



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

**FUNCIÓN NEUROTRÓFICA DE LA 5-HIDROXITRIPTAMINA DURANTE LA
ONTOGENIA DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL SOBRE EL SISTEMA
SEROTONÉRGICO Y MIGRACIÓN NEURONAL**

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA:
MARÍA GUADALUPE FLORES CRUZ

DIRECTOR DE TESIS
DR. ALFONSO ESCOBAR IZQUIERDO
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS
COMITÉ TUTOR
DRA. CAROLINA ESCOBAR BRIONES
DEPARTAMENTO DE ANATOMÍA
FACULTAD DE MEDICINA
DRA. ALICIA ELIZABETH HERNÁNDEZ ECHEAGARAY
UNIDAD DE INVESTIGACIÓN EN BIOMEDICINA
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

MÉXICO, D.F. MARZO DE 2013



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

Al Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, UNAM.

A la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA) de la UNAM.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Becario No. 203341).

Este trabajo se realizó con el apoyo presupuestal otorgado al Dr. Escobar (PAPIIT IN207510, DGAPA, UNAM; e institucional).

ÍNDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
ANTECEDENTES	3
Generalidades en la ontogenia	5
Ontogenia del sistema serotoninérgico	8
Desarrollo cortical prenatal	10
Establecimiento de la polaridad neuronal	13
Sistema serotoninérgico y ontogenia del sistema nervioso central	16
Depuración crónica de serotonina	17
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	19
OBJETIVOS	20
HIPÓTESIS	20
DISEÑO EXPERIMENTAL	21
MÉTODO	22
Sujetos	22
Aparatos	22
Materiales	23
Procedimiento	23
Gestaciones	23
Dieta sin triptófano o dieta experimental (EXP)	24
Dieta sin triptófano+triptófano o dieta control (CONT)	24
Dieta control (CHOW)	25
Sacrificios	25
Inmunohistoquímica	25
Conteo celular de neuronas positivas a TrpH	26
Evaluación de la densidad de inervación serotoninérgica	27
Western blot	27
Cromatografía líquida de alto desempeño (HPLC)	28
Tinción de Golgi-Cox	29
Tinción de Nissl	30
Campo abierto	30
Análisis estadístico	31
RESULTADOS	32
Evaluación de las dietas	32
Ratas gestantes	32
Ingesta durante la gestación	32
Partos	32
Crías	33
Peso cerebral y corporal	33
Concentración de serotonina cerebral total	35

Neuronas serotoninérgicas en el núcleo del rafe dorsal	35
Inervación serotoninérgica a la zona marginal: Células de Cajal-Retzius	39
Migración cerebral cortical: hipocampo	41
Polaridad neuronal cortical	45
Análisis conductual, campo abierto	48
DISCUSIÓN	53
CONCLUSIONES	62
REFERENCIAS	63
ANEXO 1	71
ANEXO 2	72
ANEXO 3	73

TABLA DE ABREVIATURAS

5HT	5-hidroxitriptamina
5HT1A	Receptor de serotonina de la familia 1, subtipo A
ApoER2	Receptor de apolipoproteína E (por sus siglas en inglés)
CRC	Célula de Cajal-Retzius
Dab1	Proteína adaptadora Disabled1
E	Día embrionario
GSK3B	Cinasa 3-B de sintasa de glicógeno (por sus siglas en inglés)
hTrp	Hidroxilasa de triptófano
IHQ	Inmunohistoquímica
kDa	Kilo Dalton
MAO	Monoaminoxidasa
NICD	Dominio intracelular de Notch1 (por sus siglas en inglés)
P	Día postnatal
pCPA	Para-cloro-fenil-alanina
PI3K	Cinasa de 3-fosfatidil-inositol (por sus siglas en inglés)
SERT	Transportador de serotonina
Shh	Sonic hedgehog
SNC	Sistema nervioso central
VLDLR	Receptor lipo-proteínico de muy baja densidad (por sus siglas en inglés)

RESUMEN

A principios de los 80's, en el pasado siglo, se sugirió que dada la temprana emergencia del sistema serotoninérgico durante la ontogenia, este podría desempeñar un rol "trófico" para el sistema nervioso en desarrollo, antes de funcionar como mediador de la comunicación química.

En el presente trabajo se propuso estudiar el efecto de la deficiencia prenatal crónica de triptófano dietético, precursor de la serotonina, sobre la morfología y población neuronal del principal núcleo serotoninérgico en la rata, el rafe dorsal, así como la presencia de alteraciones tanto en la migración neuronal cortical como en la polaridad celular, analizando los mecanismos moleculares subyacentes. Además de valorar la conducta en el campo abierto con el fin de determinar el efecto sistémico a largo plazo de dicha manipulación prenatal.

Se administró una dieta deficiente en triptófano a ratas gestantes durante los días 5 a 22 con el fin de disminuir la síntesis de serotonina. El grupo con deficiencia crónica de triptófano prenatal mostró menor número de neuronas serotoninérgicas en el rafe dorsal en comparación a los grupos control, así como modificación en la distribución de estas neuronas a lo largo del núcleo.

En las estructuras blanco del sistema serotoninérgico se presentaron alteraciones en la migración neuronal, entre las que se cuentan los cambios en el hipocampo, donde se encontró un número significativo de neuronas piramidales fuera de su capa; así como el establecimiento de la polaridad neuronal cortical. Estos eventos podrían estar asociados con la modificación en la señalización serotoninérgica en las células de Cajal-Retzius, responsables de la secreción de la proteína reguladora de la migración radial, la rielina, ya que se observó una mayor expresión de esta molécula en los animales privados de triptófano. A su vez, la rielina afecta la expresión de otra proteína crucial para el establecimiento de la polaridad neuronal, Notch1, misma que también presentó incremento en su expresión.

En el campo abierto, las ratas deficientes en triptófano dietético presentaron durante una mayor cantidad de tiempo las conductas de congelamiento y exploración horizontal y mostraron preferencia por una zona del mismo, evitando explorar la totalidad del mismo.

Por lo anterior, concluimos que el sistema serotoninérgico participa directamente en la regulación del desarrollo de su propio sistema, y de manera indirecta en los procesos de migración neuronal cortical y establecimiento de la polaridad neuronal durante la gestación.

ABSTRACT

At the beginning of the 8th decade of the past century, several observations about the early emergence of the serotonergic system during gestation lead to hypothesize that the serotonin could play a trophic role in the developing nervous system, before assume its known role as neuromodulator.

The aim of this work was to ascertain the effect of a chronic tryptophan deficiency during pregnancy on the morphology and neuronal population of the main serotonergic nucleus in the rat, the dorsal raphe; investigate the effect of the tryptophan deprivation on the neocortex and hippocampus, analyzing the pyramidal neuronal migration, cell polarity and their molecular mechanism. We also evaluate the long term effect of the prenatal manipulation on the behavior of the rats, employing the open field test.

With the purpose of reducing the serotonin synthesis, a tryptophan deficient diet was administered to pregnant rats from day 5 to 22. At birth, the number of serotonin producer neurons at dorsal raphe was diminished in the tryptophan deprived pups and the distribution of those neurons along the nucleus was modified.

We also observed that the target structures of the serotonergic system exhibited neuronal migration disturbances, such as ectopic pyramidal neurons in the hippocampus as well as in the establishment of the cortical neuronal polarity. Those events might be the result of a modification in the serotonergic signaling to Cajal-Retzius cells, neurons responsible of the secretion of a protein that regulates the neuronal migration, reelin protein. In the tryptophan deprived pups, the expression of reelin was increased. Reelin signaling also affects the expression of another crucial protein, involved in the establishment of neuronal polarity, Notch1; this protein expression was also increased in tryptophan deprived rats.

Prenatal deprived animals showed increased amount of time displaying behaviors such as freezing and rearing in the open field test. The trajectories displayed in the arena was also modified, those animals showed poor exploration across the field, preferring a narrow area to explore.

We conclude that the serotonergic system participates in the regulation of its own system development, and indirectly on the cortical neuronal migration and establishment of neuronal polarity processes.

ANTECEDENTES

La 5-hidroxitriptamina (5-HT) o serotonina es una monoamina formada por un anillo indol y una cadena carboxilo-amino terminal; por lo que se le clasifica como indolamina (Harding *et al.*, 2004). En el sistema nervioso (SN) se le considera un neurotransmisor clásico ya que cumple con los siguientes criterios: (a) se sintetiza en la neurona, (b) está presente en la terminal presináptica, (c) las vesículas que contienen al neurotransmisor vacían su contenido a la sinapsis en un proceso dependiente Ca^{2+} , en donde ejerce acción definida en la postsinápsis, (d) la administración del homólogo sintético reproduce los efectos del transmisor liberado de forma endógena y (e) posee un mecanismo para eliminarlo de la hendidura sináptica y para ser degradado (Schwartz, 2000).

La serotonina se sintetiza a partir del aminoácido esencial triptófano, que en mamíferos no se produce de forma endógena, sino que se obtiene de la dieta (Frazer & Hensler, 1999). Tanto en roedores como en el humano el triptófano circula en la sangre en forma libre o en unión con la albúmina; la forma libre representa aproximadamente del 10 al 20%. Este porcentaje depende de tres factores: (i) la tasa de lipólisis, (ii) la tasa de actividad de la pirrolasa de triptófano, paso limitante en la degradación del triptófano por la vía de la quinurenina, y (iii) la tasa de captura del triptófano en tejido central o periférico (Chaouloff, 1993).

Como se muestra en la **Figura 1**, la serotonina se sintetiza a partir del triptófano en dos pasos. El primer paso corresponde a la hidroxilación del triptófano por la enzima 5-monooxigenasa de triptófano, conocida también como hidroxilasa de triptófano; esta reacción requiere de oxígeno y tetrahidrobiopterina como co-substratos y el resultado es 5-hidroxitriptófano (5-HTP). El siguiente paso es la conversión del 5-HTP en 5-hidroxitriptamina o 5-HT por la enzima decarboxilasa de aminoácidos aromáticos (Frazer & Hensler, 1999; Hasegawa & Nakamura, 2010). Una vez que se sintetiza, la 5-HT se almacena en vesículas mediante transporte activo dependiente de un gradiente de H^+ (Frazer & Hensler, 1999).

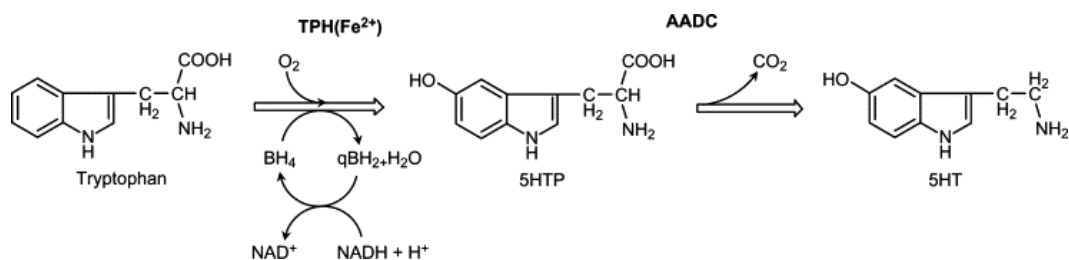


Figura 1. Biosíntesis de la serotonina a partir del aminoácido triptófano (Imagen tomada de Hasegawa & Nakamura, 2010).

La enzima hidroxilasa de triptófano está presente únicamente en las células que sintetizan 5-HT y su actividad es considerada el paso limitante en la síntesis del neurotransmisor (Chaouloff, 1993; Frazer & Hensler, 1999).

En el SNC los somas de las neuronas que sintetizan 5-HT están distribuidos en nueve núcleos en el tallo cerebral, llamados complejo B1-B9 según la clasificación establecida por Dahlström y Fuxe en 1964. En la **Tabla I**, a continuación, puede observarse a qué núcleos corresponde esta clasificación.

Nomenclatura <i>Dahlström & Fuxe, 1964</i>		Núcleo correspondiente <i>Jacobs & Azmitia, 1992; Frazer & Hensler, 1999</i>
Núcleos caudales	B1	Núcleo del rafe pálido, porción caudal ventrolateral del bulbo raquídeo
	B2	Núcleo del rafe <i>obscurus</i>
	B3	Núcleo del rafe magno, porción rostral ventrolateral del bulbo raquídeo y núcleo reticular paragigantocelular
	B4	Porción dorsolateral del núcleo del rafe <i>obscurus</i>
Núcleos rostrales	B5	Porción caudal del núcleo del rafe mediano
	B6	Porción caudal del núcleo del rafe dorsal
	B7	Porción rostral del núcleo del rafe dorsal
	B8	Porción rostral del núcleo del rafe mediano, núcleo caudal lineal y núcleo <i>pontis oralis</i>
	B9	Región supralemniscal del núcleo <i>pontis oralis</i>

Tabla I. Nomenclatura de los núcleos serotoninérgicos de acuerdo a la clasificación de Dahlström & Fuxe.

Generalidades en la ontogenia

La formación del sistema nervioso requiere del trabajo orquestado de múltiples genes, que permiten la secreción de moléculas por parte de distintos grupos celulares; esta secreción diferencial genera una señalización asimétrica que afecta de manera distinta a otros grupos celulares. La señalización asimétrica se traduce en respuestas celulares específicas, es decir, distintos patrones de respuesta (Darnell, 2005). Las señales asimétricas pueden provenir de tejidos embrionarios vecinos cuya diferenciación temprana los ha transformado en centros señalizadores. Si estos centros pueden inducir tanto diferenciación como formación de patrones en tejido (o campos celulares) indiferenciados, se les llama organizadores (Darnell, 2005).

El sistema nervioso central (SNC) de los cordados en desarrollo posee varios centros organizadores, indispensables para la generación de los distintos linajes celulares; son ejemplos de ellos la placa del piso en la línea media ventral y el istmo en los límites del mesencéfalo y el rombencéfalo. La especificación del eje dorsal-ventral se establece gracias a la secreción del morfógeno sonic hedgehog (shh) por la notocorda y el mesodermo dorsal, inducida por los factores de transcripción Goosecoid y el factor nuclear del hepatocito-3 β (HNF-3 β) (Darnell, 2005).

Como se muestra en la **Figura 2**, shh establece un gradiente a lo largo del tubo neural. La presencia de shh en la zona ventral, inhibe la expresión de los genes de caja pareada (Pax¹) 3 y 7, que originalmente se expresaban en todo el tubo neural y después lo hacen en la porción dorsal. Por otra parte, shh promueve la expresión de Pax6 en la zona ventral (Darnell, 2005).

En el neuroectodermo ventral con elevada concentración de Pax6, shh inhibe la expresión de los factores de transcripción y genes homeóticos² Dbx1, Dbx2, Irx3 y Pax6, y por otro lado induce la expresión de factores de transcripción que “ventralizan” a las células, como los genes homeóticos NKx2.2 y Nkx6.1 (Darnell, 2004).

¹ Los genes de caja pareada (Pax) son una familia de factores de transcripción que poseen un dominio pareado de unión al ADN y un dominio C-terminal de transactivación. La expresión de los genes Pax muestra patrones de expresión espacio-temporal dinámicos, y coordinan junto con otros factores, el desarrollo regional del SNC, especificando los subtipos neuronales y regulando la diferenciación y migración neuronal (Thompson & Ziman, 2011).

² Los genes homeóticos están caracterizados por poseer una secuencia específica (la caja homeótica), que codifica a un dominio (homeodominio) proteínico de aproximadamente 60 aminoácidos. Estas proteínas son factores de transcripción con funciones importantes durante el desarrollo, que van del establecimiento del patrón embrionario a la diferenciación celular (Holland et al., 2007).

Esta combinación localizada de expresiones de factores de transcripción proporciona la información necesaria para diferenciar adecuadamente a los tipos celulares para cada región.

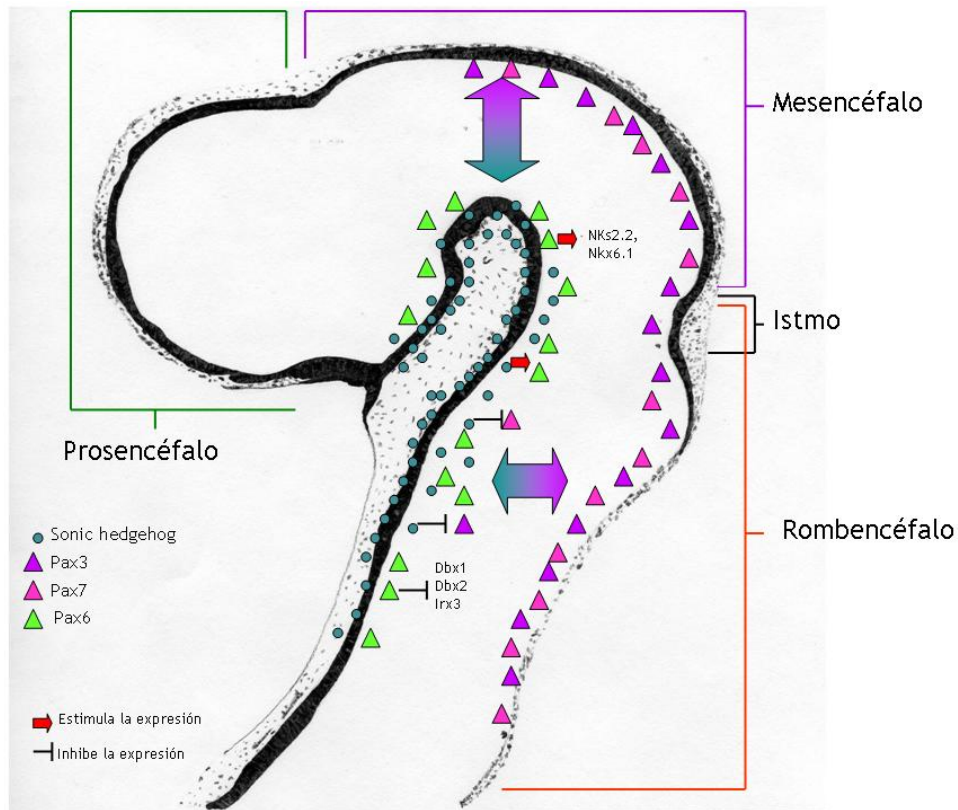


Figura 2. Establecimiento del eje dorsal-ventral en el embrión. En los cordados, la capa embrionaria más superficial, el ectodermo, se transforma en neuroectodermo y posteriormente en tubo neural. El tubo neural es la estructura embrionaria que da origen al sistema nervioso central, y debido a la forma de esta estructura, existen regiones más cercanas al mesodermo (en la imagen, del lado de la flexura) y otras distantes. La notocorda secreta al morfógeno sonic hedgehog (shh) (círculos azules), que promueve la diferenciación de los neuroblastos en motoneuronas y cuatro tipos distintos de interneuronas, además de que estimula la expresión de Pax6 (triángulos verdes), que en la región prosencefálica participa en la formación de los ojos. El morfógeno shh inhibe también la expresión de Pax3 y Pax7 (triángulos lilas y rosas), limitando su expresión a la región dorsal del tubo neural; de esta forma, la concentración elevada de shh ventraliza al neuroectodermo mientras que la baja concentración del morfógeno lo “dorsaliza”. Imagen tomada de Flores-Cruz & Escobar, 2012.

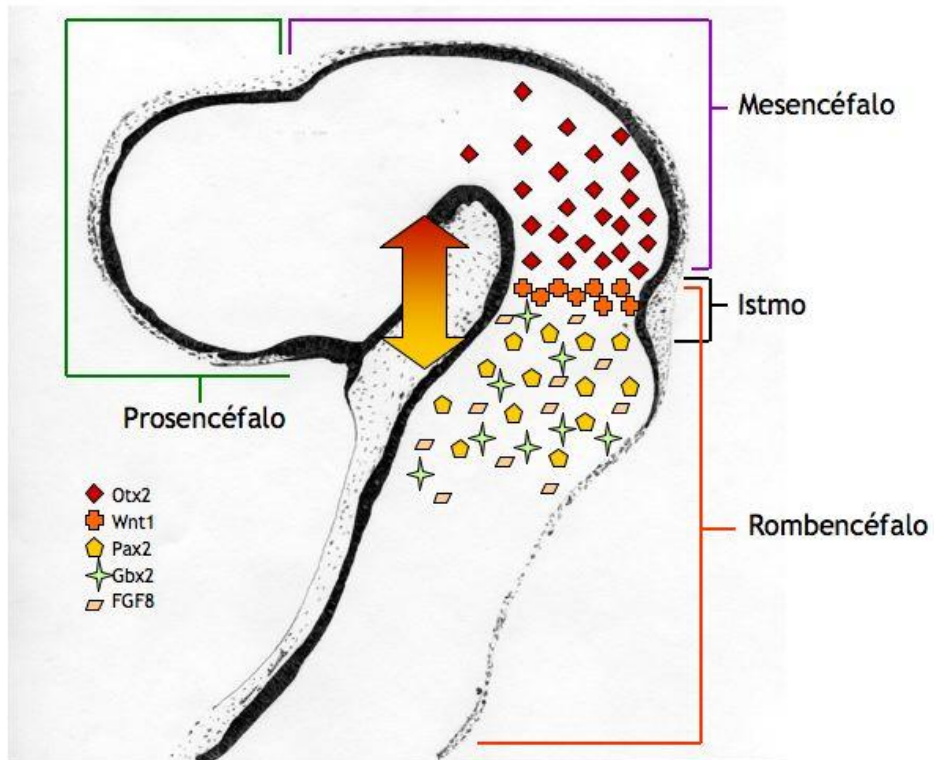


Figura 3. Establecimiento del eje antero-posterior en el embrión. El gen *Otx2* (rombos rojos) se expresa en el ectodermo rostral aun antes de la neurulación y es necesario para la diferenciación del prosencéfalo y mesencéfalo. *Otx2* inhibe la expresión del factor de crecimiento de fibroblastos 8 o FGF8 (trapezoides crema) en la región del rombencéfalo, ya que en animales carentes de *Otx2* este se expresa de forma extensa en el tubo neural. En la zona del istmo se expresa el gen *Wnt1* (cruces naranja), que induce la formación del mesencéfalo y del cerebelo; finalmente en el rombencéfalo se expresan *Gbx2* (estrellas verdes), que permite el desarrollo de las rombómeras (subdivisiones anatómo-funcionales del rombencéfalo) 1 a 3, *Pax2* (pentágonos amarillos) y FGF8. Imagen tomada de Flores-Cruz & Escobar, 2012.

El patrón antero-posterior (**Figura 3**) se establece gracias a una compleja interacción de genes que construyen el centro organizador del istmo u organizador mesencefálico-rombencefálico (Vitalis *et al.*, 2005). El organizador del istmo provee una interfase de moléculas de señalización que funcionan como señales asimétricas relacionadas con el establecimiento del eje antero-posterior. Las señales asimétricas son *Otx2*, que se expresa anterior al istmo, en la zona del mesencéfalo (Acampora & Simeone, 1999); *Wnt1*, que se expresa en el istmo y, en la región posterior del istmo se expresan los factores de transcripción *Pax2* y *Gbx2* (gen homeótico) y el factor de crecimiento de fibroblastos 8 (FGF8) (Darnell, 2004).

Ontogenia del sistema serotoninérgico

Los precursores de las neuronas 5-HT se generan en dos dominios ventrales en el rombencéfalo anterior por la interacción de FGF8 y el factor ventralizante shh (Simon *et al.*, 2005); los dominios se localizan entre las rombómeras 1 a 3 para el grupo rostral y las rombómeras 5 a 7 para el grupo caudal (Krueger & Deneris, 2008).

