



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

EFFECTO DE LA DIETA CETOGÉNICA SOBRE LA EXPRESIÓN
DEL COTRANSPORTADOR CATIÓN-CLORO NKCC1 EN EL
GIRO DENTADO DE LA RATA

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

P R E S E N T A

JERÓNIMO CRUZ KARINA

DIRECTORA DE TESIS: DRA. LETICIA GRANADOS ROJAS

ASESORA DE TESIS: DRA. ISABEL SOTO CRUZ

CIUDAD DE MÉXICO 2017





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

El presente trabajo de tesis se realizó inicialmente en el laboratorio de Neuromorformetría y posteriormente en el laboratorio de Neurociencias de la Torre de Investigación del Instituto Nacional de Pediatría, bajo la dirección de la Dra. Leticia Granados Rojas y la asesoría de la Dra. María Isabel Soto Cruz, del laboratorio No. 9 PB, UMIEZ, de la FES Zaragoza.

El trabajo forma parte del protocolo vigente titulado "Efecto de la dieta cetogénica sobre la expresión de los co-transportadores catión-cloro NKCC1 y KCC2 en el hipocampo de la rata, posible efecto anticonvulsivo", con número de registro 085/2010 ante el Comité de Investigación del Instituto Nacional de Pediatría, cuyo responsable es la Dra. Leticia Granados Rojas y fue aprobado por el Comité del Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL).

El estudio se llevó a cabo con el apoyo de los recursos económicos del proyecto del Fondo Sectorial de CONACYT no. 86784 otorgado a la Dra. Leticia Granados Rojas y de los Fondos Federales modalidad A y B del Instituto Nacional de Pediatría otorgados a la Dra. Leticia Granados Rojas.

Agradecimientos

- Al Instituto Nacional de Pediatría, por permitirme realizar el trabajo de tesis en sus instalaciones.
- A la Dra. Leticia Granados Rojas, por su dirección, confianza y todo el apoyo para la realización de este proyecto.
- A la Dra. Isabel Soto Cruz, responsable laboratorio 9 PB, UMIEZ, de la FES Zaragoza, por asesorarme durante la realización del proyecto.
- A la Biol. Tarsila Elizabeth Juárez Zepeda por el apoyo durante la elaboración del proyecto.
- Al Dr. José Maldonado de la Compañía Internacional MBF Bioscience, U.S.A. por la instrucción al programa Stereo Investigator.
- Al Dr. Miguel Tapia Rodríguez, responsable de la Unidad de Microscopía del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM, por la asesoría técnica en estereología.
- Al personal del Bioterio: MVZ Raúl Jairo Hernández Valencia y Sr. Gilberto Cárdenas Marcial, por su apoyo técnico.
- A los sinodales: Dra. Teresa Corona, Mtra. Yolanda Flores Cruz, Q. F. B. Enrique Escalera Zuñiga, Dra. María Isabel Soto Cruz y Dra. Leticia Granados Rojas, por haber invertido parte de su tiempo para revisar el presente trabajo.
- A los Fondos Federales del INP otorgados a la Dra. Leticia Granados Rojas por el apoyo económico para la impresión del presente trabajo de tesis.

Dedicatorias

A mi mamá y mi papá

A mis hermanas y hermano

A mis sobrinos y sobrinas

A mis abuelitas

A mi ñoño

A mis amigos y amigas de la FES Zaragoza

A mis amigas y amigos del INP

A las doctoras Leticia e Isabel

A los animales de experimentación

Por todo el apoyo que me han brindado en las diferentes etapas de mi desarrollo personal y profesional. ¡Gracias!

ÍNDICE

1. RESUMEN	1
2. INTRODUCCIÓN	2
3. MARCO TEÓRICO	3
4.1. Dieta cetogénica	3
4.1.1. Historia de la dieta cetogénica	3
4.1.2. Indicaciones clínicas de la dieta cetogénica	5
A. Errores congénitos del metabolismo	5
B. Diabétes mellitus II	6
C. Cáncer	6
D. Enfermedades neurodegenerativas	7
E. Tratamiento del sobrepeso y la obesidad	7
F. Epilepsia refractaria	8
4.1.3. Tipos de dieta cetogénica	8
A. Dieta clásica	9
B. Dieta con triglicéridos de cadena media	9
C. Dieta de Atkins	9
D. Dieta de alto índice glucémico	10
4.1.4. Contraindicaciones de la dieta cetogénica	10
A. Efectos adversos de la dieta cetogénica	11
4.1.5. Mecanismo de acción de la dieta cetogénica	11
4.2. Sistema nervioso central	14

4.2.1. Formación hipocámpica	17
4.3. Neurotransmisores	19
4.3.1. Ácido gama amíno butírico	20
4.4. Cotransportadores catión-cloro	21
4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	25
5. HIPÓTESIS	27
6. OBJETIVOS	28
8. MATERIAL Y MÉTODO	29
8.1. Diseño experimental	29
8.1.1. Tipo de estudio	29
8.1.2. Población de estudio	29
8.1.3. Variables	29
8.2. Técnicas	30
8.2.1. Manejo de animales	30
8.2.2. Grupos	30
8.2.3. Tipo de alimento	31
8.2.4. Tratamiento nutricional	32
8.2.5. Valoración de la cetosis	33
8.2.6. Cuantificación del peso corporal	33
8.2.7. Perfusión intracardiaca	33
8.2.8. Preservación de los cerebros	34
8.2.9. Selección de los cortes	35
8.2.10. Inmunohistoquímica	35

8.2.11. Pruebas estereológicas	37
8.2.12. Cuantificación del área, volumen y número de células inmunorreactivas a NKCC1	38
8.2.13. Análisis estadístico	39
9. RESULTADOS	41
9.1. Peso corporal	41
9.2. Glucosa	43
9.3. β -hidroxibutirato	45
9.4. Peso cerebral	46
9.5. Inmunorreactividad al cotransportador NKCC1	48
9.6. Análisis estereológico	50
9.6.1. Comparaciones entre grupos (DN vs DC)	54
9.6.2 Comparaciones intra grupos (DN o DC)	56
9.6.2.1. Área de la capa molecular, granular e hiliar	56
9.6.2.2. Volumen de la capa molecular, granular e hiliar	62
9.6.2.3. Número de células IR-NKCC1 de la capa molecular, granular e hiliar	64
10. DISCUSIÓN	66
11. CONCLUSIONES	74
12. PERSPECTIVAS	75
13. REFERENCIAS	76
14. ANEXOS	85

1. RESUMEN

Los cotransportadores catión-cloro NKCC1 y KCC2, son proteínas de membrana que transportan cloruro dentro y fuera de la célula respectivamente y determinan en parte la concentración intracelular de cloruro; dicha concentración a su vez, determina la fuerza y polaridad de la neurotransmisión mediada por el ácido gama aminobutírico (GABA). Por otro lado, la dieta cetogénica (DC) es una dieta alta en grasas y baja en hidratos de carbono, que se utiliza como tratamiento no farmacológico en diversas enfermedades, principalmente en la epilepsia. Su mecanismo de acción es desconocido, pero se conoce que la DC aumenta los cuerpos cetónicos como el β -hidroxibutirato. Se tiene evidencia de que el β -hidroxibutirato podría modificar la actividad de NKCC1 además de reducir la acción despolarizante del GABA, por lo que el objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de la dieta cetogénica, aplicada durante un periodo largo, sobre el número de células que expresan NKCC1 en el giro dentado de la rata. Se utilizaron ratas macho Sprague-Dawley divididas al azar en dos grupos alimentados con dieta normal y DC durante tres meses. Al inicio y al final del tratamiento se registró el peso corporal y los niveles en sangre de glucosa y β -hidroxibutirato. Al final del experimento se sacrificó a los animales bajo anestesia, se extrajeron los cerebros, y se obtuvieron series de cortes coronales de 50 μm , que fueron procesados mediante inmunohistoquímica para evidenciar la presencia del cotransportador NKCC1. El análisis de las capas del giro dentado (molecular, granular e hilar) fue realizado por estereología, donde se obtuvo el área, volumen y número de células inmunorreactivas a NKCC1 (IR-NKCC1) de cada región. Se realizaron pruebas estadísticas con $p \leq 0.05$. Los resultados indicaron que la DC por sí sola no modifica el área, volumen y número de células IR-NKCC1 en ninguna de las zonas analizadas, por lo que es probable que para observar sus efectos sobre este cotransportador, sea necesaria una condición patológica previa.

2. INTRODUCCIÓN

La dieta cetogénica es un régimen alimenticio capaz de inducir cetosis sistémica al aumentar los niveles sanguíneos de cuerpos cetónicos. Su alto contenido en grasas y bajo en hidratos de carbono produce metabolitos que son semejantes a los generados durante la cetosis por inanición, estos derivados de la cetosis son utilizados como fuente principal de energía para el cerebro. Bajo este esquema, la dieta cetogénica es usada como tratamiento alternativo contra la epilepsia refractaria a medicamentos y otras enfermedades del sistema nervioso central.

Sin embargo, aún se desconoce el mecanismo de acción por el cual la dieta cetogénica es eficaz para estas enfermedades.

Por esta razón se estudió el efecto que tiene la dieta cetogénica sobre la expresión del cotransportador NKCC1, que introduce iones cloruro a las células determinando la concentración intracelular de cloruro y que a su vez modulan la fuerza y polaridad del GABA, por lo que podría ser uno de los responsables de la hiperexcitabilidad neuronal.

Debido a que el hipocampo es una zona del cerebro que se ve afectada en algunas enfermedades neurológicas, sus tres capas del giro dentado fueron las seleccionadas para observar si la dieta cetogénica inducía algún efecto sobre la expresión del cotransportador NKCC1 después de una administración de 3 meses de alimento a un grupo experimental de ratas.

3. MARCO TEÓRICO

4.1. Dieta cetogénica

La dieta cetogénica se define como un alimento con alto contenido en grasas y bajo en hidratos de carbono, que conserva la cantidad proteica necesaria. Es usado como tratamiento no farmacológico para pacientes con epilepsia de difícil control o refractaria a medicamentos^{1, 2}. La dieta cetogénica fue desarrollada en 1921, con el objetivo de mimetizar en el organismo las alteraciones bioquímicas asociadas al ayuno, cuando los cuerpos cetónicos son el principal combustible para producir energía en el sistema nervioso central³.

Inicialmente fue diseñada con el objetivo de disminuir y controlar las crisis producidas en la epilepsia, pero se ha demostrado que también presentan un efecto terapéutico en otras enfermedades neurológicas como, Alzheimer^{4, 5}, enfermedad de Parkinson^{4, 6, 7}, autismo^{4, 8}, enfermedades oncológicas^{4, 6, 9, 10}, inflamatorias^{4, 6, 11} mitocondriales^{4, 6} y sobre el envejecimiento celular⁴.

4.1.1. Historia de la dieta cetogénica

Debido a que la dieta cetogénica fue diseñada para tratar las crisis de la epilepsia, los primeros registros de este tratamiento comienzan con el empleo del ayuno como la única medida terapéutica contra la epilepsia, esto fue registrado en la colección de Hipócrates en el siglo V A. C.; Galeno en el 200 A. C, consideraba que una mala alimentación podría ser un agente causal de la epilepsia al principio de la adolescencia, y recomendaba la restricción de algunos alimentos. En la Biblia, Marcos relata la historia de como Jesús cura un niño epiléptico con oración y ayuno^{12,13}.

En el siglo XX se iniciaron los primeros estudios para imitar los efectos bioquímicos de inanición en diversas regiones, en el año de 1911 en Europa los médicos franceses Guelpa y Marie la estudiaron; mientras que en Estados Unidos, el fisicoculturista Bernard y el médico homeópata Conklin realizaron estos estudios; en 1921, el endocrinólogo H. Rawle Geyelin, y posterior a él, los médicos Cobb y W. G. Lennox, entre otros, observaron que había disminución en las crisis de los pacientes con epilepsia, después de tener periodos de ayuno^{12, 14}.

Basados en los antecedentes, en 1921, se hicieron dos observaciones fundamentales: Woodyatt señaló que la acetona, el ácido acetoacético o acetoacetato y el ácido β -hidroxibutírico o β -hidroxibutirato, aparecen en sujetos sanos, bajo inanición o cuando consumen una dieta con muy bajas proporciones de hidratos de carbono y con proporciones demasiado altas de grasas. Al mismo tiempo en la Clínica Mayo, Wilder sugirió que, con una dieta con un alto contenido de grasas y con un bajo porcentaje de hidratos de carbono, se tendría una respuesta metabólica similar al ayuno y nombro a esta dieta, "dieta cetogénica"^{3, 14}, él especuló que el efecto sedativo de la cetosis producía la acción antiepiléptica, debido al aumento del ácido acetoacético y acetona, asumio que los cuerpos cetónicos actuaban como agentes anestésicos¹⁵. Posteriormente, en 1925 Peterman publicó el cálculo de la dieta cetogénica y su implementación en condiciones similares a la actual dieta cetogénica clásica y señaló la importancia de personalizar el tratamiento¹⁴.

Durante los años cuarenta, con la aparición de los nuevos fármacos antiepilépticos, la dieta cetogénica cayó en desuso; sin embargo, en octubre de 1994 regreso el interés

por la dieta cetogénica cuando se dio a conocer el caso de Charlie, un niño de 2 años de edad con crisis generalizadas intratables, que mejoró rápidamente al recibir tratamiento con dieta cetogénica por el Dr. Freeman en el hospital Johns Hopkins. Por consiguiente el padre de Charlie creó la Fundación Charlie. Esta fundación difunde videos informativos sobre la dieta y apoya estudios para evidenciar la eficacia de la dieta cetogénica. Con esto, en los últimos 20 años la dieta cetogénica se retomó como tratamiento de la epilepsia refractaria ya que se demostró su mayor efectividad, sin embargo varios médicos aún desconfían de su uso^{12, 13, 14}.

Debido a sus efectos benéficos, se ha propuesto su aplicación en otras patologías.

4.1.2. Indicaciones clínicas de la dieta cetogénica

La dieta cetogénica tiene muchos efectos y es posible que opere por diversos mecanismos en diferentes enfermedades.

A. Errores congénitos del metabolismo

La dieta cetogénica, produce los mejores resultados en los niños con epilepsia o trastornos del movimiento producidos por mutaciones en el gen GLUT-1, que es el transportador de la glucosa a través de la barrera hematoencefálica; la dieta cetogénica es una fuente de energía alternativa para el sistema nervioso central ante la hipoglucemia cerebral debida a la deficiencia de este transportador¹⁶.

Los pacientes con déficit de piruvato deshidrogenasa pueden mostrar mejoría con la dieta. La deficiencia en la piruvato deshidrogenasa afecta la propiedad de la célula de convertir el piruvato en acetil-CoA afectando al flujo de precursores desde la glucólisis al ciclo de los ácidos tricarboxílicos y limitando la producción de energía mitocondrial¹⁶.

En la deficiencia de fosfofructocinasa no se convierte la fructosa-6-fosfato a fructosa-1,6-bifosfato, los pacientes que toman dieta cetogénica, presentan una mejoría en la fuerza muscular y el desarrollo psicomotor¹⁶.

B. Diabétes mellitus II

La dieta cetogénica mejora el perfil glucémico, provocando un cambio metabólico, de glucolítico a lipolítico, de tal forma que la principal fuente de energía es la grasa en lugar de la glucosa. Esto evita la resistencia a la insulina que origina la incapacidad para disminuir los niveles de glucosa en la sangre debido a una inhibición en la captación de glucosa por las células y la síntesis del glucógeno. La dieta cetogénica puede disminuir la glucosa en la sangre, insulina y hemoglobina A_{1c}^{17, 18}.

Debido a que el β -hidroxibutirato reduce la respuesta molecular a la glucosa, se piensa que manteniendo por tiempo prolongado la dieta cetogénica, se produciría un aumento de este cuerpo cetónico y esto podría prevenir la nefropatía diabética¹⁶.

C. Cáncer

La dieta cetogénica puede tener un papel primordial en el tratamiento de los procesos con proliferación celular. Los tejidos normales se pueden adaptar a utilizar las cetonas como fuente de energía en vez de la glucosa, pero las células malignas no tienen el mismo grado de flexibilidad metabólica y no se adaptan, la mayoría de los tumores, expresan anomalías en el número y la función de sus mitocondrias esto impediría la utilización de cuerpos cetónicos para la producción de energía ya que las mitocondrias funcionales son necesarias para la oxidación de cetonas por lo que reducen su proliferación celular. Por otro lado, se ha sugerido que la glucosa es altamente utilizada

para el crecimiento de las células cancerosas y de esta forma escapar del estrés oxidativo generado por la alteración del metabolismo del oxígeno mitocondrial, por lo tanto, es posible que la dieta cetogénica reduzca la transformación de las células malignas debido a que los cuerpos cetónicos pueden ser tóxicos para las células cancerígenas^{4, 6, 9, 10, 16}.

D. Enfermedades neurodegenerativas

Al parecer, la dieta cetogénica aumenta la función mitocondrial por medio de diversas vías en algunas enfermedades neurodegenerativas. Es incierto si el mecanismo puede ser por la producción de cuerpos cetónicos, por los ácidos grasos, o bien por el cambio metabólico que produce, sin embargo, modelos animales sugieren que la restricción calórica por sí misma ya es protectora a estas enfermedades¹⁶.

En la enfermedad de Parkinson se cree que la afección de la mitocondria produce la muerte de neuronas dopaminérgicas de la sustancia negra, se cree que las cetonas pueden ser una fuente de energía alterna y aumentar la función mitocondrial y producción de ATP^{4, 6, 7, 16}.

En el Alzheimer se cree que el principal problema es la presencia de placas que contienen proteína amiloidea y el β -hidroxibutirato puede ser un protector directo, al igual que el uso de ácidos grasos esenciales^{4, 5}.

E. Tratamiento del sobrepeso y la obesidad

Las dietas cetogénicas generalmente provocan más saciedad, lo que se debe al alto contenido de lípidos y proteínas, que son más difíciles de digerir. Esto puede conllevar a un menor consumo de calorías, lo que finalmente también puede influir en la pérdida

de peso ya que la dieta tiene un mayor efecto saciante, específicamente reduciendo las concentraciones plasmáticas de colesterol total y triglicéridos, además, aumenta los niveles de colesterol HDL. Sin embargo, no se ha observado que tenga efectos benéficos sobre las concentraciones de colesterol LDL^{6,18}.

F. Epilepsia refractaria

La dieta cetogénica se ha utilizado en pacientes con epilepsia resistente a los fármacos, pero también como tratamiento en ciertos síndromes epilépticos. Es muy poco probable que un solo mecanismo explique los efectos benéficos de la dieta, parece que todos estos cambios coordinados son estabilizadores de la función sináptica y aumentan la resistencia a las convulsiones a través del cerebro¹⁶.

Para cada patología se emplean distintos tipos de dieta ya que cada una tiene características especiales.

4.1.3. Tipos de dieta cetogénica

No existe alguna recomendación específica de un tipo concreto de dieta en función del tipo de enfermedad. Las necesidades nutricionales están basadas en las particularidades de cada paciente.

Desde que en 1921 Wilder analizó el efecto anticonvulsivante de la cetosis generada por el ayuno, y de conservar dicho efecto al administrar y modificar la composición de la dieta, se han propuesto varias modificaciones a la dieta cetogénica, con el objetivo de aumentar la palatabilidad y la diversificación alimentaria y disminuir los efectos secundarios¹⁹.

A. Dieta clásica

En estas dietas cetogénicas llamadas clásicas, el 87-90% de la energía procede de la grasa de los alimentos, pudiendo variar su relación con el contenido en hidratos de carbono y proteínas. La dieta cetogénica en relación 3:1 o 4:1 nos indica que por cada 3 o 4 gramos de grasa se administra 1 gramo de carbohidratos y proteínas¹⁹. En la dieta clásica hay restricción de líquidos con el objetivo de disminuir la pérdida de cuerpos cetónicos a nivel renal¹⁹.

El siguiente tipo de dieta que se elaboró fue al sustituir los ácidos grasos saturados por ácidos grasos polinsaturados, para evitar que aumentaran los niveles de lipoproteína Apo B y disminuir el colesterol HDL. Con esta dieta se obtiene un nivel mayor de cetosis¹⁹.

B. Dieta con triglicéridos de cadena media

La dieta con triglicéridos de cadena media son más cetogénicos que los triglicéridos de cadena larga propuesta por el Dr. Peter Huttenlocher, fue ideada para mejorar la aceptación al paladar y disminuir los efectos secundarios gastrointestinales. Tiene un aporte calórico de 60-70% de grasas, 10% de proteína y 19% de hidratos de carbono; esta dieta tiene mayor poder cetogénico gracias a los triglicéridos de cadena media, aún cuando aumenta la cantidad de proteínas y carbohidratos permitida en la alimentación^{16, 19}.

C. Dieta de Atkins

La dieta de Atkins consiste en la ingesta libre de proteínas y grasas y en la restricción de carbohidratos. Se ha usado desde hace mucho tiempo en el tratamiento del sobrepeso y la obesidad e induce un estado de cetosis como la dieta cetogénica. Es

mucho más fácil acostumbrarse a su consumo que con la dieta cetogénica, ya que la única restricción es la de carbohidratos, pudiendo tomar libremente todo tipo de alimentos proteicos, agua, y no precisando para su inicio un protocolo estricto ni el ingreso en el hospital. En la dieta de Atkins modificada se potencia el consumo de grasa sobre el de proteína y se reduce la ingesta de carbohidratos a 10 gramos al día, se ha administrado en niños con epilepsia refractaria en los que ha demostrado ser efectiva^{16,19}.

D. Dieta de bajo índice glucémico

El índice glucémico o índice glicémico es un sistema para cuantificar la respuesta glucémica de un alimento que contiene la misma cantidad de hidratos de carbono que un alimento de referencia, generalmente glucosa o pan blanco al que se asigna arbitrariamente un índice de 100 g. Esta es una dieta rica en grasas (60% de las calorías), aunque permite un aporte de hidratos de carbono mayor que las otras dietas y solo se permite el consumo de los alimentos, que tienen un índice glucémico menor a 50 g^{3,16}.

4.1.4. Contraindicaciones de la dieta cetogénica

Las patologías como la deficiencia de piruvato carboxilasa, el déficit de carnitina, la porfiria u otros trastornos de la oxidación de los ácidos grasos, son contraindicaciones al uso de la dieta cetogénica ya que su administración puede ser fatal por la incapacidad de los tejidos extra hepáticos de utilizar ácidos grasos como fuente de energía y del mismo hígado de no generar cuerpos cetónicos^{3, 16}

A. Efectos adversos de la dieta cetogénica

Algunos autores consideran la dieta cetogénica poco equilibrada y por tanto, puede acarrear efectos secundarios con su empleo a corto y largo plazo. Los efectos indeseables a corto plazo incluyen estreñimiento, acidosis leve e hipoglucemia en el periodo inicial de ayuno, deshidratación, diarrea, dolor abdominal. A largo plazo se ha presentado detención del crecimiento, alteración de las concentraciones de lípidos en suero, alteración de la función cardíaca, litiasis renal, alteración del metabolismo óseo, deficiencias nutricionales y efectos adversos sobre la función inmunológica y hematológica^{16,19,20}.

4.1.5. Mecanismo de acción de la dieta cetogénica

Cuando el cuerpo se ve privado de la glucosa, se induce la producción de los cuerpos cetónicos: ácido acetoacético, acetona y β -hidroxibutirato, los cuales se forman a partir de la degradación de los ácidos grasos. La acetona al ser muy volátil es eliminada por la exhalación, mientras que los otros cuerpos cetónicos cruzan la barrera hematoencefálica donde pueden ser utilizados por el cerebro para obtener energía. El objetivo de la dieta cetogénica es simular la respuesta del cuerpo a la inanición mediante la producción de estos cuerpos cetónicos^{6, 21} (figura 1).

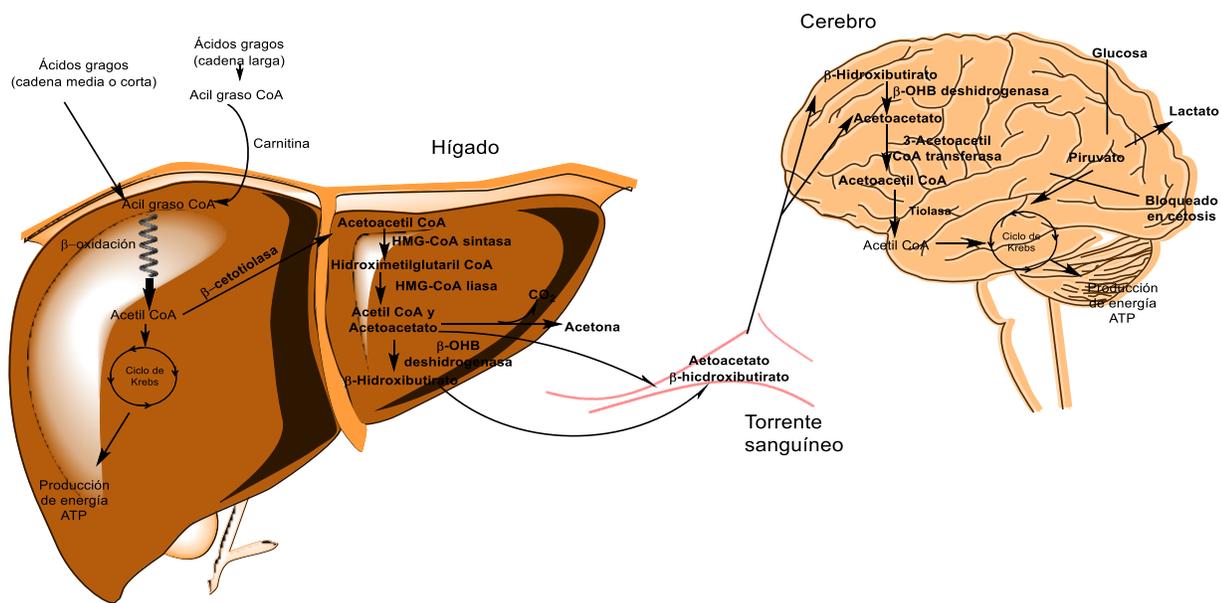


Figura 1. Síntesis de cuerpos cetónicos y su utilidad. En el hígado los ácidos grasos libres se convierten en acil-CoA que entran a la mitocondria para oxidarse en la vía de la β -oxidación y producir acetil-CoA. Esta molécula puede entrar en el ciclo de Krebs para generar energía cuando hay un exceso de acetil-CoA se producen los cuerpos cetónicos: acetoacetato por la hidroximetilglutaril-liasa (HMG-CoA liasa), β -hidroxiacetato, por la β -hidroxiacetato deshidrogenasa (β -OHB deshidrogenasa) y acetona, que son transportados desde la sangre a diferentes tejidos. La acetona es muy volátil y se elimina del cuerpo con el aire aspirado. En el cerebro, corazón o músculo, los cuerpos cetónicos producidos en el hígado se utilizan como fuente de energía en forma de acetil-CoA. Este proceso depende de enzimas mitocondriales importantes tales como la β -OHB deshidrogenasa que convierte al β -hidroxiacetato en acetoacetato, y posteriormente se produce acetoacetil-CoA por medio de la 3-cetoacetil-CoA transferasa, que participan en la formación de acetoacetil-CoA a partir de acetoacetato, la acetoacetil-CoA se convierte en acetil-CoA, que entra en el ciclo de Krebs y produce energía. La falta de glucosa impide que se lleve a cabo la glucólisis⁶ Imagen elaborada a partir de: Rubstein et al. 2011²², Melo et al. 2006²³, Branco et al. 2016⁶ y Boyer 2000²¹.

Los mecanismos de acción de la dieta cetogénica aún son desconocidos, se atribuye a un aumento en las concentraciones sericas de lípidos, la acidosis, deshidratación y alteraciones electrolíticas, sin embargo, los fundamentos no son claros¹⁵ (figura 2).

