n=8) con la finalidad de evaluar el efecto de la administración de la D-Trp y las dietas control sobre el incremento de peso cerebral en las crías de cada condición. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos en ninguna de las edades evaluadas (**Fig. 6**).

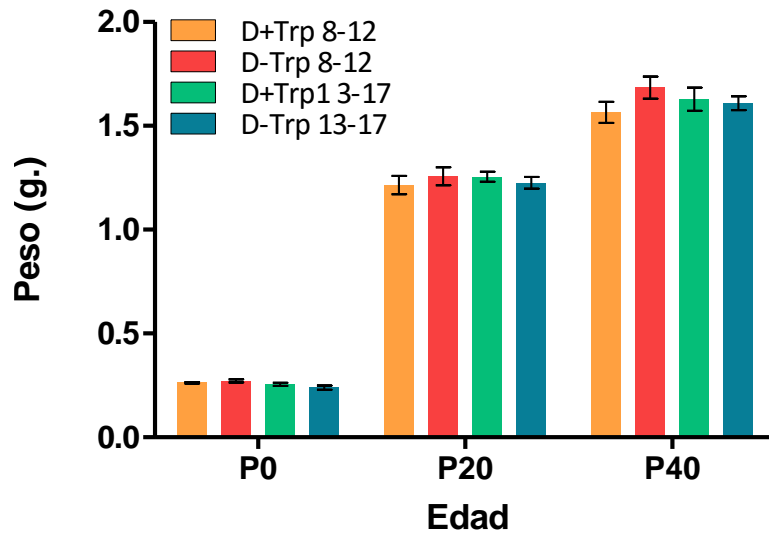


Figura 6. Ganancia de peso cerebral de las crías. En los días P0(n=8), P20(n=8) y P40(n=8). Se registró el peso cerebral de las crías por condición. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos. Se muestran media \pm error estándar.

7.3. Efecto de privación dietética de triptófano sobre la cantidad de 5-HT central

Cuantificación de 5-HT al nacimiento (P0)

Con la finalidad de conocer la concentración de 5-HT presente en el cerebro de las crías recién nacidas, se extrajo el cerebro completo en P0 e inmediatamente el tejido fue procesado para su posterior análisis mediante la técnica de HPLC antes descrita en el método. Para realizar el análisis estadístico, se utilizó el siguiente número de sujetos por condición: D+Trp 8-12(n=6); D-Trp 8-12(n=6); D+Trp 13-17(n=5) y D-Trp 13-17(n=6). El análisis estadístico realizado con la prueba *t* de Student mostró que el grupo D-Trp 8-12 presentó una menor cantidad de 5-HT al nacimiento con respecto al grupo D+Trp 8-12 $t(10)=2.308$, $p=0.044$ (**Fig. 7**).

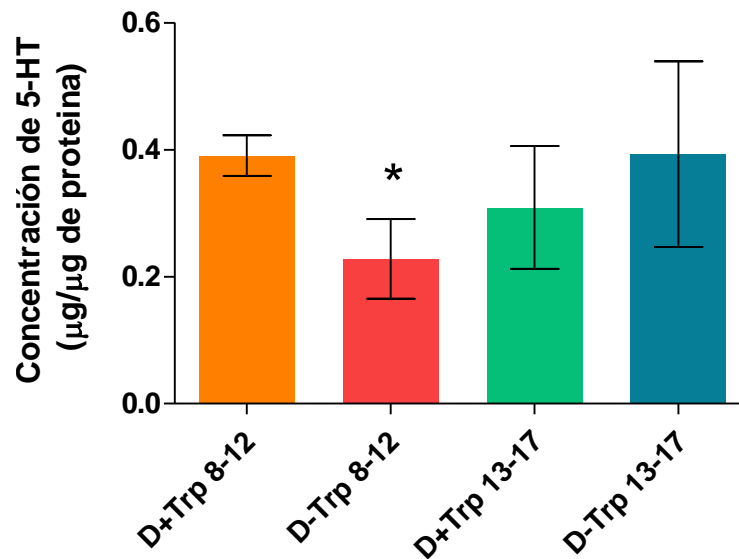


Figura 7. Concentración de 5-HT presente en el cerebro de las crías al nacimiento (P0). El grupo D-Trp 8-12 presentó una menor concentración de 5-HT (0.23 ± 0.03) con respecto al grupo D+Trp 8-12 (0.39 ± 0.06) *t* de Student, $*p < 0.05$. D+Trp 8-12 (n=6); D-Trp 8-12 (n=6); D+Trp 13-17 (n=5); D-Trp 13-17 (n=6). Se muestran media \pm error estándar.

Cuantificación de 5-HT en el tallo cerebral

Con la finalidad de conocer la concentración de 5-HT presente en el tallo cerebral de las crías en las etapas juvenil y adulta, se cuantificaron los niveles de 5-HT en dicha estructura en los días P20 y P40 utilizando la técnica de HPLC antes descrita en el método. Para realizar el análisis se utilizó el siguiente número de sujetos por edad y condición, en P20: D+Trp 8-12 (n=4); D-Trp 8-12 (n=5); D+Trp 13-17 (n=4); D-Trp 13-17 (n=6), y en P40: D+Trp 8-12 (n=4); D-Trp 8-12 (n=5); D+Trp 13-17 (n=3); D-Trp 13-17 (n=6).

El análisis estadístico realizado con la prueba *t* de Student mostró que el grupo D-Trp 8-12 presentó una menor cantidad de 5-HT en el tallo cerebral en P20 con respecto al grupo D+Trp 8-12 ($t(7) = 3.260$, $p = 0.014$).

Debido a que los datos de los grupos E13-E17 no se distribuyeron normalmente, se utilizó la prueba no-paramétrica *u* de Mann-Whitney. Se encontró que el grupo D-Trp 13-17 presentó una menor concentración de 5-HT en el tallo cerebral en P20 en comparación con el grupo D+Trp 13-17 ($U(2)$, $Z = -2.132$, $p < 0.05$).

No se encontraron diferencias significativas de la concentración de 5-HT en el tallo cerebral en el periodo de privación E8-E12 ni E13-E17 en P40 (**Fig. 8**).

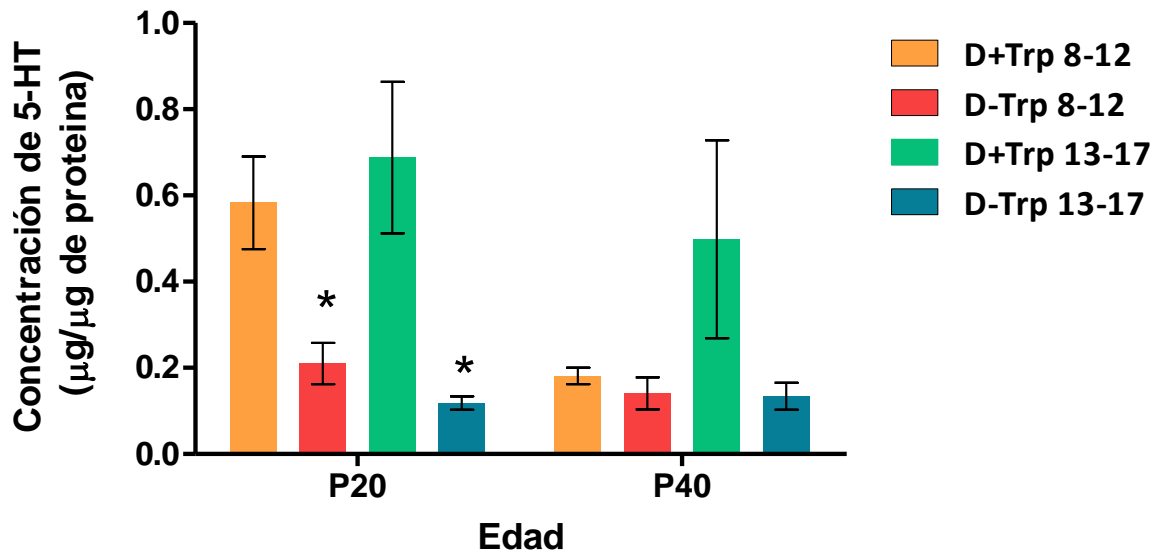


Figura 8. Concentración de 5-HT presente en el tallo cerebral en los días P20 y P40. Se observó una disminución en la concentración de 5-HT en el tallo cerebral de las ratas que fueron privadas de triptófano en el periodo E8-E12 (0.21 ± 0.040) en comparación con el grupo D+Trp 8-12 (0.74 ± 0.17) *t* de Student, $*p < 0.05$. También se observó una menor concentración de 5-HT en el tallo cerebral de las ratas que fueron privadas de triptófano en el periodo E13-17 (0.13 ± 3.33) en comparación con el grupo D+Trp 13-17 (0.56 ± 8.00) *u* de Mann-Whitney, $*p < 0.05$. P20: D+Trp 8-12 (n=4); D-Trp 8-12 (n=5); D+Trp 13-17 (n=4); D-Trp 13-17 (n=6), y P40: D+Trp 8-12 (n=4); D-Trp 8-12 (n=5); D+Trp 13-17 (n=3); D-Trp 13-17 (n=6). Se muestran media \pm error estándar.

Quantificación de 5-HT en la corteza cerebral

Con la finalidad de conocer la concentración de 5-HT presente en la corteza cerebral frontal de las crías en las etapas juvenil y adulta, se cuantificaron los niveles de 5-HT en dicha estructura en los días P20 y P40 utilizando la técnica de HPLC. Para realizar el análisis se utilizó el número de sujetos siguiente por edad y condición. En P20: D+Trp 8-12 (n=4); D-Trp 8-12 (n=5); D+Trp 13-17 (n=3); D-Trp 13-17 (n=6) y en P40: D+Trp 8-12 (n=6); D-Trp 8-12 (n=4); D+Trp 13-17 (n=3); D-Trp 13-17 (n=3). El análisis estadístico realizado con la prueba *t* de Student no mostró diferencias estadísticamente significativas en la concentración de 5-HT en la corteza cerebral en ningún periodo de privación dietética de triptófano en P20 y P40 (**Fig. 9**).

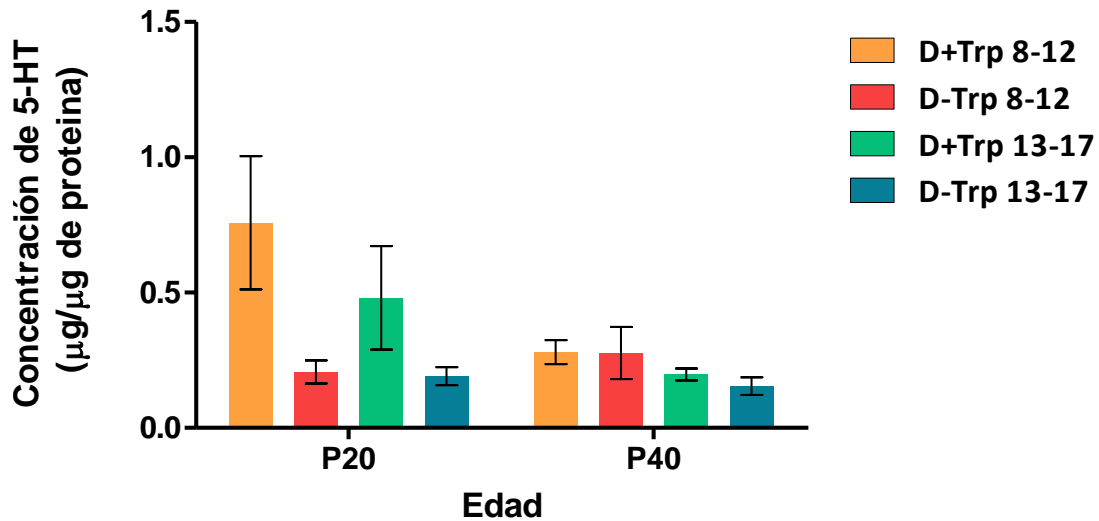


Figura 9. Concentración de 5-HT presente en la corteza cerebral en los días P20 y P40. No se observaron diferencias estadísticamente significativas en la concentración de 5-HT en la corteza cerebral de las ratas que fueron privadas de triptófano en los periodos E8-E12 y E13-17 en P20 y P40. P20: D+Trp 8-12 (n=4); D-Trp 8-12 (n=5); D+Trp 13-17 (n=4); D-Trp 13-17 (n=6). P40: D+Trp 8-12 (n=6); D-Trp 8-12 (n=4); D+Trp 13-17 (n=3); D-Trp 13-17 (n=3). Se muestran media \pm error estándar.

7.4. Efecto de privación dietética de triptófano sobre la morfología de las neuronas piramidales del hipocampo

Con la finalidad de evaluar el efecto de la privación dietética de triptófano durante el periodo de diferenciación (E8-E12) y establecimiento de vías primarias (E13-E17) del sistema serotoninérgico sobre la morfología de las neuronas piramidales del hipocampo (arquicorteza), se realizó la tinción histológica de Golgi-Cox en los días P20 y P40. Para llevar a cabo dicho análisis, se seleccionaron entre 3 y 5 neuronas piramidales de la región CA1 del hipocampo dorsal por cada sujeto, el criterio de selección fue que las neuronas estuvieran bien impregnadas, de esta manera se obtuvo el siguiente número de neuronas piramidales por grupo en P20: D+Trp 8-12 (n=33); D-Trp 8-12 (n=28); D+Trp 13-17 (n=37); D-Trp 13-17 (n=26), y P40: D+Trp 8-12 (n=28); D-Trp 8-12 (n=34); D+Trp 13-17 (n=22); D-Trp 13-17 (n=33).