El factor de transcripción homeótico LIM1b (Lmbx1b) junto con la quinta variante Ewing (FEV; Pet1) inducen la diferenciación de las neuronas 5-HT ya que su supresión inhibe la generación y diferenciación de las neuronas serotoninérgicas y las neuronas no se diferencian ni logran generarse en fases posteriores del desarrollo (Krueger & Deneris 2008; Simon *et al.*, 2005).

La expresión de Pet1 en el rombencéfalo de ratón comienza entre los días de desarrollo embrionario (E) 10.5 y E11 en el dominio rostral y aproximadamente un día más tarde en el dominio caudal (Krueger & Deneris, 2008). Pet1 se expresa en todas las neuronas 5-HT de manera sostenida desde la vida embrionaria hasta la vida adulta (Hendricks 1999; Liu *et al.*, 2010) e interactúa con Lmbx1b para diferenciar a las neuronas serotoninérgicas durante la ontogenia (Krueger & Deneris, 2008). En humanos, el gen ortólogo de Pet1 es FEV; este gen posee una secuencia similar en 96% con Pet1, y se expresa específicamente en los núcleos del rafe humanos (Iyo *et al.*, 2005)

Los factores de transcripción engrailed-1 y engrailed-2 son necesarios para la formación del núcleo dorsal del rafe o B6-B7; la supresión de ambos no afecta la generación del núcleo mediano, por lo que se sugiere que los genes engrailed-1 y -2 codifican información posicional para grupos específicos (Simon *et al.*, 2005).

Tanto en roedores como en el ser humano, las neuronas serotoninérgicas concluyen la mitosis final mucho antes que otras líneas neuronales; en roedores esto ocurre entre los días E12 a E14 (Jacobs & Azmitia, 1992), mientras que en el ser humano, ocurre aproximadamente entre la quinta y doceava semanas de gestación (Azmitia, 2004; Herlenius & Lagercrantz, 2004). En la rata, las primeras neuronas positivas a 5-HT se observan en E12; estas neuronas serán parte del grupo B4-B9 o grupo serotoninérgico rostral (Wallace & Lauder, 1983). El grupo B1-B3 o grupo caudal se detecta aproximadamente dos días después del primero, aproximadamente en E14 (Wallace & Lauder, 1983; Jacobs & Azmitia, 1992).

En roedores el pico de proliferación de las neuronas 5-HT ocurre en E15 (Wallace & Lauder, 1983; Lauder *et al.*, 1982), a este evento le siguen 4 fases hasta concluir el desarrollo del sistema en el día postnatal (P)21, estas son: 1) diferenciación de las neuronas serotonérgicas, agregación en núcleos y aparición de un primitivo árbol dendrítico, 2) formación primaria de vías, 3) formación selectiva de vías y 4) formación de campos terminales (Lidov & Molliver, 1982).

En cuanto a los receptores, uno de los más estudiados tanto en los roedores como en el hombre es el receptor 5-HT₁, que es detectable en el prosencéfalo a partir de E14.5 en la mayoría de sus variantes. El receptor 5HT_{1A} se expresa abundantemente entre E14.5 a E16.5 en el tálamo, hipocampo y de manera asimétrica en la corteza, esto es en un gradiente medial-lateral; el receptor 5HT_{1B} se detecta en estas mismas edades en la región lateral del tálamo dorsal y el cuerpo estriado mientras que el 5HT_{1D} se sobre-expresa en todo el tálamo en las mismas edades y decae para el momento del nacimiento. En cuanto al receptor 5HT_{1F} este se detecta en todas las regiones proliferativas, tales como la zona ventricular cortical, las eminencias gangliónicas (EG) y las porciones mediales del tálamo. Esta distribución diferenciada de los receptores 5HT_{1A} sugiere una mediación o modulación de aspectos distintos del desarrollo neuronal o de la proliferación celular, ya sea glial o neuronal (Bonnin *et al.*, 2006).

En el feto humano los receptores 5HT_{1A} están expresados entre 3 a 6 veces más que en el adulto entre las semanas dieciséis de gestación a la segunda postnatal y exhiben un patrón de distribución similar al adulto (Murrin *et al.*, 2007), por lo que se considera que las funciones que se le atribuyen al receptor en roedores es similar en el ser humano.

Durante el desarrollo se observa mayor expresión del transportador de serotonina (SERT) comparado con los roedores adultos, además de que no solo se localiza en las neuronas serotonérgicas sino que también en la vía tálamo-cortical. SERT se localiza en la vía tálamo-cortical en la segunda semana de vida postnatal en roedores y entre la doceava y catorceava semana de gestación en el hombre (Verney *et al.*, 2002). El aumento en la expresión de SERT se cree que está relacionada con el ajuste adecuado de los mapas sensoriales en los roedores durante el desarrollo, en donde la serotonina actuaría como un “neurotransmisor prestado” (Herlenius &

Lagercrantz, 2004) indispensable para la formación de los barriles que representan a cada vibrisa facial en la corteza somatosensorial (Gaspar *et al.*, 2003; Luo *et al.*, 2003; Vitalis & Parnavelas, 2003; Vitalis *et al.*, 2007).

En un experimento en roedores en donde se administró durante este periodo un inhibidor de las monoamino-oxidasas, enzimas encargadas de la degradación de 5-HT, se observó acumulación del neurotransmisor y se suprimió la formación de los barriles (Luo *et al.*, 2003), por lo que se concluyó que el mantenimiento de un nivel adecuado de serotonina es indispensable para la presencia de los barriles en la corteza somatosensorial.

Desarrollo cortical prenatal

Durante el desarrollo prenatal, las células neuroepiteliales que rodean la zona ventricular del tubo neural sufren dos tipos de división celular, simétrica y asimétrica. La primera les permite aumentar la población de progenitoras siempre y cuando se mantengan con el fenotipo neuroepitelial, mientras que la división asimétrica se da una vez que las células neuroepiteliales adquieren el fenotipo glial, (y se les conoce como glía radial) (Casanova & Trippe, 2006). La división asimétrica produce dos tipos celulares: una célula progenitora con el fenotipo de glía radial y una célula hija que poblará la corteza cerebral (Kriegstein *et al.*, 2006).

Las células hija, producto de la división asimétrica, migran de forma radial en dirección contraria al neuroepitelio y forman la primer lámina cortical o preplaca. La placa cortical se constituye a partir de la preplaca, cuando esta última se divide en dos regiones, una superficial llamada zona marginal y otra profunda llamada subplaca (Sùper *et al.*, 1998). Cuando nuevas oleadas de neuroblastos migran hacia la placa cortical, esquivan a las neuronas generadas previamente y se colocan por encima de ellas (ver **Figura 4**); así, en la corteza cerebral, las capas más profundas son las primeras en formarse mientras que las más superficiales, con excepción de la capa I, son las más tardías (Kriegstein & Noctor, 2004). A este patrón de migración se le conoce como “inside-out” (dentro-hacia-afuera) (Sùper *et al.*, 2000).

Durante el desarrollo cortical prenatal, la zona marginal contiene al menos dos tipos de neuronas conocidas como células pioneras o subpiales, estas pueden ser de

dos tipos: células de Cajal-Retzius (CRc), de tamaño grande y positivas a rielina (en la Figura 4, en verde), y las neuronas granulares grandes de la zona marginal, localizadas en la región profunda de la zona marginal, estas últimas no son positivas a rielina (Tissir *et al.*, 2002).

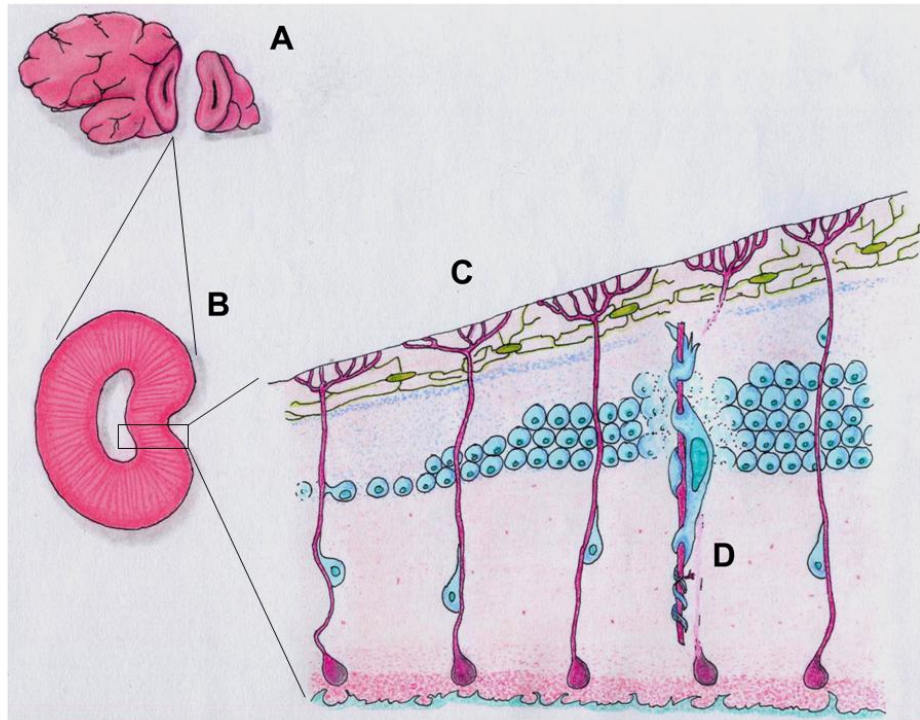


Figura 4. Migración radial en la corteza cerebral. **(A)** La corteza cerebral está formada por 6 capas celulares bien diferenciadas, compuestas principalmente por interneuronas y neuronas piramidales. Las neuronas piramidales corticales se generan en el telencéfalo dorsal, mientras que las interneuronas se generan en la zona y subzona ventriculares del telencéfalo ventral, en la eminencia gangliónica. Si se tomara una sección de la corteza en desarrollo **(B)** se podrían apreciar las distintas regiones de la corteza así como apreciarse la migración neuronal **(C)**. La migración neuronal puede ser radial o tangencial; la migración radial emplea a la glía radial (en rosa) mientras que en la tangencial las neuronas migran paralelamente a la superficie cortical. La migración radial permite el patrón citoarquitectónico “dentro-hacia-afuera”, en donde las neuronas pioneras (como las células de Cajal-Retzius mostradas en verde) permanecen en la zona marginal (ZM) de la corteza en desarrollo mientras que las oleadas de neuroblastos (en azul) generados en la zona subventricular (ZSV) se desplazan hacia la zona marginal guiados por la glía radial **(D)**. A medida que nuevos neuroblastos arriban a la placa cortical, se colocan por encima de los neuroblastos que arribaron previamente, justo por debajo de la zona marginal. Imagen modificada de Flores-Cruz & Escobar, 2011.

La rielina es una glicoproteína extracelular grande, de aproximadamente 400kDa (Jossin *et al.*, 2003) que durante el desarrollo prenatal indica a las células que migran radialmente en la corteza, cerebelo y tallo cerebral en donde detenerse, de esta forma controla la formación de las capas corticales (Luhmann *et al.*, 2003 Sùper *et*

al., 1998, Douglas *et al.*, 2005, Polleux & Anton, 2005, Ross & Walsh, 2001; Marín-Padilla, 1998; Del Río *et al.*, 1997). La rielina también contribuye con el mantenimiento de la glía radial, ya que en ausencia de las CRC, la glía radial tiene una vida promedio más corta y presenta un patrón desorganizado con respecto a zonas marginales con sinapsis normales CRC-glía radial (Soriano & Del Río, 2005).

La corteza cerebral de los ratones que carecen de rielina (mutantes *reeler*), exhibe un patrón citoarquitectónico invertido, es decir, que pierde el patrón de migración “dentro-hacia-fuera” (Rice & Curran, 2001). También la mutación de los genes que codifican para las proteínas *Disabled 1* (Dab1), *Very low density lipoprotein receptor* (VLDLR) y *Apolipoprotein E receptor 2* (ApoEr2) produce un fenotipo similar al *reeler*.

La vía de señalización de la rielina comienza con la unión de esta molécula a los receptores ApoER2 y VLDLR, esto provoca la activación de la proteína adaptadora citoplasmática Dab1 por fosforilación de residuos de tirosina. La unión de la rielina a un monómero no es suficiente para inducir la señalización, se requiere del agrupamiento de ApoER2 y VLDR en la membrana plasmática por medio de la unión de oligomérica de rielina (Jossin *et al.*, 2003). Además, la fosforilación de de Dab1 lleva al reclutamiento de el complejo *lissencephaly1* (LIS1), que participa en la regulación de la laminación cortical y la migración neuronal (Herz & Chen, 2006; Jossin *et al.*, 2003).

A pesar de que varios estudios han colocado a la rielina, a los receptores a rielina ApoER2 y VLDLR, y a la proteína adaptadora Dab1 como elementos esenciales en la misma vía de señalización de las neuronas en migración (Valiente & Marín, 2010), todavía se desconoce el mecanismo molecular preciso por medio del cual la rielina controla los procesos antes señalados.

Establecimiento de la polaridad neuronal

El término polaridad celular hace referencia a la organización asimétrica de los componentes estructurales y las propiedades funcionales de una célula (Bradke & Dotti, 2000). Una vez que las neuronas alcanzan su destino final, sufren cambios en su morfología que les permiten establecer conexiones funcionales. La polarización neuronal implica la formación de un axón único y múltiples dendritas (Tahirovic & Bradke, 2009), por lo que el establecimiento de la polaridad neuronal es un evento crucial en el desarrollo cerebral.

La polarización neuronal depende de múltiples mecanismos intracelulares y señales moleculares, estas últimas incluyen también a las señales extracelulares. El sitio propuesto en donde la cascada de señalización converge es el citoesqueleto (Tahirovic & Bradke, 2009). Los elementos que lo constituyen, filamentos y microtúbulos, poseen propiedades funcionales ideales para determinar y regular la polaridad. Algunas de las vías de señalización propuestas como reguladoras de las dinámicas del citoesqueleto y por extensión de la polaridad celular son las siguientes: señalización lipídica, señalización de la cinasa GSK-3B (Jiang et al., 2005), señalización de las proteínas de partición defectuosa –PAR- (Ossipova & Sokol, 2010) y la vía de transducción de señales de la Rho GTPasa (Bradke & Dotti, 2000; Tahirovic & Bradke, 2009).

La cascada de señalización de Notch (ver **Figura 5**) se inicia cuando un miembro de la familia DSL (Delta, Serrato y Lag-2) se une al receptor de membrana Notch; en *Drosophila*, los ligandos son Delta y Serrato, mientras que en mamíferos los nombres correspondientes son Delta y Jagged, de los que hay varios subtipos (Lai, 2004). La unión del ligando con el receptor induce una serie de cambios proteolíticos en este último, que finalmente llevarán a la generación de dos fragmentos de Notch: p180, que contiene la mayor parte del dominio extracelular y p120, un dominio intracelular de Notch (NICD) (Redmond *et al.*, 2000). NICD viaja al núcleo y funciona como factor de transcripción al unirse a las proteínas CSL adaptadoras (CBF1, Su(H) y LAG-1) (Jarriault *et al.*, 1995; Krahn & Wodarz, 2009).

La cascada de señalización de Notch1 participa en la regulación de la neurogénesis, la apoptosis y la morfogénesis dendrítica. Mientras que la modulación de la señalización de Notch1 reduce la expresión de procesos primarios y disminuye la arborización dendrítica, el aumento de la señalización de Notch1 reduce la longitud dendrítica promedio (Redmond *et al.*, 2000). Debido que Notch1 se expresa especialmente en la zona marginal cortical durante el desarrollo, y que en animales Knock-out (KO) para rielina la expresión del fragmento NICD esta severamente reducida (Hashimoto-Tori *et al.*, 2008, Sibbe *et al.*, 2009), se sugiere que puede existir una interacción entre la señalización de rielina y Notch1.

Otro hallazgo que contribuyó a esclarecer la interacción entre la rielina y Notch1 fue la posibilidad de rescatar el fenotipo neuronal anormal en ratones *reeler*; en este mutante, algunas neuronas exhiben dendritas orientadas anormalmente, pero si el dominio NICD se sobre-expresa en las neuronas del animal *reeler*, se recuperan las características dendríticas normales (Hashimoto-Tori *et al.*, 2008).

Los mecanismos moleculares por los que presumiblemente la rielina regula la disponibilidad del fragmento NICD involucra a la actividad del receptor para rielina Dab1 ya sea por vía de la inhibición de la ubiquitinación y degradación por el proteasoma (Hashimoto-Tori *et al.*, 2008; Sibbe *et al.*, 2009), así como la estimulación de la actividad de la secretasa gamma, responsable del cortado de Notch1 cuando se une con su ligando (Keilani & Sugaya, 2008; Sibbe *et al.*, 2009) (**Figura 5**).

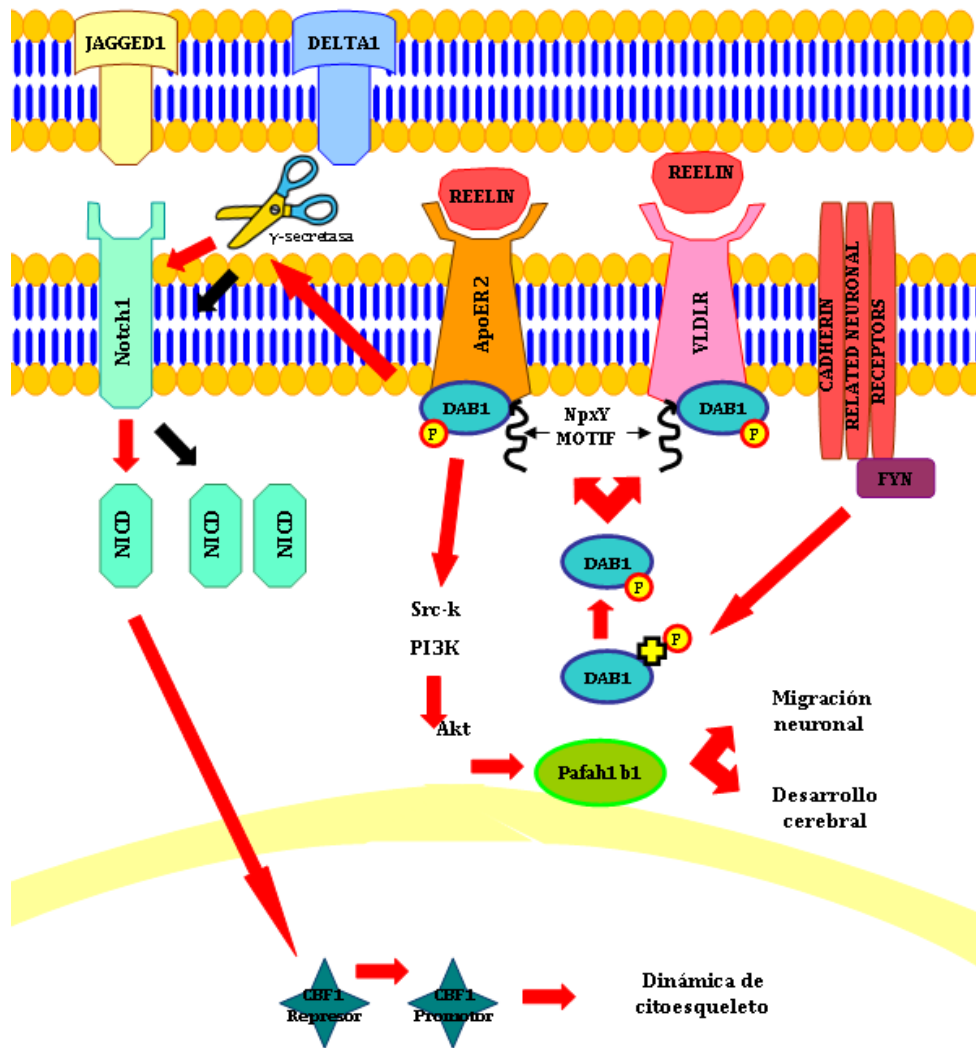


Figura 5. Convergencia entre las cascadas de señalización de rielina y Notch 1. Las células de Cajal-Retzius, que pueden verse en la Fig. 4, secretan la proteína difusible rielina, que se une a los receptores de membrana ApoER2 y VLDLR, y activan a la proteína adaptadora Dab1. La formación de un complejo formado por la rielina, el receptor, y la proteína adaptadora es necesaria para que se recluten las cinasas de la familia SRC (Src-k), además de la transfosforilación adicional de residuos de Dab1, lo que permite el reclutamiento y activación de cinasas de tirosina. El reclutamiento de las cinasas Src-k activa una cascada de cinasas citosólicas, comenzando con la cinasa de 3-fosfatidil-inositol (PI3K) y terminando con la inhibición de la cinasa 3 β de sintasa de glicógeno (GSK3 β), una de las principales cinasas que fosforilan a Tau. La fosforilación de Dab1 promueve la actividad γ -secretasa, con el consecuente incremento en el procesamiento de Notch1 (flechas negras). Notch1 durante el desarrollo cortical se relaciona con la diferenciación celular, además de regular la especificación de la morfología dendrítica cortical, considerándola una proteína importante en el establecimiento de la polaridad neuronal. Los ligandos de Notch1 son Jagged1 y Delta1, la unión de estos al receptor resulta en actividad proteolítica, con la que se obtiene un dominio extracelular inactivo y uno intracelular (NICD). NICD migra al núcleo, donde se desempeña como factor de transcripción regulando la dinámica de citoesqueleto.

Sistema serotoninérgico y ontogenia del sistema nervioso central

Durante el neurodesarrollo la disponibilidad de serotonina parece regular la morfología del sistema serotoninérgico, como lo sugieren diversos hallazgos en donde la exposición prenatal a talidomida o ácido valpróico en roedores produce hiperserotonemia sistémica, cambios en la distribución del núcleo del rafe dorsal y escasa inervación serotoninérgica en todo el SNC (Konno *et al.*, 2004; Narita *et al.*, 2002). Esto sugiere que la inervación serotoninérgica está regulada por gradientes de concentración del neurotransmisor.

El cono de crecimiento de las neuronas serotoninérgicas es una región con una abundante expresión de SERT, se propone que los conos de crecimiento reaccionan de acuerdo a la concentración de serotonina en el espacio extracelular (Igy-May *et al.*, 2004): una concentración elevada de serotonina se traduciría en una señal de quimio-repulsión, ya que indica la presencia de inervación serotoninérgica en esa zona, mientras que baja concentración de serotonina en el espacio extracelular indica que se trata de un sitio sin inervación previa y constituye una señal de quimio-atracción para los conos de crecimiento (Whitaker-Azmitia, 2001).

Lo anterior podría ocurrir también durante la migración de las neuronas serotoninérgicas desde su sitio de origen, como se sugiere en el trabajo de Konno y colaboradores (2004), en donde la administración de ácido valpróico o talidomida produjo hiperserotonemia y un cambio en la distribución de las neuronas serotoninérgicas del núcleo del rafe dorsal o B6-B7. En este trabajo no se modificó el número de neuronas productoras de serotonina, sino que se observó un mayor número de ellas en la región caudal del núcleo, y menos en la parte anterior.

Otro proceso en el que la serotonina participa durante la ontogenia es en la formación de las estructuras blanco del sistema serotoninérgico (Whitaker-Azmitia *et al.*, 1996; Whitaker-Azmitia, 2001; Luo *et al.*, 2003; Janusonis *et al.*, 2004). La administración de para-clorofenilalanina (pCPA), inhibidor de la síntesis de serotonina, retrasa la neurogénesis de las estructuras blanco del sistema 5-HT (Whitaker-Azmitia *et al.*, 1996) y modifica la expresión postnatal de receptores para 5-HT en las mismas estructuras (Lauder, 1996).

