

1128131

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

**DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMEDICAS
FACULTAD DE MEDICINA**



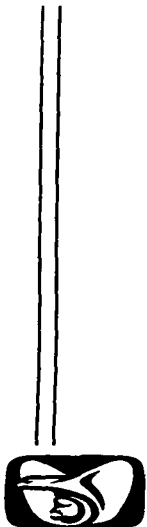
Alfredo

**EFFECTO DE UNA DIETA HIPOPROTEICA (MAIZ Y
PURINA) SOBRE EL DESARROLLO POSNATAL DEL
SISTEMA SEROTONINERGICO CEREBRAL DE LA
RATA. ESTUDIO MORFOLOGICO.**

**PROYECTO DE INVESTIGACION
DE TESIS
PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS**

**PRESENTA
M. EN C. SANDRA OROZCO SUAREZ**

TUTOR. DR. ALFREDO FERIA VELASCO



**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

2003

A



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

PAGINACIÓN DISCONTINUA



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMEDICAS

FACULTAD DE MEDICINA

pdcb/grad/045 Jun/2002

ING. LEOPOLDO SILVA
DIRECTOR GENERAL DE ADMINISTRACION
ESCOLAR DE LA UNAM.
PRESENTE.

Por medio del presente me permito informar a usted que en la reunión del Subcomité Académico de Doctorado en Ciencias Biomédicas que se llevo a cabo el día 18 de septiembre del presente año, se acordó designar el siguiente jurado para examen de Doctorado en Ciencias Biomédicas de la M en C. OROZCO SUAREZ SANDRA ADELA, con número de expediente 100014 y número de cuenta 7736451-9 con la tesis titulada: "EFECTO DE UNA DIETA HIPOPROTEICA (MAIZ Y PURINA) SOBRE EL DESARROLLO POSNATAL DEL SISTEMA SEROTONINERGICO CEREBRAL DE LA RATA. ESTUDIO MORFOLOGICO", dirigida por el Dr. Alfredo Feria Velasco.

PRESIDENTE: DR. MANUEL SALAS ALVARADO
SECRETARIO: DR. ALFREDO FERIA VELASCO
VOCAL: DR. LEON CINTRA McGLONE
VOCAL: DR. GABRIEL GUTIERREZ OSPINA
VOCAL: DR. GABRIEL ROLDAN ROLDAN
SUPLENTE: DR. GABRIEL MANJAREZ GUTIERREZ
SUPLENTE: DR. ALFONSO CARABEZ TREJO

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 18 de septiembre de 2002.

Dr. Gabriel Roldán Roldán
Responsable
Facultad de Medicina

Dr. Alfredo Feria Velasco
Coordinador
Doctorado en Ciencias Biomédicas.

C.c.p. Biol. Francisco Javier Incera, Jefe de la Unidad de Administración del Posgrado.
Tutor(a) Dr. Alfredo Feria Velasco.
Coordinación de Doctorado

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

ABSTRACT

While there are several forms and different degrees of undernutrition, it would appear that type of dietary restriction has an effect on rat brain neurochemistry appear that type of dietary restriction has effect on rat brain development. In this regard, one of neurotransmission system that appears to be altered is the serotonergic system. Serotonin (5-HT) plays a role entirely different from that which is played in the mature brain; acting as a developmental signal or regulatory specific for development of brain tissue. The effects of Tryptophan (Trp) restriction have been recently studied in our laboratory related to postnatal on development of serotonergic system in the raphe nuclei. Normal adult female wistar rats were fed for 6 weeks prior mating with 1) Normal adult female wistar rats for rodents (chow Purina, 23% protein), 2) Hypoproteic diet (chow Purina, 8% protein) and 3) Corn base diet (low tryptophan and 8% protein); some diets were given during pregnancy and lactation. Offsprings continued with those diets until reaching 60 days of age. The serotonergic cells were identified by 5-HT immunolabeling in the pups at 1, 7, 14, 21, 30 and 60 postnatal days. The numbers of 5-HT-immunoreactive neurons (5-HTir) were quantified by means of stereological analysis. Results showed a significant variation in 5-HT expression in the raphe nuclei in the animals fed the corn diet. Thus, a significant reduction in the number of 5-HTir cells in the rostral raphe nuclei, mainly in dorsal, median and lemniscus medialis as compared to the control group. This decrease was more evident at the 30 and 60 postnatal days compared to data obtained from the control groups. It is concluded that variations in the diet available TRY are affecting the proliferation of serotonergic cells.

RESUMEN

Existen diversos tipos y diferentes grados de desnutrición, que se dan de acuerdo al tipo de restricción en la dieta. La desnutrición produce diversos efectos en la neuroquímica del cerebro de rata y sobre el desarrollo mismo de cerebro. Uno de los sistemas de neurotransmisión que es alterado por la desnutrición es el sistema serotoninérgico. Dada la amplia distribución de la serotonina (5-HT) y a su expresión temprana en el cerebro fetal, se le ha atribuido a la 5-HT un papel trófico durante el desarrollo del cerebro. El presente trabajo aborda el efecto de la restricción de nutrimentos específicos como el L-triptófano (L-Trp) y la cantidad de proteína sobre algunos aspectos del desarrollo cerebral y de las neuronas serotoninérgicas en los núcleos del rafe. Para ello se alimentaron tres grupos de ratas bajo el mismo esquema antes y durante la gestación y se continuó dando a las crías hasta los 60 días de edad. 1) dieta normal para roedores a base de chow de Purina (23% de proteína), 2) dieta hipoproteica con 8% de proteína a base de chow de Purina y 3) una dieta hipoproteica a base de harina de maíz la cual es deficiente en el aminoácido esencial triptófano (Trp). Se utilizó una técnica inmunocitoquímica para identificar neuronas serotoninérgicas en los 9 núcleos del rafe, localizados en el tallo cerebral. El número de células inmunorreactivas a 5-HT (5-HTir) fue cuantificado con un análisis estereociógico. Los resultados muestran una variación significativa en la expresión de 5-HTir en el núcleo rafe entre los tres grupos experimentales: El grupo de maíz muestra una reducción significativa en el número de células 5-HTir en los núcleos rostrales principalmente en el núcleo rafe dorsal, núcleo rafe central superior y núcleo asociado al lemnisco medial, comparado con los datos obtenidos en el grupo control. Esta disminución fue más evidente a los 30 y 60 días de edad postnatal. Estos datos muestran que las variaciones en la disponibilidad de Trp afecta la proliferación de las neuronas en los núcleo del rafe. Esto puede producir alteraciones en las funciones en que la serotonina participa como es el proceso de aprendizaje y memoria.

Abreviaturas

Ácido 5-hydroxiindolacetic = 5-HIAA
Ácido lisérgico = LSD
Amortiguador de fosfato salino = PBS
Células inmunoreactivas 5-HT = 5-HTir
Chow = ch
Complejo avidin-biotin = ABC
Con = Control
Descarboxilasa de los aminoácidos aromáticos = DCAA
Días posparto= DP
Factor de crecimiento fibroblástico= FCF
Factor neurotrófico ciliar= FNTC
Fosfolipasa C= PLC Serotonina = 5-HT
Hipoproteica = Hipo
N-metil-D-aspartato = NMDA
Proteína básica de la mielina 7= PBM 7
Proteínas morfogenéticas de hueso= BMPs
Sistema Nervioso Central= SNC
Suero normal de caballo = NHS
Tetrahidrobiopterina= BH4
Triptófano = Trp
Vida fetal = VF

INDICE

1.-Introducción.....	1
1.1.- Antecedentes.....	1
1.1.1 Síntesis de serotonina cerebral.....	3
1.1.2. Ontogenía y regulación de la neurogénesis serotoninérgica	4
1.1.3. Los receptores serotoninérgicos en el desarrollo del cerebro.....	8
1.1.4. Efecto de la dieta sobre el sistema serotoninérgico	12
2.- Planteamiento del problema.....	15
3.- Hipótesis.....	15
4.- Objetivos.....	16
4.1. Objetivo General.....	16
4.2. Objetivos específicos.....	16
5.- Materiales y Métodos.....	17
5.1. Aspectos éticos	17
5.2. Variables.....	17
5.3. Diseño y descripción general del estudio	17
5.4. Procedimientos	20
5.4.1 Dietas	20
5.4.2 Obtención del tejido	21
5.4.3 Método de tinción inmunocitoquímica	21
5.4.4. Análisis cuantitativo	22
5.4.5 Análisis estadístico.....	23
6.- Resultados	24
6.1 Parámetros somatométricos	27
6.2 Análisis cuantitativo de las células 5-HT _{1r}	28
7.- Discusión.....	40
8.- Conclusiones.....	48
9.- Perspectivas.....	49
10.- Referencias.....	50

INDICE DE TABLAS Y FIGURAS

	Pagina
Figura 1. Síntesis de serotonina.....	4
Tabla 1 Receptores a serotonina.....	10
Figura 2. Localización de los núcleos del rafe en tubo neural.....	7
Figura 3. Esquema de los cortes que se hicieron para el conteo neuronal.....	28
Figura 4. Gráficas de parámetros somatométricos de las rata madre.....	29
Figura 5. Gráficas de los parámetros somatométricos de las crías.....	30
Figura 6. Gráficas de las medidas cerebrales de las crías.....	31
Figura 7. Fotomicrografías de los diferentes núcleos del rafe.....	32
Figura 8. Fotomicrografías del núcleo rafe pallidus.....	33
Figura 9. Fotomicrografías del núcleo rafe dorsal.....	34
Figura 10. Gráficas del número de células 5-HTir en dos núcleos caudales.....	35
Figura 11. Gráficas del número de células del n. rafe magnus y dorsal.....	36
Figura 12. Gráficas del número de células de dos núcleos dorsales.....	37
Figura 13. Gráficas del numero de células 5-HTir en dos núcleos dorsales.....	38
Figura 14. Gráficas del número total de células en el sistema rafe.....	39

1.- INTRODUCCIÓN

1.1 Antecedentes

Rapport y Green (1948) purificaron e identificaron en el suero una sustancia química conocida como 5-hidroxitriptamina (5-HT) la cual tiene un poderoso efecto sobre la contracción muscular de los vasos sanguíneos. Ellos la denominaron con el nombre de serotonina. Esta sustancia existe en todos los organismos biológicos, incluyendo las plantas, invertebrados y vertebrados (Smith, 1971; Fischer, 1971). Su amplia distribución en plantas y animales sugieren que este sistema es filogenéticamente antiguo. Consistente con esta idea, los receptores para serotonina, especialmente los del subtipo 5-HT₁, aparecieron hace miles de años (Peurotkatka, 1990). En mamíferos, se han localizado altos niveles de 5-HT en intestino, pulmón, riñón, testículos, ganglio cervical superior y cerebro (Twarog y Page 1953; Verhofstad y col., 1981; Gershon, 1991).

No obstante, su amplia distribución en el organismo, muchas funciones atribuidas a la serotonina se ha centrado sobre el sistema nervioso central (SNC). Wolley (1963) señaló que la serotonina es esencial para la salud mental. Esta idea se basó en la estructura similar que tiene 5-HT con el ácido lisérgico (LSD). Brodie y Shore (1957) desplegaron una extraordinaria perspicacia al proponer que la 5-HT y la norepinefrina podrían actuar como dos sistemas neuroquímicos opuestos en el SNC, algo parecido a la epinefrina y acetilcolina en el sistema nervioso periférico. Estos autores fueron los que descubrieron el papel metabólico de 5-HT en la actividad neuronal del cerebro.

Dahlström y Fuxe (1964) describieron la localización de las neuronas serotoninérgicas y de sus terminales axónicas en el cerebro de ratas. Esta descripción de las neuronas

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

serotoninérgicas contestó la pregunta de Santiago Ramón y Cajal sobre la extensión de las proyecciones de las neuronas del rafe. Ahora se conoce que este sistema rafe localizado en el tallo cerebral comprende el sistema anatómico y neuroquímico más complejo del sistema nervioso central (SNC) de los mamíferos (Azmitia E., 1986).

La información que surgió los siguientes 20 años se centro en estudios neurofisiológicos. En base a los resultados de la histofluorescencia, con los cuales se localizaron los cuerpos celulares serotoninérgicos que se agrupan a lo largo de la línea media del tallo cerebral, se registraron estas células con un microelectrodo y se encontró que estas neuronas despliegan un distintivo y regular patrón de descarga, el cual se estableció como una "señal" bioeléctrica para este grupo de neuronas (Aghanjanian y col., 1968). Los siguientes avances fueron sobre la naturaleza plástica de las neuronas serotoninérgicas y a las áreas invadidas por ellas: sobre el desarrollo de neurotoxinas químicas específicas, regeneración y recrecimiento de colaterales axónicas en el SNC, trasplantes y cultivo de neuronas fetales.

Las neurotoxinas que destruyen las entradas de 5-HT sin producir daño neuronal a otros sistemas, permitió a los investigadores estudiar el proceso de regeneración de los axones serotoninérgicos dañados y al crecimiento de nuevos brotes, así como también, al reestablecimiento de contactos funcionales. (Baugarten y col., 1971; 1982). En años más reciente, el tema que atrajo mayor interés fué sobre los diferentes subtipos de los receptores de 5-HT que se han descubierto en el SNC, muchos trabajos se enfocaron en describir su distribución anatómica y a las acciones posinápticas asociadas con ellos. Así como sobre la biología molecular de los receptores, los sistemas de segundos mensajeros y los canales iónicos. (Frazer y col., 1990; Harrington y col., 1992).

Esto permitió conocer la diversidad de funciones de la 5-HT y ha hecho posible la identificación de acciones separadas posinápticas y los efectos integrativos de la 5-HT, por lo que ha sido implicada en la regulación central de funciones autonómicas

(presión sanguínea, balance de sodio y glucosa, homeostasis de los fluidos corporales), conductas motoras (sexual y alimentaria), nocicepción, cognición, conductas de alerta y afectivas (depresión y ansiedad) (Fields y col., 1991; Marson y McKenna, 1992; Feldman y col., 1997). La diversidad anatómica que tiene el sistema serotoninérgico se refleja por los múltiples efectos fisiológicos, bioquímicos y conductuales.

1.1. 1. Síntesis de serotonina cerebral

La serotonina es una indolamina que químicamente se designa como 3-(2-aminoetil-indol-5-ol), pero ordinariamente se nombra como 5-Hidroxitriptamina (5-HT). Su estructura química revela una relación cercana con el aminoácido L-triptófano (L-Trp), el cual es el precursor de la síntesis del neurotransmisor.

La vía de síntesis y degradación se muestra en la Figura 1. El primero e importante paso limitante de la cadena metabólica que limita la síntesis de 5-HT es la hidroxilación del L-triptófano en la posición 5 para formar el 5-hidroxitriptófano (5-HTP). Esta reacción es catalizada por la enzima triptófano-5'-monooxigenasa, comúnmente conocida como la triptófano-5- hidroxilasa. En el SNC, esta enzima se localiza en las neuronas serotoninérgicas y sirve como un marcador de dichas células. La reacción que cataliza por la triptófano-5-hidroxilasa requiere de un cofactor y oxígeno molecular. El cofactor es la tetrahidrobiopterina (BH₄) que dona electrones para la reacción enzimática. El producto de la hidroxilación del aminoácido el 5-HTP, es descarboxilado por la descarboxilasa de los aminoácidos aromáticos (DCAA) para producir, la 5-HT, excepto en la glándula pineal, la 5-HT es el precursor de la síntesis de melatonina, la cual juega un papel muy importante en la conducta sexual, en el sueño y en la regulación de los ritmos biológicos (Frazer y col., 1990; Frazer y Hensler, 1994).

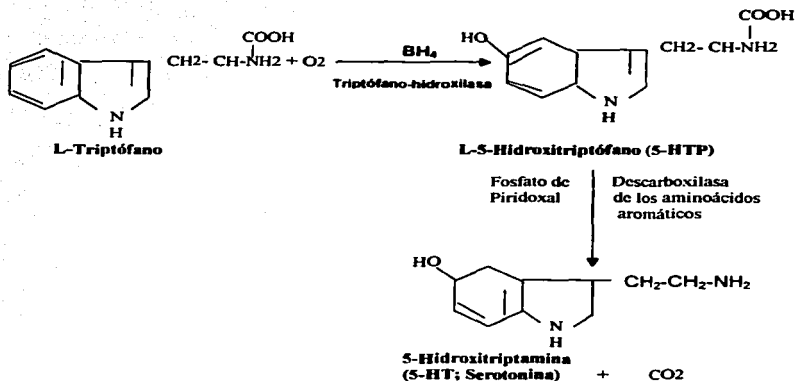


Fig.ura 1.- Síntesis de serotonina. (Tomado de Feldman, 1997).

1.1.2 Ontogenia y regulación de la neurogénesis serotoninérgica.

El desarrollo de las células que expresan serotonina en el SNC ha sido estudiado en detalle en la rata, cuyo período gestacional es aproximadamente de 20 días (para revisión ver) (Vaage, 1969; Lidov y Molliver., 1982; Molliver, 1987; Rubenstein, 1998). El sistema serotoninérgico inicia su proceso de desarrollo durante el periodo de gastrulación etapa en la cual se ha diferenciado el ectodermo en neuroepitelio y posteriormente en placa neural, después se convierte por neurilización en tubo neural, en cuya región rostral se desarrollan tres vesículas primitivas, que son los primordios

de las grandes regiones cerebrales; el cerebro anterior (prosencefalo) el cerebro medio (mesencefalo) y cerebro posterior (romboencefalo) (Fig. 2). En el curso del desarrollo cerebral, las constricciones transversas se dividen en segmentos neuronales o neurómeros (Lidov y Molliver, 1982). Los neurómeros están presentes en el cerebro posterior, donde son llamados rombómeros (Fig. 2), probablemente también se localizan en el cerebro anterior, los cuales son conocidos como prosómeros (Lidov y Molliver, 1982; Rubenstein., 1998). El grupo de neuronas rostrales es el primero en ser detectado con anticuerpos específicos contra serotonina, el cual aparece entre el día 12 al 15 de la vida fetal (VF) en la rata. El grupo caudal se detecta alrededor del día 14-VF, sin embargo, algunos estudios sugieren, que estas células se forman al mismo tiempo que las neuronas rostrales (11VF-12VF). Pero no se sabe, si las células caudales tienen un retardo en la expresión de la serotonina en relación a las neuronas serotoninérgicas rostrales (Rubenstein, 1998; Molliver, 1987).

Las características de inducción y especificación de las neuronas serotoninérgicas, es parecida a la de otros tipos celulares localizados en la misma área ventral en el tubo neural, como son las neuronas motoras y las neuronas dopaminérgicas. Existen evidencias que las moléculas producidas por la notocorda pueden inducir estos tres tipos de células (Yamada y col., 1993 ; Hynes y col., 1995; Tanabe y Jessell, 1996). Las proteínas sonido de erizo (sonic Hedgehog) que se producen en la notocorda y en la placa del piso, son las proteínas necesarias y suficientes para la inducción de las células ventrales (Tanabe y Jessell, 1996) y por consiguiente esenciales para el fenotipo serotoninérgico (Chiang y col.,1996). Del mismo modo, la competencia región específica induce genes reguladores de los distintos tipos celulares (Shimamura y Rubenstein, 1997). Las proteínas sonido de erizo inducen marcadores en los primordios del cerebro anterior. Del mismo modo, existen algunas substancias específicas de cada región que participan en la formación del cerebro, hay evidencias que la proteína básica de la mielina 7 (BMP7), producida por el mesodermo precordial, tiene un papel en la formación del hipotálamo (Dale y col., 1997). El factor de

crecimiento fibroblástico 8 (FCF8) esta implicado en el formación del cerebro anterior, medio y del cerebello.