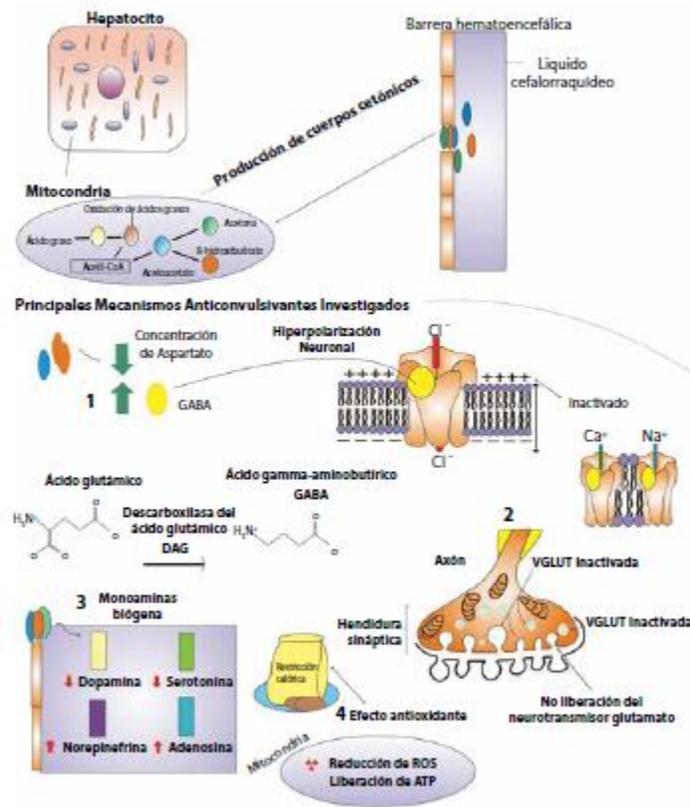


Figura 2. Producción de cuerpos cetónicos y mecanismos de acción propuestos para la dieta cetogénica como anticonvulsivante: 1. Aumento del neurotransmisor ácido gama aminobutírico (GABA) (Hiperpolarización neuronal en canales de membrana); 2. Inactivación de la VGLUT (vesícula transportadora de glutamato) e inhibición del neurotransmisor excitatorio glutamato; 3. Cambio en la concentración de monoaminas biogénicas; 4. Mecanismo antioxidante: reducción de especies reactivas de oxígeno. Tomado de Dietas cetogénicas y otras alternativas terapéuticas, en Tratamiento farmacológico de las epilepsias³.

Se acepta en general que la acción directa de los cuerpos cetónicos no es el mecanismo primario, aunque algunos investigadores han puntualizado la similitud estructural de los cuerpos cetónicos y el ácido gama aminobutírico (GABA)¹³.

La concentración de los distintos metabolitos involucrados en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos se modificó en el cerebro de ratas alimentadas con una dieta enriquecida en grasas. Se observó un incremento significativo del β-hidroxibutirato, disminución en

la concentración de succinil-CoA y optimización del cetoglutarato, lo cual implica incremento de glutamato para la derivación del GABA¹⁴.

El cambio de carbohidratos a grasas como fuente principal de energía a nivel cerebral modifica “la carga energética” (relación de ATP/ADP), con mejor utilización de los sustratos energéticos, pero no es claro como esta adaptación metabólica produce el efecto antiepiléptico. Otros investigadores han evaluado el efecto de los principales cuerpos cetónicos, β -hidroxibutirato y acetoacetato en preparaciones neuronales del hipocampo y concluyen que no se altera la actividad inhibitora ni excitadora sináptica, implicando que la dieta funciona por medio de otros mecanismos¹⁵.

4.2. Sistema nervioso central

El sistema nervioso se divide en central (encéfalo y médula espinal) y periférico (nervios y ganglios)²⁴.

El sistema nervioso está formado por diferentes tipos celulares: células neuronales y no neuronales o neuroglía.

Según su función (dirección de la transmisión del impulso), las neuronas se clasifican en sensitivas (aférentes), motoras (eferentes), y neuronas de asociación (interneuronas). Los extremos dendríticos están desnudos (receptores del dolor) o bien se asocian con un receptor sensorial^{24, 25}.

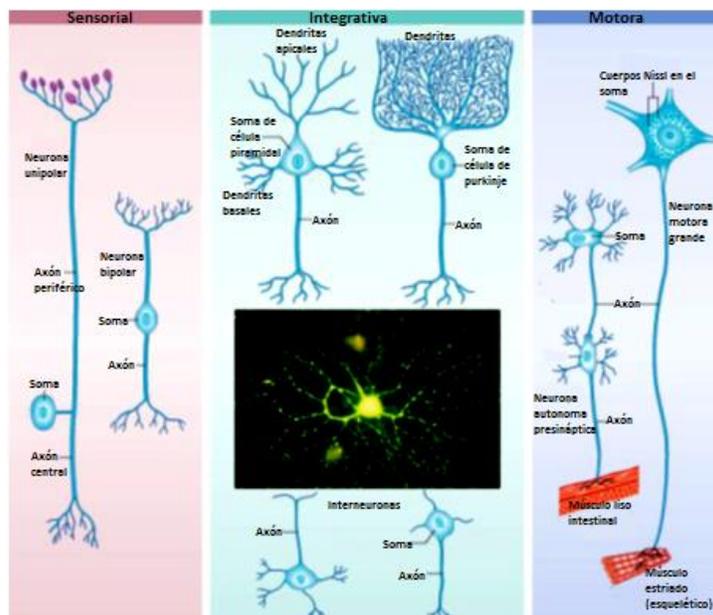


Figura 3. Tipos de neurona, según la clasificación estructural y funcional. Sensitivas: unipolares y bipolares. Interneuronas: piramidales y de Purkinje. Motora. Tomado de Gray's anatomy²⁵.

La neuroglia proporciona soporte y protección a las neuronas del sistema nervioso central y periférico. Unas células de la neuroglia son fagocitos (microglia), otras se encargan de mielinizar las prolongaciones neuronales del sistema nervioso central (oligodendrocitos) y del periférico (células de Schwann), algunas revisten las cavidades y forman la barrera hemato-encefálica (astrocitos) y otras contienen líquido cefalorraquídeo (ependimarias)^{24, 26}.

Todas las neuronas poseen un soma que contiene el núcleo y prolongaciones (fibras) de dos tipos: 1) axones (uno por neurona), típicamente generan los impulsos y los alejan del soma, y liberan neurotransmisores, y 2) dendritas (una o muchas por cada neurona), característicamente transportan la corriente eléctrica hacia el soma. La mayoría de las fibras largas están mielinizadas; la mielina aumenta la velocidad de transmisión del impulso nervioso^{24, 27}.

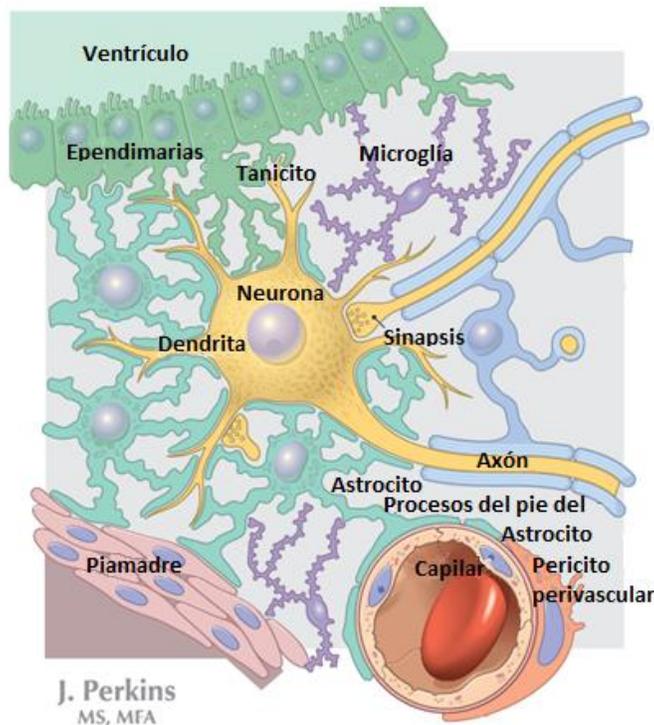


Figura 4. Tipos de células encontradas en el sistema nervioso central. Neuronas, astrocitos, microglia, oligodendrocitos, células ependimarias. Tomado y modificado de anatomía de Netter 2008²⁶.

Un impulso nervioso es un proceso electroquímico (iniciado por distintos estímulos) que cambia la permeabilidad de la membrana plasmática neuronal, permitiendo que los iones de sodio (Na^+) entren a la célula (despolarización). Una vez iniciado, el potencial de acción (o impulso nervioso) recorre toda la superficie celular. La salida de iones de potasio (K^+) de la célula provoca que la electricidad de la membrana vuelva al estado de reposo (repolarización). La bomba sodio-potasio restablece las concentraciones iónicas^{24, 28}.

Una neurona influye sobre otras neuronas y células efectoras liberando neurotransmisores, que son sustancias químicas que atraviesan la hendidura sináptica

y se unen a los receptores de membrana de la célula postsináptica. El resultado de este proceso es la apertura de canales iónicos específicos, y una activación o inhibición, según el neurotransmisor liberado y la célula postsináptica en cuestión ^{24,28}.

4.2.1. Formación hipocámpica

La formación hipocámpica es parte del sistema nervioso central, y a su vez del sistema límbico, por lo que se relaciona con la integración de procesos afectivos y cognoscitivos como el aprendizaje y la memoria²⁹.

En los roedores se encuentra inmersa en la corteza medial y basal del sistema nervioso central. Es una estructura elongada cuyo eje longitudinal se dobla en forma de “C” desde el núcleo septal rostro-dorsal al lóbulo temporal caudo-ventral. Ocupa la mayor parte de las paredes ventrolateral, y posterior de la corteza cerebral (figura 5³⁰). El giro dentado o *fascia dentada*, es una banda delgada y estratificada que se encuentra rodeada por el resto de la formación hipocámpica, toma el aspecto de “C” abierta y se continúa posteriormente con el giro supracaloso²⁹.

La formación hipocámpica está formada por cuatro regiones: a) el giro dentado (GD) o *fascia dentada*; que consta de tres capas o *stratas*: i) la molecular o plexiforme, ii) la granular y iii) la hiliar o polimorfa; b) el hipocampo o *Cornu Ammonis* (CA), compuesto por cuatro regiones CA1, CA2, CA3 y CA4, c) el complejo subicular y d) la corteza entorrinal. Cada una de las regiones del hipocampo se caracterizan por tener un tipo particular de neuronas: i) piramidales en los campos CA1, CA2, CA3 y CA4 del hipocampo; ii) granulares que son exclusivas del giro dentado y que forman la capa

granular de este; iii) células en cesta o GABAérgicas que se pueden encontrar en toda la formación hipocámpica; y iv) células de la región hiliar o polimorfas ^{29, 30, 31}.

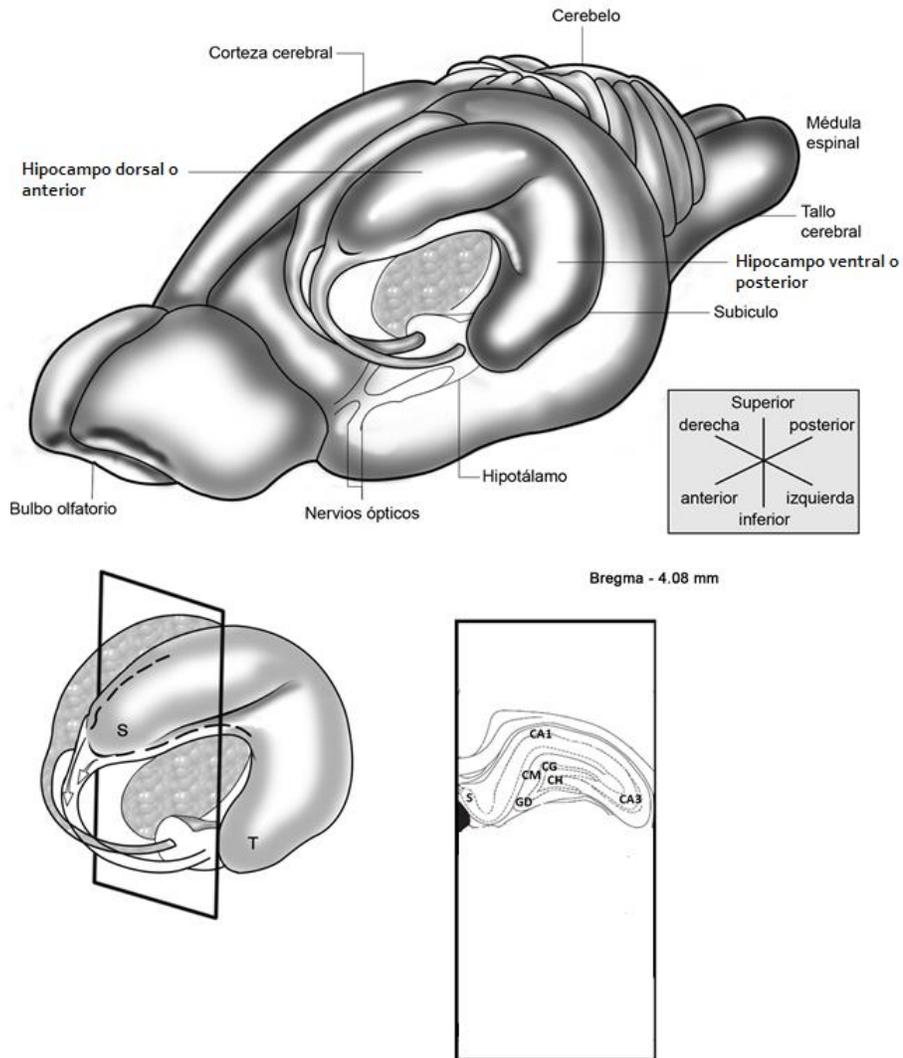


Figura 5. Esquema del cerebro de una ratona. En el dibujo se muestra la organización tridimensional del hipocampo y estructuras relacionadas. Una sección coronal a través del hipocampo izquierdo se muestra en la parte inferior derecha de la figura, con su coordenada anteroposterior en relación a Bregma. CA1, CA3, *Cornu Ammonis* campos 1 y 3; GD: giro dentado; S: subículo; t: polo temporal del hipocampo. Modificado de Cheung et al. 2005³⁰ por ilustración médica INP.

En la capa granular del giro dentado se encuentran los cuerpos o somas de las células granulares, la capa molecular contiene las dendritas terminales de las células granulares y la capa polimorfa consta de una población celular de morfología heterogénea cuyos axones proyectan a la capa molecular, también en estas capa se encuentran las fibras musgosas del giro dentado que conectan con las células piramidales del campo CA3^{30, 32}.

4.3. Neurotransmisores

Los neurotransmisores son sustancias que actúan como mensajeros químicos por la transmisión de señales desde una neurona a una célula diana a través de una sinapsis; son moléculas pequeñas y péptidos neuroactivos compuestos por cadenas cortas de aminoácidos. Antes de liberarse en la hendidura sináptica, los neurotransmisores se almacenan en vesículas secretoras (vesículas sinápticas) cerca de la membrana plasmática de la terminal del axón. La liberación del neurotransmisor se produce con mayor frecuencia en respuesta a la llegada de un potencial de acción en la sinapsis. Cuando se libera, el neurotransmisor cruza el espacio sináptico y se une a receptores específicos en la membrana de la neurona o célula post-sináptica³³.

Hay muchos tipos de neurotransmisores, unos producen excitación en la neurona postsináptica y otros, inhibición. Ambos son fundamentales para mantener un funcionamiento apropiado del SNC³⁴.

4.3.1 Ácido gama aminobutírico

El GABA es un aminoácido que actúa como neurotransmisor y se forma a partir de la descarboxilación del glutamato por la acción de la enzima glutamato descarboxilasa, quien necesita de vitamina B₆ para su funcionamiento²⁸.

Es liberado por interneuronas locales de trayecto corto como en el hipocampo y es transmisor de zonas de mayor longitud como las vías eferentes que parten del estriado a la sustancia nigra³⁵.

Los receptores de GABA se ubican tanto en astrocitos como en neuronas centrales. Existen tres subtipos de receptores:

El receptor GABA_B. Es un receptor metabotrópico que media la inhibición presináptica y postsináptica. Es un receptor acoplado a proteínas G, cuya activación da lugar a la inhibición de la adenilato ciclasa y un aumento de la conductancia de K⁺ y a una disminución del Ca²⁺, como consecuencia genera una hiperpolarización de la membrana celular y un bloqueo de la liberación de neurotransmisores³⁵.

Receptor GABA_C: es un canal de cloruro que aunque presenta gran afinidad por el GABA no se une a sus agonistas ni es modulado de las mismas sustancias que forma que el GABA_A.

Receptor GABA_A: Es un canal de cloruro activado por ligando. Es el receptor más abundante e interviene en los procesos rápidos de transmisión del tipo inhibitorio que reducen la excitabilidad de la membrana celular, es un receptor postsináptico. Estructuralmente es una glicoproteína formada por cinco subunidades polipeptídicas, pero se han descrito siete clases de subunidades (α , γ , δ , ϵ , θ y ρ) y múltiples

isoformas. Estos receptores se conforman por dos copias de la subunidad α , dos de la subunidades β y una de la subunidad γ . Estos receptores pueden modularse alostéricamente por benzodiazepinas, barbitúricos y alcoholes³⁵.

El gradiente de iones cloruro a través de la membrana neuronal es crucial para la naturaleza de la señalización GABAérgica. La dirección del movimiento del cloruro depende del gradiente de cloruro. La entrada de cloruro a través de los receptores GABA_A conduce a la hiperpolarización mientras que la extrusión del cloruro da como resultado una despolarización celular. Los cotransportadores de catión-cloro (CCC) median el transporte acoplado de iones de sodio, potasio y cloruro a través de las membranas neuronales, regulan así el gradiente electroquímico de cloro³⁶.

4.4. Cotransportadores catión-cloro

Los cotransportadores catión-cloruro son glicoproteínas que tienen un peso molecular central de ~ 110 a 130 kDa. Estos cotransportadores pertenecen a la familia portadora de solutos 12 (SLC12). Cada CCC tiene una estructura de 12 segmentos y un extremo amino y carboxilo terminal donde NKCC1 tiene un extremo amino terminal pequeño y carboxilo terminal grande, ambos son intracelulares. Los CCC se expresan en todos los órganos y, además contribuyen en la señalización neuronal, están involucradas en una serie de procesos fisiológicos, incluyendo la regulación del volumen celular, el transporte de iones transepiteliales, la señalización neuroendocrina y la regulación de la presión sanguínea³⁷.

Los cotransportadores catión-cloruro se clasifican de acuerdo a su función fisiológica en tres categorías: 1) dos miembros son cotransportadores $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$ (NKCC, dos isoformas, NKCC1 y NKCC2), 2) uno es un cotransportador $\text{Na}^+\text{-Cl}^-$ (NCC), y 3) cuatro

son cotransportadores K^+-Cl^- (KCC, isoformas KCC1 a KCC4). Todos los cotransportadores catión-cloruro se expresan en el sistema nervioso de los mamíferos en diferentes etapas de desarrollo, con excepción de NCC y NKCC2, que se encuentran predominantemente en el riñón, donde desempeñan un papel clave en la vía de transporte de la sal. Los otros dos miembros de la familia CCC, no tienen un papel fisiológico conocido³⁶.

Bajo condiciones fisiológicas, la actividad de NKCC1 (introduce iones Cl^-) modula la concentración de cloruro intracelular en neuronas, glía, células endoteliales y células epiteliales del plexo coroideo. Esto ayuda a mantener el volumen celular contra los cambios en la osmolaridad extracelular y el contenido de soluto intracelular para prevenir el excesivo hinchamiento o retracción celular³⁶.

En el sistema nervioso en desarrollo, NKCC1 se expresa en neuronas y glía en el cerebro y cerebelo, mientras que en adultos se expresa en la médula espinal, sistema nervioso periférico y plexo coroideo, y en células endoteliales vasculares cerebrales y neuronas principales. En modelos animales, la expresión de KCC2 (extrae iones Cl^-) predomina en neuronas maduras, en la retina, la corteza, el cerebelo y el cuerno dorsal de la médula espinal³⁸, pero se dice que solo se expresan en las neuronas del sistema nervioso central, donde desempeña un papel crucial en la regulación de la excitabilidad neuronal y el desarrollo del cerebro postnatal. Además, se ha relacionado con la formación de espinas dendríticas glutamatérgicas. Es responsable de mantener una baja concentración de cloruro intracelular por extrusión de iones cloruro y, por lo tanto, producir un efecto hiperpolarizante cuando GABA y glicina se unen a sus receptores afines, dando como resultado la inhibición³⁶.

Durante la vida embrionaria y postnatal temprana, NKCC1 se expresa en gran cantidad y KCC2 en menor cantidad, promoviendo incremento de iones cloruro en la neurona que desencadena la excitación mediada por GABA y, por tanto, la despolarización. Este flujo de cloruro se logra a través de un mecanismo de cotransporte electroneutral $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - 2\text{Cl}^-$, junto con la actividad de la sodio potasio ATPasa, que conduce a una salida de cloruro mediado por el receptor GABA_A . El efecto despolarizante mediado por GABA es necesario para el correcto desarrollo cerebral^{36,39}.

El cambio en el desarrollo de la señalización del GABA de excitadora a la inhibidora ocurre poco después del nacimiento de la rata, pero otras especies muestran heterogeneidad en el tiempo de cambio de este interruptor. En el SNC de mamífero adulto, la alta actividad de KCC2 y la baja actividad de NKCC1 dan como resultado una muy baja señalización GABAérgica y, por consiguiente, inhibidora en la mayoría de las poblaciones neuronales. Sin embargo, ciertas poblaciones anatómicas de neuronas en el adulto pueden variar su respuesta a GABA de excitador a inhibidor debido a la modulación dinámica de iones cloruro secundaria a variaciones en la actividad de los cotransportadores catión-cloro, lo que sugiere que algunos mecanismos de fosforilación dinámica también podría desempeñar un papel en este cambio³⁹.

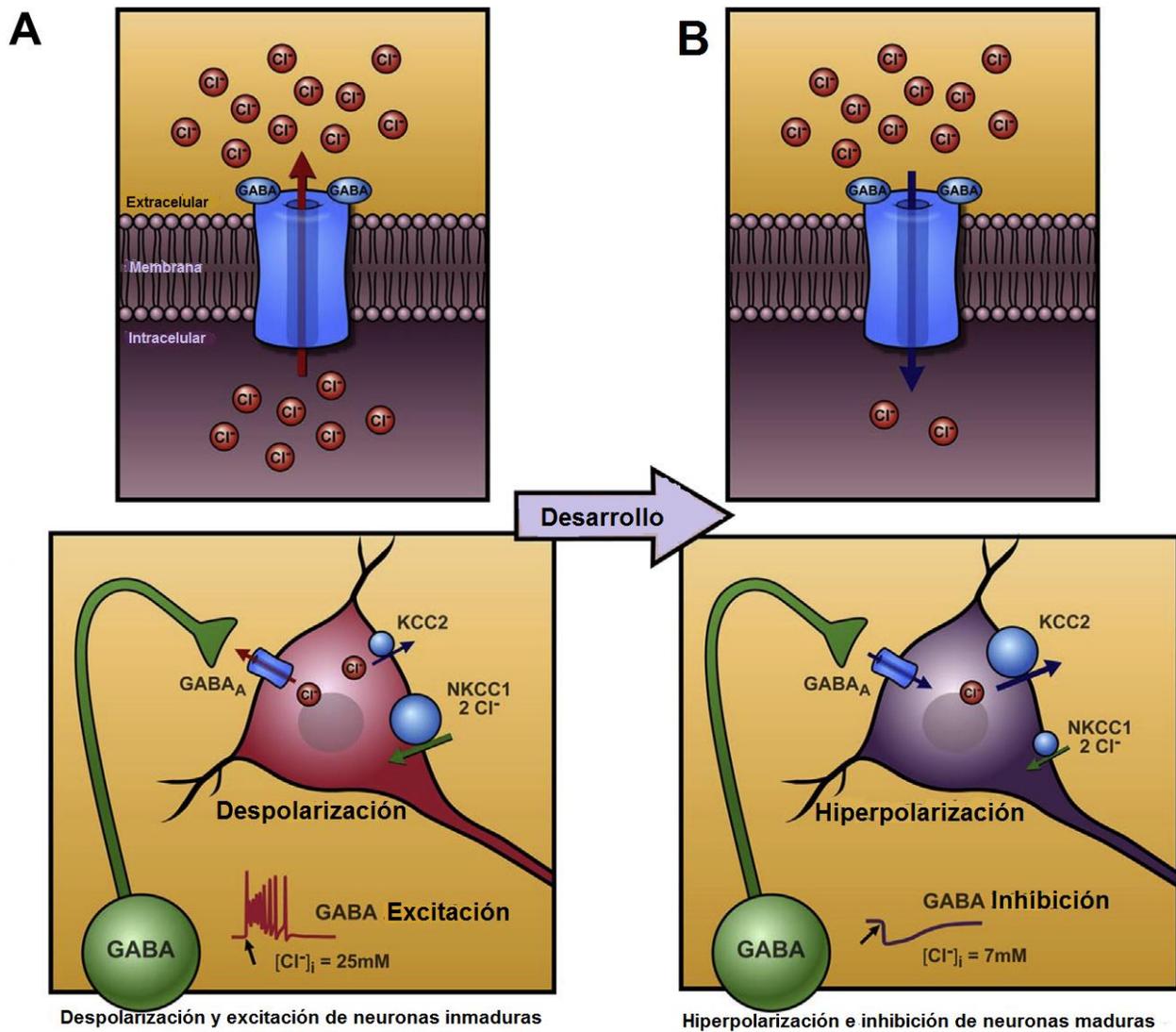


Figura 6. Cotransportadores en neuronas. **A)** Durante las primeras etapas del desarrollo o en determinadas situaciones patológicas (posiblemente en ciertos tipos de epilepsia), la baja expresión del cotransportador KCC2 y alta del cotransportador NKCC1 (que introducen y extraen iones Cl^- de la neurona respectivamente), hace que los niveles de Cl^- intracelular sean elevados, por lo que la apertura del canal del receptor GABA_A permite que los iones Cl^- salgan al espacio extracelular y se produzca una despolarización de la membrana y por tanto un efecto excitador del GABA. **B)** En la mayoría de las neuronas adultas existe una elevada expresión de KCC2 y baja de NKCC1, que mantienen una concentración intracelular de Cl^- baja, por lo que la apertura del canal del receptor GABA_A hace que fluya hacia el interior de la célula iones Cl^- , dando lugar a la hiperpolarización de la membrana neuronal y por tanto a un efecto inhibitorio del GABA. E_{Cl} : potencial de reversión del Cl^- ; V_m : potencial de membrana en reposo. Modificado de Ben Ari Y⁴⁰.

5. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El uso de estrategias dietéticas para tratar y controlar diversas enfermedades puede ser común, pero generalmente se desconocen los mecanismos de acción por los cuales son efectivos sobre esas patologías.

La dieta cetogénica es un alimento con alto contenido en grasas y bajo en hidratos de carbono; que originalmente fue diseñada como un tratamiento no farmacológico para tratar la epilepsia de difícil control, hoy en día también es usado como terapia de otras patologías; sobre todo problemas neurológicos, sin embargo, aún se desconoce su mecanismo de acción.

Se sugiere que los cuerpos cetónicos, especialmente el β -hidroxibutirato tienen un efecto sobre los cotransportadores NKCC1 y KCC2⁴¹. En condiciones normales los cotransportadores de membrana NKCC1 y KCC2 regulan respectivamente la entrada y salida de iones cloruro en las neuronas, sin embargo, alteraciones en su expresión provocadas por alguna patología pueden modificar no sólo el gradiente electroquímico del cloruro sino dañar la función neurológica.

La activación de NKCC1 depende de su estado de fosforilación y de las cinasas de serina-treonina que induce su activación³⁶.

Los cambios en la expresión de las isoformas de NKCC1 a y b, se asocian a la esquizofrenia y el desarrollo temprano del cerebro³⁶.

En la isquemia cerebral, los niveles extracelulares elevados de potasio, glutamato e interleucina 6 estimulan la actividad de NKCC1 en neuronas y astrocitos³⁶.

El NKCC1 está implicado en el desarrollo de edema y muerte celular después del inicio de un accidente cerebrovascular.

En la epilepsia se cree que la baja expresión del cotransportador KCC2 y alta de NKCC1 hace que los niveles de cloruro intracelular sean elevados, provocando la apertura de canales del GABA para liberar el cloruro intracelular y causar despolarización de la membrana celular y por lo tanto sobre-excitación neuronal.

Debido a lo anterior, el bloqueo de la actividad de NKCC1 o la regulación negativa de su expresión puede ofrecer una estrategia neuroprotectora útil.

En un estudio previo de nuestro grupo de trabajo, se demostró que al administrar la dieta cetogénica durante un mes a un grupo de ratas sanas, no se modificó la expresión de los cotransportadores NKCC1 y KCC2 en el hipocampo⁴², por estas razones se propuso estudiar si la dieta cetogénica *per se* reduce la expresión del cotransportador NKCC1 al prolongar el tiempo de ingesta de la dieta cetogénica, y determinar si los resultados obtenidos son consecuencia del tiempo de administración de la misma o son independientes del tiempo al analizar las tres capas del giro dentado.