Grosor de la dendrita apical

Se encontró que en el grupo D-Trp 13-17 aumentó el grosor de la dendrita apical en las neuronas piramidales del hipocampo, con respecto al grupo D+Trp 13-17 en el día P20 $U(330.5)$, $Z=-2.103$, $p<0.05$. Igualmente se observó un ensanchamiento de la dendrita apical en las neuronas piramidales de hipocampo dorsal en el grupo D-Trp 8-12 con respecto al grupo D+Trp 8-12 en el día P40 $t(60)=-3.239$, $p=0.002$ (**Fig. 10**).

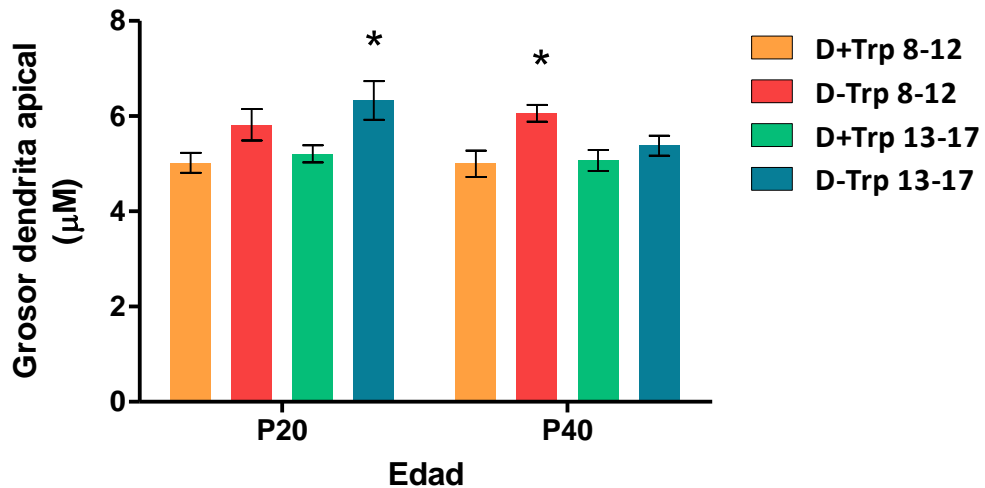


Figura 10. Grosor de la dendrita apical de las neuronas piramidales del hipocampo en P20 y P40. En P20 se observó un engrosamiento de la dendrita apical de las neuronas piramidales en el grupo D-Trp 13-17(5.83±9.05) en comparación con el grupo D+Trp 13-17(5.39±5.37) *u* de Mann-Whitney, $*p<0.05$. En P40 se observó un aumento en el grosor de la dendrita apical en el grupo D-Trp 8-12(6.06±0.18) en comparación con el grupo D+Trp 8-12(5.00±0.27) *t* de Student, $*p<0.05$, se muestran media ± error estándar. P20: D+Trp 8-12(n=33); D-Trp 8-12(n=28); D+Trp 13-17(n=37); D-Trp 13-17(n=26), P40:D+Trp 8-12(n=28); D-Trp 8-12(n=34); D+Trp 13-17(n=22); D-Trp 13-17 (n=33). Se muestran media ± error estándar.

Grosor de las dendritas basales

Se encontró que la privación dietética de triptófano aumento el grosor de las dendritas basales en las neuronas piramidales del hipocampo dorsal en el grupo D-Trp 8-12 con respecto al grupo D+Trp 8-12 $t(59)=-2.537$, $p=0.014$, y en el grupo D-Trp 13-17 en comparación con el grupo D+Trp 13-17 $U(256)$, $Z=-3.017$, $p<0.05$ en el día P20. Por otro lado, no se observaron cambios estadísticamente significativos en el grosor de las dendritas basales en ninguno de los grupos en el día P40 (**Fig. 11**).

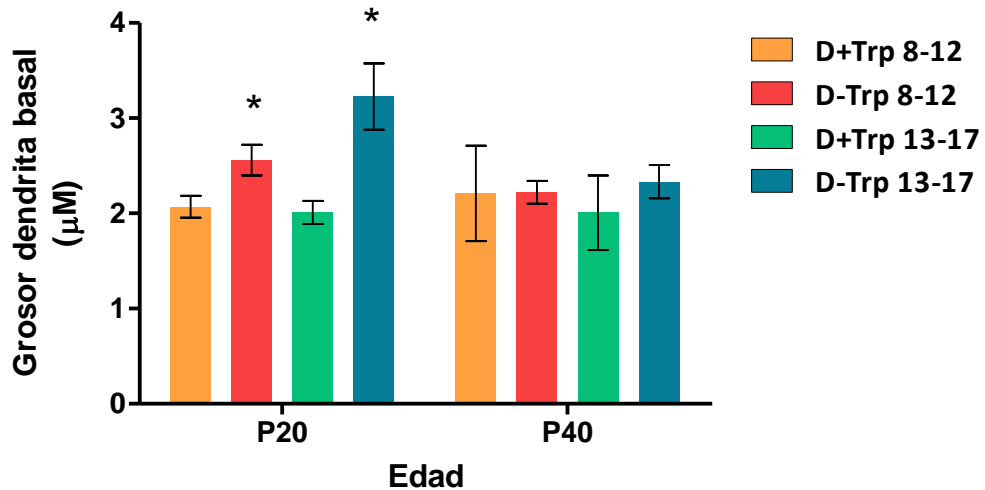


Figura 11. Grosor de las dendritas basales de las neuronas piramidales del hipocampo en P20 y P40. Se observa un aumento en el grosor de las dendritas basales de las neuronas piramidales en el grupo D-Trp 8-12 (2.56 ± 0.16) en comparación con el grupo D+Trp 8-12 (2.07 ± 0.21). *t* de Student, $*p < 0.05$. De igual manera, se observa un aumento en el grosor de las dendritas basales en el grupo D-Trp 13-17 (2.72 ± 6.94) en comparación con el grupo D+Trp 13-17 (1.93 ± 2.83) *u* de Mann-Whitney, $*p < 0.05$. P20: D+Trp 8-12 (n=33); D-Trp 8-12 (n=28); D+Trp 13-17 (n=37); D-Trp 13-17 (n=26). P40: D+Trp 8-12 (n=28); D-Trp 8-12 (n=34); D+Trp 13-17 (n=22); D-Trp 13-17 (n=33). Se muestran media \pm error estándar.

Número de procesos apicales

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en el número de procesos apicales en ninguno de los periodos de restricción dietética de triptófano en P20 y P40 (**Fig. 12**).

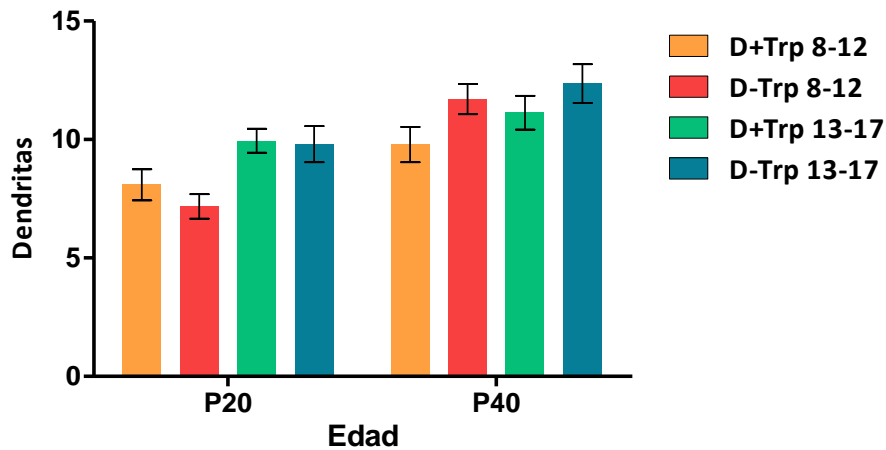


Figura 12. Procesos apicales de las neuronas piramidales del hipocampo en P20 y P40. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en el número de procesos apicales en ninguno de los grupos. P20: D+Trp 8-12 (n=33); D-Trp 8-12 (n=28); D+Trp 13-17 (n=37); D-Trp 13-17 (n=26). P40: D+Trp 8-12 (n=28); D-Trp 8-12 (n=34); D+Trp 13-17 (n=22); D-Trp 13-17 (n=33). Se muestran media \pm error estándar.

Número de procesos basales

Se encontró que la privación dietética de triptófano disminuyó el número de procesos basales de las neuronas piramidales del hipocampo dorsal en el grupo D-Trp 8-12 con respecto al grupo D+Trp 8-12 $t(59)=-2.633$, $p=0.011$ en el día P20. En el día P40 se observó un mayor número de procesos basales en las neuronas piramidales del hipocampo pertenecientes al grupo D-Trp 8-12 en comparación con el grupo D+Trp $t(60)=-2.490$, $p=0.016$ (Fig. 13).

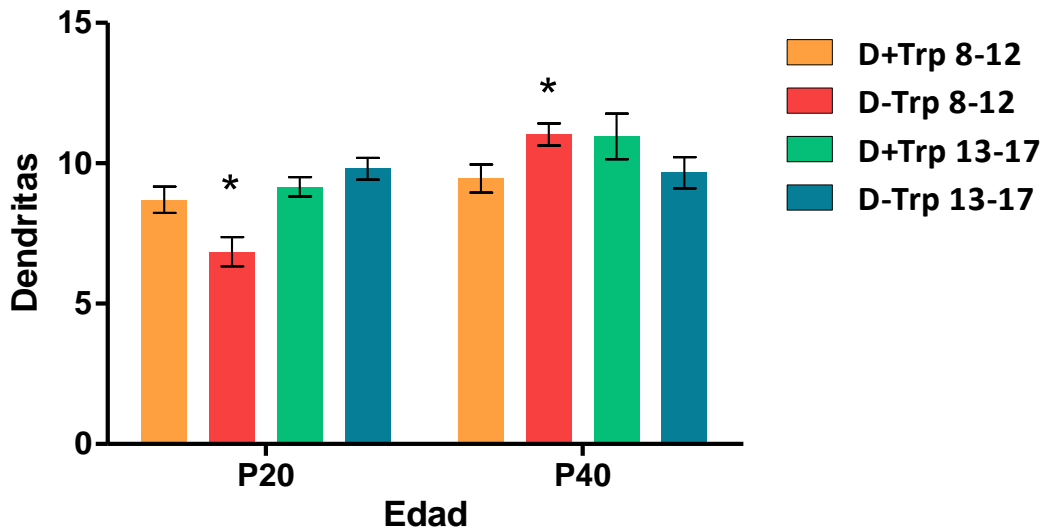


Figura 13. Procesos basales de las neuronas piramidales del hipocampo en P20 y P40. Se observa un menor número de procesos basales en las neuronas piramidales del grupo D-Trp 8-12 (6.85 ± 0.51) en comparación con los grupos D+Trp 8-12 (8.69 ± 0.47) en P20 t de Student, $*p < 0.05$, se muestran media \pm error estándar. También se observa un mayor número de procesos basales en el grupo D-Trp 8-12 (11.02 ± 0.39) con respecto al grupo D+Trp 8-12 (9.46 ± 0.50) en P40 t de Student, $*p < 0.05$, se muestran media \pm error estándar. P20: D+Trp 8-12 ($n=33$); D-Trp 8-12 ($n=28$); D+Trp 13-17 ($n=37$); D-Trp 13-17 ($n=26$). P40: D+Trp 8-12 ($n=28$); D-Trp 8-12 ($n=34$); D+Trp 13-17 ($n=22$); D-Trp 13-17 ($n=33$). Se muestran media \pm error estándar.

Orientación de la dendrita apical

Con la finalidad de conocer el efecto de la privación dietética de triptófano durante el periodo de diferenciación (E8-E12) y establecimiento de vías primarias (E13-E17) del sistema serotoninérgico sobre el establecimiento de polaridad celular de las neuronas piramidales del hipocampo dorsal, se midió el ángulo de inserción de la dendrita apical considerando un ángulo $>15^\circ$ como un error en la orientación de dicha dendrita y también se registró el número de neuronas piramidales que tuvieran más de una dendrita apical protruyendo directamente del soma, las características anteriores se consideraron como alteraciones en el establecimiento de polaridad neuronal (Hashimo-Tori *et al.*, 2008).

Para llevar a cabo dicho análisis, se seleccionaron entre 3 y 7 neuronas piramidales de la región CA1 del hipocampo dorsal por sujeto, el criterio de selección fue que las neuronas estuvieran bien impregnadas y que se pudiera observar claramente el proceso apical. Las mediciones correspondientes a cada neurona se realizaron con ayuda del software ImageJ.

La exploración morfológica de las neuronas piramidales del hipocampo realizada en los días P20 y P40, mostró alteraciones en la orientación de la dendrita apical y el surgimiento de múltiples procesos apicales directamente del soma en ambos periodos de privación dietética de triptófano, encontrándose un mayor porcentaje de las alteraciones antes mencionadas en el día P20, en los grupos D-Trp 8-12 y D-Trp 13-17 [Chi-cuadrada(3)= 9.441 p=0.024] y en el día P40 el grupo que presentó un mayor porcentaje de alteraciones fue el D-Trp 13-17 [Chi-cuadrada(3)= 12.083 p=0.007] en comparación con el resto de los grupos (**Fig. 14 y Tabla II**).

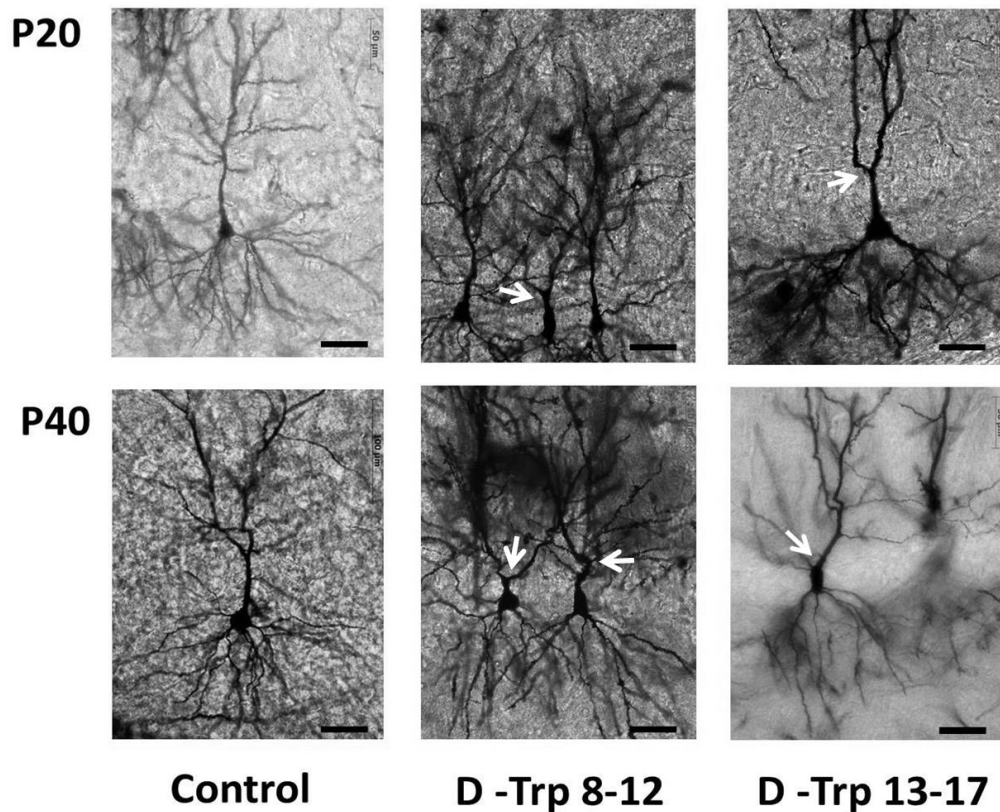


Figura 14. Fotomicrografías representativas de las neuronas piramidales de la región CA1 del hipocampo dorsal. En la imagen se pueden apreciar algunos defectos en la orientación de la dendrita apical de las neuronas piramidales en P20 y P40 como la bifurcación de la dendrita apical y un ángulo de inserción de la dendrita apical $>15^\circ$. Tinción de Golgi Cox, objetivo 10x. La barra de escala equivale a 50µm.

Condición	n	P20(%)	n	P40(%)
D+Trp 8-12	4	19.50 ± 7.02	4	23.32 ± 14.52
D-Trp 8-12	5	41.00 ± 4.58*	5	23.32 ± 16.32
D+Trp 13-17	5	24.45 ± 6.11	3	9.52 ± 9.52
D-Trp 13-17	4	52.50 ± 20.56*	5	52.66 ± 12.39*

Tabla II. Porcentaje de neuronas piramidales del hipocampo dorsal que presentaron alteraciones en la polaridad neuronal. El grupo D-Trp 8-12 y D-Trp 13-17 presentaron un mayor porcentaje de modificaciones en la arquitectura neuronal en P20 en comparación con los grupos control. En P40 el grupo D-Trp 13-17 mantuvo las modificaciones citoarquitectónicas observadas en P20.

7.5. Efecto de privación dietética de triptófano sobre la morfología de las neuronas piramidales neocorticales

Con la finalidad de conocer el efecto de la privación dietética de triptófano durante el periodo de diferenciación (E8-E12) y establecimiento de vías primarias (E13-E17) del sistema serotoninérgico sobre el establecimiento de polaridad celular de las neuronas piramidales de la corteza cerebral, se observó directamente la morfología neuronal mediante la tinción de Golgi-Cox, utilizando los objetivos 10x para observar la morfología completa de cada neurona, y 40x para constatar el fenotipo piramidal por medio de la observación de espinas dendríticas.

Se encontró que la privación dietética de triptófano incrementó el porcentaje de alteraciones en la polaridad celular en ambos periodos de privación dietética de triptófano en todas las cortezas evaluadas en P20 y en P40. (Tablas III y IV; Figs. 15 y 16).

Ventana E8-E12

Condición/Edad	Cx Motora (%)	Cx Somatosensorial (%)		
	I	Miembros anteriores	Miembros posteriores	Vibrisas
D+Trp(P20)	3.32±0.47	12.40±1.12	0.50±0.50	1.37±1.37
D-Trp(P20)	9.06±2.06	18.13±7.19	13.65±3.17	15.82±3.80
D+Trp(P40)	4.08±1.50	0.66±0.66	4.00±2.58	2.52±1.93
D-Trp(P40)	30.06±5.19	20.95±4.54	27.67±5.77	27.04±2.58

Tabla III. Proporción de neuronas piramidales por grupo que presentaron anomalías en la polaridad neuronal. Se observa un aumento en el porcentaje de neuronas piramidales que presentaron errores en el establecimiento de polaridad celular en las cortezas motora y somatosensorial tanto en P20 como en P40 en el grupo D-Trp 8-12. P20: D+Trp 8-12(n=5); D-Trp 8-12(n=4). P40: D+Trp 8-12(n=6); D-Trp 8-12(n=6). Se muestran media ± error estándar.

Ventana E13-E17

Condición/Edad	Cx Motora (%)	Cx Somatosensorial (%)		
	I	Miembros anteriores	Miembros posteriores	Vibrisas
D+Trp(P20)	2.40±1.08	0.74±0.74	0.53±0.49	0.75±0.75
D-Trp(P20)	11.08±0.94	23.38±4.35	15.73±2.10	22.90±5.32
D+Trp(P40)	1.04±0.67	0.64±0.64	2.91±2.08	2.84±1.70
D-Trp(P40)	38.90±6.93	24.51±7.20	20.12±4.67	24.44±5.60

Tabla IV. Porcentaje de neuronas piramidales por fotografía que presentaron anomalías en la polaridad neuronal. Se observa un aumento en el porcentaje de neuronas piramidales que presentaron errores en el establecimiento de polaridad celular en las cortezas motora y somatosensorial tanto en P20 como en P40 en el grupo D-Trp 13-17. P20: D+Trp 13-17(n=7); D-Trp 13-17(n=6). P40: D+Trp 13-17(n=7); D-Trp 13-17(n=7). Se muestran media ± error estándar.

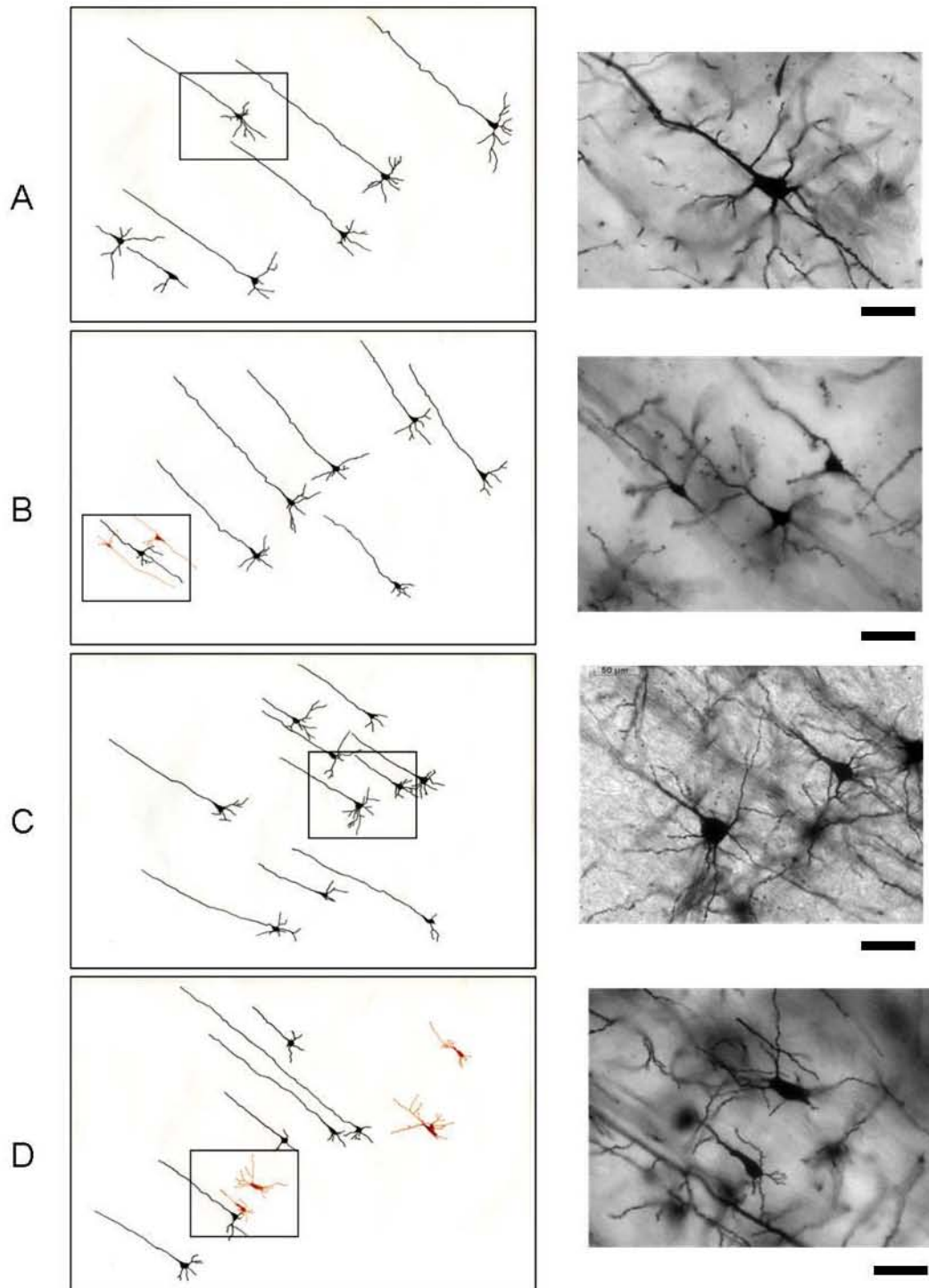


Figura 15. Dibujos representativos de la corteza somatosensorial en la región de vibrisas de ratas juveniles (P20), teñidas con la tinción de Golgi-Cox. En A, D+Trp 8-12; B, D-Trp 8-12; C, D+Trp 13-17; D, D-Trp 13-17. Las imágenes representativas de la corteza somatosensorial en la región de vibrisas, fueron capturadas con el objetivo 10x y luego dibujadas para apreciar con mejor claridad los tipos neuronales corticales. En el recuadro se muestran neuronas piramidales normales (objetivo 40x, Figs. A y C) y con alteración en la polaridad neuronal (objetivo 40x, Figs. B y D). La barra de escala equivale a 50 µm.