Se ha observado que las señales del centro dorsal pueden producen las proteínas morfogenéticas de hueso (BMPs) las cuales reprimen la neurogénesis serotoninérgica en la placa alar. Sin embargo, señales adicionales regulan la neurogénesis serotoninérgica y son producidas en otros centros de formación, tales como la región del ismo que es la zona de transición del cerebro medio y del cerebro posterior. Finalmente, la competencia región-específica para formar las neuronas serotoninérgicas es controlada a través de la expresión regional de factores de transcripción; como los genes homeóticos como; *Oyx* los cuales reprimen al fenotipo serotoninérgico en el cerebro medio y anterior y permiten la inducción de las células serotoninérgicas en el cerebro posterior (Rubenstein, 1998). También, las proteínas neurotróficas regulan el desarrollo de las neuronas serotoninérgicas, por ejemplo el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) promueve la sobrevivencia de las neuronas serotoninérgicas (Eaton y Whitemore, 1996) y el factor neurotrófico ciliar (FNTC) promueve a las células del rafe a diferenciarse en neuronas colinérgicas y reduce el número de neuronas serotoninérgicas (Rudge y col., 1996).

Tan pronto se diferencian las neuronas serotoninérgicas en el SNC empiezan a enviar sus axones rostralmente, a sus primeros blancos por ejemplo las neuronas dopaminérgicas de la substancia nigra. El grupo de neuronas localizadas en el rafe rostral envía proyecciones axonales que ascienden al cerebro anterior (Fig. 1B), en tanto que las del rafe caudal envían axones que descienden a la médula espinal (Molliver, 1987; Wallace y Lauder, 1983). Las proyecciones de las neuronas rostrales empiezan a ser visibles después de que la inmunoreactividad a serotonina está presente en el tallo cerebral. Estas fibras se proyectan al polo frontal del telencéfalo (Fig. 1B) y alrededor del día 15 VF alcanza al diencéfalo (Okado y col., 1993; Lidov y col., 1980). Hay evidencias que indican que alrededor del cerebro medio anterior, las

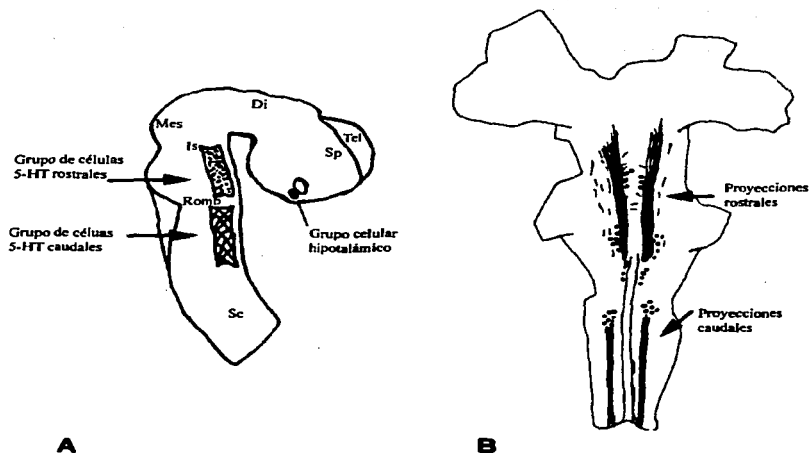


Fig.ura.2.- A) Localización aproximada de los núcleos serotoninérgicos en el tubo neural del pollo (10-VF). di (diencefalo); is (istmo); mes(mesencéfalo); Tel (telencefalo); me (médula espinal) y rom (rombómeros). B) Muestra las proyecciones serotoninérgicas, las que ascienden al cerebro anterior provienen de los núcleos rostrales y las que descienden a la médula espinal provienen de los núcleo caudales.

Fibras mediales se proyectan al polo frontal del telencefalo, sin embargo, las fibras laterales van al hipotálamo. Estas fibras serotoninérgicas anteriores alcanzan la terminación rostral del cerebro alrededor del día 17 VF, algunas cruzan la línea media de la comisura supraóptica. Del mismo modo, estas fibras serotoninérgicas ingresan al

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

telencéfalo a través de la eminencia ganglionar en el día 17 VF (Azmitia y Zegal, 1978; D'Amato y col., 1987; Lebrand y col., 1996). Alrededor de la corteza cerebral, las fibras se segregan en dos grupos; uno superficial (alrededor de la zona marginal) y otro en la profundidad de la placa cortical. La corteza hipocampal recibe fibras que siguen curso dorsomedial a través de la corteza cingulada. Finalmente, hay un grupo de fibras serotoninérgicas que ingresan más tarde a su blanco y son las que inervan principalmente la corteza sensorial (Rubenstein, 1998).

1.1.3. Los receptores serotoninérgicos en el desarrollo del cerebro

Existe una gran heterogeneidad de receptores 5-HT en el cerebro, los cuales se clasifican de 5-HT₁ a 5-HT₇ con diferentes subtipos (Whitaker-Azmitia., 1991; Bat-Peled y col., 1991; Barnes y Sharp, 1999; Azmitia y Whitaker., 1997; Aghajanian, 1981). La acción electrofisiológica de 5-HT abarca dos grandes familias de receptores de 5-HT: los receptores acoplados a proteínas G (5-HT₁, 5-HT₂ y 5-HT₄) y los ligados a canales iónicos (5-HT₃) (Tabla 1).

Debido a su extraordinaria diversidad de acciones electrofisiológicas de la 5-HT en SNC, los receptores a 5-HT comprende diferentes mecanismos efectores, entre los que destacan; a) un efecto inhibitorio que esta mediado por los receptores 5-HT₁, que abre canales de K⁺ y cierra canales de Ca²⁺, vía proteínas G- sensible a la toxina pertusis; (b) un efecto facilitador que involucra el cierre de canales de K⁺ el cual es mediado por los receptores 5-HT₂, con el fosfatidil inositol como segundo mensajero y la fosfolipasa C que actúa como un circuito de retroalimentación; (c) otro efecto facilitador de 5-HT esta mediado por los receptores 5-HT₄ a través de la reducción de las corrientes de de K⁺ (Ca²⁺) o corrientes de K⁺ dependientes de voltaje, aparentemente en algunos casos a través de la vía del AMPc y en algunos casos no (Aghajanian, 1995) y (d) una excitación rápida que esta mediada por los receptores 5-

HT₃ a través de un ligando unido a canal iónico, el cual no requiere acoplamiento con proteínas G o segundos mensajeros.

Los receptores que se encuentran acoplados negativamente a adenilato ciclasa, incluye: 5-HT₁, 5-HT_{1A}, 5-HT_{1B}, 5-HT_{1D}, 5-HT_{1E} y 5-HT_{1F} (Nelson y col., 1980; Stark y col., 1998). La familia de receptores 5-HT₂ son los que estimulan la fosfolipasa C (PLC), 5-HT_{2A}, 5-HT_{2B}, 5-HT_{2C}. La familia de receptores 5-HT que estimula la actividad de la adenilato ciclasa, se caracteriza por ser un grupo heterogéneo que incluye los receptores 5-HT₄, 5-HT₆ y 5-HT₇ (Nelson y col., 1980; Stark y col., 1998; Harrington y col., 1992; Bolaños-Jiménez y col., 1997). Los receptores 5-HT_{5A} y 5-HT_{5B} constituye una familia de receptores que no modulan la actividad de adenilato ciclasa o la fosfolipasa C, se desconocen los sistemas de traducción de la señal al interior de la neurona (Bolaños-Jiménez y col., 1997; Peurotka, 1990)

Los receptores a 5-HT se encuentran sobre expresados en el cerebro inmaduro en comparación con el adulto, alcanzan un pico máximo de expresión en la vida fetal entre la 16 a la 22 semana de gestación en el humano (Bat-Peled y col., 1991) y en la rata alrededor del día 12-VF en el tallo cerebral y se incrementa alrededor del día 15 – VF, después de este tiempo disminuye su expresión y nunca vuelve a incrementarse a esos niveles (Hillion y col., 1994). Las regiones que maduran más tarde, tales como el cerebelo (Daval y col., 1987) y la corteza visual (Dyck y Cynader, 1993), el pico de máxima expresión ocurre más tarde que en el tallo cerebral. La disminución en el número de receptores después del día 15 VF se debe probablemente al incremento en los niveles de serotonina, por ejemplo la expresión del receptor 5-HT_{1A} es sensible a la autoinhibición (Nishi y Azmitia, 1999).

Receptor	Mecanismo Efecto
5-HT1A	inhibición de la adenilato ciclasa
5-HT1D α	apertura de canales de K ⁺
5-HT1D β	inhibición de la adenilato ciclasa
5-HT1E	inhibición de la adenilato ciclasa
5-HT1F	inhibición de la adenilato ciclasa
5-HT2A	estimulación de fosfoinosidos, específicamente fosfolipasa C, cierra canales de K ⁺
5-HT3	ligando unido a canal iónico
5-HT4	estimulación de adenilato ciclasa
5-HT5A	estimulación de adenilato ciclasa
5-HT5B	?
5-HT6	estimulación de adenilato ciclasa
5-HT7	estimulación de adenilato ciclasa

Tabla 1.- Receptores serotoninérgicos presentes en el sistema nervioso central

Grandes esfuerzos se han realizado en conocer el papel de receptores que transitoriamente son sobreexpresados durante el desarrollo del cerebro. Existen dos posibilidades: primero, que los receptores pueden simplemente ser sobreexpresados en el cerebro inmaduro de la misma forma que las células y la sinapsis son sobreexpresadas. Los receptores innecesarios o redundantes son eliminados en el curso del desarrollo, así como las células y la sinapsis. Estos son los receptores que pueden ser nombrados programables, dependiendo del nivel de estimulación, pueden permanecer o ser eliminados (Whitaker-Azmitia, 1991).

Segundo, los receptores que son transitoriamente sobreexpresados, más bien influyen sobre el desarrollo cerebral. En muchos casos, esto es a través de la producción de

segundos mensajeros, similar al producido al cerebro maduro pero con un mayor nivel de actividad. Este incremento en el nivel de actividad en el cerebro inmaduro se debe al AMPc producido por la adenilato ciclasa, que es estimulado por la serotonina (Nelson y col., 1980). La actividad de la fosfolipasa C (la cual es responsable de la producción de fosfato de inositol) estimulado por el receptor 5-HT_{1A}. Lo que ha sugerido que los receptores que estimulan la hidrólisis de fosfoinosidos regulan la proliferación celular, sin embargo los receptores que regulan la actividad de la adenilato ciclasa pueden jugar un papel en la diferenciación celular. La diferenciación celular es a menudo considerada el tiempo en el cual la división celular termina. Este es el primer punto en el cual hay importante interacción entre segundos mensajeros.

Los receptores 5-HT_{1A} y 5-HT_{2A} también, participan en la organización y regulación de los elementos del citoesqueleto en las células blanco durante el desarrollo del SNC, si hay un desbalance entre el número de estos dos receptores se producen cambios en la forma neuronal (Alexander y col., 1987). Se conoce que el efecto inhibitorio y estimulador de 5-HT se debe a la diversidad de funciones que tiene 5-HT en las etapas del crecimiento y a la homeostasis del Ca²⁺ intracelular en sus células receptoras blanco (Lipton y col.1989; Mattson y col., 2000).

1.1.4. Efecto de la dieta sobre el sistema serotor:inérgico

Una inadecuada nutrición durante el período perinatal es uno de los principales factores no genéticos que puede afectar el desarrollo del cerebro. El término "desnutrición" indica que, todos los nutrimentos requeridos por las especies están disponibles en la dieta, pero la cantidad es insuficiente (Morgane y col., 2002). El término "malnutrición" implica que uno o más de los aminoácidos esenciales están ausentes o se encuentran en baja proporción en la dieta. El valor nutricional de las proteínas en la dieta reside esencialmente en la cantidad de aminoácidos que han sido absorbidos del sistema digestivo materno. Esto indica que los aminoácidos que son esenciales para la madre también son esenciales para el feto. De tal forma, que la

omisión de un simple aminoácido de la dieta materna afecta la síntesis de proteínas en el feto. La ausencia de uno de los aminoácidos esenciales (metionina, fenilalanina, arginina, lisina o L- triptófano) de la dieta materna puede afectar el desarrollo del cerebro fetal, de igual forma que lo afectaría la disminución de proteínas (Zamenhof, 1985). Los aminoácidos son los precursores de proteínas estructurales que son esenciales para el crecimiento de los tejidos corporales, incluyendo el tejido nervioso. También son precursores directos de enzimas, hormonas peptídicas y neurotransmisores. Por consiguiente, es obvio que los aminoácidos están involucrados en amplias funciones del SNC, que va más allá de su simple participación en la síntesis de proteínas.

Numerosas dietas con restricción de proteínas, especialmente las derivadas de fuentes vegetales, son pobres en algunos aminoácidos esenciales (Stern y col., 1976). Hace más de 20 años se desarrolló un modelo animal de desnutrición en el que se utilizó una dieta a base de maíz como única fuente de proteína. Este tipo de dieta produce una reducción sustancial en los niveles cerebrales de L-triptófano (L- Trp) y serotonina (5-HT) y la síntesis de 5-HT (medida a través del aumento de 5-HTP) disminuye con respecto al control (Fernstrom y Hirsch, 1977; Gibbons y col., 1979; Fernstrom y col., 1985; Fernstrom, 1991; Beas-Zaráte y col., 1988; Del Angel, y col., 1989, 2001). Estos cambios se observan después de un período de 6 semanas que reciben esta dieta, una vez destetadas ingieren a libre demanda la dieta de maíz. Por lo tanto la disminución en la tasa de formación de 5-HT, se debe a un bajo nivel de sustrato (Boadle-Biber, M., 1982; Fernstrom, 1991). Esto indica que el cerebro de las ratas con esta dieta, sintetiza menos 5-HT que los animales bien nutridos (Fernstrom y Hirsch, 1977; 1991). De tal modo que si se inyecta L-Trp a estas ratas, los niveles de 5-HT cerebral aumentan rápidamente, así como la tasa de síntesis de 5-HT (Fernstrom y Hirsch, 1977), lo que indica que los cerebros de estos animales retienen la capacidad para sintetizar cantidades normales de 5-HT cuando se da una cantidad adecuada de L-Trp (Fernstrom, 2000).

Lo datos anteriores, concuerda con algunos trabajos en los que se ha demostrado que los niveles de 5-HT en el cerebro de la rata dependen de la disponibilidad del precursor el, L-Trp y cambios crónicos y agudos en el aporte de este aminoácido produce una modificación en la tasa de síntesis de 5-HT (Gibbons y col., 1979; Boadle-Biber, M., 1982; Fernstrom y col., 1985). La modificación en la síntesis de 5-HT se ha observado en algunos modelos de desnutrición proteica (Morgane y col., 1993) o de restricción de alimento (Hernández y Chagoya., 1986; Hernández y col., 1989; Manjarrez y col., 1988a; 1988b; 1994), la desnutrición prenatal en estos modelos produce un incremento significativo en los niveles de serotonina cerebral y estos niveles permanecen elevados durante la vida adulta (Manjarrez y col., 1999). Por esto la síntesis de serotonina es particularmente sensible a las variaciones en las concentraciones cerebrales de L-Trp, porque la enzima triptófano-5-hidroxilasa en condiciones normales no se satura con el aminoácido. Así la poza del L-Trp central y periférico puede inducir un incremento inmediato en las concentraciones de serotonina cerebral (Fernstrom, 1991). Así se explica porque los animales crónicamente desnutridos prenatalmente cuando se rehabilitan posnatalmente las concentraciones de 5-HT y 5-HIAA alcanzan valores cercanos a los animales control (Chen y col., 1997).

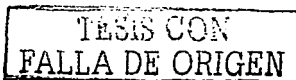
Es difícil realizar modelos de restricción de un nutrimento específico en el que se aislen los efectos de un solo componente de la dieta, como es el caso del L-Trp, sin embargo, una dieta a base de maíz, que además de ser dieta hipoproteica es baja en L-Trp, lo que la hace ser un modelo útil por el cual que se podrá evaluar como la deficiencia L-Trp además de la restricción de proteína puede afectar el desarrollo del sistema serotoninérgico cerebral.

2.- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Una alimentación con dietas baja en proteína y con restricción del L-Trp ocasiona una disminución de las concentraciones cerebrales de serotonina. Por otro lado, la serotonina está involucrada en la regulación de la neurogénesis y puede también actuar como un factor trófico para el desarrollo de cerebro. Por lo tanto la restricción de proteína y L-Trp podrá afectar el desarrollo posnatal de las células serotoninérgicas los núcleos del rafe?.

3. - HIPÓTESIS

Las restricción de proteína y L-Trp afecta el desarrollo posnatal de las células serotoninérgicas, que se reflejará en una disminución en el número de células inmunorreactivas a 5-HT en los núcleos del rafe.



4.-OBJETIVOS.

4.1. General

Conocer el efecto que tiene una dieta baja en proteína y con restricción de L-Trp sobre el número de neuronas inmunorreactivas a 5-HT en los núcleos del rafe.

4.2. Específicos

4.2.1. Conocer los efectos de la dieta baja en proteína y con restricción de L-Trp sobre los parámetros somatométricos de las madres y crías expuestas a estos tipos de dieta.

4.2.2. Caracterizar el patrón de expresión postnatal de las células serotoninérgicas en los núcleos del rafe con 3 tipos de dieta (Control, Hipoproteica y Maíz) que se establece durante el desarrollo postnatal.

4.2.3. Comparar el número de neuronas inmunorreactivas a 5-HT, entre el grupo control (buena condición nutricional) y en condiciones de restricción de proteína (chow de Purina y Maíz)

5.-MATERIALES Y MÉTODOS

El proyecto se realizó en el laboratorio de Neuromorfología de la Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Neurológicas del Hospital de Especialidades del CMN S-XXI y en la División de Neurociencias del Centro de Investigación Biomédica de Occidente del Instituto Mexicano del Seguro Social. Se efectuó un estudio prospectivo, longitudinal, experimental y comparativo con el seguimiento de tres grupos de ratas. Una grupo de ratas con dieta normal (23 % purina Chow), otro grupo de ratas con restricción de proteína (8% purina Chow) el cual fue el control de proteína baja y un grupo de ratas con restricción de proteína y de L-Trp (en dieta de maíz), cuyo diseño se muestra abajo.

5.1. Aspectos éticos

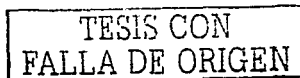
Todos los procedimientos experimentales se realizó con apego a las normas de la Ley General de Salud (1995) y de acuerdo a las recomendaciones del capítulo referente al manejo de animales en proyectos de investigación y ciencia, así como la norma oficial mexicana para animales de laboratorio (Aluja, 2002).

5.2. Variables

- a) Independientes: condición nutricional
- b) Dependientes. Peso corporal y cerebral, diámetro cerebral transverso y rostro-caudal, número de neuronas inmunorreactivas a 5-HT en los núcleos rostrales y caudales

5.3. Diseño y descripción general del estudio

Se utilizaron 20 hembras nulíparas de la cepa Wistar de 60 días de edad con pesos promedio de 250 g \pm 20 g, adaptadas a condiciones controladas de luz y oscuridad



de 12 h, temperatura ($22^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$) y humedad ambiental relativa (45-55%), por 2 semanas. seis semanas antes del apareamiento, las ratas tuvieron libre acceso a una dieta seleccionada (*ad libitum*), en tres grupos como se menciona arriba: 1) grupo control (**Con**), 2) grupo con dieta hipoproteica (**Hipo**) y 3) dieta a base de maíz (**maíz**). Después se aparearon con machos normales durante las fases estro y proestro del ciclo. Al nacimiento las crías, se ajustaron a 8 machos en cada grupo de estudio; posterior a esto, las madres continuaron recibiendo los tres tipos de dieta "ad libitum", durante la lactancia y lo siguieron las crías después del destete(21DP) y hasta el sacrificio (Del Angel A. y col. 1989;2001). Los estudios morfométricos y neurobiológicos se hicieron en las crías de cada uno de los grupos en los días 1, 7, 14, 21, 30, y 60 días posnatales.