En roedores, durante la formación de los barriles que representan a cada vibrisa en la corteza somatosensorial, es indispensable mantener un nivel adecuado de serotonina para su aparición. La administración de inhibidores de la enzima que degrada a la 5-HT provoca acumulación del neurotransmisor y suprime la formación de los barriles (Luo *et al.*, 2003), como ya fue mencionado.

En otras estructuras blanco del sistema serotoninérgico la administración crónica durante la gestación de 5-metoxitriptamina (agonista inespecífico del sistema serotoninérgico) tuvo como consecuencia el desarreglo columnar en la capa subgranular de la corteza presubicular y disminución en la expresión de rielina cerebral (Janusönis *et al.*, 2004). En el trabajo antes descrito, los autores le adjudicaron las anomalías en la migración neuronal al incremento en la actividad de los receptores serotoninérgicos en las células de Cajal Retzius (CRc), ya que estas últimas reciben innervación serotoninérgica desde el día E17. Estos hallazgos indican que durante la migración neuronal, el mantenimiento constante de los niveles de 5-HT en las estructuras laminadas contribuye al adecuado arreglo citoarquitectónico en la corteza presubicular a través de un mecanismo indirecto que involucra a la rielina.

Depuración crónica de serotonina

Actualmente existen varias opciones para disminuir el contenido de serotonina en el SNC, como la manipulación farmacológica y la dieta deficiente en triptófano, con el fin de estudiar los procesos en los que se considera que la serotonina está involucrada. La manipulación farmacológica consiste en la administración de pCPA, (inhibidor de la síntesis de 5-HT por unión irreversible con la hidroxilasa de triptófano (Haring & Yan, 1999)), o de agentes neurotóxicos serotoninérgicos como la 5,7-dihidroxitriptamina (5,7-DHT) y la paracloroanfetamina -pCA- (Yan *et al.*, 1997; Haring & Yan, 1999). La eficacia máxima de la disminución por pCPA es de 82 - 88% después de 3 a 5 días de administración (Jha *et al.*, 2006; Prinssen *et al.*, 2002). Sin embargo, esta administración afecta significativamente el nivel de noradrenalina, reduciéndolo hasta en un 56% (Jha *et al.*, 2006). Adicionalmente, la pCPA inhibe la síntesis de proteínas por hiperfenilalaninemia, debida a la inhibición irreversible de la hidroxilasa de fenilalanina (Lepetit *et al.*, 1991), de tal forma que se presenta una marcada

reducción en el volumen cerebral después de la administración crónica del mismo (Lepetit *et al.*, 1991).

El déficit de serotonina inducido a través de la dieta consiste en la administración de una dieta nula en triptófano (Thomas & Wysocki, 1967) o con baja concentración de triptófano y rica en aminoácidos esenciales de alto peso molecular, que compiten por el transportador tipo L de aminoácidos para ingresar al SNC (Van der Does, 2001; Booij *et al.*, 2005). Estas dietas provocan disminución en la concentración de serotonina en el intestino delgado, colon y cerebro (Thomas & Wysocki, 1967). El maíz es un ingrediente base para las dietas deficientes en triptófano, provoca en los animales alimentados con estas dietas una marcada reducción en el peso corporal y decremento en el nivel de serotonina en el SNC (Lytle *et al.*, 1975; Fernstrom & Hirsch, 1977).

Con la administración postnatal de dietas en donde se restringe al triptófano en la formulación, se han encontrado cambios plásticos en la arborización dendrítica de neuronas piramidales de la corteza frontal (González-Burgos *et al.*, 1996) y reducción en el número de espinas dendríticas en neuronas piramidales del área CA3 del hipocampo (Zhang *et al.*, 2006).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En los antecedentes se muestra que la serotonina interviene durante la ontogenia del SNC como modulador para el desarrollo del propio sistema serotoninérgico de manera directa (Konno *et al.*, 2004; Narita *et al.*, 2002), mientras que de manera indirecta modula el desarrollo de estructuras blanco del sistema 5-HT como la corteza presubicular (Janusonis *et al.*, 2004) y el área somatosensorial de la corteza en roedores (Luo *et al.*, 2003).

En un trabajo previo de nuestro grupo de trabajo, se observaron alteraciones en la migración neuronal en la neocorteza e hipocampo (neuronas ectópicas y en posiciones aberrantes) de ratas alimentadas prenatal y postnatalmente con una dieta pobre en triptófano elaborada con maíz (Flores-Cruz, 2006). En el presente trabajo, se propone estudiar el efecto de la deficiencia crónica de triptófano durante el desarrollo del sistema 5-HT, evaluando directamente la morfología y topografía del principal núcleo serotoninérgico (el núcleo del rafe dorsal), la densidad de inervación serotoninérgica en el SNC y el contenido de serotonina cerebral; así como los posibles trastornos en la migración neuronal, que pueden expresarse a través de desarreglos citoarquitectónicos en la neocorteza y la arquicorteza.

OBJETIVOS

Objetivo General

Estudiar los efectos de la deficiencia prenatal de triptófano dietético sobre la ontogenia del sistema 5-HT y la corteza cerebral de ratas.

Objetivos Específicos

1. Estudiar los efectos de la deficiencia crónica de triptófano sobre la morfología y número de neuronas inmunorreactivas a hidroxilasa de triptófano en el núcleo del rafe dorsal.

2. Estudiar los efectos de la deficiencia prenatal de triptófano en los procesos de migración y establecimiento de la polaridad de neuronas piramidales neo- y arquicorticales.

3. Caracterizar la influencia de la 5-HT en la expresión de proteínas implicadas en la migración neuronal: Notch1 y rielina.

4. Evaluar las posibles alteraciones en la conducta en el campo abierto de los roedores sometidos a privación prenatal de triptófano dietético.

HIPÓTESIS

1. El número de neuronas positivas a hidroxilasa de triptófano en el núcleo del rafe dorsal será menor en el grupo deficiente de triptófano dietético en comparación con los animales control.

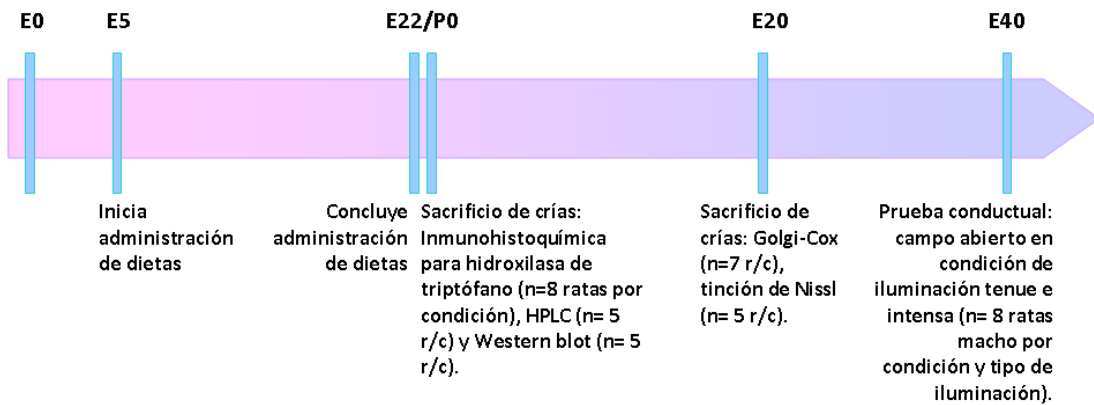
2. Se presentarán cambios discretos pero persistentes en la citoarquitectura cortical, tales como alteraciones en la polaridad neuronal de las células piramidales corticales así como desórdenes en la migración neuronal, esto es, en la laminación cortical.

3. Se presentará alteración en la expresión de la proteína rielina, así como del factor de transcripción vinculado con la expresión de rielina, Notch1.

4. De encontrarse alteraciones citoarquitectónicas en los animales sometidos a privación crónica de triptófano prenatal, podrían observarse alteraciones conductuales en el campo abierto.

DISEÑO EXPERIMENTAL

RATAS GESTANTES	Depuración de triptófano	Dieta sin triptófano ó experimental (EXP)
	Sin depuración de triptófano	Dieta sin triptófano + triptófano (CONT)
		Dieta chow (CHOW)



MÉTODO

Sujetos

Se emplearon 35 ratas Wistar hembra nulíparas de 10 semanas de vida (~270g) y sus camadas, 27 repartidas aleatoriamente a una de las tres condiciones experimentales y las 9 restantes usadas como nodrizas. Las ratas fueron alojadas en el bioterio del Instituto de Investigaciones Biomédicas, con un ciclo luz-oscuridad 12/12 (luces encendidas de 0700 a 1900hrs); temperatura ($22 \pm 1^\circ\text{C}$) y humedad controladas (45-55%). El acceso al agua y comida, de acuerdo a su condición experimental, fue *ad libitum*. Los procedimientos aquí descritos fueron aprobados por la Comisión de Bioética para Investigación en Animales del mencionado Instituto.

Aparatos

Para la histología y biología celular:

- Bomba de perfusión (modelo 77521-40, Masterflex)
- Sonicador (XL2000 Microson, QSONICA, LLC)
- Centrífuga
- Balanza (BL150, Sartorius)
- Lector de placas de ELISA (Chromate, Awareness)
- Microtomo (modelo 27, Sartorius-Wercke)
- Incubadora (modelo RB360, W.C. Heraeus GMBH)
- Microscopio (modelo AxioImager. A1, Carl Zeiss; equipado con el software AxioVision, v4.6.3, Carl Zeiss)
- CCD –coupled charged device AxioCam MRC (Carl Zeiss)
- Escaner (modelo V350PHOTO, Epson)
- Cromatógrafo con detección fluorométrica (Waters Co, Milford, Mass)
- Columna analítica de fase reversa de 4.6mmx100mm 100mmHypersil 116 100 °A ODS (tamaño de partícula: 3µm, Evoelution)

Para la evolución conductual:

- Cámara (Digimax S600, Samsung)
- Campo abierto (caja de acrílico pintado de blanco, 90 x 90 x 40)

Software:

- ImageJ 1.41 (Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA)
- SPSS 10 para Windows
- PhotoShop

Materiales

- Caseína hidrolizada C2 (19582, Organotechnie)
- Violeta de Cresilo (acetato) Certistain (1.05235, Merck)
- Triton X-100 (sc-29112, Santa Cruz)
- Suero normal de caballo (S-2000, Vector)
- Suero normal de conejo (S-5000, Vector)
- Suero normal de cabra (S26-100mL, Vector)
- Kit ABC Vectastain –avidina/biotina- (PK-4000, Vector)
- Kit FD Rapid GolgiStain (PK 401, FD NeuroTechnologies)
- Kit de bloqueo de avidina/biotina (SP-2001, Vector)
- Kit de sustrato de DAB para peroxidasa (SK-4100)
- Kit de cuantificación de proteínas (RCDCCProtein Assay, BIO-RAD)

Anticuerpos:

- Anti-hidroxilasa de triptófano, desarrollado en cabra, policlonal (AB1541, Millipore)
- Anti-reelin, desarrollado en ratón, monoclonal (MAB5364, Millipore)
- Anti-Notch1, desarrollado en ratón, monoclonal (MAB5352, Millipore)
- Anti-receptor 5-HT1A, desarrollado en cerdo de guinea, policlonal (AB5406, Millipore)
- Anti- β -tubulina III, desarrollado en ratón, monoclonal (T8578, Sigma-Aldrich)
- Anti-ratón, peroxidado, desarrollado en caballo (PI-2000, Vector)
- Anti-cabra, desarrollado en conejo (BA-6000, Vector)
- Anti-cerdo de guinea, desarrollado en cabra (BA-7000, Vector)

Procedimiento

Gestaciones

Para provocar la gestación, se colocó en la caja –habitación de un macho sexualmente maduro a las hembras (3 hembras por macho); diariamente se realizó frotis vaginal y una vez que en el frotis se detectaron espermatozoides se registró como día embrionario 0 (E0). Las hembras se colocaron en grupos de 3 animales por caja y se transfirieron a una caja individual en E20 para que construyeran un nido.

Debido a que la serotonina es indispensable para el establecimiento del polo vegetal-polo animal en el embrión, se realizó la privación de triptófano dietario prenatal posterior al día E5 de gestación. De esta forma, la administración de las dietas experimentales se realizó entre E5-E22/día del parto. Al nacimiento, se cambió la dieta

experimental y control por la dieta CHOW (Harlan Teklad 19% Proteína, 2019S) en todos los grupos.

Con el fin de evitar desnutrición postnatal en el grupo experimental, las crías fueron alimentadas por una nodriza cuya gestación estuvo empatada temporalmente con la del grupo sin triptófano. Esta rata nodriza fue alimentada con dieta CHOW durante la gestación y después del parto las crías fueron removidas y se cambiaron por las de una rata del grupo experimental.

Durante la gestación, se registró la ingesta desde E5 hasta el parto, dividiéndose por semanas (semana 1: E6-E10, semana 2: E11-E15 y semana 3 E16-E20).

Dieta sin triptófano o dieta experimental (EXP)

Debido a que el consumo de triptófano dietético de la rata gestante afecta directamente la disponibilidad del aminoácido y de 5-HT en el SNC del feto, la reducción de triptófano al que se sometió a la madre incidió en la cría (Arévalo et al., 1991). Se restringió el consumo de triptófano mediante la administración de una dieta en cuya formulación se incluyó caseína hidrolizada (la hidrólisis ácida de la caseína destruye al triptófano dejando inalterados al resto de los aminoácidos y harina de maíz nixtamalizada. La caseína hidrolizada (Cat: 19582, Organotechnie) fue la fuente principal de aminoácidos y harina de maíz nixtamalizado la de carbohidratos. La nixtamalización del maíz es una forma de hidrólisis alcalina que igualmente destruye el poco triptófano del maíz y facilita la digestión de los carbohidratos (Thomas & Wysor, 1967). La administración se realizó de acuerdo al diseño experimental arriba mostrado. La formulación de la dieta puede verse en el Anexo 1 y el contenido de aminoácidos en la caseína hidrolizada en el Anexo 2.

Dieta sin triptófano+triptófano o dieta control (CONT)

Con el fin de asegurar que los hallazgos en los grupos a los que se administró la dieta EXP se debieron a la carencia de triptófano y no a otra característica de la dieta, se empleó una dieta control con la misma formulación que la dieta EXP, a la que se le agregó triptófano (Cat: T0254, Sigma) en la concentración recomendada en el alimento estándar para ratas según la dieta de Harlan Tekland (0.20%).

Dieta control (CHOW)

Se empleó la dieta Harlan Tekland Global Diet, 2019 (anexo 3); 19% de proteína para alimentar a un grupo de ratas de acuerdo al diseño experimental mostrado. El contenido de triptófano de la dieta CHOW fue el parámetro con el que se elaboró la dieta CONT, por lo que ambas dietas presumiblemente eran equivalentes tanto calórica como nutrimentalmente.

Sacrificios

Los sacrificios se realizaron al nacimiento (4 sujetos por camada por condición experimental) y en P20 (2 machos por camada por condición experimental). La eutanasia se realizó inyectando a los animales una sobredosis de pentobarbital sódico (120mg/kg ip); mediante la observación física se comprobó la muerte de los animales (pérdida del reflejo parpebral, falta de tono muscular, coloración cianótica). Una vez sacrificados, los animales se perfundieron intracardiamente con amortiguador de fosfatos-salina (PBS) al 9% seguidos de PBS-para formaldehído (PBS-PFA) al 4% para realizar inmunohistoquímica (IHQ) o tinción de Nissl; para realizar Western blot y cromatografía solo fueron perfundidos con PBS-salina.

Inmunohistoquímica

Con el propósito de conocer el número de neuronas productoras de serotonina en el núcleo del rafe dorsal así como su distribución en el mismo, se realizó IHQ para detectar a la enzima hidroxilasa de triptófano (TrpH). Como se mencionó previamente, la TrpH es considerada la enzima “paso limitante” en la síntesis de serotonina, y se encuentra únicamente en las células que producen esta molécula. También se realizó IHQ para determinar la presencia del receptor 5HT1A en las células de Cajal-Retzius en la zona marginal de la neocorteza.

Posterior al sacrificio, se extrajo el cerebro y se colocó en post-fijación durante 48 h; terminado este periodo se transfirió a una solución de sacarosa al 30% durante 48 h, todo esto en refrigeración. El cerebro se cortó en secciones coronales de 70µm con un microtomo de congelación. Los cortes fueron lavados con PBS y posteriormente incubados a temperatura ambiente con 0.018% de peróxido de hidrógeno en PBS, para bloquear la peroxidasa endógena, durante 10 min; enseguida se lavaron 3 x 10 min en

PBS y las secciones correspondientes al tallo cerebral se incubaron durante 48 h a 4°C en una solución de 1% de suero normal de conejo, 0.3% de Triton X100 en PBS y el anticuerpo anti-hidroxilasa de triptófano, 1:1000, desarrollado en cabra. Transcurrido ese periodo, las secciones se lavaron 3 x 10 min en PBS y se incubaron en la misma solución antes mencionada con el anticuerpo secundario biotinilado en concentración 1:200, durante 24 h a 4°C. Al día siguiente se lavó el tejido y se incubó en el complejo de avidina-biotina (Kit ABC, Vector) por 2 h a 37°C en la incubadora, al término de este periodo se lavó de la misma forma antes mencionada y se reveló con el Kit anti-peroxidasa, Vector; en el caso de la corteza cerebral, se realizó doble IHQ para rielina y el receptor 5HT1A, los cortes se incubaron durante 48 h a 4°C en una solución de 1% de suero normal de caballo, 0.3% de Triton X100 en PBS y el anticuerpo anti-rielina IgG_{1K}, 1:1000, levantado en ratón. Al concluir este periodo, el tejido se lavó como se describe previamente y se incubó con el anticuerpo secundario conjugado a peroxidasa, 1:3000, durante 24 h a 4°C. El revelado se realizó con el kit anti-peroxidasa (Vector), luego se preparó el tejido para la nueva incubación bloqueando avidina y biotina con el kit de bloqueo de Vector y se incubó durante 24 h a 4°C con una solución de 1% de suero normal de cabra, 0.3% de Triton X-100 en PBS y el anticuerpo anti-receptor 5HT1A, 1:500; después se incubaron durante 24 h a 4°C en el anticuerpo secundario. Los cortes se revelaron con el kit de peroxidasa usando en esta ocasión níquel en la solución para conseguir una coloración negra en el revelado. Los cortes se montaron en portaobjetos y se cubrieron con Entellan (Merck).

Conteo celular de neuronas positivas a TrpH

El núcleo dorsal del rafe se foto-documentó empleando un sistema de adquisición de imágenes CCD (AxioCam, Zeiss) acoplado a un microscopio Axioscope, Zeiss. Con el fin de evaluar morfológicamente el rafe dorsal, el núcleo fue dividido en regiones rostral, medial y caudal, de acuerdo al atlas del desarrollo prenatal de la rata (Altman y Bayer) en donde al día E21, corresponde al día del nacimiento de la camada. Las secciones se capturaron siguiendo la progresión rostro-caudal del núcleo, utilizando un objetivo Achromplan 10x/0.10 AN para tener una visión panorámica del núcleo y un objetivo Achromplan 20x/0.45 AN para realizar los conteos celulares. Una vez obtenidas las imágenes se analizaron con el software gratuito ImageJ (NIH), con la

aplicación "Cell count" del mismo programa. Las marcas se colocaron únicamente sobre las neuronas que se encontraban en foco y debido a que la captura de la totalidad del núcleo requirió varias imágenes, se evitó contar las neuronas de las zonas de traslape.

Evaluación de la densidad de inervación serotoninérgica

En cuanto a la inervación 5-HT, esta se evaluó en el haz prosencefálico medial. Una vez que se identificaron las secciones, se foto-documentaron empleando una CCD acoplada a un microscopio Axioscope, Zeiss. Las imágenes se tomaron empleando el objetivo Achroplan 40x/0.65 AN para distinguir con claridad las fibras positivas a TrpH. Las imágenes fueron convertidas a 8 bits en escala de grises. Se midió la densidad óptica de los precipitados por densitometría con el analizador de imágenes ImageJ (NIH).

Para las IHQ dobles, se capturaron las imágenes con un objetivo Achroplan 40X/0.65 AN para tener una visión panorámica de la zona marginal y Achroplan 100X/1.25 AN para realizar la detección de las dobles marcas sobre las células de Cajal-Retzius. La coloración café correspondió a la marca de rielina, mientras que la marca negra correspondió al receptor 5-HT1A.

Western blot

El cerebro se extrajo rápidamente y se lavó en PBS a 4°C para después colocarlo en *buffer* de lisis a 4°C compuesto por: tris-HCl 50mM pH 7.5, NaCl 150mM, NP-40 1%, DOC 0.5% 0.5%, y mezcla de inhibidores de proteasas (Completetm, Roche). Las muestras se sonicaron empleando pulsos 50Hz durante 5 s, con 5 series de pulsos con descansos de 10 s entre cada pulso; posteriormente se centrifugaron a 14000rpm durante 75 min a 4°C. Una vez separadas las membranas, se recolectó el homogenado de proteínas y se cuantificó la concentración de proteínas por método de Lowry modificado. Para la detección de Notch1 y rielina se utilizó un gel de SDS-poliacrilamida al 10%. Se cargaron 60µg de proteína total, por condición, disuelta en *buffer* de carga en condiciones reductoras con 2-β-mercaptoetanol, azul de bromofenol 0.05% y SDS 10% (p/V). Las muestras se hirvieron durante 5 min a 94°C. Los geles se corrieron a 25mA, en *buffer* de corrida (tris –base, tripsina y SDS pH 8.3)

durante 3 h. Las proteínas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa en cámara húmeda durante 20 h. Al terminar el tiempo de transferencia, la membrana se bloqueó con una solución de PBS-leche descremada al 5% durante 2 h a 37°C. Las membranas se incubaron con los siguientes anticuerpos: ratón anti-riolina IgG_{1k} (Cat: MAB5364, Chemicon, que reconoce las formas cortadas “cleaved” de 300 y 180kDa) y ratón anti-Notch1 IgG1 (Cat: MAB5352, Chemicon, que reconoce los fragmentos intracelulares (NICD) de +-200 y 120kDa) diluidos 1:1000 en PBS-BSA al 5%, durante 48 h a 4°C. Después de incubadas en el anticuerpo primario las membranas se lavaron 3 x 10 min en 0.2% Tween20 en PBS para después incubarlas en anticuerpo secundario peroxidasa anti-ratón IgG (H+L) (Vector Laboratories) 1:3500 en PBS-leche al 5% y suero de la especie en la que fue desarrollado el anticuerpo secundario al 1%, por 90 min a temperatura ambiente. Al terminar el tiempo de incubación, se lavaron una vez más en PBS-Tween20, 3 x 10 min. El revelado de las membranas se realizó por medio de quimioluminiscencia y visualizados en hiperfilm ECL (Kodak). Los controles negativos se realizaron al eliminar de la incubación el anticuerpo primario. Se utilizó α -tubulina como un control de carga de proteínas. Las membranas se escanearon y la imagen digitalizada a 400dpi se transformó a escala de 8 bits. Se midió la densidad óptica de los precipitados por densitometría con el analizador de imágenes ImageJ del NIH.