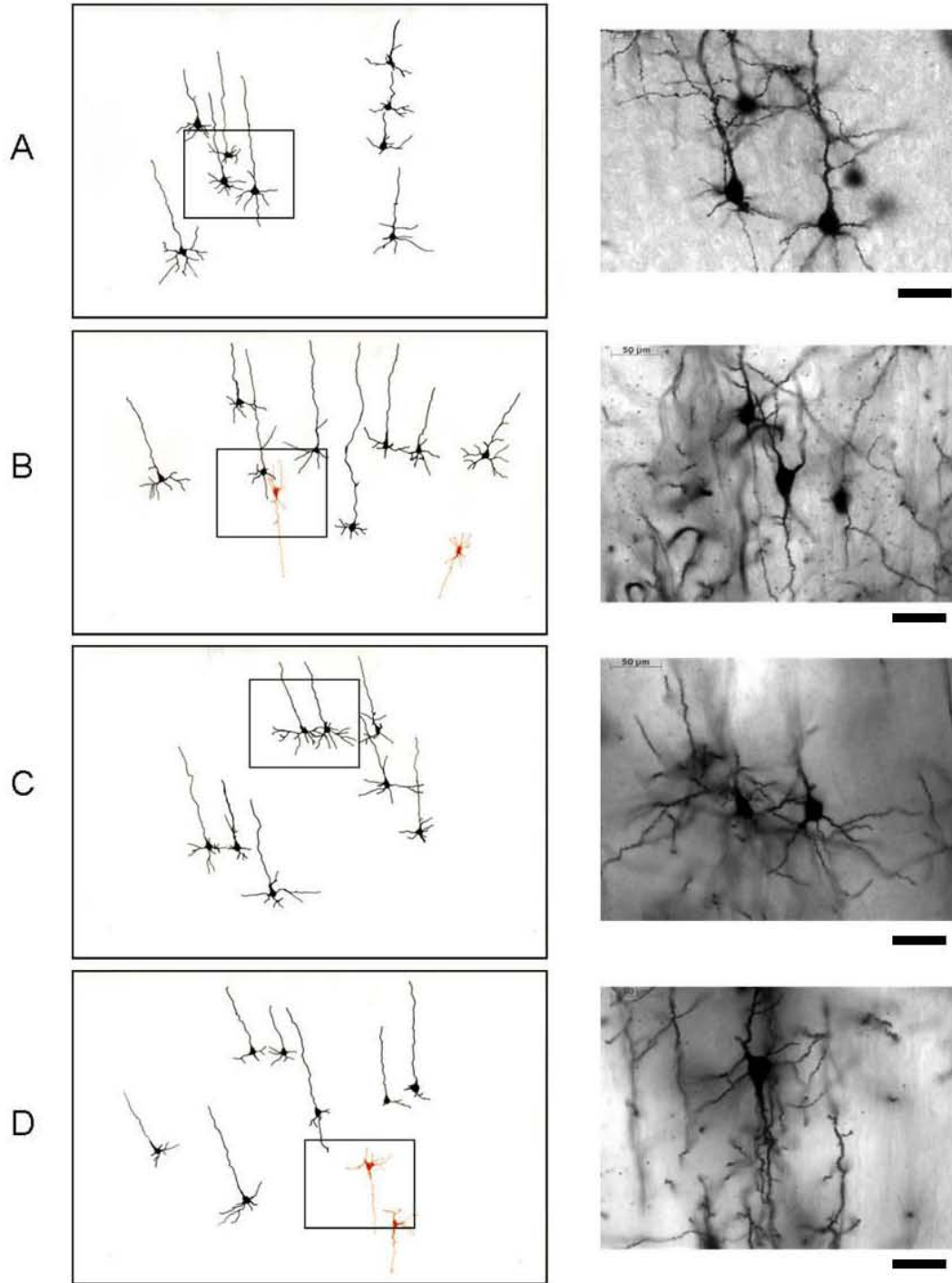


Figura 16. Dibujos representativos de la corteza motora I de ratas juveniles (P20), teñidas con la tinción de Golgi-Cox. En A, D+Trp 8-12; B, D-Trp 8-12; C, D+Trp 13-17; D, D-Trp 13-17. Las imágenes representativas de la corteza motora primaria fueron capturadas con el objetivo 10x y luego dibujadas para apreciar con mayor claridad los tipos neuronales corticales. En el recuadro se muestran neuronas piramidales normales (objetivo 40x Figs. A y C) y con alteración en la polaridad neuronal (objetivo 40x Figs. B y D). La barra de escala equivale a 50µm.

7.6. Efecto de la privación dietética de triptófano sobre la conducta en campo abierto

Debido a que se encontraron cambios en el posicionamiento final de las neuronas piramidales en las cortezas motora primaria y somatosensorial, así como alteraciones morfológicas en las neuronas piramidales del hipocampo dorsal, decidimos evaluar la conducta de las ratas macho en el día P40. La prueba utilizada fue el campo abierto conocido en inglés como *Open Field Test* (OF por sus siglas en inglés), debido a que esta prueba nos permite evaluar de manera muy general la integración senso-motriz de las ratas. La prueba consiste en medir las conductas que despliega la rata al ser colocada en un espacio abierto nuevo, en donde escapar está impedido por un muro que rodea al campo.

La evaluación conductual de cada sujeto en el OF tuvo una duración de 5 min, en los que se evaluó el tiempo que la rata permaneció dentro de un cuadrante moviendo únicamente las vibrisas (inmovilidad), el tiempo que la rata permaneció completamente inmóvil (congelamiento), el tiempo de acicalamiento, la distancia recorrida dentro del campo, el tiempo en la periferia, el tiempo en el centro, la frecuencia de levantamiento o exploración vertical (levantarse en cuartos traseros) y la producción de bolos fecales.

La prueba se realizó durante la fase oscura en dos condiciones de iluminación: luz tenue (10 luxes), que asemeja las condiciones naturales de navegación de los roedores y luz intensa (500w), que representa una condición aversiva. El análisis estadístico se realizó con la prueba ANOVA de un factor.

Luz tenue

Los resultados mostraron que las ratas sometidas a privación dietética de triptófano prenatal en el periodo E8-E12 presentaron un índice mayor de levantamientos verticales durante la prueba de campo abierto en la condición de luz tenue con respecto al grupo D+Trp 8-12 [$F(3,22) = 6.450$ $p=0.003$] (**Tabla V**). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos en las conductas de inmovilidad, congelamiento, acicalamiento, distancia recorrida, producción de bolos fecales, tiempo en el centro ni tiempo en la periferia.

Luz intensa

Las ratas sometidas a privación dietética de triptófano prenatal en el periodo E13-E17 produjeron un mayor número de bolos fecales en la condición aversiva de luz intensa con respecto al grupo D+Trp 13-17 [$F(3,24) = 11.387$ $p=0.019$] (**Tabla VI**). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos en las conductas de congelamiento, acicalamiento, levantamiento vertical, distancia recorrida, tiempo en el centro ni tiempo en la periferia.

Luz tenue				
Condición	D+Trp 8-12 n=6	D-Trp 8-12 n=5	D+Trp 13-17 n=8	D-Trp 13-17 n=7
Inmovilidad(s)	0.50 ± 0.50	2.97 ± 1.57	2.94 ± 1.78	8.53 ± 2.50
Congelamiento(s)	0.05 ± 0.05	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
Acicalamiento(s)	13.35 ± 7.12	5.70 ± 2.19	6.98 ± 4.07	3.30 ± 1.62
Distancia recorrida (cuadros)	181.83 ± 23.60	258.60 ± 30.99	237.00 ± 11.43	320 ± 41.43
Tiempo periferia(s)	287.10 ± 3.67	281.03 ± 2.75	284.27 ± 3.68	287.37 ± 2.47
Tiempo centro(s)	12.74 ± 3.63	18.96 ± 6.16	15.73 ± 3.68	12.57 ± 2.48
Levantamiento vertical (frecuencia)	22.50 ± 4.13	38.20 ± 2.22*	22.62 ± 1.49	28.57 ± 2.69
Bolos fecales	2.50 ± 0.71	2.40 ± 1.12	1.62 ± 0.80	1.14 ± 0.59

Tabla V. Conductas evaluadas durante la prueba de campo abierto en condición de luz tenue P40. Se observa un mayor índice de levantamientos verticales en el grupo D-Trp 8-12 con respecto al grupo D+Trp 8-12 (ANOVA de una vía. *post hoc* Sheffé, * $p < 0.05$). Se muestran media ± error estándar.

Luz intensa				
Condición	D+Trp 8-12 n=6	D-Trp 8-12 n=6	D+Trp 13-17 n=10	D-Trp 13-17 n=6
Inmovilidad(s)	0.57 ± 0.43	2.06 ± 1.04	4.61 ± 2.75	24.31 ± 12.73
Congelamiento(s)	1.10 ± 0.69	0.75 ± 0.50	0.77 ± 0.52	3.27 ± 2.03
Acicalamiento(s)	9.36 ± 4.13	9.12 ± 2.56	4.86 ± 1.89	6.63 ± 3.55
Distancia recorrida (cuadros)	186.83 ± 23.51	279.83 ± 28.56	196.00 ± 20.40	222.50 ± 43.45
Tiempo periferia(s)	296.22 ± 0.92	295.72 ± 1.16	297.19 ± 1.32	298.05 ± 0.72
Tiempo centro(s)	3.94 ± 0.84	4.27 ± 1.17	2.52 ± 1.26	1.98 ± 0.74
Levantamiento vertical (frecuencia)	22.33 ± 2.75	25.83 ± 2.41	22.90 ± 2.68	22.00 ± 3.86
Bolos fecales	2.33 ± 0.76	2.50 ± 0.61	1.70 ± 0.53	4.66 ± 0.66*

Tabla VI. Conductas evaluadas durante la prueba de campo abierto en condición de luz intensa P40. Se observa una mayor producción de bolos fecales en el grupo D-Trp 13-17 con respecto al grupo D+Trp 13-17 (ANOVA de una vía. *post hoc* Sheffé, *p<0.05). Se muestran media ± error estándar.

8. DISCUSIÓN

En la década de 1980 se sugirió por primera vez que en el estadio embrionario la 5-HT podía participar en la regulación de algunos eventos que dirigen el desarrollo del SNC, debido a que esta monoamina es detectada por primera vez en E12 en el cerebro de los roedores. En la actualidad se sabe que la 5-HT es un neurotransmisor que actúa como una señal fisiológica en la comunicación neuronal y también como una señal “trófica” que regula el patrón de desarrollo de su propio sistema y de algunas estructuras prosencefálicas como la corteza cerebral.

El propósito de este trabajo fue evaluar el efecto que tiene la deficiencia prenatal de triptófano dietético, precursor de la 5-HT, en diferentes periodos embrionarios del desarrollo del sistema serotoninérgico sobre la maduración de las neuronas piramidales de la corteza cerebral y el hipocampo. Debido a que se sabe que la 5-HT regula el desarrollo de su propio sistema, nos preguntamos si la depuración prenatal de triptófano afecta de manera diferencial el desarrollo de las neuronas piramidales corticales en relación con el periodo de privación, es decir si existe un periodo crítico en el desarrollo del sistema serotoninérgico que afecte significativamente el desarrollo de la estructura blanco, para ello se administró una dieta libre de triptófano durante los periodos de diferenciación (E8-E12) o establecimiento de vías primarias (E13-E17) del sistema serotoninérgico.

La depuración de 5-HT inducida por medio de dieta consiste en la administración de una dieta deficiente de triptófano o con bajas concentraciones del mismo y rica en aminoácidos esenciales de alto peso molecular, que compiten por el transportador tipo L de aminoácidos para ingresar al SNC (Oldendorf, 1971; Yuwiler *et al.*, 1977). Estas dietas provocan una disminución en la cantidad de 5-HT en el intestino delgado, colon y cerebro (Thomas y Wysor, 1967). El maíz es un ingrediente base para las dietas deficientes de triptófano, provoca en los animales alimentados con estas dietas una marcada reducción en el peso corporal y disminución en el nivel de 5-HT en el SNC (Lytle *et al.*, 1975; Fernstrom y Hirsch, 1977).

En este trabajo se encontró que la privación dietética de triptófano que se realizó durante el periodo de establecimiento de vías primarias (E13-E17) provocó una disminución en el peso corporal de los neonatos (P0). Se sabe que la 5-HT regula la secreción de la hormona de crecimiento en los organismos adultos, en la rata se ha observado que después de la administración de PCPA y/o 5,7 hidroxitriptamina se inhibe la secreción de esta hormona. En las crías del grupo D-Trp 13-17, la dieta deficiente de triptófano no modificó la cantidad de 5-HT al nacimiento, sin embargo, los niveles de 5-HT pudieron haberse modificado durante el periodo (E13-E17), lo que pudo haber interferido en la secreción de la hormona de crecimiento en el embrión. En un estudio en el que se depuró prenatalmente al SNC de 5-HT utilizando ratones *knockout* para la Tph2 y para Vmat2, se describió que el retardo en el crecimiento embrionario y postnatal de las crías es una característica común en los modelos mencionados de depuración genética de 5-HT, y que la tasa de crecimiento normal se recupera cuando se reconstituye la 5-HT en el *knockout* para Vmat2 (Kiyasova *et al.*, 2011).

El peso cerebral de los neonatos permaneció sin cambios entre las condiciones como se ha reportado en otros estudios similares (Orozco-Suárez *et al.*, 2003; Vitalis *et al.*, 2007; Flores-Cruz *et al.*, 2012).

El primer paso enzimático en la síntesis de 5-HT central se lleva a cabo por la Tph2, que convierte al Trp en 5-HTRP, por lo que esta enzima se considera el paso limitante en la síntesis de 5-HT central. En condiciones fisiológicas normales la Tph2 no se satura, es decir, que normalmente dentro del sistema existe una mayor concentración de enzima que de sustrato, por lo tanto la síntesis de 5-HT central depende principalmente de la concentración plasmática de Trp, de la tasa de transcripción y de la actividad enzimática de la Tph2 (Biggio *et al.*, 1974; Gessa *et al.*, 1975),

Algunos experimentos *in vitro* realizados con neuronas serotoninérgicas embrionarias del RD, muestran que la actividad del promotor de la Tph2 incrementa durante el periodo de diferenciación de dichas neuronas, evento que favorece tanto la expresión de Tph2 como de 5-HT (Rind *et al.*, 2000). La expresión de la Tph2 en el núcleo del RD es detectable a partir del E11.25, a partir de este punto se observa un incremento exponencial en la transcripción de la enzima hasta el nacimiento P(0.5), igualmente los niveles de RNAm de Tph2 se mantienen elevados hasta el P22 y posteriormente ocurre una reducción del 40% del RNA mensajero entre el P22 y el P61 (Rind *et al.*, 2000; Gutknecht *et al.*, 2009).

También se sabe que la actividad enzimática de la Tph2 se incrementa al estimular a las neuronas del núcleo del RD (Herr *et al.*, 1975; Boadle-Biber *et al.*, 1983), y por el contrario dicha actividad disminuye por efecto de la hiperpolarización que resulta de la estimulación de los autorreceptores serotoninérgicos 5-HT_{1A} localizados en las membranas somatodendríticas de las neuronas serotoninérgicas (Hamon *et al.*, 1988; Invernizzi *et al.*, 1991).

En el presente estudio, la privación dietética de triptófano realizada durante el periodo de diferenciación E8-E12 disminuyó la concentración de 5-HT en el cerebro completo (P0) y en el tallo cerebral (P20) de las crías, mientras que la privación dietética de triptófano realizada durante el periodo de establecimiento de vías primarias 13-17 se observó una disminución en la cantidad de 5-HT en el tallo cerebral (P20).

De lo anterior sugerimos que la privación dietética de Trp realizada en momentos específicos del desarrollo del sistema serotoninérgico como son la diferenciación (E8-E12) y el establecimiento de vías primarias (E13-17) pudo haber aumentado la actividad enzimática de la Tph2 como un mecanismo de compensación por falta de 5-HT en estos periodos embrionarios, y al restituir el Trp en la dieta se pudo haber producido un aumento en la concentración de 5-HT. En el caso de que la suposición anterior fuese correcta el aumento en la concentración de 5-HT podría sobre-estimular a los autorreceptores 5-HT_{1A}, que gradualmente regularían a la baja la actividad enzimática de la Tph2 en el tiempo. El efecto autorregulatorio propuesto podría perdurar durante la vida postnatal temprana, lo que en parte pudiese explicar la disminución en la concentración de 5-HT en P0 (E8-E12) y la disminución en la concentración de 5-HT en el tallo cerebral en P20 en ambos periodos.

En la corteza cerebral no se observaron diferencias en el nivel de 5-HT en ninguno de los periodos de privación dietética de Trp en P20 con respecto a los grupos control, sin embargo podemos observar una tendencia hacia la baja en el nivel de 5-HT en estos grupos experimentales, por lo que es necesario aumentar el número de muestra para constatar dicha tendencia.

Por otra parte en P40 no se encontraron diferencias en el nivel de 5-HT en la corteza ni en el tallo cerebral en ninguna condición, no obstante, se observa que la concentración de 5-HT en el tallo cerebral de los grupos control disminuyó considerablemente de P20 a P40, suceso que concuerda con la ya mencionada disminución de la expresión de la Tph2 que ocurre normalmente entre el P22 y P60 (Rind *et al.*, 2000; Gutknecht *et al.*, 2009). La concentración de 5-HT en los grupos experimentales de P20 a P40 en el tallo cerebral parece ser constante, es decir que los niveles de 5-HT se mantienen abatidos durante este periodo.

La polaridad celular se refiere a las diferencias espaciales en la forma, estructura y función de cada célula. En la corteza cerebral, las neuronas piramidales son células altamente polarizadas en las que la dendrita apical se orienta hacia la capa molecular, mientras que las dendritas basales y el axón se orientan hacia los ventrículos. En la corteza cerebral, el establecimiento de polaridad neuronal es un fenómeno prenatal que se define durante el periodo de migración de las neuronas piramidales del E12 al E17 en roedores. La polaridad neuronal permite el direccionamiento correcto de la información sináptica que es necesaria para establecer circuitos funcionales, por lo que dicho evento es crucial durante el desarrollo del SNC (Calderon de Anda *et al.*, 2008).

Con el propósito de detectar anomalías en el establecimiento de polaridad, se utilizó la tinción histológica de Golgi-Cox que nos permitió evaluar la morfología y orientación de las neuronas piramidales corticales. En el presente trabajo, se observó que la privación dietética de Trp que se realizó durante el periodo de diferenciación E8-E12 o durante el periodo de establecimiento de vías primarias E13-E17, produjo un mayor porcentaje de alteraciones en el establecimiento de polaridad de las neuronas piramidales en P20 y P40 con respecto a los grupos control.

Las anomalías morfológicas que nosotros observamos en ambos periodos de privación dietética de Trp prenatal incluyen la inversión de las neuronas piramidales corticales, es decir que en estas neuronas, la dendrita apical está orientada hacia los ventrículos y las dendritas basales están orientadas hacia la capa molecular, también observamos el surgimiento de múltiples procesos dendríticos protruyendo directamente del soma, los eventos anteriores son evidencia de la pérdida de polaridad neuronal.

Se sabe que el inicio de la migración de las neuronas piramidales coincide con la llegada de las fibras serotoninérgicas a la ZM de la corteza cerebral en donde establecen contactos primitivos con las células de CR (Janušonis *et al.*, 2004). Dado que las CR's regulan la migración de las neuronas piramidales a través de la secreción de rielina, se ha sugerido que la 5-HT podría regular indirectamente la migración neuronal a través del contacto con estas células. En el trabajo realizado por Flores-Cruz en 2012, se demostró que las CR poseen el receptor 5-HT_{1A} comprobando que el sistema serotoninérgico interactúa directamente con dichas células pioneras de la ZM. El receptor 5-HT_{1A} esta acoplado a una proteína G α i/o que se encarga de inhibir la producción de AMPc. En investigaciones previas se reportó que la administración de 5-metoxitriptamina, un antagonista inespecífico de los receptores 5-HT₁ y 5-HT₂ durante la gestación tuvo como consecuencia la disminución en la expresión de la proteína rielina secretada por las CR (Janušonis *et al.*, 2004).

Los resultados obtenidos en el trabajo de Flores-Cruz (2012), mostraron que la privación crónica de Trp durante la gestación genera un aumento de la expresión de dos isoformas de la proteína rielina, argumentando que al disminuir los niveles de 5-HT, la estimulación de los receptores 5-HT_{1A} en las CR sería menor, permitiendo que estas células secretaran una mayor cantidad de rielina.

Sabemos que la rielina que es secretada por las células de CR, se encarga de regular el patrón de migración neuronal en la corteza cerebral, y como ya se mencionó en la introducción, la carencia de esta proteína produce el fenotipo “*reeler*” que se caracteriza por la inversión en el orden de migración de las neuronas corticales (D’Arcangelo *et al.*, 1995; Frotsher *et al.*, 1997). Aunado a lo anterior también se ha observado que en los mutantes “*reeler*”, la dendrita apical de las neuronas piramidales en la corteza cerebral no tiene una orientación adecuada hacia la superficie pial e incluso se ha reportado el surgimiento de múltiples procesos dendríticos orientados en diferentes direcciones (Ladrieu y Goffinet 1981; Terashima *et al.*, 1992).

También se ha demostrado que la carencia de la proteína adaptadora Dab-1 que es indispensable para la señalización por rielina produce el mutante *scrambler*, dicho mutante posee neuronas piramidales con dendritas apicales mal orientadas y desorganizadas que en algunos casos no logran alcanzar la zona marginal. Dado que el estudio anterior se realizó durante el periodo de migración neuronal en el E16, los autores sugieren que las anomalías asociadas con el proceso precursor de la dendrita apical son secundarias a los defectos que se presentan durante la migración y que son generadas por la disminución en la señal de rielina y como resultado de un mal posicionamiento del soma neuronal (Olson *et al.*, 2006).

En los trabajos antes citados concluyen que la disminución en la señal de rielina afecta la migración de las neuronas piramidales corticales en el periodo E16-E20 y que al afectar la migración neuronal se compromete la orientación de la dendrita apical.

Por otro lado, se ha demostrado que la rielina también regula la migración de las neuronas granulares del giro dentado en periodos postnatales. Se sabe que las nuevas neuronas granulares normalmente migran hacia la zona más profunda de la capa granular en el giro dentado, sin embargo, cuando se sobre-expresa rielina en el cerebro postnatal dichas neuronas se ubican a lo ancho de toda la capa granular e incluso alcanzan la capa molecular (Pujadas *et al.*, 2010).

En conjunto, las referencias anteriores sugieren que la disminución o el aumento en la expresión de rielina afecta la migración neuronal, comprometiendo el arreglo citoarquitectónico. Nuestros resultados muestran un mayor número de alteraciones en la orientación de la dendrita apical en las neuronas piramidales en el hipocampo (arquicorteza), de los animales que fueron privados de Trp dietético, las alteraciones en P20 incluyen la desorientación y surgimiento anormal de múltiples procesos apicales directamente del soma, así como procesos apicales inconsistentemente orientados tanto en el periodo de diferenciación E8-E12 (41.00 ± 4.58 %) como en el periodo de establecimiento de vías primarias E13-E17 (52.50 ± 20.56 %), siendo este último el más sensible a la depuración dietética de Trp ya que en P40 se observó la permanencia de dendritas apicales con orientación anómala (52.66 ± 12.39 %).

La vía de señalización de notch que originalmente se describió en *Drosophila*, participa en varios procesos celulares durante el neurodesarrollo de los vertebrados que incluyen el mantenimiento y autorrenovación de los progenitores neuronales, proliferación, diferenciación y apoptosis (Lasky y Wu 2005). Se ha reportado que las neuronas recién generadas de la placa cortical, expresan NICD en el núcleo y que notch participa en el crecimiento de las neuritas en las neuronas corticales (Sestan *et al.*, 1999).

Hashimoto-Torii *et al.*, (2008), demostraron que tanto en ratones *reeler* como en ratones carentes de NICD, los neuroblastos corticales exhiben procesos primarios ectópicos que incluyen dendritas mal orientadas así como múltiples procesos protruyendo desordenadamente del soma durante el periodo de migración.

El hallazgo anterior sugirió que tanto la morfología como la migración de los neuroblastos en la corteza cerebral están reguladas por la interacción de rielina y notch. La hipótesis anterior se comprobó cuando se logró rescatar el fenotipo dendrítico normal de las neuronas del ratón *reeler* sobre-expresando NICD. El mecanismo molecular sugerido para la interacción rielina-notch indica que la rielina puede modular los niveles del fragmento NICD por medio de la degradación ubiquitina-proteosoma mediante el receptor para rielina Dab1.

El desarrollo de las dendritas es un evento crítico durante la neurogénesis, es un proceso complejo y bien orquestado que incluye el crecimiento de las dendritas, la formación del árbol dendrítico característico para cada fenotipo neuronal y la formación de espinas dendríticas. El árbol dendrítico es una estructura sumamente dinámica que puede crecer o retraerse en respuesta a la información recibida, así como también puede estabilizarse y mantenerse gracias a la señalización postsináptica (Kulkarni *et al.*, 2012).

Las alteraciones en la morfología de las dendritas o los defectos en el desarrollo neuronal, incluyen cambios en el patrón de ramificación de las dendritas, retracción o pérdida de la ramificación del árbol dendrítico y cambios en la morfología y número de espinas dendríticas. Se ha reportado que las características anteriores contribuyen con varios desórdenes neurológicos y del neurodesarrollo como son el trastorno del espectro autista, la enfermedad de Alzheimer, esquizofrenia, síndrome de Down, ansiedad y depresión (Kaufmann *et al.*, 2000; Eiland *et al.*, 2012; Kulkarni *et al.*, 2012).

El desarrollo de una enfermedad mental depende tanto de factores genéticos como ambientales y dado que la 5-HT es un neurotransmisor que aparece de manera temprana durante el desarrollo embrionario del SNC, se ha postulado que existen periodos críticos en la ontogenia del sistema serotoninérgico que pueden alterar la formación de los circuitos de las estructuras blanco y de esta manera generar cierta predisposición para la enfermedad mental (Gaspar *et al.*, 2003).

Nosotros encontramos que las neuronas piramidales de CA1 de los animales que fueron privados de Trp durante el periodo de diferenciación (E8-E12) y establecimiento de vías (E13-E17) del sistema serotoninérgico, presentan en ambos casos procesos dendríticos basales de mayor grosor y un aumento en el grosor de las dendritas apicales únicamente en el periodo (E13-E17) en P20, en P40 se observó un aumento en el grosor de las dendritas apicales en el periodo de diferenciación (E8-E12).

Se sabe que la 5-HT ejerce un efecto trófico sobre las neuronas hipocámpicas ya que es capaz de promover el crecimiento de las dendritas y la formación de sinapsis durante el desarrollo (Chubakov *et al.*, 1986). También se ha observado que las neuronas piramidales del hipocampo expresan el receptor 5-HT_{1A} a partir del E18 y que la expresión del receptor 5-HT_{1A} se produce de manera diferenciada a través del tiempo en las neuronas piramidales. Durante el estadio embrionario, el receptor se localiza en el soma, mientras que a partir del P10 su localización cambia y comienza a expresarse más abundantemente en las porciones distales de las dendritas apicales y basales (Patel y Zhou 2005).

En un estudio en el que se realizó el bloqueo farmacológico del receptor 5-HT_{1A} en ratones del P14 al P35 se reportó un aumento en el número de procesos apicales proximales de las neuronas piramidales del hipocampo, igualmente se observó que en presencia de 5-HT disminuye el número de dichos procesos, lo que sugiere que la 5-HT ejerce un efecto inhibitorio sobre el crecimiento del árbol dendrítico por medio de la activación del receptor 5-HT_{1A}. Resultados parecidos se obtuvieron con el ratón *knockout* para 5-HT_{1A}, sugiriendo que el incremento en el número de dendritas apicales proximales que se observa en *knockout* para 5-HT_{1A}, es una consecuencia de la disminución de la señalización de 5-HT mediada por el receptor 5-HT_{1A} durante un periodo crítico para el desarrollo del árbol dendrítico (Ferreira *et al.*, 2010).

En otro estudio en el que se administró fluoxetina prenatalmente (E8-E18) con la finalidad de estudiar el efecto del aumento de 5-HT durante la gestación sobre la modulación del receptor 5-HT₃ presente en las neuronas piramidales de la corteza somatosensorial, se encontró que dicha manipulación prenatal tuvo como resultado una disminución del 50% en la complejidad del árbol dendrítico en P60. Estos resultados sugieren que el aumento de la concentración de serotonina durante la gestación, tiene como consecuencia cambios en la citoarquitectura cortical a largo plazo (Smit-Rigter *et al.*, 2012).

En el presente trabajo se sugirió que durante la privación dietética de Trp, la actividad enzimática de la Tph2 pudo haber aumentado como un mecanismo de compensación por la falta de 5-HT, lo que pudiera resultar en un aumento transitorio en la concentración de 5-HT durante la gestación, nuestros resultados muestran un menor número de procesos basales en las neuronas piramidales del hipocampo de los animales que fueron privados de Trp dietético en el periodo de proliferación (E8-E12) en P20, mientras que en P40 se observó un mayor número de procesos basales.

Se ha descrito en varios sistemas que las neuronas presentan un periodo de plasticidad juvenil en el cual la conectividad puede ser modificada en respuesta a estímulos sensoriales o a cierto tipo de experiencias, especialmente en periodos críticos del desarrollo. Lo anterior permite que las neuronas obtengan nuevas características estructurales que les permitan responder de manera eficiente al medio (Yang *et al.*, 2010; Emoto 2011 y 2012).

Se sabe que la remodelación de las dendritas es un evento que ocurre en condiciones normales durante el neurodesarrollo y que también puede ocurrir en la vida adulta en respuesta a un daño o en un proceso patológico

(Chow *et al.*, 2009; Ruan *et al.*, 2006; Spigelman *et al.*, 1998). En cada caso, la selección o eliminación de las dendritas es sumamente importante para la formación y estabilización del árbol dendrítico maduro (Emoto, 2012).

La pérdida progresiva de ramificaciones en las neuronas corticales a menudo se relaciona con enfermedades psiquiátricas como esquizofrenia y trastornos neurodegenerativos como la enfermedad de Alzheimer (Emoto, 2012).

Al parecer, la estabilidad y el mantenimiento del árbol dendrítico dependen de factores que permiten estabilizar las ramificaciones existentes una vez que las neuronas han cubierto apropiadamente sus campos receptivos, por otro lado, también deben existir factores que suprimen el crecimiento del árbol dendrítico, lo que permitiría mantener la integridad del mismo en la vida adulta. Los defectos en los mecanismos que mantienen la estructura del árbol dendrítico tienen como resultado la reducción o la expansión del árbol, características que normalmente se relacionan con trastornos del neurodesarrollo (Emoto, 2012).

Se ha reportado que la desnutrición producida por la privación de alimento en etapas tempranas del desarrollo postnatal P4-P13 produce un menor número de dendritas basales en las neuronas piramidales corticales, al igual que una reducción en el grosor de dichas dendritas y un menor número de espinas, estos resultados se relacionan directamente con la carencia de nutrientes y particularmente con la disminución en la ingesta de proteínas, eventos que se reflejan en la disminución del peso corporal de las crías desnutridas con respecto a los controles (Salas *et al.*, 1974). Zhang *et al.*, (2006), demostraron que la restricción dietética de Trp durante la vida postnatal temprana P1-P28 y P28-P56 produce una reducción en el árbol dendrítico de las neuronas piramidales del campo CA1 en el hipocampo.

Cuando se realizó el análisis nutricional de la formulación de la dieta experimental libre de Trp aquí utilizada (Flores-Cruz *et al.*, 2012), se comprobó que el contenido de proteínas, carbohidratos y grasas son equivalentes en esta dieta, por lo que dicha manipulación asegura que se cubran de manera adecuada los requerimientos energéticos, y así evitar deficiencias nutricionales entre grupos. Cuando se evaluó la progresión de peso cerebral y corporal de las crías que fueron privadas de Trp durante la ventana E8-E12 no se encontraron diferencias con respecto a los controles, por lo que podemos asumir que los animales no estaban en condiciones de malnutrición. Nosotros concluimos que la 5-HT interviene en la maduración del árbol dendrítico y que la manipulación prenatal dietética de Trp genera cambios a largo plazo en la morfología de las neuronas piramidales.

Debido a que en P40 se encontró un mayor porcentaje de neuronas piramidales corticales con errores en la polaridad en las cortezas somatosensorial I y motora I en ambos grupos experimentales E8-E12 y E13-E17, se utilizó el campo abierto con la finalidad de determinar si la privación dietética de Trp tuvo consecuencias a largo plazo en la conducta de los roedores.

La prueba se realizó bajo dos condiciones de iluminación: luz tenue que asemeja las condiciones naturales de navegación de los roedores y luz intensa que representa una condición aversiva.

En el campo abierto, se observó que en condiciones de luz tenue la conducta de los animales sometidos a privación dietética de Trp durante el periodo de proliferación celular (E8-E12), fue similar a los controles, con excepción del levantamiento vertical o rearing que en esta condición fue mayor; mientras que cuando se utilizó la iluminación intensa, no se observó ninguna diferencia con respecto al comportamiento de los controles.

Por otro lado, se observó que en condiciones de luz tenue la conducta de los animales sometidos a privación dietética de Trp durante el periodo de establecimiento de vías primarias (E13-E17), fue similar a los controles; mientras que cuando se utilizó la iluminación intensa, se incrementó significativamente la presencia de bolos fecales, sin modificarse ningún otro parámetro.

En un trabajo realizado por Flores-Cruz (2012), en el que se administró crónicamente la misma dieta libre de Trp aquí utilizada del E8 al E22, se encontró un aumento en la exploración vertical en los animales sometidos a la privación prenatal de Trp, este resultado coincide con lo encontrado en la presente tesis durante el periodo de privación E8-E12.

9. CONCLUSIONES

- La privación dietética de Trp durante el periodo de diferenciación (E8-E12) del sistema serotoninérgico, produjo la disminución en la cantidad de 5-HT presente en el cerebro en P0, así como en el tallo cerebral en P20, mientras que la privación dietética de Trp durante el periodo de establecimiento de vías primarias (E13-17) del sistema serotoninérgico produjo una disminución en la cantidad de 5-HT en el tallo cerebral en P20. Se concluye que la depuración prenatal de triptófano, en ambos periodos críticos del desarrollo del sistema serotoninérgico, produce una disminución en la cantidad de 5-HT cerebral durante la vida postnatal, dicha disminución se produce de manera diferencial, siendo el periodo de diferenciación (E8-E12) el más sensible a la ausencia de Trp.
- La privación dietética de Trp durante el periodo de diferenciación (E8-E12) y de establecimiento de vías primarias (E13-E17) del sistema serotoninérgico, produjo un mayor porcentaje de alteraciones en el establecimiento de polaridad de las neuronas piramidales de las cortezas motora I y somatosensorial en P20 y P40 con respecto a los grupos control. Se concluye que la depuración prenatal de triptófano, en ambos periodos críticos del desarrollo del sistema serotoninérgico producen alteraciones morfológicas en las neuronas piramidales. Una posible explicación a este fenómeno sugiere que la interacción del sistema serotoninérgico con las células de Cajal-Retzius que regulan la migración neuronal pudiera verse afectado a nivel de la señalización celular mediada por rielina.

- La privación dietética de Trp durante el periodo de diferenciación (E8-E12) y de establecimiento de vías primarias (E13-E17) del sistema serotoninérgico en P20, produjo un mayor número de alteraciones en la orientación de la dendrita apical en las neuronas piramidales en el hipocampo (arquicorteza) con respecto a los grupos control. Dichas alteraciones permanecieron en las neuronas piramidales del grupo D-Trp 13-17, por lo que se puede concluir que este periodo es más sensible a la privación dietética de Trp para el desarrollo de las neuronas piramidales en el hipocampo.
- La privación dietética de Trp durante el periodo de diferenciación (E8-E12) del sistema serotoninérgico, produjo la hipercomplejidad del árbol dendrítico basal en las neuronas piramidales del hipocampo en P40, por lo que concluimos que la 5-HT interviene en la maduración del árbol dendrítico y que la manipulación prenatal dietética de Trp genera cambios a largo plazo en la morfología de las neuronas piramidales de manera diferencial en P40.
- La privación dietética de Trp durante el periodo de diferenciación (E8-E12) del sistema serotoninérgico, produjo un incremento en la conducta de levantamiento vertical durante la evaluación conductual en campo abierto bajo la condición de luz tenue, mientras que la privación dietética de Trp durante el periodo de establecimiento de vías primarias (E13-E17) del sistema serotoninérgico, produjo un aumento en la cantidad de bolos fecales bajo la condición de luz intensa, por lo que se concluye que la depuración prenatal de triptófano no produce alteraciones en la conducta de las ratas en la prueba del campo abierto.

10. REFERENCIAS

- Altman, J. y Bayer, S. (1990). Prolonged sojourn of developing pyramidal cells in the intermediate zone of the hippocampus and their settling in the stratum pyramidale. *J Comp Neurol*, 301: 343-364.
- Arimura, N. y Kaibuchi, K. (2007). Neuronal polarity: from extracellular signals to intracellular mechanism. *Nat Rev Neurosci*, 8:194-205.
- Archer, J. (1973). Test for emotionality in rats and mice: A review. *Anim Behav*, 21: 205-235.
- Aulich, D. (1979). Escape versus exploratory activity: An interpretation of rats behavior in the open field and a light-dark preference test. *Behavioural Process*, 1:153-164.
- Bayer, S. y Altman, J. (1990). Development of layer I and the subplate in the rat neocortex. *Exp Neurol*, 107: 48-62.
- Biggio, G., Fadda, F., Fanni, P., Tagliamonte, A. y Gessa, G. (1974). Rapid depletion of serum tryptophan, brain tryptophan, serotonin and 5-hydroxyindolacetic acid by a tryptophan-free diet. *Life Sci*, 14: 1321-1329.
- Boadle-Biber, M., Johannessen, J., Narasimhachari, N. y Phan, T. (1983). Activation of tryptophan hydroxylase by stimulation of central serotonergic neurons. *Biochem Pharmacol*, 32 (1): 185-188.
- Bonnin, A., Peng, W., Hewlett, W. y Levitt, P. (2006). Expression mapping of 5-HT1 serotonin receptor subtypes during fetal and early postnatal mouse forebrain development. *Neurosci*, 141: 781-794.
- Bonnin, A., Torii, M., Wang, L., Rakic, P. y Levitt, P. (2007). Serotonin modulates the response of embryonic thalamocortical axons to netrin-1. *Nat Neurosci*, 10:588-597.
- Blazek, R. y Shaw, DM. (1978). Tryptophan availability and brain protein synthesis. *Neuropharmacol*, 17: 1065-1068.
- Braisted, J., Catalano, S., Stimac, R., Kennedy, T., Tessier-Lavigne, S., Shatz, C. y O'Leary, D. (2000). Netrin-1 promotes thalamic axon growth and is required for proper development of the thalamocortical projection. *J Neurosci*, 20: 5792-5801.
- Bystron, I., Blackemore, C. y Rakic, P. (2008). Development of the human cerebral cortex: boulder committee revisited. *Nat Rev Neurosci*, 9: 110-122.
- Calderon de Anda, F., Gärdner, A., Tsai, Li-Huei. y Dotti, C. (2008). Pyramidal neuron polarity axis is defined at the bipolar stage. *J Cell Sci*, 121: 178-185.
- Cannizzaro, C., Plescia, F., Gangliano, M., Cannizzaro, G., Mantia, G., La Barbera, M., Provezano, G. y Cannizzaro, E. (2008). Perinatal exposure to 5-methoxytryptamine, behavioural-stress reactivity and functional response of 5-HT1A receptors in the adolescent rat. *Behav Brain Res*, 186: 98-106.

Cases, O., Vitalis, T., Seif, L., De Maeyer, E., Sotelo, C. y Gaspar, P. (1996). Lack of barrels in the somatosensory cortex of monoamine oxidase A- deficient mice: role of a serotonin excess during the critical period. *Neuron*, 16: 297-307.

Chameau, P., Inta, D., Vitalis, T., Moyer, H., Wadman, W. y van Hooft. (2009). The N-terminal region of reelin regulates postnatal dendritic maturation of cortical pyramidal neurons. *PNAS*, 106: 7227 – 7232.

Chaouloff, F. (1993). Physiopharmacological interactions between stress hormones and central serotonergic systems. *Brain Res Rev*, 18: 1-32.

Chow, D., Groszer, M., Pribadi, M., Machnik, M., Carmichael, T., Liu, X. y Trachtenberg, J. (2009). Laminar and compartmental regulation of dendritic growth in mature cortex. *Nat Neurosci*, 12: 116-118.

Chubakov, A., Gromova, E., Konovalov, G., Sarkisova, E. y Chumasov, E. (1986) The effects of serotonin on the morpho-functional development of rat cerebral neocortex in tissue culture, *Brain Res*, 369: 285–297.

Dahlström, A. y Fuxe, K. (1964) Evidence for the existence of monoamine- containing neurons in the central nervous system. I. Demonstration of monoamines in cell bodies of brainstem neurons. *Acta Physiol Scand*, Suppl, 232: 1-55.

D' Arcangelo, G., Miao, G., Chen, C., Soares, H., Morgan, J. y Curran, T. (1995) A protein related to extracellular matrix proteins deleted in the Mouse mutante reeler. *Nature*, 374: 719-723.

Deng, D., Djalali, S., Hölting, M., Große, G., Stroh, T., Voigt, I., Kusserow, H., Theuring, F., Ahnert-Hilger, G. y Hörtnagl, H. (2007). Embryonic and postnatal development of the serotonergic raphe system and its target regions in 5-HT 1A receptor deletion or overexpressing mouse mutants. *Neurosci*, 147: 388-402.

Donkelaar, E.L., Blokland, A., Ferrington, L., Kelly, P.A., Steinbusch, H.W.M y Prickaerts, J. (2011). Mechanism of acute tryptophan depletion: is it only serotonin? *Mol Psychiatr*, 16: 695-713.

Dotti, C., Sullivan, C. y Banker, G. (1988). The establishment of polarity by hippocampal neurons in culture. *J Neurosci*, 8: 1454-1468.

Eiland, L. y McEwen, B. (2012). Early life stress followed by subsequent adult chronic stress potentiates anxiety and blunts hippocampal structural remodeling. *Hippocampus*, 22: 82-91.

Emoto, K. (2011). Dendrite remodeling in development and disease. *Develop Growth Differ*, 53: 277-268.

Emoto, K. (2012). Signaling mechanisms that coordinate the development and maintenance of dendritic fields. *Curr Opin Neurobiol*, 22: 805-811.

Erzurumlu, R. y Gaspar, P. (2012). Development and critical period plasticity of the barrel cortex. *Eur J Neurosci*, 35: 1540-1553.

Fernstrom, J. y Wurtman, R. (1971). Brain serotonin content: physiological dependence on plasma tryptophan levels. *Science*, 173: 149-152.

Ferreira, T., Lo Iacono, L y Gross, C. (2010). Serotonin receptor 1A modulates actin dynamics and restricts dendritic growth in hippocampal neurons. *Eur J Neurosci*, 32: 18-26.

Fernstrom J. y Hirsch. (1977). Brain serotonin synthesis: reduction in corn malnourished rats. *J of Neurochem*, 28:877-879.

Flores-Cruz, M.G. Función neurotrófica de la 5-Hidroxitriptamina durante la ontogenia del sistema nervioso central sobre el sistema serotoninérgico y migración neuronal. Tesis (Doctora en Ciencias). México, D.F., Universidad Nacional Autónoma de México, Instituto de Investigaciones Biomédicas, 2013. 73p.

Flores – Cruz, M.G. y Escobar, A. (2012). Reduction of serotonergic neurons in the dorsal raphe due to chronic prenatal administration of a tryptophan- free diet. *Int. J. Devl Neuroscience*, 30: 63-67.

Frotscher, M. (1997). Cajal Retzius cells, Reelin, and the formation of layers. *Curr Opin Neurobiol*, 8: 570-575.

Gaspar, P., Cases, O y Maroteaux, L. (2003). The developmental role of serotonin: news from mouse molecular genetics. *Nat Rev Neurosci*, 4: 1002-1012.

Gessa, GL., Biggio, G., Fadda, F., Corsini, GU. y Tagliamonte, A. (1974). Effect of the oral administration of tryptophan-free amino acid mixtures on serum tryptophan and serotonin metabolism. *J Neurochem*, 22: 869-870.

Gessa, GL., Biggio, G., Fadda, F., Corsini, GU. y Tagliamonte, A. (1975). Tryptophan free diet: a new means for rapidly decreasing brain tryptophan content and serotonin synthesis. *Acta Vitamin Enzymol*, 29: 72-78.

González-Burgos, I., Del Angel-Meza, A., Barajas-López, G. y Feria-Velasco, A. (1996). Tryptophan restriction causes long-term plastic changes in corticofrontal pyramidal neurons. *Int J Devl Neuroscience*, 14:673-679.

Gordis, C. y Rohrer, H. (2002). Specification of catecholaminergic and serotonergic neurons. *Nat Rev Neurosci*, 3: 531-541.

Gromova, H., Chubacov, A., Chumasov, E y Konovalov, H. (1983). Serotonin as a stimulator of hippocampal cell differentiation in tissue culture. *Int J Devl Neuroscience*, 1: 339-349.

Gutknecht, L., Kriegebaum, C., Waider, J., Schmitt, A. y Lesh, KP. (2009). Spatio- temporal expression of tryptophan hydroxylase isoforms in murine and human brain: convergent data from Tph2 knockout mice. *Eur Neuropsychopharm*, 19: 266-282.

Hamon, M., Fattaccini, C., J. Adrien., Gallissat, M., Martin, P y Gozlan, H. (1988). Alterations of central serotonin and dopamine turnover in rats treated with ipsapirone and other 5- hydroxytryptamine1A agonist with potential anxiolytic properties. *J Pharmacol Exp Ther*, 246: 745-752.

Hashimoto-Torii, K., Torii, M., Sarkisian, M., Bartley, C., Shen, J., Radtke, F., Gridley, T., Šestan, N. y Rakic, P. (2008). Interaction between reelin and notch signaling regulates neuronal migration in the cerebral cortex. *Neuron*, 60: 273-284.

Hawthorne, A., Wylie, R., Landmesser, L., Deneris, E. y Siver, J. (2010). Serotonergic neurons migrate radially through neuroepithelium by dynamin – mediated somal translocation. *J Neurosci*, 30 (2): 420-430.

Hendricks, T., Francis, N., Fyodorov, D. y Deneris, E. (1999). The ETS domain factor Pet-1 is an early and precise marker of central 5-HT neurons and interacts with a conserved element in serotonergic genes. *J Neurosci*, 19: 10348-10356.

Herr, B., Gallager, D. y Roth, R. (1975). Tryptophan hydroxylase: Activation in vitro following stimulation of central serotonergic neurons. *Biochem Pharmacol*, 24(21): 2019-2023.

Hornung, Jean-Pierre. (2003). The human raphe nuclei and serotonergic system. *J Chem Neuroanat*, 26: 331- 343.

Invernizzi, R., Carli, M., Di Clemente, A. y Samanin, R. (1991). Administration of 8-hydroxy-2-(Di-n-propylamino) tetralin in raphe nuclei dorsalis and medianus reduces serotonin synthesis in the rat brain: Difference in Potency and regional sensitivity. *J Neurochem*, 56: 243-247.

Jacobs, B. y Azmitia, E. (1992). Structure and function of the brain serotonin system. *Physiol Rev*, 72: 165-229.

Janušonis, S., Gluncic, V. y Rakic, P. (2004). Early serotonergic projections to Cajal – Retzius cells: relevance for cortical development. *J Neurosci*, 24: 1652-1659.

Jonnakuty, C y Gragnoli, C. (2008). What do we know about serotonin? *J Cell Physiol*, 217:301-306.

Kaufmann, W. y Moser, H. (2000). Dendritic anomalies in disorders associated with mental retardation. *Cereb Cortex*, 10: 981-991.

Kiyasova, V., Fernandez, S., Laine, J., Stankovski, L., Muzarella, A., Doly, S. y Gaspar, P. (2011). A genetically defined morphologically and functionally unique subset of 5-HT neurons in the mouse raphe nuclei. *J Neurosci*, 31: 2756-2768.

Kulkarni, V. y Firestein, B. (2012) The dendritic tree and brain disorders. *Mol Cell Neurosci*, 50: 10-20.

Ladrieu, P. y Goffinet, A. (1981). Inverted pyramidal neurons and their axons in the neocortex of reeler mutant mice. *Cell Tissue Res*, 218: 293-301.

Lakatosova, S. y Ostatnikova. (2011). Reelin and its complex involvement in brain development and function. *Int J Biochem Cell B*, 44: 1501-1504.

Lasky, J. y Wu, H. (2005). Notch signaling, brain development and human disease. *Pediatric Research*, 57: 104-109.

Lauder, J. y Bloom, F. (1974). Ontogeny of monoamine neurons in the locus coeruleus, raphe nuclei and substantia nigra of the rat. *J Comp Neurol*, 155: 469-482.

Lauder, J. y Krebs, H. (1978). Serotonin as a differentiation signal in early neurogenesis. *Dev Neurosci*, 1: 15-30.

Lauder, J. (1990). Ontogeny of the serotonergic system in the rat: serotonin as a developmental signal. *Ann N Y Acad Sci*, 600: 297-314.

Lee, Li-Jen. (2009). Neonatal fluoxetine exposure affects the neuronal structure in the somatosensory cortex and somatosensory – related behaviors in adolescent rats. *Neurotox Res*, 15: 212-223.

Lesh, Klaus –Peter y Waider Jonas. (2012). Serotonin in the modulation of neuronal plasticity and networks: implications for neurodevelopmental disorders. *Neuron*, 76: 175-191.

Levitt, P., Barbe, M. y Eagleson, K. (1997). Patterning and specification of the cerebral cortex. *Annu Rev Neurosci*, 20: 1-24.

Lidov, H. y Molliver, M. (1982). An immunohistochemical study of serotonin neuron development in the rat: ascending pathways and terminal fields. *Brain Res Bull*, 8: 389-430.

Lytle L., Messing, R., Fisher, L y Phebus, L (1975). Effects of long-term corn consumption in brain serotonin and response to electric shock, *Science*, 190:692.694.

Louvi, A. y Artavanis-Tsakonas, S. (2006). Notch signalling in the vertebrate neural development. *Nat Rev Neurosci*, 7: 93-102.

Marcondes, F., Bianchi, F. y Tanno, A. (2002). Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. *Braz J Biol*. 62 (4A): 609-614.

Marin-Padilla, M. (2001). Evolución de la estructura de la neocorteza del mamífero: nueva teoría citoarquitectónica. *Rev Neurol*, 33(9): 843-853.

Miyazaki, K., Narita, N. y Narita, M. (2005). Maternal administration of thalidomide or valproic acid causes abnormal serotonergic neurons in the offspring: implications for pathogenesis of autism. *Int J Dev Neurosci*, 23: 287-297.

Noctor, S., Martínez-Cerdeño, V., Lidija, I y Kriegstein, A.(2004). Cortical neurons arise in symmetric and asymmetric division zones and migrate through specific phases. *Nat Neurosci*, 7:136-144.

Oldendorf WH. (1971). Brain uptake of radiolabeled amino acids, amines and hexoses after arterial injection. *AM J Physiol*, 221: 1629-1639.

Olson, E., Kim, S. y Walsh, C. (2006) Impaired neuronal positioning and dendritogenesis in the neocortex after cell-autonomous Dab1 suppression. *J Neurosci*, 26:1767-1775.

Orozco-Suárez, S., Del Ángel, A., Beas-Zárate, C., Manjarrez, G. y Feria-Velasco, A. (2003). Corn feeding during development induces changes in the number of serotonergic neurons in the raphe nuclei. *Int J Dev Neurosci*, 21:13-22.

Partridge, W. y Oldendorf, W. (1975). Kinetic analysis of blood-brain barrier transport of amino acids. *Biochim Biophys Acta*, 401: 128-136.

Patel, T. y Zhou, F. (2005). Ontogeny of 5-HT_{1A} receptor expression in the developing hippocampus. *Dev Brain Res*, 157: 42-57.

Persico, A. M., Calia, E., Moessner, R., Lesch K, P., Murphy, D, L., y Keller, F. (1998). Alterations in neonatal barrel cortex and in aging brain of serotonin transporter knockout mice. *Soc Neurosci Abs*, 24: 1111.

Persico, A. M., Mengual, E., Moessner, R., Hall, S, F., Revay, S, F., Sora, I., Arellano, J., DeFelipe, j., Giménez-Amaya, J. M., Conciatori, M., Merino, R., Baldi, A., Cabib, S., Pascucci, T., Uhl, G, R., Murphy, D, L., Lesh, P, K. y Keller, F. (2001). Barrel pattern formation requires serotonin uptake by thalamo cortical afferents, and nor vesicular monoamine release. *J Neurosci*, 21: 6862-6873.

Pfaar, H., von Holst, A., Vogt Weisenhorn, M., Brodski, C., Guimera, J. y Wurst, W. (2002). mPet-1, a mouse ETS-domain transcription factor, is expressed in central serotonergic neurons. *Dev Genes Evol*, 212: 43-46.

Pujadas, L., Gruart, A., Bosch, C., Delgado, L., Teixeira, C., Rossi, D., de Lecea, L, Martínez, A., Delgado-Gracia, J. y Soriano, E. (2010). Reelin regulates postnatal neurogenesis and enhances spine hypertrophy and long-term potentiation. *J Neurosci*, 30: 4636-4649.

Rahman, MK., Nagatsu, T., Sakurai, T., Hori, S., Abe, M. y Matsuda, M. (1982). Effect of pyridoxal phosphate deficiency on aromatic L-amino acidcarboxylase activity with L-DOPA and L-5-hydroxytryptophan as substrates in rats. *Jpn J Pharmacol*, 32:803-811.

Rind, H., Russo, A. y Wittemore, S. (2000). Developmental regulation of tryptophan hydroxylase messenger RNA expression and enzyme activity in the raphe and its target fields. *J Neurosci*, 101: 665-677.

Ruan, Y., Zou, B., Fan, Y., Li, Y., Lin, N., Zeng, Y., Gao, T., Yao, Z. y Xu, Z. (2006). Dendritic plasticity of CA1 pyramidal neurons after transient global ischemia. *Neuroscience*, 140: 191-201.

Salas, M., Diaz, S. y Nieto, A. (1973). Effects of neonatal food deprivation on cortical spines and dendritic development of the rat. *Brain Res* 73:139-144.

Salichon, N., Gaspar, P., Upton, A, L., Picaud, S., Hanoun, N., Hamon, M., De Maeyer, E., Murphy D, L., Moessner R., Lesh K, P., Hen, R. y Self, I. (2001) Excessive activation of serotonin (5-HT) 1B receptors disrupts the formation of sensory maps in monoamine oxidase and 5-HT transporter knock-out mice. *J Neurosci*, 21: 8884-896.

Schlessinger, A., Cowan, W. y Swason, L. (1978). The time of origin of neurons in ammon's horn and the associated retrohippocampal fields. *Anat Embryol*, 154: 153-173.

Sestan, N., Artavanis-Tsakonas, S. y Rackic, P. (1999). Contact-dependent inhibition of cortical neurite growth mediated by notch signaling. *Science*, 286: 741-746.

Smit-Rigter, L., Noorlander, C., Oerthel, L., Chameau, P., Smidt, M. y van Hooft. (2012). Prenatal fluoxetine exposure induces life-long serotonin 5-HT₃ receptor- dependent cortical abnormalities and anxiety – like behaviour . *Neuropharmacology*, 62: 865-870.

Smit-Rigter, L., Noorlander, C., Oerthel, L., Chameu, P., Smidt, M. y van Hooft, J. (2012). Prenatal fluoxetine exposure induces life-long serotonin 5-HT₃ receptor –dependent cortical abnormalities and anxiety-like behavior. *Neuropharmacology*, 62: 865-870.

Soriano, E y Del Rio, J. (2005). The cells of Cajal-Retzius still a mystery one century after. *Neuron*, 46: 389-394.

Spigelman, I., Yan, X., Obenaus, A., Lee, E., Wasterain, C. y Ribak, C. (1998). Dentate granule cells form novel basal dendrites in a rat model of temporal lobe epilepsy. *Neuroscience*, 86: 109-120.

Supèr, H., Soriano, E. y Uylings, H. (1998). The functions of the preplate in development and evolution of the neocortex and hippocampus. *Brain Res Rev*, 27: 40-64.

Supèr, H., Del Rio, J., Martinez, A., Pèrez – Sust, P., y Soriano, E. (2000). Disruption of neuronal migration and radial glia in the developing cerebral cortex followin ablation of Cajal-Retzius cells. *Cereb Cortex*, 10: 602-613.

Terashima, T., Takayama, C., Ichicawa, R. e Inoue, Y. (1992). Dendritic arborization of large pyramidal neurons in the motor cortex of normal and reeler mutant mouse. *Okajimas Folia Anat Jpn*, 68: 351-364.

Trakhtenberg, E. y Golberg, J. (2012). The role of serotonin in axon and dendrite growth. *Int Rev Neurobiol*, 106: 105-126.

Uylings, G., van Pelt, J., Parnavelas, A. y Ruiz-Marcos, A. (1994). Geometrical and topological characteristics in the dendritic development of cortical piramidal and non-pyramidal neurons, in : van Pelt, J., Cornel, H.B.M., Ulyngs, F.H. Lopes da Silva (Eds.), *Prog Brain Res*, 102: 109-123. *Brain Res*, 1169: 9-16.

Velasquez, J., Goeden, N., Bonnin, A. (2013). Placental serotonin: implications for the developmental effects of SSRI and maternal depression. *Front Cell Neurosci*, 47:1-7.

Vitalis, T., Cases, O., Callebert, J., Launay, J. M., Price, D, J., Seif, I. y Gaspar, P. (1998). Effects on monoamino oxidase A inhibition on barrel formation in the mouse somatosensory cortex. Determination of a sensitive developmental period. *J Comp Neurol*, 393: 169-184.

Vitalis, T. y Parnavelas, J. (2003). The role of serotonin in early cortical development. *Dev Neurosci*, 25: 245-256.

Vitalis, T., Cases, O., Passemard, S., Callebert, J. y Parnavelas, J. (2007). Embryonic depletion of serotonin affects cortical development. *Eur J Neurosci*, 26: 331-334.

Vitalis, T., Ansorge, M. y Dayer, A. (2013). Serotonin homeostasis and serotonin receptors as actors of cortical construction: special attention to the 5-HT_{3A} and 5-HT₆ receptor subtypes. *Front Cell Neurosci*, 7:1-20.

Wallace, J. y Lauder, J. (1983). Development of the serotonergic systems in the rat embryo: an immunocytochemical study. *Brain Res Bull*, 10: 459-479.

Whintaker-Azmitia, P. (2001). Serotonin and brain development: role in human developmental diseases. *Brain Res Bull*, 56:479-485.

Whintaker-Azmitia, P. y Azmitia, E. (1986). ³H-serotonin binding to brain astroglial cells differences between intact and homogenized preparations and mature and immature cultures. *J Neurochem*, 46: 1186-1189.

Whintaker-Azmitia, P., Murphy, R. y Azmitia, E. (1990). Stimulation of astroglial 5-HT_{1A} receptor releases the serotonergic growth factor, protein S-100, and alters astroglial morphology. *Brain Res*, 528: 155-158.

Whintaker-Azmitia, P., Clarke, C y Azmitia, E. (1993). Localization of 5-HT_{1A} receptors to astroglial cells in adult rats: implications for neuronal-glial interactions and psychoactive drug mechanism. *Synapse*, 14: 201-205.

Yang, Y., Kim, A. y Bonni, A. (2010). The dynamic ubiquitin ligase duo: Cdh1-APC and Cdc20-APC regulate neuronal morphogenesis and connectivity. *Curr Opin Neurobiol*, 20: 92-99.

Yuwiler, A., Oldendorf, W.H., Geller, E. y Braun, L. (1977). Effects of albumin binding and amino acid competition on tryptophan uptake into brain. *J Neurochem*, 28: 1015-1023.

Zhang . L., Guadarrama, L., Corona – Morales, A., Vega Gonzales, A., Rocha, L. y Escobar, A. (2006). Rats subjected to extended tryptophan restriction during early postnatal stage exhibit anxious – depressive features and structural changes. *J Neuropathol Exp Neurol*, 65: 562-570.

Zhou, F.C., Sari, Y., Zhang, J.K., Goodlett, C.R., Li, T., 2001a. Prenatal alcohol exposure retards the migration and development of serotonin neurons in fetal C57BL mice. *Dev Brain Res*, 126: 147–155.

11. ANEXO I

Composición de las dietas D-Trp y D+Trp

Ingredientes	Cantidad
Harina de maíz	500g
Caseína hidrolizada	300g
Azúcar de mesa	110g
Aceite de maíz	50g
Celulosa	20g
Mezcla de minerales	10g
Mezcla de vitaminas	3g Berocca ^{MR} + 3g Centrum ^{MR} =6g
L-metionina	2g
L-triptófano (solo D+Trp)	2g

Para la elaboración de los pellets de dieta se mezclaron los ingredientes secos, se incorporaron el aceite de maíz y 250mL de agua ultrapurificada, a la D-Trp, se le añadió colorante comestible amarillo, con la finalidad de distinguir la dieta experimental de la dieta control, a la D+Trp se le agregó triptófano y se le añadió colorante comestible rojo. Una vez agregados todos los ingredientes, se amasó la mezcla y se moldeó en forma de pellet, finalmente se dejaron secar los pellets a temperatura ambiente.

12. ANEXO II

Composición de la dieta Chow

Harlan Laboratories

2019

Teklad Global 19% Protein Extruded Rodent Diet

Product Description- 2019 is a fixed formula, non-autoclavable diet manufactured with high quality ingredients and designed to support gestation, lactation, and growth of rodents. It is particularly useful for poorly breeding strains of rodents and genetically engineered stocks and strains. 2019 does not contain alfalfa or soybean meal, minimizing the occurrence of natural phytoestrogens, which can be beneficial for reproductive toxicology. Typical isoflavone concentrations (daidzein + genistein aglycone equivalents) range from non-detectable to 20 mg/kg. Exclusion of alfalfa reduces chlorophyll, improving optical imaging clarity. Absence of animal protein and fish meal minimizes the presence of nitrosamines. The extruded form ensures that despite its high fat content, it remains firm with minimal wastage. **Also available certified (2019C) and irradiated (2919). For autoclavable diet, refer to 2019S (Sterilizable).**

Ingredients (in descending order of inclusion)- Ground wheat, ground corn, corn gluten meal, wheat middlings, soybean oil, calcium carbonate, dicalcium phosphate, brewers dried yeast, L-lysine, iodized salt, magnesium oxide, choline chloride, DL-methionine, calcium propionate, L-tryptophan, vitamin E acetate, menadione sodium bisulfite complex (source of vitamin K activity), manganous oxide, ferrous sulfate, zinc oxide, niacin, calcium pantothenate, copper sulfate, pyridoxine hydrochloride, riboflavin, thiamin mononitrate, vitamin A acetate, calcium iodate, vitamin B₁₂ supplement, folic acid, biotin, vitamin D₃ supplement, cobalt carbonate.

Macronutrients		
Crude Protein	%	19.0
Fat (acid hydrolysis) ^a	%	9.0
Carbohydrate (available) ^b	%	44.9
Crude Fiber	%	2.6
Neutral Detergent Fiber ^c	%	12.1
Ash	%	5.0
Energy Density ^d	kcal/g (kJ/g)	3.3 (13.8)
Calories from Protein	%	23
Calories from Fat	%	22
Calories from Carbohydrate	%	55
Minerals		
Calcium	%	0.9
Phosphorus	%	0.7
Non-Phytate Phosphorus	%	0.4
Sodium	%	0.1
Potassium	%	0.4
Chloride	%	0.4
Magnesium	%	0.2
Zinc	mg/kg	60
Manganese	mg/kg	80
Copper	mg/kg	15
Iodine	mg/kg	6
Iron	mg/kg	200
Selenium	mg/kg	0.23
Amino Acids		
Aspartic Acid	%	1.1
Glutamic Acid	%	3.5
Alanine	%	1.2
Glycine	%	0.7
Threonine	%	0.6
Proline	%	1.8
Serine	%	0.9
Leucine	%	2.3
Isoleucine	%	0.8
Valine	%	0.9
Phenylalanine	%	1.1
Tyrosine	%	0.5
Methionine	%	0.5
Cystine	%	0.3
Lysine	%	0.9
Histidine	%	0.4
Arginine	%	0.8
Tryptophan	%	0.2

Standard Product Form: Extruded

Vitamins		
Vitamin A ^{e,1}	IU/g	15.0
Vitamin D ₃ ^{e,9}	IU/g	1.5
Vitamin E	IU/kg	110
Vitamin K ₃ (menadione)	mg/kg	50
Vitamin B ₁ (thiamin)	mg/kg	17
Vitamin B ₂ (riboflavin)	mg/kg	15
Niacin (nicotinic acid)	mg/kg	75
Vitamin B ₆ (pyridoxine)	mg/kg	18
Pantothenic Acid	mg/kg	33
Vitamin B ₁₂ (cyanocobalamin)	mg/kg	0.08
Biotin	mg/kg	0.40
Folate	mg/kg	4
Choline	mg/kg	1200
Fatty Acids		
C18:0 Palmitic	%	0.9
C18:0 Stearic	%	0.2
C18:1ω9 Oleic	%	1.7
C18:2ω6 Linoleic	%	3.9
C18:3ω3 Linolenic	%	0.4
Total Saturated	%	1.2
Total Monounsaturated	%	1.7
Total Polyunsaturated	%	4.4
Other		
Cholesterol	mg/kg	--

^a Ether extract is used to measure fat in pelleted diets, while an acid hydrolysis method is required to recover fat in extruded diets. Compared to ether extract, the fat value for acid hydrolysis will be approximately 1% point higher.

^b Carbohydrate (available) is calculated by subtracting neutral detergent fiber from total carbohydrates.

^c Neutral detergent fiber is an estimate of insoluble fiber, including cellulose, hemicellulose, and lignin. Crude fiber methodology underestimates total fiber.

^d Energy density is a calculated estimate of *metabolizable energy* based on the Atwater factors assigning 4 kcal/g to protein, 9 kcal/g to fat, and 4 kcal/g to available carbohydrate.

^e Indicates added amount but does not account for contribution from other ingredients.

^f 1 IU vitamin A = 0.3 µg retinol

⁹ 1 IU vitamin D = 25 ng cholecalciferol

For nutrients not listed, insufficient data is available to quantify.

Nutrient data represent the best information available, calculated from published values and direct analytical testing of raw materials and finished product. Nutrient values may vary due to the natural variations in the ingredients, analysis, and effects of processing.

Teklad Diets are designed and manufactured for research purposes only.

harlanTM
Helping you do research better



Harlan, Harlan Laboratories, Helping you do research better, and the Harlan logo are trademarks and trade names of Harlan Laboratories, Inc. © 2005 Harlan Laboratories, Inc.