Los parámetros morfométricos evaluados fueron los siguientes:

- **Peso corporal de las madres**
- **Cantidad de alimento ingerido por las madres**
- **Peso corporal de las crías**
- **Peso cerebral**
- **Diámetro cerebral transverso**
- **Diámetro cerebral rostro-caudal**
- **Número de células inmunorreactivas a 5-HT para cada uno de los núcleos que compone el sistema del rafe.**
- **Número de células inmunorreactivas a 5-HT en todo el sistema rafe**

MODELO EXPERIMENTAL

Ratas hembras de la cepa Wistar
(nulliparas de 200-250 g)

↓
Periodo de Adaptación
(2 semanas)

↙ ↘
Grupo Con Grupo Hipo Grupo de Maíz

↓
ALIMENTACIÓN "ad libitum"
(6 semanas)

↓
APAREAMIENTO
(Con machos normales, 300-350g)

↓
AL NACIMIENTO
ESTANDARIZACIÓN DE LOS GRUPOS

↙ ↘ ↘
Con (8 crías) Hipo (8 crías) Maíz (8 crías)

↓
LACTANCIA

↓
DESTETE

Alimentación con dieta
23 % de proteína

Alimentación con
dieta de 8% proteína

Alimentación con
dieta de maíz

↓
1 día de edad
7, 14 días de edad
21 días de edad
30 y 60 días de edad

5.4. Procedimientos

5.4.1. Dietas

COMPONENTES) (g/ 100 g de dieta)	Con (23 % de proteína)	Hipo (8% de proteína)	Maíz (Maíz)
Harina de maíz	-	-	86.0
Purina chow	98.0	34.04	-
Glucosa		19.0	
Sacarosa	-	20.1	-
Dextrosa	-	19.0	
Aceite vegetal	2.0	3.13	2.0
Mezcla de Vitaminas *		1.0	1.0
Mezcla de minerales R-H*	-	1.0	2.1
Fibra no nutritiva		9.0	8.9
% de proteína	23.0	8.0	8.0
L-Trp	0.39	0.30	0.15
Kcal/100 gr.	350.0	350.46	346.5

* Tecklad (cat. No. 170760: 40060 y 160390 respectivamente).

5.4.2. Obtención del tejido

Se anestesiaron las ratas con fentobarbital (30mg/Kg) y se perfundieron vía del ventrículo izquierdo, con una solución de amortiguador de fosfatos (PBS), 0.1 M, pH 7.4 por 15 minutos (30ml/min), después se colocaron en el fijador paraformaldehído(Sigma) al 4% en amortiguador de fosfatos (0.1 M, pH 7.4, Sigma), se obtuvo el cerebro por craneotomía y se dejó 48 horas en el fijador a 4° C.

Después se obtuvo el tallo cerebral (dependiendo del tamaño del cerebro) se obtuvieron rebanadas de tejido de 50 µm de espesor mediante un vibratomo (Leica), los cuales se colocaron en cajas de cultivo con amortiguador de fosfatos frío por lo menos 2 semanas a 4° C (mínimo).

5.4.3. Método de tinción Inmunocitoquímica

Las rebanadas de tejido se colocaron en amortiguador de fosfatos 0.1 M, pH 7.4- y Tritón X-100, al 0.1 % (PBS-tritón)(Sigma) por media hora. Después se inhibió la peroxidasa endógena con una solución con 98 ml de metanol-1 ml peróxido de hidrógeno- 1ml de fenilhidrazina durante 5 minutos, la reacción se lavó abundantemente con PBS-tritón, se incubó con suero normal de bovino por 2 horas, se escurrió el exceso y se colocó el anticuerpo primario anti- triptófano hidroxilasa (Sigma) diluido en PBS- SNH (1%)- Tritón (0.1 %) en una dilución 1: 2,500, en cámaras de cultivo de 1ml. Después de 48 horas de agitación continua a razón de 25 rpm. Se lavó con PBS-tritón tres veces por diez. Se incubó con el 2o. anticuerpo biotinilado (Vector,Labs)con una dilución 1:200 durante 2 horas (dilución en PBS-tritón). Se lavó con PBS-tritón tres veces por diez minutos, se incubó por una hora en el complejo avidina-biotina- peroxidasa. Se lavó tres veces por diez minutos con un amortiguador Tris-HCl, 0.05 M y pH 7.4, se reveló con 3'-3'- diaminobenzidina (Sigma) por 10 minutos, (5 mg en 10 ml de amortiguador Tris, 0.05 M, pH 7.4 y 30 µl

de H₂O₂). La reacción fue amplificada con sulfato de níquel; se lavó primero con agua destilada y luego con Tris-HCl. Los cortes fueron colocados en laminillas con adhesivo; se deshidrataron con alcoholes de grados crecientes y clarificados con xilol; finalmente se montaron con resina sintética, Entellan (Merck).

5.4.5. Análisis cuantitativo

Los cortes de todo el tallo cerebral fueron colocados y dispuestos en serie. El número de cuerpos neuronales inmunorreactivos a 5-HT (5-HTir) en las diferentes regiones anatómicas fue determinado por conteo en un microscopio de luz, equipado con un sistema de análisis de imágenes (Image Data Base de Leica). Los núcleos del rafe fueron identificados de acuerdo al atlas estereotáxico de Paxinos (1998). El número de neuronas fue cuantificado a través del método fraccionario (West, 1993), el cual involucra el conteo neuronas en disectores ópticos de una muestra sistemáticamente uniforme que constituye una fracción del volumen de la región que es analizada (Fig. 3). El método fraccionario se realizó en cortes de 50 µm los cuales se montaron en serie de 5 por laminilla. Se calculó el número de cortes de acuerdo a la longitud de los núcleos en el tallo cerebral (Fig.3D). Solo uno de los cortes de cada serie se analizó y fueron 10 series en total. La fracción de muestreo (*ssf*) es entonces 1/10. Se tomó una fracción de volumen de cada núcleo $ssf = \text{área (cuadro)} / \text{área (x,y)}$, que corresponde al área de conteo 0.02mm X 0.002 mm este es un corte óptico obtenido a través del monitor de la computadora. La altura del disector, *h*, es relativo al espesor del corte, *t*, h/t . El número de neuronas inmunorreactivas a 5-HT se calculó de acuerdo a la siguiente fórmula: $N = \sum Q \cdot t/h \cdot 1/ssf \cdot 10 \cdot ssf$. *Q*- es el número de células 5-HTir en una fracción de volumen conocido de cada núcleo en el tallo cerebral. Note que el volumen de toda la región nunca fue estimada. Se utilizó la misma fracción de volumen para cada edad y cada grupo de estudio para hacer uniforme el conteo. Los valores son expresados como el número de células 5-HTir.

5.5. Análisis estadístico

Se realizó una base de datos, con cuadros de salida de los resultados en los que se registraron las edades y cada una de las mediciones efectuadas en los diferentes grupos experimentales. En los cuadros de salida se anotaron los promedios con sus desviaciones estándar. Los resultados de cada grupo se analizaron en dos direcciones, la primera fue la edad y la otra fue la condición nutricia de las crías, mediante análisis de varianza de dos vías (ANOVA) para el número total de células, y de una vía para el número de células en cada núcleo, se aceptó un valor de significancia estadística de $p < 0.05$.

La comparación entre grupos de la misma edad y en cada núcleo se realizó mediante una prueba pos prueba de comparaciones múltiples de Bonferroni's. Los datos fueron procesados con un programa estadístico Sigma Stat (Jandel scientific, USA).

6.-RESULTADOS

6.1 *Parámetro somatométricos*

6.1.1. *Peso corporal de las madres.*

En relación al peso corporal de las madres en los tres grupos experimentales no mostró una diferencia significativa (Fig.4), esto nos indica que la desnutrición en las madres con la dieta de maíz y el grupo hipoproteico no es severa. Además cabe señalar que esto fue en la fase de adaptación a la dieta. Del mismo modo se observa que las madres de los tres grupos experimentales ingieren la misma cantidad de alimento en cada una de las dietas (Fig. 4A).

6.1.2. *Peso corporal y cerebral de las crías*

Los resultados indican que los animales del grupo de **Maíz e Hipo** muestran una disminución significativa del peso corporal y después del destete es estadísticamente significativa en relación a los controles ($p < 0.01$) (Fig. 5). La ganancia de peso cerebral en el grupo de los animales alimentados con dieta de maíz y proteína, muestra una reducción significativa después de los 7 días de edad y se hace más notoria a los 60 días de edad en relación al control y al grupo alimentado con una dieta baja en proteína (**Hipo**) (Fig. 5). El diámetro cerebral rostro-caudal en el grupo de maíz, mostró una reducción significativa ($p < 0.05$) a los 30 y 60 días de edad en comparación con el grupo control. El diámetro transversal en el grupo de maíz se redujo significativamente ($p < 0.05$) después de los 21 días de edad postnatal (Fig.6) cuando se compara con el control y cuando se compara con el grupo hipoproteico ($p < 0.05$).

6.2. Análisis cuantitativo de las células inmunorreactivas a 5-HT

Es difícil especificar la localización anatómica de las neuronas 5-HT, por esta razón los grupos de células 5-HT en el tallo cerebral han sido clasificadas numéricamente en 9 grupos celulares, el grupo B1 se encuentra en la médula oblonga y el grupo B9 se encuentra en el cerebro medio (Tork., 1990). Los grupos celulares B1, B2/B4 y B3 se localizan en la región caudal, y los grupos B5/8, B6/7 y B9 se ubican en la región rostral.

Grupo Caudal o Inferior B1,B2/B4 y B3

Las neuronas 5-HTir en el rafe pallidus (B1) son las neuronas que se encuentran localizadas más ventralmente, este núcleo se extiende desde el nervio craneal XII al polo rostral de la oliva inferior. Lo componen células de gran tamaño mayor de 20 μm de diámetro, multipolares con fibras que se incrementan en su calibre a los 60 días de edad (Fig. 8D). El núcleo representa más del 17 % del total de células de los núcleos del rafe. Este núcleo se afecta menos en cuanto a su densidad celular en el grupo de maíz en comparación con los otros dos grupos. Su pico máximo de expresión es a los 7 días. Sin embargo, no hubo diferencias significativas entre los tres grupos y solo a los 60 días de edad el grupo de maíz presenta una disminución significativa ($p < 0.05$) comparada con el grupo control (Fig. 10A).

Las células en el núcleo rafe obscurus (B2), se encuentran agrupadas a lo largo de la línea media, se extienden rostrocaudalmente a través de la médula oblonga y el puente en 2 grupos paralelos; son células de tamaño mediano (15-20 μm), las cuales están orientadas perpendicularmente a la línea media. Las dendritas de muchas células de este núcleo se localizan en la línea media, tienen una orientación dorsoventral. En este núcleo el grupo de maíz mostró un patrón de expresión de 5-HTir diferente al grupo control y al grupo Hipo. Se observó que el número de células 5-HTir en el grupo de maíz a los 1,7,15,21 de edad postnatal fue significativamente menor comparada con el grupo control ($p < 0.05$) y al grupo Hipo a los 7 días de edad

($p < 0.05$) al grupo Hipo. Del mismo, modo se observó que el número de células 5-HTir a los 30 y 60 días de edad es menor en el grupo de maíz pero no hubo diferencias significativas con los otros dos grupos (Fig. 10B).

Las células del rafe magnus (**B3**) comprenden un conjunto de neuronas extendidas de una manera dispersa que las del palidus y obscurus. La mayoría de las neuronas son las que más se extienden del borde caudal del puente a la médula espinal. En la médula espinal las células se encuentran dispersas en el área central de la sustancia gris justo en la parte ventral del canal central de la médula espinal y en el borde medial de la asta ventral. Las células de este núcleo son de tamaño mediano y las más anteriores se extienden hacia la parte dorsal del rafe magnus (Fig. 7A y B). En este núcleo, el pico máximo de expresión de células 5-HTir, se observó a los 7 días de edad postnatal en los tres grupos de estudio no se observaron diferencias significativas en las edades de estudio, excepto en el grupo de maíz, que mostró una reducción significativa ($p < 0.05$) a los 60 días de edad en comparación con el grupo control (Fig. 11A).

Grupo Rostral o Superior B6/B7, B5/B8 y B9

Los grupos de células que se localizan en la región rostral difieren notablemente en tamaño y densidad de las que se localizan en la zona caudal.

El núcleo rafe dorsal (**B6 y B7**) representa el núcleo con la mayor densidad de células 5-HTir, contribuye con más del 35% del total de células de los núcleos del rafe, la mayoría de las células son redondas y ovals, miden entre 12-16 μ m, con fibras delgadas (Fig. 7C y 9D). Este grupo de células tiene una extensión caudal desde el puente hasta el cerebro medio. La mayor población de células 5-HTir se observó entre el día 14-21 de edad postnatal (Fig.11B), posteriormente el grupo control presentó disminución de la densidad celular a los 60 días de edad. En el grupo hipo se observó

una disminución significativa en el número de células 5-HT en comparación con el grupo control en las edades de 14 y 21 días de edad postnatal ($p < 0.05$) y el grupo de maíz también mostró un menor número de células 5-HTir en todas las edades estudiadas, excepto a uno y 7 días de edad en comparación con el grupo control y a los 14 y 30 días de edad postnatal en comparación con el grupo Hipo ($p < 0.05$) (Fig. 11).

Los núcleos del rafe mediano (central superior), intermedio y pontis, son núcleos que presentan también una gran población de células 5-HTir y contribuyen con un gran porcentaje a la densidad total de células 5-HTir a los núcleos del rafe. El núcleo rafe mediano se localiza entre el puente rostral y la zona caudal de la línea media (Fig. 7B). El mayor número de células 5-HTir fue a los 21 días de edad en los tres grupos experimentales. El grupo de maíz presentó una reducción significativa en el número de células 5-HTir a los 14, 21 y 60 días de edad postnatal, si se compara con el grupo control ($p < 0.05$) y a los 14 días de edad en comparación con el grupo Hipo ($p < 0.05$) (Fig. 12 A).

En el núcleo linearis intermedius no se observaron diferencias significativas entre los tres grupos a las edades estudiadas (Fig. 12). Sin embargo, se observó que el pico máximo de expresión 5-HTir en el grupo de maíz fue a los 7 días de edad y en el grupo **Con** e **Hipo** es a los 14 de edad postnatal. El núcleo rafe pontis (Fig. 7 A y B) presentó su pico máximo de densidad de células 5-HTir a los 7 días de edad en los tres grupos de estudio, se observa un mayor número de células 5-HTir en el grupo de maíz en comparación con el control ($p < 0.05$) (Fig. 13A). Sin embargo, no hubo diferencias significativas entre los tres grupos en la etapas adulta (60 días de edad postnatal) (Fig. 13A).

Las neuronas en el núcleo **B9** se encuentran asociadas con el núcleo del lemnisco medial, algunas células están localizadas alrededor del núcleo rafe pontis y en la formación reticular mesencefálica. Estas neuronas se observan ovoides (Fig. 7C) y a

veces aplanadas de tamaño mediano (15-20 μ m), en este núcleo se localizan numerosas terminales y una gran densidad de fibras delgadas. En los tres grupos del estudio el pico máximo de expresión en células 5-HTir fue al nacimiento; posterior a eso hay una reducción leve en el grupo control a las siguientes edades de estudio. En los dos grupos experimentales se observó una reducción significativa, en comparación con el control ($p < 0.05$) y en menor proporción el grupo de maíz en relación al grupo Hipo ($p < 0.05$)(Fig. 13 B).

Cuando se realizó la cuantificación total de las células 5-HTir se observó que los tres grupos tuvieron un patrón de desarrollo similar, la mayor expresión de células 5-HT se presentó a los 14 días de edad, después disminuyó a los 60 días de edad, a esta edad las células 5-HTir alcanzan su tamaño real y las fibras tienen un mayor calibre. Sin embargo, el grupo **Hipo** presentó una menor densidad celular a los 14, 21 y a los 60 días de edad postnatal en relación al grupo control ($p < 0.005$). El grupo de maíz mostró una reducción significativa del número de células en todas las edades de estudiadas en comparación con el grupo **Con** ($p < 0.05$) y a los 14 días de edad en relación con el grupo **Hipo** ($p < 0.05$)(Fig.14).

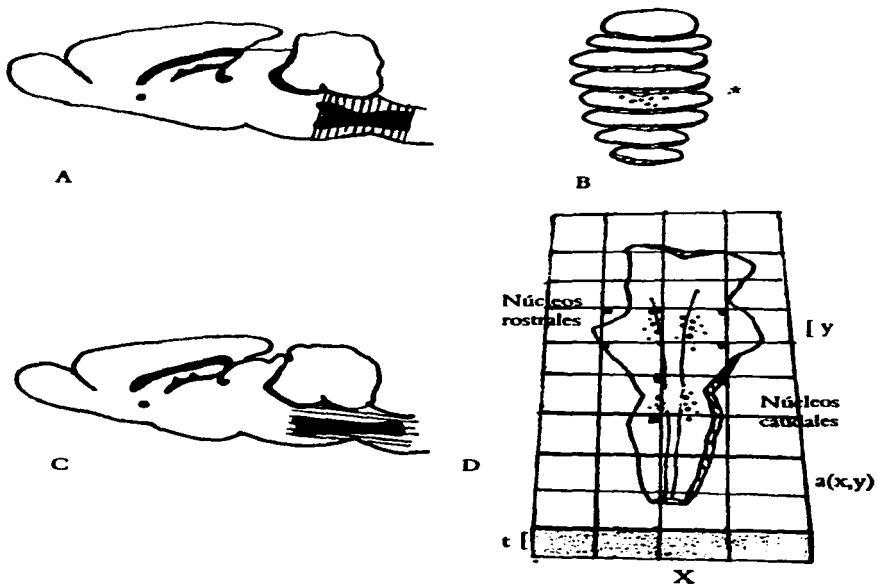


FIGURA 3.- El tallo cerebral se cortó en dos planos: uno coronal para el conteo de neuronas inmunorreactivas a 5-HT (A y B) y el otro en plano sagital (C) para delimitar los límites neuroanatómicos de cada núcleo (D).

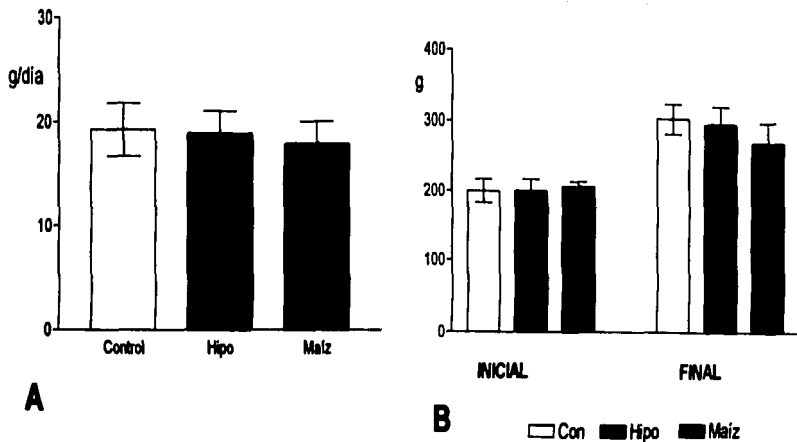


FIGURA 4. A) Cantidad de alimento ingerido por las ratas madre en el transcurso del estudio y B) peso corporal al inicio y al final del estudio. Los valores corresponden a los valores promedio \pm desviación estándar. No se observan diferencias significativas entre los tres grupos experimentales después de ANOVA de una vía.

30

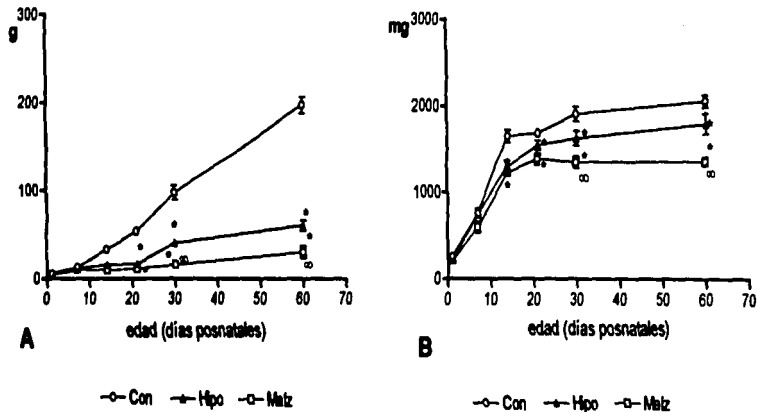


FIGURA 5. - Datos somatométricos de las crías. **A)** peso corporal; **B)** peso cerebral. Los valores corresponden a los valores promedio \pm desviación estándar. $n = 7$; * $p < 0.05$ en comparación con el grupo control y $\infty p < 0.05$ en comparación con el grupo hipoproteico, después de ANOVA de una vía y una posprueba de Bonferroni.