Cromatografía líquida de alto desempeño (HPLC)

El análisis cuantitativo de la serotonina cerebral total se realizó mediante cromatografía líquida de alto desempeño (HPLC) con detección fluorométrica. Una vez que el cerebro fue removido, se homogeneizó con un sonicador (3 pulsos de 50Hz por 20 s con descansos entre pulsos de 10 s) en 300 μ l de una solución de ácido perclórico (0.1M) y EDTA (0.1mM) y se centrifugó durante 15 min a 17000rpm a 4°C. El sobrenadante resultante se filtró a través de un filtro de 0.22 μ m (Millipore) y antes de ser inyectado en el HPLC se determinó la concentración de proteínas de cada muestra. Se utilizó el sistema HPLC Waters Co, Milford, Mass., y se usó una columna de 3 μ m de 4.6mm x 100mm Hypersil 116 100 °A ODS, Evoelution. La fase móvil consistió en 90% de amortiguador de acetato de amonio (50mM, pH 3.5) y 10% de acetonitrilo. Las longitudes de onda para detectar serotonina fueron de 270nm y 345nm, para la

excitación y emisión respectivamente. La muestra completa fue inyectada en la columna; por medio de la comparación de los tiempos de retención de la muestra con los observados del estándar (hidrocloruro de 5-hidroxitriptamina) fue como se determinó que se trataba del neurotransmisor. Las concentraciones de serotonina se muestran como microgramos de 5-HT por gramo de tejido

Tinción de Golgi-Cox

La evaluación de los cambios en la polaridad celular en corteza cerebral se efectuó en el día de vida postnatal (P) 20, debido a que para esta fecha es posible ver con claridad, empleando una tinción argéntica, la morfología de la neurona.

Se emplearon 5 animales macho por condición experimental; después de administrales una dosis letal de pentobarbital sódico, se les decapitó y extrajo rápidamente el cerebro. El tejido cerebral se lavó en PBS a 4°C y se seccionó coronalmente en trozos de 5 mm de ancho. Las secciones se sumergieron en la solución de impregnación del kit GolgiStain para Golgi-Cox (Neurotechnologies) durante 2 semanas, al término de este periodo se les transfirió a la solución protectora para prepararlos para el corte durante al menos 2 semanas. El kit de Golgi-Cox sugiere seccionar los trozos ya impregnados y montarlos en cubreobjetos preparados con gelatina bacteriológica, sin embargo se realizó una modificación en la técnica de revelado para optimizar los resultados. Esta optimización consistió en realizar los últimos pasos (revelado y aclarado) en los cortes en flotación, lo que redujo el tiempo requerido para realizar la técnica en al menos 2 semanas además de que mejoró la calidad de las tinciones obtenidas. Una vez aclarados y deshidratados, los cortes fueron montados en portaobjetos y cubiertos con Entellan (Merck). Las secciones se fotodocumentaron con una CCD acoplada a un microscopio Axioscope (Zeiss) empleando un objetivo Achroplan 20x/ 0.45 AN. Las cortezas somatosensorial (miembros anteriores, mandíbula y vibrisas), motora (primaria y secundaria) así como la corteza del cíngulo se seleccionaron para evaluar la polaridad neuronal.

La evaluación semi-cuantitativa de las cortezas se realizó de la siguiente forma: primero se cuantificó por fotografía el número de neuronas piramidales bien impregnadas, enseguida se registró el número de neuronas piramidales que

presentaban alteración en la polaridad neuronal. De esta forma se obtuvo un porcentaje de neuronas con polaridad modificada en cada fotografía.

Tinción de Nissl

Con el propósito de evaluar la migración neuronal cortical, en particular de neuronas piramidales arquicorticales en los animales sometidos a privación prenatal de triptófano en la dieta, se realizaron tinciones de Nissl. Esta se empleó para cuantificar neuronas piramidales fuera del estrato piramidal en el hipocampo así como para determinar el perfil de las capas corticales. Una vez perfundidos con PBS-PFA al 4%, el cerebro se extrajo y se dejó en fijación durante 24 h. Al final de este periodo se deshidrató en series de alcoholes, aclaró y embebió en parafina (Prophet *et al.*, 1995); se cortaron secciones de 5µm del bloque y se montaron en un baño de flotación en portaobjetos preparados con Poly-L-lysine, Sigma. Los cortes se secaron en un horno a 60°C, se dejaron enfriar y se desparafinaron en xilol seguido de series de alcoholes. Enseguida se re-hidrataron para ser sumergidos en una solución acuosa de Violeta de Cresilo al 4% a 50°C durante 10 min; posteriormente se enjuagaron en agua bidestilada y series de alcoholes (alcohol 96º y absoluto), por último se aclararon en xileno. Para terminar las laminillas fueron cubiertas con Entellan, Merck. Las secciones se fotodocumentaron con una CCD acoplada a un microscopio Axioscope (Zeiss) empleando un objetivo Achromat 20x/0.45 AN; se analizaron las secciones que contienen la sección CA2 en la porción dorsal del hipocampo (láminas 32-36 del atlas de cerebro de la rata, Paxinos).

Campo abierto

Una vez que se comprobó la presencia de alteraciones en la migración y en el establecimiento de la polaridad neuronal cortical, se evaluó a los animales en el campo abierto. El campo abierto permite evaluar la conducta espontánea de la rata cuando la arena se ilumina tenuemente y la conducta ante situaciones aversivas, cuando la arena se ilumina intensamente (500W). Con el fin de evaluar la conducta de las ratas se utilizó el campo abierto; se utilizaron 5 ratas macho de 40 días de vida por condición experimental. El campo abierto consistió en una caja de acrílico blanco de 90x90x40cm, en cuya base estaba marcada una cuadrícula de 10x10cm. Entre cada

ensayo, la caja se limpió en su totalidad con alcohol etílico de 70° y al final de cada sesión, se lavaba por completo con jabón neutro para eliminar cualquier rastro olfativo. Cada ensayo tuvo una duración de 5 min a partir del momento en que se coloca a la rata sobre el piso del campo abierto. Los ensayos se videograbaron con una cámara Digimax S600, Samsung; a una velocidad de 30cps. La prueba de campo abierto se realizó durante la fase oscura del ciclo, entre las 7:30 y las 9:00pm; de 7:30 y 8:30pm se destinó a habituación a las condiciones ambientales del laboratorio, para luego continuar con la prueba conductual.

Para el análisis conductual de los videos, se tomaron en cuenta los siguientes parámetros: tiempo de inmovilidad, tiempo de congelamiento, tiempo de acicalamiento, tiempo en la periferia (de la cuadrícula del piso, las dos hileras adyacentes a la pared del campo abierto), tiempo en el centro, distancia recorrida (número de cruces en la cuadrícula), conducta vertical (levantarse en dos patas), rascado y número de veces en las que defecaba. Estos parámetros se eligieron al mostrarse que son de fácil evaluación e interpretación y se han validado en varios estudios previos (Goma & Tobeña, 1978; Hale *et al.*, 2008).

Análisis estadísticos

Los datos obtenidos en los conteos celulares (IHQ y tinción de Nissl), las cromatografías y las evaluaciones conductuales cumplieron los criterios de normalidad y homogeneidad de varianza, necesarios para poder ejecutar un análisis estadístico paramétrico. Los datos fueron analizados con una prueba ANOVA de una vía, seguido de la prueba post hoc de Tukey HSD. El nivel de significancia estadística fue fijado en $p < 0.05$

Las densidades ópticas fueron analizados usando la prueba no-paramétrica de Kruskal Wallis, el nivel de significancia estadística fue fijado en $p < 0.05$.

Los análisis estadísticos se realizaron con el programa SPSS, versión 10.0, para Windows.

RESULTADOS

Evaluación de las dietas

El análisis nutrimental de las dietas que se utilizaron en el presente trabajo indicó que tanto el contenido de proteína, carbohidratos y grasas eran equivalentes (**Tabla II**). La equivalencia de estos parámetros resulta esencial para asegurar equivalencia nutrimental y calórica, evitando deficiencias entre grupos.

Determinación	Experimental (g/100g)	Control (g/100g)	Chow (g/100g)
Humedad	25.8	23.1	10
Cenizas	8.8	9.2	5.9
Grasas	5.8	6.0	6.0
Proteína	19.0	19.2	18.8
Fibra cruda	2.9	2.8	3.8
Carbohidratos asimilables	53.4	48.0	57.26

Tabla II. Análisis nutrimental de las dietas utilizadas.

Ratas gestantes

Ingesta durante la gestación

El consumo de las dietas se evaluó semana por semana, así se observó que los distintos grupos ingirieron en promedio la misma cantidad de alimento en cada semana. La ingesta se incrementó con respecto al tiempo de gestación. Aunque en la **Figura 6** se observa una tendencia en la primera semana a disminuir el consumo (neofobia) en los grupos CONT y EXP con respecto a CHOW, la diferencia entre grupos no fue estadísticamente significativa.

Partos

Todas las ratas parieron en el día E22, sin cambios estadísticamente significativos en el número de crías por camada (10.5 ± 1.5). Debido a que se realizaron manipulaciones experimentales en los animales recién nacidos, el número final de crías por camada fue de 6.5 ± 1.5 .

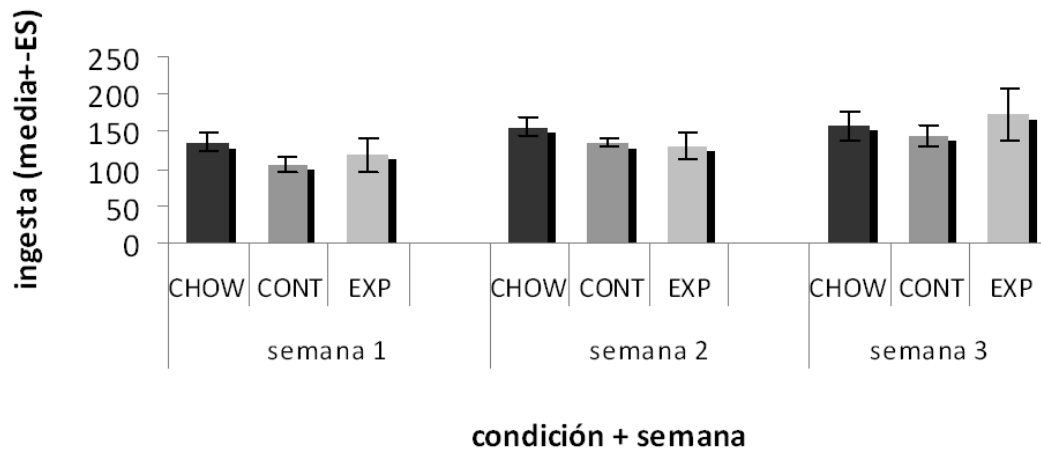


Figura 6. Ingesta promedio semanal durante la gestación. La administración de las dietas a las ratas preñadas comenzó en el día E5 y concluyó en E22, por lo que cada semana comprende el consumo de 6 días.

Crías

Peso cerebral y corporal

Al nacimiento (P0), los individuos del grupo EXP no presentaron diferencias estadísticamente significativas en cuanto al peso cerebral húmedo (peso cerebral EXP: 0.233 ± 0.0037 g) al compararse contra el resto de los grupos (peso cerebral CHOW: 0.2613 ± 0.0053 g; CONT: 0.2636 ± 0.0058 g; $F = 3.668_{2-81}$, $p > 0.05$) como se muestra en la **Figura 7**. Sin embargo, el peso corporal de las crías del grupo EXP (4.4856 ± 0.1138 g) fue menor que en los controles (CHOW: 5.819 ± 0.1059 g; CONT: 5.8313 ± 0.0841 g; $F = 49.968_{2-81}$, $p < 0.001$) (**Figura 8**).

En los días P10 y P20 el grupo EXP mostró menor peso cerebral y corporal (P10 cerebral: 0.6275 ± 0.016 g, corporal: 12.0137 ± 0.5275 g; P20 cerebral: 1.0591 ± 0.0478 g, corporal: 23.42 ± 0.6685 g), comparado con los grupos control (P10 cerebral, CHOW: 0.965 ± 0.0157 g, CONT: 1.0083 ± 0.0227 g, $F = 108.811_{2-27}$, $p < 0.001$; corporal CHOW: 20.7312 ± 0.6847 g, CONT: 21.8183 ± 0.5589 g, $F = 47.315_{2-27}$, $p < 0.001$; P20 cerebral, CHOW: 1.4167 ± 0.0165 g, CONT: 1.3981 ± 0.0233 g, $F = 58.457_{2-47}$, $p < 0.001$ corporal CHOW: 43.9835 ± 1.094 g, CONT: 43.5327 ± 2.147 g, $F = 85.989_{2-54}$, $p < 0.001$).

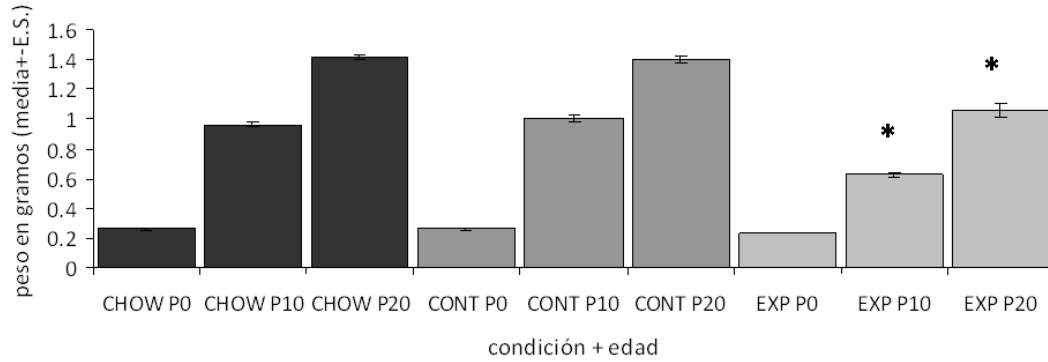


Figura 7. Peso cerebral por condición experimental y edad. En el grupo EXP el peso cerebral es menor a partir del día 10 de la evaluación y se mantiene por debajo de los controles (CHOW y CONT) hasta el día 20 postnatal; al nacimiento no existen diferencias estadísticamente significativas en comparación con los grupos control. * $p < 0.05$

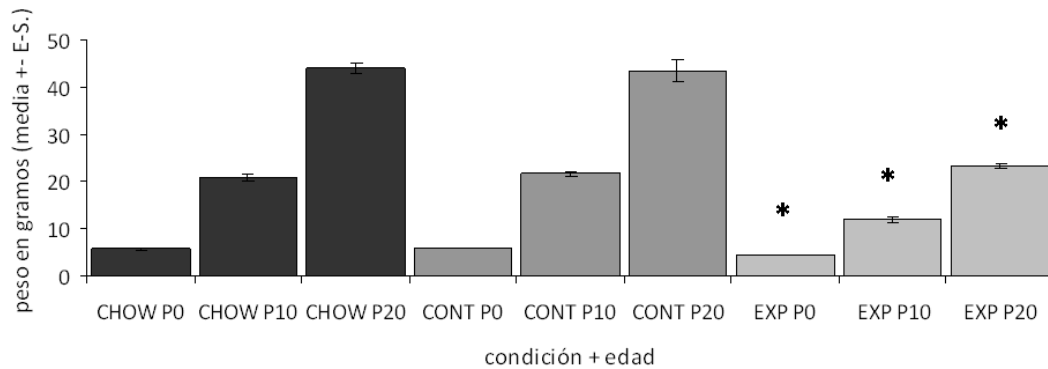


Figura 8. Peso corporal por condición experimental y edad. Los grupos control se comportan como si fuesen el mismo grupo, mientras que el grupo deficiente en triptófano prenatal se mantiene con bajo peso corporal en todos los puntos temporales. * $p < 0.05$

Concentración de serotonina cerebral total

En el día E20, se cambió a dieta Chow a los animales que recibieron dieta CONT y EXP, de manera que las hembras recobraron la concentración plasmática de triptófano (Biggio *et al.*, 1974) y por ende, la de las crías. Los análisis de HPLC mostraron que la concentración de serotonina total en los cerebros de las crías recién nacidas fue similar entre las condiciones: CHOW: $0.2918 \pm 0.2915 \mu\text{g/g}$; CONT: $0.3214 \pm 0.0541 \mu\text{g/g}$; EXP: $0.3484 \pm 0.0608 \mu\text{g/g}$.

Neuronas serotoninérgicas en el núcleo del rafe dorsal

Con el fin de cuantificar las neuronas serotoninérgicas en el núcleo del rafe dorsal, así como para evaluar la morfología de dicho núcleo, se realizó una IHQ para TrpH. En el conteo de neuronas inmunorreactivas (ir) a TrpH se encontró que el número de estas neuronas en el grupo EXP fue aproximadamente 35% menor que en los grupos control ($F = 18.604_{2-19}$, $p < 0.001$). Entre las condiciones control no se encontraron diferencias estadísticamente significativas (Tukey HSD, $p > 0.05$). Véase **Figuras 9 y 10**.

Otra de las observaciones que debe mencionarse es la referente a la intensidad de la inmunorreacción en el grupo EXP. Como puede observarse en la **Figura 9**, donde se observa más claramente en las secciones medial y caudal, la inmunorreacción en dicho grupo es mucho más tenue que en el resto de las condiciones.

El análisis de la distribución de las neuronas ir a TrpH en las distintas regiones del rafe dorsal, esto es, según la división del núcleo en rostral, medial y caudal, mostró que en los grupos control (CHOW y CONT) las neuronas serotoninérgicas se distribuyen de manera similar a largo del núcleo. Los grupos control presentan un mayor número de neuronas TrpH positivas en las regiones medial y caudal, mientras que el número en la región rostral es menor, como se indica en las curvas de distribución de la **Figura 11**.

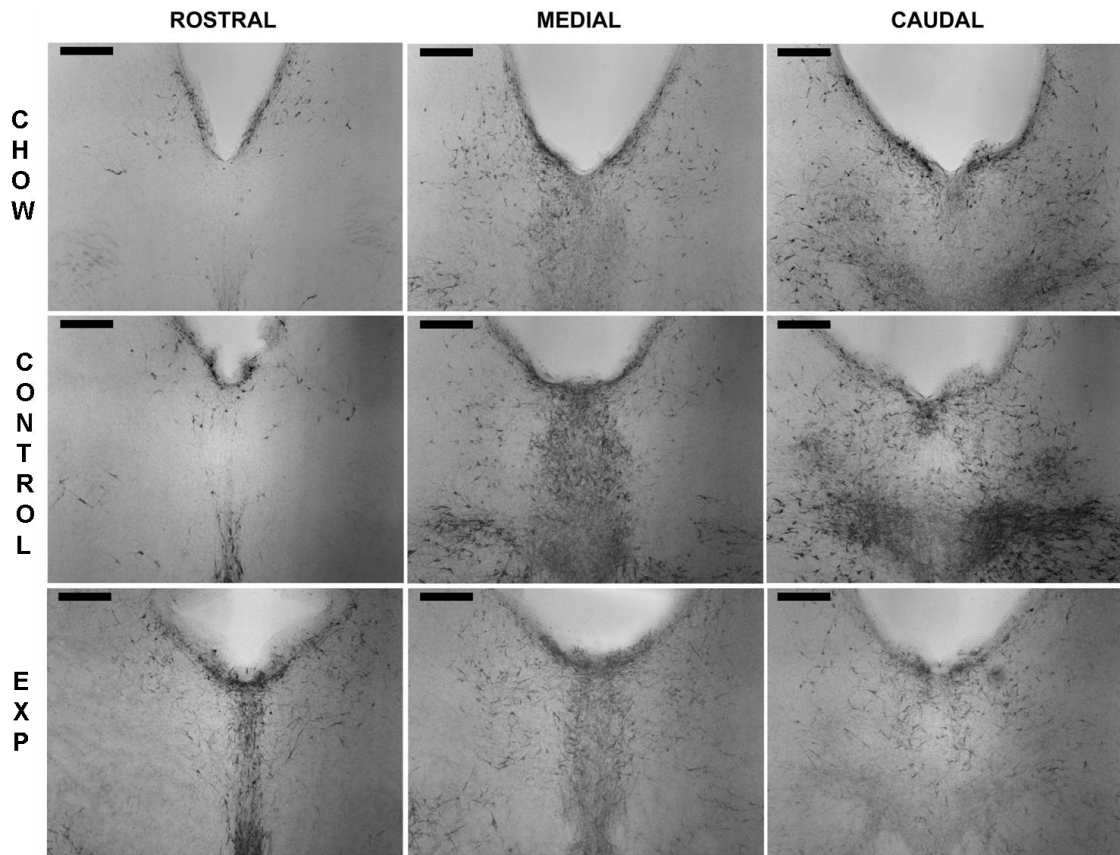


Figura 9. Neuronas serotoninérgicas en el núcleo del rafe dorsal. Inmunohistoquímica para hidroxilasa de triptófano, secciones representativas del núcleo del rafe dorsal en P0; se muestran las secciones del núcleo adyacentes al acueducto. Objetivo 10x. Barra: 200µm.

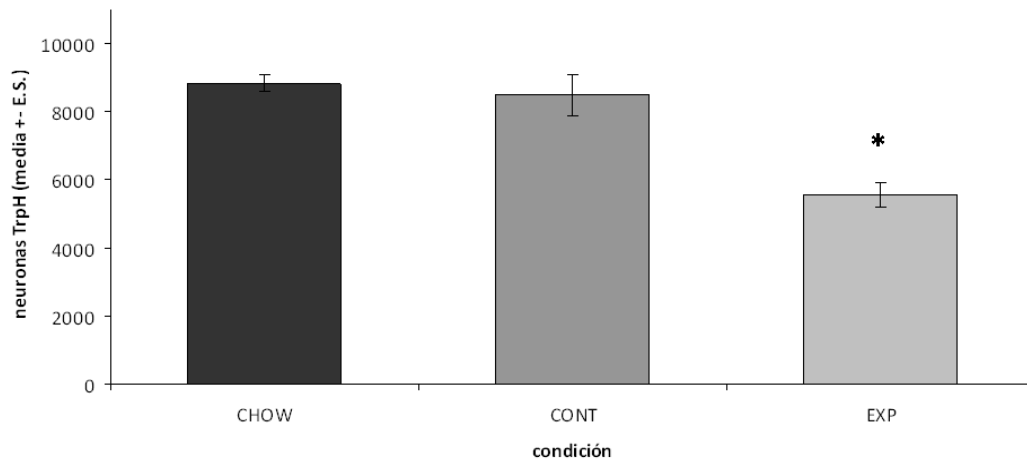


Figura 10. Número de neuronas serotoninérgicas en el rafe dorsal. El histograma muestra el promedio de neuronas inmunoreactivas a TrpH al nacimiento en los distintos grupos; el grupo EXP muestra una menor cantidad de neuronas serotoninérgicas (aprox. 35% menos) comparado contra los controles. * $p < 0.001$

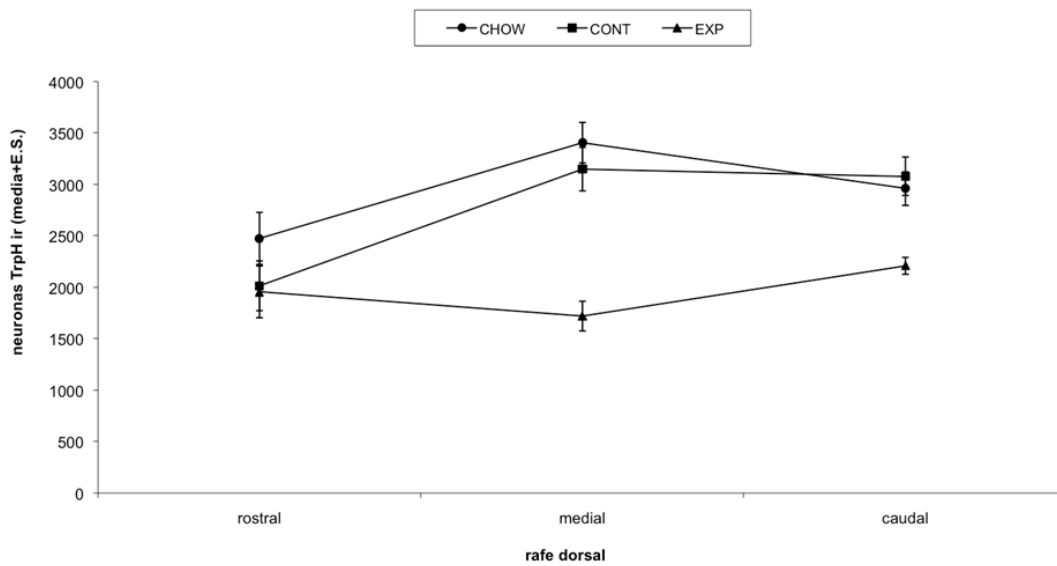


Figura 11. Distribución de las neuronas ir a TrpH en el rafe dorsal. Las curvas de distribución en los grupos control indican que las neuronas ir a TrpH son más abundantes en la región medial y caudal del núcleo y menos abundantes en la región rostral, mientras que en el grupo EXP no es posible observar ese patrón.