Se escogió al giro dentado como estructura de análisis debido a que es una de las regiones que continúan la neurogénesis en la adultez, reciben información de otras áreas del cerebro y se cree que esta zona puede contribuir en los procesos de aprendizaje y memoria del hipocampo, además de que es una región epileptógena⁴³.

6. HIPÓTESIS

Hipótesis alterna

La dieta cetogénica disminuye el número de células que expresan el cotransportador catión-cloruro NKCC1 en el giro dentado de la rata con respecto a las ratas control.

Hipótesis nula

La dieta cetogénica no disminuye el número de células que expresan el cotransportador catión-cloruro NKCC1 en el giro dentado de la rata con respecto a las ratas control.

7. OBJETIVOS

Objetivo general

Estudiar el efecto de la dieta cetogénica sobre la expresión del cotransportador catión-cloruro NKCC1 en el giro dentado de la rata.

Objetivos particulares

Cuantificar en ratas alimentadas con dieta normal y cetogénica:

- Peso corporal.
- Peso cerebral.
- Niveles de glucosa en sangre periférica.
- Niveles de β -hidroxibutirato en sangre periférica.
- Área total de cada capa del giro dentado (molecular, granular e hilar).
- Volumen total de cada capa del giro dentado (molecular, granular e hilar).
- Número total de células que expresan el cotransportador catión-cloruro NKCC1 en las tres capas del giro dentado (molecular, granular e hilar).

8. MATERIAL Y MÉTODOS

8.1. Diseño experimental

8.1.1. Tipo de estudio:

Prospectivo, longitudinal, transversal, comparativo y experimental⁴⁴.

8.1.2. Población de estudio

Células inmunorreactivas al cotransportador catión-cloruro NKCC1, presentes en el giro dentado de ratas macho Sprague-Dawley alimentadas durante tres meses con una dieta normal o cetogénica.

8.1.3. Variables

- **Variable independiente**

- Tipo de alimento o dieta: cualitativa, nominal, categórica.

- **Variables dependientes**

- Peso corporal (g): cuantitativa, continua.
- Concentración de β -hidroxibutirato: (mmol/L) en sangre periférica: cuantitativa, continua.
- Concentración de glucosa en sangre periférica (mg/dL): cuantitativa, continua.
- Peso cerebral (g): cuantitativa, continua.
- Número de células inmunorreactivas a NKCC1: cuantitativa, discreta.
- Área de las capas del giro dentado (μm^2): cuantitativa, continua.
- Volumen de las capas del giro dentado (μm^3): cuantitativa, continua.

8.2. Técnicas

8.2.1. Manejo de animales

Se utilizaron 16 ratas macho, albinas de la cepa Sprague-Dawley de 21 días de edad, recién destetadas que se mantuvieron en jaulas para rata de policarbonato de 259 mm x 476 mm x 209 mm; con tapa de acero inoxidable con división para bebedero y comedero. En el fondo de las cajas donde se alojaron las ratas con dieta cetogénica, se colocó una malla de acero inoxidable para evitar que las ratas tuvieran contacto con la viruta de madera y sus heces. Las jaulas se colocaron en estantes metálicos ubicados en el interior del Bioterio del Instituto Nacional de Pediatría, manteniéndose bajo idénticas condiciones de luz-oscuridad de 12 horas, a temperatura de 22°C a 24°C, humedad relativa 40 a 50% de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999⁴⁵.

El recambio y limpieza de las jaulas, comederos y bebederos, se efectuó cada tercer día hasta que concluyó el experimento.

8.2.2. Grupos

Se formaron dos grupos de animales:

- 1) Grupo control (DN). Ratas alimentadas con una dieta normal (n = 8).
- 2) Grupo experimental (DC). Ratas alimentadas con una dieta cetogénica (n= 8).

Para evitar problemas en el desarrollo del sistema nervioso central y modificación de la expresión del cotransportador catión-cloruro NKCC1 ajenos a la administración de las dietas, las ratas se mantuvieron en parejas, debido a que el aislamiento es un modelo

muy usado para producir esquizofrenia y estrés^{45, 46}, además, los procesos del desarrollo neuronal en la corteza cerebral de los roedores y el humano son similares en términos neurobiológicos, de esta forma un día en la vida de la rata equivale aproximadamente a 3 meses de desarrollo en el hombre: por tanto, basta que estos animales sufran una privación social de pocos días para que constituya una manipulación de tipo crónica a nivel de sistema nervioso central⁴⁶.

8.2.3. Tipo de alimento

Se utilizaron dos tipos de alimento:

1) Dieta normal: dieta 2018S de Harlan.

Es una fórmula fija, esterilizable por calor húmedo, diseñado para apoyar la gestación, la lactancia y el crecimiento de los roedores, con proteína al 18%, suplementada con vitaminas adicionales para asegurar la adecuada nutrición después de esterilizarse⁴⁹. La presentación del alimento es en forma de pellets (Cuadro 1).

2) Dieta cetogénica: dieta 96355 de Harlan.

Es una dieta muy alta en grasa y casi sin carbohidratos. La proporción de grasa contra proteína más carbohidratos en la dieta cetogénica, es de aproximadamente 4,25 a 1⁵⁰, por lo tanto es una dieta cetogénica clásica. Su consistencia es pastosa y de color beige.

Cuadro 1. Información nutrimental de la dieta normal (Harlan 20185) y de la dieta cetogénica (Harlan 96355) usadas en el estudio.

COMPONENTES	TIPO DE DIETA			
	Dieta Normal	Dieta Cetogénica	Dieta Normal	Dieta Cetogénica
MACRONUTRIENTES	% por peso		% por kcal	
Proteína	18.6	15.3	24	9.1
Grasas	6.2	67.4	18	90.5
Carbohidratos	0.44	0.6	58	0.4
Fibra cruda	3.5			
Densidad Energética			3.1 kcal/g (13kJ/g)	6.7 kcal/g (28 kJ/g)

Composición nutrimental principal de la dieta normal y la dieta cetogénica expresada en porcentajes por peso y en kcal. La dieta cetogénica tiene casi el doble del valor calórico (densidad energética) que la dieta normal por poseer un porcentaje mayor de grasas en su composición. Ver información detallada de ambas dietas en los anexos 1, 2, 3 y 4^{49, 50}.

8.2.4. Tratamiento nutricional

Una vez destetadas las crías, el grupo control inició su alimentación con una dieta normal, en tanto que el grupo experimental, se mantuvo en ayuno por 24 horas, con el fin de alcanzar más rápidamente un estado de cetosis. Inmediatamente después se inició su alimentación con dieta cetogénica. Todos los animales tuvieron libre acceso a las respectivas dietas y al agua hasta el momento de su sacrificio (114 días de edad, 93 o 92 días consumiendo dieta normal o cetogénica respectivamente). El consumo de dieta cetogénica en ratas aisladas y en ratas mantenidas en un ambiente social a partir del momento del destete no es diferente⁴⁷ (datos del laboratorio no publicados) por lo que durante el experimento se alojaron dos ratas por caja.

Para monitorear el consumo de alimento se utilizó una balanza granataria y se pesaron cantidades iguales de dieta en cada grupo iniciando con 50 g para cada jaula y

aumentando la cantidad conforme a la ingesta. Se registró el consumo de alimento diario entre las 09:00 y 10:00 h. Los pellets se colocaron sobre la tapa metálica; mientras que la dieta cetogénica al tener consistencia pastosa, se colocó en comederos metálicos. En los grupos control y cetogénico se estimó el consumo individual en proporción al número de sujetos, se asumió un consumo homogéneo al considerar la uniformidad en la ganancia individual de peso corporal de los animales.

8.2.5. Valoración de la cetosis y glucosa

Se cuantificó la concentración en sangre periférica de glucosa y β -hidroxibutirato al momento del destete (basales), y al momento del sacrificio (final). Para tal fin, se realizó un pequeño corte en la punta de la cola, limpiando las primeras gotas de sangre. Se colocó una gota de sangre en las tiras reactivas (Free Style) para glucosa y β -hidroxibutirato, previamente introducidas en un glucómetro (Abbott modelo Optium Xceed).

8.2.6. Cuantificación del peso corporal

Las ratas del grupo control y del grupo cetogénico se pesaron el día de destete y el día del sacrificio. Se utilizó una balanza granataria con canastilla para animales.

8.2.7. Perfusión intracardiaca

Los animales se sacrificaron por perfusión vía intracardiaca al final del experimento (114 días de edad postnatal). Inicialmente se anestesiaron por vía intraperitoneal, con una sobredosis de pentobarbital sódico (40 mg/kg de peso corporal, Anestosal, 6.3 g/dL). Una vez que la rata estuvo completamente anestesiada se procedió a la perfusión que consistió en lo siguiente:

- Se realizó una incisión a nivel de la línea media del abdomen, comenzando por la piel y posteriormente se continuó con el musculo. A continuación se cortó el diafragma hasta llegar a la cavidad torácica, de esta manera se expuso el corazón del animal, y se colocó una cánula en el ventrículo izquierdo.
- Con la ayuda de una bomba para infusión se dejó pasar inicialmente solución salina al 0.9% (PISA) para lavar y evitar el taponamiento por coágulos sanguíneos, posteriormente 400 a 500 mL de una solución fijadora de paraformaldehído (Sigma Aldrich) al 4% (PFA) en buffer de fosfatos 0.1M, pH 7,4 (PB), hasta que el cuello y cabeza de la rata quedaron rígidos y su nariz y ojos se tornaron pálidos. Tanto la solución salina como el PFA se mantuvieron fríos en un recipiente con hielo durante todo el procedimiento.
- Posteriormente se extrajo el cerebro y se registró su peso en una balanza digital.

8.2.8. Preservación de los cerebros

- Los cerebros se almacenaron individualmente en paraformaldehído al 4% en PB en refrigeración durante 24 horas para fijar el tejido.
- Posteriormente se colocaron en una solución de sacarosa (Sigma) al 30% en PB, y permanecieron ahí hasta que los tejidos bajaron al fondo del vial contenedor.
- A continuación, los cerebros se congelaron sumergiéndolos en 2-metilbutano (Fisher) mantenido en hielo seco.
- Se almacenaron a - 70°C en un ultra congelador (Thermo Fisher Scientific) hasta su uso.

- Posteriormente en un criostato (Leyca) se realizaron cortes por congelación en un plano coronal, con grosor de 50 μm que se depositaron en cajas de 24 pozos con solución crioprotectora o anticongelante. Sólo se recolectaron las series de cortes que contenían hipocampo y estas se almacenaron a - 20°C.

8.2.9. Selección de los cortes

De cada serie de cortes que contenían el hipocampo, se seleccionaron sistemáticamente y al azar de 12 a 14 cortes. De los primeros ocho cortes con hipocampo, se seleccionó al azar un corte de inicio, a partir de éste, se seleccionó el siguiente que fuera el octavo corte y se continuo así hasta terminar la serie.

8.2.10. Inmunohistoquímica

Los cortes se procesaron con la técnica de inmunodetección por flotación para NKCC1 en microplacas para cultivo de 24 pozos a temperatura ambiente y en agitación constante. Se realizaron controles negativos a la tinción (omitiendo el anticuerpo primario o secundario).

Después de varias estandarizaciones, la técnica para inmunodetección constó de los siguientes pasos:

- Tres lavados de 10 minutos cada uno con PB 0.1M.
- Incubación en una solución de peróxido de hidrogeno al 3% para permeabilizar la membrana y bloquear la actividad de la peroxidasa de las células.
- Tres 3 lavados de 10 minutos cada uno con PB 0.1M.
- Incubación en una solución de citratos (20X Immuno DNA Retriever Citrate, Bio SB) en estufa a 65 °C para evidenciar los sitios antigénicos.

- Enfriar a temperatura ambiente por 15 minutos para evitar choque térmico.
- Tres lavados de 10 minutos cada uno con PB 0.1M.
- Incubación durante toda la noche en el anticuerpo primario NKCC1 (Millipore) desarrollado en conejo a una dilución de 1:500 en suero de caballo al 3.3%, Triton X100 al 0.3%, y PB 0.1M.
- Tres lavados de 10 minutos cada uno con PB 0.1M.
- Incubación en el anticuerpo secundario biotilnado IgG (Vector) anti-conejo desarrollado en cabra, a una dilución de 1:500, en suero de caballo al 5%, Triton X100 al 0.3% y PB 0.1M, durante 2 horas.
- Tres lavados de 10 minutos cada uno con PB 0.1M.
- Incubación en el complejo avidina-biotina peroxidasa (ABC, Vectanstain) durante una hora para amplificar la señal.
- Tres lavados de 10 minutos cada uno con PB 0.1M.
- Para evidenciar la reacción, los cortes se incubaron con una solución de diaminobenzidina (DAB, Vector) hasta observar que el corte tomara una coloración azul oscuro, el tiempo de revelado fue de 3 minutos. La reacción se paró con agua destilada.
- Tres lavados de 10 minutos cada uno con PB 0.1M.

- El montaje de los tejidos se realizó en portaobjetos gelatinizados, previamente etiquetados. Los tejidos se cubrieron con entellan (Merck) y se colocó un cubre objetos, posteriormente se dejaron secar.
- Se ocultó la identificación de las series de tejidos y se asignó una clave para que el observador no conociera el grupo al que pertenecían.

8.2.11. Pruebas estereológicas

La estereología es un conjunto de métodos que permiten la estimación no sesgada y eficiente de cantidades geométricas definidas en estructuras arbitrarias, tales como número de objetos o partículas, longitud de estructuras, área, volumen, entre otras, es una herramienta útil en la cuantificación de parámetros morfométricos cerebrales⁵⁰. A diferencia de los métodos tradicionales utilizados para el conteo de células basadas en uno o dos cortes, el análisis estereológico toma en cuenta toda la región estudiada. En el presente estudio la cuantificación de la expresión del cotransportador NKCC1 en los cortes de los diferentes grupos se llevó a cabo utilizando un sistema de análisis de imágenes con estereología que consiste en un microscopio (BX51 de Olympus) de campo claro con platina motorizada en los tres ejes (movimientos en X, Y, Z), una cámara digital a color y el software Stereoinvestigator (Microbrightfield). Se utilizó el método estereológico del fraccionador óptico para obtener el área, volumen y número total de células que expresan NKCC1^{52, 53} en las tres capas del giro dentado: molecular, granular e hilar.

En la figura 7 se muestra un ejemplo con los pasos esenciales para el conteo estereológico con la prueba del fraccionador óptico.

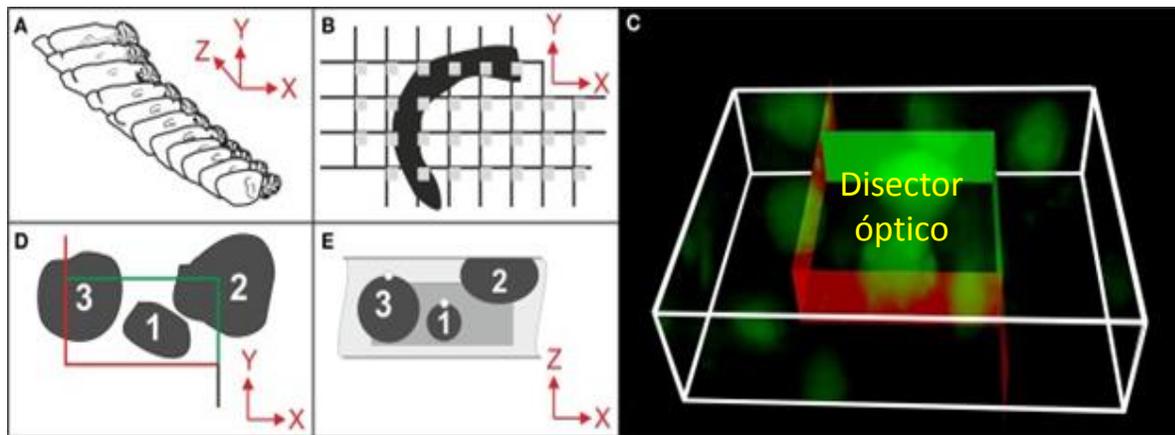


Figura 7. Pasos esenciales para el conteo celular por estereología. A) Selección de 11 cortes de una manera sistemática y al azar de toda la región de interés en cada serie de cortes (cada 10° corte). B) En cada corte se traza el contorno de la estructura de interés (semicírculo negro), sobre éste se coloca una malla de conteo que contiene a su vez cuadros de conteo o disectores equidistantes (cuadros grises). Los cuadros de conteo o disectores que se encuentren dentro de la región del área de interés indican los sitios donde se realizara la cuantificación celular. C) Representación tridimensional de un corte de cerebro de ratón (prisma rectangular delimitado por líneas blancas). Dentro de este corte se observa un disector óptico el cual es una estructura tridimensional que delimitará el espacio donde se lleva a cabo el conteo celular en los tres ejes: x. y. z. cada disector está delimitado por un par de líneas verdes llamadas de inclusión y un par de líneas rojas llamadas de exclusión; se toman en cuenta las células de interés que se encuentren dentro de este disector. D) Vista superior de un disector sobre un corte de tejido, en el cual se observan tres células (1, 2 y 3), las células que se encuentren dentro del disector o parcialmente fuera pero que toquen las líneas de inclusión (verdes) se toman en cuenta para la cuantificación (células 1 y 2). Las células que se encuentre fuera o parcialmente dentro del disector pero que toquen las líneas rojas o de exclusión no son tomadas en cuenta para el conteo (célula 3). E) Es importante mencionar que el equipo cuenta con una platina motorizada en el eje z que permite realizar un escaneo desde la superficie hasta la profundidad del corte, por lo tanto en ese corte las células 1 y 3 están en una zona profunda y la célula 2 es superficial, por lo tanto solo se contaría la célula 1 por que cubre los criterios de inclusión. El software calcula una estimación no sesgada del número total de las células de la región de interés⁵².

8.2.12. Cuantificación del área, volumen y número de células inmunorreactivas a NKCC1

Para obtener la cuantificación del área, volumen y el conteo de células que fueron inmunorreactivas al anticuerpo NKCC1 (IR-NKCC1), se desglosaron los diferentes componentes anatómicos del giro dentado de acuerdo a los siguientes puntos:

1) Por capa del giro dentado: capa molecular, capa granular y capa hiliar, para conocer si la dieta cetogénica tenía algún efecto diferencial en las poblaciones celulares de cada capa del giro dentado.

2) Por hemisferio cerebral, es decir se analizó por separado el hemisferio derecho del izquierdo y además se analizó la sumatoria de ambos hemisferios con la finalidad de conocer si existían diferencias por lateralidad.

3) De acuerdo al eje anteroposterior, se dividió en dos regiones: giro dentado anterior y giro dentado posterior, ambas regiones se sumaron para obtener la cuantificación completa de los hemisferios del giro dentado y observar si presentaron diferencias por región anterior o posterior.

8.3. Análisis estadístico

Una vez recabados los datos fueron ordenados en bases de datos en Excel, y posteriormente fue empleado el Paquete Estadístico para las Ciencias Sociales, SPSS versión 20 donde se obtuvieron los valores promedio, desviaciones estándar y otras pruebas estadísticas de cada uno de los parámetros cuantificados tanto en el grupo DN y DC; y posteriormente se realizaron cuadros y gráficas de los promedios \pm las desviaciones estándar para evidenciar las diferencias o similitudes entre los grupos según el valor de significancia de $p \leq 0.05$ para todos los análisis. Se realizaron dos tipos de análisis:

1) Entre grupos:

Se comparó cada uno de los parámetros entre el grupo DN y DC, ya sea al inicio ó al final del experimento. En este caso se aplicaron las pruebas estadísticas de t de

Student ó U de Mann Whitney para muestras independientes de acuerdo a la prueba de Levene que indicó la homocedasticidad de los datos. Las variables que se analizaron con estas pruebas fueron: peso corporal al destete, peso corporal al día del sacrificio, niveles de glucosa al destete, niveles de glucosa al día del sacrificio, concentración de β -hidroxibutirato al destete, concentración de β -hidroxibutirato al sacrificio, peso cerebral, área, volumen y número de células IR-NKCC1 de cada una de las tres capas del giro dentado.

2) Intra grupos (o por edad):

En este caso los parámetros se compararon entre los datos obtenidos al destete con los datos obtenidos al momento del sacrificio en el grupo DN y posteriormente en el grupo DC; se consideraron como muestras relacionadas, por lo que se aplicó la prueba estadísticas t de Student para muestras relacionadas. Las variables que se analizaron con estas pruebas son: peso corporal, glucosa y β -hidroxibutirato, comparándose al destete vs al sacrificio.

Para las comparaciones intra grupos de las diferentes regiones del giro dentado del área, volumen y número de células IR-NKCC1 en el grupo DN ó DC se realizó la prueba de Levene o de homogeneidad de datos, seguido de las pruebas estadísticas de ANOVA de una vía o Welch de acuerdo con el resultado de la prueba de Levene, posterior a esto se realizó la prueba pos-hoc Tuckey y Dunnet T3 respectivamente.

9. RESULTADOS

Para analizar el efecto de las dietas (normal y cetogénica), se realizaron mediciones de los siguientes parámetros, antes (al destete) y después (al sacrificio) de la administración de las dietas.

9.1. Peso corporal

Al destete, los valores del peso corporal promedio \pm la desviación estándar para el grupo DN y el grupo DC fueron de 45.02 g \pm 5.15 g y 42.35 g \pm 4.76 g respectivamente y, al momento del sacrificio, los valores del peso corporal promedio \pm la desviación estándar fueron 478.35 g \pm 89.87 g y 433,27 g \pm 75,48 g respectivamente. Al analizar los datos con la prueba estadística t de Student para muestras independientes, no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre el grupo alimentado con dieta normal y dieta cetogénica, en las dos edades de medición (anexo 5, figuras 8, 9 y 10).

Cuando se realizaron comparaciones por edad en cada grupo, con la prueba estadística t de Student para muestras relacionadas, entre el destete y el día del sacrificio, se mostró que existen diferencias estadísticamente significativas (anexo 5, figuras 8, 9 y 10) estas diferencias corresponden a la ganancia de peso en ambos grupos, del 1 062.4% para el grupo DN y 1 023% para el grupo DC.

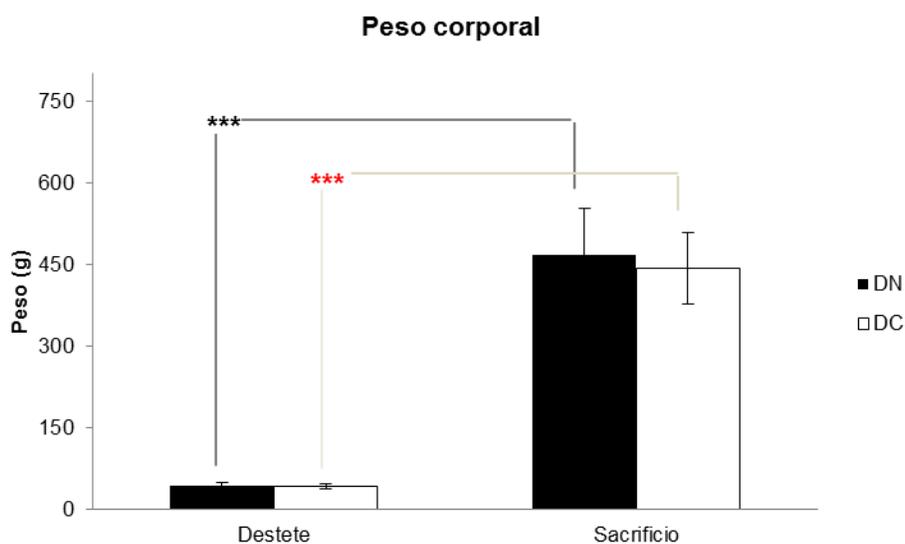


Figura 8. Efecto de la dieta cetogénica sobre el peso corporal. Gráfica del peso corporal de los grupos DN y DC al momento del destete y al sacrificio. No existieron diferencias estadísticamente significativas entre estos grupos ni al momento del destete ni al momento del sacrificio. Cuando se comparó por edad, el grupo DN fue significativamente mayor al final del experimento (***) que al inicio de la administración de la dieta, al igual que el grupo DC (***)). $p \leq 0.001$.



Figura 9. Grupos al inicio de la administración de las dietas (al destete). A la derecha se observan ratas que al destete (22 días de edad postnatal) iniciaron su alimentación con una dieta normal y a la izquierda ratas de la misma edad que iniciaron su alimentación con una dieta cetogénica. No existieron diferencias estadísticamente significativas en el peso corporal entre los grupos al inicio del experimento. En la base interna de las cajas del grupo cetogénico se colocó una rejilla de metal con el fin de que los animales no tuvieran contacto directo con el aserrín y las heces. La dieta cetogénica se proporcionó en recipientes especiales debido a su consistencia pastosa.

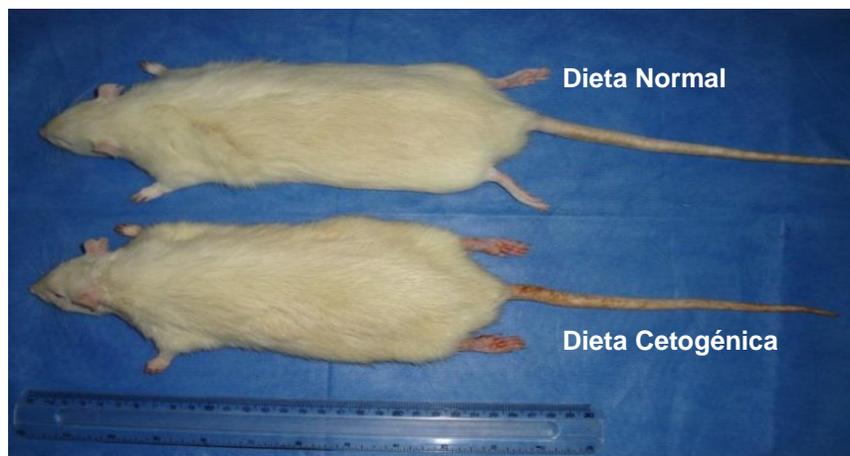


Figura 10. Grupos al final de la administración de las dietas (al sacrificio). Rata del grupo DN (superior) y del grupo DC (inferior) al momento del sacrificio (114 días de edad postnatal). El peso corporal entre los grupos DN y DC en esta edad no fue significativamente diferente.

9.2. Glucosa

El resultado de la prueba estadística t de Student para muestras independientes en las mediciones de glucosa, no mostro diferencias significativas entre el grupo DN y DC ni al inicio ni al final del experimento. Se observó que al destete los valores promedio y desviación estándar fueron de 130.87 mg/dL \pm 19.44 mg/dL para el grupo DN y 115.62 mg/dL \pm 24.66 mg/dL en el grupo DC, y el día del sacrificio, los promedios y desviaciones estándar fueron de 90.75 mg/dL \pm 10.74 mg/dL y 89.71 mg/dL \pm 11.92 mg/dL en el grupo DN y el grupo DC respectivamente, (anexo 6, figuras 11 y 12).

El valor de la concentración de glucosa en sangre periférica fue menor al final de la administración de las dietas que al inicio del experimento, tanto en el grupo DN (30.7% menor) como en el grupo DC (22.40%). Al realizar las comparaciones por edad con la prueba estadística t de Student para muestras relacionadas, se observaron diferencias estadísticamente significativas solamente en el grupo DN (anexo 6, figuras 11 y 12).

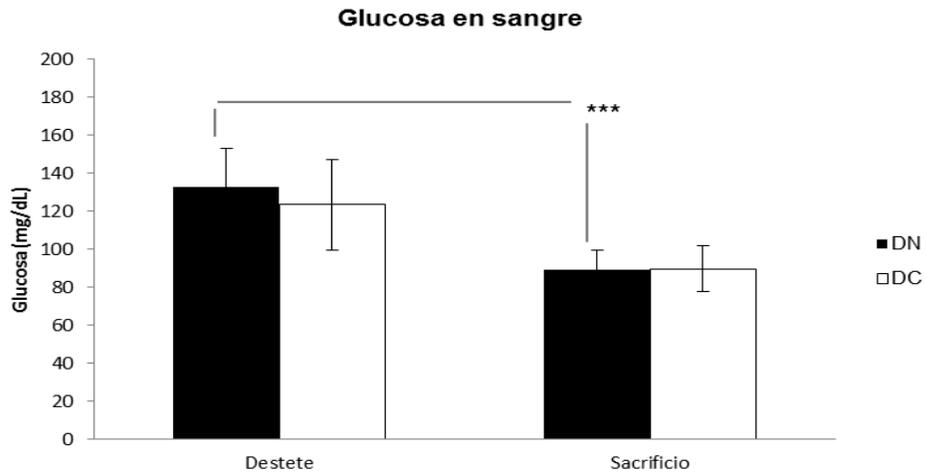


Figura 11. Efecto de la dieta cetogénica sobre la concentración de glucosa sanguínea. Gráfica de la concentración de glucosa en sangre periférica del grupo DN y DC al momento del destete y al sacrificio. No existieron diferencias estadísticamente significativas entre los dos grupos ni al destete ni al momento del sacrificio. Cuando se comparó por edad, el nivel de glucosa tanto en el grupo DN como en el DC al final del experimento, fue menor que al inicio; sólo resultado con diferencias significativas el grupo DN (***)



Figura 12. Mediciones de glucosa y β -hidroxibutirato en sangre periférica. Mediciones iniciales (destete) de la concentración de glucosa (arriba) y β -hidroxibutirato (abajo) en una gota de sangre tomada de la cola de la rata, la cual se colocó en una tira reactiva para medir glucosa (color azul) y β -hidroxibutirato (color morado). Las tiras reactivas se encontraban dentro de un glucómetro, mostraron automáticamente las concentraciones de ambos analitos en sangre periférica.

9.3. β -hidroxibutirato

Los promedios \pm las desviaciones estándar de las concentraciones de β -hidroxibutirato en sangre periférica, al destete fueron de 0.91 mmol/L \pm 0.34 mmol/L en el grupo DN y de 1.1 mmol/L \pm 0.44 mmol/L en el grupo DC, por lo tanto la concentración en el grupo DC fue 20.5% mayor que la del grupo DN. Al final del experimento, los promedios fueron: 0.32 mmol/L \pm 0.19 mmol/L en el grupo DN y 1.0 mmol/L \pm 0.44 mmol/L en el grupo DC; por lo tanto en esta edad, el aumento de la concentración en el grupo DC fue de 207.2%. Al realizar las comparaciones entre los grupos alimentados con las dietas, el grupo DC fue estadísticamente significativo sólo en la fecha del sacrificio, de acuerdo a la prueba estadística t de Student para muestras independientes (anexo 7, figuras 12 y 13).

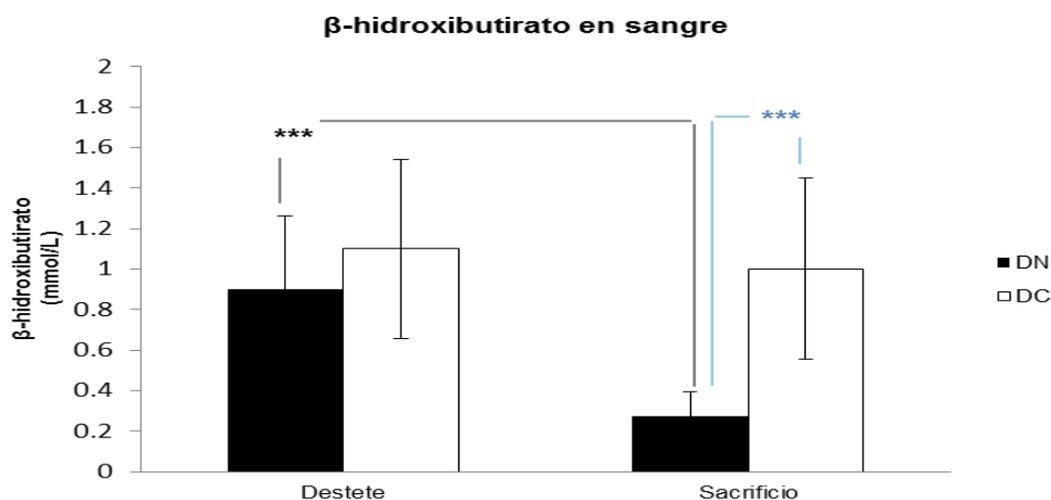


Figura 13. Efecto de la dieta cetogénica sobre la concentración de β -hidroxibutirato en sangre. Gráfica del promedio y desviación estándar de la concentración de β -hidroxibutirato en sangre periférica del grupo DN y DC al momento del destete y del sacrificio. Existieron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos DC y DN al momento del sacrificio (***) . Por edad solo existió diferencia significativa en el grupo DN (***) .

Cuando se realizaron comparaciones por edad, se observó que los valores de β -hidroxibutirato tanto en el grupo DN como el grupo DC se redujeron en un 64.2% y 9.1% respectivamente; la prueba t de Student para muestras relacionadas indicó que existen diferencias significativas únicamente en el grupo DN (anexo 7, figuras 12 y 13).

9.4. Peso cerebral

Los valores del peso cerebral de los grupos DN y DC al momento del sacrificio fueron: $1.79 \text{ g} \pm 0.12 \text{ g}$ y $1.77 \text{ g} \pm 0.14 \text{ g}$ respectivamente, no presentaron diferencias estadísticamente significativas, estos datos se compararon con la prueba estadística t de Student para muestras independientes (anexo 8, figura 14).

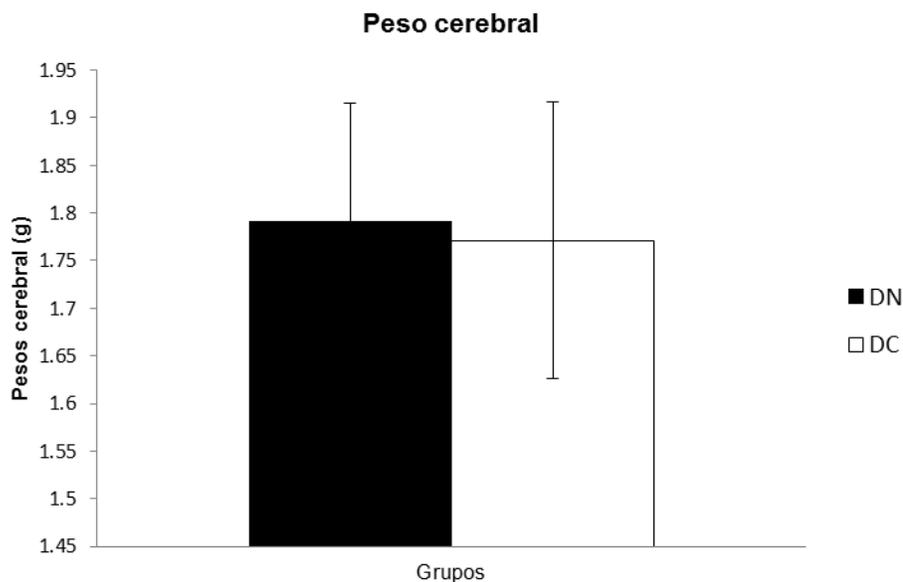


Figura 14. Efecto de la dieta cetogénica sobre el peso cerebral. Gráfica de peso cerebral del grupo DN y DC al momento del sacrificio. No existieron diferencias significativas entre estos grupos.



Figura 15. Perfusión. Sistema de perfusión con circulación de solución salina y paraformaldehído que introduce estas soluciones en el sistema circulatorio de la rata. La bomba peristáltica aporta la presión suficiente permitiendo que el fijador entre a través del ventrículo izquierdo, pase a la aorta, desde la cual se distribuye por todo el cuerpo. Tras pasar por la red capilar la solución fijadora fluye a los vasos venosos que terminan por verter su contenido en la aurícula derecha, donde se realiza una abertura en esta cavidad para que drene la solución fijadora fuera del cuerpo del animal.



Figura 16. Cortes del cerebro. Se observa un cerebro de rata colocado en la platina de un criostato. Se realizaron cortes coronales seriados del encéfalo, a 50 μ m de grosor.

9.5. Inmunorreactividad al cotransportador NKCC1

El análisis cualitativo de las imágenes panorámicas del hipocampo y giro dentado en los cortes procesados con la técnica de inmunodetección para el cotransportador NKCC1 en el grupo DN (figura 17), mostró que la citoarquitectura del giro dentado y del hipocampo no presentaron variaciones, se conservó adecuadamente la laminación propia del giro dentado que se observó tanto en el hemisferio derecho como en el izquierdo, en su región anterior y posterior. Estas características morfológicas también se conservaron en el grupo DC.

Cuando se analizó el patrón de tinción a mayores aumentos (figura 18), se observó que la tinción fue nítida y uniforme a lo largo de todo el giro dentado. Se observaron claramente las células IR-NKCC1 (somas y procesos) en todas las zonas de análisis de las tres capas del giro dentado. Las características morfológicas de las células IR-NKCC1 en el giro dentado se observaron nítidas, de aspecto y tamaño uniforme en cada una de las capas del giro dentado. La coloración de las células osciló entre los colores gris y café tenues hasta el color negro.

También fue fácil identificar y delimitar las regiones de análisis: capa molecular, granular e hilar del giro dentado, tanto en su región anterior como posterior en el hemisferio derecho e izquierdo.

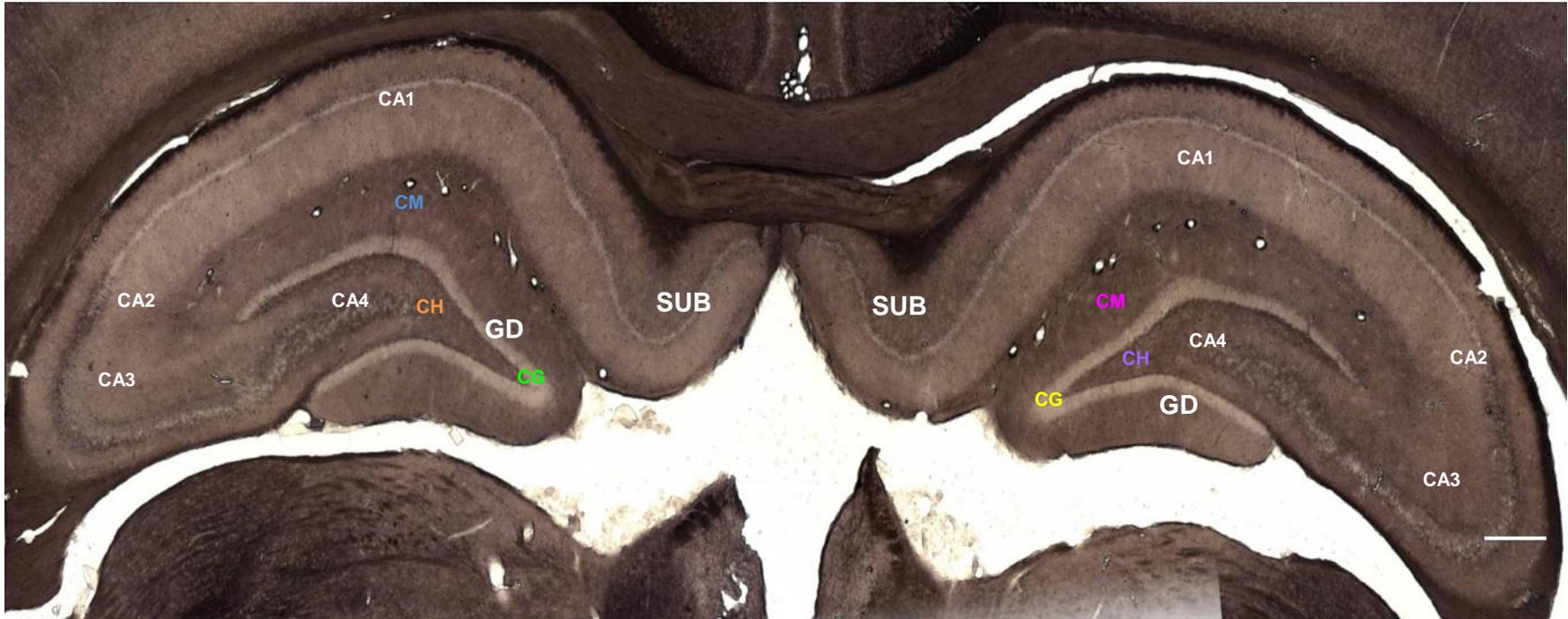


Figura 17. Hipocampo marcado con el anticuerpo NKCC1. Imagen panorámica del hipocampo de una rata del grupo DN. Se observa la laminación propia de giro dentado (GD): capa molecular (CM), granular (CG) e hiliar (CH) y las diferentes zonas del hipocampo: *Cornus Ammonis* 1 (CA1), *Cornus Ammonis* 2 (CA2), *Cornus Ammonis* 3 (CA3), *Cornus Ammonis* 4 (CA4), *Subiculum* (SUB), tanto en el hemisferio derecho como en el izquierdo de la región anterior de giro dentado. Barra de calibración = 500 micras.

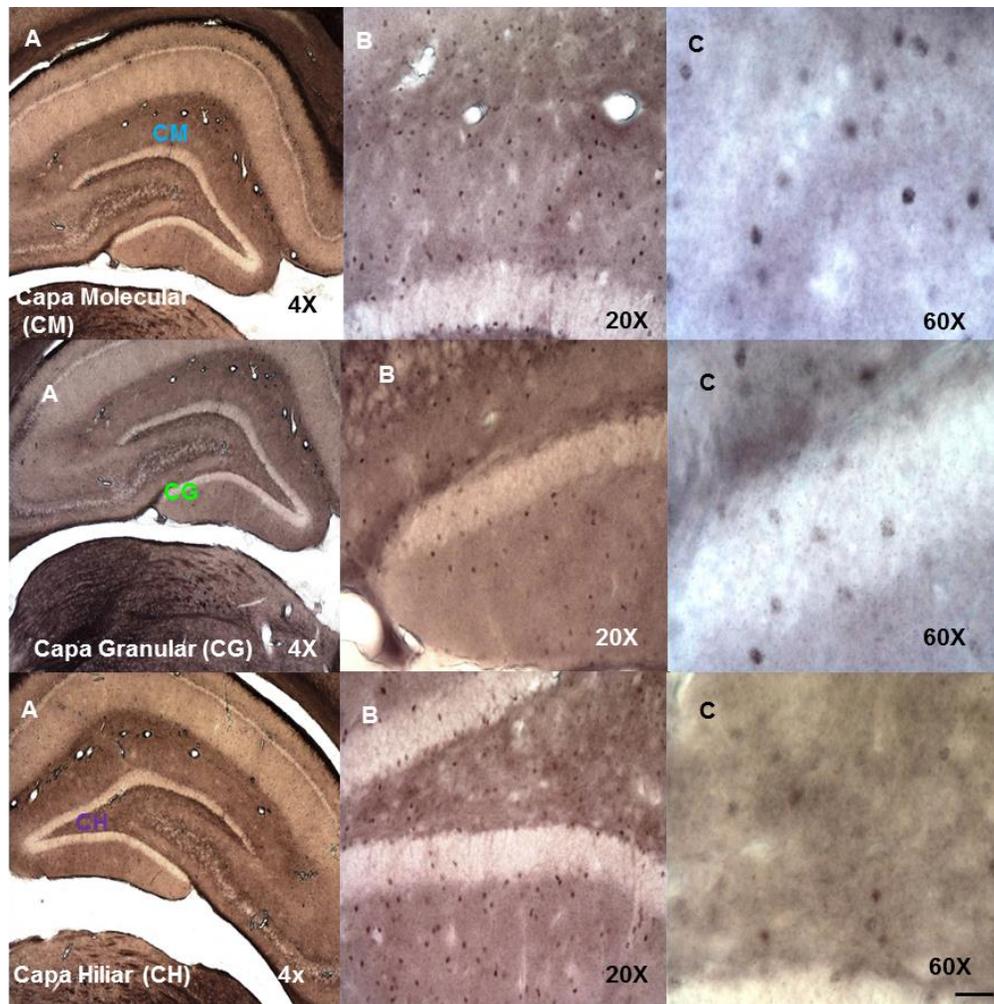


Figura 18. Inmunomarcaje a NKCC1 en las capas del giro dentado. Imágenes de los cortes inmunoteñidos para NKCC1 en una rata del grupo DN. A un aumento de 4X (columna A), se observa la laminación del giro dentado, a 20X (columna B) se observan las células IR-NKCC1 en todas las capas del giro dentado y a 60X (columna C) se observan detalles de las células en cada capa, los soma se observaron nítidos y delimitados. Barra de calibración = 100 micras.

9.6. Análisis estereológico

Una vez que la reacción inmunohistoquímica para NKCC1 resulto positiva en los 12-14 cortes por animal, se procedió a realizar el análisis estereológico aplicando el método del disector óptico en el equipo de estereología (figura 19). Inicialmente se trazaron los contornos de cada una de las zonas de análisis a evaluar a un aumento de 4x (figura 20), hasta completar los 12 a 14 cortes de cada animal (figura 21).

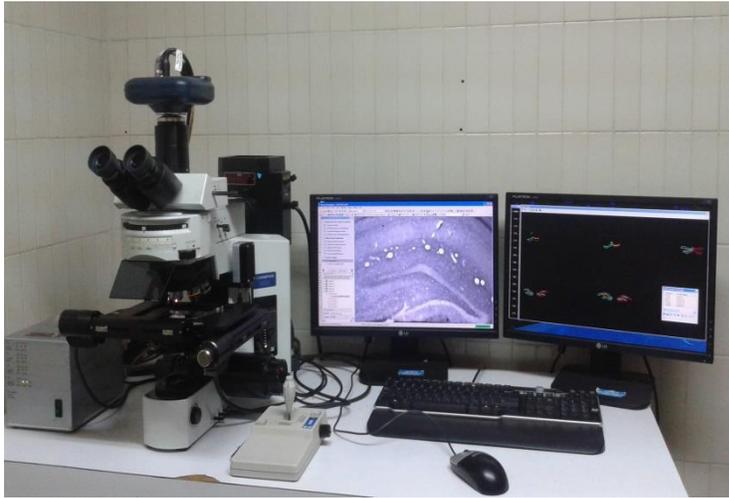


Figura 19. Sistema de análisis de imágenes con estereología. En este equipo, se llevó a cabo el análisis estereológico de cada una de las regiones a evaluar en las tres capas del giro dentado del grupo DN y DC. El sistema está integrado por un microscopio BX51 (Olympus) con platina motorizada acoplado al software estereológico (Microbrightfield) que se maneja en dos monitores.

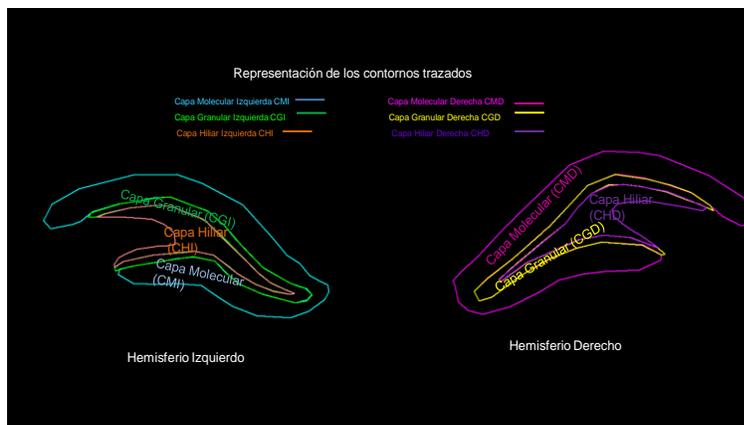


Figura 20. Contornos de un corte del giro dentado en la región anterior. Los contornos fueron trazados para cada una de las tres capas del giro dentado: molecular, granular e hiliar en los dos hemisferios cerebrales.

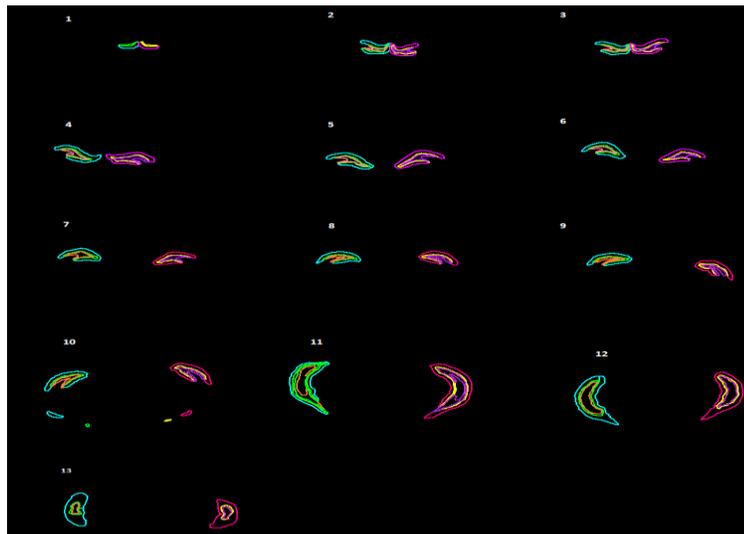


Figura 21. Contornos totales de un individuo de análisis. Trazos de las tres capas del giro dentado en 13 cortes seleccionados de una manera al azar y sistemática de una serie completa de cortes seriados (de anterior a posterior).

Con el fin de cuantificar el número de células IR-NKCC1 y después de un estudio piloto, las medidas de cada zona de conteo o disector fueron las siguientes: cuadro de conteo de 70 x 45 μm y una altura de 13 μm (figura 22). Debido a que la densidad celular es diferente en cada capa, se utilizaron dos mallas de conteo, una de 300 x 300 μm para las capas molecular e hiliar y otra de 250 x 250 μm para la capa granular, que contenían los disectores de una manera equidistante (figura 22).

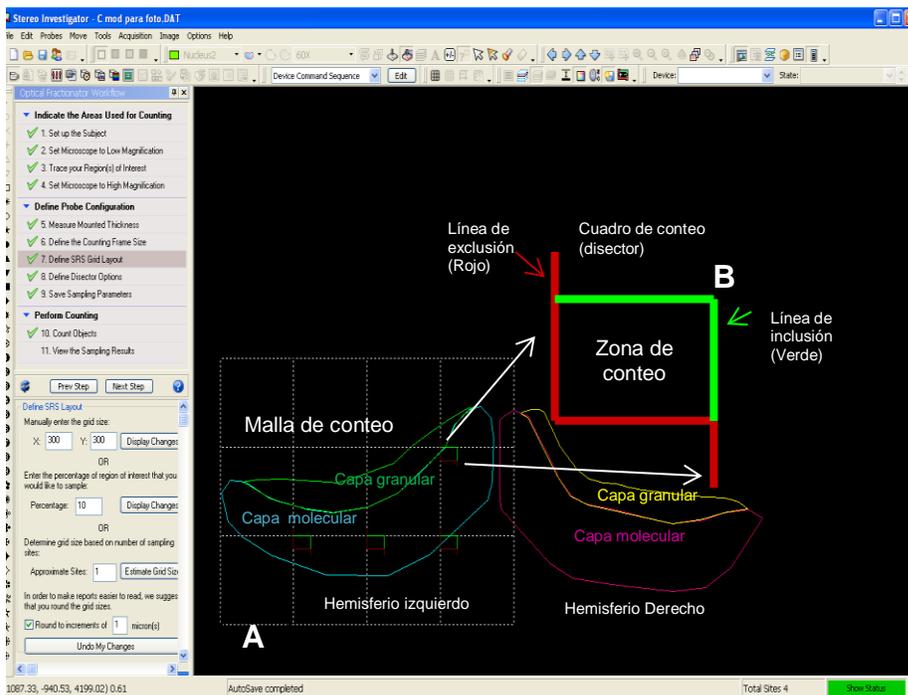


Figura 22. Disector óptico. Imagen del monitor con el programa del fraccionador óptico. En **A**, se observa la región a analizar: capa molecular del giro dentado del hemisferio izquierdo, delimitada por líneas en azul con la malla de conteo (cuadrícula) sobrepuesta al azar. En cada cuadro de la malla que cae dentro de la región de interés, se observa en la parte superior izquierda una zona de conteo o disector. En **B**, una ampliación de un disector óptico con sus líneas de inclusión en verde y de exclusión en rojo.

Se obtuvo el área, volumen y número de células IR-NKCC1 de cada una de las zonas de análisis para cada animal del grupo DN y DC. Durante el conteo de las células IR-NKCC1, sólo se seleccionaron las células con marca positiva, que presentaron coloraciones de café claro a oscuro, cuyos contornos fueron bien definidos. Sólo se contaron aquellas células localizadas dentro de la zona de conteo y sobre las líneas de

inclusión (figura 23). El coeficiente de error de Gundersen para cada análisis fue menor a 0,10 que indicó que los resultados del conteo de células IR-NKCC1 fueron confiables.

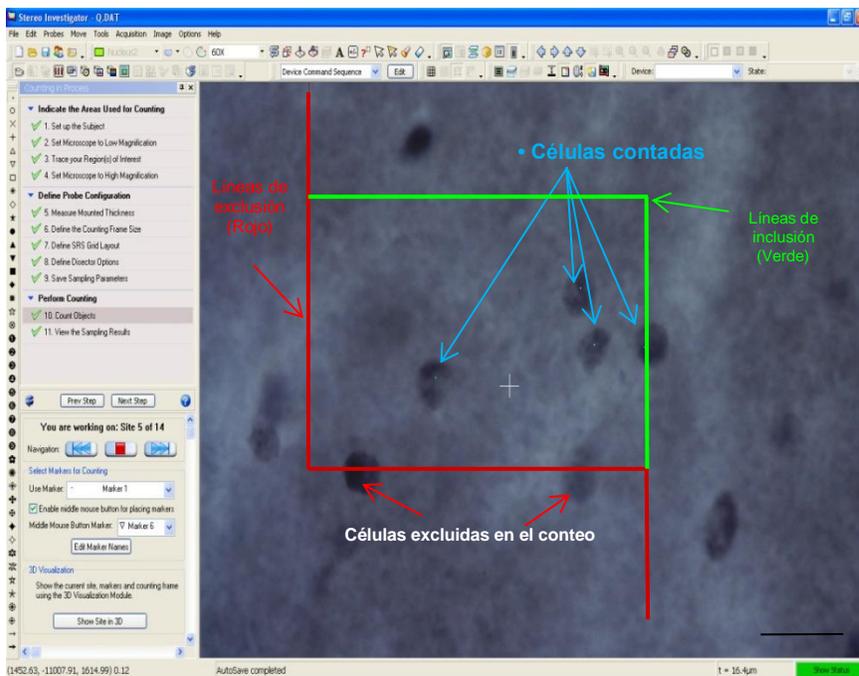


Figura 23. Pantalla con un disector durante el conteo. Zona de conteo o disector óptico sobre la capa molecular del giro dentado del hemisferio izquierdo. Una célula es contada si y solo si se encuentra dentro del marco de conteo o si toca las zonas de inclusión (verdes). Las flechas azules indican las células IR-NKCC1 contadas en este disector y las líneas en rojo las células que tocan las líneas de exclusión y que por tanto no son tomadas en cuenta. Barra de calibración = 100 micras.

Finalmente, tanto para el grupo DN como DC, se obtuvieron las siguientes zonas de análisis de acuerdo al desglose por:

1) capa del giro dentado:

- a. capa molecular
- b. capa granular
- c. capa hilar

2) región del giro dentado:

- a. región anterior
- b. región posterior

c. sumatoria de región anterior y posterior o completa

3) hemisferio o lateralidad:

a. hemisferio derecho

b. hemisferio izquierdo

c. sumatoria de hemisferios: derecho + izquierdo

Se realizaron dos tipos de análisis estadísticos:

1) entre grupos, con comparaciones de cada zona entre el grupo DN y el grupo DC y

2) intra grupo, con comparaciones entre las diferentes zonas de análisis en un mismo grupo (DN o DC).

9.6.1. Comparaciones entre grupos (DN vs DC)

En este análisis se comparó el área, volumen y número de células IR-NKCC1, entre el grupo DN y DC en cada una de las diferentes zonas de análisis.

Al realizar el análisis estadístico con la prueba t de Student para muestras independientes o U de Mann Whitney según fuera el caso, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en las mediciones del área, volumen y número de células IR-NKCC1 de la capa molecular, capa granular, y capa hilar, del giro dentado en los hemisferios derecho e izquierdo de la región anterior ni en la región posterior, ni en la sumatoria de hemisferios, ni en la sumatoria de regiones, (tabla 2, figuras 24, 25 y 26, anexos 9, 10 y 11).

Tabla 2. COMPARACIONES ENTRE GRUPOS (DN vs DC) DEL ÁREA, VOLUMEN Y NÚMERO DE CÉLULAS IR-NKCC1 EN LAS DIFERENTES ZONAS DE ANÁLISIS

Capa	Región	Hemisferio	Significancia estadística		
			Área (μm^2)	Volumen (μm^3)	Número de células IR-NKCC1
Molecular	Anterior	Derecho	NS	NS	NS
Molecular	Anterior	Izquierdo	NS	NS	NS
Sumatoria Molecular	Anterior	$\Sigma = (\text{Derecho} + \text{Izquierdo})$	NS	NS	NS
Molecular	Posterior	Derecho	NS	NS	NS
Molecular	Posterior	Izquierdo	NS	NS	NS
Sumatoria Molecular	Posterior	$\Sigma = (\text{Derecho} + \text{Izquierdo})$	NS	NS	NS
Molecular	Completa = (Anterior + Posterior)	Derecho	NS	NS	NS
Molecular	Completa = (Anterior + Posterior)	Izquierdo	NS	NS	NS
Sumatoria Molecular	Completa = (Anterior + Posterior)	$\Sigma = (\text{Derecho} + \text{Izquierdo})$	NS	NS	NS
Granular	Anterior	Derecho	NS	NS	NS
Granular	Anterior	Izquierdo	NS	NS	NS
Sumatoria Granular	Anterior	$\Sigma = (\text{Derecho} + \text{Izquierdo})$	NS	NS	NS
Granular	Posterior	Derecho	NS	NS	NS
Granular	Posterior	Izquierdo	NS	NS	NS
Sumatoria Granular	Posterior	$\Sigma = (\text{Derecho} + \text{Izquierdo})$	NS	NS	NS
Granular	Completa = (Anterior + Posterior)	Derecho	NS	NS	NS
Granular	Completa = (Anterior + Posterior)	Izquierdo	NS	NS	NS
Sumatoria Granular	Completa = (Anterior + Posterior)	$\Sigma = (\text{Derecho} + \text{Izquierdo})$	NS	NS	NS
Hiliar	Anterior	Derecho	NS	NS	NS
Hiliar	Anterior	Izquierdo	NS	NS	NS
Sumatoria Hiliar	Anterior	$\Sigma = (\text{Derecho} + \text{Izquierdo})$	NS	NS	NS
Hiliar	Posterior	Derecho	NS	NS	NS
Hiliar	Posterior	Izquierdo	NS	NS	NS
Sumatoria Hiliar	Posterior	$\Sigma = (\text{Derecho} + \text{Izquierdo})$	NS	NS	NS
Hiliar	Completa = (Anterior + Posterior)	Derecho	NS	NS	NS
Hiliar	Completa = (Anterior + Posterior)	Izquierdo	NS	NS	NS
Sumatoria Hiliar	Completa = (Anterior + Posterior)	$\Sigma = (\text{Derecho} + \text{Izquierdo})$	NS	NS	NS

Los valores indican las significancias de las pruebas estadísticas t de Student para datos independientes o U de Mann-Whitney. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas al comparar el grupo DN con DC en cada zona de análisis de los parámetros, área, volumen y número de células IR-NKCC1. Σ = sumatoria. NS = No significativo.

9.6.2. Comparaciones intra grupos (DN O DC)

9.6.2.1. Área

Al realizar comparaciones del área de cada una de las zonas de análisis entre el hemisferio derecho e izquierdo en la región anterior, posterior y la región completa (anterior + posterior) de las capas molecular, granular e hiliar, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas tanto en el grupo DN (tabla 3, figura 24, anexo 12) como en el grupo DC (tabla 4, figura 24, anexo 21), lo que indica que no existe diferencia por lateralidad, es decir, el área analizada fue la misma en el hemisferio derecho e izquierdo, tanto en el grupo control como en el grupo DC.

Tabla 3. COMPARACIONES INTRA GRUPOS POR LATERALIDAD: (HEMISFERIO DERECHO VS HEMISFERIO IZQUIERDO) DEL ÁREA, VOLUMEN Y NÚMERO DE CÉLULAS IR-NKCC1 EN EL GRUPO DN

Capa	Región	Comparación de Hemisferios	Significancia estadística		
			Área (μm^2)	Volumen (μm^3)	Número de células IR-NKCC1
Molecular	Anterior	Derecho vs Izquierdo	NS	NS	NS
Molecular	Posterior	Derecho vs Izquierdo	NS	NS	NS
Molecular	Completa = (Anterior + Posterior)	Derecho vs Izquierdo	NS	NS	NS
Granular	Anterior	Derecho vs Izquierdo	NS	NS	NS
Granular	Posterior	Derecho vs Izquierdo	NS	NS	NS
Granular	Completa = (Anterior + Posterior)	Derecho vs Izquierdo	NS	NS	NS
Hiliar	Anterior	Derecho vs Izquierdo	NS	NS	NS
Hiliar	Posterior	Derecho vs Izquierdo	NS	NS	NS
Hiliar	Completa = (Anterior + Posterior)	Derecho vs Izquierdo	NS	NS	NS

Los valores representan las significancias de las pruebas estadísticas *post hoc* Tukey o Dunnett T3, (para ANOVA de un factor o Welch, respectivamente). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas al comparar los hemisferios en el grupo DN en cada zona de análisis de los parámetros: área, volumen y número de células IR-NKCC1 (figuras 24, 25 y 26). NS = No significativo.

Tabla 4. COMPARACIONES INTRA GRUPOS POR LATERALIDAD: (HEMISFERIO DERECHO VS HEMISFERIO IZQUIERDO) DEL ÁREA, VOLUMEN Y NÚMERO DE CÉLULAS IR-NKCC1 EN EL GRUPO DC

Capa	Región	Comparación de Hemisferios	Significancia estadística		
			Área (μm^2)	Volumen (μm^3)	Número de células IR-NKCC1
Molecular	Anterior	Derecho vs Izquierdo	NS	NS	NS
Molecular	Posterior	Derecho vs Izquierdo	NS	NS	NS
Molecular	Completa = (Anterior + Posterior)	Derecho vs Izquierdo	NS	NS	NS
Granular	Anterior	Derecho vs Izquierdo	NS	NS	NS
Granular	Posterior	Derecho vs Izquierdo	NS	NS	NS
Granular	Completa = (Anterior + Posterior)	Derecho vs Izquierdo	NS	NS	NS
Hiliar	Anterior	Derecho vs Izquierdo	NS	NS	NS
Hiliar	Posterior	Derecho vs Izquierdo	NS	NS	NS
Hiliar	Completa = (Anterior + Posterior)	Derecho vs Izquierdo	NS	NS	NS

Los valores representan las significancias de las pruebas estadísticas *post hoc* Tukey o Dunnett T3, (para ANOVA de un factor o Welch, respectivamente). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas al comparar los hemisferios en el grupo DC en cada zona de análisis de los parámetros, área, volumen y número de células IR-NKCC1 (figuras 24, 25 y 26). NS = No significativo.

La sumatoria del área de los hemisferios derecho e izquierdo de la región posterior es significativamente mayor que en la región anterior del GD en la capa molecular, granular e hiliar en el grupo DN (tabla 5, figura 24, anexo 13) y en la capa molecular e hiliar en el grupo DC (tabla 6, figura 24, anexo 22), lo cual indica que existe más área en la región posterior del GD tanto en el grupo DN como DC.

Tabla 5. COMPARACIONES INTRA GRUPOS POR REGIÓN: (ANTERIOR vs POSTERIOR) DEL ÁREA, VOLUMEN Y NÚMERO DE CÉLULAS IR-NKCC1 EN EL GRUPO DN

Capa	Suma de hemisferios	Comparación de Región	Significancia estadística		
			Área (μm^2)	Volumen (μm^3)	Número de células IR-NKCC1
Molecular	$\Sigma = (\text{Derecho} + \text{Izquierdo})$	Anterior vs Posterior	***	***	*
Granular	$\Sigma = (\text{Derecho} + \text{Izquierdo})$	Anterior vs Posterior	***	***	NS
Hiliar	$\Sigma = (\text{Derecho} + \text{Izquierdo})$	Anterior vs Posterior	***	***	*

Los valores representan las significancias de las pruebas estadísticas *post hoc* Tukey o Dunnett T3, (para ANOVA de un factor o Welch, respectivamente). Se encontraron diferencias estadísticamente significativas al comparar la región anterior y posterior del giro dentado en las tres capas en los tres parámetros del grupo DN excepto en el número de células IR-NKCC1 de la capa granular (figuras 24, 25 y 26). Σ = sumatoria. NS = No significativo. Significativo si: * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$.

Tabla 6. COMPARACIONES INTRA GRUPOS POR REGIÓN: (ANTERIOR vs POSTERIOR) EN EL GRUPO DC

Capa	Suma de hemisferios	Comparación de Región	Significancia estadística		
			Área (μm^2)	Volumen (μm^3)	Número de células IR-NKCC1
Molecular	$\Sigma = (\text{Derecho} + \text{Izquierdo})$	Anterior vs Posterior	**	**	NS
Granular	$\Sigma = (\text{Derecho} + \text{Izquierdo})$	Anterior vs Posterior	NS	NS	NS
Hiliar	$\Sigma = (\text{Derecho} + \text{Izquierdo})$	Anterior vs Posterior	**	***	NS

Los valores representan las significancias de las pruebas estadísticas *post hoc* Tukey o Dunnett T3, (para ANOVA de un factor o Welch, respectivamente). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas al comparar la región anterior y posterior de la capa granular en ninguno de los parámetros, área, volumen y número de células IR-NKCC1. Tampoco existieron diferencias estadísticamente significativas en las comparaciones de la capa molecular e hiliar en el número de células IR-NKCC1, para las zonas restantes si existieron diferencias estadísticamente significativas en el área y volumen (figuras 24, 25 y 26). Σ = sumatoria. NS = No significativo. Significativo si: * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$.

Tabla 7. COMPARACIONES INTRA GRUPOS POR CAPA: (MOLECULAR, GRANULAR E HILIAR) DEL ÁREA, VOLUMEN Y NÚMERO DE CÉLULAS IR-NKCC1 EN EL GRUPO DN					
Región	Hemisferio	Comparación de capas	Significancia estadística		
			Área (μm^2)	Volumen (μm^3)	Número de células IR-NKCC1
Anterior	Derecho	Molecular vs Granular	***	***	NS
Anterior	Derecho	Molecular vs Hiliar	***	***	**
Anterior	Derecho	Granular vs Hiliar	NS	NS	NS
Anterior	Izquierdo	Molecular vs Granular	***	***	*
Anterior	Izquierdo	Molecular vs Hiliar	***	***	***
Anterior	Izquierdo	Granular vs Hiliar	NS	NS	NS
Anterior	$\Sigma = (\text{Derecho} + \text{Izquierdo})$	Molecular vs Granular	***	***	*
Anterior	$\Sigma = (\text{Derecho} + \text{Izquierdo})$	Molecular vs Hiliar	***	***	**
Anterior	$\Sigma = (\text{Derecho} + \text{Izquierdo})$	Granular vs Hiliar	NS	NS	NS
Posterior	Derecho	Molecular vs Granular	***	***	***
Posterior	Derecho	Molecular vs Hiliar	***	***	***
Posterior	Derecho	Granular vs Hiliar	NS	NS	NS
Posterior	Izquierdo	Molecular vs Granular	***	***	**
Posterior	Izquierdo	Molecular vs Hiliar	***	***	***
Posterior	Izquierdo	Granular vs Hiliar	NS	NS	NS
Posterior	$\Sigma = (\text{Derecho} + \text{Izquierdo})$	Molecular vs Granular	***	***	***
Posterior	$\Sigma = (\text{Derecho} + \text{Izquierdo})$	Molecular vs Hiliar	***	***	***
Posterior	$\Sigma = (\text{Derecho} + \text{Izquierdo})$	Granular vs Hiliar	NS	NS	NS
Completa = (Anterior + Posterior)	Derecho	Molecular vs Granular	***	***	***
Completa = (Anterior + Posterior)	Derecho	Molecular vs Hiliar	***	***	***
Completa = (Anterior + Posterior)	Derecho	Granular vs Hiliar	NS	NS	NS
Completa = (Anterior + Posterior)	Izquierdo	Molecular vs Granular	***	***	**
Completa = (Anterior + Posterior)	Izquierdo	Molecular vs Hiliar	***	***	***
Completa = (Anterior + Posterior)	Izquierdo	Granular vs Hiliar	NS	NS	NS
Completa = (Anterior + Posterior)	$\Sigma = (\text{Derecho} + \text{Izquierdo})$	Molecular vs Granular	***	***	***
Completa = (Anterior + Posterior)	$\Sigma = (\text{Derecho} + \text{Izquierdo})$	Molecular vs Hiliar	***	***	***
Completa = (Anterior + Posterior)	$\Sigma = (\text{Derecho} + \text{Izquierdo})$	Granular vs Hiliar	NS	NS	NS

Los valores representan las significancias de las pruebas estadísticas *post hoc* Tukey o Dunnett T3, (para ANOVA de un factor o Welch, respectivamente). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre la capa granula e hiliar en el grupo DN en los parámetros: área, volumen y número de células IR-NKCC1, en estos parámetros, tampoco se encontraron diferencias entre la capa molecular y granular del hemisferio derecho, mientras que entre el resto de las capas si se encontraron diferencias estadísticamente significativas en todos los parámetros (figuras 24, 25 y 26). Σ = sumatoria. NS = No significativo. Significativo si: * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$.

Tabla 8. COMPARACIONES INTRA GRUPOS POR CAPA: (MOLECULAR, GRANULAR E HILIAR) DEL ÁREA, VOLUMEN Y NÚMERO DE CÉLULAS IR-NKCC1 EN EL GRUPO DC

Región	Hemisferio	Comparación de capas	Significancia estadística		
			Área (μm^2)	Volumen (μm^3)	Número de células IR-NKCC1
Anterior	Derecho	Molecular vs Granular	***	***	NS
Anterior	Derecho	Molecular vs Hiliar	***	***	**
Anterior	Derecho	Granular vs Hiliar	NS	NS	NS
Anterior	Izquierdo	Molecular vs Granular	***	***	NS
Anterior	Izquierdo	Molecular vs Hiliar	***	***	**
Anterior	Izquierdo	Granular vs Hiliar	NS	NS	NS
Anterior	Σ = (Derecho + Izquierdo)	Molecular vs Granular	***	***	NS
Anterior	Σ = (Derecho + Izquierdo)	Molecular vs Hiliar	***	***	**
Anterior	Σ = (Derecho + Izquierdo)	Granular vs Hiliar	NS	NS	NS
Posterior	Derecho	Molecular vs Granular	***	***	NS
Posterior	Derecho	Molecular vs Hiliar	***	***	*
Posterior	Derecho	Granular vs Hiliar	NS	NS	NS
Posterior	Izquierdo	Molecular vs Granular	***	***	NS
Posterior	Izquierdo	Molecular vs Hiliar	***	***	*
Posterior	Izquierdo	Granular vs Hiliar	NS	NS	NS
Posterior	Σ = (Derecho + Izquierdo)	Molecular vs Granular	***	***	NS
Posterior	Σ = (Derecho + Izquierdo)	Molecular vs Hiliar	***	***	*
Posterior	Σ = (Derecho + Izquierdo)	Granular vs Hiliar	NS	NS	NS
Completa = (Anterior + Posterior)	Derecho	Molecular vs Granular	***	***	NS
Completa = (Anterior + Posterior)	Derecho	Molecular vs Hiliar	***	***	**
Completa = (Anterior + Posterior)	Derecho	Granular vs Hiliar	NS	NS	NS
Completa = (Anterior + Posterior)	Izquierdo	Molecular vs Granular	***	***	NS
Completa = (Anterior + Posterior)	Izquierdo	Molecular vs Hiliar	***	***	**
Completa = (Anterior + Posterior)	Izquierdo	Granular vs Hiliar	NS	NS	NS
Completa = (Anterior + Posterior)	Σ = (Derecho + Izquierdo)	Molecular vs Granular	***	***	NS
Completa = (Anterior + Posterior)	Σ = (Derecho + Izquierdo)	Molecular vs Hiliar	***	***	**
Completa = (Anterior + Posterior)	Σ = (Derecho + Izquierdo)	Granular vs Hiliar	NS	NS	NS

Los valores representan las significancias de las pruebas estadísticas *post hoc* Tukey o Dunnett T3, (para ANOVA de un factor o Welch, respectivamente). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre la capa granular e hilar el grupo DC en los parámetros, área, volumen y número de células IR-NKCC1, en estos parámetros, tampoco se encontraron diferencias entre la capa molecular y granular de ambos hemisferios en las distintas regiones del giro dentado, mientras que entre las otras capas si se encontraron diferencias estadísticamente significativas en todos los parámetros, (figuras 24, 25 y 26). Σ = sumatoria. NS = No significativo. Significativo si: * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$.

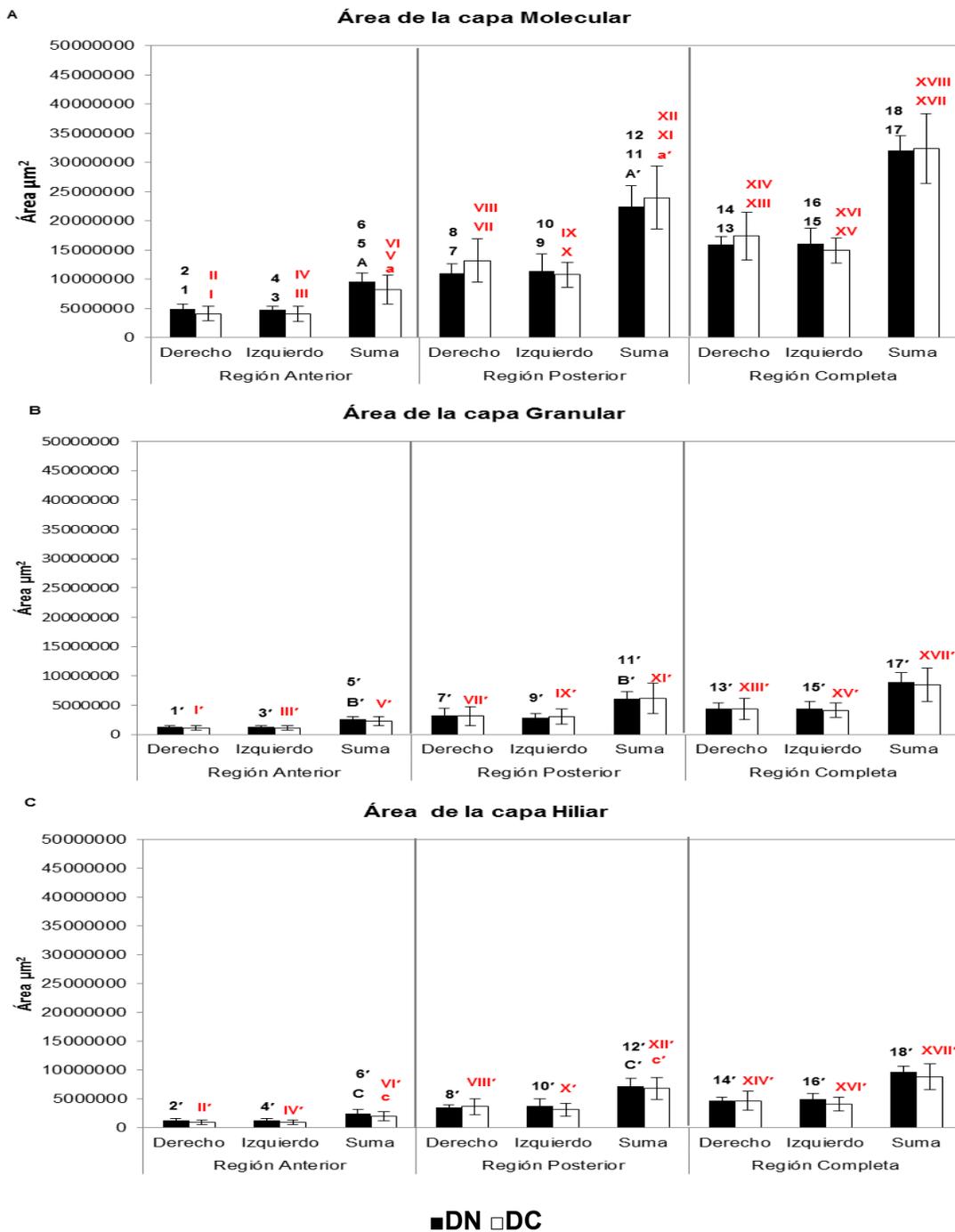


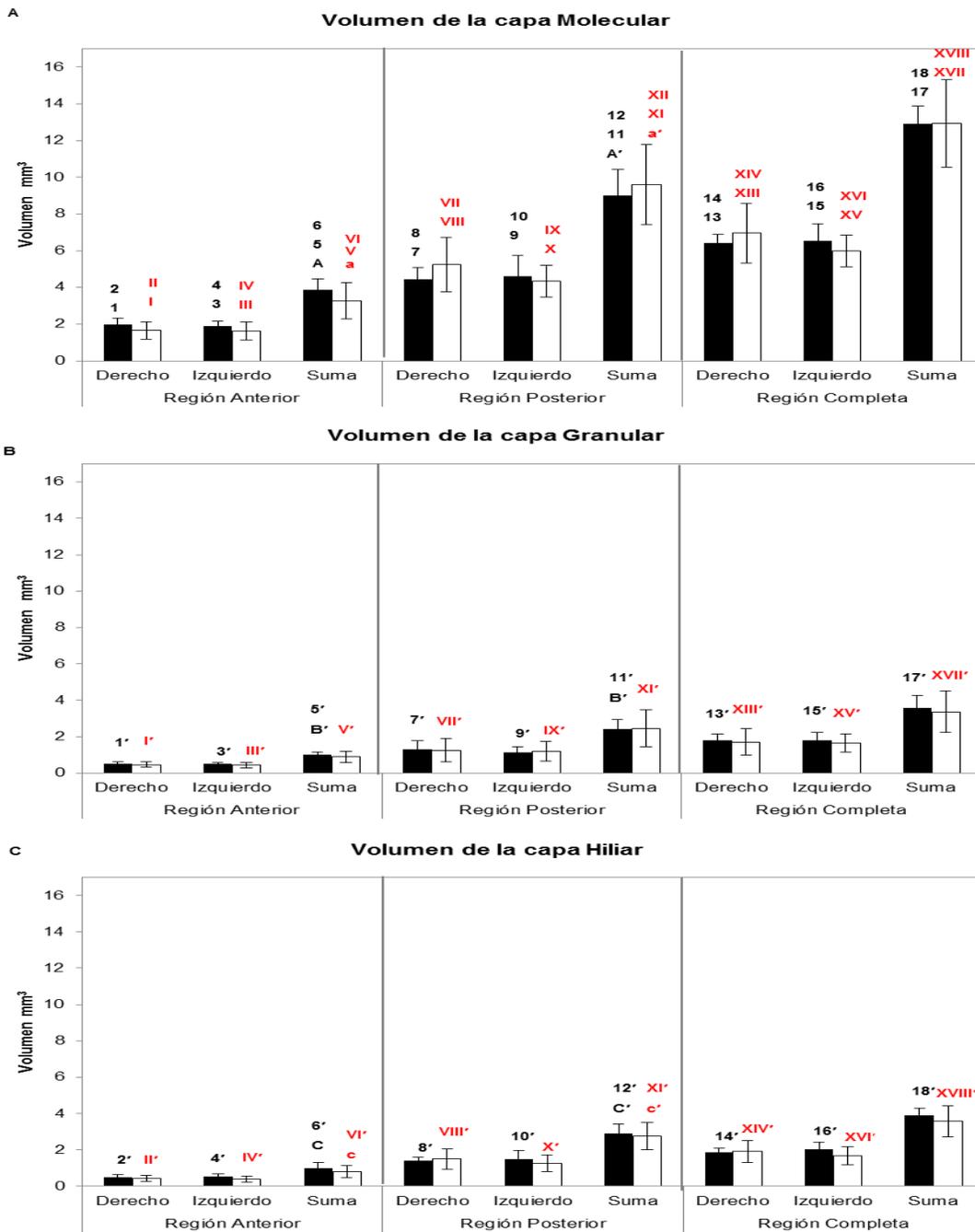
Figura 24. Gráfica de las áreas de las tres capas del giro dentado en los dos grupos de estudio. Promedio \pm la desviación estándar del área (μm^2) de las tres capas del giro dentado: molecular (A), granular (B) e hiliar (C) tanto en el hemisferio cerebral derecho como en el izquierdo y la sumatoria de ambos hemisferios, en la región anterior, posterior y región completa (anterior más posterior) del grupo DN (barras negras) y DC (barras blancas). No existieron diferencias estadísticamente significativas entre las áreas del grupo DN y DC en ninguna de las diferentes zonas de análisis en las tres capas del giro dentado. No existieron diferencias significativas en el área por lateralidad en ninguna de las zonas de análisis. La sumatoria del área de los hemisferios derecho e izquierdo en la región posterior fue mayor que en la anterior en las tres capas del giro dentado: molecular (A vs A' en el grupo DN y a vs a' en el grupo DC), granular (B vs B' en el grupo DN) e hiliar (C vs C' en el grupo DN y c vs c' en el grupo DC). El área de la capa molecular en todas las zonas de análisis fue mayor que la granular (números negros impares vs números negros impares' en cada zona para el grupo DN y números romanos impares rojos vs números romanos impares rojos' en cada zona para el grupo DC). El área de la capa molecular fue mayor que el área de la capa hiliar en todas las zonas de análisis (números negros pares vs números negros pares' en cada zona para el grupo DN y números romanos pares rojos vs números romanos pares rojos' en cada zona para el grupo DC).

9.6.2.2. Volumen

Al realizar comparaciones del volumen de cada una de las zonas de análisis entre el hemisferio derecho e izquierdo en la región anterior, posterior y la región completa de las capas molecular, granular e hiliar, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas tanto en el grupo DN (tabla 3, figura 25, anexo 15) como en el grupo DC (tabla 4, figura 25, anexo 24), lo que indica que no existe diferencia por lateralidad, es decir, el volumen analizado fue el mismo en el hemisferio derecho e izquierdo.

La sumatoria del volumen de los hemisferios derecho e izquierdo de la región posterior es significativamente mayor que en la región anterior del GD en la capa molecular, granular e hiliar en el grupo DN (tabla 4, figura 25, anexo 16) y en la capa molecular e hiliar en el grupo DC (tabla 5, figura 25, anexo 25), lo cual indica que existe más volumen en la región posterior del GD.

Cuando se comparó el volumen de las diferentes zonas de análisis por capas, se observó que es significativamente mayor la capa molecular respecto de la granular e hiliar, por el contrario, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas cuando se compararon las capas granular e hiliar tanto en el grupo DN (tabla 7, figura 25, anexo 17) como en el grupo DC (tablas 8, figura 25, anexo 26).



■ DN □ DC

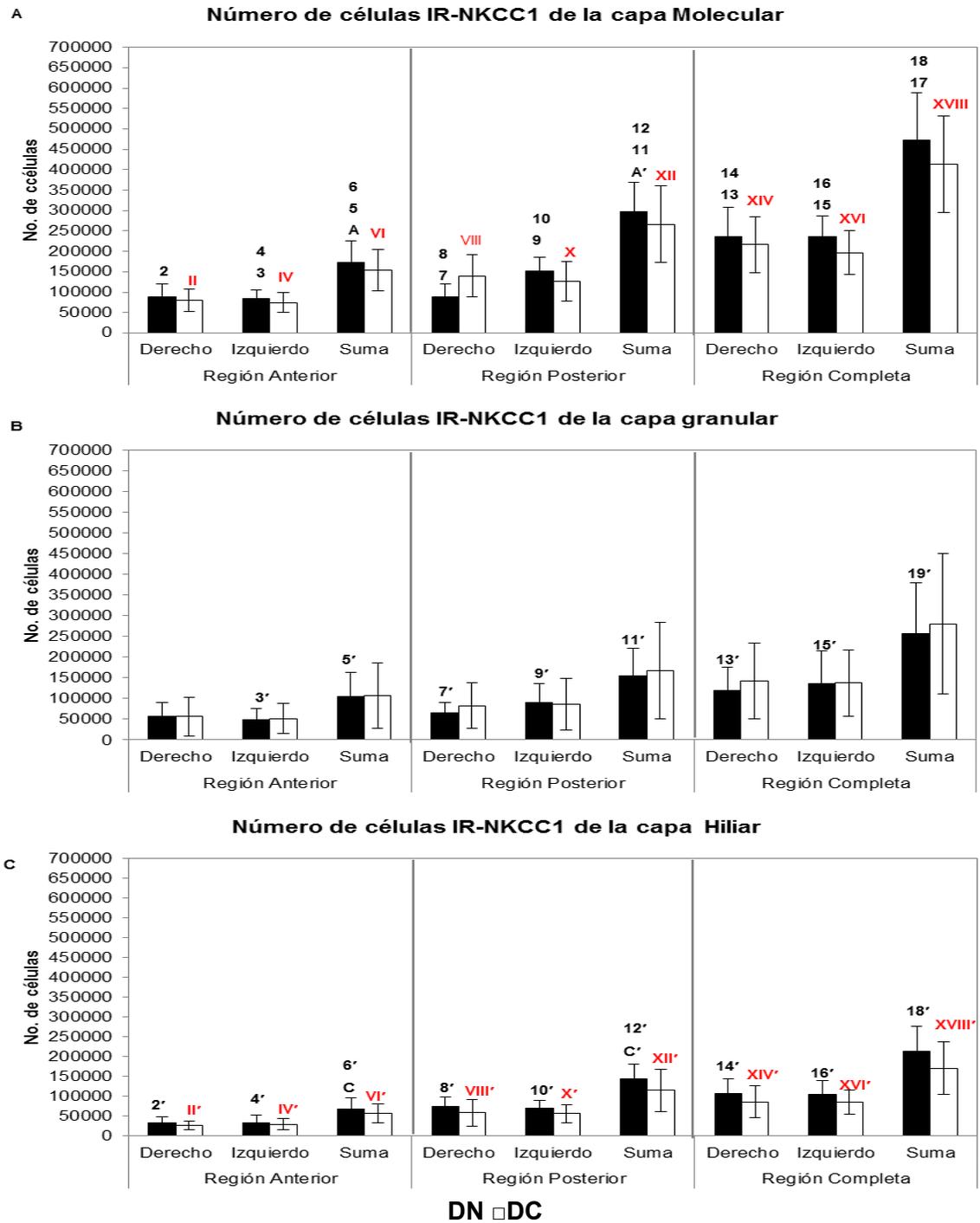
Figura 25. Gráfica del volumen de las capas del giro dentado: molecular, granular e hilar. Promedio y desviación estándar del volumen (μm^3) de las tres capas del giro dentado: molecular (A), granular (B) e hilar (C) tanto en el hemisferio cerebral derecho como en el izquierdo y la sumatoria de ambos hemisferios, en la región anterior, posterior y región completa (anterior y posterior) del giro dentado del grupo DN (barras negras) y DC (barras blancas). No existieron diferencias estadísticamente significativas entre el volumen del grupo DN y DC en ninguna de las diferentes zonas de análisis en las tres capas del giro dentado. No existieron diferencias significativas por lateralidad del volumen en ninguna de las zonas de análisis. La sumatoria del volumen de los hemisferios derecho e izquierdo en la región posterior fue mayor que en la anterior en las tres capas del giro dentado: molecular (A vs A' en el grupo DN y a vs a' en el grupo DC), granular (B vs B' en el grupo DN) e hilar (C vs C' en el grupo DN y c vs c' en el grupo DC). El volumen de la capa molecular en todas las zonas de análisis fue mayor que la granular (números negros impares vs números negros impares' en cada zona para el grupo DN y números romanos impares rojos vs números romanos impares rojos' en cada zona para el grupo DC). El volumen de la capa molecular fue mayor que la hilar en todas las zonas de análisis (números negros pares vs números negros pares' en cada zona para el grupo DN y números romanos pares rojos vs números romanos pares rojos' en cada zona para el grupo DC).

9.6.2.3. Número de células IR-NKCC1

Al realizar comparaciones del número de células IR-NKCC1 de cada una de las zonas de análisis entre el hemisferio derecho e izquierdo en la región anterior, posterior y la región completa de las capas molecular, granular e hiliar, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas tanto en el grupo DN (tabla 3, figura 26, anexo 18) como en el grupo DC (tabla 4, figura 26, anexo 27), lo que indica que no existe diferencia por lateralidad, es decir, el número de células IR-NKCC1 analizado fue el mismo en el hemisferio derecho e izquierdo.

Al analizar el número de células IR-NKCC1 en la sumatoria de hemisferios del grupo DN, sólo existieron diferencias estadísticamente significativas entre la región anterior y posterior de las capas molecular e hiliar (tabla 5, figura 26, anexo 19). No existieron diferencias estadísticamente significativas en la sumatoria de los hemisferios derecho e izquierdo de la región posterior y anterior en ninguna de las tres capas del giro dentado en el grupo DC (tabla 6, figura 25, anexo 28).

Cuando se comparó el número de células IR-NKCC1 por capas, se observó que éste es significativamente mayor en la capa molecular respecto de la granular e hiliar, por el contrario no se encontraron diferencias estadísticamente significativas cuando se compararon las capas granular e hiliar en el grupo DN (tabla 7, figura 26, anexo 20) y que éste es mayor en la capa molecular respecto de la hiliar, sin presentarse diferencias significativas entre la capa molecular y granular en el grupo DC (tabla 8, figura 26, anexo 29).



DN □ DC

Figura 26. Gráfica del número de células IR-NKCC1 de las capas del giro dentado: molecular, granular e hilar Promedio y desviación estándar del número de células IR-NKCC1 de las tres capas del giro dentado: molecular (A), granular (B) e hilar (C) tanto en el hemisferio cerebral derecho como en el izquierdo y la sumatoria de ambos hemisferios, en la región anterior, posterior y región completa (anterior y posterior) del giro dentado del grupo DN (barras negras) y DC (barras blancas). No existieron diferencias estadísticamente significativas entre el número de células IR-NKCC1 del grupo DN y DC en ninguna de las diferentes zonas de análisis en las tres capas del giro dentado. No existieron diferencias significativas por lateralidad del número de células IR-NKCC1 en ninguna de las zonas de análisis. La sumatoria del número de células IR-NKCC1 de los hemisferios derecho e izquierdo en la región posterior fue mayor que en la anterior en las capas dentado: molecular (A vs A' en el grupo DN) e hilar (C vs C' en el grupo DN). El número de células IR-NKCC1 de la capa molecular en todas las zonas de análisis fue mayor que la granular (números negros impares vs números negros impares' en cada zona para el grupo DN y **números romanos impares rojos vs números romanos impares rojos'** en cada zona para el grupo DC). El número de células IR-NKCC1 de la capa molecular fue mayor que la hilar en todas las zonas de análisis (números negros pares vs números negros pares' en cada zona para el grupo DN y **números romanos pares rojos vs números romanos pares rojos'** en cada zona para el grupo DC).

10. DISCUSIÓN

En este estudio, al momento del destete (21 días de edad postnatal), cuando se inició la fase experimental y la provisión de las dietas tanto normal como cetogénica, los resultados mostraron que no existieron diferencias significativas en el peso corporal, glucosa y β -hidroxibutirato entre el grupo con dieta normal y el grupo con dieta cetogénica, lo cual indica que las condiciones basales de ambos grupos fueron iguales al iniciar el experimento.

Al concluir la fase experimental (114 días de edad postnatal y 93 días después de iniciadas las dietas), la dieta cetogénica no tuvo efecto significativo sobre el peso corporal con respecto al grupo que recibió dieta normal, sin embargo se observó una ligera tendencia a disminuir en el grupo cetogénico^{18, 54}. A simple vista, ambos grupos no presentaron diferencia en el comportamiento ni en su estado físico, como se observó en un grupo de ratones alimentados con el mismo tipo de dieta cetogénica (Harlan-Teklad No. 96355) que se utilizó en el presente trabajo y dieta normal durante 4 semanas, se observó además que la ganancia de peso fue la misma entre los grupos⁵⁴. En otro estudio se observó que, ratas de la cepa Sprague-Dawley alimentadas con dieta cetogénica que contenía 10% de proteína, no mostraron signos de desnutrición o enfermedad, cuando la dieta se inició en el día 22 postnatal^{55, 56}. Sin embargo, en ratas Wistar alimentadas con una dieta que tenía una concentración de proteínas al 20%, las ratas si presentaron pérdida de peso y pelo, estas características sugirieron desnutrición⁵⁵, debido a lo anterior se utilizó la cepa Sprague-Dawley en el presente estudio. Cuando se incidió en la cavidad abdominal durante la perfusión de los animales, se observó que las ratas del grupo DC presentaron más tejido adiposo que

las del grupo DN, probablemente la ganancia de peso en el grupo DC pudo deberse a los depósitos de grasa acumulados más que al peso muscular, lo que concuerda con un trabajo donde se observó que en la región ependimal y perirrenal aumento la cantidad de masa de la grasa en el grupo DC que en el grupo control. Aun cuando el grupo experimental presento menor peso que el grupo normal, la relación entre el peso de grasa con respecto al peso corporal resulto ser mayor en el grupo DC, originado por el aumento de tejido adiposo en las ratas del grupo alimentado con dieta cetogénica⁵⁶. Los resultados del presente trabajo concuerdan con estudios donde se observó que el tratamiento con una variedad de dietas cetogénicas no induce efectos sobre el peso corporal; por ejemplo, al proporcionar a un grupo de ratas macho adultas de 19 meses de edad posnatal, dos dietas cetogénicas con concentraciones de 10% y 20% de triglicéridos de cadena media durante 8 semanas⁵⁷.

Además, en otro trabajo donde se probaron dos tipos de dietas cetogénicas con concentraciones de lípidos y proteínas más carbohidratos de 6.6:1 y 3.0:1 y una dieta control, que fueron administradas al destete a grupos de ratas Sprague-Dawley, se les realizaron mediciones constantes de β -hidroxibutirato y glucosa en un glucómetro marca Abbott (método que se utilizó en el presente trabajo). Los resultados mostraron que las concentraciones de β -hidroxibutirato se elevaron mientras que las de glucosa disminuyeron al segundo día de la administración de la dieta de concentración 6.6:1, las cuales, permanecieron así hasta los 19 días cuando se finalizó la administración de esa dieta. En ese momento, las ratas presentaron un peso ligeramente menor que el del grupo con dieta cetogénica con concentración 3.0:1; las cuales apenas comenzaban a disminuir las concentraciones de glucosa y el aumento de la cetosis, la cetosis solo permaneció hasta los 74 días de administración de las dieta 3.0:1. Al finalizar el periodo

de alimentación, las ratas cetogénicas y controles no diferían en el peso corporal. La disminución de la glucosa en la sangre en el grupo control entre las semanas 3 y la 13 de edad, parece ser un efecto normal del desarrollo⁵⁸, estos resultados son semejantes a los encontrados en el presente trabajo.

Como se muestra en los resultados, la dieta cetogénica produjo un aumento en la concentración de β -hidroxibutirato en sangre periférica, lo cual indica un aumento en la cetosis tal como se esperaba^{42, 54, 59, 60}. Este resultado confirma que la dieta cetogénica aplicada en el presente trabajo en efecto generó cetosis. Además, se sabe que un estado de cetosis es necesario para que la dieta cetógena inicie sus efectos beneficios⁶¹. Se ha reportado que un estado de cetosis por un mes es suficiente para que la dieta cetogénica muestre sus benéficos en los animales como tratamiento de alguna patología^{54, 62}; sin embargo no se ha demostrado consistentemente una correlación entre el grado de hipercetonemia y la eficacia clínica⁶³.

El grupo control o alimentado con una dieta normal presento niveles de β -hidroxibutirato al destete mayores que al finalizar el experimento en un 70%. Esto se debe a que las ratas como los humanos son animales altriciales, al nacimiento la madre amamanta a las crías durante el periodo de lactancia que finaliza al momento del destete, durante este periodo las crías son hipercetonémicas debido a que la leche materna contiene una alta cantidad de grasa⁶⁴, principalmente triglicéridos con ácidos grasos de cadena media, que favorecen su metabolismo^{65,66}, en la leche materna humana, las grasas proporcionan el 40% de la energía total⁶⁴ por lo tanto, se estimula la producción de cuerpos cetónicos, en la rata, estos cuerpos cetónicos aumentan durante la segunda y tercera semana postnatal y disminuyen gradualmente hasta alcanzar los niveles adultos⁶⁷.

En el grupo cetogénico, el nivel de β -hidroxibutirato en sangre periférica disminuyó ligeramente al finalizar el experimento, indicando que la dieta cetogénica aplicada a este grupo sí produjo cuerpos cetónicos y por lo tanto un estado de cetosis que se mantuvo durante los tres meses del consumo de la dieta.

En cuanto a la glucosa, se observó que los niveles en sangre periférica disminuyeron al final del experimento respecto del inicio en ambos grupos, lo cual es debido a que en etapas tempranas del desarrollo el cuerpo obtiene la mayor parte de la energía por la oxidación de las grasas, pues la glucosa es ineficiente en el cerebro del recién nacido, por lo tanto los niveles sanguíneos de glucosa son más elevados en esta etapa; después del destete en condiciones normales, el cerebro obtiene casi toda su energía de la oxidación aeróbica de la glucosa por lo tanto en la edad adulta la principal fuente de energía en el organismo se obtiene de la glucosa, de tal manera los niveles sanguíneos de glucosa disminuyen por su consumo. La DC, presenta concentraciones de hidratos de carbono más bajos que la leche materna por lo tanto la reducción de la concentración de glucosa sanguínea pudiera ser debido a este fenómeno⁶⁵. Por lo anterior al finalizar el experimento, sólo el grupo control tuvo diferencias significativas.

La dieta cetogénica no tuvo efecto sobre el peso cerebral. Es bien conocido que el cerebro es uno de los órganos que presenta menor susceptibilidad que otros órganos a los efectos de diferentes dietas como una dieta baja en proteínas, pues se ha observado que no existen efectos sobre el peso cerebral^{67, 68}.

La dieta cetogénica no tuvo efecto en el área y volumen de la capa molecular, granular e hilar del giro dentado. Por un lado este resultado indica que la cuantificación del número de células IR-NKCC1 se llevó a cabo en un área y volumen semejante tanto en el grupo alimentado con una dieta normal como en el grupo de ratas alimentadas con

una dieta cetogénica. Por otro lado, el administrar dieta cetogénica a un individuo sano no modificaría el tamaño del cerebro ni la expresión del cotransportador NKCC1; esto es de importancia cuando se aplican estas dietas para bajar de peso y disminuir el apetito⁶⁹.

La dieta cetogénica no modificó la expresión del cotransportador catión-cloro NKCC1, en ninguna de las regiones analizadas del giro dentado de la rata: región anterior, posterior y sumatoria de ambas regiones o completa, sugiriendo que las características del sustrato anatómico no se modifica, y probablemente las funciones tampoco, lo cual concuerda con un artículo donde se observó que la dieta cetogénica no modifica varios aspectos de la transmisión sináptica como respuesta a la estimulación de la rata adulta⁷⁰. En otro trabajo que apoyaría esta idea, no se encontró ninguna evidencia de que los cuerpos cetónicos modificaran las corrientes mediadas por los receptores post sinápticos de GABA o glutamato en condiciones normales⁷¹, por lo que probablemente la dieta cetogénica no modifique la fuerza y polaridad de la transmisión GABAérgica.

Sin embargo en otros estudios como el de Bought⁷², sí se reportan alteraciones electrofisiológicas en los animales alimentados con dos tipos de dieta: normal restringida de calorías y cetógena restringida de calorías, sugiriendo que pueden tener un efecto anticonvulsivante y antiepileptogénico.

Al conocer que el cotransportador NKCC1 es un regulador de la fuerza y polaridad de la transmisión GABAérgica y que, probablemente, los cuerpos cetónicos en especial el β -hidroxibutirato modificarían la actividad NKCC1 en neuronas inmaduras *in vitro*, en el presente trabajo la hipótesis alterna propuesta fue que la DC cambiaría los niveles de expresión del cotransportador *in vivo*, sin embargo no se cumplió. En un trabajo pasado se demostró que una concentración fisiológica de 2 mM de β -hidroxibutirato es capaz

de inducir hiperpolarización del potencial de membrana de GABA en neuronas inmaduras, lo que sugería que la presencia del β -hidroxibutirato podría modificar la actividad NKCC1⁴⁰. En el presente trabajo, aun cuando los niveles de β -hidroxibutirato en el grupo cetogénico permanecieron elevados (1.0 mmol/L en el grupo cetogénico, 200% mayor que el del grupo DN), no se observaron cambios en la expresión del cotransportador catión-cloro NKCC1⁵⁴. Eso podría deberse a que en aquel trabajo las mediciones se realizaron en células inmaduras y nuestro estudio se llevó a cabo en ratas adultas de 114 días de edad *in vivo*, las cuales ya no presentan neuronas inmaduras y por lo tanto la señalización de GABA sería inhibitoria y no excitadora.

No obstante, en otros trabajos se demostró que en las neuronas inmaduras, el β -hidroxibutirato no altera el potencial de membrana del GABA y que la activación de los receptores GABA_A aumentaron la concentración de calcio intracelular y la despolarización del potencial de membrana, lo que sugiere que la probable acción antiepiléptica de los cuerpos cetónicos no están mediadas por la señalización del sistema GABAérgico o mediante la modificación de la actividad de los cotransportadores catión-cloro^{73, 74}.

Los resultados del presente trabajo, complementan lo reportado por Gómez-Lira y colaboradores ya que en aquel trabajo se evaluó el efecto de la DC por un periodo corto de tiempo de 1 mes, y en el presente trabajo por un periodo largo de tres meses realizando mediciones estereológica de las células IR-NKCC1⁴². Estos resultados son semejantes a los reportados recientemente por Wang y colaboradores quienes evaluaron la expresión del cotransportador NKCC1 por Western blott⁷⁵, tras la administración de un mes de las dietas, los autores no encontraron diferencias significativas.

Por otro lado, en el grupo alimentado con una dieta normal, no se observaron diferencias por lateralidad en el área, volumen y número de células IR-NKCC1, es decir, estos parámetros son semejantes en la capa molecular, granular e hilar del giro dentado en el hemisferio derecho e izquierdo. La dieta cetogénica no modifica el desarrollo morfológico normal del cerebro ya que el comportamiento de estos parámetros es semejante al grupo control.

En el grupo alimentado con una dieta normal, el área, volumen y número de células IR-NKCC1 de la capa molecular es mayor que las de las capas granular e hilar, por el contrario, en el grupo alimentado con una dieta cetogénica, los resultados solo son semejantes en el área y volumen de las capas del giro dentado, ya que el número de células en la capa granular fue semejante al de la molecular, estos resultados indican una posible neurogénesis de las células granulares del giro dentado producida por la dieta cetogénica, y por tanto un aumento de las células IR-NKCC1, lo cual explicaría en parte, la no diferencia de estas células en la capa molecular y granular. También podría suceder que las células IR-NKCC1 disminuyeran en la capa molecular.

Hasta donde se conoce éste es de los primeros trabajos donde se lleva a cabo un estudio estereológico de una estructura completa en este caso en el giro dentado completo, para analizar los efectos de la dieta cetogénica sobre el área, volumen y número de células IR-NKCC1 mientras que en la mayoría de los trabajos se realizan el análisis en un solo corte de pocas micras de grosor del giro dentado.

El objetivo de este trabajo fue determinar los efectos de la dieta cetogénica por un periodo de tres meses, sin embargo, no se observó efecto alguno sobre los parámetros que se analizaron, esto se puede deber a que la dieta cetogénica funciona cuando existen condiciones diferentes a las normales, por ejemplo favorece la neurogénesis

después de la aplicación de ácido kaínico como modelo de epilepsia⁵⁴, la cetosis crónica favorece la neuroprotección en modelos de isquemia cerebral donde se produjo un infarto al ocluir la arteria cerebral media⁶³, se ha observado que la dieta tiene efecto en los grupos con epilepsia inducida por kindling pero no en los controles⁷⁵, además de los efectos terapéuticos en el cáncer, obesidad, diabetes, deficiencias de la GLUT1, neurodegeneración entre otros⁶⁴.

11. CONCLUSIONES

Los principales hallazgos del presente trabajo de tesis son:

Entre grupos (DN vs DC)

1. No existieron diferencias significativas en los valores basales (al destete) del peso corporal, glucosa y β -hidroxibutirato entre el grupo DN y DC.
2. No existieron diferencias significativas en los valores finales del peso corporal, peso cerebral y glucosa entre los grupos DN y DC. No obstante el β -hidroxibutirato fue significativamente mayor en el grupo DC al finalizar el tratamiento, lo que indica que la dieta cetogénica evaluada en el presente trabajo produjo los niveles de cetosis adecuados.
3. No existieron diferencias significativas por la dieta cetogénica en el área, volumen y número de células IR-NKCC1 en ninguna de las zonas analizadas.

Intra grupos en el grupo DN y DC

1. No existieron diferencias en el área, volumen y número de células IR-NKCC1 de la capa molecular, granular e hilar entre el hemisferio derecho e izquierdo en ninguna de las zonas analizadas del grupo DN ni del grupo DC.
- 2.-El área y volumen de la capa molecular, granular e hilar en la región posterior son mayores que en la región anterior tanto en el grupo DN como en el grupo DC.
- 3.- El número de células IR-NKCC1 es mayor en la región posterior respecto de la región anterior en el grupo DN e igual en el grupo DC.
- 4.-Los valores del área, volumen y número de células IR-NKCC1 de la capa molecular fueron mayores que los de las capas granular e hilar en el grupo DN, de igual forma en

el grupo DC a excepción del número de células IR-NKCC1 que fue semejante en la capa molecular y granular.

Aun cuando hubo un aumento significativo del β -hidroxibutirato, provocado por la ingesta prolongada de dieta cetogénica, los resultados no mostraron cambios significativos en el número de células IR-NKCC1 en ninguna de las regiones del giro dentado, ni modificó el área y volumen de las mismas capas del giro dentado, por lo tanto se concluye que la dieta cetogénica no modifica la expresión del cotransportador catión cloruro NKCC1 en el giro dentado de la rata.

12. PERSPECTIVAS

En los últimos años, se ha producido una gran expansión de conocimientos relacionados con las aplicaciones de la dieta cetogénica para el tratamiento no farmacológico de enfermedades no neurológicas y neurológicas como la epilepsia, por lo que es necesario continuar con el estudio para dilucidar los mecanismos de acción de esta dieta.

Se sugiere analizar las regiones restantes del hipocampo y de la corteza cerebral para observar si en esas zonas se encuentran algunas alteraciones.

Se propone estudiar el efecto de la dieta cetogénica sobre otros cotransportadores, principalmente el cotransportador catión-cloro KCC2 para complementar el estudio y conocer si éste es más susceptible a los cambios por la acción de la dieta cetogénica.

Es importante evaluar el efecto de la dieta cetogénica sobre la expresión de los cotransportadores catión-cloro NKCC1 y KCC2 en un modelo animal de epilepsia, como el kindling eléctrico.

13. REFERENCIAS

1. Armeno M, Caraballo R, Vaccarezza M, Alberti MJ, Ríos V, Galicchio S, et al. Consenso nacional sobre dieta cetogénica. *Rev Neurol*. 2014;59(5):213-223.
2. Caraballo RH, Flesler S, Armeno M, Fortini S, Agostinho A, Mestre G, et al. Ketogenic diet in pediatric patients with refractory focal status epilepticus. *Epilepsy Res*. 2014;108(10):1912-1916.
3. Pereira BSL. Dietas cetogénicas y otras alternativas terapéuticas. En: Targas YEM, Contreras CG, Ríos PL, editores. *Tratamiento farmacológico de las epilepsias*. 1ª ed. São Paulo:Leitura Médica Ltda; 2014. p. 207-214.
4. Stafstrom CE and Rho JM. The ketogenic diet as a treatment paradigm for diverse neurological disorders. *Front Pharmacol*. 2012;3(59):1-8.
5. Cunnane SC, Courchesne-Loyer A, St-Pierre V, Vandenberghe C, Pierotti T, Fortier M, et al. Can ketones compensate for deteriorating brain glucose uptake during aging?. Implications for the risk and treatment of Alzheimer's disease. *Ann NY Acad Sci*. 2016;1367(1):12-20.
6. Branco AF, Ferreira A, Simões RF, Magalhães-Novais S, Zehowski C, Cope E, et al. Ketogenic diets: from cancer to mitochondrial diseases and beyond. *Eur J Clin Invest*. 2016;46(3):285–298.
7. Shaafi S, Najmi S, Aliasgharpour H, Mahmoudi J, Sadigh-Etemad S, Farhoudi M, et al. The efficacy of the ketogenic diet on motor functions in Parkinson's disease: A rat model. *Iran J Neurol*. 2016;15(2):63-69.
8. García-Peñas JJ. Trastornos del espectro autista y epilepsia: el papel de la dieta cetogénica. *Rev Neurol*. 2016;62(1):S73-S78.

9. Allen BG., Bhatia SK, Anderson CM, Eichenberger-Gilmore JM, Sibenaller ZA, Mapuskar KA, et. al. Ketogenic diets as an adjuvant cancer therapy: History and potential mechanism. *Redox Biol.* 2014;2:963–970.
10. Seyfried TN, Kiebish MA, Marsh J, Shelton LM, Huysentruyt LC, Mukherjee P. Metabolic management of brain cancer. *Biochim Biophys Acta.* 2011;1807(6):577–594.
11. Dupuis N, Curatolo N, Benoist JF., Auvin S. Ketogenic diet exhibits anti-inflammatory properties. *Epilepsia.* 2015;56(7):95–98.
12. Wheless WJ. History and Origin of the Ketogenic Diet. En: Stafstrom CE, Rho JM, eds. *Epilepsy and ketogenic diet.* Totowa, NJ:Humana Press Inc; 2004. p. 31-50.
13. Kossoff EH, Haney CA. Ketogenic Diets. En: Shorvon S, Perucca E, Engel Jr editores. *The treatment of Epilepsy.* 4^a ed. USA: Wiley-Blackwell; 2009. 288-297.
14. Wheless WJ. History of the ketogenic diet. *Epilepsia.* 2008;49(8):3-5.
15. Caraballo R, Trípoli J, Escobal L, Cersósimo R, Tenenbaum S, Palacios C, et. al. Dieta cetogénica: eficacia y tolerabilidad en epilepsia refractaria en pediatría. *Rev Neurol.* 1998;26(149):61-64.
16. Pineda MM, Fisiopatología del efecto antiepiléptico. En: Lambruschini FN, Gutiérrez SA, editores. *Dieta Cetogénica Aspectos clínicos, Aplicación dietética.* España:Spanish Publishers Associates; 2012.p. 15-23.
17. Pérez-Guisado J. Las dietas cetogénicas: beneficios adicionales a la pérdida de peso y efectos secundarios infundados. *Arch Latinoam Nutr.* 2008;58(4):323-329.
18. Covarrubias GP, Aburto GM, Sámano OLF. Dietas cetogénicas en el tratamiento del sobrepeso y la obesidad. *Nutr Clin Diet Hosp.* 2013;33(2):98-111.

19. Pedron GC. Epilepsia y alimentación. Dietas cetogénicas. Nutr Hosp Supl. 2009;2(2):79-88.
20. Bainbridge JL, Gidal BE, Ryan M. The ketogenic diet. Pharmacotherapy. 1999;19(6):782–786.
21. Boyer R. Metabolismo de ácidos grasos y lípidos. En: Boyer R. Conceptos de Bioquímica. México: Internacional Thomson Editores; 2000. p. 553-593.
22. Rubenstein J, Hartman A. How does the ketogenic diet work? En: Kossoff E, Freeman JM, Rubenstein JE, Turner Zahava, Ketogenic diets: treatments for epilepsy and other disorders. 5^o ed. New York USA: Demos Medical Publishing; 2011. p34.
23. Melø TM, Nehlig A, Sonnewald U. Neuronal–glial interactions in rats fed a ketogenic diet. Neurochem Int. 2006;48(6-7):498-507.
24. Marieb NE. Sistema nervioso. En: Martín-Romo M. Anatomía y Fisiología Humana. 9na ed. Madrid: Pearson Educación; 2008 p. 227-275.
25. Standring S. Nervous system. En: Standring .S editor. Gray's Anatomy. 40th ed. Spain; Elsevier, 2008. p. 194-279.
26. Hasen JT. Introduction to the human body. En: Hasen JT. Netter's clinical anatomy 2^a ed. Canada; 2008. p. 18-21.
27. Valadez RJ. Tejido nervioso. En: Valadez RJ. Neuroanatomía funcional, 1ed. México DF: Ediciones de Neurociencias; 2002. p. 31-64.
28. Uchitel. OD. El lenguaje de las neuronas. En: Colección ciencia joven. Vol. 14. Eudeba; 2006.

29. Granados RL. Efecto de la malnutrición hipoproteínica prenatal sobre el desarrollo de las fibras musgosas de la formación hipocámpica. Tesis de maestría. Centro de Neurobiología. México:UNAM 1995. p 60.
30. Cheung THC, Cardinal RN. Hippocampal lesions facilitate instrumental learning with delayed reinforcement but induce impulsive choice in rats. *BMC Neuroscience*. 2005;6(36):1-24.
31. Amaral, DG; Lavenex P. Hippocampal neuroanatomy. In: Andersen P; Morris R, Amaral D; Bliss T, O'Keefe J. editors. *The Hippocampus Book*. 1ed. New York: Oxford University Press; 2007. p. 37-114.
32. Amaral DG, Scharfman HE, Lavenex P. The dentate gyrus: fundamental neuroanatomical organization (dentate gyrus for dummies). *Prog Brain Res*. 2007;163:3-22.
33. Bustamante ZE. Neurotransmisores. En: Bustamante ZE. *El sistema nervioso: desde las neuronas hasta el cerebro humano*. Colombia. Editorial Universidad de Antioquía. 2007. p. 101-106.
34. Moreno H, Moreno CB. Transmisión sináptica-canales de calcio y liberación de neurotransmisores. *Rev Cienc Salud*. 2005;3(1): 47-61.
35. Ruiz-Goyo M, Fuentes CA. Introducción a la farmacología del sistema nervioso central. Neurotransmisores y receptores En: Lorenzo FP; Moreno AG, Leza CJC, Lizasoain HI, Moro SMA, Portoles PA. En: Velázquez L. *Farmacología Básica y Clínica 18ª Ed*. Buenos Aires, Médica panamericana 2008, p 196-198.
36. Martín-Aragon BMAS, Poole VA, Darlison MG. Chloride co-transporters as possible therapeutic targets for stroke. *J Neurochem*. 2017;140(2):195-209.

37. Kaila K, Price TJ, Payne JA, Puskarjov M, Voipio J. Cation-chloride cotransporters in neuronal development, plasticity and disease. *Nat Rev Neurosci.* 2014;15(10):637-654.
38. Kahle KT, Staley KJ, Nahed BV, Gamba G, Hebert SC, Lifton RP, et al. Roles of the cation-chloride cotransporters in neurological disease. *Nat Clin Pract Neurol.* 2008;4(9):490-503.
39. Kahle KT, Rinehart J, Lifton RP. Phosphoregulation of the Na-K-2Cl and K-Cl cotransporters by the WNK kinases. *Biochim Biophys Acta.* 2010;1802(12):1150-1158.
40. Ben-Ari Y. The GABA Excitatory/inhibitory developmental sequence: a personal journey. *Neuroscience.* 2014;24(279):187–219.
41. Rheims S, Holmgren CD, Chazal G, Mulder J, Harkany T, Zilberter T, et al. GABA action in immature neocortical neurons directly depends on the availability of ketone bodies. *J Neurochem.* 2009;110(4):1330-1338.
42. Gómez-Lira G, Mendoza-Torreblanca JG, Granados-Rojas L. Ketogenic diet does not change NKCC1 and KCC2 expression in rat hippocampus. *Epilepsy Res.* 2011;96(1-2):166-171.
43. Arias-Carrión O, Olivares-Bañuelos T, Drucker-Colín R. Neurogénesis en el cerebro adulto. *Rev Neurol.* 2007;44(9):541-550.
44. Álvarez IM. Metodología de la investigación médica cuantitativa. Apuntes para el módulo 1. Coordinación de la investigación científica, pp 12-13.
45. Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio.

46. Yang SS, Huang CL, Chen HE, Tung CS, Shih HP, Liu YP. Effects of SPAK knockout on sensorimotor gating, novelty exploration, and brain area-dependent expressions of NKCC1 and KCC2 in a mouse model of schizophrenia. *Prog. Neuro-psychopharm Biol Psych.* 2015;(61):30-36.
47. Cárdenas-Villalvazo A, López-Espinoza A, Martínez AG, Franco K, Díaz F, Aguilera V, et al. Consumo de alimento, crecimiento y ansiedad tras estrés por hacinamiento o aislamiento de ratas. *Rev Mex Anal Conducta.* 2010;36(2):129-142.
48. Pascual R. La interrupción temprana del vínculo social altera la organización citoarquitectónica y expresión de neuropéptidos en la corteza prefrontal. *Rev Chil Neuro-Psiquiatr.* 2002;40(2):9-20.
49. Harlan Laboratories Teklad Global 18% Protein Rodent Diet (Sterilizable) 2018S, Product. [Internet]. North America. [citado 6 abr 2013]. Disponible en: http://www.harlan.com/products_and_services/research_models_and_services/laboratory_animal_diets/teklad_natural_ingredient_diets/teklad_global_diets/global_rodent_diets/Teklad_global_18_rodent_diet_sterilizable_2018s.html
50. Harlan Laboratories. TD.96355 Ketogenic Diet. Teklad Custom Research Diet Data Sheet. [Internet]. North America. [citado 6 abr 2013]. Disponible en: www.harlan.com
51. Fernández-Viadero C, González-Mandly A, Verduga R, Crespo D, Cruz-Orive LM. La estereología como herramienta de cuantificación del volumen y la atrofia cortical en el cerebro del anciano con demencia. *Rev Esp Geriatr Gerontol.* 2008;43(1):32-43.

52. Schmitz C, Eastwood BS, Tappan SJ, Glaser JR, Peterson DA, Hof PR. Current automated 3D cell detection methods are not a suitable replacement for manual stereologic cell counting. *Front Neuroanat.* 2014;8:(27):1-13.
53. Stereo Investigator, [Internet] USA: 2017 [actualizado 2017; citado 6 abr 2013]. Disponible en: <http://www.mfbioscience.com/stereo-investigator>.
54. Kwon YS, Jeong SW, Kim DW, Choi ES, Son BK. Effects of the ketogenic diet on neurogenesis after kainic acid-induced seizures in mice. *Epilepsy Res.* 2008;78(2-3):186-194.
55. Bough KJ, Eagles DA. A ketogenic diet increases the resistance to pentylenetetrazole-induced seizures in the rat. *Epilepsia.* 1999;40(2):138-143.
56. Ribeiro LC, Chittó AL, Müller AP, Rocha JK, Castro DSM, Quincozes-Santos A, et al. Ketogenic diet-fed rats have increased fat mass and phosphoenolpyruvate carboxykinase activity. *Mol Nutr Food Res.* 2008;52(11):1365-1371.
57. Baliatti M, Fattoretti P, Giorgetti B, Casoli T, Di Stefano G, Platano D, et. al. Effect of two medium chain triglycerides-supplemented diets on synaptic morphology in the cerebellar cortex of late-adult rats. *Microsc Res Tech.* 2009;72(12):933-938.
58. Ruskin DN, Suter TACS, Ross JL, Masino SA. Ketogenic diets and thermal pain: dissociation of hypoalgesia, elevated ketones, and lowered glucose in rats. *J Pain.* 2013;14(5):467-474.
59. Thavendiranathan P, Chow C, Cunnane S, Burnham WM. The effect of the “classic” ketogenic diet on animal seizure models. *Brain Res.* 2003;959(2):206-213.

60. Xu X, Sun R and Jin R. Effect of ketogenic diet on hippocampus mossy fiber sprouting and GluR5 expression in kainic acid induced rat model. *Chin Med J.* 2006;119(22):1925-1929.
61. Rauch AE. La dieta cetogénica. *Rev Chil Epil.* 2006;7(1):25-33.
62. Xu K, Ye L, Sharma K, Jin Y, Harrison MM, Caldwell T, et al. Diet-induced ketosis protects against focal cerebral ischemia in mouse. En: Halpern HJ et al, editors. *Oxygen transport to tissue XXXIX, advances in experimental medicine and biology.* Vol 977. Springer:Springer International Publishing; 2017. p. 205-2013.
63. Yuen AWC, Walcutt IA and Sander JW. An acidosis-sparing ketogenic (ASK) diet to improve efficacy and reduce adverse effects in the treatment of refractory epilepsy. *Epilepsy Behav.* 2017;74:15–21.
64. Baliatti M, Casoli T, Di Stefano G, Giorgetti B, Aicardi G, Fattoretti P. Ketogenic diets: an historical antiepileptic therapy with promising potentialities for the aging brain. *Ageing Res Rev.* 2010;9(3):273-279.
65. Mosca F, Gianni ML. Human milk: composition and health benefits. *La Pediatria Medica e Chirurgica.* 2017;39(155):47-52.
66. Sáyago-Ayerdi SG, Vaquero MP, Schultz-Moreira A, Bastida S, Sánchez-Muñiz FJ. Utilidad y controversias del consumo de ácidos grasos de cadena media sobre el metabolismo lipoproteico y obesidad. *Nutr Hosp.* 2008;23(3):91-202.
67. Díaz-Cintra S, Cintra L, Ortega A, Kemper T, Morgane PJ. Effects of protein deprivation on pyramidal cells of the visual cortex in rats of three age groups. *J Comp Neurol.* 1990;292(1):117-126.

68. Granados-Rojas L, Larriva-Sahd J, Cintra L, Gutiérrez-Ospina G, Rondán A, Díaz-Cintra S. Prenatal protein malnutrition decreases mossy fibers-CA3 thorny excrescences asymmetrical synapses in adult rats. *Brain Res.* 2002;933(2):164-171.
69. Gibson AA, Seimon RV, Lee CM, Ayre J, Franklin J, Markovic TP, et al. Do ketogenic diets really suppress appetite? A systematic review and meta-analysis. *Obes Rev.* 2015;16(1):64-76.
70. Stafstrom CE, Wang C, Jensen FE. Electrophysiological observations in hippocampal slices from rats treated with the ketogenic diet. *Dev. Neurosci.* 1999;21(3-5):393-399.
71. Thio LL, Wong M, Yamada KA. Ketone bodies do not directly alter excitatory or inhibitory hippocampal synaptic transmission. *Neurology.* 2000;54(2):325-331.
72. Bough KJ, Schwartzkroin PA, Rho JM. Calorie restriction and ketogenic diet diminish neuronal excitability in rat dentate gyrus in vivo. *Epilepsia.* 2003;44(6):752-760.
73. Kirmse K, Witte OW, Holthoff K. GABA depolarizes immature neocortical neurons in the presence of the ketone body β -hydroxybutyrate. *J. Neurosci.* 2010;30(47):16002-16007.
74. Tyzio R, Allene C, Nardou R, Picardo MA, Yamamoto S, Sivakumaran S, et al. Depolarizing actions of GABA in immature neurons depend neither on ketone bodies nor on pyruvate. *J. Neurosci.* 2011;31(1):34-45.
75. Wang S, Ding Y, Ding XY, Liu ZR, Shen CH, Jin B, et al. Effectiveness of ketogenic diet in pentylenetetrazol-induced and kindling rats as well as its potential mechanisms. *Neurosci Lett.* 2016;614(12):1-6.

14. Anexos

Anexo 1. Componentes de la dieta normal 2018S Harlan-Teklad.

Harlan Laboratories

2018S

Teklad Global 18% Protein Rodent Diet (Sterilizable)

Product Description- 2018S is a fixed formula, autoclavable diet manufactured with high quality ingredients and designed to support gestation, lactation, and growth of rodents. 2018S does not contain alfalfa, thus lowering the occurrence of natural phytoestrogens. Typical isoflavone concentrations (daidzein + genistein aglycone equivalents) range from 150 to 250 mg/kg. Exclusion of alfalfa reduces chlorophyll, improving optical imaging clarity. Absence of animal protein and fish meal minimizes the presence of nitrosamines. 2018S is supplemented with additional vitamins to ensure nutritional adequacy after autoclaving. Also available certified (2018SC), the diet most commonly fed in Harlan Laboratories' Rodent Colonies.

Macronutrients		
Crude Protein	%	18.6
Fat (ether extract) ^a	%	6.2
Carbohydrate (available) ^b	%	44.2
Crude Fiber	%	3.5
Neutral Detergent Fiber ^c	%	14.7
Ash	%	5.3
Energy Density ^d	kcal/g (kJ/g)	3.1 (13.0)
Calories from Protein	%	24
Calories from Fat	%	18
Calories from Carbohydrate	%	58
Minerals		
Calcium	%	1.0
Phosphorus	%	0.7
Non-Phytate Phosphorus	%	0.4
Sodium	%	0.2
Potassium	%	0.6
Chloride	%	0.4
Magnesium	%	0.2
Zinc	mg/kg	70
Manganese	mg/kg	100
Copper	mg/kg	15
Iodine	mg/kg	6
Iron	mg/kg	200
Selenium	mg/kg	0.23
Amino Acids		
Aspartic Acid	%	1.4
Glutamic Acid	%	3.4
Alanine	%	1.1
Glycine	%	0.8
Threonine	%	0.7
Proline	%	1.6
Serine	%	1.1
Leucine	%	1.8
Isoleucine	%	0.8
Valine	%	0.9
Phenylalanine	%	1.0
Tyrosine	%	0.6
Methionine	%	0.6
Cystine	%	0.3
Lysine	%	1.1
Histidine	%	0.4
Arginine	%	1.0
Tryptophan	%	0.2

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

Standard Product Form: Pellet

Vitamins		
Vitamin A ^{e,f}	IU/g	30.0
Vitamin D ₃ ^{e,g}	IU/g	2.0
Vitamin E	IU/kg	135
Vitamin K ₃ (menadione)	mg/kg	100
Vitamin B ₁ (thiamin)	mg/kg	117
Vitamin B ₂ (riboflavin)	mg/kg	27
Niacin (nicotinic acid)	mg/kg	115
Vitamin B ₆ (pyridoxine)	mg/kg	26
Pantothenic Acid	mg/kg	140
Vitamin B ₁₂ (cyanocobalamin)	mg/kg	0.15
Biotin	mg/kg	0.90
Folate	mg/kg	9
Choline	mg/kg	1200
Fatty Acids		
C16:0 Palmitic	%	0.7
C18:0 Stearic	%	0.2
C18:1ω9 Oleic	%	1.2
C18:2ω6 Linoleic	%	3.1
C18:3ω3 Linolenic	%	0.3
Total Saturated	%	0.9
Total Monounsaturated	%	1.3
Total Polyunsaturated	%	3.4
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

^g 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.

Harlan, Harlan Laboratories, Helping you do research better, and the Harlan logo are trademarks and trade names of Harlan Laboratories, Inc. © 2008 Harlan Laboratories, Inc.



Anexo 2. Componentes de la dieta cetogénica TD.96355 de Harlan.

Teklad Custom Research Diet Data Sheet

TD.96355 Ketogenic Diet	
Formula	g/Kg
Casein	173.3
DL-Methionine	2.6
Vegetable Shortening, hydrogenated (Crisco)	586.4
Corn Oil	86.2
Cellulose	87.97
Vitamin Mix, Teklad (40060)	13.0
Choline Bitartrate	2.5
TBHQ, antioxidant	0.13
Mineral Mix, Ca-P Deficient (79055)	20.0
Calcium Phosphate, dibasic	19.3
Calcium Carbonate	8.2
Magnesium Oxide	0.4

Footnote
A very high fat diet with almost no carbohydrate. The ratio of fat to protein + carbohydrate in this ketogenic diet is approximately 4.25.

Selected Nutrient Information ¹		
	% by weight	% kcal from
Protein	15.3	9.1
Carbohydrate	0.6	0.4
Fat	67.4	90.5
Kcal/g	6.7	

¹ Values are calculated from ingredient analysis or manufacturer data
Teklad Diets are designed & manufactured for research purposes only.

Speak With A Nutritionist

- (800) 483-5523
- askanutritionist@harlan.com

Harlan Laboratories · PO Box 44220 · Madison, WI 53744-4220
www.harlan.com



Key Features

- Purified Diet
- Ketogenic
- Crisco
- Rodent

Key Planning Information

- Products are made fresh to order
- Store product at 4°C or lower
- Use within 6 months (applicable to most diets)
- Box labeled with product name, manufacturing date, and lot number
- Replace diet at minimum once per week
More frequent replacement may be advised
- Lead time:
 - 2 weeks non-irradiated
 - 4 weeks irradiated



Product Specific Information

- Powder (paste)
- Minimum order 3 Kg
- Irradiation available upon request

Options (Fees Will Apply)

- Rush order (pending availability)
- Irradiation (see Product Specific Information)

International Inquiry

· Outside U.S.A. or Canada ·

- askanutritionist@harlan.com

Place Your Order (U.S.A. & Canada)

· Place Order · Obtain Pricing ·
· Check Order Status ·

- (800) 483-5523
- (608) 277-2066 *facsimile*
- tekladinfo@harlan.com



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. © 2009 Harlan Laboratories, Inc.

02/12/09

Anexo 3. Mezcla de vitaminas de la dieta cetogénica.

Teklad Custom Research Diet Data Sheet

CA.40060 Vitamin Mix, Teklad

Formula	g/Kg
p-Aminobenzoic Acid	11.0132
Vitamin C, ascorbic acid, coated (97.5%)	101.6604
Biotin	0.0441
Vitamin B ₁₂ (0.1% in mannitol)	2.9736
Calcium Pantothenate	6.6079
Choline Dihydrogen Citrate	349.6916
Folic Acid	0.1982
Inositol	11.0132
Vitamin K ₃ , menadione	4.9559
Niacin	9.9119
Pyridoxine HCl	2.2026
Riboflavin	2.2026
Thiamin HCl	2.2026
Vitamin A Palmitate (500,000 IU/g)	3.9648
Vitamin D ₃ , cholecalciferol (500,000 IU/g)	0.4405
Vitamin E, DL-alpha tocopheryl acetate (500 IU/g)	24.2291
Corn Starch	466.6878

Footnote

Designed as a general purpose, well-fortified vitamin mix. The recommended use level is 1% in rodent diets, but may be used in diets for other species as well. This mix includes a source of choline and vitamin C.

Teklad Mixes are designed & manufactured for research purposes only.

Speak With A Nutritionist

- (800) 483-5523
- askanutritionist@harlan.com

Harlan Laboratories · PO Box 44220 · Madison, WI 53744-4220
www.harlan.com



Harlan, Harlan Laboratories, Helping you do research better,
 and the Harlan logo are trademarks and trade names of Harlan Laboratories, Inc.
 © 2009 Harlan Laboratories, Inc.

Key Features

- Vitamin Mix
- General Purpose
- Commonly Used

Key Planning Information

- Products are made fresh to order
- Lead time 2 weeks
- Store product at 4°C or lower
- Use within 6 months (applicable to most mixes)
- Box labeled with product name, manufacturing date, and lot number



Product Specific Information

- Powder
- Minimum order 500 gms

Options (Fees Will Apply)

- Rush order (pending availability)
- Vacuum packaging (1 and 2 Kg)

International Inquiry

- Outside U.S.A or Canada ·
- askanutritionist@harlan.com

Place Your Order (U.S.A & Canada)

- Place Order · Obtain Pricing ·
- Check Order Status ·

- (800) 483-5523
- (608) 277-2066 *facsimile*
- tekladinfo@harlan.com



Helping you do research better

02/09/09 2/31

Anexo 4. Mezcla de minerales de la dieta cetogénica.

Teklad Custom Research Diet Data Sheet

TD.79055 Mineral Mix, Ca-P Deficient

Formula	g/Kg
Sodium Chloride	193.7325
Potassium Citrate, monohydrate	575.9615
Potassium Sulfate	136.1363
Magnesium Oxide	62.8322
Manganous Carbonate	9.163
Ferric Citrate	15.708
Zinc Carbonate	4.1888
Cupric Carbonate	0.7854
Potassium Iodate	0.0262
Sodium Selenite, pentahydrate	0.0262
Chromium Potassium Sulfate, dodecahydrate	1.4399

Footnote

This is a modification of mineral mix AIN-76 (170915). When used at the rate of 13.369 g/Kg of diet, mineral elements other than Ca and P will be supplied to the diet at rates similar to those provided by 35.0 g/Kg of 170915.

Teklad Mixes are designed & manufactured for research purposes only.

Speak With A Nutritionist

- (800) 483-5523
- askanutritionist@harlan.com

Harlan Laboratories · PO Box 44220 · Madison, WI 53744-4220
www.harlan.com



Harlan, Harlan Laboratories, Helping you do research better,
 and the Harlan logo are trademarks and trade names of Harlan Laboratories, Inc.
 © 2008 Harlan Laboratories, Inc.

Key Features

- Mineral Mix
- Calcium & Phosphorus
- Modification of AIN-76 Mineral Mix

Key Planning Information

- Products are made fresh to order
- Lead time 2 weeks
- Store in cool, dry conditions
- Use within 6 months (applicable to most mixes)
- Box labeled with product name, manufacturing date, and lot number



Product Specific Information

- Powder
- Minimum order 500 gms

Options (Fees Will Apply)

- Rush order (pending availability)
- Vacuum packaging (1 and 2 Kg)

International Inquiry

- Outside U.S.A or Canada ·
- askanutritionist@harlan.com

Place Your Order (U.S.A & Canada)

- Place Order · Obtain Pricing ·
- Check Order Status ·

- (800) 483-5523
- (608) 277-2066 *facsimile*
- tekladinfo@harlan.com



Helping you do research better

02/11/09

Anexo 5. Análisis estadístico del peso corporal.

Comparaciones entre grupos DN vs DC

Parámetro	F de Levene	Significancia de Levene	t de Student muestras independientes	Significancia estadística
Peso corporal al destete	0.025	0.876	1.078	0.299, NS
Peso corporal al sacrificio	0.16	0.696	1.043	0.316, NS

Comparaciones intra grupos, destete vs sacrificio

Parámetro	t de Student muestras relacionadas	Significancia estadística
Peso corporal DN	-14.129	0.000***
Peso corporal DC	-13.996	0.000***

*** \leq 0.001, NS = No significativo.

Anexo 6. Análisis estadístico de la concentración de glucosa en sangre periférica.

Comparaciones entre grupos, DN vs DC

Parámetro	F de Levene	Significancia de Levene	t de Student muestras independientes	Significancia estadística
Glucosa al destete	0.91	0.356	1.373	0.191, NS
Glucosa al sacrificio	0.008	0.928	0.177	0.862, NS

Comparación intra-grupo, destete vs sacrificio

Parámetro	t de Student muestras relacionadas	Significancia estadística
Glucosa DN	6.400	0.000 ***
Glucosa DC	2.002	0.092, NS

*** \leq 0.001, NS = No significativo.

Anexo 7. Análisis estadístico de la concentración de β -hidroxibutirato en sangre periférica.

Comparaciones entre grupo, DN vs DC

Parámetro	F de Levene	Significancia de Levene	t de Student muestras independientes	Significancia estadística
β -hidroxibutirato al destete	0.005	0.946	-0.944	0.361, NS
β -hidroxibutirato al destete	4.256	0.06	-3.898	0.002 **

** ≤ 0.01 , NS = No significativo.

Comparación intra-grupo, destete vs sacrificio

Parámetro	t de Student muestras relacionadas	Significancia estadística
β -hidroxibutirato DN	3.786	0.007 **
β -hidroxibutirato DC	0.567	0.592, NS

** ≤ 0.01 , NS = No significativo.

Anexo 8. Análisis estadístico del peso cerebral.

Comparaciones entre grupo, DN vs DC

Parámetro	F de Levene	Significancia de Levene	t de Student muestras independientes	Significancia estadística
Peso cerebral al sacrificio	0.736	0.407	0.285	0.78, NS

NS = No significativo.

Anexo 9. Análisis estadístico del área (μ^2) entre grupos, DN vs DC.

Región	Hemisferio	Valor de Levene	Significancia de Levene	Valor de t de Student muestras independientes	Valor de U de Mann-Whitney	Significancia estadística
Capa Molecular Anterior	Derecho	0.095	0.763	1.504	N/A	0.155, NS
	Izquierdo	0.865	0.368	1.373	N/A	0.191, NS
	Sumatoria	0.382	0.546	1.445	N/A	0.17, NS
Capa Molecular Posterior	Derecho	3.539	0.083	-1.474	N/A	0.16, NS
	Izquierdo	0.086	0.773	0.415	N/A	0.68, NS
	Sumatoria	0.957	0.346	-0.659	N/A	0.52, NS
Capa Molecular Completa	Derecho	12.614	0.004	N/A	20.0	0.35, NS
	Izquierdo	0.011	0.919	0.958	N/A	0.35, NS
	Sumatoria	9.179	0.010	N/A	27.0	0.90, NS
Capa Granular Anterior	Derecho	0.239	0.633	0.879	N/A	0.39, NS
	Izquierdo	0.329	0.576	1.249	N/A	0.23, NS
	Sumatoria	0.253	0.623	1.060	N/A	0.30, NS
Capa Granular Posterior	Derecho	0.869	0.368	0.157	N/A	0.87, NS
	Izquierdo	1.974	0.183	-0.395	N/A	0.69, NS
	Sumatoria	3.081	0.103	-0.096	N/A	0.92, NS
Capa Granular Completa	Derecho	3.526	0.083	0.173	N/A	0.86, NS
	Izquierdo	0.253	0.624	0.542	N/A	0.59, NS
	Sumatoria	3.254	0.094	0.390	N/A	0.70, NS
Capa Hiliar Anterior	Derecho	0.070	0.795	1.253	N/A	0.23, NS
	Izquierdo	0.049	0.829	1.533	N/A	0.14, NS
	Sumatoria	0.088	0.771	1.408	N/A	0.18, NS
Capa Hiliar Posterior	Derecho	6.196	0.027	N/A	20.0	0.35, NS
	Izquierdo	0.234	0.636	0.930	N/A	0.36, NS
	Sumatoria	1.442	0.251	0.495	N/A	0.62, NS
Capa Hiliar Completa	Derecho	6.092	0.028	0.066	27.0	0.90, NS
	Izquierdo	0.257	0.621	1.466	N/A	0.16, NS
	Sumatoria	6.470	0.024	1.017	24.0	0.64, NS

NS = no significativo.

Anexo 10. Análisis estadístico del volumen (μ^3) entre grupos, DN vs. DC.

Región	Hemisferio	Valor de Levene	Significancia de Levene	Valor de t de Student muestras independientes	Valor de U de Mann-Whitney	Significancia estadística
Capa Molecular Anterior	Derecho	0.067	0.799	1.497	N/A	0.156, NS
	Izquierdo	0.735	0.406	1.449	N/A	0.169, NS
	Sumatoria	0.324	0.578	1.481	N/A	0.161, NS
Capa Molecular Posterior	Derecho	3.389	0.089	-1.452	N/A	0.17, NS
	Izquierdo	0.039	0.846	0.514	N/A	0.616, NS
	Sumatoria	1.108	0.312	-0.6	N/A	0.559, NS
Capa Molecular Completa	Derecho	12.444	0.004	N/A	20.0	0.354, NS
	Izquierdo	0.056	0.817	1.188	N/A	0.256, NS
	Sumatoria	9.371	0.009	N/A	25.5	0.772, NS
Capa Granular Anterior	Derecho	0.408	0.533	0.574	N/A	0.575, NS
	Izquierdo	2.147	0.165	1.232	N/A	0.238, NS
	Sumatoria	0.945	0.347	0.914	N/A	0.376, NS
Capa Granular Posterior	Derecho	0.656	0.432	0.104	N/A	0.919, NS
	Izquierdo	1.969	0.184	-0.231	N/A	0.821, NS
	Sumatoria	2.856	0.115	-0.048	N/A	0.963, NS
Capa Granular Completa	Derecho	3.471	0.085	0.29	N/A	0.776, NS
	Izquierdo	0.253	0.623	0.597	N/A	0.561, NS
	Sumatoria	3.337	0.091	0.486	N/A	0.635, NS
Capa Hiliar Anterior	Derecho	0.571	0.462	0.939	N/A	0.364, NS
	Izquierdo	0.085	0.776	1.426	N/A	0.176, NS
	Sumatoria	0.283	0.603	1.199	N/A	0.25, NS
Capa Hiliar Posterior	Derecho	5.482	0.036	N/A	19.5	0.321, NS
	Izquierdo	0.117	0.738	0.939	N/A	0.365, NS
	Sumatoria	1.696	0.215	0.475	A/A	0.642, NS
Capa Hiliar Completa	Derecho	5.036	0.043	N/A	26.0	0.815, NS
	Izquierdo	0.773	0.395	1.656	N/A	0.122, NS
	Sumatoria	6.463	0.025	N/A	23.5	0.602, NS

NS = No significativo.

Anexo 11. Análisis estadístico del número de células IR-NKCC1 entre grupos, DN vs. DC.

Región	Hemisferio	Valor de Levene	Significancia de Levene	Valor de t de Student muestras independientes	Valor de U de Mann-Whitney	Significancia estadística
Capa Molecular Anterior	Derecho	0.000	0.988	0.668	N/A	0.515, NS
	Izquierdo	0.256	0.621	0.810	N/A	0.432, NS
	Sumatoria	0.172	0.685	0.756	N/A	0.462, NS
Capa Molecular Posterior	Derecho	0.172	0.685	0.300	N/A	0.769, NS
	Izquierdo	1.188	0.295	1.170	N/A	0.263, NS
	Sumatoria	0.697	0.419	0.760	N/A	0.461, NS
Capa Molecular Completa	Derecho	0.048	0.829	0.520	N/A	0.612, NS
	Izquierdo	0.083	0.778	1.518	N/A	0.153, NS
	Sumatoria	0.004	0.950	0.980	N/A	0.345, NS
Capa Granular Anterior	Derecho	3.291	0.091	0.033	N/A	0.974, NS
	Izquierdo	0.220	0.646	-0.222	N/A	0.828, NS
	Sumatoria	1.991	0.180	-0.085	N/A	0.933, NS
Capa Granular Posterior	Derecho	2.147	0.167	-0.799	N/A	0.439, NS
	Izquierdo	0.299	0.594	0.168	N/A	0.869, NS
	Sumatoria	1.294	0.276	-0.262	N/A	0.798, NS
Capa Granular Completa	Derecho	0.791	0.390	-0.607	N/A	0.555, NS
	Izquierdo	0.016	0.902	-0.025	N/A	0.98, NS
	Sumatoria	0.342	0.569	-0.321	N/A	0.754, NS
Capa Hiliar Anterior	Derecho	0.643	0.436	0.963	N/A	0.352, NS
	Izquierdo	0.573	0.462	0.522	N/A	0.61, NS
	Sumatoria	0.371	0.552	0.779	N/A	0.449, NS
Capa Hiliar Posterior	Derecho	1.256	0.283	1.000	N/A	0.335, NS
	Izquierdo	0.307	0.589	1.265	N/A	0.228, NS
	Sumatoria	1.825	0.200	1.224	N/A	0.243, NS
Capa Hiliar Completa	Derecho	0.014	0.909	1.043	N/A	0.316, NS
	Izquierdo	0.492	0.495	1.250	N/A	0.233, NS
	Sumatoria	0.005	0.945	1.224	N/A	0.243, NS

NS = No significativo.

Anexo 12. Análisis estadístico del área (μm^2) por lateralidad: hemisferio derecho vs izquierdo en el grupo DN.

Capa	Valor de Levene	Significancia de Levene	Valor de ANOVA (F)	Valor de Welch	Significancia estadística	Comparación por Hemisferios	Significancia Post Hoc (Tukey)	Significancia Pos Hoc (Dunnett T3)
Molecular	1.810	0.092	130.98	N/A	0.000	Derecho anterior vs Izquierdo anterior	1.000, NS	N/A
						Derecho posterior vs Izquierdo posterior	1.000, NS	N/A
						Derecho completa vs Izquierdo completa	1.000, NS	N/A
Granular	3.720	0.001	N/A	50338	0.000	Derecho anterior vs Izquierdo anterior	N/A	1.000, NS
						Derecho posterior vs Izquierdo posterior	N/A	1.000, NS
						Derecho completa vs Izquierdo completa	N/A	1.000, NS
Hiliar	3.207	0.004	N/A	113697	0.000	Derecho anterior vs Izquierdo anterior	N/A	1.000, NS
						Derecho posterior vs Izquierdo posterior	N/A	1.000, NS
						Derecho completa vs Izquierdo completa	N/A	1.000, NS

Anexo 13. Análisis estadístico del área (μm^2) por región: sumatoria anterior vs sumatoria posterior en el grupo DN.

Capa	Valor de Levene	Significancia de Levene	Valor de ANOVA (F)	Valor de Welch	Significancia estadística	Comparación por región	Significancia Pos Hoc (Tukey)	Significancia Pos Hoc (Dunnett T3)
Molecular	1.810	0.092	130.98	N/A	0.000	Σ región anterior vs Σ región posterior	0.000 ***	N/A
Granular	3.720	0.001	N/A	50338	0.000	Σ región anterior vs Σ región posterior	N/A	0.001 ***
Hiliar	3.207	0.004	N/A	113697	0.000	Σ región anterior vs Σ región posterior	N/A	0.000 ***

*** ≤ 0.001

Anexo 14. Análisis estadístico del área (μm^2) por capa: molecular, granular e hiliar en el grupo DN.

Región	Valor de Levene	Significancia de Levene	Valor de ANOVA (F)	Valor de Welch	Significancia estadística	Comparación por Capas	Significancia Pos Hoc (Tukey)	Significancia Pos Hoc (Dunnett T3)
Anterior Derecha	5.401	0.013	N/A	69.293	0	Molecular vs Granular	N/A	0.000 ***
						Molecular vs Hiliar	N/A	0,000 ***
						Granular vs Hiliar	N/A	0.974, NS
Anterior Izquierda	3.507	0.049	N/A	108.246	0	Molecular vs Granular	N/A	0.000 ***
						Molecular vs Hiliar	N/A	0.000 ***
						Granular vs Hiliar	N/A	0.999, NS
Sumatoria Anterior	4.58	0.022	N/A	22.486	0	Molecular vs Granular	N/A	0.000***
						Molecular vs Hiliar	N/A	0.000***
						Granular vs Hiliar	N/A	0.992, NS
Posterior Derecha	8.887	0.002	N/A	79.755	0	Molecular vs Granular	N/A	0.000 ***
						Molecular vs Hiliar	N/A	0.000 ***
						Granular vs Hiliar	N/A	0.916, NS
Posterior Izquierda	2.474	0.108	47.792	N/A	0	Molecular vs Granular	0.000 ***	N/A
						Molecular vs Hiliar	0.000 ***	N/A
						Granular vs Hiliar	0.611, NS	N/A
Sumatoria Posterior	3.535	0.048	N/A	12.907	0	Molecular vs Granular	N/A	0.000 ***
						Molecular vs Hiliar	N/A	0.000 ***
						Granular vs Hiliar	N/A	0.232, NS
Completo Derecho	2.649	0.094	367.697	N/A	0	Molecular vs Granular	0.000 ***	N/A
						Molecular vs Hiliar	0.000 ***	N/A
						Granular vs Hiliar	0.798, NS	N/A
Completo Izquierdo	1.156	0.334	117.264	N/A	0	Molecular vs Granular	0.000 ***	N/A
						Molecular vs Hiliar	0.000 ***	N/A
						Granular vs Hiliar	0.809, NS	N/A
Sumatoria Completa	0.948	0.404	440.933	N/A	0	Molecular vs Granular	0.000 ***	N/A
						Molecular vs Hiliar	0.000 ***	N/A
						Granular vs Hiliar	0.611, NS	N/A

Anexo 15. Análisis estadístico del volumen (μm^3) por lateralidad: hemisferio derecho vs izquierdo en el grupo DN.

Capa	Valor de Levene	Significancia de Levene	Valor de ANOVA (F)	Valor de Welch	Significancia estadística	Comparación por Hemisferios	Significancia Pos Hoc (Tukey)	Significancia Pos Hoc (Dunnett T3)
Molecular	1.592	0.145	142.236	N/A	0.000	Derecho anterior vs Izquierdo anterior	1.000, NS	N/A
						Derecho posterior vs Izquierdo posterior	1.000, NS	N/A
						Derecho completa vs Izquierdo completa	1.000, NS	N/A
Granular	3.865	0.001	N/A	55.53	0.000	Derecho anterior vs Izquierdo anterior	N/A	1.000, NS
						Derecho posterior vs Izquierdo posterior	N/A	1.000, NS
						Derecho completa vs Izquierdo completa	N/A	1.000, NS
Hiliar	2.837	0.009	N/A	98.863	0.000	Derecho anterior vs Izquierdo anterior	N/A	1.000, NS
						Derecho posterior vs Izquierdo posterior	N/A	1.000, NS
						Derecho completa vs Izquierdo completa	N/A	0.972, NS

Anexo 16. Análisis estadístico del volumen (μm^3) por región: sumatoria anterior vs sumatoria posterior en el grupo DN

Capa	Valor de Levene	Significancia de Levene	Valor de ANOVA (F)	Valor de Welch	Significancia estadística	Comparación por región	Significancia Pos Hoc (Tukey)	Significancia Pos Hoc (Dunnett T3)
Molecular	1.592	0.145	142286	N/A	0.000	Σ región anterior vs Σ región posterior	0.000 ***	N/A
Granular	3.865	0.001	N/A	55053	0.000	Σ región anterior vs Σ región posterior	N/A	0.001 ***
Hiliar	2.837	0.009	N/A	98863	0.000	Σ región anterior vs Σ región posterior	N/A	0.000 ***

Anexo 17. Análisis estadístico del volumen (μm^3) por capa: molecular, granular e hiliar en el grupo DN.

Región	Valor de Levene	Significancia de Levene	Valor de ANOVA (F)	Valor de Welch	Significancia estadística	Comparación por Capas	Significancia Pos Hoc (Tukey)	Significancia Pos Hoc (Dunnett T3)
Anterior Derecha	4.721	0.02	N/A	65,488	0	Molecular vs Granular	N/A	0.000 ***
						Molecular vs Hiliar	N/A	0.000 ***
						Granular vs Hiliar	N/A	0.997, NS
Anterior Izquierda	3.884	0.037	N/A	105,117	0	Molecular vs Granular	N/A	0.000 ***
						Molecular vs Hiliar	N/A	0.000 ***
						Granular vs Hiliar	N/A	1.0, NS
Sumatoria Anterior	4.336	0.027	N/A	81,833	0	Molecular vs Granular	N/A	0.000 ***
						Molecular vs Hiliar	N/A	0.000 ***
						Granular vs Hiliar	N/A	0.999, NS
Posterior Derecha	7.719	0.003	N/A	80.05	0	Molecular vs Granular	N/A	0.000 ***
						Molecular vs Hiliar	N/A	0.000 ***
						Granular vs Hiliar	N/A	0.88, NS
Posterior Izquierda	2.347	0.12	53,609	N/A	0	Molecular vs Granular	0.000 ***	N/A
						Molecular vs Hiliar	0.000 ***	N/A
						Granular vs Hiliar	0.613, NS	N/A
Sumatoria Posterior	3.17	0.063	129,852	N/A	0	Molecular vs Granular	0.000 ***	N/A
						Molecular vs Hiliar	0.000 ***	N/A
						Granular vs Hiliar	0.56, NS	N/A
Completo Derecho	2.068	0.151	376,722	N/A	0	Molecular vs Granular	0.000 ***	N/A
						Molecular vs Hiliar	0.000 ***	N/A
						Granular vs Hiliar	0.92, NS	N/A
Completo Izquierdo	1.049	0.368	142,517	N/A	0	Molecular vs Granular	0.000 ***	N/A
						Molecular vs Hiliar	0.000 ***	N/A
						Granular vs Hiliar	0.735, NS	N/A
Sumatoria Completa	0.684	0.516	461,771	N/A	0	Molecular vs Granular	0.000 ***	N/A
						Molecular vs Hiliar	0.000 ***	N/A
						Granular vs Hiliar	0.648, NS	N/A

Anexo 18. Análisis estadístico del número de células IR-NKCC1 por lateralidad: hemisferio derecho vs izquierdo en el grupo DN.

Capa	Valor de Levene	Significancia de Levene	Valor de ANOVA (F)	Valor de Welch	Significancia estadística	Comparación por Hemisferios	Significancia Pos Hoc (Tukey)	Significancia Pos Hoc (Dunnett T3)
Molecular	2.248	0.035	N/A	24315.000	0.000	Derecho anterior vs Izquierdo anterior	N/A,	1.000, NS
						Derecho posterior vs Izquierdo posterior	N/A	1.000, NS
						Derecho completa vs Izquierdo completa	N/A	1.000, NS
Granular	1.703	0.115	8102.000	N/A	0.000	Derecho anterior vs Izquierdo anterior	1.000, NS	N/A
						Derecho posterior vs Izquierdo posterior	0.997, NS	N/A
						Derecho completa vs Izquierdo completa	1.000, NS	N/A
Hiliar	2.603	0.016	N/A	16988.000	0.000	Derecho anterior vs Izquierdo anterior	N/A	1.000, NS
						Derecho posterior vs Izquierdo posterior	N/A	1.000, NS
						Derecho completa vs Izquierdo completa	N/A	1.000, NS

Anexo 19. Análisis estadístico del número de células IR-NKCC1 por región: sumatoria anterior vs sumatoria posterior en el grupo DN.

Capa	Valor de Levene	Significancia de Levene	Valor de ANOVA (F)	Valor de Welch	Significancia estadística	Comparación por región	Significancia Pos Hoc (Tukey)	Significancia Pos Hoc (Dunnett T3)
Molecular	2.248	0.035	N/A	24315.000	0.000	Σ región anterior vs Σ región posterior	N/A	0.04 *
Granular	1.703	0.115	8102.000	N/A	0.000	Σ región anterior vs Σ región posterior	0.813, NS	N/A
Hiliar	2.603	0.016	N/A	16988.000	0.000	Σ región anterior vs Σ región posterior	N/A	0.015 **

Anexo 20. Análisis estadístico del células IR-NKCC1(μm^3) por capa: molecular, granular e hilar en el grupo DN.

Región	Valor de Levene	Significancia de Levene	Valor de ANOVA (F)	Valor de Welch	Significancia estadística	Comparación por Capas	Significancia Pos Hoc (Tukey)	Significancia Pos Hoc (Dunnett T3)
Anterior Derecha	1.976	0.164	8,164	N/A	0.002	Molecular vs Granular	0.078, NS	N/A
						Molecular vs Hiliar	0.002 **	N/A
						Granular vs Hiliar	0.217, NS	N/A
Anterior Izquierda	0.69	0.513	10,092	N/A	0.001	Molecular vs Granular	0.012 **	N/A
						Molecular vs Hiliar	0.001 ***	N/A
						Granular vs Hiliar	0.477, NS	N/A
Sumatoria Anterior	1.192	0.323	10,104	N/A	0.001	Molecular vs Granular	0.025 *	N/A
						Molecular vs Hiliar	0.001 ***	N/A
						Granular vs Hiliar	0.278, NS	N/A
Posterior Derecha	1.947	0.168	14,892	N/A	0	Molecular vs Granular	0.000 ***	N/A
						Molecular vs Hiliar	0.001 ***	N/A
						Granular vs Hiliar	0.857, NS	N/A
Posterior Izquierda	1.678	0.211	11.55	N/A	0	Molecular vs Granular	0.006 **	N/A
						Molecular vs Hiliar	0.000 ***	N/A
						Granular vs Hiliar	0.502, NS	N/A
Sumatoria Posterior	1.162	0.332	16,536	N/A	0	Molecular vs Granular	0.000 ***	N/A
						Molecular vs Hiliar	0.000 ***	N/A
						Granular vs Hiliar	0.926, NS	N/A
Completo Derecho	0.776	0.473	12,765	N/A	0	Molecular vs Granular	0.001 ***	N/A
						Molecular vs Hiliar	0.000 ***	N/A
						Granular vs Hiliar	0.901, NS	N/A
Completo Izquierdo	0.98	0.392	11,929	N/A	0	Molecular vs Granular	0.005 **	N/A
						Molecular vs Hiliar	0.000 ***	N/A
						Granular vs Hiliar	0.514, NS	N/A
Sumatoria Completa	0.631	0.542	14,136	N/A	0	Molecular vs Granular	0.001 ***	N/A
						Molecular vs Hiliar	0.000 ***	N/A
						Granular vs Hiliar	0.687, NS	N/A

Anexo 21. Análisis estadístico del área (μm^2) por lateralidad: hemisferio derecho vs izquierdo en el grupo DC.

Capa	Valor de Levene	Significancia de Levene	Valor de ANOVA (F)	Valor de Welch	Significancia estadística	Comparación por Hemisferios	Significancia Pos Hoc (Tukey)	Significancia Pos Hoc (Dunnett T3)
Molecular	4.639	0.000	N/A	47975.000	0.000	Derecho anterior vs Izquierdo anterior	N/A	1.000, NS
						Derecho posterior vs Izquierdo posterior	N/A	0.967, NS
						Derecho completa vs Izquierdo completa	N/A	0.976, NS
Granular	5.808	0.000	N/A	16096.000	0.000	Derecho anterior vs Izquierdo anterior	N/A	1.000, NS
						Derecho posterior vs Izquierdo posterior	N/A	1.000, NS
						Derecho completa vs Izquierdo completa	N/A	1.000, NS
Hiliar	4.234	0.000	N/A	26688.000	0.000	Derecho anterior vs Izquierdo anterior	N/A	1.000, NS
						Derecho posterior vs Izquierdo posterior	N/A	1.000, NS
						Derecho completa vs Izquierdo completa	N/A	1.000, NS

Anexo 22. Análisis estadístico del área (μm^2) por región: sumatoria anterior vs sumatoria posterior en el grupo DC.

Capa	Valor de Levene	Significancia de Levene	Valor de ANOVA (F)	Valor de Welch	Significancia estadística	Comparación por región	Significancia Pos Hoc (Tukey)	Significancia Pos Hoc (Dunnett T3)
Molecular	4.639	0.000	N/A	47975.000	0.000	Σ región anterior vs Σ región posterior	N/A	0.002 ***
Granular	5.808	0.000	N/A	16096.000	0.000	Σ región anterior vs Σ región posterior	N/A	0.115, NS
Hiliar	4.234	0.000	N/A	26688.000	0.000	Σ región anterior vs Σ región posterior	N/A	0.006 **

*** ≤ 0.001

Anexo 23. Análisis estadístico del área (μm^2) por capa: molecular, granular e hiliar en el grupo DC.

Región	Valor de Levene	Significancia de Levene	Valor de ANOVA (F)	Valor de Welch	Significancia estadística	Comparación por Capas	Significancia Pos Hoc (Tukey)	Significancia Pos Hoc (Dunnett T3)
Anterior Derecha	2.139	0.143	42,786	N/A	0	Molecular vs Granular	0.000 ***	N/A
						Molecular vs Hiliar	0.000 ***	N/A
						Granular vs Hiliar	0.93, NS	N/A
Anterior Izquierda	2.51	0.105	39,453	N/A	0	Molecular vs Granular	0.000 ***	N/A
						Molecular vs Hiliar	0.000 ***	N/A
						Granular vs Hiliar	0.951, NS	N/A
Sumatoria Anterior	2.373	0.118	41,257	N/A	0	Molecular vs Granular	0.000 ***	N/A
						Molecular vs Hiliar	0.000 ***	N/A
						Granular vs Hiliar	0.941, NS	N/A
Posterior Derecha	3.475	0.053	36,813	N/A	0	Molecular vs Granular	0.000 ***	N/A
						Molecular vs Hiliar	0.000 ***	N/A
						Granular vs Hiliar	0.913, NS	N/A
Posterior Izquierda	2.113	0.15	55,131	N/A	0	Molecular vs Granular	0.000 ***	N/A
						Molecular vs Hiliar	0.000 ***	N/A
						Granular vs Hiliar	0.987, NS	N/A
Sumatoria Posterior	2.823	0.086	53,724	N/A	0	Molecular vs Granular	0.000 ***	N/A
						Molecular vs Hiliar	0.000 ***	N/A
						Granular vs Hiliar	0.937, NS	N/A
Completo Derecho	6.511	0.007	N/A	11,133	0	Molecular vs Granular	N/A	0.000 ***
						Molecular vs Hiliar	N/A	0.000 ***
						Granular vs Hiliar	N/A	0.96, NS
Completo Izquierdo	1.749	0.202	104,947	N/A	0	Molecular vs Granular	0.000 ***	N/A
						Molecular vs Hiliar	0.000 ***	N/A
						Granular vs Hiliar	0.999, NS	N/A
Sumatoria Completa	6.393	0.008	N/A	47,098	0	Molecular vs Granular	N/A	0.000 ***
						Molecular vs Hiliar	N/A	0.000 ***
						Granular vs Hiliar	N/A	0.983, NS

Anexo 24. Análisis estadístico del volumen (μm^3) por lateralidad: hemisferio derecho vs izquierdo en el grupo DC.

Capa	Valor de Levene	Significancia de Levene	Valor de ANOVA (F)	Valor de Welch	Significancia estadística	Comparación por Hemisferios	Significancia Pos Hoc (Tukey)	Significancia Pos Hoc (Dunnett T3)
Molecular	4.511	0.000	N/A	48665.000	0.000	Derecho anterior vs Izquierdo anterior	N/A	1.000, NS
						Derecho posterior vs Izquierdo posterior	N/A	0.973, NS
						Derecho completa vs Izquierdo completa	N/A	0.974, NS
Granular	5.363	0.000	N/A	15612.000	0.000	Derecho anterior vs Izquierdo anterior	N/A	1.000, NS
						Derecho posterior vs Izquierdo posterior	N/A	1.000, NS
						Derecho completa vs Izquierdo completa	N/A	1.000, NS
Hiliar	3.362	0.003	N/A	25857.000	0.000	Derecho anterior vs Izquierdo anterior	N/A	1.000, NS
						Derecho posterior vs Izquierdo posterior	N/A	1.000, NS
						Derecho completa vs Izquierdo completa	N/A	1.000, NS

Anexo 25. Análisis estadístico del volumen (μm^3) por región: sumatoria anterior vs sumatoria posterior en el grupo DC.

Capa	Valor de Levene	Significancia de Levene	Valor de ANOVA (F)	Valor de Welch	Significancia estadística	Comparación por región	Significancia Pos Hoc (Tukey)	Significancia Pos Hoc (Dunnett T3)
Molecular	4.511	0.000	N/A	48665.000	0.000	Σ región anterior vs Σ región posterior	N/A	0.002 **
Granular	5.363	0.000	N/A	15612.000	0.000	Σ región anterior vs Σ región posterior	N/A	0.112, NS
Hiliar	3.362	0.003	N/A	25857.000	0.000	Σ región anterior vs Σ región posterior	N/A	0.001 ***

Anexo 26. Análisis estadístico del volumen (μm^3) por capa: molecular, granular e hiliar en el grupo DC.

Región	Valor de Levene	Significancia de Levene	Valor de ANOVA (F)	Valor de Welch	Significancia estadística	Comparación por Capas	Significancia Pos Hoc (Tukey)	Significancia Pos Hoc (Dunnnett T3)
Anterior Derecha	2.062	0.152	41,898	N/A	0	Molecular vs Granular	0.000 ***	N/A
						Molecular vs Hiliar	0.000 ***	N/A
						Granular vs Hiliar	0.943, NS	N/A
Anterior Izquierda	2.114	0.146	38,577	N/A	0	Molecular vs Granular	0.000 ***	N/A
						Molecular vs Hiliar	0.000 ***	N/A
						Granular vs Hiliar	0.97, NS	N/A
Sumatoria Anterior	2.156	0.141	40,568	N/A	0	Molecular vs Granular	0.000 ***	N/A
						Molecular vs Hiliar	0.000 ***	N/A
						Granular vs Hiliar	0.957, NS	N/A
Posterior Derecha	3.398	0.056	36,745	N/A	0	Molecular vs Granular	0.000 ***	N/A
						Molecular vs Hiliar	0.000 ***	N/A
						Granular vs Hiliar	0.901, NS	N/A
Posterior Izquierda	1.838	0.188	54,398	N/A	0	Molecular vs Granular	0.000 ***	N/A
						Molecular vs Hiliar	0.000 ***	N/A
						Granular vs Hiliar	0.976, NS	N/A
Sumatoria Posterior	2.777	0.089	53,475	N/A	0	Molecular vs Granular	0.000 ***	N/A
						Molecular vs Hiliar	0.000 ***	N/A
						Granular vs Hiliar	0.992, NS	N/A
Completo Derecho	6.43	0.008	N/A	30,591	0	Molecular vs Granular	N/A	0.000 ***
						Molecular vs Hiliar	N/A	0.000 ***
						Granular vs Hiliar	N/A	0.936, NS
Completo Izquierdo	1.434	0.264	106,361	N/A	0	Molecular vs Granular	0.000 ***	N/A
						Molecular vs Hiliar	0.000 ***	N/A
						Granular vs Hiliar	0.999, NS	N/A
Sumatoria Completa	6.409	0.008	N/A	48,258	0	Molecular vs Granular	N/A	0.000 ***
						Molecular vs Hiliar	N/A	0.000 ***
						Granular vs Hiliar	N/A	0.974, NS

Anexo 27. Análisis estadístico del número de células IR-NKCC1 por lateralidad: hemisferio derecho vs izquierdo en el grupo DC.

Capa	Valor de Levene	Significancia de Levene	Valor de ANOVA (F)	Valor de Welch	Significancia estadística	Comparación por Hemisferios	Significancia Pos Hoc (Tukey)	Significancia Pos Hoc (Dunnett T3)
Molecular	2.390	0.027	N/A	14132.000	0.000	Derecho anterior vs Izquierdo anterior	N/A	1.000, NS
						Derecho posterior vs Izquierdo posterior	N/A	1.000, NS
						Derecho completa vs Izquierdo completa	N/A	1.000, NS
Granular	1.570	0.154	4583.000	N/A	0.000	Derecho anterior vs Izquierdo anterior	1.000, NS	N/A
						Derecho posterior vs Izquierdo posterior	1.000, NS	N/A
						Derecho completa vs Izquierdo completa	1.000, NS	N/A
Hiliar	3.076	0.006	N/A	9237.000	0.000	Derecho anterior vs Izquierdo anterior	N/A	1.000, NS
						Derecho posterior vs Izquierdo posterior	N/A	1.000, NS
						Derecho completa vs Izquierdo completa	N/A	1.000, NS

Anexo 28. Análisis estadístico del número de células IR-NKCC1 (μm^3) por región: sumatoria anterior vs sumatoria posterior en el grupo DC.

Capa	Valor de Levene	Significancia de Levene	Valor de ANOVA (F)	Valor de Welch	Significancia estadística	Comparación por región	Significancia Pos Hoc (Tukey)	Significancia Pos Hoc (Dunnett T3)
Molecular	2.390	0.027	N/A	14132.000	0.000	Σ región anterior vs Σ región posterior	N/A	0.33, NS
Granular	1.570	0.154	4583.000	N/A	0.000	Σ región anterior vs Σ región posterior	0.927, NS	N/A
Hiliar	3.076	0.006	N/A	9237.000	0.000	Σ región anterior vs Σ región posterior	N/A	0.406, NS

Anexo 29. Análisis estadístico del células IR-NKCC1(μm^3) por capa: molecular, granular e hilar en el grupo DC.

<i>Región</i>	Valor de Levene	Significancia de Levene	Valor de ANOVA (F)	Valor de Welch	Significancia estadística	Comparación por Capas	Significancia Pos Hoc (Tukey)	Significancia Pos Hoc (Dunnett T3)
Anterior Derecha	12.779	0	N/A	12,652	0.001	Molecular vs Granular	N/A	0.571, NS
						Molecular vs Hiliar	N/A	0.002 **
						Granular vs Hiliar	N/A	0.291, NS
Anterior Izquierda	1.979	0.163	5,619	N/A	0.011	Molecular vs Granular	0.211, NS	N/A
						Molecular vs Hiliar	0.008 **	N/A
						Granular vs Hiliar	0.267, NS	N/A
Sumatoria Anterior	7.831	0.003	N/A	11,991	0.002	Molecular vs Granular	N/A	0.45, NS
						Molecular vs Hiliar	N/A	0.002 **
						Granular vs Hiliar	N/A	0.289, NS
Posterior Derecha	0.509	0.609	5,265	N/A	0.016	Molecular vs Granular	0.091, NS	N/A
						Molecular vs Hiliar	0.014 *	N/A
						Granular vs Hiliar	0.639, NS	N/A
Posterior Izquierda	1.602	0.229	3,851	N/A	0.041	Molecular vs Granular	0.268, NS	N/A
						Molecular vs Hiliar	0.033 *	N/A
						Granular vs Hiliar	0.494, NS	N/A
Sumatoria Posterior	0.976	0.396	4,852	N/A	0.021	Molecular vs Granular	0.142, NS	N/A
						Molecular vs Hiliar	0.017 *	N/A
						Granular vs Hiliar	0.543, NS	N/A
Completo Derecho	0.881	0.431	6,146	N/A	0.009	Molecular vs Granular	0.144, NS	N/A
						Molecular vs Hiliar	0.007 **	N/A
						Granular vs Hiliar	0.311, NS	N/A
Completo Izquierdo	1.574	0.234	6,423	N/A	0.008	Molecular vs Granular	0.172, NS	N/A
						Molecular vs Hiliar	0.006 **	N/A
						Granular vs Hiliar	0.232, NS	N/A
Sumatoria Completa	1.115	0.349	6,619	N/A	0.007	Molecular vs Granular	0.143, NS	N/A
						Molecular vs Hiliar	0.005 **	N/A
						Granular vs Hiliar	0.255, NS	N/A