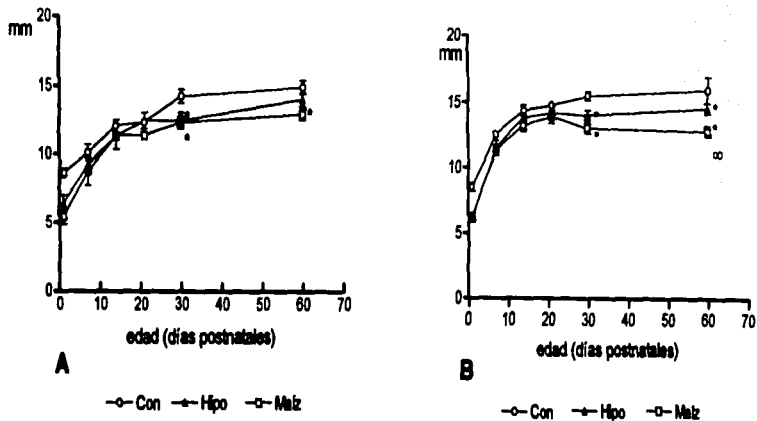


FIGURA 6.- Datos somatométricos de las crías. A) diámetro cerebral rostro-caudal; B) diámetro cerebral transverso. Los valores corresponden a los valores promedios \pm desviación estándar, $n=7$, * $p < 0.05$ en comparación con el grupo control y $\infty p < 0.05$ en comparación con el grupo hipoproteico, después ANOVA de una vía y una posprueba de Bonferroni.



FIGURA 7.- Fotomicrografías de cortes coronales del tallo cerebral a nivel del sistema del rafe. NRM= núcleo rafe magnus; NRP = núcleo rafe pontis; NRMn= núcleo rafe mediano (centralis superior); NRCL= núcleo caudado lineal; NRD= núcleo rafe dorsal y B9 = núcleo asociado al lemnisco medial. Barra de calibración = 100 μ m.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

32

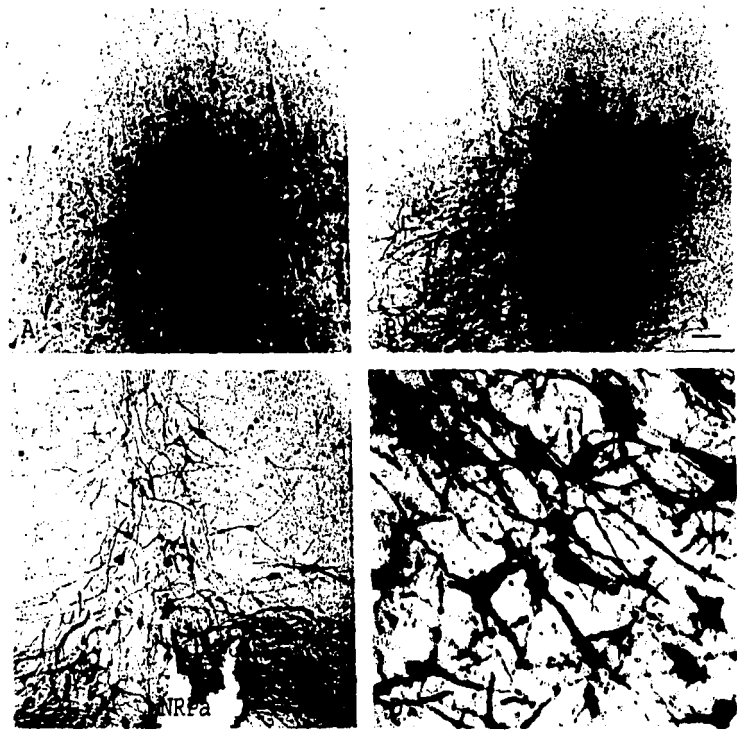


FIGURA 0.- Fotomicrografías de cortes coronales a nivel de un núcleo caudal del sistema del rafe en el grupo de maíz donde se muestran neuronas 5-HT_{1r}. A) ratas de un día de edad; B) ratas de 14 días de edad y C) ratas de 60 días de edad. NRPa= núcleo rafe palidus. D) Fotomicrografías a mayor aumento de B. Barra de calibración en A, B y C = 100 μ m; D=20 μ m.

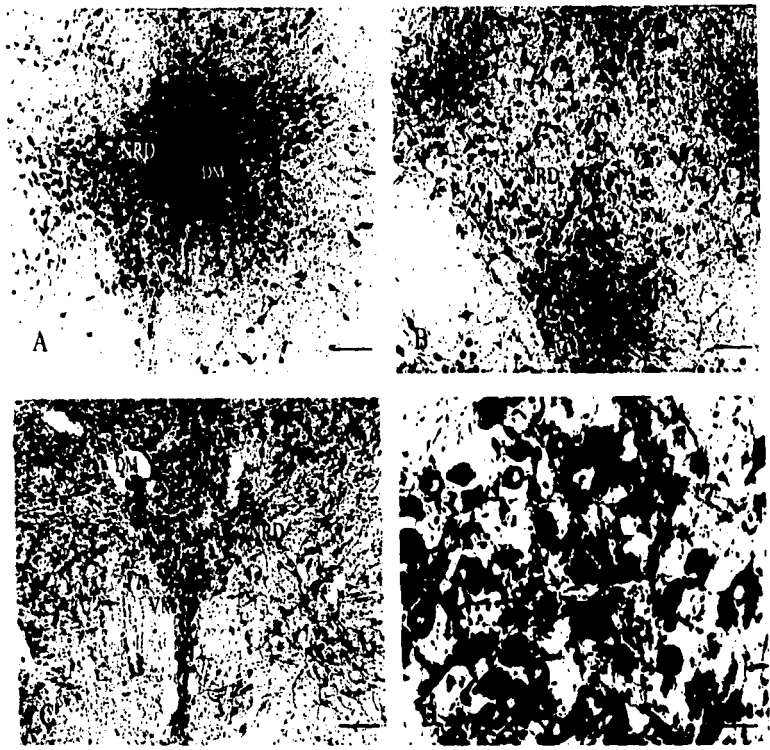


FIGURA 9.- Fotomicrografías de cortes coronales a nivel del rafe dorsal en el grupo de maíz, donde se muestran neuronas 5-HTir. A) ratas de un día de edad; B) ratas de 14 días de edad y C) ratas de 60 días de edad. NRD= núcleo rafe dorsal, DM= dorsomedial, VM= ventromedial. D) fotomicrografía a mayor aumento de B. Barra de calibración en A y C= 100 μ .m; B= 60 μ .m y D= 20 μ .m.

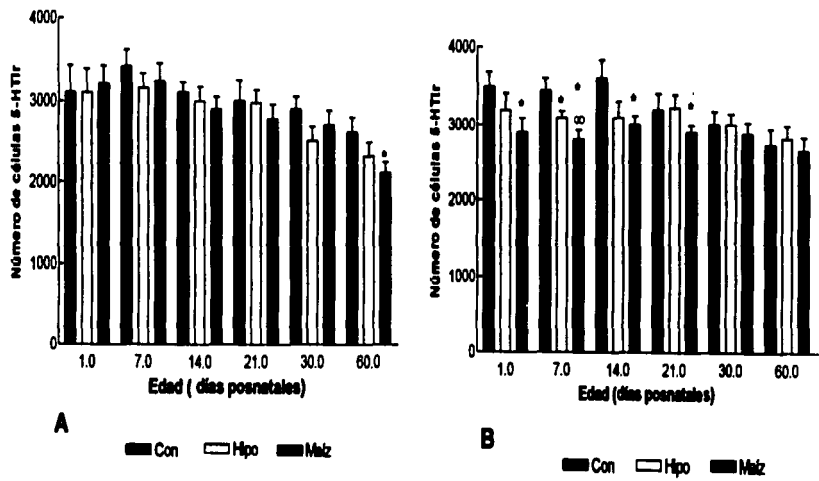


FIGURA 10. Número de células inmunorreactivas a 5-HT. **A)** núcleo rafe pallidus; **B)** núcleo rafe obscurus. Los valores corresponden a las medias \pm desviación estándar. $n = 7$, * $p < 0.05$ en comparación con el grupo control y $\infty p < 0.05$ en comparación con el grupo hipoproteico, después de ANOVA de una vía y una posprueba de Bonferroni's.

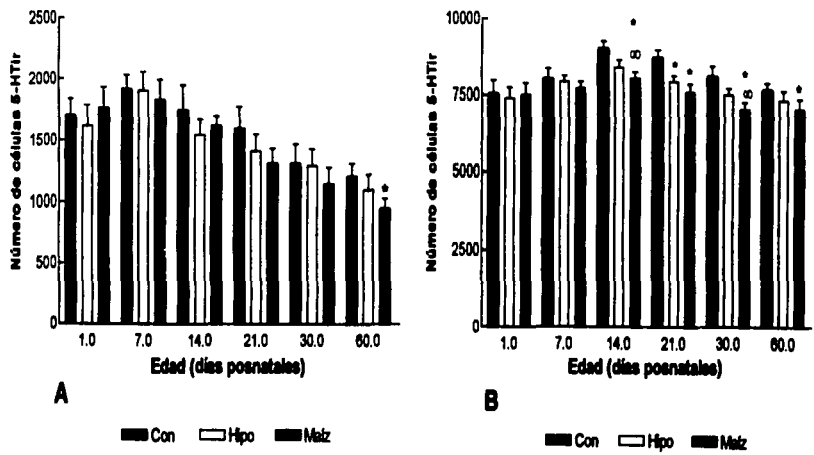


FIGURA 11. Número de células inmunorreactivas a 5-HT. A) núcleo rafe magnus; B) núcleo rafe dorsal. Los valores corresponden a las medias \pm desviación estándar. $n=7$, * $p < 0.05$, en comparación con grupo control y $\infty p < 0.05$ en comparación con el grupo hipoproteico, después de ANOVA de una vía y una posprueba de Bonferroni's

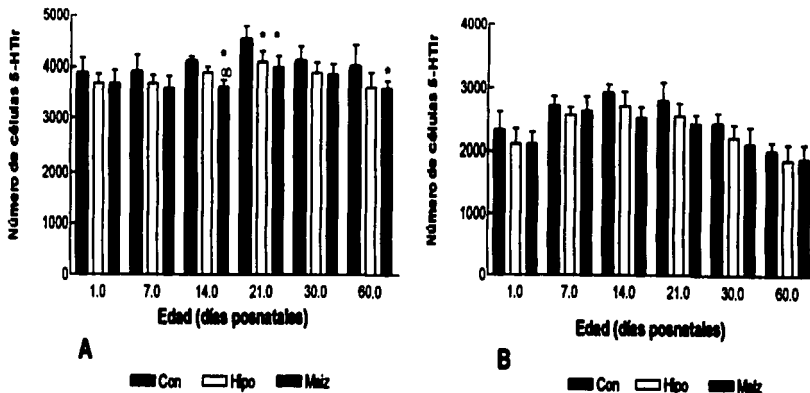


FIGURA 12. Número de células inmunorreactivas a 5-HT. A) núcleo rafe central superior; B) núcleo rafe linearis intermedios. Los valores corresponden a las medias \pm desviación estándar, $n=7$, * $p < 0.05$ en comparación con el grupo control y $\infty p < 0.05$ en comparación con el grupo hipoproteico, después de ANOVA de una vía y una posprueba de Bonferroni's.

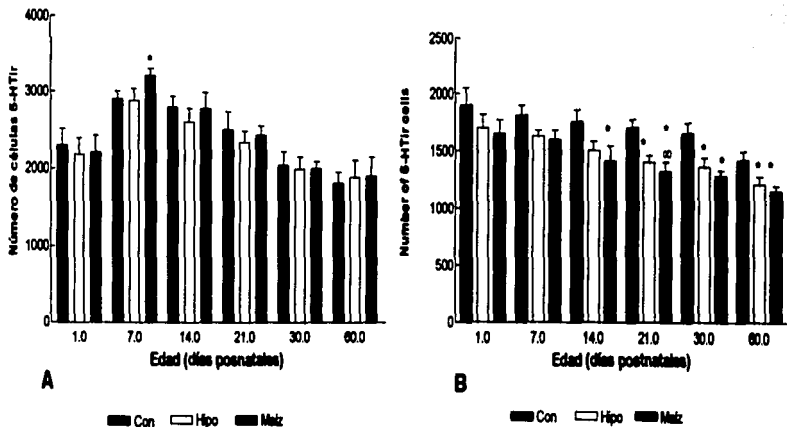


FIGURA 13. Número de células inmunorreactivas a 5-HT. **A)** núcleo rafe pontis ; **B)** núcleo asociado al lemnisco medial. Los valores corresponden a las medias \pm desviación estándar. $n=7$, * $p < 0.05$, en comparación con grupo control y $\infty p < 0.05$ en comparación con el grupo hipoproteico, después de ANOVA de una vía y una posprueba de Bonferroni's.

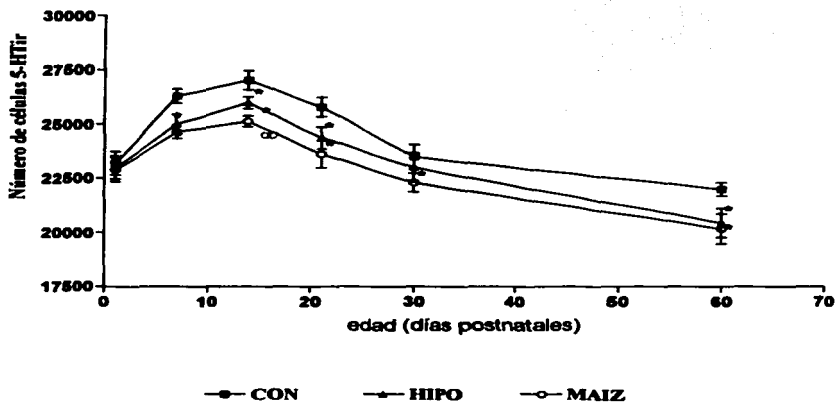


FIGURA 14.- Número de células inmunorreactivas a 5-HT en los núcleos del rafe, los valores corresponden a los valores promedio \pm desviación estándar. $n=7$, * $p < 0.05$ en comparación con el grupo control y $\alpha < 0.05$ en comparación con el grupo hipoproteico, después de ANOVA de dos vías y una posprueba de Bonferroni's.

7.-DISCUSIÓN

7.1. Parámetros somatométricos

La cuantificación de diversos parámetros físicos que en conjunto se denominan "medidas antropométricas" ha sido de gran utilidad en la evaluación del estado nutricional del organismo y se considera una forma rápida de evaluar el grado de desnutrición. Aunque, estos parámetros sólo indican el estado físico y no permite evaluar aspectos funcionales importantes. Así, el progreso del desarrollo prenatal puede ser seguido por los parámetros gruesos como el peso corporal, tamaño del cerebro y el peso cerebral (Zamenhof y Van Marthens, 1978). Los resultado de estos parámetros en las ratas madre indican que las dietas con restricción de proteína y además deficiente en el aminoácido L-Trp (maíz), no produce una disminución en la ingestión del alimento (Fig. 4A), lo que se ve reflejado en el peso corporal de las madres, no hubo diferencias significativas en la ganancia de peso entre los tres grupos experimentales, lo que nos indica que las ratas madre no se desnutrieron severamente (Fig. 4B).

Los resultados en las crías muestran que tanto el peso como corporal, cerebral y el tamaño del cerebro, son parámetros que se modifican significativamente durante el desarrollo bajo diferentes tipos de alimentación, lo que permite evaluar de una forma más completa el grado de variación de esos parámetros físicos y proporciona un criterio adicional para conocer el desarrollo físico de ratas alimentadas con estos tres tipos de dieta. El hecho de que las madres no sufrieran una "desnutrición" severa, se reflejó en el peso de las crías que al nacimiento y hasta los 7 días no mostraran diferencias entre los tres grupos experimentales (Fig. 5A). Sin embargo, la ganancia de peso se ve drásticamente reducida después del destete, cuando las crías empiezan alimentarse con cada una de las dietas. El que se mantuviera el peso hasta al destete nos puede indicar, que probablemente existen mecanismos compensatorios en la madre para proveer al feto todos los nutrimentos necesarios para su desarrollo

(Zamenhof, 1985), los cuales son soportados hasta la lactancia, por lo que la ganancia de peso disminuyó después del destete, en los grupos con restricción de proteína y muy severamente en el grupo de maíz, muy probablemente, estas dietas no produjo cambios conductuales en la ingestión de alimento en las crías.

El examen de las diferentes medidas cerebrales confirma los datos de trabajos realizados con anterioridad, en los cuales se han utilizado diversos modelos de desnutrición. El peso cerebral disminuye en menor proporción con la restricción de L-Trp y proteína (Maíz) en relación con la disminución del peso corporal; esto nos indica que el cerebro es una de las estructuras que más se protege, por lo tanto las medidas cerebrales se afectaron menos en relación con el grupo control (Fig 6 A y B). Los mecanismos compensatorios de la madre y del feto, también protegen al cerebro de la desnutrición. Bedi y Bhide, (1988), señalan que bajo restricción de nutrimentos el cerebro desencadena mecanismos plásticos para desarrollarse sin afectar mucha de sus funciones.

7.2. Efecto de la dieta sobre la expresión posnatal de células 5-HT_{1r}

En los tres grupos experimentales, se observó que número de células 5-HT_{1r} se incrementa entre el día 14 y 21 día de edad posnatal, con una progresiva reducción a las dos siguientes semanas (Fig.14). Estos estudios concuerdan con los hechos por Lívó y Molliver (1982) que muestran que hay un rápido incremento en las terminales serotoninérgicas en las 3 primeras semanas después del nacimiento en la rata. De igual forma, estudios bioquímicos en ratas, revelan que los niveles de 5-HT se incrementan rápidamente en las primeras semanas después del nacimiento (Huether y Lajtha, 1991; Buznikov y col., 1999). Estos datos concuerdan con los reportados por Rind y col., (2001), que muestran un incremento en la expresión de la enzima triptofano-5-hidroxilasa en la tercera semana postnatal y una reducción a los 60 días de edad.

Esto sugiere que el sistema serotoninérgico en el tallo cerebral tiene 2 diferentes fases de desarrollo postnatal; a) una abundante expresión en las dos primeras semanas en correlación con el desarrollo integral de esta área y con la regulación de su propio desarrollo, así como también, con regulación de las áreas que reciben inervación 5-HT particularmente la corteza cerebral (Hohmann y col., 1988; Molliver, 1987; Voight y de Lima., 1991; Lauder, 1988) y el hipocampo que recibe inervación del rafe dorsal y mediano (Gould, 1999). b) Cuando han madurado las áreas blanco la expresión de 5-HT. se ve ligeramente reducida en el tallo cerebral. Por lo que se observa una disminución en el número de células 5-HTir hacia el final de la 8a. semana postnatal (Fig.14).

En el grupo de **maíz** y en el grupo **hipo** se observa que el patrón de desarrollo numérico de 5-HTir es semejante al grupo control, sin embargo, el número de células 5-HTir es menor que en el grupo control, principalmente en los núcleos rostrales (dorsal, central superior y el núcleo asociado al lemnisco medial), esta disminución es más significativa en el grupo de maíz. En los núcleos del rafe caudales el número de células 5-HTir se ve poco afectado por efecto de la dieta (Fig. 10 A y B, Fig. 11A). Esto nos provee evidencia de que el desarrollo de las células serotoninérgicas bajo condiciones de restricción de Trp produce diferente respuesta en el grupo rostral y en el caudal.