Se eligió el haz prosencefálico medial como punto de observación de la inervación ya que allí se concentran las fibras provenientes del grupo rostral de núcleos serotoninérgicos. Los resultados no indicaron diferencia condiciones en cuanto al número de fibras a TrpH ir en el haz tegmental central y lateral (**Figura 12**).

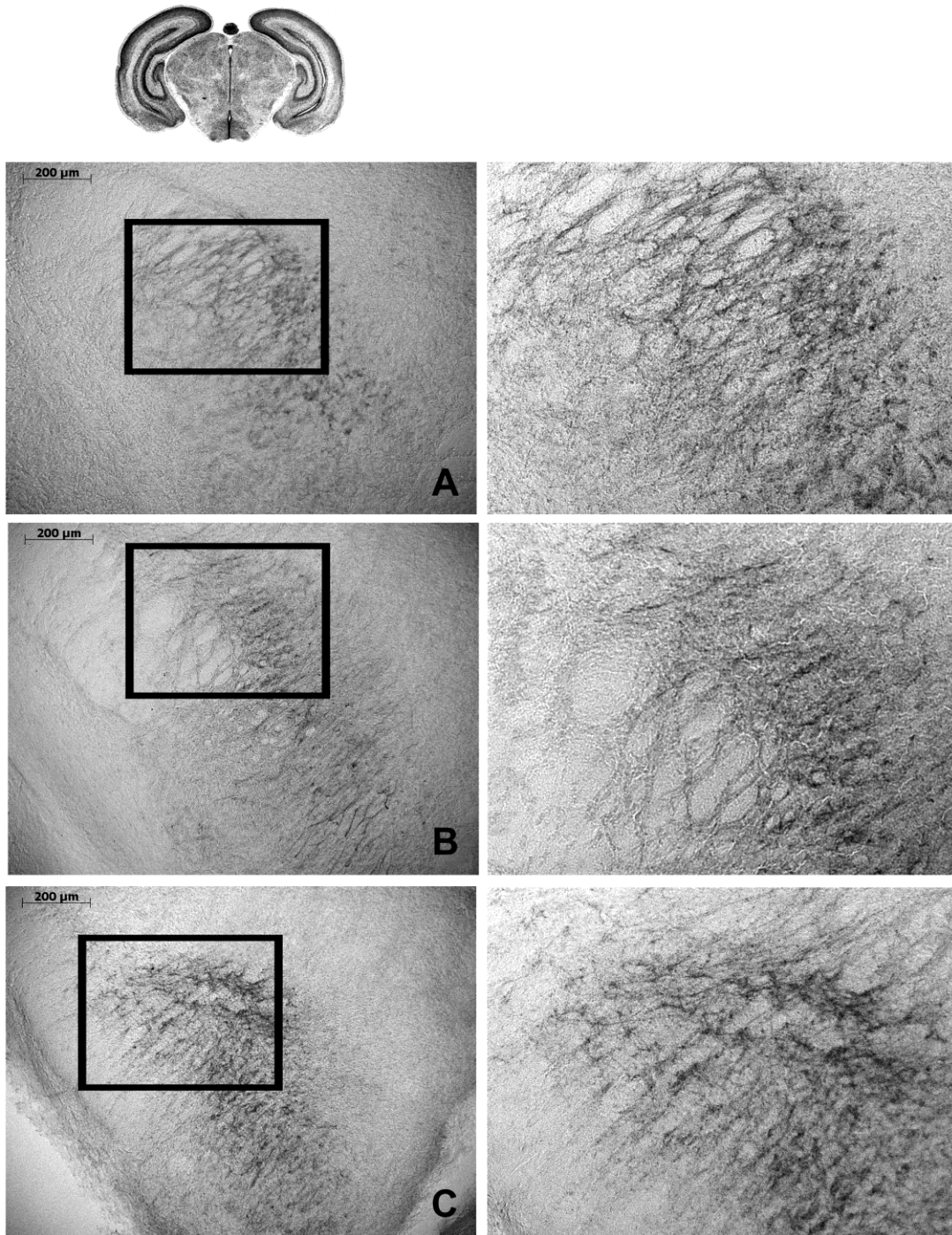


Figura 12. Fotografías representativas del haz prosencefálico medial, región lateral. Inmunohistoquímica para TrpH en tejido de animales recién nacidos. Las imágenes a la izquierda están obtenidas con un objetivo 20x y el voxel con 40x. A, CHOW; B, CONT; C, EXP.

Inervación serotoninérgica en la zona marginal: Células de Cajal-Retzius

Otro objetivo del presente trabajo fue estudiar los efectos de la deficiencia prenatal de triptófano en el proceso de migración de neuronas piramidales. En primer lugar, se buscó evidencia de la inervación 5-HT en las CRC's usando una doble IHQ para rielina (para identificar a las CRC) y para receptores de serotonina del tipo 1A. En las **Figura 13** se muestra la doble marca en una célula de Cajal-Retzius, en color café se observa la ir correspondiente a la proteína rielina y en color negro a 5-HT1A.

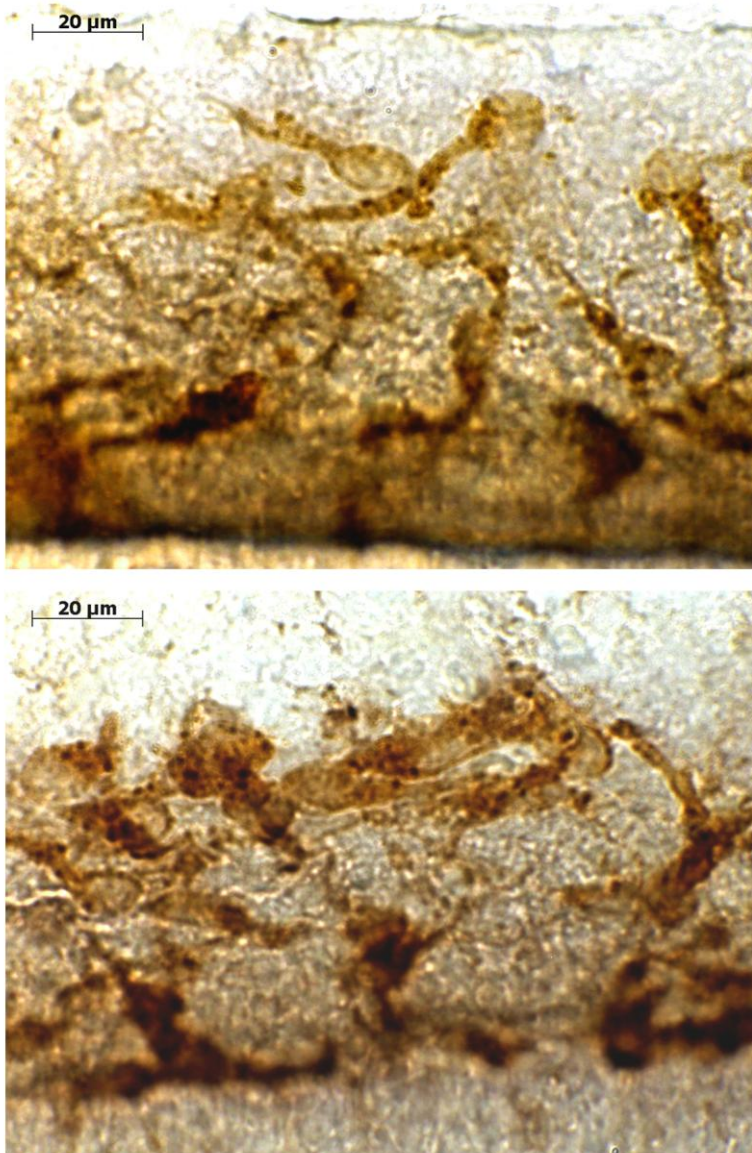


Figura 13. Zona marginal de la corteza cerebral de recién nacidos, IHQ doble para rielina y el receptor 5-HT1A. En la imagen se muestra a las células de Cajal-Retzius en la zona marginal en P0; la marca café indica la presencia de rielina mientras que los puntos en tonalidad café-negruzca indican la presencia de receptores para serotonina del tipo 1A. En ambas imágenes se muestran cortezas control. Objetivo 100x

Una vez que se comprobó que el sistema 5-HT interactúa con las células pioneras de la zona marginal, se evaluó la expresión de la proteína rielina; para ello se realizaron Western blots de tejido cerebral total en el día P0. Se encontró que la expresión de rielina fue mayor en la condición EXP en la variedad de la proteína de 180kDa (rielina 180kDa: Chi-cuadrada = 7.491₂, p= 0.024), como se observa en la **Figura 14**, y en la variedad de 300kDa (rielina 300kDa: Chi-cuadrada = 6.956₂, p= 0.031), que se muestra en la **Figura 15**.

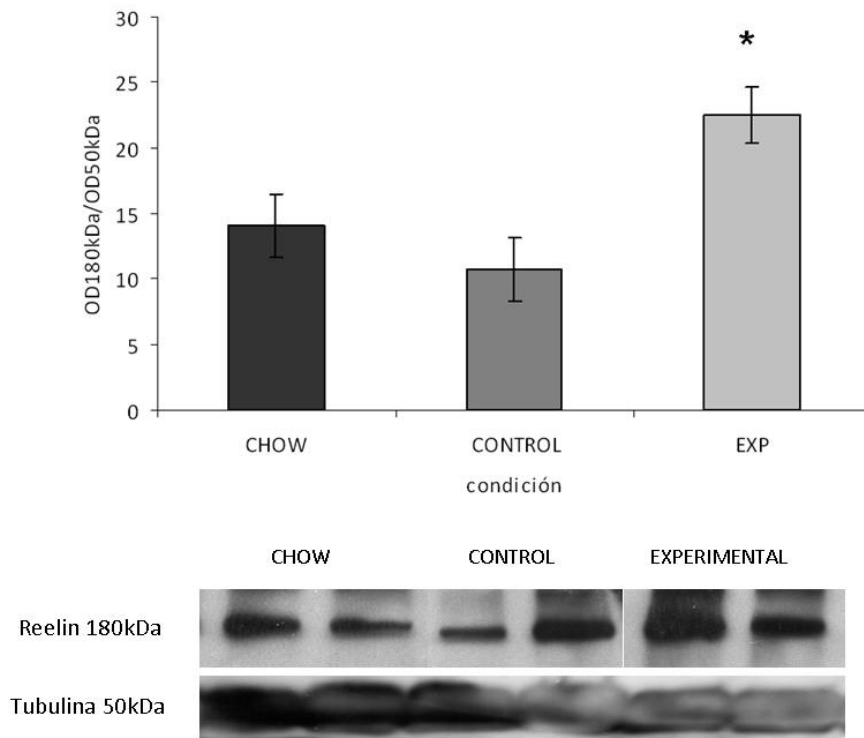


Figura 14. Expresión de la proteína rielina de 180 kDa. Densidad óptica de la proteína obtenida de tejido cerebral de animales recién nacidos. Los datos en el histograma representan media y error estándar. * $p < 0.05$. Bajo el histograma se muestran Western blots representativos de cada una de las condiciones.

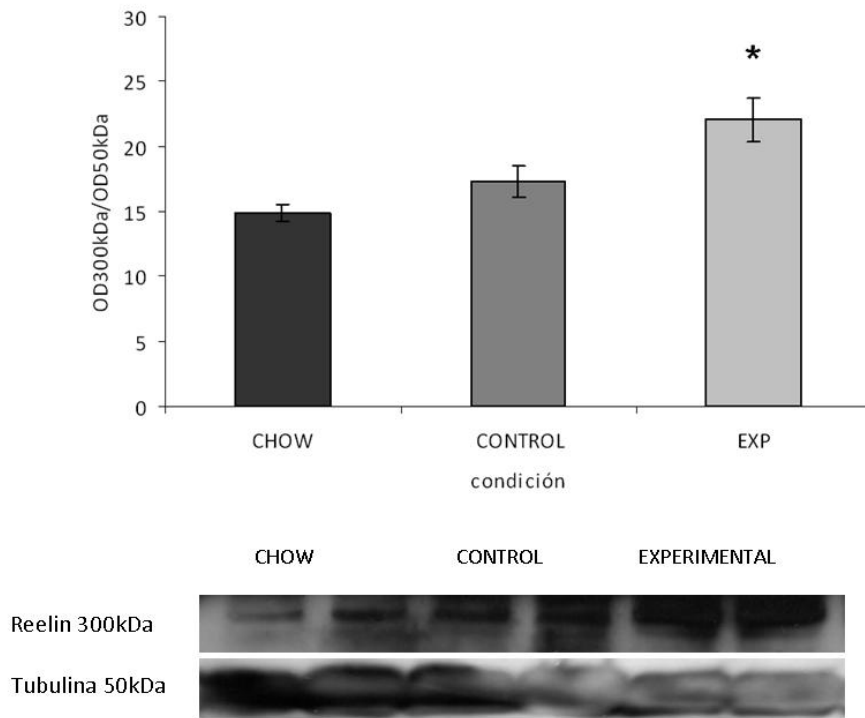


Figura 15. Expresión de la proteína rielina de 300kDa. Densidad óptica de la proteína obtenida de tejido cerebral de animales recién nacidos. Los datos en el histograma representan media y error estándar. * $p < 0.05$. Bajo el histograma se muestran Western blots representativos de cada una de las condiciones.

Migración cerebral cortical: hipocampo

Al observarse el incremento en la expresión de rielina de 180kDa y 300kDa, dada la participación de esta proteína en la regulación de la migración neuronal, se analizó la corteza cerebral en busca de anomalías migratorias en las neuronas que llevan a cabo migración radial, en particular de neuronas piramidales arquicorticales. Se eligió esta estructura debido a que su arreglo laminar es muy preciso y nos permitió detectar de manera sencilla a aquellas neuronas piramidales que se encontraran fuera de la capa que les corresponde. La división citoarquitectónica del hipocampo incluye una región celular y tres regiones acelulares; la primera es la capa o estrato piramidal, en dónde se localizan los cuerpos celulares de las neuronas piramidales, y las regiones acelulares comprenden a las capas o estratos *oriens* (que está formado por las dendritas basales de las neuronas piramidales), *radiatum* (superficial a la capa

piramidal) y el *lacunosum-moleculare* (ocupado por las dendritas apicales piramidales) (Johnston & Amaral, 2004).

Para ello se realizaron tinciones de Nissl; se escogieron secciones con el hipocampo, se fotodocumentó el campo CA2 y se cuantificaron las neuronas piramidales en los estratos i. piramidal, ii. *oriens*, y iii. *radiatum*.

En la **Figura 16**, a continuación, se muestran los conteos neuronales realizados en los hipocampos impregnados con Violeta de Cresilo, en las que se observa un menor número de neuronas piramidales en el área CA2 del grupo EXP (114.666 ± 10.12 neuronas, $F = 20.73_{2-21}$, $p < 0.001$), mientras que las condiciones control no presentaron diferencias estadísticamente significativas entre ellas (CHOW: 204.0 ± 39.33 neuronas, CONT: 207.01 ± 22.98 neuronas).

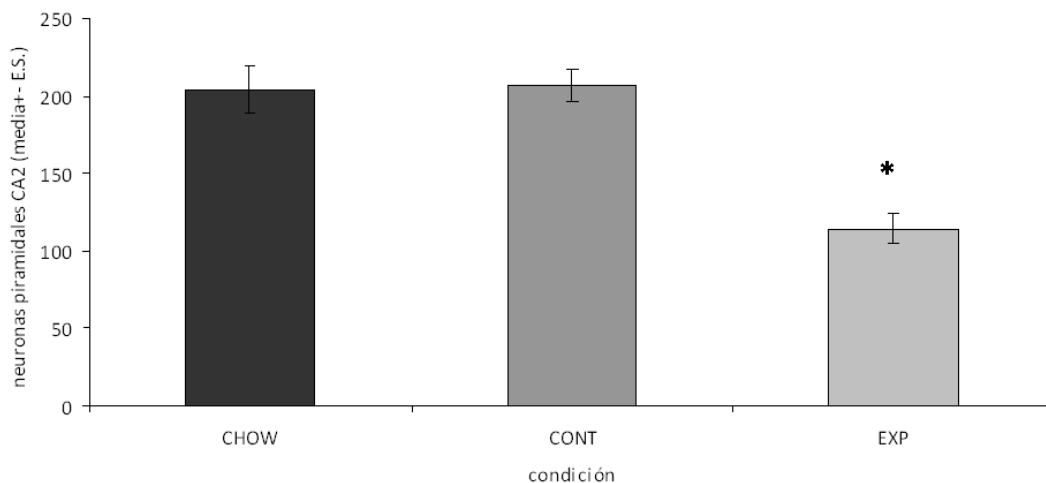


Figura 16. Neuronas piramidales en el estrato piramidal del área CA2 del hipocampo. En el conteo celular se observó un menor número de neuronas piramidales en el grupo EXP en los hipocampos de animales de 20 días de vida. * $p < 0.001$

En lo que respecta a las neuronas piramidales ectópicas en CA2 (**Figura 18**), el grupo experimental mostró un mayor número de ellas en comparación con los grupos control en el estrato *radiatum* (EXP: 14.33 ± 4.57 neuronas, $F = 13.85_{2-21}$, $p < 0.001$) mientras que entre las condiciones control no existieron diferencias (CHOW: 5.71 ± 1.14 neuronas, CONT: 6.6 ± 2.51 neuronas), ver **Figura 17**.

El número de neuronas piramidales ectópicas en el estrato *oriens* no mostró diferencias entre las tres condiciones (CHOW: 3.71 ± 1.08 neuronas, CONT: 6.2 ± 1.59 neuronas, EXP: 7.08 ± 1.53 neuronas, $F = 1.29_{2-21}$, $p > 0.05$).

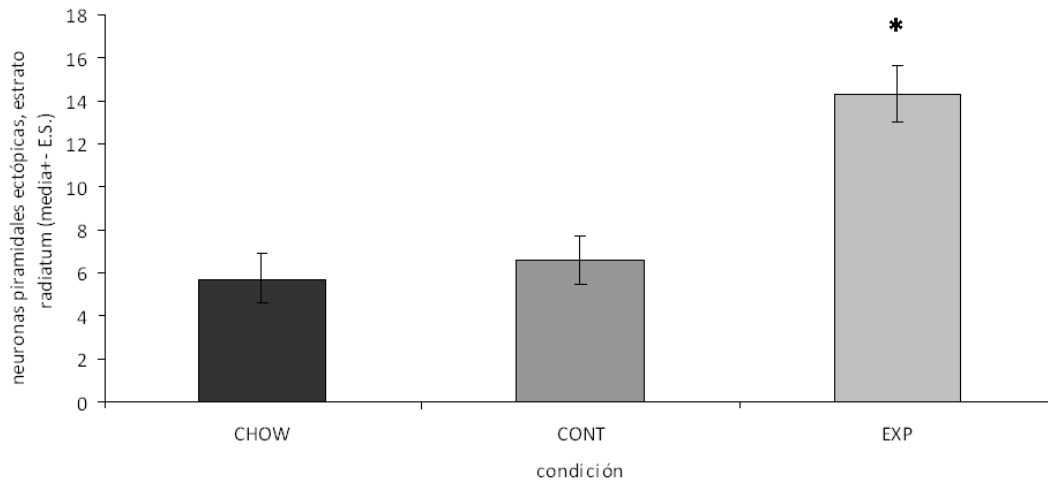


Figura 17. Neuronas piramidales ectópicas en el estrato *radiatum* de CA2 del hipocampo. El grupo EXP mostró el doble de neuronas piramidales ectópicas en P20, comparadas con los grupos control. * $p < 0.001$

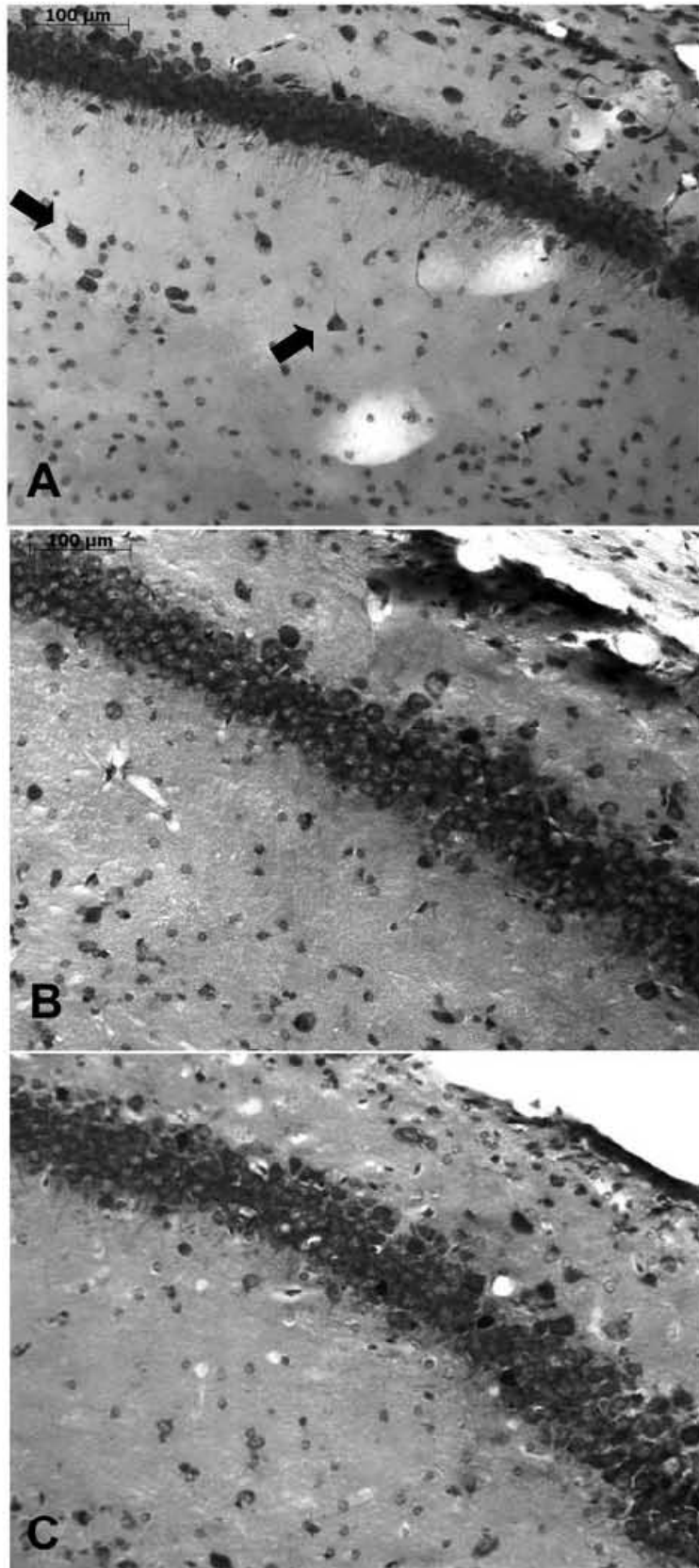


Figura 18. Tinción de Nissl del sector CA2 del hipocampo. En A, EXP; en B, CONTROL y en C, CHOW. Las flechas indican neuronas piramidales ectópicas, fácilmente reconocibles por su morfología triangular y la presencia de procesos visibles. Objetivo 20x

Polaridad neuronal cortical

En las hipótesis del presente trabajo se planteó que se presentarían cambios discretos pero persistentes en la citoarquitectura cortical, tales como desórdenes en la migración neuronal; y por otra parte que se presentarían alteraciones en la polaridad celular de las neuronas piramidales corticales dados por la alteración en la expresión de la proteína rielina, la cuál afecta la vía de señalización del factor de transcripción Notch1, responsable del establecimiento de la polaridad neuronal. Se considera alteración en la polaridad neuronal a la que presentan todas aquellas neuronas con procesos cortos, múltiples e inconsistentemente orientados, que protruyen directamente del soma (Hashimoto-Tori *et al.*, 2008)

En cuanto al establecimiento de la polaridad celular en las neuronas piramidales corticales, se observó directamente la morfología celular mediante la tinción de Golgi-Cox utilizando un objetivo 10x para observar la morfología completa de la neurona y 40x para comprobar que se trata de una neurona piramidal asegurándonos de la presencia de espinas dendríticas. Se encontró que el grupo EXP presentó un gran número de neuronas con alteración en la polaridad neuronal en las cortezas somatosensorial, motora y del cíngulo. La corteza más afectada por la privación de triptófano dietario prenatal fue la corteza somatosensorial en las 3 divisiones evaluadas (vibrisas – véase **Figura 19-**, miembros anteriores y mandíbula), como se muestra en la **Tabla III**, a continuación.

Corteza	Porcentaje
<i>Somatosensorial</i>	
Miembros anteriores	2-9%
Vibrisas	3-15%
Mandíbula	4-8%
<i>Motora</i>	
Primaria	3-6%
Secundaria	0%
<i>Cíngulo</i>	
	<4%

Tabla III. Porcentaje de neuronas piramidales por fotografía que presentaron alteración en la polaridad neuronal.

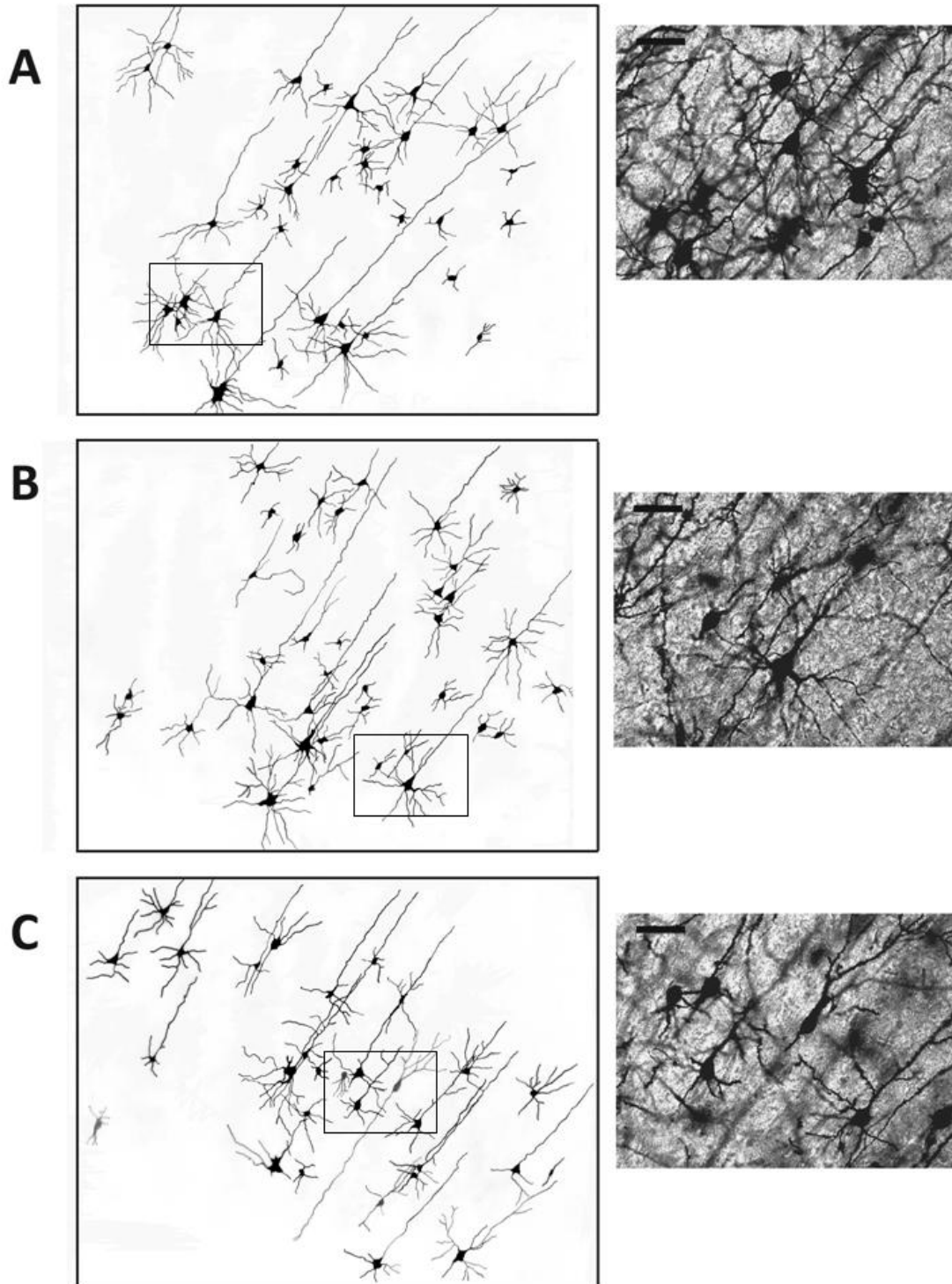


Figura 19. Dibujos de las cortezas somatosensorial de ratas juveniles teñidas con el método de Golgi-Cox. En A, CHOW; B, CONT; C, EXP. Las imágenes representativas de la corteza somatosensorial, en la zona que corresponde a las vibrisas, fueron obtenidas con un objetivo 10x y luego dibujadas para notar con más claridad los tipos neuronales corticales; en el recuadro se muestran neuronas piramidales normales (objetivo 40x) (A y B) y con alteración en la polaridad neuronal (C), la barra de escala equivale a 50µm.

Una vez que se observó que la corteza presentaba alteraciones discretas en la polaridad neuronal, se cuantificó la expresión del factor de transcripción Notch1 implicado en el establecimiento de la polaridad neuronal. Se analizó la expresión de las variedades procesadas de Notch 1 (NICD) de 200kDa y 120kDa en el tejido cerebral total de las crías recién nacidas. Notch1 de 120kDa no tuvo diferencias estadísticamente significativas (Chi-cuadrada= 4.8₂, $p=0.091$), como se observa en la **Figura 20**; mientras que para la proteína de 200kDa, en la condición EXP se observó aumento en la expresión (Chi-cuadrada= 6.0₂, $p=0.05$), comparada contra las condiciones CHOW y CONT, como se observa en la **Figura 21**.

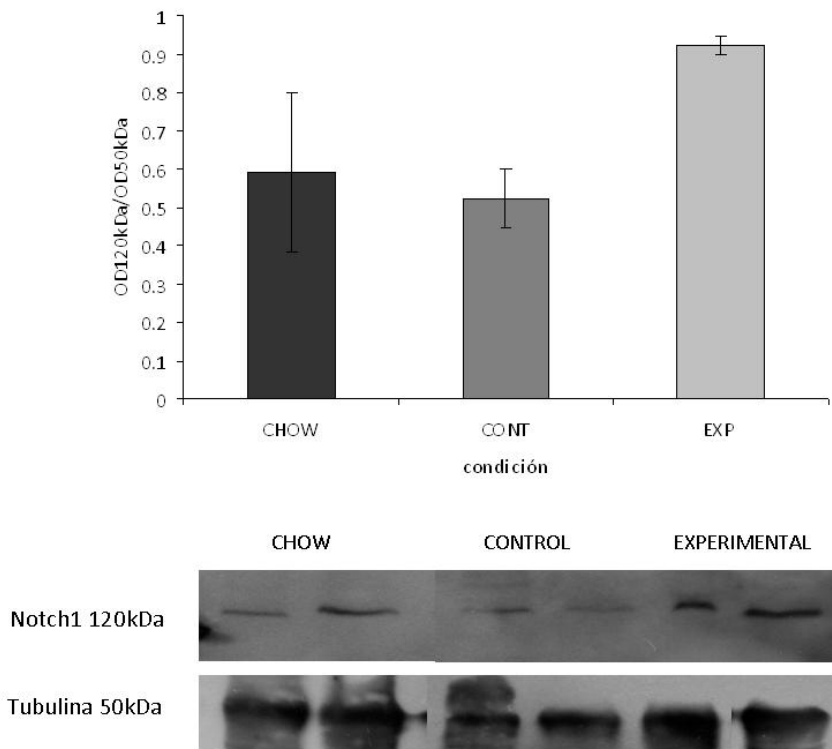


Figura 20. Expresión de la proteína Notch1 de 120kDa al nacimiento. Los datos en el histograma representan media y error estándar. Bajo el histograma se muestran Western blots representativos de cada una de las condiciones.

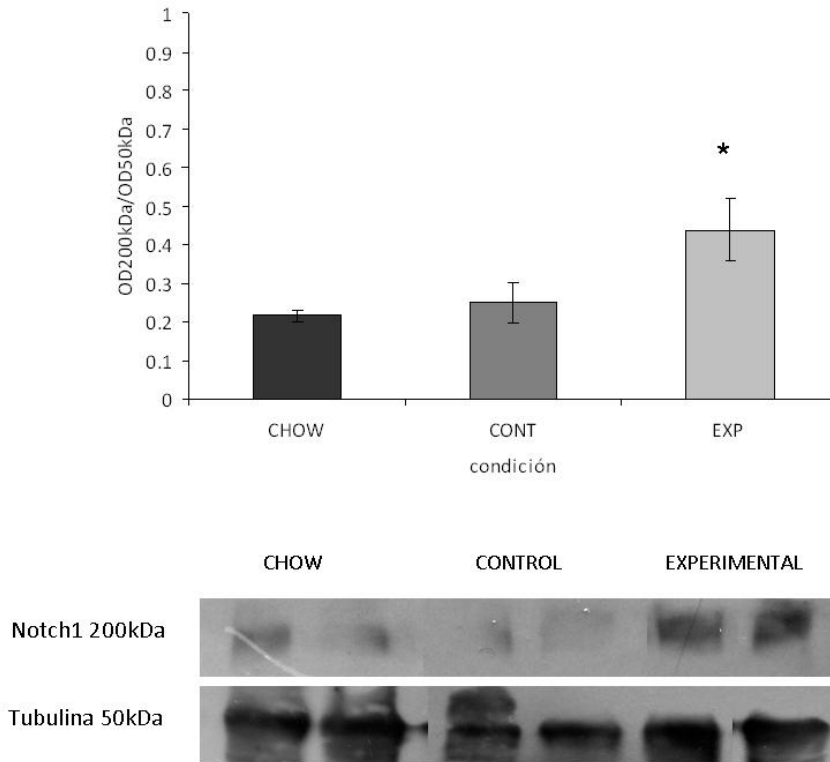


Figura 21. Expresión de la proteína Notch1 de 200kDa al nacimiento. La expresión de la proteína Notch1 fue mayor en el grupo EXP. Los datos en el histograma representan media y error estándar. * $p < 0.05$ el histograma se muestran Western blots representativos de cada una de las condiciones.

Análisis conductual, campo abierto

Debido a que en las evaluaciones histológicas se encontraron alteraciones citoarquitectónicas diversas, se decidió evaluar la conducta espontánea en los animales sometidos a privación prenatal de triptófano dietario. Se escogió el campo abierto en condición de iluminación tenue para evaluar la conducta espontánea y en iluminación intensa (500W) para evaluar la conducta en condición aversiva.

Originalmente el campo abierto se empleó para estudiar la “emocionalidad” en las ratas; el procedimiento consiste en iluminar con luz brillante una arena de aproximadamente 1.20m de diámetro cerrada por una pared de 0.45m de alto y colocar en la periferia de la arena a la rata (Prut & Belzung, 2003). Los roedores prefieren, de manera espontánea, la periferia del aparato (tigmotaxis) a permanecer en la parte central del campo abierto. Si los animales incrementan su tiempo de

permanencia en la zona central del campo o disminuyen la latencia para moverse hacia el centro del campo se considera ansiólisis; en este caso la ansiedad está disparada por dos mecanismos, la agorafobia y la separación del grupo social (Prut & Belzung, 2003).

Los parámetros evaluados en el campo abierto fueron tiempo de inmovilidad, tiempo de congelamiento, tiempo que pasa en la periferia del campo abierto, tiempo que pasa en el centro del campo abierto, exploración vertical (número de veces en los que la rata se levanta sobre sus patas traseras), exploración horizontal (número de cuadrantes por los que cruza en el campo abierto), acicalamiento y bolos fecales (número).

LUZ TENUE			
	CHOW	CONTROL	EXPERIMENTAL
Inmovilidad	56.28 ± 7.33	52.18 ± 16.10	33.39 ± 11.37
Congelamiento	0.41 ± 0.23	0.81 ± 0.51	0.00 ± 0.00
Exploración vertical	32.14 ± 3.15	18.87 ± 1.87	20.38 ± 2.88
Exploración horizontal	269.61 ± 17.79	312.75 ± 52.06	265.97 ± 26.46
Tiempo en la periferia	282.43 ± 3.39	291.04 ± 3.51	291.63 ± 1.64
Tiempo en el centro	17.17 ± 3.29	8.95 ± 3.51	8.33 ± 1.64
Acicalamiento	7.49 ± 2.26	22.89 ± 15.36	25.96 ± 8.65
Bolos fecales	1.05 ± 0.34	1.5 ± 0.86	1.44 ± 0.53

Tabla IV. Conductas de los animales expuestos a la prueba de campo abierto en condición de iluminación tenue. La prueba se realizó en P40, se utilizaron 5 machos por condición experimental. Medias ± ES.

En cuanto a la conducta espontánea (luz tenue) de las ratas sometidas a privación prenatal de triptófano dietario, esta no difiere al de las ratas control en los parámetros tiempo de inmovilidad, congelamiento, acicalamiento, tiempo en la

periferia, tiempo en el centro y defecado ($p>0.05$), como se muestra en la **Tabla IV**; únicamente se observó cambio en la exploración vertical ($F= 4.91_{2-27}$ $p= 0.016$), también conocida como *rearing*.

LUZ INTENSA			
	CHOW	CONTROL	EXPERIMENTAL
Inmovilidad	89.05 ± 16.61	94.33 ± 42.18	88.13 ± 23.88
Congelamiento	3.61 ± 2.44	4.97 ± 3.59	30.29 ± 12.34
Exploración vertical	30.58 ± 3.48	21.94 ± 4.52	18.05 ± 3.59
Exploración horizontal	190.43 ± 18.73	208.83 ± 12.75	141.29 ± 27.11
Tiempo en la periferia	290.72 ± 3.18	297.71 ± 2.28	296.46 ± 2.16
Tiempo en el centro	9.31 ± 3.20	2.28 ± 2.27	3.52 ± 2.17
Acicalamiento	10.28 ± 4.07	1.09 ± 1.09	14.58 ± 3.82
Bolos fecales	2.70 ± 0.59	3.11 ± 1.25	3.75 ± 1.03

Tabla V. Conductas de los animales expuestos a la prueba de campo abierto en condición de iluminación intensa. La prueba se realizó en P40, se utilizaron 5 machos por condición experimental. Medias ± ES.

La exposición a luz intensa en la prueba de campo abierto provocó que el tiempo de de congelamiento aumentara en todos los grupos. Sin embargo, el tiempo de las ratas con privación prenatal de triptófano fue mayor que los controles ($F= 3.87_{2-22}$), obteniendo significancia estadística ($p<0.05$). Para el resto de los parámetros evaluados, no existió diferencia estadísticamente significativa, ver **Tabla V**.

Al analizar las trayectorias en el campo abierto, es decir, el recorrido del animal al interior del campo durante el tiempo que duró el ensayo se pudieron observar diferencias en el patrón de recorrido entre las condiciones luz tenue y luz intensa; en la

primera, se observó una mayor cantidad de cruces por la zona central del campo abierto para todos los animales, mientras que en la condición de luz intensa esta exploración por la zona central disminuye de forma similar para todos los grupos.

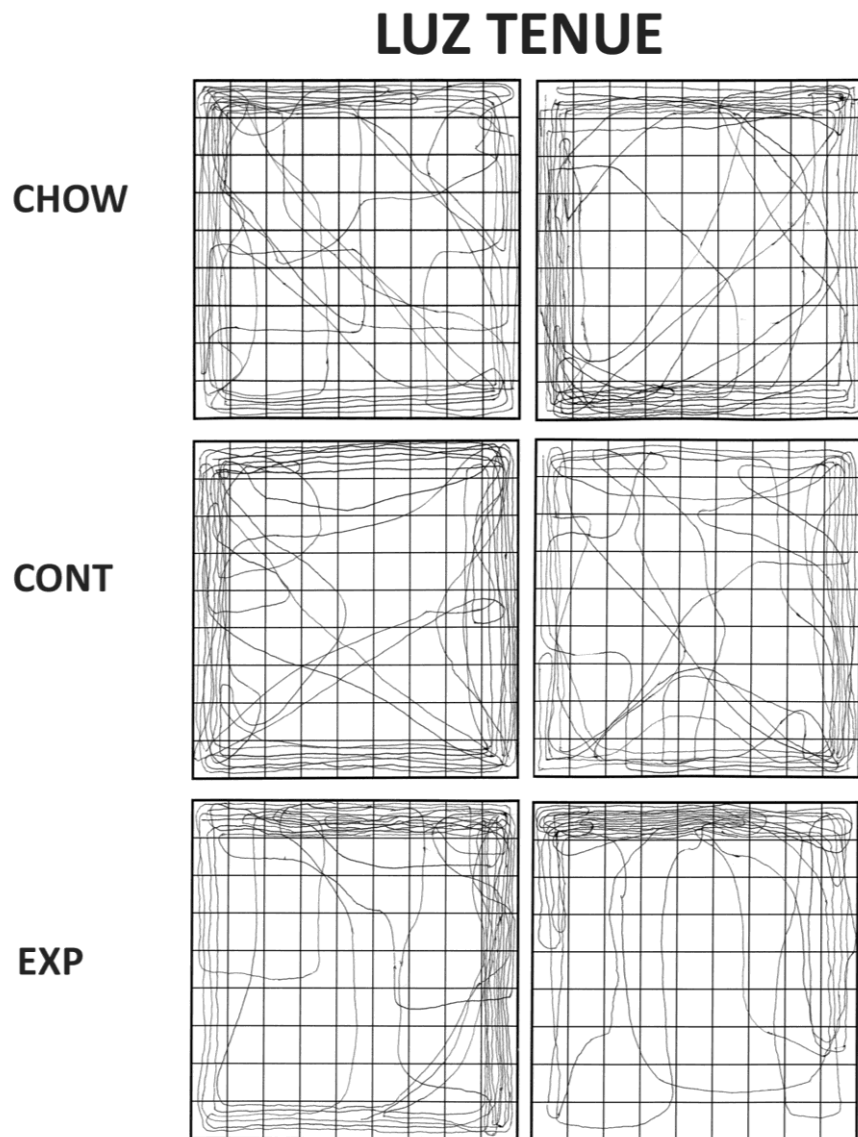


Figura 22. Trayectorias representativas de dos animales de cada grupo experimental en el campo abierto. Condición de iluminación tenue.

Como se observa en las **Figuras 22 y 23**, las trayectorias del grupo experimental muestran que los animales no exploraron de manera uniforme el campo abierto, sino

que hubo zonas en las que permanecieron más tiempo desplazándose y otras que permanecieron prácticamente inexploradas.

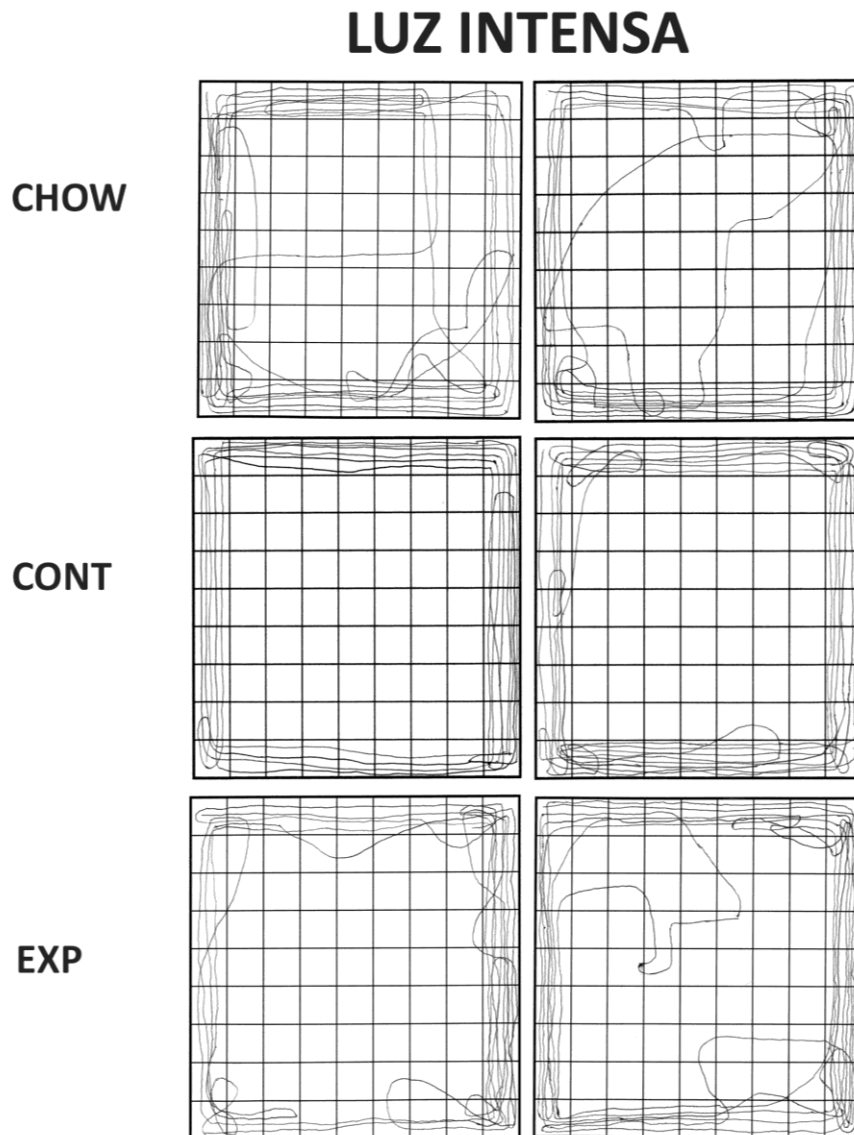


Figura 23. Trayectorias representativas de dos animales de cada grupo experimental en el campo abierto. Condición de iluminación intensa.

DISCUSIÓN

En el presente trabajo se investigaron los efectos de la privación crónica dietética de triptófano prenatal durante la ontogenia del sistema serotoninérgico, evaluando en particular al núcleo del rafe dorsal y la inervación eferente en el haz proscencefálico medial; así como el efecto de la privación de triptófano sobre el desarrollo cortical a través de la inervación serotoninérgica a las células de Cajal-Retzius.

La manipulación dietética consistió en la elaboración y administración crónica de una dieta libre de triptófano. Hay que recordar que la restricción de triptófano limita la síntesis de serotonina cerebral, por lo que históricamente se han empleado varias dietas que utilizan alguna de las siguientes opciones: mezcla de aminoácidos libre de triptófano; caseína hidrolizada, que como ya se mencionó, la hidrólisis ácida desnatura al triptófano presente sin afectar al resto de los aminoácidos, o bien el empleo de maíz, ya sea molido o en harina.

La formulación de la dieta deficiente en triptófano aquí empleada es una modificación a la fórmula de dos dietas publicadas previamente por Thomas & Wysor en 1967 y por Segall & Timiras en 1976. En la primera dieta se empleó la hidrólisis ácida para desnaturar al triptófano en la caseína, siendo esta la principal fuente de aminoácidos y se empleó también maíz molido como fuente principal de carbohidratos; en la segunda dieta también se empleó caseína hidrolizada como fuente principal de aminoácidos pero la fuente principal de carbohidratos fue en este caso la sacarosa.

En el presente trabajo, se observó reducción en el peso corporal en los animales con privación dietética de triptófano prenatal. La relación entre la función serotoninérgica y la secreción de hormona del crecimiento es bien conocida; en la rata adulta, Willoughby y colaboradores (1982), observaron inhibición de la secreción de hormona del crecimiento posterior a la administración de PCPA y/o 5,7 dihidroxitriptamina. En los animales del grupo EXP, la dieta deficiente de triptófano inhibió la síntesis de serotonina durante la gestación, y podría así interferir con la adecuada secreción de la hormona de crecimiento. El peso cerebral de las crías recién nacidas permaneció sin cambios entre las condiciones, como se ha reportado en otras investigaciones similares (Orozco-Suárez *et al.*, 2003; Vitalis *et al.*, 2007).

Uno de los objetivos de esta tesis fue determinar el efecto de la privación crónica de triptófano dietético durante la gestación sobre la ontogenia del sistema serotoninérgico, en particular del núcleo del rafe dorsal. Al nacimiento, se observó que el empleo de la dieta aquí descrita, provocó disminución en el número de neuronas productoras de serotonina en el núcleo antes mencionado, aproximadamente un tercio menos de neuronas que los grupos control. El núcleo caudal lineal, el rafe mediano y el dorsal agrupan al 85% de todas las neuronas serotoninérgicas en el SNC (Hornung, 2003), por lo que el impacto de la disminución en el número de neuronas serotoninérgicas debido a la manipulación prenatal es considerable.

En el trabajo de Orozco-Suárez *et al.* (2003), la administración prenatal y postnatal de una dieta a base de maíz (8% proteína) no disminuyó en el número de neuronas positivas a serotonina en ningún núcleo del rafe durante las primeras dos semanas de vida postnatal. No fue sino hasta P14 y P60 que se encontró una discreta reducción en el número de neuronas positivas a 5-HT en el rafe dorsal y mediano. En otro estudio, se alimentó a ratas hembras lactantes con una dieta deficiente en triptófano con el fin de disminuir el suministro de triptófano a las crías; esta manipulación produjo la reducción en el número de neuronas ir a 5-HT en las regiones dorsal y ventral del rafe dorsal en P14 (González *et al.*, 2008). En el presente trabajo, la administración de una dieta libre de triptófano con 19% proteína provocó la reducción en 35% del número de neuronas positivas a TrpH en el núcleo del rafe dorsal de ratas recién nacidas, lo que indica que durante el desarrollo del sistema serotoninérgico, este núcleo es más sensible a la disminución de triptófano durante el periodo prenatal a la obtenida durante el periodo de desarrollo postnatal.

Es importante mencionar que al momento del nacimiento, la totalidad de las neuronas serotoninérgicas ya están diferenciadas y colocadas en su respectivo núcleo, y no es posible que se diferencien durante la vida postnatal, ya que no están presentes las señales embrionarias que les permiten diferenciarse.

La tasa de síntesis de serotonina en el sistema nervioso central es dependiente de la concentración de triptófano plasmático libre (Biggio *et al.*, 1974); en recién nacidos, la mayor parte del triptófano se encuentra en forma libre, y la afinidad de los transportadores de aminoácidos aromáticos por este aminoácido en particular es mayor en los individuos jóvenes que en adultos (Bourgoin *et al.*, 1974). En los trabajos

previamente citados (González *et al.*, 2008; Orozco-Suárez *et al.*, 2003) se valen de una inmunohistoquímica contra serotonina para determinar los efectos de la privación de triptófano en el número de neuronas serotoninérgicas, esta aproximación no es la más conveniente, a diferencia del empleo de la enzima paso limitante debido al bajo nivel de triptófano libre en plasma inducido por la restricción dietética, la síntesis de serotonina en el cerebro de los animales privados es menor, de manera que la reducción en el número de neuronas inmuno-reactivas a serotonina reportado en estos trabajos no necesariamente refleja el número de neuronas que sintetizan serotonina en el tallo cerebral.

Como se menciona previamente, en el presente trabajo la administración de las dietas control y experimental se suspendió en E22, que es la fecha esperada para el parto, por lo que las hembras del grupo experimental recobraron la concentración plasmática de triptófano (Biggio *et al.*, 1974) y por ende, la de las crías. Los análisis de HPLC mostraron que la concentración de serotonina total en los cerebros de las crías recién nacidas fue similar entre las condiciones.

Al examinar la distribución de neuronas inmuno-reactivas a TrpH a lo largo del núcleo del rafe dorsal en el grupo EXP, encontramos que además de la reducción en el número de neuronas que sintetizan serotonina, estas neuronas se agrupan de un modo distinto a los grupos control. El rafe dorsal se dividió en regiones, rostral, medial y caudal, de acuerdo al atlas del desarrollo de la rata (Altman & Bayer, 1995); en los grupos control se observó que el núcleo alberga un mayor número de neuronas productoras de serotonina en las regiones medial y caudal, y la región rostral es la menos poblada. En el grupo privado de triptófano prenatal se observó que una diferencia en el perfil de distribución de las neuronas serotoninérgicas; el número de neuronas inmuno-reactivas a hidroxilasa de triptófano en la región rostral no difiere del que se observa en las regiones medial y caudal.

En E11, los factores de transcripción necesarios para el establecimiento del linaje serotoninérgico aparecen en el rombencéfalo rostral (Krueger & Deneris, 2008). Las neuronas que “nacerán” entre las rombómeras 1 a 3 constituirán al grupo serotoninérgico rostral o grupo B4-B9, mientras que las neuronas originadas entre las rombómeras 5 a 7 formarán el grupo serotoninérgico caudal o B1-B3 (Krueger & Deneris, 2008). El grupo rostral migra hacia el mesencéfalo, mientras que el grupo caudal lo

hace hacia el puente y el bulbo raquídeo (Hornung, 2003). En un par de estudios (Miyazaki *et al.*, 2005; Narita *et al.*, 2002) la administración de ácido valpróico o talidomida a ratas gestantes provocó hiperserotonemia sistémica y cambios en la distribución de las neuronas serotoninérgicas del núcleo del rafe dorsal de las crías. Los animales expuestos prenatalmente a la talidomida y al ácido valpróico no mostraron diferencias en el número total de neuronas inmuno-reactivas a serotonina en el rafe dorsal, sin embargo, la distribución de las neuronas a lo largo del núcleo cambió, desplazándose esta hacia la región caudal (Miyazaki *et al.*, 2005).

Las ratas que fueron sometidos a privación prenatal de triptófano presentaron un menor número de neuronas serotoninérgicas y estas no se distribuían de la misma forma que las de los grupos control. Como se mencionó en la introducción, una concentración elevada de serotonina provoca una respuesta de quimio-repulsión, ya existe inervación serotoninérgica previa, y a bajas concentraciones de serotonina se presenta una señal de quimio-atracción para los conos de crecimiento de las neuronas 5-HT (Whitaker-Azmitia, 2001). De esta forma, los animales hiperserotonérgicos, en los trabajos de Miyazaki y colaboradores (2005), mostraron “caudalización” del rafe dorsal, mientras que nuestras ratas, alimentadas con una dieta deficiente en triptófano exhibieron una “rostralización” del núcleo, lo que respalda a la hipótesis de defecto en la migración de las neuronas serotoninérgicas.

Con el fin de conocer la densidad de la inervación del sistema serotoninérgico ascendente en respuesta a privación prenatal de triptófano, se decidió cuantificar el número de fibras inmunorreactivas a HT en el haz tegmental central y lateral. Pese a que bajo la condición de privación de triptófano dietético gestacional se encontró una reducción en más del 35% de neuronas serotoninérgicas en el núcleo del rafe dorsal (B6 y B7), la vía de salida principal hacia el prosencéfalo basal de los núcleos serotoninérgicos anteriores, no muestra diferencias en cuanto a número de fibras. Este hallazgo sugiere un posible mecanismo compensatorio que permitiría que pese a la reducción en el número de células serotoninérgicas, la inervación a los blancos se preservara. Esto podría ocurrir gracias a la ramificación de los axones de las neuronas serotoninérgicas existentes.

Como es evidente en las micrografías, la marca de la inmunorreacción es más tenue en el grupo deficiente de triptófano prenatal, tal cómo ocurrió con la marca en

los somas de las neuronas 5-HT anteriormente, por lo que el empleo de la densidad óptica para realizar la cuantificación de las fibras habría tenido resultados engañosos.

En las hipótesis de este trabajo se planteó la presencia de cambios discretos pero persistentes en la citoarquitectura cortical, tales como alteraciones en la polaridad neuronal de las células piramidales corticales así como desórdenes en la migración neuronal; esto es en la laminación cortical debido a que se presentaría alteración en la expresión de la proteína rielina, necesaria para la correcta migración neuronal, así como del factor de transcripción vinculado con la expresión de la rielina, Notch1 mismo que es responsable del establecimiento de la polaridad neuronal.

En principio se buscó evidencia de la invasión serotoninérgica en las CRc a través de la observación de receptores 5-HT_{1A}; estos receptores están acoplados a una proteína *Gi*, es decir inhiben la actividad de la adenilato ciclasa, por lo que disminuye la producción de adenosín monofosfato cíclico, y tienden a inhibir el metabolismo celular. En investigaciones previas, se ha observado que la administración de agonistas serotoninérgicos inespecíficos durante la gestación tuvo como consecuencia la disminución en la expresión de la proteína rielina, secretada por las CR's (Janussonis *et al.*, 2004), por lo que en el presente trabajo se planteó en las hipótesis que dada la privación de triptófano prenatal a través de la dieta, se modificaría la expresión de la proteína. Como se observó en la sección de resultados, los animales del grupo EXP mostraron un aumento de la expresión en dos isoformas de la proteína rielina; al disminuir los niveles de serotonina, la estimulación a los receptores 5-HT_{1A} sería menor, permitiendo que las CRc secretaran mayor cantidad de rielina.

Una vez que se observó que la expresión de la proteína rielina era mayor en los animales sometidos a privación prenatal de triptófano, se evaluó la migración radial en el hipocampo. La tinción de Nissl permitió visualizar a las neuronas piramidales del sector CA2 del hipocampo con sus características más relevantes, un cuerpo celular grande (Johnston & Amaral, 2004) y cuerpos de Nissl gruesos y abundantes (Geneser, 2000). El número de neuronas piramidales en la capa piramidal registradas en las condiciones control fue similar, no así en el grupo EXP, en donde se observó un menor número de pirámides. Al comparar el peso corporal y cerebral de los animales de los grupos control contra el grupo EXP en P20 se notó que los animales son mucho más

pequeños, y de allí puede provenir el menor número de neuronas piramidales observadas. En el estrato *radiatum* los grupos control no presentaron diferencias en el número de neuronas piramidales contabilizadas, pero el grupo EXP mostró un mayor número de neuronas fuera de la capa piramidal.

La administración crónica de un agonista serotoninérgico inespecífico (5-metoxitriptamina), desde el día E12 hasta el día del parto, produjo disminución en la expresión de rielina y pérdida del arreglo columnar en la corteza presubicular; la corteza presubicular posee un arreglo citoarquitectónico específico, esta exhibe columnas bien definidas en la región supragranular, que pueden ser apreciadas con una tinción de Nissl (Jannusonis *et al.*, 2004).

En los ratones *reeler* –deficientes en rielina-, hay una falla en el andamiaje que provee la glía radial del hipocampo, provocando que las células granulares del giro dentado se encuentren dispersas en toda la región (Sibbe *et al.*, 2009). Durante la vida postnatal, la rielina participa regulando también la migración neuronal. Al sobre-expresar rielina en el cerebro postnatal se alteró la migración neuronal de las células granulares del giro dentado; mientras que las neuronas granulares recién generadas en la zona subgranular de los animales control migraban hacia la zona más profunda de la capa granular del giro dentado. En los animales adultos que sobre-expresaban rielina las nuevas neuronas granulares se ubicaban a lo ancho de toda la capa granular e incluso alcanzaban la capa molecular (Pujadas *et al.*, 2010). En los trabajos antes citados, concluyen que la disminución o incremento en la expresión de la rielina afectó la migración neuronal radial, comprometiendo al arreglo citoarquitectónico. Nuestros resultados demostraron un incremento en la expresión de dos de las isoformas de rielina y alteración en la migración de las neuronas piramidales en el hipocampo de los animales deficientes de triptófano dietético.

Con lo que respecta a la evaluación de la polaridad en las neuronas piramidales corticales, las tinciones de Golgi-Cox permitieron observar la morfología neuronal y así detectar anomalías en la neurona. En las ratas sometidas a privación prenatal de triptófano dietético se observó con mayor frecuencia alteraciones en la polaridad celular de las neuronas piramidales. La abundancia en la expresión del fragmento transmembrana del factor de transcripción Notch1 (NICD), responsable en parte del

establecimiento de la polaridad neuronal en los animales privados de triptófano prenatal podría aclarar en parte la presencia de este fenómeno.

La expresión de Notch1, específicamente NICD, es escasa en ratones *reeler*. La pérdida de la señalización de la rielina y Notch1 provoca alteraciones en la migración neuronal radial cortical y defectos morfológicos, entendidos como la orientación anormal de los procesos neuronales apicales, así como la presencia de más de una dendrita apical o procesos inconsistentemente orientados (Hashimoto-Tori *et al.*, 2008). Como se mostró en la introducción, la disminución en la señalización de Notch 1 reduce tanto la expresión de procesos primarios y disminuye la arborización dendrítica, mientras que el incremento en la señalización por Notch1 reduce la longitud dendrítica (Redmond *et al.*, 2000) esto significa que la señalización de Notch1 es indispensable para la regulación del citoesqueleto neuronal, pero también la rielina puede contribuir a estabilizar al citoesqueleto.

En los ratones *reeler* también se encontró que los niveles de tau fosforilado son mayores que en los animales silvestres, además de presentar incremento en la actividad de GSK3B, responsable de la fosforilación de tau (Ohkubo *et al.*, 2003). Por otra parte, la activación de los receptores ApoE inducen la fosforilación de la proteína adaptadora Dab1 que suprime la fosforilación de tau *in vivo* a través de la estimulación de la cinasa de 3-fosfidil-inositol (PI3K), resultando en la activación de la proteína cinasa B (PKB) e inhibiendo a GSK3B (Beffert *et al.*, 2002). Esto significa que tanto la vía de señalización de Notch1 como de rielina convergen en el citoesqueleto, regulando la fosforilación de tau y en consecuencia, la polimerización y estabilidad del citoesqueleto neuronal.

De entre las cortezas evaluadas, la corteza somatosensorial en donde están representadas las vibrisas, exhibió el mayor número de casos de alteración en la polaridad; es decir, las alteraciones no se distribuyeron de manera homogénea. El desarrollo de la corteza somatosensorial se ha vinculado a la disponibilidad de serotonina durante las primeras semanas de vida postnatal. Como se mencionó en la introducción, SERT se expresa en la vía tálamo cortical que inerva la corteza somatosensorial, en la zona que representa a las vibrisas (Verney *et al.*, 2002; Luo *et al.*, 2003) y se cree que la serotonina obtenida por esta vía participa en el ajuste de los mapas sensoriales en los roedores (Herlenius & Lagercrantz, 2004). Pese a que en el

caso de la formación de los barriles en la capa IV de la corteza somatosensorial se necesita directamente de la presencia de serotonina (Gaspar *et al.*, 2003; Luo *et al.*, 2003; Vitalis & Parnavelas, 2003; Vitalis *et al.*, 2007) y en los eventos de establecimiento de la polaridad neuronal no sea el neurotransmisor directamente responsable del proceso, es importante señalar esta similitud en la vulnerabilidad de la corteza a la manipulación del sistema serotoninérgico.

Para determinar si la privación prenatal de triptófano dietético tuvo consecuencias a largo plazo en la conducta de los sujetos se empleó el campo abierto con dos formas de iluminación, luz tenue para observar la conducta espontánea de los sujetos, e iluminación intensa para observar la conducta ante una situación aversiva.

En el campo abierto, se observó que en condiciones de luz tenue la conducta de los animales sometidos a privación prenatal de triptófano fue similar a los controles, con excepción de la exploración vertical o *rearing*; mientras que cuando se utilizó la iluminación intensa, fue el congelamiento el que se incrementó significativamente, sin modificarse ningún otro parámetro.

La inhibición neonatal de la síntesis de serotonina, mediante la administración intraventricular de 5,7-dihidroxitriptamina, reduce la exploración en el campo abierto en los animales de 3 meses, sin modificar el tiempo que pasan en la periferia o el centro de la arena (Rok-Bujko *et al.*, 2012); por otra parte, la administración prenatal de PCPA entre los días E8-11 o E14-17 produce en los animales de 3 meses incremento en la exploración en el campo abierto (Vateava *et al.*, 2007). Cuando la depuración de serotonina neonatal se efectúa inhibiendo la expresión de los transportadores vesiculares en las neuronas serotoninérgicas, la locomoción espontánea en los animales de 2 meses de edad se reduce en aproximadamente 40% (Narboux-Neme *et al.*, 2011); todo lo anterior muestra que durante el desarrollo, los momentos en el que se lleve a cabo la depuración de serotonina son cruciales para la manifestación conductual posterior, ya que si bien en todos los casos se redujo la expresión del neurotransmisor, las consecuencias conductuales no son las mismas.

La interpretación de los resultados también constituye una fuente de controversia, ya que por un lado, en los trabajos en donde se limita la disponibilidad del neurotransmisor de manera postnatal, la disminución en la locomoción se considera una conducta “no ansiosa” o ansiolítica (Narboux-Neme *et al.*, 2011), y por

tanto, los animales en el presente trabajo serían catalogados como “no ansiosos” al pasar más tiempo inmóviles en presencia de luz intensa; mientras que en los estudios en donde se reducen los niveles de serotonina neonatal y se observa disminución de la locomoción en el campo abierto, consideran esto como una “conducta similar a la depresión” (Rok-Bujko *et al.*, 2012; Lesch *et al.*, 2012).

En el presente trabajo, no se observó modificación en la locomoción con lo que respecta al número de cruces por el campo abierto, pero si se encontró que las trayectorias que los animales describieron fue distinta entre los grupos control y el privado de triptófano prenatal; en este último se observa preferencia por una zona del campo abierto, especialmente cuando la iluminación es tenue. Esta conducta ha sido catalogada como “perseverante” (Scott & Deneris, 2005) y se le relaciona con los trastornos del espectro autista (Lesch *et al.*, 2012). Sin embargo, los intentos por modelar a los trastornos del espectro autista se enfocan en el incremento en la disponibilidad de serotonina postnatal (Mikazaki *et al.*, 2005; Narita *et al.*, 2007; Scott & Deneris 2005); en el presente trabajo se buscó reducir la disponibilidad del triptófano prenatal, es decir, el evento contrario, además de que no se encontró modificación en la concentración total de serotonina postnatal.

Conclusiones

Sistema serotoninérgico

- La privación prenatal de triptófano dietético redujo la cantidad de neuronas productoras de serotonina en el núcleo del rafe dorsal de las ratas. También modificó la distribución de estas neuronas a lo largo del núcleo, por lo que se concluye que al disminuir la cantidad de triptófano, precursor de la serotonina, durante la gestación, el desarrollo del sistema serotoninérgico se ve afectado. Estos hallazgos se suman a las evidencias que muestran que la serotonina, durante la gestación, participa en la regulación del desarrollo de su propio sistema.

Corteza cerebral

- Los animales privados de triptófano durante la gestación mostraron una mayor cantidad de neuronas ectópicas en el hipocampo que los animales control. Así mismo se encontró que en la neocorteza, especialmente la somatosensorial, las neuronas piramidales presentaron defectos en la polaridad neuronal, es decir, en la disposición de sus procesos dendríticos. Debido a que se observó que la expresión de rielina y Notch1 en los animales privados de triptófano durante la gestación fue mayor que los controles, se concluye que los desarreglos citoarquitectónicos en las cortezas podrían estar explicados por la alteración en la señalización de estas moléculas en las neuronas piramidales.

Conducta en el campo abierto

- Los animales privados de triptófano dietético durante la gestación, sometidos a la prueba de campo abierto, mostraron incremento en el tiempo de congelamiento e incremento en la exploración vertical. Las trayectorias que estos animales describieron en el campo abierto mostraron una pobre exploración en la totalidad del campo y se restringieron a recorrer solo una sección del mismo. Con esto se concluye que la privación prenatal de triptófano dietético provocó cambios conductuales a largo plazo; las alteraciones en la citoarquitectura cortical así como del núcleo del rafe dorsal podrían ser responsables de estas características en la conducta.

Referencias

- Acampora D & Simeone A. Understanding the roles of Otx1 and Otx2 in the control of brain morphogenesis. *Trends in Neuroscience* 1999, 22: 116-122.
- Altman J & Bayer SA. *Atlas of prenatal rat brain development*. CRC Press, 1995.
- Arévalo R, Alfonso D, Castro R & Rodríguez M. Fetal brain serotonin synthesis and catabolism is under control by mother intake of tryptophan. *Life Sciences* 1991, 49: 53-66.
- Azmitia EC. Modern views on an ancient chemical: Serotonin effects on cell proliferation, maturation and apoptosis. *Brain Research Bulletin* 2004, 56: 413-424.
- Baba K, Dekimoto H, Muraoka D, Agata K, Terashima T & Katsuyama Y. A mouse homologue of Strawberry Notch is transcriptionally regulated by Reelin signal. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2006, 350: 842-849.
- Beffert U, Morfini G, Bock H, Huichuan R, Brady S & Herz J. Reelin-mediated signaling locally regulates protein kinase B/Akt and glycogen synthase kinase 3B. *Journal of Biological Chemistry* 2002, 277: 49958-49964.
- Biggio G, Fadda F, Fanni P, Tagliamonte A & Gessa GL. Rapid depletion of serum tryptophan, brain tryptophan, serotonin and 5-hydroxyindolacetic acid by a tryptophan-free diet. *Life Sciences* 1974, 14: 1321-1329.
- Bonnin A, Peng W, Hewlett W & Levitt P. Expression mapping of 5-HT1 serotonin receptor subtypes during fetal and early postnatal mouse forebrain development. *Neuroscience* 2006, 141: 781-794.
- Booij L, Van der Does AJW, Haffmans PMJ, Riedel WJ, Fekkes D & Blom MJB. The effects of high-dose and low-dose tryptophan depletion on mood and cognitive functions of remitted depressed patients. *Journal of Psychopharmacology* 2005, 19: 267-275.
- Bradke F & Dotti CG. Establishment of neuronal polarity: lessons from cultured hippocampal neurons. *Current Opinion in Neurobiology* 2000, 10: 574-581.
- Casanova MF & Trippe J. Regulatory mechanisms of cortical laminar development. *Brain Research Reviews*, 2006; 51: 72-84.
- Chaouloff F. Physiopharmacological interactions between stress hormones and central serotonergic systems. *Brain Research Reviews* 1993, 18: 1-32.
- Dahlström A & Fuxe K. Evidence for the existence of monoamine containing neurons in the central nervous system. I. Demonstration of monoamines in the cell bodies of brain stem neurons. *Acta Physiologica Scandinavica* 1964, 62(Sup. 232): 13-55.