El grupo caudal y rostral se desarrollan en diferentes tiempos (Rubenstein, 1998), quizás, en el grupo caudal, se observó que después de la segunda semana postnatal las células 5-HTir adquieren progresivamente sus características morfológicas de maduración y muestran marcados cambios en el número de células 5-HTir hasta el final de la cuarta semana postnatal cuando el patrón de densidad es similar a la que se ve en el adulto (Fig. 8B y D). Sin embargo, los componentes rostrales muestran marcados cambios en el número de células después de la tercera semana postnatal, esto parece indicar que pueden ser más susceptibles a la restricción de proteína y L-Trp, y afecta la proliferación celular, dado que estas células utilizan este neurotransmisor para regular su desarrollo en el tallo cerebral, (Lauder y Krebs.,

1976;1978; Lauder, 1988; 1993). Esto se reflejó en una disminución en la densidad de células 5-HTir, principalmente en el núcleo rafe dorsal (Fig. 11 B), núcleo rafe central superior (Fig. 12A) y en el núcleo asociado al lemnisco medial (Fig. 13 B), muy importante a los 60 días de edad en el grupo de maíz y en menor proporción el grupo hipo.

Estos resultados, concuerda con los resultados obtenidos en nuestro laboratorio con este modelo de desnutrición, en el cual se observa una reducción del contenido de DNA, RNA y proteína a partir de los 21 hasta los 60 días posparto (datos no mostrados) principalmente en el tallo cerebra. La disminución del número de células en lo núcleos del rafe, podría también explicar la reducción en el contenido de 5-HT y de 5-HIAA en el tallo cerebral con este modelo (Beas-Zárate y col., 1988).

Las consecuencias de una disminución del número de células en el núcleo rafe dorsal y central superior puede implicar una menor disponibilidad de 5-HT a estructuras blanco como es el hipocampo que recibe aferencias de estos dos núcleos, esto afecta la propia función hipocampal. Algunos estudios hechos por (Blatt y col., 1994) han mostrado que en los animales con restricción de proteína (6%), disminuyen las fibras 5-HT que inervan la formación hipocampal, además, se observa un persistente incremento en los niveles basales de liberación de 5-HT en el rafe e hipocampo. Estas fibras serotoninérgicas que ascienden del rafe dorsal y mediano terminan principalmente en varias clases de interneuronas GABAérgicas en regiones selectivas del hipocampo. Así, Del Angel-Meza y col., (2002), encontró con el modelo de maíz un incremento en la actividad de GAD y en la liberación de GABA en la corteza cerebral e hipocampo y como consecuencia un incremento en la inhibición. El incremento en la inhibición se ve en términos de deficiencias en la inducción y mantenimiento de la potenciación de largo tiempo, que se traduce en deficiencias en el aprendizaje por consiguiente una limitación en la plasticidad hipocampal. Por acción directa sobre la misma formación hipocampal (particularmente sobre las interneuronas GABAérgicas) o indirectamente se afectan las entradas subcorticales en la formación hipocampal

(Austin y col., 1989; 1992; Tonkiss y col., 1993; Morgane y col., 2002; Del Angel-Meza y col., 2002).

Se sabe, que el hipocampo juega un papel importante en la organización de procesos cognitivos como es la memoria espacial a través del establecimiento de mapas cognitivos relacionados con señales visual-espaciales de su entorno (Jarrad, 1993). Además, el hipocampo también, participa en la conducta exploratoria que es una de las habilidades de las ratas para adaptarse a un nuevo ambiente. Los animales alimentados con dieta de maíz muestran deficiencias en este tipo aprendizaje. Se nota un deterioro progresivo de esta capacidad, caracterizado por la carencia de una estrategia espacial definida, inhabilidad para reducir la distancia que recorren durante la prueba y también una remarcable irregularidad en el aprendizaje de las curvas del laberinto "T" (González-Burgos y col., 1995; Olvera-Cortés y col., 1998). Del mismo modo, Freund y col., (1990) y vanLuijtelar y col., (1991), reportaron que la reducción de las fibras 5-HT provenientes del rafe dorsal al hipocampo produce cambios en el estado afectivo y un inadecuado aprendizaje espacial.

A nivel del hipocampo se efectúa el control de otros estados afectivos, donde la 5-HT modula los circuitos locales inhibitorios en una fase estado-dependiente a través de un sistema de retroalimentación por conexiones aferentes y eferentes entre el núcleo rafe dorsal al hipotálamo. El hipotálamo tiene un papel integrativo de muchas funciones fisiológicas único en el cerebro de los mamíferos (Simerly, 1981). De tal modo que la 5-HT influye innegablemente sobre varios aspectos de la conducta alimentaria. Una variedad de estudios en ratas indican que alteraciones en los niveles de 5-HT, produce cambios en la ingestión y selección de los alimentos. La disminución de 5-HT puede alterar también el substrato fisiológico de iniciación de la ingestión (la señal de "hambre"), el substrato fisiológico de terminación de la comida (la señal de "saciedad") y el mecanismo que regula la opción de selección de macronutrientes, la percepción sensorial del alimento, el componente motor de ingestión de la comida, y así sucesivamente. Todo esto en conjunto se ve reflejado en desordenes en el peso. (Leibowitz y Alexander, 1998). Sin embargo, hay que tomar en cuenta otros

parámetros que influyen sobre esta conducta, por ejemplo el ayuno prolongado, el stress y el hambre cambian los niveles de ácidos grasos en el suero y por consiguiente los niveles de unión del L-Trp a la albúmina, lo que modifica la recaptura al cerebro, un incremento en los niveles de 5-HT induce cambios en la conducta alimentaria como la selección del alimento, se ha observado que disminuye la ingesta de carbohidratos más que de grasa y proteínas (Leibowitz y Alexander, 1998; Fernstrom, 1991). Las ratas alimentadas con dieta baja en proteína y L-Trp no modifican la conducta alimentaria en la rata madre, consumen la misma cantidad de alimento que el grupo control (Fig. 4A), sin embargo las crías que después del destete empiezan a consumir estos tipo de dieta se observa cierta aversión al alimento (observaciones directas), esto probablemente contribuye a la disminución tan drástica que se observa en la ganancia de peso (Fig. 5 A).

La 5-HT también está fuertemente relacionada con los ciclos sueño vigilia y los ritmos circadianos. El núcleo rafe dorsal y núcleo rafe mediano envía proyecciones al SNC a través del tracto genículo-hipotalámico. Se ha observado que la pérdida de neuronas en alguno de estos núcleos produce cambios en el ciclo circadiano, se incrementa la fase de actividad nocturna y se produce un incremento en la sensibilidad a la luz (Morin, 1999). Del mismo modo, la restricción de proteína (6%) también produce cambios en la actividad motora en el ritmo circadiano (Castañón-Cervantes y Cintra., 2002). Una variedad de estudios farmacológicos han demostrado las implicaciones de la serotonina como un regulador directo de las fases del ritmo circadiano, pero otros estudios sugieren que una simple elevación de la 5-HT en el SNC no modifica las fases del ritmo. El más convincente papel de la 5-HT es su habilidad para modular la sensibilidad a la luz en el ritmo circadiano. Esta modulación es por vía presináptica con la participación de los receptores 5-HT_{1B} en el tracto genículo-hipotalámico, la activación de estos receptores atenúa las entradas fóticas al SNC y reduce la fase de respuesta a la luz (Morin, 1999). Nosotros hemos observado que los grupos de animales alimentados con dieta de maíz muestran mayor hiperactividad durante el día, que los animales del grupo control, además, responden agresivamente a ciertos estímulos, hemos considerado que es importante que se realicen trabajos para

conocer los cambios que produce la disminución del contenido de 5-HT y la disminución de células en los núcleos involucrados en esta función (rafe dorsal y mediano) sobre las diferentes fases del ritmo circadiano.

En relación a la acción trófica de 5-HT, se ha observado que bajo condiciones de restricción de Trp por una disminución de proteína o restricción de L-Trp en la dieta o en condiciones de lesión farmacológica selectiva del núcleo rafe dorsal en ratas (Pérez-Vega y col., 2000), puede darse algunos mecanismos compensatorios para madurar adecuadamente las diferentes estructuras celulares inervadas por 5-HT (Beaudet y Sotelo, 1981); que puede involucrar hipersensibilidad de los receptores 5-HT con el propósito de expandir la neurotransmisión, incrementar la afinidad de recaptura de 5-HT, lo que nos puede indicar también un mecanismo compensatorio de las terminales 5-HT como respuesta a la disminución de 5-HT en el tallo cerebral (Beas-Zarate y col., 1988). De igual forma se han observado cambios plásticos en las células que reciben inervación serotoninérgica en corteza cerebral, hipocampo y cerebelo (Azmitia y col., 1978; Datiche y col., 1995; Freund y col., 1990; Pérez-Vega y col., 2000). Se han observado en trabajos previos con este modelo, ciertas respuestas plásticas en la corteza prefrontal (González-Burgos y col., 1995; 1996; Pérez-Vega, y col., 2000). Los animales alimentados con una dieta con restricción del L-Trp y con lesión farmacológica en los núcleos del rafe, muestran un incremento en la densidad de espinas dendríticas delgadas y espinas gordas en el segmento inicial de las dendritas apicales, así como, un crecimiento anormal en longitud de las dendritas basales y apicales en células piramidales de la corteza frontal. La presencia de espinas gordas en las dendritas cercanas al soma sugiere la incidencia de un mecanismo compensatorio para disminuir la presumible hiperexcitabilidad debido a la falta de espinas, por lo que no se trasmite el impulso sináptico eficientemente. Debido a la localización de estas espinas gordas en áreas de integración de estímulos predominantemente inhibitorios. Esto puede representar un mecanismo modulador posináptico de la excitabilidad neuronal (Feria-Velasco y col., 2002).

Del igual forma, los animales bajo restricción de proteína y L-Trp producen cambios plásticos en las células granulares y de Purkinje en la corteza cerebelosa como un incremento en la longitud de sus dendritas, aunque se observa un retardo en la maduración de la corteza cerebelosa (Del Angel-Meza y col., 2001). De este modo, las células incrementan su área de superficie para establecer mayores contactos sinápticos. La 5-HT en el cerebelo, tiene la función de modular la actividad sináptica excitatoria. Esta actividad serotoninérgica cerebelosa juega un importante papel en la integración de las entradas sensoriales por células granulares y de Purkinje, así como la modulación de la información de salida a través de facilitación presináptica. En este contexto, todo estos resultados nos indica que los bajos niveles de 5-HT inducidos por la dieta de maíz, interfiere con los procesos de proliferación y migración celular lo que lleva a un retardo en la maduración de las áreas blanco. Esto en turno puede disparar algunas respuestas plásticas, para compensar las posibles alteraciones en la actividad cortical ó hipocampal. Es necesario realizar más trabajo del efecto de este tipo de dieta sobre las fibras que inervan principalmente estas áreas y conocer más sobre las respuestas plásticas que realiza el cerebro ante la falta de nutrimentos tan importantes para su buen desarrollo y adecuado funcionamiento.

8.- CONCLUSIONES

El peso corporal, el peso cerebral y en menor proporción las dimensiones cerebrales son parámetros que se modifican significativamente durante el desarrollo con dietas con restricción de proteína y L-Trp (dieta a base de maíz). Esto sugiere que los animales con estas dos tipos de dietas se desnutren, principalmente después del destete.

La restricción de proteína y del L-Trp en la dieta durante el desarrollo del cerebro, afecta en menor proporción el número de células en los núcleos caudales que se diferencian más tardíamente que los núcleos rostrales.

Del mismo modo, la restricción de L-Trp en la dieta cuando la disponibilidad de este aminoácido esencial es reducida durante el desarrollo del SNC produce una disminución en la síntesis de 5-HT y 5-HIAA. Esto parece afectar la proliferación, el crecimiento y los procesos de maduración del sistema rafe, lo que afecta principalmente el número de células 5-HTir en los núcleos rostrales (dorsal, linearis intermedius y el asociado al lemnisco medial).

9.- PERSPECTIVAS

A pesar de que este trabajo es completamente morfológico, nos ha dado información muy valiosa sobre el desarrollo del sistema serotoninérgico en condiciones de restricción proteica y del L-Trp en los núcleos del rafe, lugar se generan las células que poseen la maquinaria sintética para producir el neurotransmisor 5-HT. Sin embargo, es necesario que completemos este trabajo cuantificando el número de fibras serotoninérgicas en áreas blanco tan importantes como: la corteza prefrontal, somatosensorial e hipocampo y dar soporte a todos los trabajos conductuales que se han hecho con este modelo.

Se podría explorar el efecto de esta restricción selectiva de nutrimentos, sobre otros sistemas de neurotransmisión como es el GABAérgico o el colinérgico, dada la función trófica que ejerce el 5-HT para madurar diferentes áreas cerebrales y por la estrecha relación entre estos sistemas en el hipocampo y corteza cerebral.

También, es importante conocer si las alteraciones que se producen en el desarrollo del SNC pueden revertirse con una rehabilitación nutricional adecuada y oportuna, de esta forma se conocerá si los trastornos son permanente o pueden ser revertidos.

10.- REFERENCIAS

- 1 Aghajanian G., Foote W., Sheard H. Lysergic acid diethylamide: sensitive neuronal units in the midbrain raphe. *Science Wash.* 1968; 161, 706-708.
- 2 Aghajanian G. The modulatory role of serotonin at multiple receptors in brain. En: Jacobs BL, Gelperin A., (Eds). *Serotonin neurotransmission and behavior.* Cambridge, MA: MIT Press. 1981, pp. 156-185.
- 3 Aghajanian G. Electrophysiology of serotonin receptor subtypes and signal transduction pathways. En: *Psychopharmacology: The fourth generation progress.* Floyd E., Bloom y Kupfer D. (Eds). Raven Press, Ltd, New York. 1995; 40, pp.451-460.
- 4 Alexander J., Hechtman H., Shepro D. serotonin induced actin polymerization and association with cytoskeletal elements in cultured bovine aortic endothelium. *Biochem Biophys Res Commun.* 1987; 143, 152-158.
- 5 Aluja S. Animales de laboratorio y la norma oficial mexicana (NOM-062-ZOO-1999). *Gaceta Médica de México.* 2002; 138, 294-298
- 6 Austin K., Beiswanger C., Bronzino J., Austin-LAFrance R., Galler J., Morgane P. Prenatal protein malnutrition alters behavioral state modulation of inhibition and facilitation in the dentate gyrus. *Brain Res Bull.* 1992; 28, 245-255.
- 7 Austin K., Bronzino J., Morgane P. Paired-pulse facilitation and inhibition in the dentate gyrus is dependent on behavioral state. *Exp. Brain Res.* 1989; 28, 245-255.
- 8 Azmitia, E.C., Segal, M. An auto radiographic analysis of the differential ascending projections of the dorsal and median raphe nuclei in the rat. *J. Comp Neurol.* 1978; 179, 641-668.
- 9 Azmitia E. The primate serotonergic system: localized application of neurotoxins and fetal neurons. *Adv. Neurol.* 1986; 43; 493-507.
- 10 Azmitia E, Whitaker-Azmitia P. Handbook of experimental pharmacology: Serotonergic neurons and 5-HT receptors in the CNS. En: Baumgarten HG, Gothert M (eds), *Development and Neuroplasticity of Central Serotonergic Neurons*, 1997: pp 1-39.

- 11 Bat-Peled, O., Gross-Isseroff R., Ben-Hur H., Hoskins I., Groner Y., Biegon A. Fetal human brain exhibits a prenatal peak in the density of serotonin 5-HT_{1A} receptors. *Neuroscience Lett.* 1991; 127, 173-176.
- 12 Barnes N., Sharp T. A review of central 5-HT receptors and their function. *Neuropharmacol.* 1999; 38, 1083-1152.
- 13 Baugarten H., Bjorklund G., Lachenmayer L., Novin A., Stenevi U. Long lasting selective depletion of brain serotonin by 5,6-dihydroxytryptamine. *Acta physiol. Scand Suppl.* 1971; 373, 1-16.
- 14 Baugarten H., Klemm H., Sievers J., Schlossberger. Dihydroxytryptamine as tools to study the neurobiology of serotonin. *Brain Res Bull.* 1982; 9, 131-150.
- 15 Beaudet A., Sotelo C. Synaptic remodeling of serotonin axon terminals in rat agranular cerebellum. *Brain Res.* 1981; 206, 305-329.
- 16 Beas-Zárate C., Del Angel-Meza A., Morales-Villagran A., Feria-Velasco A. Serotonin uptake in the central nervous system of rats fed corn-diet. *Comparative Biochemistry and Physiology.* 1988; 89 C, 173-177.
- 17 Bedi K., Bhide P. Effects of environmental diversity on brain morphology. *Early Hum. Dev.* 1988; 17, 107-143.
- 18 Birdsall T. 5-Hydroxytryptophan: a clinically-effective serotonin precursor. *Altern Med Rev.* 1988; 3, 271-280.
- 19 Blatt G., Chen J., Rosene D., Volicer L., Galler J. Prenatal protein malnutrition effects on the serotonergic system in the hippocampal formation: an immunocytochemical, ligand binding, and neurochemical study. *Brain Res. Bull.* 1994; 34, 507-518.
- 20 Boadle-Biber M. Biosynthesis of serotonin. *Biology of Serotonergic Transmission.* N.N Osborne (editor). John Wiley and Sons Ltd. 1982; 3, pp. 63-87.
- 21 Bolaños-Jimenez F, Choi DS, Maroteaux L Preferential expression of 5-HT_{1D} over 5-HT_{1B} receptors during early embryogenesis. *Neuroreport.* 1997; 8, 655-660.
- 22 Brodie B., Shore P. A concept for role of serotonin and norepinephrine as chemical mediators in the brain. *Ann NY. Acad Sci.* 1957; 66, 631-642.

- 23 Buznikov, G., Shmukter, Y., Lauder J. Changes in the physiological roles of neurotransmitter during individual development. *Neurosci. Behav. Physiol.*, 1999; 29, 11-21.
- 24 Castañón-Cervantes O., Cintra L. Circadian rhythms of occipital-cortex, temperature and motor activity in young and old rats under chronic protein malnutrition. *Nutr Neurosci.* 2002; 5, 279-286.
- 25 Chen J., Turiak G., Galler J., Volicer L. Postnatal changes of brain monoamine levels in prenatally malnourished and control rats. *Int. J. Dev Neurosci.* 1997; 2, 257-263.
- 26 Chiang C., Litingtung Y., Lee E. Cyclopia and defective axial patterning in mice lacking sonic hedgehog gene function. *Nature.* 1996; 383, 407-413.
- 27 Dahlström A., Fuxe K. Evidence for the existence of monoamine containing neurons in the central nervous system. I. Demonstration of monoamines in cell bodies of brain neurons. *Acta Physiol.Scand.* 1964; 62 (Suppl. 232), 1-55.
- 28 D'amato R., Blue M., Largent B. Ontogeny of the serotonergic projection to rat neocortex: Transient expression of a dense innervations to primary sensory areas. *Proc Natl Acad Sci.USA.* 1987; 84, 43-22.
- 29 Dale J., Vazque C., Lints T. Cooperation of BMP and SHH in the induction of forebrain ventral midline cells by prechordal mesoderm. *Cell.* 1997; 90, 257-269.
- 30 Datiche F., Luppi P., Cattarelli, M. Serotonergic and non-serotonergic projections from the raphe nuclei to the piriform cortex of the rat: a cholera toxin B subunit (Ctb) and 5-HT immunohistochemical study. *Brain Res.* 1995; 671, 27-37
- 31 Daval G., Verge D., Becerril A., Gozlan H., Spampinato U., Hammon M. Transient expression of 5-HT1A receptor binding sites in some areas of the rat CNS during postnatal development. *Int. J Dev. Neurosci.* 1987; 5, 171-189.
- 32 Del Angel-Meza A., Beas-Zárate C, Morales A. Effects of corn fed and protein restriction on rat cerebellum and brain stem maturation. *Nutr. Reports I.* 1989; 40, 1192-1206.
- 33 Del Angel-Meza A., Ramírez-Cortés, L., Olivera-Cortés, E., Pérez-Vega, M., González-Burgos, I. A tryptophan-deficient corn-based diet induces plastic

- responses in cerebellar cortex cells of rat offspring. *Int. J. Devl Neurosci.* 2001; 19, 447-453.
- 34 Del Angel-Meza A., Ramírez-Cortés, L., Adame-González, G., González-Burgos I., Beaz-Zárate C. Cerebral GABA release and GAD activity in protein-and tryptophan-restricted rats during development. *Int J Devl Neuroscience.* 2002; 20, 47-54.
- 35 Dyck R., Cynader M. Autoradiographic localization of serotonin receptors subtypes in cat visual cortex: Transient regional, laminar and columnar distributions during postnatal development. *J Neurosci.* 1993; 13, 4316-4338.
- 36 Eaton M., Whittermore S. Autocrine BDNF secretion enhances the survival and serotonergic differentiation of raphe neuronal precursor cells grafted into the adult rats CNS. *Exp Neurol.* 1996; 140, 105-114.
- 37 Feldman R. Meyer J., Quenzer L. Principles of neuropsychopharmacology. Sinauer Associates, Inc., Publishers, Sunderland Mass. USA. 1997; pp.345-389.
- 38 Feria-Velasco A., Del Angel-Meza A., González-Burgos A. Modification of dendritic development. *Progress in Brain Res.* 2002; 136, 135-143.
- 39 Fernstrom J. Hirsch M. Brain serotonin: reduction in corn-malnourished rats. *J. Neurochem.* 1977; 28, 877-879.
- 40 Fernstrom J., Fernstrom P., Grubb, Volk, E. Absence of chronic effects of dietary protein content on brain tryptophan concentrations in rats. *J Nutr.* 1985; 115, 1337-1344.
- 41 Fernstrom J. Effects of the diet and other metabolic phenomena on brain tryptophan uptake and serotonin synthesis. En: *Kynurenine and Serotonin Pathways*, R. Schwarcz (Editor), Plenum Press, New York, 1991, pp.369-376
- 42 Fernstrom J. Can nutrient supplements modify brain function?. *J. Clin. Nutr.* 2000; 71, 1669S-1673S.
- 43 Fields H., Heinricher M., Mason P. neurotransmitter in nociceptive modulatory circuits. *Annu Rev Neurosci.* 1991; 14, 219-245.
- 44 Fischer H. Vergleichende pharmakologie von übertragersubstanzen in tiersystematischer Darstellung. 1971. Berlin, Heidelberg, N.Y. Springer-Verlag. pp. 30-37.

- 45 Frazer A., Hensler J. Serotonin. En : Basic Neurochemistry, Siegel G., Agranoff, W., Wayne R. Molinoff, P. (Eds.). Raven Press, New York; 1994, pp. 283-308.
- 46 Frazer A., Maayani S., Schoenfeld R. Subtypes of receptor for serotonin and their effectors. *Neuropsychopharmacology*. 1990; 3, 17-35.
- 47 Freund T., Gulyás A., Acsády L., Gorces T., Toth K. Serotonergic control of the hippocampus via local inhibitory interneurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1990; 87, pp.8501-8505.
- 48 Galter D., Unsicker, K. Regulation of the transmitter phenotype of rostral and caudal groups of cultured serotonergic raphe neurons. *Neuroscience*. 1999; 88, 549-559.
- 49 Gershon M. Serotonin: its role and receptors in enteric neurotransmission. *Adv Exp. Med Biol*. 1991; 249, 221-230.
- 50 Gibbons L., Gordon A., Barr D., Bridger L., Fryer. Manipulation of dietary tryptophan. Effects on mouse killing and brain serotonin in the rat. *Brain Res*. 1979; 169, 139-153.
- 51 González-Burgos I., Olvera- Cortés E., Del Angel-Meza A., Pérez-Vega, M., Feria-Velasco, A. Serotonin involvement in the spontaneous alternation ability; a behavioral study in tryptophan-restricted rats. *Neurosci Lett*. 1995;190: 143-145
- 52 González-Burgos I., Del Angel-Meza A., Barajas-López G., Feria-Velasco A. Tryptophan restriction causes long-term plastic changes in corticofrontal pyramidal neurons. *Int. J. Dev. Neurosci.*, 1996; 14, 673-679.
- 53 González-Burgos I., Del Angel-Meza A., Pérez-Vega, M., Feria-Velasco, A. Effect of tryptophan restriction on short-term memory. *Physiol. Behav.*, 1998; 63, 165-169.
- 54 Gould E., Serotonin and hippocampal neurogenesis. *Neuropsychopharmacol*. 1999; 21, S4-S51.
- 55 Harrington M., Zhong P, Garlow S., Ciaranello R. Molecular biology of serotonin receptors. *J Clin Psychiatry*. 1992; 53, Suppl:8-27.
- 56 Hernández J., Chagoya, G., Brain serotonin synthesis and Na⁺, K⁺ ATPase activity are increased postnatally after prenatal administration of L-Tryptophan. *Dev. Brain Res*. 1986; 25, 221-226.

- 57 Hernández J., Manjarrez G., Chagoya, G. Newborn humans and rats malnourished in-utero: free plasma L-Tryptophan, neutral amino acids and brain serotonin synthesis. *Brain Res.* 1989; 488, 1-13.
- 58 Hillion J., Catelon J., Raid M., Hamon M., De Vitry F. Neuronal localization of 5-HT1A receptors mRNA and protein in rat embryonic brain stem cultures. *Brain Res Dev.* 1994; 79, 195-202.
- 59 Hisatomi K. and Niiyama Y. Effects of postnatal undernutrition on the catecholamine and serotonin contents of suckling rat brain. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, 1980, 26, 279-292.
- 60 Hoffman P., Cleveland J., Griffin P., Landes N., Cowan D., Price. Neurofilament gene expression: a major determinant of axonal caliber. *Proc Natl Acad Sci. USA.* 1987; 84, 3472-3476.
- 61 Hohmann C., Hamon, R., Batshaw, M., Coyle, J. Transient postnatal elevation of serotonin levels in the mouse neocortex. *Brain Res.* 1988; 471, 163-169.
- 62 Huether G., Lajtha A. Changes in free amino acid concentrations in serum, brain and throughout embryogenesis. *Neurochem. Res.* 1991; 16, 145- 150.
- 63 Hynes M., Poulsen K., Tessier-Lavigne M., Rosenthal A. Control of neuronal diversity by the floor plate : Contact mediated induction of midbrain dopaminergic neurons. 1995. *Cell*; 80, 90-95
- 64 Jarrad L. On the role of the hippocampus in learning and memory in the rat. *Behav Neural Biol.* 1993; 60, 9-26.
- 65 Kligman D., Marshak. Purification and characterization of a neurite extension factor from bovine brain. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1985; 82, 121-125.
- 66 Lebrand C., Cases O., Adelbrecht C. Transient uptake and storage of serotonin developing thalamic neurons. *Neuron.* 1996; 17, 823-835.
- 67 Lauder J., Krebs H. Effects of p-chlorophenylanine on time of neuronal origin during embryogenesis in the rat. *Brain Res.*, 1976; 107 , 638-644.
- 68 Lauder J., Krebs H. Serotonin as a differentiation signal in early neurogenesis. *Dev. Neurosci.* 1978; 1, 15-30.
- 69 Lauder JM., Wallace J., Krebs H., Petrusz P., McCarthy K. In vivo and in vitro development of serotonergic neurons. *Brain Res Bull.* 1982; 9, 605-625.

- 70 Lauder J. Neurotransmitters as morphogenes. *Brain Res.* 1988; 73, 365-387.
- 71 Lauder J. Neurotransmitter as growth regulatory signals: role of receptors and second messengers. *Trends Neurosci.* 1993; 16, 233-240.
- 72 Lee S., Wang W, Finlay G., Fanburg B. Serotonin stimulates mitogen-activated protein kinase activity through the formation of superoxide anion. *Am J Physiol* 1999; 277: L282-91.
- 73 Leibowitz S., Alexander J. Hypothalamic serotonin in control of eating behavior, meal size, and body weight. *Biol Psychiatry.* 1998; 44, 851-864.
- 74 Ley General de Salud de la República Mexicana. Título Séptimo: De la investigación que incluye la utilización de animales de experimentación. Editorial Porrúa, sexta edición., México D.F. 1995: pp. 430-431.
- 75 Lidov H., Grzana R., Molliver T. The serotonin innervation of the cerebral cortex in the rat. An immunohistochemical analysis. *Neuroscience.* 1980; 5, 207-277.
- 76 Lidov, H., Molliver M. An Immunohistochemical study of the development of serotonergic neurons in the rat CNS. *Brain Res Bull.* 1982; 9 , 559-604.
- 77 Lipton S., Kater S. Neurotransmitter regulation of neuronal outgrowth, plasticity and survival. *Trends Neurosci* 1989;12, 265-270.
- 78 McMahon L., Kaver J. Hippocampal interneurons are excited via serotonin-gated ion channels. *J. Neurophysiol.*1997;2493-2502.
- 79 Manjarrez G., Chagoya G., Hernández, J. Perinatal brain serotonin metabolism in rats malnourished in-utero. *Biol. Neonate.* 1988a; 54. 232-240.
- 80 Manjarrez G., Chagoya, G., Hernández J., Desnutrición intrauterina. II. L-trptófano-5-hidroxilasa y serotonina en el cerebro de rata. *Bol. Med. Hosp. Infant. Mex.*, 1988b; 45, 808-816.
- 81 Manjarrez G., Chagoya G., Hernández J., Early nutritional changes modify the kinetics and phosphorylation capacity of tryptophan-5-hydroxylase. *Int. J. Dev. Neurosci.*1994; 12, 695-702.
- 82 Marson L., MacKenna E. A role for 5-hydroxytryptamine in descending inhibition of spinal sexual reflexes. *Exp. Brain Res.*1992; 88, 313-320.
- 83 Mattson M.P., Neurotransmitters in the regulation of neuronal cytoarchitecture. *Brain Res. Rev.*, 1988, 472, 179-212.

- 84 Mattson MP, LaFerla FM, Chan SL, Leissring MA, Shepel PN, Geiger JD. Calcium signaling in the ER: its role in neuronal plasticity and neurodegenerative disorders. *Trends Neurosci.* 2000; 23, 222-229.
- 85 Molliver ME. Serotonergic neuronal system: What their anatomic organization tells us about function. *J. Clin Psychophar.* 1987; 7 (Suppl), 3-23.
- 86 Molliver D., Molliver M. Anatomic evidence for neurotoxic effect of (\pm)- fenfluramine upon serotonergic projections in the rat. *Brain Res.*1990; 511, 165-168.
- 87 Morgane P., Austin-La France R. Bronzino, J., Tonkiss, J., Diaz-Cintra S., Cintra L., Kemper T. Prenatal malnutrition and development of the brain. *Neurosc and Biobeha. Rev.* 1993; 17, 91-128.
- 88 Morgane P.,Mokler D., Galler J. Effects of prenatal protein malnutrition on the hippocampal formation. *Neuroscience and Biobeha Rev.* 2002; (en prensa).
- 89 Morin LP. Serotonin and the regulation of mammalian circadian rhythmicity. *Ann Med.* 1999; 31, 12-32.
- 90 Nelson D., Herbert A., Adrein A., Bockaert J., Hamon M. Serotonin- sensitive adenylyate cyclase and H-serotonin binding sites in the CNS of the rat. *BiochePharmacol*, 1980; 29, 2455-2463.
- 91 Nishi M., Azmitia E. Agonist and antagonist-induced plasticity of rat 5-HT1A receptor in hippocampal cell culture. *Synapse*, 1999; 31, 186-195.
- 92 Okado N., Cheng L., Tanatsugu Y., Hamada S., Hamaguchi K. Synaptic loss following removal of serotonergic fibers in newly hatched and adult chickens. *J. Neurobiol.* 1993; 21, 687-693.
- 93 Olvera-Cortés., Perez-Vega M., Barajas-López G., Del Angel-Meza A., González-Burgos I.,Feria-Velasco A. Place learning impairment in chronically tryptophan-restricted rats. *Nutr Neurosci.* 1998; 1, 223-235.
- 94 Paxinos, G., Watson Ch., *The rat brain in stereotaxic coordinates.* Academic Press, San Diego, CA, 1997.
- 95 Pérez-Vega M., Feria-Velasco A., González-Burgos I. Prefrontocortical serotonin depletion results in plastic changes of prefrontocortical pyramidal neurons, underlying a greater efficiency of short-term memory. *Brain Res. Bull.* 2000; 53, 291-300.

- 96 Peurotka J. 5- hidroxitriptamin receptor subtypes: Molecular, biochemical and physiological characterization. *Trends. Neurol. Sci.* 1990; 11, 496-504.
- 97 Rapport M., Green A., Page. Serum vasoconstrictor (serotonin). IV. Isolation and chacterization. *J. Biol. Chem.* 1948; 176, 1243- 1251.
- 98 Rind H.B., Russo, A.F. and Whittemore S.R., Developmental regulation of tryptophan hydroxylase messenger RNA expression and enzyme activity in the raphe and its target fields. *Neuroscience.* 2000; 101, 665-677.
- 99 Rubenstein R.,Martínez S., Shimamura K., Puelles L. The embryonic vertebrate forebrain: The prosomeric model. *Science*; 266, 578-580.
- 100 Rubenstein R. Patterning of the embryonic forebrain. *Curr. Opin Neurobiol.* 1998; 8,18-26.
- 101 Rudge J., Eaton M., Mather P., Lindsay R., Whittemore S. CNTF induces raphe neuronal precursors to switch from a serotonergic to a cholinergic phenotype in vitro. *Mol Cell Neurol.* 1996; 7,204-221.
- 102 Simerly R. Anatomical substrates of hypothalamic integration, in: G. Paxinos (Ed). *The Rat Nervous System*, Academic Press, Sydney, 1995, pp.357-376.
- 103 Shimamura K.,Hartigan D.,Martínez S., Puelles L.,Rubenstein J. Longitudinal organization of anterior neural plate and neural tube. *Development.* 1995; 121, 3923-3933.
- 104 Shimamura K., Rubenstein J. Inductive interactions direct early regionalization of the mouse forebrain. *Development.* 1997; 124, 2709-2718.
- 105 Smith TA. The occurrence, metabolism and functions of amine in plants. *Biol Rev Camb Philos Soc.*1971; 46, 201-241.
- 106 Stark K., Oosting R., Hen R. Novel strategies to probe the function of serotonin receptors. *Biol Psychiatry.* 1998; 44, 163-168.
- 107 Stern W., Miller C., Forbes W., Morgane P., Resnick O. Ontogeny of the levels of biogenic amines in various parts of the brain and in peripheral tissues in normal and protein malnourished rats. *Exp. Neurol.* 1976; 49, 314-326.
- 108 Stone, T.W. Neuropharmacology of quinolinic acid kynurenic acid. *Pharmacol Rev.* 1993; 45, 309-379.

- 109 Tanabe Y, Jessell T. Diversity and pattern in the developing spinal cord. *Science*. 1996; 274, 1115-1123.
- 110 Tonkiss J., Galler J., Morgane P., Bronzino J., Austin-LeFrance R. Prenatal malnutrition and postnatal brain function. *Ann N.Y. Acad Sci*. 1993; 678, 215-227.
- 111 Twarog B., Page I. Serotonin content of some mammalian tissues and urine and a method for its determination. *Am. J Physiol*. 1953; 175, 157-161.
- 112 Tork, Y. Anatomy of the serotonergic system. *Ann NY Acad. Sci*. 1990; 600, 9-35.
- 113 Vaage S. The segmentation of the primitive neural tube in chick embryos (*Gallus domesticus*). *Adv Anat. Embryol Cell Biol*, 1969; 41, 1-88.
- 114 Verhofstad A., Steinbusch H., Penke B., Varga J., Joosten H. Serotonin-immunoreactive cell in the superior cervical ganglion of the rat. Evidence for the existence of separate serotonin and catecholamine-containing small ganglionic cells. *Brain Res*. 1981; 212, 39-49.
- 115 Voight, T. de Lima, A., Serotonergic innervation of the frontal cerebral cortex. II. Postnatal development. *J. Comp. Neurol*. 1991; 314, 415-428.
- 116 Wallace J., Lauder J. Development of serotonergic system in the rat embryo: an immunocytochemical study. *Brain Res. Bull.* 1983; 10, 459-479.
- 117 Wallace J.A., Lauder J.M. Development of the serotonergic system in rat and chick embryos. In Bjorklund A. Hokfelt T., Thoyama M. Editors. *Handbook of Chemical Neuroanatomy, V.10: Ontogeny of transmitters and peptides in the CNS*. Amsterdam: Elsevier Science Publisher. 1992, pp. 619.
- 118 West, M., New stereological method for counting neurons. *Neurobiol Aging*. 1993; 14, 275-285.
- 119 Whitaker-Azmitia P., Shemer A.V., Caruso J., Molino A., Azmitia E., *Neuropharmacology of serotonin*. *Ann. N.Y. Acad. Sci*. 1990; 660, pp.315-330.
- 120 Whitaker-Azmitia, PM. Role of serotonin and other neurotransmitter receptors in brain developmental pharmacology. *Pharmacol Rev*. 1991; 43, 553-561.
- 121 Whitaker-Azmitia, PM., Druse, M., Walker, P. and Lauder, J.M., Serotonin as a developmental signal. *Behav. Brain Res.*, 1996; 73, 19-29.

- 122 Wolley D. The biochemical bases of psychoses or the serotonin hypothesis about mental illness. New York, John Wiley and Sons, Inc.
- 123 Yamada T, Ptaff SL, Edmund T, Jessell TM. Control of cell pattern in the neural tube: motor neuron induction by diffusible factors from notochord and floor plate. Cell. 1993; 73, 673-686.
- 124 Zamenhof S., Van Marthens E. Nutritional influences on prenatal brain development: En Gottlieb G (ed.), Studies on the development of behavior and the nervous system. Early influences: Academic Press, New York. 1978; pp. 147-179.
- 125 Zamenhof S. Malnutrition and brain development in: Lajtha A. editor. Handbook of neurochemistry, vol. 9. New York: Plenum Press, 1985. pp. 151-172.



Corn feeding during development induces changes in the number of serotonergic neurons in the raphe nuclei

Sandra Orozco-Suárez, Alma Rosa Del Angel, Carlos Beas-Zárate, Gabriel Manjarrez, Alfredo Fera-Velasco

^a Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Neurológicas, Hosp. Especialidades, CMN-Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), México, DF, México

^b División de Neurociencias, CIBO, IMSS, Guadalajara, Jalisco, México

^c Pathology and Environmental Biotechnology Division, CATEJ (SEP-CONACYT), Guadalajara, Jalisco, México

Received 18 June 2002; received in revised form 13 November 2002; accepted 14 November 2002

Abstract

Serotonin (5-HT) plays a trophic role during brain development; chronic changes in cerebral concentration of this neurotransmitter during the critical stage of development can produce severe damage in the formation of the neural circuits. For the present work a hypoproteinic (HYP) diet based on corn (CORN) meal which is deficient in tryptophan (TRY) was given to rats before and during pregnancy, which continued to the offspring until they reached 60 days of age. An isocaloric but hypoproteinic diet containing normal amount of TRY, and normal chow (Ch) Purina were given with the same scheme to two groups of rats considered as controls. 5-HT immunohistochemistry was revealed by avidin–biotin complex (ABC) method to quantify serotonergic nerve cells in the nine raphe nuclei. The number of cells immunoreactive to 5-HT immunoreactive (5-HTir) were quantified by means of stereological analysis. Results demonstrated a significant variation in 5-HT expression in the raphe nuclei. Thus, a significant reduction in the number of 5-HTir cells in the rostral raphe nuclei was seen at all ages studied in the animals fed the corn diet, compared to data obtained from the control groups. This decrease was more evident between the postnatal ages of 30 and 60 days. It is concluded that the variations in the available TRY affect the brain cells producing 5-HT and the innervation of their target areas.

© 2002 ISDN. Published by Elsevier Science Ltd. All rights reserved.

Keywords: Serotonin; Undernutrition; Raphe nuclei; Development

1. Introduction

Serotonin (5-HT) neurons are known to comprise extensive central neuronal network related to basic brain functions since an early stage of brain development ().