- Darnell DK. Anteroposterior and dorsoventral patterning. Capítulo 3. En: Rao M.S. & Jacobsson M (Eds.). *Developmental Neurobiology*, Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York. Cuarta edición, 2005.
- Del Río JA, Heimrich B, Borrell V, Förster E, Drakew A, Alcántara S, Nakajima K, Miyata T, Ogawa M, Mikoshiba K, Derer P, Frotscher M & Soriano E. A role of Cajal-Retzius cells and reelin in the development of hippocampal connection. *Nature* 1997, 385: 70-74.
- Diez JA, Sze PV & Ginsburg BE Tryptophan regulation of brain tryptophan hydroxylase. *Brain Research* 1976, 104: 396-400.
- Donato R. S100: a multigenic family of calcium-modulated proteins of the EF-hand type with intracellular and extracellular functional roles. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 2001, 33: 637-668.
- Douglas R, Markram H & Martin K. Neocortex. Pp: 499-558. En: Sheperd GM (Ed). *The synaptic organization of the brain*. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, 2005.
- Fernstrom JD & Hirsch MJ. Brain serotonin synthesis: reduction in corn-malnourished rats. *Journal of Neurochemistry* 1977, 28: 877-879.
- Flores-Cruz MG & Escobar A. Normal neuronal migration. *Salud Mental* 2011, 34: 61-66.
- Flores-Cruz MG & Escobar A. Ontogenia de los sistemas de neurotransmisión. *Revista de Neurología* 2012, 54: 41-48.
- Frazer A & Hensler JG. Serotonin. En: Siegel GJ., *et al.* (Eds). *Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects* (pp 263-292), 6ta Ed. Philadelphia: Lippincott Raven Publishers.
- Gaspar P, Cases O & Maroteaux L. The developmental role of serotonin: news from mouse molecular genetics. *Nature Reviews Neuroscience* 2003, 4:1002-1012.
- Geneser F. *Histología. Sobre bases biomoleculares*. Editorial Médica Panamericana, Tercera Edición, 2000.
- Goma M & Tobeña A. Reliability of various measures obtained in open field test. *Psychological Reports* 1978, 43: 1123-1128.
- González EMC, Penedo LA, Oliveira-Silva P, Campello-Costa P, Araújo-Guedes RC & Serfaty CA. Neonatal tryptophan dietary restriction alters development of retinotectal projections in rats. *Experimental Neurology* 2008, 211: 441-448.
- González-Burgos I, Del Ángel-Meza AR, Barajas-López G & Feria-Velasco A. Tryptophan restriction causes long-term plastic changes in corticofrontal pyramidal neurons. *International Journal of Developmental Neuroscience* 1996, 14: 673-679.
- Hale MW, Hay-Schmidt A, Mikkelsen JD, Poulsen B, Bouwknecht JA, Evans AK, Stamper CE, Shekhar A & Lowry CA. Exposure to an open-field arena increases c-fos expression in a

- subpopulation of neurons in the dorsal raphe nucleus, including neurons projecting to the basolateral amygdaloid complex. *Neuroscience* 2008, 157: 733–748.
- Harding A, Paxinos G & Halliday G. The serotonin and tachykinin systems. Pp: 1205-1212. En: Paxinos G (Ed.) *The rat nervous system*. 3ra edición. Elsevier Academic Press, San Diego, USA. 2004.
- Haring JH & Yan W. Dentate granule cell function after neonatal treatment with parachloroamphetamine or 5,7-dihydroxytryptamine. *Developmental Brain Research* 1999, 114: 269-272.
- Hashimoto-Tori K, Torii M, Sarkisian MR, Bartley CM, Shen J, Radtke F, Gridley T, Sestan N & Rakic P. Interaction between reelin and notch signaling regulates neuronal migration in the cerebral cortex. *Neuron* 2008, 60: 273-284.
- Herlenius E & Lagercrantz H. Development of neurotransmitter systems during critical periods. *Experimental Neurology* 2004, 190: S8-S21.
- Herz J & Chen Y. Reelin, lipoprotein receptors and synaptic plasticity. *Nature Reviews Neuroscience*. 2006, 7: 850-859.
- Holland PWH, Booth HA & Bruford EA. Classification and nomenclature of all human homeobox genes. *BMC Biology* 2007, 5:47.
- Hufton SE, Jennings G. & Cotton RGH. Structure and function of the aromatic amino acid hydroxylases. *Biochemistry Journal* 1995, 311: 353-366.
- Igvy-May N, Tamir H & Gershon MD. Synaptic properties of serotonergic growth cones in developing rat brain. *J Neurosci* 1994, 14:1011-1029.
- Iyo AH, Porter B, Deneris ES. & Austin MC. Regional distribution and cellular localization of the ETS-domain transcription factor, FEV, mRNA in the human postmortem brain. *Synapse* 2005, 57:223–228.
- Jacobs, BL. & Azmitia EC. Structure and function of the brain serotonin system. *Physiological Reviews* 1992, 72: 165-229.
- Janusonis SS, Gluncic V, Rakic P. Early serotonergic projections to Cajal-Retzius cells: Relevance to cortical development. *Journal of Neuroscience* 2004, 24: 1652-1659.
- Jarriault S, Brou C, Logeat F, Schroeter EH, Kopan R & Israel A. Signalling downstream of activated mammalian Notch. *Nature* 1995, 377: 355-358.
- Jha S, Rajendran R, Davda J & Vaidya VA. Selective serotonin depletion does not regulate hippocampal neurogenesis in the adult rat brain: Differential effects of p-chlorophenylalanine and 5,7-dihydroxytryptamine. *Brain Res* 2006, 1075: 48-59.

- Jiang H, Guo W, Liang X. & Rao Y. Both the establishment and maintenance of neuronal polarity require active mechanisms: critical roles of GSK-3B and its upstream regulators. *Cell* 2005, 120: 123-135.
- Johnston D, & Amaral DG. Hippocampus. En: Shepherd GM (Ed). *The synaptic organization of the brain*. Oxford University Press. Quinta edición, 2004.
- Jossin Y, Bar I, Ignatova N, Tissir F, Lambert de Rouvroit C, Goffinet A. The reelin signaling pathway: some recent developments. *Cerebral Cortex* 2003, 13: 627-633.
- Keilani S, Sugaya K. Reelin induces a radial glial phenotype in human neural progenitors cells by activation of Notch-1. *BMC Developmental Biology* 2008, 8:69.
- Knott PJ & Curzon G. Free tryptophan in plasma and brain tryptophan metabolism. *Nature* 1978, 239: 452-453.
- Konno J, Narita M. & Narita N. Migration and differentiation disorder of serotonergic neuron in the embryonic thalidomide/valproic acid exposed autism model rats. Poster. 34th Annual Meeting Society for Neuroscience. San Diego, November 2004.
- Krahan MP & wodarz a. Notch sigaling: linking delta endocytosis and cell polarity. *Developmental Cell* 2009, 17: 153-154.
- Kriegstein A, Noctor S & Martínez-Cerdeño V. Patterns of neuronal stem and progenitor cell division may underlie evolutionary cortical expansion. *Nature Reviews Neuroscience*, 2006; 7: 883-890.
- Kriegstein AR & Noctor SC. Patterns of neuronal migration in the embryonic cortex. *Trends in Neuroscience*, 2004; 27(7): 392-399.
- Krueger KC & Deneris E.S. Serotonergic transcription of human FEV reveals direct GATA factor interactions and fate of Pet-1-deficient serotonin neuron precursors. *Journal of Neuroscience* 2008, 28: 12748–12758.
- Lai EC. Notch signaling: control of cell communication and cell fate. *Development* 2004, 131: 965 – 973.
- Lathia JD, Mattson MP & Cheng A. Notch: From neuronal development to neurological disorders. *Journal of Neurochemistry* 2008, 107: 1471-1481.
- Lauder JM. Neurotransmitters as growth regulatory signals: role of receptors and second messengers. *Trends in Neuroscience* 1993, 16: 233-240.
- Lepetit P, Touret M, Grange E, Gay B & Bobiller P. Inhibition of methionine incorporation into brain proteins after systemic administration of p-chlorophenylalanine and L-5-hydroxytryptophan. *European Journal of Pharmacology* 1991, 209: 207-212.
- Lesch KP, Araraggi N, Waider J, van de Hove D & Gutknecht L. Targeting brain serotonin synthesis: insights into neurodevelopmental disorders with long-term outcomes related

- to emotionality, aggression and anti-social behavior. *Philosophical Transactions of The Royal Society* 2012, 367: 2426-2443.
- Lidov HG & Molliver ME. An histochemical study of serotonin neuron development in the rat: ascending pathways and terminal fields. *Brain Res Bull* 1982, 8:389-430.
- Liu C, Maejima T, Wyler SC, Casadesus G, Herlitze S & Deneris ES. *Pet-1* is required across different stages of life to regulate serotonergic function. *Nature Neuroscience* 2010, 13: 1190-1200.
- Luhmann HJ, Hanganu I & Kilb W. Cellular physiology of the neonatal rat cerebral cortex. *Brain Research Bulletin*, 2003; 60: 345-353.
- Luo X, Persico AM & Lauder JM. Serotonergic regulation of somatosensory cortical development: Lessons from genetic mouse models. *Developmental Neuroscience* 2003, 25: 173-183.
- Lytle LD, Messing RB, Fisher L & Phebus L. Effects of long-term corn consumption on brain serotonin and response to electric shock. *Science* 1975, 190:692-694.
- Marín O & Rubenstein JLR. Cell migration in the forebrain. *Annual Review Neuroscience*, 2003; 26: 441-483.
- Marín-Padilla M. Cajal-Retzius cells and the development of the neocortex. *Trends in Neuroscience* 1998, 21: 64-71.
- Miyazaki K, Narita M & Narita N. Maternal administration of thalidomide or valproic acid causes abnormal serotonergic neurons in the offspring: implication for pathogenesis of autism. *International Journal of Developmental Neuroscience* 2005, 23: 287-297.
- Murrin LC, Sanders JD & Bylund D.B. Comparison of the maturation of the adrenergic and serotonergic neurotransmitter systems in the brain: Implications for differential drug effects on juveniles and adults. *Biochemical Pharmacology* 2007, 73: 1225-1236.
- National Academy of Sciences. Capítulo 2: Nutrient requirements of the laboratory rat. En: *Nutrient Requirements of the laboratory animals*, 4ta edición, 1995.
- Narboux-Neme N, Sagné C, Doly S, Diaz SL, Martin CBP, Angenard G, Martres MP, Giros B, Hamon M, Lanfumey L, Gaspar P & Mongeau R. Severe serotonin depletion after conditional deletion of the vesicular monoamine transporter 2 gene in serotonin neurons: neural and behavioral consequences. *Neuropsychopharmacology* 2011, 36: 2538-2550.
- Narita N, Kato M, Tazoe M, Miyazaki K, Narita M & Okado N. Increased monoamine concentration in the brain and blood of fetal thalidomide- and valproic acid-exposed rat: Putative animal models for autism. *Pediatric Research* 2002, 52: 576- 579.
- Nishiyama H, Knöpfel T, Endo S & Itohara S. Glial protein S-100B modulates long-term neuronal

synaptic plasticity. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2002, 99: 4037-4042.

Ohkubo N, Lee YD, Morishima A, Terashima T, Satoshi K, Tohyama M, Sakanaka M, Tanaka J, Maeda N, Vitek MP & Mitsuda N. Apolipoprotein E and Reelin ligands modulate tau phosphorylation through an apolipoprotein E receptor/disabled-1/glycogen synthase kinase-3beta cascade. *The Journal of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 2003, 17: 295-297.

Orozco-Suárez S, Del Ángel AR, Beas-Zárate C, Manjarrez G & Feria-Velasco A. Corn feeding during development induces changes in the number of serotonergic neurons in the raphe nuclei. *International Journal of Developmental Neuroscience* 2003, 21:13-22.

Ossipova O & Sokol SY. Cell polarity, notch signaling and neurogenesis. *Cell Cycle* 2010, 9: 1-2.

Polleux F & Anton ES. Neuronal migration in the developing brain. Pp 223-239. En: Rao MS., Jacobson M. *Developmental Neurobiology*, 4ta edición. Kluwer Academic / Plenum Publishers, Nueva York, 2005.

Prophet EB, Mills B, Arrington JB. & Sobin LH. *Métodos histotecnológicos*. Instituto de Patología de las Fuerzas Armadas de los Estados Unidos de América. Registro de Patología de los Estados Unidos de América, Washington D.C., 1995.

Prut L & Belzung C. The open field test as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors. *European Journal of Pharmacology* 2003, 463:3-33.

Pujadas L, Gruart A, Bosch C, Delgado L, Teixeira CM, Rossi D, de Lecea L, Martínez A, Delgado-García JM & Soriano E. Reelin regulates postnatal neurogenesis and enhances spine hypertrophy and long-term potentiation. *Journal of Neuroscience* 2010, 30: 4636-4649.

Redmond L, Oh SR, Hicks C, Weinmaster G & Ghosh A. Nuclear Notch1 signaling and the regulation of dendritic development. *Nature Neuroscience* 2000, 3: 30-40.

Rice DS & Curran T. Role of the reelin signaling pathway in central nervous system development. *Annual Reviews Neuroscience* 2001, 24: 1005-1039.

Rok-Bujko P, Krzascik P, Szyndler J, Kostowski W & Stefanski R. The influence of neonatal serotonin depletion on emotional and exploratory behaviours in rats. *Behavioural Brain Research* 2012, 226: 87-95.

Ross ME & Walsh CA. Human brain malformations and their lessons for neuronal migration. *Annual Reviews Neuroscience* 2001, 24: 1041-1070.

Scott MM & Deneris ES. Making and braking serotonin neurons and autism. *International Journal of Developmental Neuroscience* 2005, 23: 277-285.

Sibbe M, Förster E, Basak O, Taylor V & Frostscher M. Reelin and Notch1 cooperate in the development of the dentate gyrus. *Journal of Neuroscience* 2009, 29: 8578-8585.

- Sigala S, Zoli M, Palazzolo F, Faccoli S, Zanardi A, Mercuri NB & Spano P. Selective disarrangement of the rostral telencephalic cholinergic system in heterozygous reeler mice. *Neuroscience* 2007, 144: 834-844.
- Simon HH, Scholz C & O'Leary DDM. Engrailed genes control developmental fate of serotonergic and noradrenergic neurons in mid- and hindbrain in a gene dose-dependent manner. *Molecular and Cellular Neuroscience* 2005, 28:96–105.
- Supèr H, Soriano E & Uylings HBM. The functions of the preplate in development and evolution of the neocortex and hippocampus. *Brain Research Reviews* 1998, 27: 40-64.
- [Supèr H](#), [Del Río JA](#), [Martínez A](#), [Pérez-Sust P](#) & [Soriano E](#). Disruption of neuronal migration and radial glia in the developing cerebral cortex following ablation of Cajal-Retzius cells. [Cerebral Cortex](#) 2000, 10: 602-13.
- Tahirovic S & Bradke F. Neuronal polarity. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 2009; 1: a001644
- Thomas RG & Wysor WG. Alteration of serotonin metabolism in rats deficient in niacin and tryptophan. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 1967, 126: 374- 377.
- Thompson JA & Ziman M. Pax genes during neural development and their potential role in neuroregeneration. *Progress in Neurobiology* 2011, 95: 334-351.
- Tissir F, Lambert de Rouvroit C & Goffinet AM. The role of reelin in the development and evolution of the cerebral cortex. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 2002; 35: 1473-1484.
- Ueda S, Hou XP, Whitaker-Azmitia PM & Azmitia EC. Neuro-glial interaction in the S-100 β retarded mutant mouse (Polydactyly Nagoya). II. Co-cultures study. *Brain Research* 1994, 633: 284-288.
- Utsunomiya-Tate N, Kubo K, Tate S, Kainosho M, Katayama E, Nakajima K & Mikoshiba K. Reelin molecules assemble together to form a large protein complex, which is inhibited by the function-blocking CR-50 antibody. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2000, 97: 9729-9734.
- Valiente M, & Marín O. Neuronal migration mechanisms in development and disease. *Current Opinion in Neurobiology*, 2010; 20: 68-78.
- Van der Does AJW. The effects of tryptophan depletion on mood and psychiatric symptoms. *Journal of Affective Disorders* 2001, 64: 107-119.
- Van Eldik LJ & Wainwright MS. The Janus face of glial-derived S100B: Beneficial and detrimental functions in the brain. *Restorative Neurology and Neuroscience* 2003, 21: 97-108.

- Verney C, Lebrand C & Gaspar P. Changing distribution of monoaminergic markers in the developing human cerebral cortex with special emphasis on the serotonin transporter. *The Anatomical Record* 2002, 267:87–93.
- Vataeva L, Kudrin VS, Vershinina EA, Mosin VM, Tiul'kova EI & Otellin VA. Behavioral alteration in the adult rats prenatally exposed to para-chloro phenylalanine. *Brain Research* 2007, 1169: 9-16
- Vitalis T & Parnavelas JG. The role of serotonin in early cortical development. *Developmental Neuroscience* 2003, 26:245-256.
- Vitalis T, Cases O & Parnavelas JG. Development of the dopaminergic neurons in the rodent brainstem. *Experimental Neurology* 2005, 191:S104-S112.
- Vitalis T, Cases O, Passermard S, Callabert J & Parnavelas JG. Embryonic depletion of serotonin affects cortical development. *European Journal of Neuroscience* 2007, 26:331-344.
- Wallace JA & Lauder JM. Development of serotonergic system in the rat embryo: an immunocytochemical study. *Brain Res Bull* 1983, 10:459-479.
- Whitaker-Azmitia PM. Serotonin and brain development: Role in human developmental diseases. *Brain Res Bull* 2001, 56:479-485.
- Yan W, Wilson C & Haring JH. Effects of neonatal serotonin depletion on the development of rat dentate granule cells. *Develop Brain Res* 1997, 98: 177-184.
- Young VR. Protein and amino acids. Pp. 49-64. En: Gershwin ME, German JB & Keen CL (Eds.) *Nutrition and immunology. Principles and practice*, Humana Press Totowa, New Jersey. 2000.
- Zhang L, Guadarrama L, Corona-Morales AA, Vega-Gonzalez A, Rocha L, Escobar A. Rats subjected to extended tryptophan restriction during early postnatal stage exhibit anxious-depressive features and structural changes. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* 2006, 65: 562 – 570.

Anexo 1

Dieta sin triptófano -Exp-.

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

Después de mezclar los ingredientes secos, incorporar el aceite y 250 mL de agua ultrapurificada. La dieta experimental prescinde del L-triptófano y a la mezcla se añade colorante comestible amarillo. La dieta control se tiñe con colorante comestible rojo. La masa se moldea en forma de pellet y se deja secar a temperatura ambiente.

Anexo 2

Análisis del contenido de aminoácidos libres y totales en la caseína hidrolizada (Organotechnie).

Aminoácido	Total (g/100g)	Libres (g/100g)
Alanina	1,9	1,3
Arginina	2,2	1,2
Ácido aspártico	4,0	3,0
Ácido glutámico	13,5	7,9
Cistina	0,2	0,2
Fenilalanina	2,2	1,3
Glicina	1,1	0,9
Histidina + Glutamina	1,5	0,57
Isoleucina	3,0	1,1
Leucina	5,0	3,0
Lisina	4,8	2,8
Metionina	-	0,9
Prolina	6,1	3,5
Serina + anserina	2,8	2,0
Treonina + citrulina	2,2	1,5
Tirosina	1,8	0,7
Triptófano	0,0	0,0
Valina	1,8	1,9
TOTAL	56,4	33,9

Anexo 3 Composición Dieta Chow

Harlan Laboratories

Teklad Global 19% Protein Extruded Rodent Diet (Sterilizable)

2019S

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

Macronutrients		
Crude Protein	%	19.0
Fat (acid hydrolysis) ^a	%	9.0
Carbohydrate (available) ^b	%	44.9
Crude Fiber	%	2.6
Neutral Detergent Fiber ^c	%	12.1
Ash	%	5.0
Energy Density ^d	kcal/g (kJ/g)	3.3 (13.8)
Calories from Protein	%	23
Calories from Fat	%	22
Calories from Carbohydrate	%	55

Minerals		
Calcium	%	0.9
Phosphorus	%	0.7
Non-Phytate Phosphorus	%	0.4
Sodium	%	0.1
Potassium	%	0.4
Chloride	%	0.4
Magnesium	%	0.2
Zinc	mg/kg	60
Manganese	mg/kg	80
Copper	mg/kg	15
Iodine	mg/kg	6
Iron	mg/kg	200
Selenium	mg/kg	0.23

Amino Acids		
Aspartic Acid	%	1.1
Glutamic Acid	%	3.5
Alanine	%	1.2
Glycine	%	0.7
Threonine	%	0.6
Proline	%	1.8
Serine	%	0.9
Leucine	%	2.3
Isoleucine	%	0.8
Valine	%	0.9
Phenylalanine	%	1.1
Tyrosine	%	0.5
Methionine	%	0.6
Cystine	%	0.3
Lysine	%	1.1
Histidine	%	0.4
Arginine	%	0.8
Tryptophan	%	0.2

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

Standard Product Form: *Extruded*

Vitamins		
Vitamin A ^{e,1}	IU/g	30.0
Vitamin D ₃ ^{e,2}	IU/g	2.0
Vitamin E	IU/kg	135
Vitamin K ₃ (menadione)	mg/kg	100
Vitamin B ₁ (thiamin)	mg/kg	117
Vitamin B ₂ (riboflavin)	mg/kg	27
Niacin (nicotinic acid)	mg/kg	120
Vitamin B ₆ (pyridoxine)	mg/kg	28
Pantothenic Acid	mg/kg	140
Vitamin B ₁₂ (cyanocobalamin)	mg/kg	0.15
Biotin	mg/kg	0.90
Folate	mg/kg	9
Choline	mg/kg	1200

Fatty Acids		
C16:0 Palmitic	%	0.9
C18:0 Stearic	%	0.2
C18:1ω9 Oleic	%	1.7
C18:2ω6 Linoleic	%	3.9
C18:3ω3 Linolenic	%	0.4
Total Saturated	%	1.2
Total Monounsaturated	%	1.7
Total Polyunsaturated	%	4.4
Other		
Cholesterol	mg/kg	—

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

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

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

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

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

¹ 1 IU vitamin A = 0.3 µg retinol

² 1 IU vitamin D = 25 ng cholecalciferol

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

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

Teklad Diets are designed and manufactured for research purposes only.

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

harlan™
Helping you do research better