Therefore, damage to this type of neuron in early postnatal life cannot be ignored as it may produce functional, behavioral and learning deficits ().

The influence of early postnatal undernutrition on the serotonergic system has been the subject of considerable biochemical research ().

referring an increase of brain 5-HT concentration and its metabolite 5-hydroxyindolacetic acid (5-HIAA), most marked in the brain stem and hippocampus from the time of birth to adulthood ().

These effects most likely result from changes in the degree of substrate saturation of tryptophan hydroxylase, which are introduced by alteration in brain tryptophan (TRY), 5-HT and 5-HIAA. Other authors, using a model with pregnant rats fed a corn (CORN)-based diet (), which contains 8% protein and restricted in TRY and lysine have contributed considerably to the understanding of the regulatory role of 5-HT as a neuromodulator, and as a neurotransmitter in the central nervous system (CNS). These studies have been carried out by feeding the rats with a corn-based diet before mating, during gestation and after weaning ().

Abbreviations: 5-HT, serotonin; 5-HIAA, 5-hydroxyindolacetic acid; TRY, tryptophan; CNS, central nervous system; 5-HTir, 5-HT immunoreactive; CORN, corn; HYP, hypoproteinic; Ch, chow; PBS, phosphate buffered saline; ABC, avidin–biotin complex; NHS, normal horse serum

* Corresponding author. Tel.: +52-33-3345-5200;

fax: +52-33-3345-5200x1001.

E-mail address: afera@ciatej.net.mx (A. Fera-Velasco).

0736-5748/02/\$30.00 © 2002 ISDN. Published by Elsevier Science Ltd. All rights reserved.
PII: S0736-5748(02)00124-7

61

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

). Corn proteins are among the most deficient in TRY of all proteins normally ingested by humans. Presumably, the decline in brain 5-HT and 5-HIAA levels in these animals might at least partially reflect a decrease in 5-HT formation secondary to its substrate deficiency. With this model, indirect evidence has shown a reduction of 5-HT synthesis and degradation (

). reduction in the TRY transport mechanism by CNS elements, and increase of 5-HT uptake affinity particularly in brain stem and telencephalon (

Although some authors producing prenatal protein deprivation found no effect of the diet on the timing of hippocampal pyramidal cell generation (or on the number of cells generated in the locus coeruleus (

) also using prenatally protein malnourished rats found a significant increase of 5-HT release and 5-HIAA concentration in hippocampal slice preparations when compared to controls with no significant differences in other neurotransmitter concentrations.

in a neuroanatomical study in protein deprived adult rats found a decrease in the density of 5-HT afferent fibers in the hippocampal formation; and increasing the litter size of mice during the first 3 weeks postnatally with quantitative analysis at 60 postnatal days of age (PND) found a significant decrease in serotonin immunoreactive 5-HT immunoreactive (5-HTir) cell bodies in the total raphe system and the subpyramidal region.

Although numerous neurochemical studies have been made in malnourished rats including those employing TRY-restricted diets, there are few studies dealing with changes in the serotonergic system of specific brain regions of nutrient restricted rodents.

With the improvement of neurotransmitter mapping in the brain, it is possible to determine precisely the CNS regions where abnormalities of certain neurotransmitter actually occur. Using an immunohistochemistry method we investigated the effects of TRY restriction during the prenatal and early postnatal life on the rat brain stem serotonergic system in postnatal development.

2. Materials and methods

2.1. Malnutrition induction paradigm

A detailed description of the nutritional, mating and postweaning procedures has been published elsewhere (

). All experiments were carried out in accordance with the National Institute of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (NIH Publications No. 8023, revised in 1978). Briefly, the procedures were as described in the following paragraph.

Twenty-one female Wistar rats were divided into three groups of seven rats each and fed with different diets: Corn

Table 1
Composition of diets (g/100 g diet)

Components	Group		
	Ch	HYP	CORN
Chow Purina	98.00	34.04	—
Corn meal	—	19.00	86.00
Dextrinose	—	20.10	—
Saccharose	—	12.67	—
Dextrin	—	3.13	4.00
Vegetable oil	2.00	1.00	4.00
Mineral mixture Rh	—	1.00	1.00
Vitamin mixture	—	9.06	6.90
Fiber cellulose	—	8.00	8.00
Percentage of proteins	23.00	350.46	348.50
Kilocalories per 100 g	350.00	0.10	0.058
Tryptophan content (g/100 g diet)	0.30	—	—

* Obtained from ICN.

† Obtained from the Wood and Cellulose Institute of University of Guadalajara.

group (CORN) was fed with TRY-deficient diet (corn-based diet, containing 8% protein); hypoproteinic group (HYP) was fed with 8% protein diet in a chow Purina base; and Chow group (Ch) fed with chow Purina for rodents, containing 23% protein. All diets were given as powder, were isocaloric and their composition appears in

. The rats had free access to their respective diets and water, during 6 weeks to allow them to acclimate to the respective diet, thus reducing metabolic disequilibrium related to acute diet changes. After this time the animals were mated with healthy males overnight, and pregnancy was determined by identification of mucous plug and sperm cells in a daily vaginal examination and smear. Pregnant rats were kept in individual cages, at 24 °C and 50% relative environmental humidity, under controlled dark–light cycle (10 h light; 14 h darkness). No statistically significant differences were detected in the amount of food ingestion during gestation in the 3 groups of rats. The pregnant rats were checked every 12 h by the end of the gestation period, and the day of birth was considered day 1. At birth, all litters were adjusted to eight pups per mother with a similar number of males and females per group. The pups were placed with their mothers corresponding to each diet during lactation; after weaning, each litter was fed with the same diet until pups reached 60 PND.

2.2. Tissue preparation

At 1, 7, 14, 21, 30 and 60 PND, pups were anesthetized with sodium pentobarbital and perfused transcardially with 0.12 M phosphate buffered saline (PBS), pH 7.4 for 15 min followed by perfusion with 4% paraformaldehyde diluted with PBS, at a pH of 7.4 for 15 min at room temperature. The brains were then removed and postfixed in the same fixing solution for 24 h at 4 °C, and transferred to cold PBS for several hours to a few days. The brains were sectioned in the coronal plane at 50 µm with a vibratome for the 5-HTir counting procedure in the raphe nuclei (

62

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

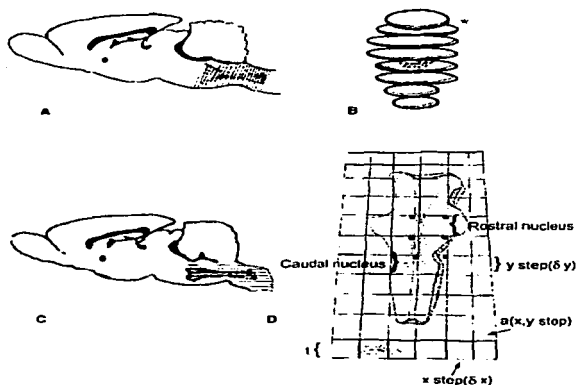


Fig. 1. The brain stem was sectioned in two planes; the coronal plane for counting 5-HT_{1r} neurons (A and B) and the horizontal plane (C) to delimit the boundaries of each raphe nucleus of animals from all groups at all ages studied. Fifty micrometer thick sections were serially obtained, mounting five sections per slide. The number of sections varied depending the length of each raphe nucleus (D). Only one section was analyzed in each consecutive subseries, 10 in total. As a consequence, the section sampling fraction, *saf*, was 1/10. A volume fraction of each nucleus was taken and the area sampling fraction (*saf*) = area (frame)/area (*x, y*) is the area of counting frame (0.02 mm × 0.02 mm), relative to the area associated with each field in the computer monitor. The thickness sampling fraction is the height, *h*, of the dissector relative to the section thickness, *A/t*. The number of 5-HT_{1r} neurons was calculated according to: $N = \Sigma Q = 1/h \cdot i_{sf} \times j_{sf}$, where *Q* is the number of 5-HT_{1r} in a fraction of known volume of the brain stem. In order to standardize the counting the same volume fraction was used for each group of animals and at each age studied.

Some brain stems of rats from each group were horizontally sectioned to measure the length of each raphe nucleus corresponding to each age studied in the three groups of animals (). Sections through brain stem and both hemispheres were collected in tissue-culture wells in cold PBS. They were further processed for immunohistochemistry.

2.3. Immunohistochemistry

Free-floating sections from both control and experimental groups were immunostained for 5-HT using the standard avidin-biotin complex (ABC) method and processed simultaneously using the same reagents and incubation times. At first, endogenous peroxidase activity was blocked with a 20 min incubation in 0.1% H₂O₂. Then, the sections were incubated in 5% normal horse serum (NHS) at room temperature for 2 h. The sections were then placed in PBS containing 5% NHS, 0.5% Triton X-100 and mouse anti tryptophan hydroxylase serum (1:2500) at 4 °C for 48 h. After several rinses with PBS containing 0.1% Triton X-100, the sections were incubated in 1% anti-mouse IgG with 5%

NHS for 2 h at room temperature. Then, the sections were rinsed again and incubated in 1% ABC solution for 1 h. After several rinses in 0.05 M Tris buffer, the bound antibodies were visualized by incubating sections in 0.05% DAB and 0.005% H₂O₂. The reaction was enhanced with nickel sulfate. Sections were mounted on poly-L-lysine-subbed slides and allowed to air-dry for at least 30 min. Then the sections were dehydrated in graded changes of ethanol, cleared in xylene and mounted with Entellan mountant (Merck) and coverslips. Each preparation was examined under a light microscope.

2.4. Quantitative analysis

The sections from the entire brain stem were arranged serially on a slide. The number of 5-HT_{1r} nerve cell bodies in the various anatomical locations was determined by counting them under a light microscope equipped with a digitalized image analysis system. Raphe nuclei were identified according to Paxinos stereotaxic map (). The number of cells was determined with the optical

fractionator method (), which involves counting cells with the optical disectors in an uniform systematic sample that constitutes a known fraction of the volume of the region being analyzed (). We used 10 sections for each brain in each age, and the counting was done in the whole 50 μm thickness, because the 5-HTir cells were not always spherical and the diameter of their cell bodies varied with the brain region, as described below. Values were expressed as number of 5-HTir cells.

2.5. Statistical analysis

Results were analyzed for statistical significance ($P < 0.05$) using one-way analysis of variance (ANOVA) and Bonferroni's multiple comparison post hoc test. All statistical analyses were performed using the Sigma Stat Program (Jandel Scientific, USA).

3. Results

3.1. Somatometric parameters

According to results, postnatal malnutrition was evident in animals of the CORN and HYP groups. Body weight

gain started to lessen after weaning, being highly significant ($P < 0.01$) on 30 and 60 days old animals (). Cerebral weight gain on the CORN group was reduced after being 7 days old, and also when animals reached 60 PND. In HYP group malnutrition was less severe; nevertheless weight gain was also affected (). The brain transverse diameter was significantly reduced after 21 PND when compared to data of Ch ($P < 0.001$), and HYP ($P < 0.05$) groups. In a less significant way, the rostro-caudal diameter of the cerebral hemispheres was reduced in the CORN group compared to that observed in Ch and HYP groups ().

3.2. Quantitative analysis of the 5-HT immunoreactive cells

A precise anatomic location of serotonergic neurons in the brain stem can hardly be specified, thus they have been classified in nine groups of cells (B1–B9) immunoreactive to 5-HT (5-HTir) that constitute those called the raphe nuclei ().

In the pallidus raphe nucleus, 5-HTir neurons were ventrally located and appeared large ($>20 \mu\text{m}$ in diameter), multipolar (), increasing its fiber diameter towards reaching 60 PND. This nucleus represents more than 17% of the total number of neurons in the raphe system ().

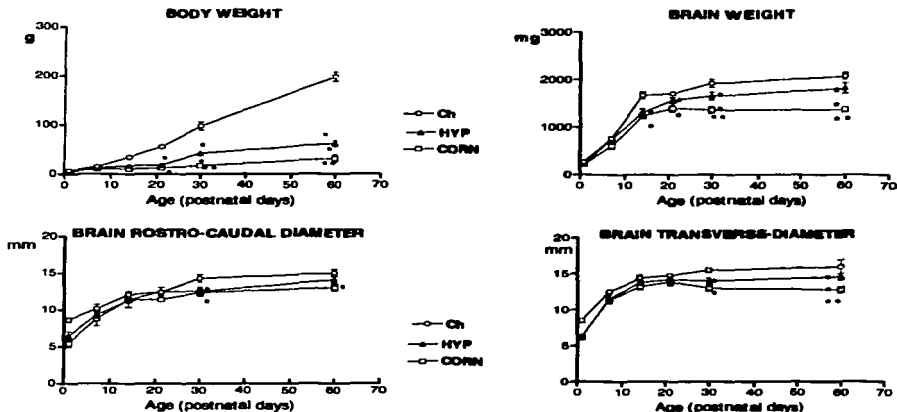


Fig. 2. Effect of TRY and protein restriction (CORN group) on some somatometric parameters. Values represent the mean \pm S.D.M. Significantly different from corresponding Ch group at * $P < 0.05$ and significantly different from HYP group at ** $P < 0.01$ (one-way ANOVA with Bonferroni's post hoc test).

64

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

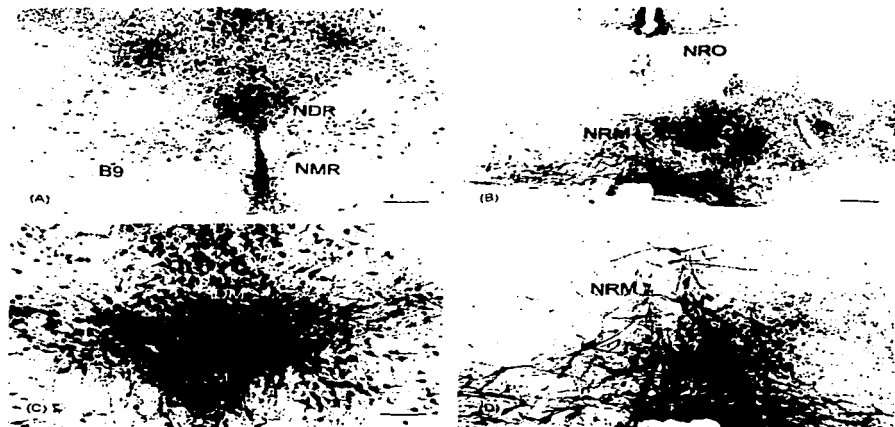


Fig. 3. Photomicrographs of 14 days old rat brain sections showing 5-HTir neurons. (A) Rostral group, NRD: rostral portion of the N. raphe dorsalis; NRM: N. raphe medianus; NLM: N. lemniscus medialis. (B) Caudal group, NRP: N. raphe pallidus; NRM: N. raphe magnus; NRO: N. raphe obscurus. (C) Higher magnification of A showing part of the lateral (L), dorsomedial (DM) and ventromedial (VM) components of N. raphe dorsalis. (D) Higher magnification of B where large 5-HTir neurons (arrows) of the N. raphe magnus are observed; NRP: N. raphe pallidus. Bar in A and B = 100 μ m; Bar in C and D = 20 μ m.

). Regarding its cellular density, in HYP group this nucleus was more affected compared to that of the Ch group (), reaching its expression maximum peak at 7 PND, in contrast to Ch and CORN groups, which reached it at 14 PND and at birth, respectively. However, in this nucleus no statistically significant differences among the groups of animals after 21 PND were observed.

The neurons of obscurus and magnus nuclei located along the midline in the medulla oblongata and in the pons, were observed in two parallel oblongs. These neurons were identified as medium sized (15–20 μ m in diameter), perpendicularly oriented to the midline (). In the CORN group, a 5-HT expression pattern different to that seen in the Ch and HYP groups was observed, since at 1, 7, 14 and 21 PND the number of detectable 5-HTir cells in obscurus nucleus in the CORN group was significantly decreased ($P < 0.05$) as compared to the Ch group (). Even though at 30 and 60 PND, a decrease on the number of 5-HTir neurons was observed in this nucleus in the CORN group, this decrement was not statistically significant when compared to that seen in Ch and HYP groups. This nucleus

contributes with 17% of the total 5-HTir cells of the raphe system ().

Cell groups located in the rostral region, remarkably differ in both, size and number, from those located in the raphe caudal region. The dorsal raphe nucleus is the one showing a greater density of 5-HTir neurons; it expands from the caudal pontine region to the midbrain and contributes with 35% of the total number of raphe system neurons ().

Most of these cells showed an oval or spherical body of 12–16 μ m in diameter and thin fibers (). The greatest amount of 5-HTir cells in this nucleus was noticed in the Ch group between 14 and 21 PND, decreasing at 30 and 60 PND (). This nucleus had a decrement in the number of 5-HTir neurons in HYP group compared to what was seen in Ch group, while in the CORN group this reduction was greater when comparing the data to those of the Ch group, as well as when doing so with those in HYP group, mainly after 14 PND ().

Centrally superior, linearis intermedius and pontis raphe nuclei jointly contribute to 35% of the total 5-HTir neurons of the raphe system and are located in the pons rostral

65

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

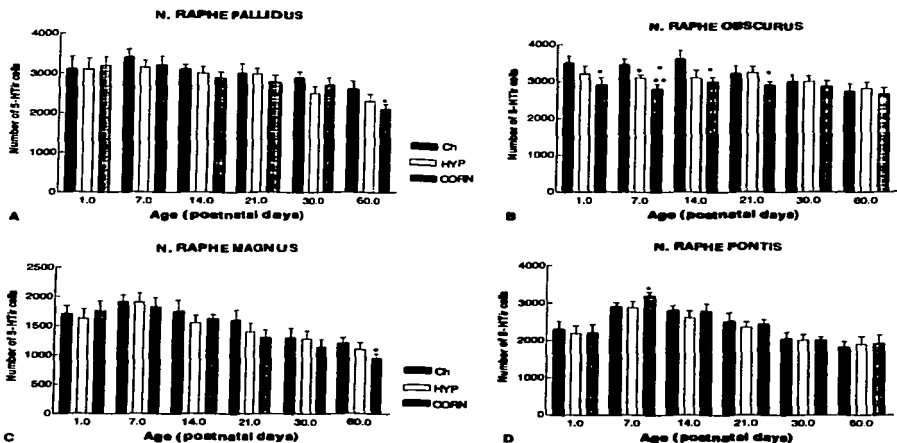


Fig. 4. Histograms of the number of 5-HTir somata in some caudal and rostral nuclei of the raphe system in animals of the CORN group (mean \pm S.D.M.) as compared to the Ch group at each age ($*P < 0.05$), and as compared to the HYP group ($**P < 0.01$) (one-way ANOVA with Bonferroni's post hoc test).

region towards the caudal zone on the midline (). The central superior nucleus showed an increment in the number of 5-HTir cells with its maximum peak of expression at 21 PND in the Ch group, and a reduction towards 30 and 60 PND. HYP and CORN groups showed a reduction in this type of neurons in every age studied. CORN group had a greater 5-HTir cell reduction mainly at 14, 21 and 60 PND ().

The nucleus raphe pontis showed an expression pattern in the number of 5-HTir neurons, with an increment of such cells towards day 7 PND in the three groups studied, and a progressive reduction in the subsequent ages. No statistically significant differences were observed in the number of immunoreactive cells in this nucleus among the three groups with the exception of the CORN group that showed an increment at 7 PND as compared to the other two groups ($P < 0.05$) ().

The nucleus linearis intermedius showed an increment in the 5-HTir neuron pattern similar to that seen in the raphe pontis nucleus, with a maximum peak at 14 PND. There was no significant variation in the number of 5-HTir nerve cell bodies in this nucleus among the three groups studied ().

The cells of the nucleus lemniscus medialis are located in the pons surrounding the pontine nucleus and in part of the caudal region of the mesencephalic reticular formation (). These cells appeared ovoid or ellipsoid in shape, medium sized (15–20 μ m), with numerous thin fibers (). The maximal number of 5-HTir neurons was noticed at one PND, with a slight progressive reduction in the subsequent ages. A reduction in the number of 5-HTir neurons in this nucleus, in HYP and CORN groups was identified, compared to Ch group data. The reduction noticed in the CORN group values was even more significant, mainly after 14 PND ().

As a whole, a similar development pattern was noticed in most of the raphe nuclei, with an increment of 5-HTir cells from birth to 14 PND with a reduction of such number in subsequent ages, reaching, on 60 PND, figures slightly smaller than those observed at birth (). Although the expression pattern of raphe nuclei 5-HTir cells in CORN and HYP groups was similar to that seen in the Ch group at birth, the CORN group showed a significant ($P < 0.05$) reduction in the number of 5-HTir cells at subsequent ages when compared to what was seen in the Ch group ().

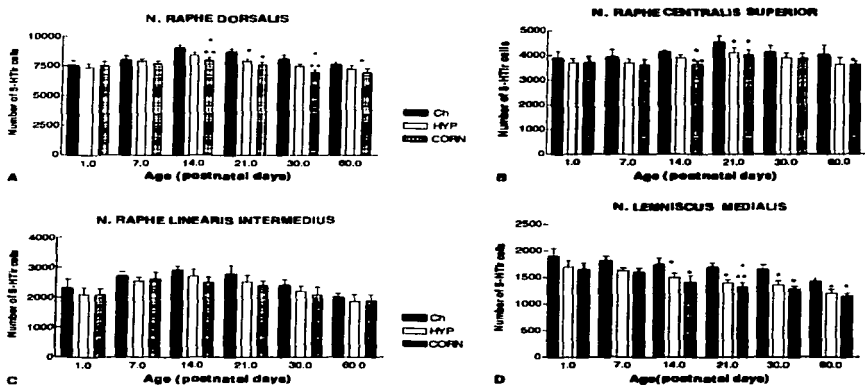


Fig. 5. Histograms of the number of 5-HTT somata in some rostral nuclei of the raphe system in animals of the CORN group (mean \pm S.D.M.) as compared to the Ch group at each age ($^*P < 0.05$), and as compared to the HYP group ($^{**}P < 0.01$) (one-way ANOVA with Bonferroni's post hoc test).

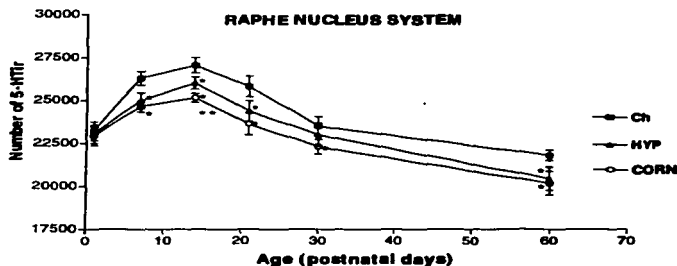


Fig. 6. Histogram of the number of 5-HTT somata in the total raphe system in animals of the CORN group (mean \pm S.D.M.) as compared to the Ch group at each age ($^*P < 0.05$), and as compared to the HYP group ($^{**}P < 0.01$) (two-way ANOVA with Bonferroni's post hoc test).

4. Discussion

Prenatal malnutrition has been shown to be more detrimental to the brain postnatal development than postnatal malnutrition ().

Although some authors found no differences in body and brain weight of 30 days old rats prenatally malnourished by protein restriction (), present results from the morphometric parameters including body and brain weight are in accordance to what

67

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

has been expressed by different authors using diverse models of malnutrition. Remarkably, the brain weight diminishes in a lesser proportion with a restriction of L-TRY and protein in relation with body weight reduction, pointing out that one of the most protected structures under adverse nutritional conditions is the CNS.

4.1. Effects of the diet on postnatal expression of 5-HT immunoreactivity in the rat brain

studies have proved the existence of a fast increment in the cerebral serotonergic innervation on the first 3 weeks after birth in the rat, and biochemical studies disclose that 5-HT levels increase rapidly in the first 4–5 postnatal weeks of age (). This was the development pattern noticed in the number of 5-HTir cells in rat raphe system under normal conditions in the present work, with an increment set out at birth, reaching its maximum peak between 14 and 21 PND, with a progressive diminishing from there on (). This information suggests that in the brain stem serotonergic system development, two phases are identified regarding the number of 5-HTir cells: (a) an abundant expression during the first 2 weeks probably finding correlation with that area integral development, with those serotonergic components participation in the ontogeny regulation of other areas receiving innervation from its fibers (), particularly the cerebral cortex ()

and hippocampus (); (b) afterwards, when target areas mature, the expression is reduced/diminishing the number of 5-HTir neurons, starting at the second and third weeks of postnatal life. This finding is consistent with data reported by , who showed an increased expression of tryptophan 5-hydroxylase mRNA on the third postnatal week and a reduction at the 60 PND.

The present work remarks that in CORN and HYP groups the development pattern in the number of 5-HTir cells is similar to that of the Ch group. However, in the first two groups and in a more significant way in the CORN group, a more important reduction could be observed in the rostral raphe nuclei (rostral, linearis, and centralis), which basically project their fibers to neocortical structures ()

, while the raphe caudal nuclei were less affected in their number of 5-HTir cells, due to the effect of protein and TRY restriction in the diet.

Caudal group develops earlier than the raphe rostral group (). Although in this model the mother was subjected to nutrient restriction, she still keeps reserves to be transmitted to her products during gestation. Starting from second week and especially from the third week of postnatal life, when the serotonergic neurons progressively acquire their mature morphologic features, the raphe rostral components seem to be more susceptible to protein and TRY restriction, because during these stages they exclusively depend on the components contributed by

the exogenous diet. It is in keeping with results reported when using the experimental model on corn-based diet which shows a reduction of DNA, RNA and protein content, mainly in the brain stem and from day 21 PND (data not shown). Moreover, it well correlates with the reduction in content of 5-HT and 5-HIAA reported in the brain stem using the same model of protein and TRY restriction as the one used in this work ()

. These neurochemical results differ from those reported by other authors ()

; , who find an increment in the content of 5-HT and 5-HIAA in malnutrition conditions. Such differences could obey to the experimental paradigms used to provoke malnutrition, as well as to the animal ages and to the cerebral regions studied. In these terms one can conclude that the bioavailability of TRY for 5-HT synthesis is basically required in the process of the raphe development and maturation in the earliest postnatal developmental stages, and most probably on prenatal stages during the definition of its serotonergic phenotype also, as suggested by other authors ()

4.2. Role of 5-HT in brain development

Besides working as a neurotransmitter (), 5-HT plays a trophic function during morphogenesis, neuronal differentiation, and synaptogenesis; thus it influences in the integral development of the target tissues innervated by serotonergic fibers, and taking part in the development regulation of other neurotransmitter systems ()

Under TRY restrain conditions with a diminishing on 5-HT synthesis in the CNS, some compensatory mechanisms could take place oriented to achieve an adequate maturation of those target areas innervated by the serotonergic fibers (). These might involve an increase in 5-HT uptake affinity and hypersensitivity of 5-HT receptors with the purpose of expanding the neurotransmission under reduction conditions in the 5-HT synthesis, as it has been demonstrated in the brain stem (). Likewise, plastic changes have been observed in neurons receiving serotonergic innervation. It is well known that axons coming from the rostral raphe nuclei provide major serotonergic projections to the forebrain and hippocampus ()

. Data from our laboratory show an increment in the number of dendritic spines in the pyramidal cells of the prefrontal cerebral cortex in both, the rats fed with a diet restricted in TRY (), and under conditions of selective pharmacological lesion of the dorsal raphe nucleus in rats ()

The aforementioned points out that TRY variations on the diet affect the availability of 5-HT with damage in the CNS serotonergic system, which is involved in development and

68

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

maturing processes of the raphe system itself and the areas innervated by their fibers.

Side effects to the reduction of 5-HT due to a diminishing of that indolamine producing neurons might be related to disturbances on behavioral manifestations where 5-HT is involved (). This neurotransmitter is directly related to sleep-awake cycles, depressive conditions, anxiety, feeding, pain control and sexual behaviors ().

Therapeutic administration of 5-HT and 5-hydroxytryptophane has proved its effectiveness in the treatment of some of these disorders ().

In conclusion, restriction of TRY on the diet when the availability of this essential amino acid is reduced during the CNS development, produces a reduction in 5-HT synthesis, with a diminution of 5-HIAA levels in the brain. This may determine the alteration in both, the growing and maturity processes in the raphe system areas in rostral nuclei mainly, and in the regions innervated by their nerve fibers. The effect over these regions and its functional implications cannot be asserted from the present work and require further investigation. Also, more work is needed to discern the role of malnutrition and particularly TRY restriction in the control of 5-HT neurogenesis.

Acknowledgements

This work was supported in part by Mexican Institute of Social Security (IMSS) grant no. FP-0038-1286 and FUN-SALUD Cap. Jal. No. 101-001-003.

References

Azmiza, E.C., Segal, M., 1978. An autoradiographic analysis of the differential ascending projections of the dorsal and median raphe nuclei in the rat. *J. Comp. Neurol.* 179, 641–668.

Beas-Zárate, C., Del Angel-Meza, A.R., Morales-Villagrán, A., Feria-Velasco, A., 1988. Serotonin uptake in the central nervous system of rats fed corn-diet. *Comp. Biochem. Physiol.* 89C, 173–177.

Beaudet, A., Sotelo, C., 1981. Synaptic remodeling of serotonin axon terminals in rat granular cerebellum. *Brain Res.* 206, 305–329.

Birdsall, T.C., 1988. 5-Hydroxytryptophan: a clinically-effective serotonin precursor. *Altern. Med. Rev.* 3, 271–280.

Blant, G.J., Chen, J.C., Rosene, D.L., Volicser, L., Galler, J., 1994. Prenatal protein malnutrition effects on the serotonergic system in the hippocampal formation: an immunocytochemical, ligand binding, and neurochemical study. *Brain Res. Bull.* 34, 507–518.

Boadle-Biber, M., Biosynthesis of serotonin, 1982. In: Osborne, N.N. (Ed.), *Biology of Serotonergic Transmission*. Wiley, New York, Chapter 3, pp. 63–87.

Buznikov, G., Shrutkter, Y.B., Lauder, J.M., 1999. Changes in the physiological roles of neurotransmitter during individual development. *Neurosci. Behav. Physiol.* 29, 11–21.

Chen, J.C., Tonkin, J., Galler, J., Volicser, L., 1992. Prenatal protein malnutrition enhances serotonin release from hippocampus: in biochemical and molecular roles of nutrients. *J. Nutr.* 122, 2138–2143.

Chen, J.C., Turiak, G., Galler, J., Volicser, L., 1997. Postnatal changes of brain monoamine levels in prenatally malnourished and control rats. *Int. J. Dev. Neurosci.* 2, 257–263.

Cintra, L., Granados, L., Aguilar, A., Kemper, T., DeBasio, W., Galler, J., Morgane, P., Durán, P., Diaz-Cintra, S., 1997. Effects of prenatal protein malnutrition on mossy fibers of the hippocampal formation in rats of four age groups. *Hippocampus* 7, 184–191.

Dalichow, F., Luppi, P., Cattarelli, M., 1995. Serotonergic and non-serotonergic projections from the raphe nuclei to the piform cortex of the rat: a cholera toxin B subunit (Ctb) and 5-HT immunohistochemical study. *Brain Res.* 671, 27–37.

DeBasio, W.A., Kemper, T.L., Galler, J.R., Tonkin, J., 1994. Prenatal malnutrition effect on pyramidal and granule cell generation in the hippocampal formation. *Brain Res. Bull.* 35, 57–61.

Del Angel, A., Beas-Zárate, C., Morales, A., 1989. Effects of corn fed and protein restriction on rat cerebellum and brain stem maturation. *Nutr. Rep. Int.* 40, 1192–1206.

Del Angel-Meza, A.R., Ramirez-Cortés, L., Olvera-Cortés, E., Pérez-Vega, M.I., González-Burgos, I., 2001. A tryptophan-deficient corn-based diet induces plastic responses in cerebellar cortex cells of rat offspring. *Int. J. Dev. Neurosci.* 19, 447–453.

Fernstrom, J.D., 1981. Physiological control of brain serotonin synthesis: relevance to physiology and behavior. In: Jacobs, B.L., Gelperin, A. (Eds.), *Serotonin Neurotransmission and Behavior*. MIT Press, London, Chapter 3, pp. 75–102.

Fernstrom, J.D., 2000. Can nutrient supplements modify brain function? *J. Clin. Nutr.* 11, 1669S–1673S.

Fernstrom, J.D., Hirsch, M.J., 1977. Brain serotonin synthesis: reduction in corn-malnutritioned rats. *J. Neurochem.* 28, 877–879.

Fernstrom, J.D., Hirsch, M.J., Grubb, P.E., Volk, A., 1985. Absence of chronic effects of dietary protein content on brain tryptophan concentrations in rats. *J. Nutr.* 115, 1337–1344.

Freund, T.F., Gulyás, A.I., Acadály, L., Görös, T., Tóth, K., 1990. Serotonergic control of the hippocampus via local inhibitory interneurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87, 8501–8505.

Galler, J.R., Shumsky, J.S., Morgane, P.J., 1996. Malnutrition and brain development. In: Walker, C.A., Watkins, J.B. (Eds.), *Nutrition in Pediatrics: Basic Science and Clinical Applications*, Second ed. Dekker, Newly-sur-Seine, France, pp. 196–212.

Galler, D., Unsicker, K., 1999. Regulation of the transmitter phenotype of rostral and caudal groups of cultured serotonergic raphe neurons. *Neuroscience* 88, 549–559.

Gerschenfeld, H.M., Puopartian-Triah, D., Dewere, F., 1981. Neuronal responses to serotonin: a second view. In: Jacobs, B.L., Gelperin, A. (Eds.), *Serotonin Neurotransmission and Behavior*. MIT Press, London, Chapter 4, pp. 103–130.

González-Burgos, I., Del Angel-Meza, A., Barajas-López, G., Feria-Velasco, A., 1996. Tryptophan restriction causes long-term plastic changes in corticofrontal pyramidal neurons. *Int. J. Dev. Neurosci.* 14, 673–679.

González-Burgos, I., Del Angel-Meza, A.R., Pérez-Vega, M.I., Feria-Velasco, A., 1998. Effect of tryptophan restriction on short-term memory. *Physiol. Behav.* 63, 155–169.

Gould, E., 1999. Serotonin and hippocampal neurogenesis. *Neuropsychopharmacol.* 21, 546–551.

Halliday, G., Harding, A., Pazinos, G., 1995. Serotonin and tachykinin systems. In: Paxinos, G. (Ed.), *The Rat Nervous System*. Academic Press, San Diego, CA, pp. 929–974.

Hernández, J., Chagoyra, G., 1986. Brain serotonin synthesis and Na⁺, K⁺ ATPase activity are increased postnatally after prenatal administration of L-tryptophan. *Dev. Brain Res.* 25, 221–226.

Hernández, J., Chagoyra, G., Chagoyra, G., 1989. Newborn humans and rats malnourished in-utero: free plasma L-tryptophan. *Brain Res.* 488, 1–13.

Hisatomi, K., Niyama, Y., 1980. Effects of postnatal undernutrition on the catecholamine and serotonin contents of suckling rat brain. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* 26, 279–292.

Hohmann, C.F., Harmon, R., Betschaw, M.L., Coyle, J.T., 1968. Transient postnatal elevation of serotonin levels in the mouse accumbens. *Brain Res.* 471, 163–169.

69

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

- Ishimura, K., Takeuchi, Y., Fujiwara, K., Yoshioka, H., Sawada, T., Kusunoki, T., 1989. Effects of undernutrition on the serotonin system in the developing brain: an immunohistochemical study. *Dev. Brain Res.* 50, 225–231.
- King, R.S., Kemper, T.L., DeBassio, W.A., Blatt, G.J., Ramzan, M., Roene, D.L., Gallen, J.R., 1999. Effect of prenatal protein malnutrition on birthdates and number of neurons in the rat locus coeruleus. *Neurosci.* 2, 267–276.
- Lauder, J.M., 1988. Neurotransmitters as morphogens. *Prog. Brain Res.* 73, 365–387.
- Lauder, J.M., Wallace, J.A., Krebs, H., Pemasz, P., McCarthy, K., 1982. In vivo and in vitro development of serotonergic neurons. *Brain Res. Bull.* 9, 605–625.
- Lidov, H.G., Molliver, M.E., 1982. Immunohistochemical study of the development of serotonergic neurons in the rat CNS. *Brain Res. Bull.* 9, 559–604.
- Manjarez, G., Chagoya, G., Hernández, J., 1988a. Perinatal brain serotonin metabolism in rats malnourished in utero. *Biol. Neonat.* 54, 232–240.
- Manjarez, G., Chagoya, G., Hernández, J., 1988b. Denervation of intracutaneous. Part II. 1-Trptófano-5-hidroxilasa y serotonina en el cerebro de rata. *Bol. Med. Hosp. Infant. Mex.* 45, 808–816.
- Manjarez, G., Chagoya, G., Hernández, J., 1994. Early nutritional changes modify the kinetics and phosphorylation capacity of tryptophan-5-hydroxylase. *Int. J. Dev. Neurosci.* 12, 695–702.
- Miller, S.A., 1970. Nutrition in the neonatal development of protein metabolism. *Fed. Proc.* 29, 1497–1502.
- Molliver, M.E., 1982. Role of monoamines in the development of the neocortex. *Neurosci. Res. Bull. Progr.* 20, 492–507.
- Molliver, M.E., 1987. Serotonergic neuronal system: what their anatomic organization tells us about function. *J. Clin. Psychopharmacol.* 7, 35–235.
- Morgane, P.J., Austin-LaFrance, R., Bronzino, J., Tonkiss, J., Diaz-Cintra, S., Cintra, L., Kemper, T., Gallen, J.R., 1993. Prenatal malnutrition and development of the brain. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 17, 91–128.
- Okada, N., Cheng, L., Teraszuga, Y., Hamada, S., Hamauchi, K., 1993. Synaptic loss following removal of serotonergic fibers in newly hatched and adult chickens. *J. Neurobiol.* 24, 687–693.
- Patinos, G., Watson, Ch., 1997. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. Academic Press, San Diego, CA, 1997.
- Pérez-Vega, M.I., Peña-Velasco, A., González-Burgos, I., 2000. Prefrontocortical serotonergic neurons, underlying a greater efficiency of short-term memory. *Brain Res. Bull.* 53, 291–300.
- Resnick, O., Morgane, P.J., 1989. Ontogeny of the levels of serotonin in various parts of the brain in severe protein malnourished rats. *Brain Res.* 303, 163–170.
- Rind, H.B., Russo, A.F., Whittemore, S.R., 2000. Developmental regulation of tryptophan hydroxylase messenger RNA expression and enzyme activity in the raphe and its target fields. *Neuroscience* 101, 665–677.
- Rubenstein, J.L., Beachy, P.A., 1998. Patterning of the embryonic forebrain. *Curr. Opin. Neurobiol.* 8, 18–26.
- Stern, W.C., Miller, M., Forbes, W.B., Morgane, P.J., Resnick, O., 1975. Ontogeny of the levels of biogenic amines in various parts of the brain and in peripheral tissues in normal and protein malnourished rats. *Exp. Neurol.* 49, 314–326.
- Tilast, A.H., Tikkanen, I.T., 1977. Maturation of the responses of brain 5-hydroxytryptamine turnover, plasma non-esterified fatty acids and corticosterone to stress during ontogeny. In: Vermedakis, A., Giacobini, E., Filogamo, G. (Eds.), *Maturation of Neurotransmission*. Karger, Basel, pp. 191–199.
- Tork, I., 1990. Anatomy of the serotonergic system. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 600, 9–35.
- Wright, T., de Léna, A.D., 1991. Serotonergic innervation of the ferret cerebral cortex. Part II. Postnatal development. *J. Comp. Neurol.* 314, 415–428.
- West, M., 1993. New stereological method for counting neurons. *Neurobiol. Aging* 14, 275–285.
- Whitaker-Azmitia, P.M., Druse, M., Walker, P., Lauder, J.M., 1996. Serotonin as a developmental signal. *Behav. Brain Res.* 73, 19–29.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN