



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA

EFFECTO DE UN AMBIENTE HIPERCALÓRICO-
HIPOPROTEÍNIC PERINATAL SOBRE LA EXPRESIÓN
DE RECEPTORES 5-HT_{1A} EN EL HIPOCAMPO DE LA
RATA JUVENIL

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

LICENCIADA EN NEUROCIENCIAS

P R E S E N T A :

ANGELA RENATA JIMÉNEZ PÉREZ

DIRECTORA DE TESIS:

DRA. PILAR DURÁN HERNÁNDEZ
Facultad de Ciencias, UNAM

Ciudad Universitaria, CDMX, 2023

Facultad de Medicina





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Datos del Jurado

1. Datos del alumno
Jiménez Pérez
Ángela
Renata
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Medicina
Lic. Neurociencias
31504713-6
2. Datos del Tutor
Doctora.
Pilar
Durán
Hernández
3. Datos del sinodal 1
Doctor.
Mauricio
Díaz
Muñoz
4. Datos del sinodal 2
Doctor.
David Erasmo
García
Díaz
5. Datos del sinodal 3
Doctora.
Susana
Castro
Obregón
6. Datos del sinodal 4
Doctora.
Martha Lilia
Escobar
Rodríguez
7. Datos del trabajo escrito
Efecto de un ambiente hipercalórico-hipoproteínico perinatal sobre la expresión de receptores 5-ht1a en el hipocampo de la rata juvenil.
61 pp
2023

Agradecimientos Institucionales

Agradezco a la Universidad Autónoma de México por mi formación académica, por las grandes oportunidades y por los años llenos de aprendizaje.

Al Laboratorio de Biología Animal Experimental por prestar sus instalaciones para el desarrollo de este proyecto.

A la Dra. Pilar Durán Hernández por su apoyo en el desarrollo y planeación de este proyecto, por los grandes aprendizajes y el apoyo incondicional a lo largo de este camino.

Al Apoyo técnico recibido del Dr. Martín A. Fuentes Cano y la Biol. Dulce J. Bustamante Valdez.

A los miembros del jurado, por el tiempo dedicado a la revisión de esta tesis, por su retroalimentación y conocimientos que ayudaron a hacer de este un mejor trabajo.

Dra. Pilar Durán Hernández
Dr. Mauricio Muñoz Díaz
Dr. David Erasmo García Díaz
Dra. Susana Castro Obregón
Dra. Martha Lilia Escobar Rodríguez

PAPIIT IA207521

Al presupuesto institucional FC-PDURÁN 2021-2022

Agradecimientos a título personal

Agradezco a todas las personas que siempre me dieron su apoyo incondicional y que formaron parte de este camino.

A mi familia por ser mi motor y fuerza en momentos de duda e incertidumbre. ¡Lo logramos!

A mi mamá Lorena, por subirte a esta montaña rusa de emociones, de logros y tropiezos, gracias por enseñarme que soy más fuerte de lo que creo. Las palabras no bastan para expresar lo agradecida que estoy de tenerte a mi lado.

A mi papá Manuel, gracias por ser el primero en creer en mí y en este sueño, gracias por darme la fuerza que necesitaba para llegar hasta este momento.

A José Luis, gracias por compartir conmigo cada paso de este camino, por ser mi lugar seguro y cobijarme con tu amor y calma todos los días.

A mis amigos, gracias por hacer de la carrera una experiencia más amena, por tantas risas y buenas anécdotas, espero seguir compartiendo momentos de éxito y felicidad con ustedes.

A mi Tomasita, gracias por ser mi refugio en mis peores momentos, por acompañarme en las noches mientras escribía y por siempre recibirme con una sonrisa.

A Dulce y Martín, gracias por recibirme con los brazos abiertos desde el primer día, por enseñarme tantas cosas, por su amistad y apoyo incondicional. Dulce, gracias por tantos cafés compartidos.

A mi tutora Dra. Pilar Durán, gracias por los aprendizajes y por las oportunidades, por abrirme las puertas de su laboratorio y por empujarme a ser mejor tanto profesional como personalmente.

Dedicatoria

Este trabajo se lo dedico a la persona que vino a completar mi vida, a enseñarme tantas cosas y a llenarme de alegría los días.

A mi hermana,

Nati, esto es para ti. Los sueños sí se cumplen, nunca lo dudes.

I. Índice de tablas y figuras

Tabla 1.	Composición nutrimental de las dietas de los grupos control y malnutrido.....	33
Figura 1.	Esquema de la distribución de proyecciones serotoninérgicas en el sistema nervioso central.....	14
Figura 2.	Esquema de la síntesis y metabolismo de serotonina.....	16
Figura 3.	Esquema del sistema hipocampo-rafe.....	18
Figura 4.	Origen del sistema serotoninérgico en el sistema nerviosos central.....	25
Figura 5.	Comparación de los primeros eventos del neurodesarrollo en ratas y humanos.....	27
Figura 6.	Identificación de áreas de interés.....	33
Figura 7.	Ejemplo de la determinación del área de interés en ImageJ.....	38
Figura 8.	Inmunohistoquímica del receptor 5-HT1a, grupo hembras.....	39
Figura 9.	Inmunohistoquímica del receptor 5-HT1a, grupo machos.....	40
Figura 10.	Control de especificidad.....	41
Figura 11.	Análisis estadístico de la expresión del receptor 5-HT1a.....	42
Figura 12.	Análisis estadístico de la cuantificación celular en el CA1 y giro dentado.....	43
Figura 13.	Tinción con violeta de cresilo del giro dentado del hipocampo dorsal de la rata.....	44
Figura 14.	Tinción con violeta de cresilo del CA1 del hipocampo dorsal de la rata.	45

II. Abreviaturas

5-HT	5-hydroxitriptamina, serotonina
CCK	Colecistoquinina
Co	Grupo control
FGF4	Factor de crecimiento de fibroblastos 4
FGF8	Factor de crecimiento de fibroblastos 8
GD	Giro dentado
MP	Dieta de malnutrición hipercalórica
REM	Rapid eye movement
SHH	Sonic hedgehog
SNC	Sistema Nervioso Central
SERT	Transportador de serotonina

III. Resumen

La serotonina actúa como un factor de crecimiento durante la embriogénesis antes de asumir su papel como neurotransmisor, su actividad forma parte de la cascada de eventos que conducen a cambios en la maduración del sistema nervioso central. La interrupción de estos procesos puede contribuir a un desarrollo deficiente impactando en las respuestas fisiológicas y conductuales del organismo adulto.

El sistema serotoninérgico, una vez establecido, es uno de los sistemas de neurotransmisión más relevantes por sus implicaciones en procesos neurofisiológicos como el establecimiento del ciclo de sueño y vigilia, la atención, el aprendizaje y la memoria, estados de ánimo, etc. Así mismo se ha reportado que alteraciones en su funcionamiento pueden asociarse a patologías como depresión y ansiedad.

La malnutrición es uno de los principales factores no genéticos que afectan al desarrollo del cerebro, alterando negativamente la capacidad del organismo para interactuar con su entorno. Se sabe que una deficiencia en la cantidad o calidad de nutrientes en la dieta durante la gestación y la lactancia provoca cambios en el sistema nervioso de la progenie con consecuencias incluso permanentes. Estudios en animales malnutridos prenatalmente han reportado una serie de alteraciones en el sistema serotoninérgico del cerebro, específicamente en la formación hipocámpica.

Por lo tanto, es importante conocer si el ambiente hipercalórico e hipoproteínico producido por una “dieta de cafetería” impuesta en etapas tempranas pre y postnatales, afecta el desarrollo del sistema serotoninérgico hipocámpico, en particular al receptor 5HT1a y cuáles podrían ser las implicaciones en los procesos cognoscitivos y conductuales relacionados.

Los resultados muestran que, en los machos, la relación entre la expresión de receptores y el número de células se mantiene a pesar de la exposición a la malnutrición perinatal. El conteo celular y la densidad óptica revelaron en el grupo control una diferencia entre machos y hembras: en el CA1 hipocámpico las hembras presentaron menor número de células, pero más expresión de receptores serotoninérgicos. En los grupos experimentales, control y malnutridos, los machos presentan una relación cercana de 1:1, mientras que las hembras malnutridas presentan un mayor número de células (relación 1:1.5), pero menor expresión de receptores serotoninérgicos.

Se concluye que la malnutrición perinatal provocada por una dieta hipercalórica/hipoproteínica disminuye la expresión del receptor 5HT1a tanto en el giro dentado como en el CA1 del hipocampo de ratas hembra y macho. Además, la expresión de receptores 5HT1a en el CA1 del hipocampo presenta un dimorfismo sexual en la rata adulta.

Palabras clave: Malnutrición perinatal, serotonina, receptor 5HT1A, CA1 y giro dentado.

IV. Abstract

Serotonin acts as a growth factor during embryogenesis before assuming its role as a neurotransmitter. Its synthesis and release, as well as the activity of the serotonin receptor, are part of the cascade of events that lead to changes in the maturation of the central nervous system. Disruption in these processes can contribute to impaired development and alterations in the physiological and behavioral responses of the adult organism.

Once established, the serotonergic system is one of the most relevant neurotransmitter systems in the brain, mainly due to its implications in critical neurophysiological processes such as regulation of the sleep-wake cycle, attention, learning and memory, mood, etc. Reports on alterations in their functioning reveal that they can lead to pathologies such as depression and anxiety, among other emotional disorders.

Malnutrition is one of the main non-genetic factors affecting brain development, negatively altering the organism's ability to interact with its environment. In addition, it is known that a deficiency in the quantity or quality of nutrients in the diet during pregnancy and lactation induces changes in the nervous system of the offspring with permanent consequences.

Studies in prenatally malnourished animals have reported various alterations in the brain serotonergic system, specifically in hippocampal formation.

Therefore, it is important to know whether a high-calorie, low-protein environment produced by a "cafeteria diet" during the prenatal and postnatal stages affects the development of the hippocampal serotonergic system, particularly the 5HT1a receptor, and what might be the implications for developmentally related cognitive and behavioral processes.

The results show that, in males, the relationship between receptor expression and cell number was maintained, despite exposure to perinatal malnutrition. In the control group, cell count and optical density revealed a difference between males and females: the female hippocampal CA1 showed fewer cells but higher expression of serotonin receptors. In the male hippocampus of control, and malnourished groups, a proportion close to 1:1 was presented, meanwhile, the malnourished female hippocampus presented a greater number of cells (ratio 1:1.5), but lower expression of serotonin receptors.

We conclude that perinatal malnutrition caused by a high-calorie/low-protein diet decreases the expression of the 5HT1a receptor in the dentate gyrus and hippocampal CA1 of male and female rats. Furthermore, 5HT1a receptor expression in the CA1 hippocampus also exhibits sexual dimorphism in adult rats.

Key words: Perinatal malnutrition, serotonin, 5HT1A receptor, CA1 and dentate gyrus.

Tabla de contenido

Datos del Jurado	1
Agradecimientos a título personal	3
Dedicatoria	4
I. Índice de tablas y figuras	5
II. Abreviaturas	6
III. Resumen	7
1. Introducción	11
2. Antecedentes	13
2.1 El sistema serotoninérgico en el sistema nervioso central en mamíferos	13
2.2. Síntesis y metabolismo de la serotonina	14
2.3 Hipocampo y serotonina	16
<i>2.5.1 De la inducción a la diferenciación de las neuronas serotoninérgicas</i>	22
2.6 El receptor 5-HT1a en el desarrollo del sistema nervioso central	23
2.7 Periodos críticos del desarrollo del cerebro en mamíferos	25
2.8 El neurodesarrollo y la malnutrición	27
2.9 El sistema serotoninérgico y la malnutrición	28
3. Planteamiento del problema	30
4. Hipótesis	31
5. Objetivos	31
5.1 Objetivo general	31
6. Metodología	31
6.1. Animales/Muestras	31

6.2. Dietas	32
6.3 Cuantificación de receptores	33
6.3.1 Preparación de las secciones.....	33
6.3.2 Inmunohistoquímica	33
7.Resultados	38
8. Discusión	46
9. Conclusiones y perspectivas	53
10. Anexos	54
10.1 Soluciones	54
12. Referencias	55

1. Introducción

La maduración del sistema nervioso central y el desarrollo óptimo de capacidades cognoscitivas y conductuales depende de factores tanto genéticos como ambientales (Morgane, et al., 1993). La nutrición es uno de los principales elementos que intervienen en el desarrollo del cerebro, y un desequilibrio o deficiencia en la ingesta de nutrientes puede llevar a alteraciones en el desarrollo con consecuencias a corto y largo plazo.

Diversos estudios tanto en humanos (Black, 2018) como en modelos animales han reportado que una dieta materna baja en proteínas durante el embarazo y la lactancia afecta el desarrollo del cerebro de las crías, ya que puede inducir cambios irreversibles y alterar negativamente la capacidad del organismo para interactuar con su entorno (Morgane, et al., 1993). Investigaciones realizadas bajo un modelo de malnutrición hipoproteínica (Morgane et al., 1993) han permitido estudiar las consecuencias a corto y largo plazo de una deficiencia de proteínas durante etapas pre y postnatales.

El neurotransmisor monoaminérgico serotonina (5-hidroxitriptamina o 5-HT) está ampliamente distribuido en el sistema nervioso central del mamífero. En el cerebro adulto la liberación de serotonina influencia una serie de procesos fisiológicos y de comportamiento. Sin embargo, antes de cumplir su función como neurotransmisor, la serotonina interviene como señalizador en la regulación del desarrollo del sistema nervioso central.

Al igual que ocurre en el sistema nervioso maduro, el desarrollo del sistema nervioso central depende de la activación de receptores específicos. En el caso del sistema serotoninérgico se ha reportado que la expresión de ciertos receptores puede cambiar durante - críticos del desarrollo (Patel & Zhou, 2005)

El receptor 5-HT_{1a} ha recibido especial atención ya que representa uno de los subtipos más abundantes expresados en el cerebro de los mamíferos, además de su expresión en el desarrollo temprano del cerebro. Así mismo, se le ha relacionado con procesos de plasticidad neuronal, regulación de la liberación de serotonina y en el control de diversos tipos de comportamiento (Popova & Naumenko, 2013).

La integridad anatomofuncional del sistema nervioso es importante para el correcto desempeño cognoscitivo y conductual, así como de la interacción con el entorno en los organismos adultos, por lo que es importante determinar si un ambiente hipercalórico e hipoproteínico producido por una “dieta de cafetería” durante el desarrollo perinatal del sistema nervioso afecta la función serotoninérgica y su sistema en el hipocampo en particular el receptor 5HT_{1a} y las implicaciones en la vida adulta.

2. Antecedentes

2.1 El sistema serotoninérgico en el sistema nervioso central en mamíferos

La serotonina (5-hydroxitriptamina, 5-HT), mejor conocida como “la hormona de la felicidad”, es un neurotransmisor que actúa como mensajero modulando la actividad neuronal y diversos procesos fisiológicos en el sistema nervioso central (SNC) (Sodhi & Sanders-Bush, 2004). La serotonina también se encuentra presente en otros sistemas como el entérico, aproximadamente el 90% de su producción tiene origen en el intestino y estudios recientes han reportado que podría estar implicada en la regulación y comunicación con otros sistemas como el inmune a través de las células cebadas (Conti & Shaik-Dasthagirisaheb, 2015; De Vadder et al., 2018; Nautiyal et al., 2012).

Los cuerpos celulares de serotonina tienen origen en los núcleos del rafe del tallo cerebral y sus axones inervan casi todas las regiones del cerebro (Cristina Berumen, 2012). De manera general, las neuronas que contienen serotonina se conocen como grupos celulares B1-B9 y se agrupan en dos bloques principales: la división caudal (B1-B5) y la división rostral (B6-B9) (Gaspar et al., 2003). El grupo rostral representa el 85% de las neuronas serotoninérgicas mientras que el grupo caudal representa el 15% restante (Jean-Pierre Hornung, 2003).

Las neuronas serotoninérgicas rostrales de los núcleos del rafe dorsal y central superior (núcleo del rafe medio) inervan la corteza cerebral, estructuras límbicas del cerebro anterior (formación del hipocampo, amígdala), los ganglios basales, áreas hipotalámicas y algunas regiones talámicas. Mientras que las neuronas serotoninérgicas caudales de los núcleos rafe pontis, magnus, pálido y obscurus se proyectan hacia regiones del tronco cerebral, el cerebelo y médula espinal (Figura 1).

Dado que el sistema serotoninérgico tiene una amplia distribución en el SNC, influye en casi todas las esferas fisiológicas de los mamíferos, desde la regulación cardiovascular y respiratoria, hasta funciones controladas centralmente como la regulación de los ritmos circadianos, el apetito, actividades sensoriomotoras, comportamiento sexual, estado de ánimo y procesos cognoscitivos como el aprendizaje y la memoria.

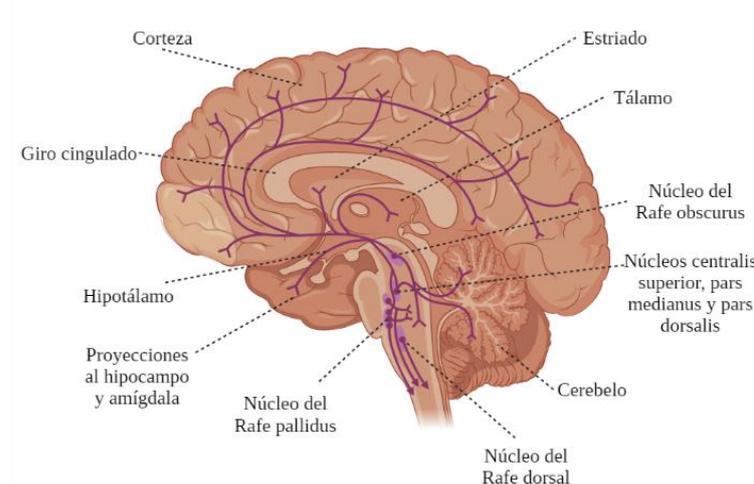


Figura 1. Esquema de la distribución de proyecciones serotoninérgicas en el sistema nervioso central del cerebro humano (modificado de Sodhi & Sanders-Bush, 2004). *Imagen creada en BioRender.com*

2.2. Síntesis y metabolismo de la serotonina

5-hidroxitriptamina o serotonina, es una amina biogénica que se sintetiza en una vía de dos pasos a partir del aminoácido esencial triptófano (Mohammad-Zadeh et al., 2008). Al ser un aminoácido esencial se obtiene únicamente a través de lo que se ingiere en la dieta, siendo ésta la primera limitante para la síntesis de serotonina (Fernstrom J, 1977).

En condiciones normales aproximadamente el 90% del triptófano plasmático está unido a albumina formando un complejo que no puede cruzar la barrera hematoencefálica (BHE); el resto circula como fracción libre disponible para ser transportada hacia el cerebro a través del transportador de aminoácidos (LAT1) (Ruddick et al., 2006).

Una vez en el sistema nervioso central, la serotonina es sintetizada y almacenada en las neuronas presinápticas (neuronas serotoninérgicas, glándula pineal y neuronas catecolaminérgicas), donde el aminoácido esencial triptófano es hidroxilado a 5-hidroxitriptófano (5-HTP) por el triptófano hidroxilasa. Por último, el 5-HTP se descarboxila, gracias a la acción del aminoácido aromático descarboxilasa (AAAD), formando una molécula de serotonina (5-HT) (Mohammad-Zadeh et al., 2008) (Figura 2). Así mismo, es importante destacar que la serotonina es precursora de la síntesis de melatonina. Esta hormona está involucrada en el control circadiano del sueño en especies diurnas, incluido el ser humano, mientras que en especies nocturnas la melatonina se asocia con el estado de vigilia (Ruddick et al., 2006; Nava Zisapel & Zisapel, 2018)

La serotonina ejerce diversos efectos fisiológicos a través de su interacción con múltiples receptores (Bombardi et al., 2021). Esta modulación es compleja y varía según el área del cerebro, pero, de manera general existen siete clases de receptores serotoninérgicos (5HT1-7) con más de 14 subclases. En su mayoría pertenecen a la familia de receptores metabotrópicos, exceptuando al receptor 5HT3 que es de tipo ionotrópico (Berumen et al., 2012; Sodhi & Sanders-Bush, 2004b)

Después de cumplir su función biológica, la serotonina es metabolizada por la enzima de la membrana mitocondrial externa, monoamina oxidasa A (MAO-A) que genera el metabolito (5-HIAA) el cual es eliminado a través de los riñones.

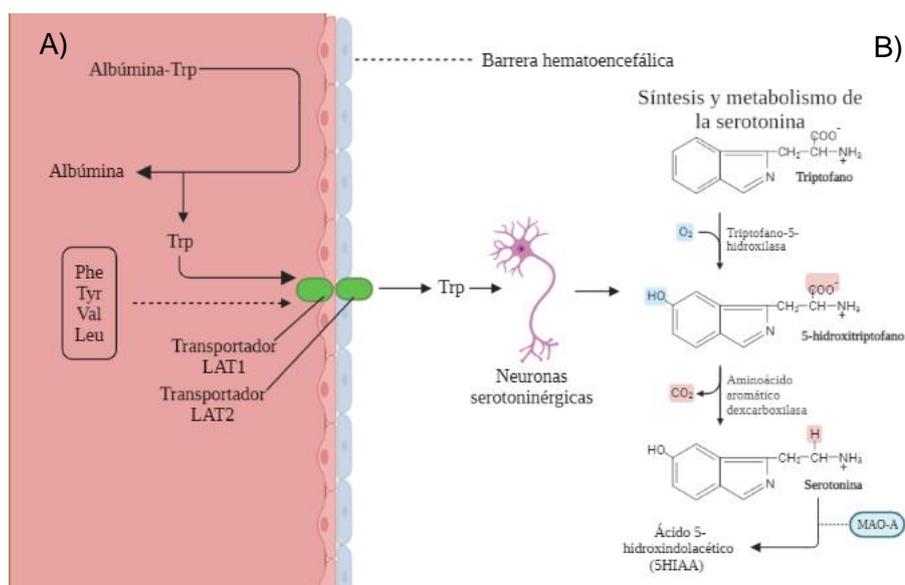


Figura 2. Esquema de la síntesis y metabolismo de serotonina: a) transporte del aminoácido triptofano a través de la barrera hematoencefálica, b) síntesis y metabolismo de la serotonina (modificado de Ruddick et al., 2006). *Imagen creada en*

2.3 Hipocampo y serotonina

El hipocampo es una estructura del cerebro que desempeña un papel fundamental en el procesamiento emocional y cognitivo de los organismos, se considera que la región hipocampal se forma a partir de dos conjuntos de estructuras corticales: la formación hipocampal y la región parahipocampal (Witter & Amaral, 2004). La formación hipocampal se comprende de tres regiones interconectadas: el giro dentado, el hipocampo (que se subdivide en el CA1, CA2, CA3) y el subiculum. Mientras que el complejo parahipocampal está conformado por la corteza entorrinal medial y lateral (Donato, 2021).

Así mismo, la red hipocampal está interconectada a través de una serie de sinapsis secuenciales denominadas circuito trisináptico, el cual tiene el siguiente orden: corteza entorrinal, células granulares del giro dentado, células piramidales de CA3 y piramidales de CA1 que se proyectan de nuevo al área entorrinal (Mongeau R, 1997).

Las neuronas de la formación hipocampal se dividen en dos tipos principales: células glutamatérgicas "excitadoras" (células granulares del giro dentado, células piramidales del hipocampo y del subiculum) e interneuronas GABAérgicas "inhibidoras" (Bombardi et al., 2021).

Por otra parte, el hipocampo es una de las principales áreas del cerebro inervadas por neuronas serotoninérgicas y contiene una de las distribuciones de

receptores a serotonina más complejas del sistema nervioso central (Menahem Segal,1990). Casi todos los receptores pre y postsinápticos de serotonina se han identificado en el hipocampo además del transportador de 5HT (SERT, 5-HTT) y las enzimas encargadas de la síntesis y degradación de la serotonina (Berumen et al., 2012). Debido a esta compleja distribución de inervaciones serotoninérgicas, el papel de la serotonina en la actividad hipocampal ha sido ampliamente discutido, específicamente en la regulación del ciclo sueño-vigilia, aprendizaje y memoria, neurogénesis y alteraciones en el estado de ánimo como la ansiedad y depresión. (Mokler et al., 2007; Mongeau et al., 1997; Sakai et al., 1993).

2.3.1 Inervaciones serotoninérgicas en el Hipocampo

El sistema hipocampo-rafe tiene una distribución dual de proyecciones; el primer grupo surge del núcleo dorsal del rafe y se caracteriza por tener axones finos y pequeñas ramificaciones, el segundo grupo se origina en el núcleo del rafe medial y presenta axones gruesos y ramificaciones terminales (David J. Mokler, 1998). Asimismo, el núcleo dorsal del rafe inerva principalmente el hipocampo ventral, mientras que el hipocampo dorsal tiene proyecciones provenientes del núcleo medial (Peñalva, 2001) (Figura 3).

En la formación hipocampal las fibras serotoninérgicas del núcleo rafe medial se dirigen especialmente hacia el giro dentado (capa molecular y granular) y hacia los campos CA1 y CA3 del hipocampo (en particular en el stratum lacunosum moleculare) (Bombardi et al., 2021). Las fibras serotoninérgicas dirigidas al giro dentado terminan especialmente en la capa celular poliforme, principalmente en la zona subgranular. En el hipocampo, propiamente dicho, las fibras serotoninérgicas están distribuidas de manera difusa y se dirigen preferentemente a interneuronas GABAérgicas que expresan la colecistoquinina (CCK) y proteínas de unión al calcio

(calbindina-D28k y parvalbúmina) (Bombardi et al., 2021). Finalmente, proyecciones de los núcleos serotoninérgicos del rafe medio y dorsal llegan al subiculum innervando principalmente el área ventral (Witter & Amaral, 2004).

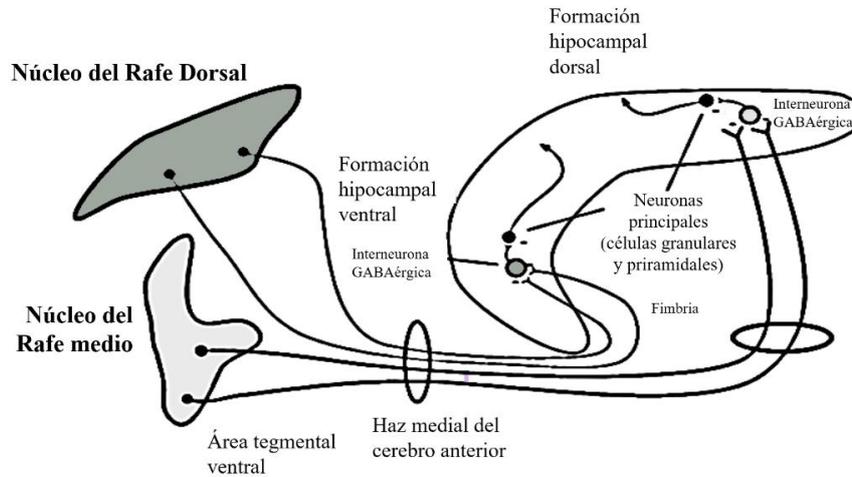


Figura 3 Esquema del sistema hipocampo-rafe. El núcleo del rafe dorsal inerva principalmente el hipocampo ventral. Las proyecciones del núcleo del rafe medio inervan al hipocampo dorsal. El sistema hipocampo-rafe regula la actividad hipocámpica a través de la activación de interneuronas GABAérgicas (Mokler et al., 1998).

2.4. El receptor 5-HT1a en el hipocampo: características, función e implicaciones a nivel cognitivo-conductual

Como mencionamos anteriormente en el hipocampo se expresan las siete familias de receptores serotoninérgicos y casi todas sus subclases, sin embargo, contiene en su mayoría una alta densidad de sitios 5-HT₁, de los cuales un gran porcentaje pertenecen al subtipo 5-HT_{1a} (Berumen et al., 2012).

De manera particular, el receptor 5HT_{1a} ha sido detectado en el giro dentado, CA1, CA2, corteza entorrinal y también, aunque en menor medida, en el CA3 y subiculum del hipocampo de la rata (Bombardi et al., 2021). Específicamente se ha reportado que las células piramidales y granulares, así como las interneuronas GABAérgicas tienen una alta densidad de receptores 5HT_{1a} (Samuels et al., 2016).

Los receptores 5HT1a pertenecen a la familia de receptores metabotrópicos (Mongeau et al., 1997) es decir, funcionan acoplándose a proteínas Gi/Go, las cuales a su vez controlan numerosas cascadas de señalización intracelular, incluidas la inhibición de la formación de adenosín monofosfato cíclico (AMPC), la inactivación de canales de calcio y la activación de canales de potasio (García-García et al., 2014).

Así mismo, los receptores 5-HT1a se clasifican en dos subtipos: autorreceptores presinápticos, localizados en las dendritas y en el cuerpo celular de las neuronas serotoninérgicas de los núcleos del rafe; y los heteroreceptores postsinápticos, que se encuentran en las dendritas y el cuerpo celular de neuronas no serotoninérgicas (Albert & Vahid-Ansari, 2019).

La activación del autorreceptor 5-HT1a regula negativamente el sistema serotoninérgico al inducir la hiperpolarización de las células de los núcleos del rafe, disminuyendo así, la liberación de serotonina dependiente de actividad (Polter & Li, 2010; Popova & Naumenko, 2013).

Por el contrario, la activación de los heteroreceptores 5-HT1a, que se expresan en las neuronas piramidales excitadoras e interneuronas inhibitoras del hipocampo, puede inducir cambios sobre el patrón de disparo modificando respuestas cerebrales específicas (Albert & Vahid-Ansari, 2019). Por ejemplo, la actividad del heterorreceptor 5-HT1a produce una respuesta excitatoria indirecta al inhibir la actividad de las interneuronas GABAérgicas (Rojas & Fiedler, 2016).

En este sentido, los receptores 5-HT1a pueden suprimir la liberación global de serotonina o mediar respuestas específicas en regiones cerebrales como el hipocampo (Albert & Vahid-Ansari, 2019). Asimismo, múltiples estudios sobre la actividad del receptor han observado que tanto el autorreceptor como el heterorreceptor están implicados en una amplia gama de comportamientos.

De manera particular, el receptor 5-HT1a se ha asociado cada vez más con alteraciones en el estado de ánimo, como la ansiedad y la depresión. Es bien sabido que los inhibidores selectivos de la recaptura de serotonina (ISRS) producen un efecto antidepresivo tras un tratamiento crónico, siendo ineficientes en una administración inmediata, sin embargo, es importante aclarar que el efecto antidepresivo a largo plazo es gracias a un aumento en la liberación de serotonina y este aumento a su vez es consecuencia de la inhibición de los transportadores de serotonina (SERT) (Popova & Naumenko, 2013).

Estudios sugieren que el efecto a largo plazo de los ISRSs es gracias a la desensibilización de los autorreceptores presinápticos 5-HT1a pues de acuerdo con Albert y colaboradores (2004) los autorreceptores 5-HT1a se desensibilizan tras el tratamiento crónico con ISRSs, aumentando la frecuencia de disparo de las neuronas y en consecuencia la liberación de serotonina, lo que a su vez se correlaciona con una mejora clínica en pacientes con depresión (Popova & Naumenko, 2013). De igual manera, se ha observado un aumento en la expresión de autorreceptores 5HT1a, en el rafe rostral del tejido post-mortem de víctimas de suicidio en comparación con sujetos control, pero con niveles bajos del autorreceptor 5HT1a en la región del rafe caudal (Albert, 2012; Boldrini et al., 2008).

En este sentido, alteraciones en la expresión basal de autorreceptores 5-HT1a también podrían predisponer al individuo a desarrollar depresión o alguna enfermedad mental relacionada a una desregulación del sistema serotoninérgico (Albert & Lemonde, 2004).

Por otra parte, la particular inervación de las vías serotoninérgicas en el hipocampo y la diversa expresión de receptores en esta área hacen de la serotonina uno de los principales moduladores de la actividad hipocampal. Si bien diversos

estudios han descrito el posible papel de la serotonina en procesos de aprendizaje y memoria, recientemente se ha reportado que ratones con mutación nula en el gen que codifica para el receptor 5HT1a presentan un deterioro en la memoria espacial sugiriendo un papel modulador del receptor en el hipocampo (Glikmann-Johnston et al., 2015).

Finalmente, la serotonina, al igual que otros neurotransmisores, comparte la capacidad de promover el estado de vigilia y suprimir el sueño REM. Receptores como el 5HT1a y 5HT1b se expresan en estructuras que son relevantes para la modulación del sueño y la vigilia, como la corteza cerebral, hipocampo y tálamo. En particular, se ha reportado que ratones que no expresan el receptor 5HT1a presentan una mayor cantidad de sueño REM (por sus siglas en inglés) en comparación con ratones wild-type (Monti, 2011).

2.5. Desarrollo del sistema serotoninérgico

El sistema serotoninérgico tiene un inicio temprano en el desarrollo; en roedores surge alrededor del día embrionario E10 a E12, mientras que en los humanos aparece a partir de la semana cinco de gestación (Booij et al., 2015); un día después de su generación, las neuronas serotoninérgicas provenientes del rafe ya son capaces de sintetizar serotonina (Gaspar et al., 2003). Sin embargo, el neurotransmisor 5-HT puede ser detectado desde la fertilización ya que está implicado en procesos como la morfogénesis temprana del corazón, de los epitelios craneofaciales y estructuras del SNC (Herlenius & Lagercrantz, 2004).

El sistema serotoninérgico comienza su diferenciación a partir de dos grupos (rostral y caudal), provenientes del romboencéfalo ventral (Rubenstein J. L., 1998). El grupo caudal da lugar al rafe pálido, al obscurus y al pontis (B1-B5) (Gaspar et

al., 2003), mientras que el grupo rostral corresponde al rafe dorsal (B7), rafe medio (núcleo central superior, B8), el rafe lineal dorsal caudal (B6) y al grupo celular ventrolateral (B9) (Rubenstein J. L., 1998) (Figura 4).

2.5.1 De la inducción a la diferenciación de las neuronas serotoninérgicas

El desarrollo del sistema nervioso central inicia con la formación de la placa neural. Durante la neurulación la placa neural se cierra y da lugar al tubo neural, que posteriormente se subdivide en una serie de vesículas que son el origen de las de las principales regiones del cerebro: el cerebro anterior (prosencefalo), el cerebro medio (mesencefalo) y el cerebro posterior (rombencefalo) (Bianchi, cap 3; Rubenstein J. L., 1998).

En particular, el rombencefalo se subdivide transitoriamente en varios compartimentos conocidos como rombómeros. Los rombómeros 1, 2 y 3 dan lugar al grupo rostral de neuronas del rafe, y los rombómeros 5, 6 y 7 dan lugar al rafe caudal (Kiyasova & Gaspar, 2011) (Figura 4).

La especificación de los precursores de neuronas serotoninérgicas en el tubo neural está determinada por la combinación de factores secretados y su ubicación a lo largo de los ejes antero-posterior (A/P) y dorso-ventral (D/V) (Chapter 5 Proliferation and Migration of Neurons, 1897; Gaspar et al., 2003). En ratones las neuronas serotoninérgicas aparecen en dos oleadas de diferenciación, en el día embrionario E10 surge el grupo rostral, mientras que en el día E11 aparece el grupo caudal (Kiyasova & Gaspar, 2011).

Así mismo cada uno de estos grupos es inducido por la expresión coordinada de dos morfógenos distintos. El grupo rostral de neuronas serotoninérgicas es inducido por la expresión de Sonic hedgehog (SHH) y el factor de crecimiento de

fibroblastos 8 (FGF8); mientras que el grupo caudal, que surge 24 horas después, es inducido por Shh y el factor de crecimiento de fibroblastos 4 (FGF4) (Kiyasova & Gaspar, 2011).

La señalización de SHH en el rombencéfalo, durante la inducción, conduce a la activación del factor de transcripción de homodominio *Nkx2.2*. La expresión de *Nkx2.2* inicia la diferenciación de las neuronas 5HT y en conjunto con *Mash 1* activa postmíticamente los factores de transcripción *Gata3*, *Gata2*, *Lmx1b* y *Pet1* (Alenina et al., 2006; Kiyasova & Gaspar, 2011)

Por último, la expresión de factores de transcripción como *Pet1* y *Gata 3* determinarán el fenotipo de las neuronas serotoninérgicas activando la transcripción de los genes necesarios para la producción y el metabolismo de serotonina (Alenina et al., 2006; Gaspar et al., 2003).

2.6 El receptor 5-HT1a en el desarrollo del sistema nervioso central

La aparición temprana del neurotransmisor serotonina durante la embriogénesis ha llevado a la hipótesis de que este neurotransmisor en conjunto con algunos de sus receptores juega un papel crítico en el desarrollo y maduración del sistema nervioso central (Kiyasova & Gaspar, 2011; Whitaker-Azmitia et al., 1996).

Se ha reportado que la serotonina afecta distintos procesos del neurodesarrollo como la proliferación, diferenciación, migración celular y sinaptogénesis (Patel & Zhou, 2005; Whitaker-Azmitia et al., 1996). Sin embargo, la capacidad del neurotransmisor serotonina, de regular el desarrollo de ciertas células, depende de la expresión de subtipos específicos de receptores 5-HT (Whitaker-Azmitia et al., 1996).

Si bien se han identificado y clasificado varios subtipos de receptores 5-HT, el receptor 5-HT1a es el que más atención ha recibido como posible mediador entre la

serotonina y sus efectos en el neurodesarrollo (Patel & Zhou, 2005). Principalmente debido a su expresión transitoria en áreas como el cerebelo, que normalmente no expresa o expresa sólo niveles bajos de este receptor en el cerebro maduro; pero que durante el período postnatal temprano muestra transitoriamente niveles elevados en la densidad de sitios 5-HT1 (Daval et al., 1987; Patel & Zhou, 2005).

Estudios previos han reportado fluctuaciones en la expresión del receptor 5HT1a durante etapas prenatales y postnatales en diferentes zonas del cerebro. Hillion, J et al., (1993) reportaron la expresión del receptor 5HT1a en ratas, desde el día embrionario E12 con un aumento en su expresión a partir del día E14-E15 en el tallo cerebral, periodo en el cuál las células serotoninérgicas comienzan a diferenciarse, asimismo, reportan que a partir del día E18 se observa una disminución significativa en la expresión de este receptor. Por otra parte, estudios realizados por Daval et al., (1987) observaron un aumento progresivo en la densidad de los sitios 5-HT1a en el hipocampo, el septum y la corteza cerebral a partir del día E6 hasta la tercera semana postnatal donde llegan a niveles adultos y se estabiliza su expresión.

El receptor 5HT1a se ha relacionado directamente con el desarrollo de estructuras como el hipocampo. En humanos se presenta un pico prenatal (semana 16-22) en la densidad de receptores de serotonina 5-HT1a (Booij et al., 2015), que se asocia a un aumento en la neurogénesis, diferenciación neuronal y maduración dendrítica del hipocampo (Herlenius & Lagercrantz, 2004). De igual manera, estudios realizados en rata muestran que el bloqueo del receptor 5HT1a en un periodo postnatal temprano impide el desarrollo de las dendritas de células piramidales y granulares, causando una reducción en la ramificación, densidad de las espinas y en la formación de sinapsis (Patel & Zhou, 2005).

Por último, es importante destacar que el receptor 5-HT_{1a} también se expresa en elementos no neuronales (astrocitos, glía radial, células endimarias y células endoteliales) (Bombardi et al., 2021). En particular, un estudio realizado en el 2005 por Patel y colaboradores describe una expresión transitoria del receptor 5HT_a en astrocitos del giro dentado, CA1 y CA3 del hipocampo. En ratas el receptor tiene un pico en su expresión en el día postnatal P7 y comienza a disminuir a partir del día P10, concluyendo en una reducción de más del 50% de su expresión para el día P16; estos resultados sugieren que la expresión temporal del receptor 5HT_{1a} desempeña un papel en la regulación de eventos postmitóticos como la migración neuronal, el crecimiento de las neuritas y la diferenciación fenotípica de las células del hipocampo (Patel & Zhou, 2005).

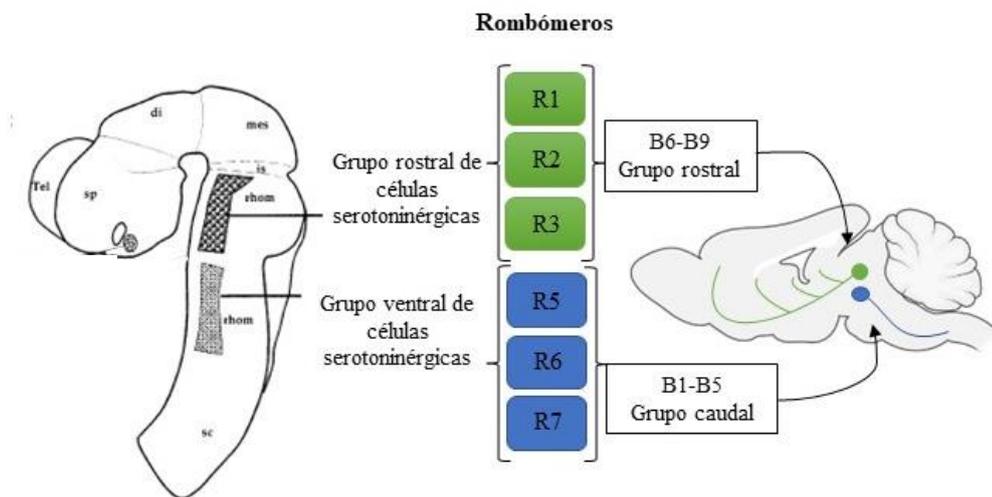


Figura 4. Origen del sistema serotoninérgico en el sistema nervioso central. Después del cierre de la placa neural, el tubo neural se subdivide en 3 vesículas: prosencéfalo, mesencéfalo y romboencéfalo. A su vez, el romboencéfalo se divide transitoriamente en compartimientos más pequeños llamados rombómeros, los cuales darán lugar a los núcleos del rafe. Los rombómeros 1-3 formarán el grupo rostral de las neuronas del rafe (grupo B6-B9) mientras que los rombómeros 5-7 darán lugar al grupo caudal de las neuronas del rafe (grupo B1-B5), (modificado de *Kiyasova & Gaspar, 2011*)

2.7 Periodos críticos del desarrollo del cerebro en mamíferos

El desarrollo del cerebro en mamíferos da inicio en las primeras semanas de gestación y continúa después del nacimiento. Durante la maduración del sistema nervioso central existen ventanas de tiempo conocidas como periodos críticos del

desarrollo, donde ciertos procesos no pueden ser revertidos o repetidos posteriormente (Morgane et al.,1998).

La presencia de periodos críticos del desarrollo nos indica que la maduración del cerebro no ocurre de manera uniforme, y que la duración e importancia de estos periodos depende, en gran medida, de la tasa de cambio que se dé durante esta ventana temporal (Figura 5). En particular, durante procesos críticos el sistema acelera su actividad por periodos cortos de tiempo y al finalizar se detiene por completo, mientras que en otros casos el desarrollo puede iniciar de manera acelerada y gradualmente disminuir su velocidad, pero nunca detenerse por completo (Morgane et al., 2002).

Alteraciones durante periodos críticos pueden llevar a consecuencias irreversibles que incluso modifiquen la capacidad del organismo para interactuar con su entorno. Así mismo, es importante destacar que la severidad, tipo y duración del insulto influirán en cómo afectará el desarrollo del cerebro (Morgane et al., 1993).

Por lo tanto, el desarrollo óptimo y funcional del SNC depende en gran medida de factores externos, como el ambiente nutricional ya que, la administración adecuada (cantidad y calidad) de nutrientes, es necesaria para el desarrollo de estructuras celulares y diversos sistemas metabólicos esenciales (Morgane et al., 1998).

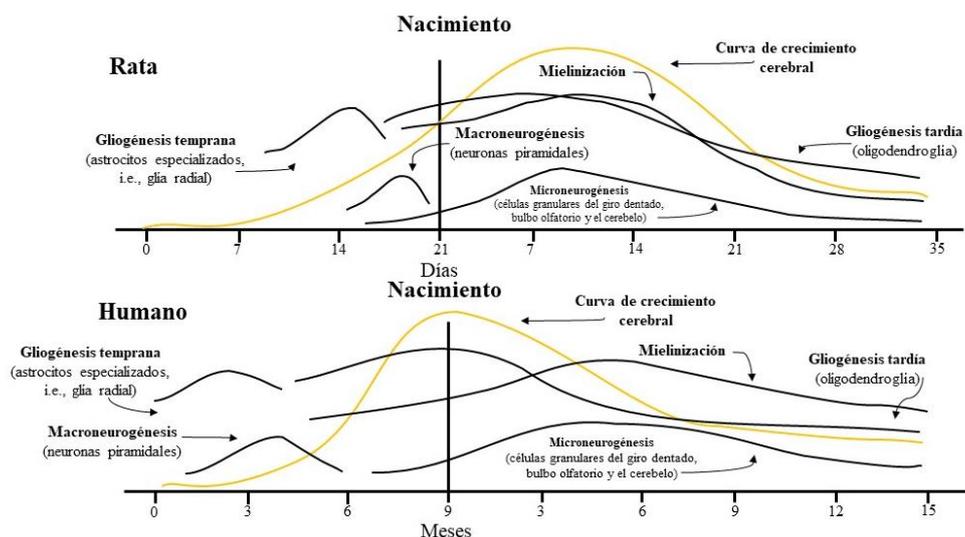


Figura 5. Comparación de los primeros eventos del neurodesarrollo en el cerebro de ratas y humanos. La curva de color amarillo representa el crecimiento del cerebro, las curvas en negro representan eventos específicos del neurodesarrollo como la gliogénesis y mielinización. La relación de las curvas de desarrollo con respecto al tiempo nos permite determinar los periodos críticos, vulnerables o sensibles del desarrollo (*modificado de Morgane et al., 2002*)

2.8 El neurodesarrollo y la malnutrición

La malnutrición es un problema a nivel mundial que afecta adultos, jóvenes, niños e incluso antes de nacer. De manera general, esta condición se refiere a cualquier alteración nutricional que resulte de una deficiencia o exceso en la ingesta de nutrientes (Maniscalco, 2007; OMS, 2021).

De acuerdo con la organización mundial de la salud la malnutrición puede ser clasificada en tres grandes grupos: desnutrición, sobrepeso u obesidad, y malnutrición asociada a un déficit de micronutrientes (OMS, 2021). Esta última ha sido el principal paradigma en la nutrición materno-infantil de países en desarrollo durante la última década, pues afecta a más de un tercio de la población de niños en el mundo (de Onís, et al., 1993; Semba, 2016).

Así mismo, la malnutrición es uno de los principales factores no genéticos que alteran el desarrollo del cerebro (Morgane et al., 1993); en particular, parece afectar el origen, migración y diferenciación celular (Alamy & Bengelloun, 2012) produciendo efectos permanentes en la morfología, fisiología y neuroquímica del cerebro. Es importante destacar que las consecuencias dependen tanto de la duración y ventana temporal como del tipo de malnutrición (Morgane et al., 2002).

Por tanto, en las últimas décadas se han desarrollado diferentes técnicas experimentales para comprender las consecuencias que produce la malnutrición en el sistema nervioso central (Durán, 2000). Dentro de los modelos de malnutrición

más empleados se encuentra la dieta baja en proteínas reportada por Morgane y colaboradores (1993). Esta dieta varía en función del porcentaje de caseína que contenga, es decir, si el 25% de la dieta contiene caseína representa condiciones normales, el 8% desnutrición moderada, o el 6% desnutrición severa.

Estudios han reportado que la exposición a una dieta deficiente en proteínas durante periodos prenatales tiene consecuencias en el desarrollo del cerebro a nivel anatómico, fisiológico, bioquímico y conductual (Resnick et al., 1979). En particular el grupo de Morgane y colaboradores (1999) ha reportado una disminución en el número y tamaño de las neuronas, además de alteraciones en las arborizaciones dendríticas y en la formación de sinapsis. Por otra parte, cambios en el metabolismo del triptófano también han sido reportados (Miller et al., 1977). A nivel fisiológico se han reportado alteraciones en el control homeostático y circadiano de los estados de sueño y vigilia (Durán et al., 1999), así como variaciones en la actividad eléctrica del hipocampo de la rata (Durán, 2000). Estos cambios a su vez se ven reflejados en la vulnerabilidad de los organismos a ciertos factores como el estrés (Mokler et al., 2007).

2.9 El sistema serotoninérgico y la malnutrición

Estudios sobre la malnutrición y el neurodesarrollo indican que el sistema serotoninérgico es particularmente vulnerable a alteraciones en la dieta durante un periodo perinatal, induciendo cambios en su distribución, activación y mecanismo de acción. En animales malnutridos se ha observado una disminución en la densidad de fibras serotoninérgicas en el giro dentado y CA3 del hipocampo, así como una disminución de receptores 5HT1a (Blatt et al., 1994).

Así mismo, un estudio realizado en ratas malnutridas reportó una disminución casi inmediata en la liberación de serotonina sobre el hipocampo dorsal tras la estimulación eléctrica del núcleo del rafe medio, efecto que no ocurre tan drásticamente en el grupo control (Mokler et al., 1999). De acuerdo con el autor esta inhibición exacerbada podría sugerir una mayor sensibilidad de los autorreceptores somatodendríticos o terminales serotoninérgicas en animales malnutridos.

De igual manera, varios estudios han reportado un aumento significativo en las concentraciones basales de serotonina en cerebros de ratas malnutridas (Morgane., et al, 1993; Resnick & Morgane, 1984; Mokler et al., 1999). Este aumento en la liberación basal de serotonina se ha relacionado con una mayor respuesta al estrés, es decir, es posible que animales expuestos a una malnutrición proteínica perinatal sean más sensibles a factores estresantes, lo que en consecuencia provoca una liberación exacerbada de serotonina en áreas como el hipocampo (Mokler et al., 2003).

Recientemente, un estudio realizado por Ye W y colaboradores (2018) reportó una disminución en el funcionamiento del receptor 5HT1a en el hipocampo dorsal de ratas hembra que estuvieron expuestas a una malnutrición perinatal (10% proteína). Así mismo, reportaron que la atenuación de la actividad del receptor 5HT1a aún podía ser observada en ratas malnutridas adultas (P112), a pesar de haber sido alimentadas con una dieta estándar justo después del destete.

Por el contrario, se ha reportado que la exposición materna a una dieta alta en grasas (antes de la gestación, durante la gestación y en la lactancia) produce un aumento en la expresión del Htr1a que codifica para el receptor 5HT1A en el hipocampo ventral de ratones C57BL/6N. (Peleg-Raibstein et al., 2012)

Finalmente, estudios en humanos también han reportado alteraciones en el sistema serotoninérgico debido a una malnutrición prenatal. Particularmente se han observado niveles altos de serotonina circulante en recién nacidos que tuvieron un bajo peso al nacer, así como incremento significativo en la fracción libre de L-Trp y una disminución en la fracción unida a albúmina. Cabe mencionar que estas alteraciones persistieron durante el periodo post natal temprano (Hermindez et al., 1989).

3. Planteamiento del problema

El sistema serotoninérgico tiene implicaciones tanto en el desarrollo como en la fisiología del sistema nervioso central. El hipocampo es una de las principales estructuras inervadas por este sistema, el cual, a través de la liberación de serotonina (5HT) y de la activación de receptores regulan procesos tanto en etapas tempranas del desarrollo como en la adultez. En particular, el receptor 5HT1a está involucrado en procesos de aprendizaje y memoria, regulación de ciclos sueño-vigilia y alteraciones en el estado de ánimo.

Una deficiencia en la cantidad o calidad de nutrientes en la dieta durante la gestación y la lactancia conduce a cambios en el desarrollo del sistema serotoninérgico, afectando diversas esferas fisiológicas de áreas como el hipocampo.

Por lo tanto, es importante conocer si el ambiente hipercalórico e hipoproteínico producido por una “dieta de cafetería” impuesta en etapas tempranas pre y postnatales, afecta el desarrollo del sistema serotoninérgico hipocámpico, en particular al receptor 5HT1a, ya que podría tener implicaciones en los procesos cognoscitivos y conductuales relacionados.

4. Hipótesis

Si la malnutrición perinatal, consecuencia de una dieta hipercalórica-hipoproteínica (“dieta de cafetería”), altera los períodos críticos del desarrollo del sistema serotoninérgico en el hipocampo entonces, en edades postnatales se encontrarán alteraciones en los receptores de serotonina tipo 1 (5HT1a) en el hipocampo.

5. Objetivos

5.1 Objetivo general

Cuantificar la expresión de los receptores 5HT1a en el giro dentado y el CA1 del hipocampo de ratas hembra y macho expuestas a una dieta hipercalórica-hipoproteínica (MP) durante el periodo perinatal, así como en el grupo de una dieta control (Co).

5.2 Objetivos específicos

- Determinar si existe diferencia en la expresión de receptores 5HT1a en el giro dentado y el CA1 entre hembras y machos Co y MP
- Analizar la correlación entre el número de células y la expresión de receptores 5HT1a en el CA1 del hipocampo en ambos sexos de los grupos Co y MP.

6. Metodología

6.1. Animales/Muestras

En el presente proyecto los cerebros utilizados fueron colectados, junto con otros órganos, como parte del proyecto general “*Efecto de una dieta de cafetería*”

sobre la expresión circadiana del metabolismo energético en la rata” (registro de la Comisión de ética y responsabilidad Científica de la Facultad de Ciencias, responsable Dra. P. Durán, no. oficio CEARC/Bioéticos/03122021). Los órganos y tejidos fueron distribuidos en otros proyectos de investigación y tesis, a efecto de economizar de manera ética el número de animales, ya que el protocolo de malnutrición es el mismo. Se emplearon cerebros de ratas de la cepa *Sprague-Dawley* de 90 días de edad que previamente estuvieron bajo una dieta control o bajo un protocolo de malnutrición hipercalórica. Las muestras se mantuvieron en paraformaldehído al 4% hasta su uso.

6.2. Dietas

El protocolo de malnutrición consiste en la administración de dos dietas distintas (Tabla 1) a ratas hembra adultas de la cepa *Sprague-Dawley* en edad reproductiva, específicamente 6 semanas antes de la cruce, durante la gestación y hasta el destete. El grupo control (Co) es alimentado con la dieta estándar para roedores de laboratorio: *Lab Chow*, Purina 5008 con un aporte energético de 4.15 kcal/g. Mientras que la dieta de malnutrición hipercalórica (MP) está formulada de la siguiente manera: como base la dieta *Lab Chow*, Purina 5008, a la cual se le adiciona leche condensada, pan de caja, chocolate, galletas, coco seco, queso, papa hervida y manteca vegetal, con un aporte de energía bruta de 6.32 kcal/g (Bustamante, 2015).

Componentes	Dieta Control (%)	Dieta Hipercalórica/ hipoproteínica (%)
Carbohidratos	50.3	67.16
Proteína	23.6	8.78
Grasa	6.7	13.73
Cenizas	6.1	2.58
Fibra Cruda	3.3	0.65

Humedad	10	7.1
Kcal/g	4.15	6.32

Tabla 1. Composición nutricional de las dietas de los grupos control y malnutrido (Obtenido de Bustamante, 2015)

6.3 Cuantificación de receptores

6.3.1 Preparación de las secciones

Una vez seleccionados los cerebros a utilizar, se cortaron rebanadas de 50 μm con ayuda de un vibratomo (FHC Oscillating Tissue Slicer 5000) a temperatura ambiente, con una oscilación de 4 y velocidad de 5 en un ángulo de 15°. Las secciones fueron colectadas en cajas de cultivo de 12 o 24 pozos y se mantuvieron en PBS (ver anexo 1) hasta su uso (Figura 6).

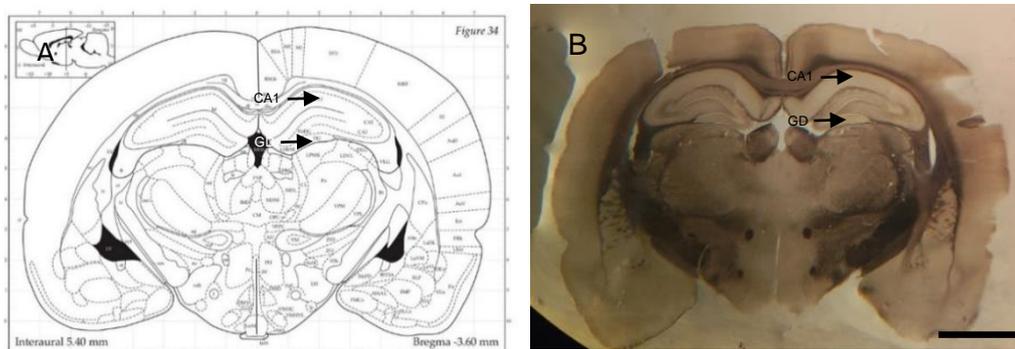


Figura 6 Identificación de áreas de interés. Antes de realizar la inmunohistoquímica se definieron las coordenadas para obtener las secciones del cerebro de las ratas Co y MP (Bregma -3.60mm a -3.80mm). A) Representación esquemática de una sección dorsal del atlas de cerebro de rata de Paxinos y Watson (1997). B) Corte dorsal de cerebro de rata de 50 μm . Las flechas indican las áreas de interés para la inmunohistoquímica: CA1 y giro dentado (GD) de la rata. Barra de escala, 0.5 mm.

6.3.2 Inmunohistoquímica

Para evaluar el efecto de una malnutrición hipercalórica-hipoprotéica en el sistema serotoninérgico se cuantificó el número de receptores 5HT1a en el hipocampo de los grupos control y experimental. Para la inmunohistoquímica se llevó a cabo una modificación del protocolo reportado en (López Oropeza, 2017).

Las rebanadas se colocaron en portaobjetos gelatinizados y se dejaron secar por 1 hora. Pasado el tiempo se colocaron en una caja coplin con paraformaldehído

al 4% por 30 min, esto con la finalidad de terminar de fijar el tejido. Posteriormente se lavaron las laminillas en PBS durante 5 min. A continuación, los cortes pasaron por un gradiente de alcoholes: 75%, 100% (1), 100% (2) y finalmente por xileno al 100% (J.T Baker) durante 5 min cada uno, este proceso tuvo como finalidad mejorar la adherencia del tejido con el portaobjetos gelatinizado. Por último, las laminillas pasaron por un gradiente de regreso por 2 min en cada alcohol, y dos lavados de 5 min en PBS.

Recuperación de antígeno. El siguiente paso fue la recuperación del antígeno. Este proceso permite desdoblar las proteínas y exponer los epítomos para ser reconocidos por el anticuerpo. Se colocaron los cortes en una caja coplin de plástico, con Buffer de citratos (0.01 M, 0.5% Tween, pH 6), previamente se puso a calentar agua a 95 °C y con ayuda de una rejilla de metal se colocó la caja coplin con los cortes durante 20 min, pasado el tiempo se dejó enfriar por otros 20 min y se realizaron 2 lavados de 5 min con PBS. Finalmente se retiraron los cortes del portaobjetos con ayuda de una navaja y se colocaron en cajas de cultivo de 12 pozos.

Bloqueos. Para esta etapa se tomó como referencia el protocolo de tinción inmunohistoquímica cromogénica de tejidos incluidos en parafina, obtenido del sitio oficial de Novus biologicals. Después de la recuperación del antígeno, se bloqueó la peroxidasa endógena usando una solución de peróxido al 3% (10% de peróxido de hidrógeno (30%, J. T. Baker) en metanol (J.T. Baker)), se utilizaron 1.5 mL de solución por pozo y pasados 15 min se hicieron dos lavados con agua destilada de 5 min cada uno. Posteriormente, se llevaron a cabo dos lavados de 10 min con PBS-T 1% suero de cabra. Por último, se llevó a cabo el bloqueo de proteínas (PBS-T 5% suero de cabra) durante 30 min en agitación a 90 rpm (revoluciones por minuto).

Anticuerpo primario. Una vez que se bloquearon las secciones se colocó el anticuerpo primario anti 5TH1a policlonal hecho en conejo, No. De catalogo ADI-905-741-100 *Enzo Life Sciences*. La concentración utilizada fue 1:500, en una solución de PBS 1% suero de cabra. Se dejó incubando durante la noche (20 h, aproximadamente) a temperatura controlada de 24 °C y en agitación a 90 rpm.

Día 2, lavados y anticuerpo secundario. Al día siguiente, se retiró el anticuerpo primario y se realizaron 3 lavados de 10 min con PBS-T (ver anexo 1). Después se colocó el anticuerpo secundario; Anti-IgG de conejo, IgG acoplado a Biotina-SP-AffiniPure (H+L), Jackson Immunoresearch, No. De catálogo 111-065-144 a una dilución 1:500 en PBS-T durante 1 h y media a 90 rpm.

Avidina peroxidasa. Pasado el tiempo de incubación se retiró el anticuerpo secundario y se hicieron 3 lavados de 10 min con PBS-T. Después de los lavados se colocó avidina peroxidasa a una concentración 1:100 en PBS-T y se dejó incubar durante una 1 h a 90 rpm. La avidina se unirá a la biotina del anticuerpo secundario y la reacción de la enzima con el cromógeno permitirá su detección en el microscopio. Al concluir el tiempo se realizaron 3 lavados de 10 min con PBS-T.

Revelado. Durante el último lavado se preparó la solución de trabajo DAB (1:20 DAB, 1:4000 peróxido de hidrógeno al 30% en PBS-T) para el revelado. La preparación se hizo de la siguiente manera: en un tubo falcon limpio se colocó PBS-T, al cual se le agregó primero el DAB y posteriormente el peróxido de hidrógeno, finalmente se aforó con PBS-T y se homogeneizó con ayuda de un vórtex. Se preparó 1 mL por cada pozo. Al finalizar el último lavado se colocaron los cortes en cajas de cultivo limpias y se les agregó la solución de trabajo DAB, se mantuvieron en agitación a 50 rpm durante 5 min. La reacción fue monitoreada todo el tiempo y pasada la marca de tiempo se revisaba un corte, montándolo en un portaobjetos

para observarlo en el microscopio, después de confirmar que hubiera señal la reacción se detenía con PBS-T y adicionalmente se realizaban 2 lavados de 10 min con PBS-T. Las secciones se mantuvieron en PBS-T hasta su montaje. Las rebanadas se montaron en portaobjetos gelatinizados y se dejaron secar para después colocar permount (J.T Baker) y colocar el cubreobjetos, esto permite conservar los tejidos y la marca obtenida de la inmunohistoquímica. Por último, se dejaron secar durante un día antes de limpiarlas y observarlas en el microscopio.

Control de especificidad. Para el control de especificidad del anticuerpo primario se utilizaron rebanadas de igual grosor (50 μm) de un macho control. El tratamiento de los cortes fue el mismo que los experimentales, exceptuando el anticuerpo primario, en su lugar los cortes se mantuvieron en PBS 1% suero de cabra durante la incubación. Así mismo, durante el revelado se llevó a cabo el mismo protocolo y pasados 10 min en la solución de trabajo DAB se realizar los lavados correspondientes.

6.3.3 Análisis de datos

Para evaluar la cantidad de receptores en el hipocampo se analizaron los cortes por medio de densidad óptica (DO) con ayuda del programa ImageJ. Las secciones se observaron en el microscopio ZEISS PrimoStart 3 con el objetivo 10x y se tomaron las fotos con la cámara ZEISS AxioCam 208 color y software Zen 3 de ZEISS. Se tomó una fotomicrografía del CA1 y giro dentado por cada corte, las fotomicrografías fueron tomadas bajo los mismos parámetros de exposición y contraste.

Para el análisis por densidad óptica primero se calibró el sistema siguiendo las indicaciones obtenidas desde el sitio oficial del programa ImageJ, se utilizó la

imagen de referencia y los valores de DO listados en la página. La misma curva de calibración fue utilizada para todas las imágenes.

Una vez calibrado el sistema, se cargaron las imágenes por grupo y se ajustaron a los parámetros sugeridos por el programa con la intención de que todas fueran evaluadas en las mismas condiciones de exposición, contraste y brillo. Posteriormente, las imágenes fueron transformadas a 8-bits ya que el análisis por DO es bajo una escala de grises. Para la evaluación se estableció una misma área para todos los cortes, una vez establecida, se calculó el valor de la señal obtenida y se determinó el ruido de fondo con un área donde no hubiera marca (Figura 7). Para evaluar la expresión de receptor 5HT1A se restó el ruido de fondo del valor de la señal obtenida. Adicionalmente se hizo un conteo celular a mano en el programa ImageJ, para el recuento se utilizaron las mismas imágenes que se utilizaron para el análisis por DO (fotomicrografías tomadas con el objetivo 10x de las áreas de interés CA1 y GD). Para el conteo celular se realizó una tinción simple con violeta de cresilo, en secciones de 50 μm de grupos control y malnutridos.

Para el análisis de los datos obtenidos se utilizó el programa *GraphPad Prism* 8.0.2 Se graficaron los promedios \pm la desviación estándar y se hizo la comparación entre grupos con una prueba de *t* no paramétrica (Mann-Whitney) se definió una $p < 0.05$. De igual manera, se evaluó la relación entre el número de células y la densidad de receptores de ambas áreas del hipocampo de hembras y machos, Co y MP.

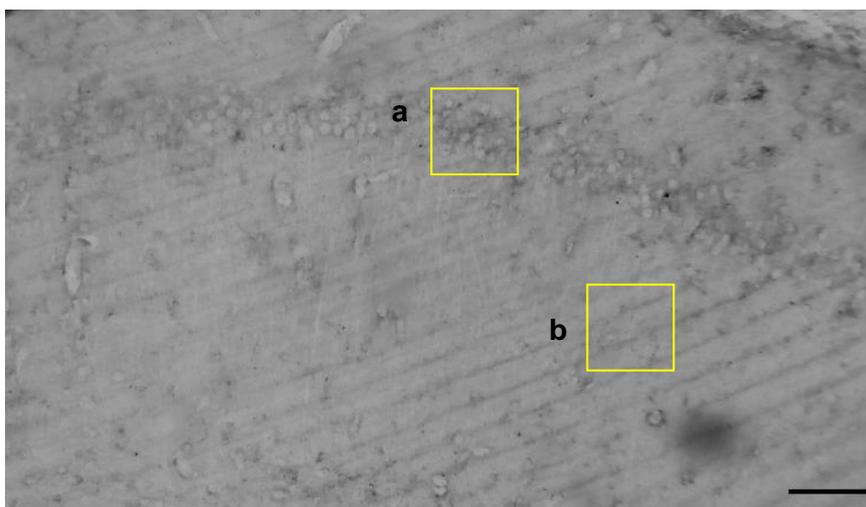


Figura 7. Ejemplo de la determinación del área para el análisis por densidad óptica. Se determina el área a evaluar en la zona de interés (a) y se resta el ruido de fondo de un área de mismo tamaño, pero donde no se presenta marca (b). Barra de escala 1mm.

7.Resultados

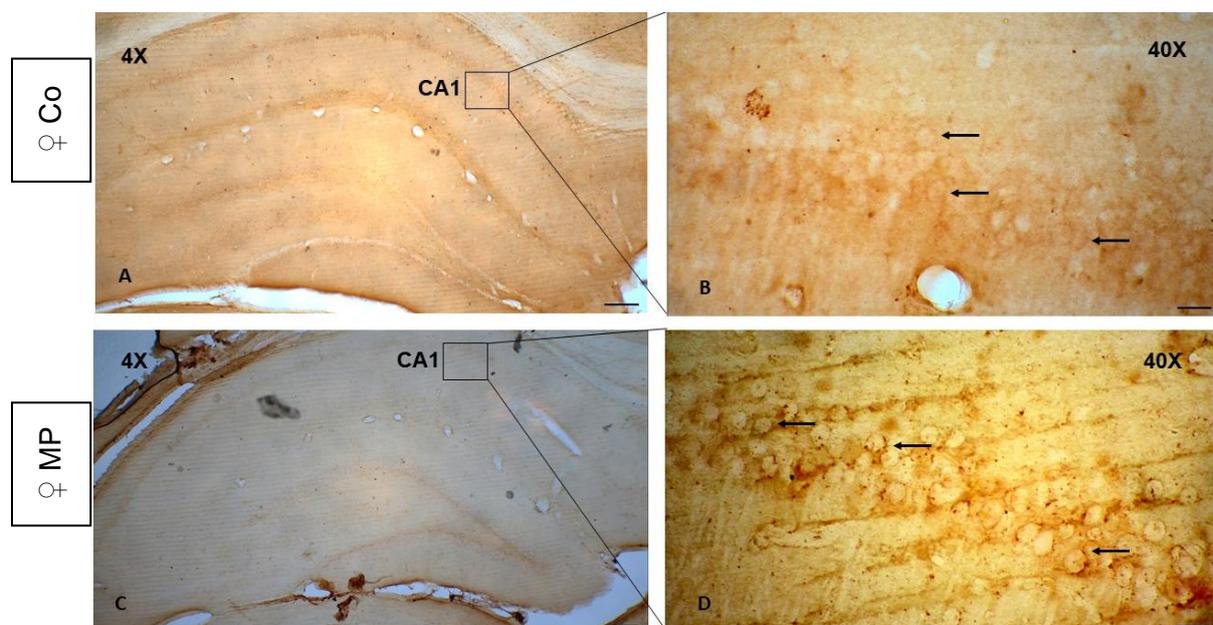
Como se describió anteriormente, la inmunohistoquímica se analizó a partir de densidad óptica con ayuda del programa ImageJ, los resultados obtenidos muestran una disminución en la densidad de receptores 5HT1a en el CA1 y giro dentado de la rata malnutrida en comparación con el grupo control (según la prueba estadística Mann-Whitney $p < 0.05$) (Figura 11). En particular, el grupo de hembras reportó una disminución del 72% en la cantidad de receptores en el CA1 y un 44% en el GD. Con respecto al grupo de ratas macho malnutridas la disminución en el CA1 fue de un 53% y en giro dentado de un 55%. En las figuras 8 y 9 observamos las áreas evaluadas con densidad óptica, así como la expresión de receptor en el CA 1 y giro dentado. Por último, la figura 10 muestra el control de especificidad del anticuerpo, los cortes que fueron incubados sin el anticuerpo primario no presentaron algún tipo de marca.

Para el conteo celular se realizó una tinción con violeta de cresilo de cortes a la misma altura y de los mismos cerebros utilizados para la inmunohistoquímica, las

secciones fueron procesadas y contabilizadas a mano en el programa ImageJ. Los resultados obtenidos muestran una diferencia significativa (Figura 12) en el CA1 de ratas hembra control y malnutridas, específicamente vemos un aumento en el número de células en el grupo de MP (54% más que en el grupo control).

El conteo celular y la densidad óptica revelaron en el grupo control una diferencia entre machos y hembras: en el CA1 hipocámpico las hembras control presentaron menor número de células, pero mayor densidad de receptores serotoninérgicos. En los machos tanto Co como MP la relación es cercana a 1:1, mientras que las hembras MP presentan mayor número de células, pero menor densidad de receptores serotoninérgicos.

De igual manera, los resultados de la tinción con violeta de cresilo mostraron una posible alteración morfológica en el grupo de ratas hembra y macho MP, pues la distribución de las células tanto en el giro dentado como el CA1 parece ser más difusa en comparación con el grupo control (Figuras 13-14).



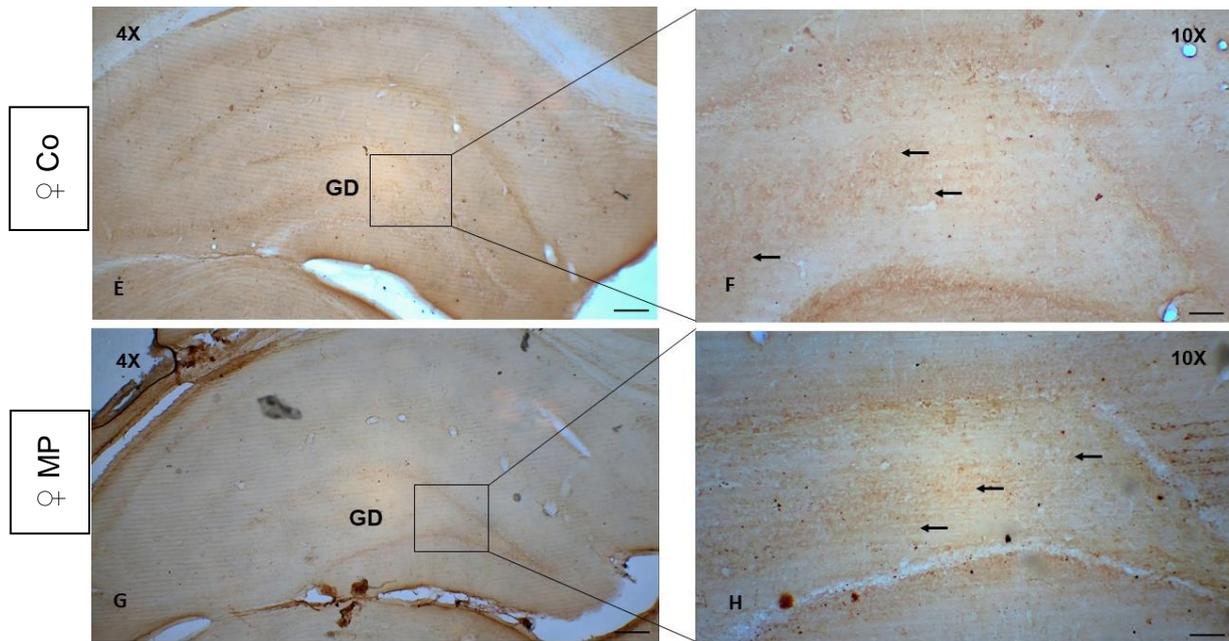
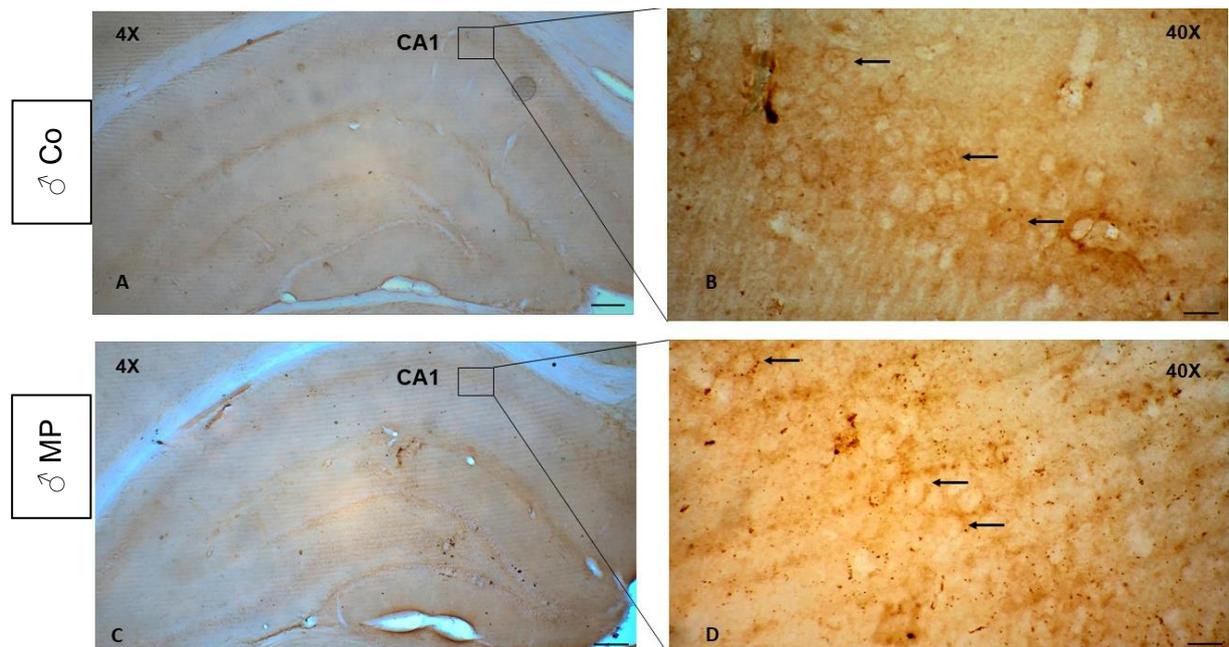


Figura 8. Inmunohistoquímica del receptor 5-HT1a. (A-H) Distribución general de la inmunoreactividad del receptor 5-HT1a en hembras control (A-B, E-F) y malnutridas. (C-D, G-H) Expresión del receptor 5-HT1a en el CA1 (A-D) y giro dentado (E-H). Las flechas indican células inmunorreactivas. (n=6 H-Co, H-MP), (n=4 M-Co, M-MP). Escala: 1mm.



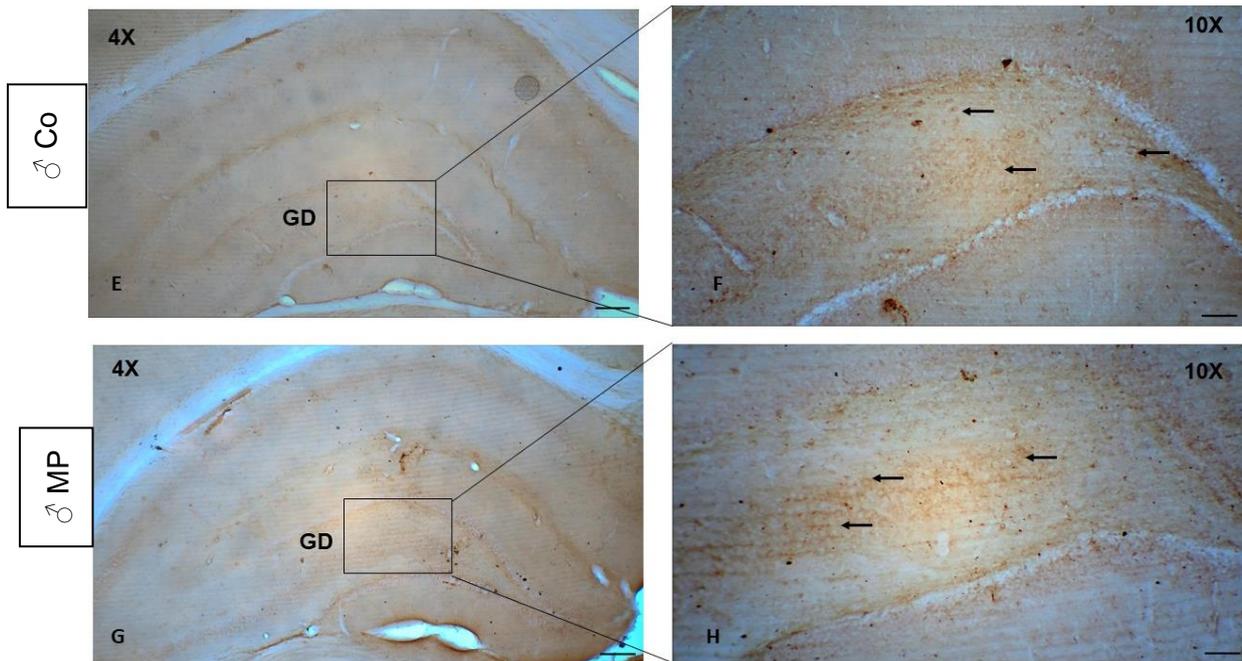


Figura 8. Inmunohistoquímica del receptor 5-HT1a. (A-H) Distribución general de la inmunoreactividad del receptor 5-HT1a en machos control (A-B, E-F) y malnutridos. (C-D, G-H) Expresión del receptor 5-HT1a en el CA1 (A-D) y giro dentado (E-H). Las flechas indican células inmunorreactivas. (n=6 H-Co, H-MP), (n=4 M-Co, M-MP). Escala 1mm.



Figura 10. Control de especificidad. Fotomicrografías tomadas a 4x y 10x, no se observa inmunoreactividad en los cortes, esto nos indica que el marcaje observado en la inmunohistoquímica corresponde a la unión del anticuerpo primario con la proteína de interés y no es resultado de una reacción inespecífica del anticuerpo secundario. Escala 1 mm.

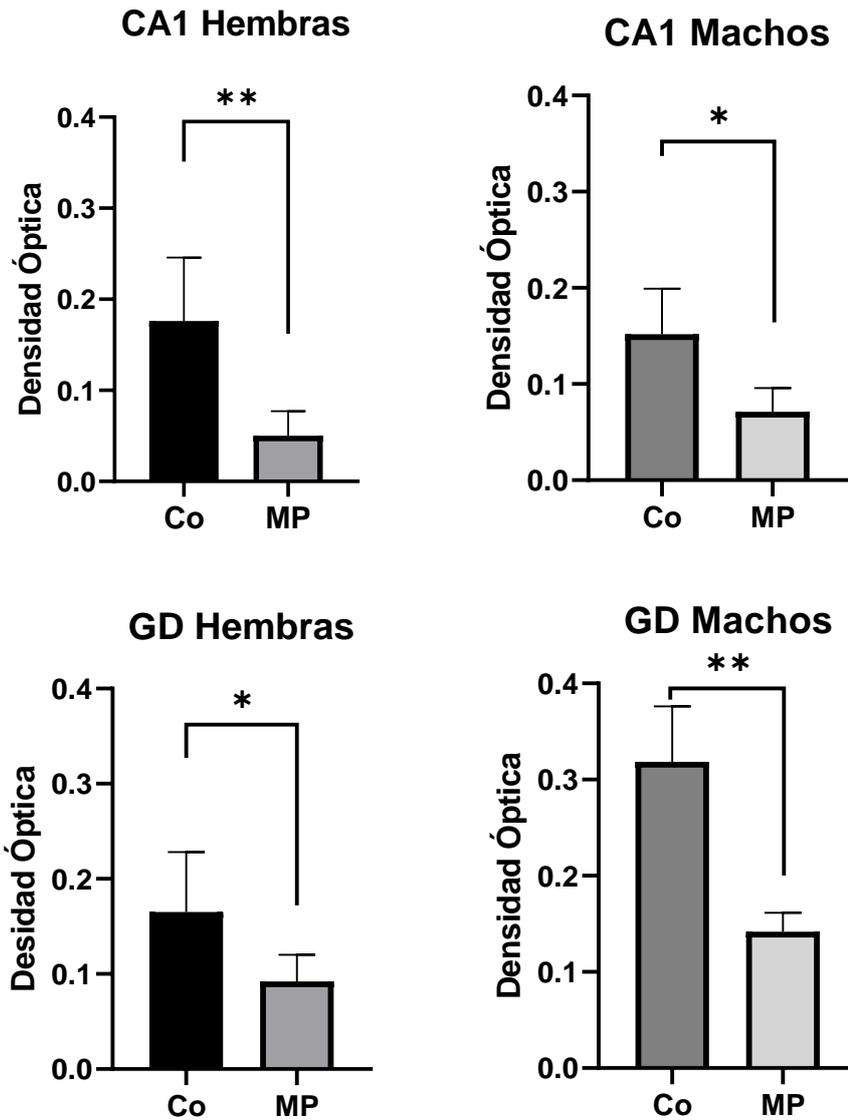


Figura 11. Análisis estadístico de la expresión del receptor 5-HT1a en el CA1 y giro dentado del hipocampo dorsal de la rata. La barra oscura corresponde al grupo control, mientras que la barra clara al grupo MP. Los datos se muestran como promedio \pm DE. * : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$ según la prueba de Mann-Withney , (n=6 H-Co, H-MP), (n=4 M-Co, M-MP).

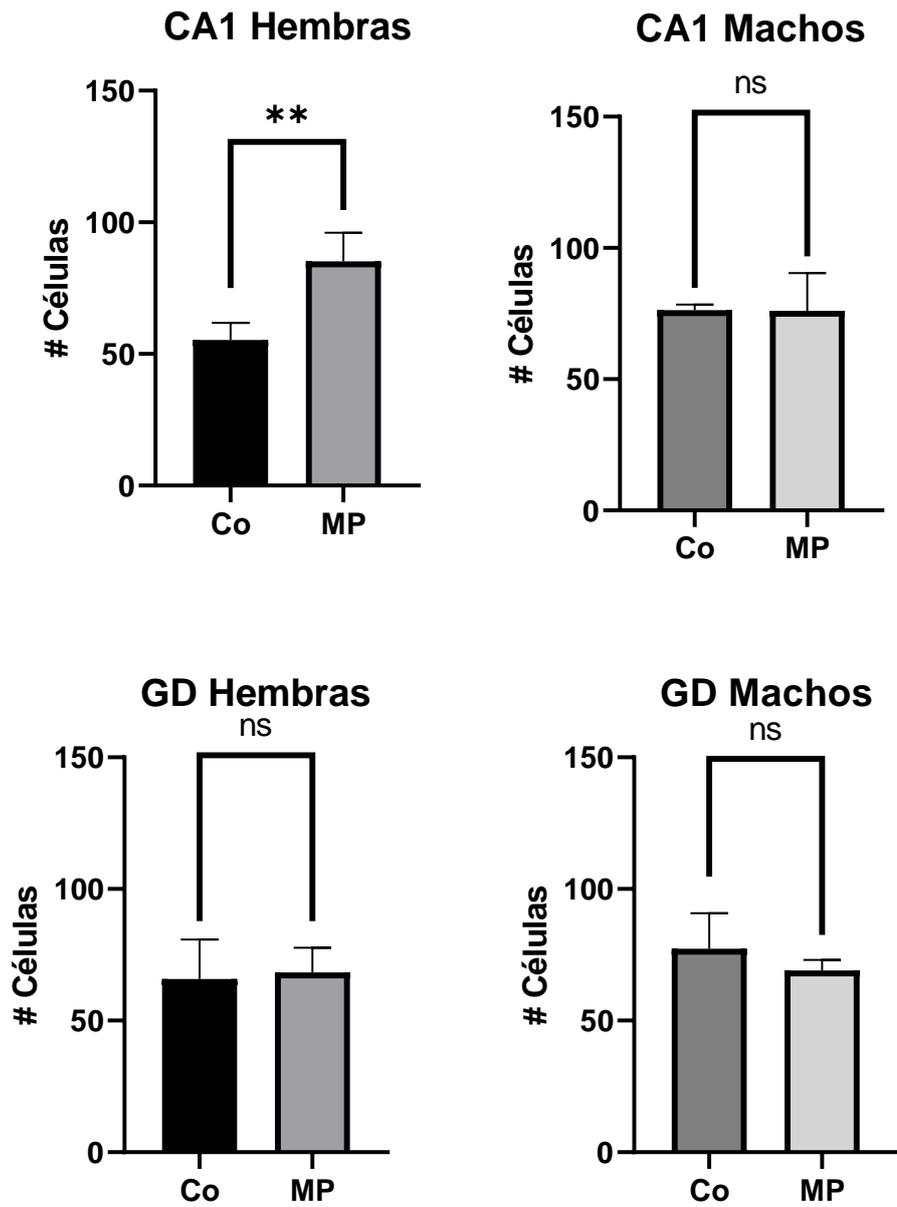


Figura 12. Análisis estadístico de la cuantificación celular en el CA1 y giro dentado del hipocampo dorsal de la rata. La barra oscura corresponde al grupo control, mientras que la barra clara al grupo MP. Los datos se muestran como promedio \pm DE. * : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$ según la prueba de Mann-Whitney , (n=6 H-Co, H-MP), (n=4 M-Co, M-MP).

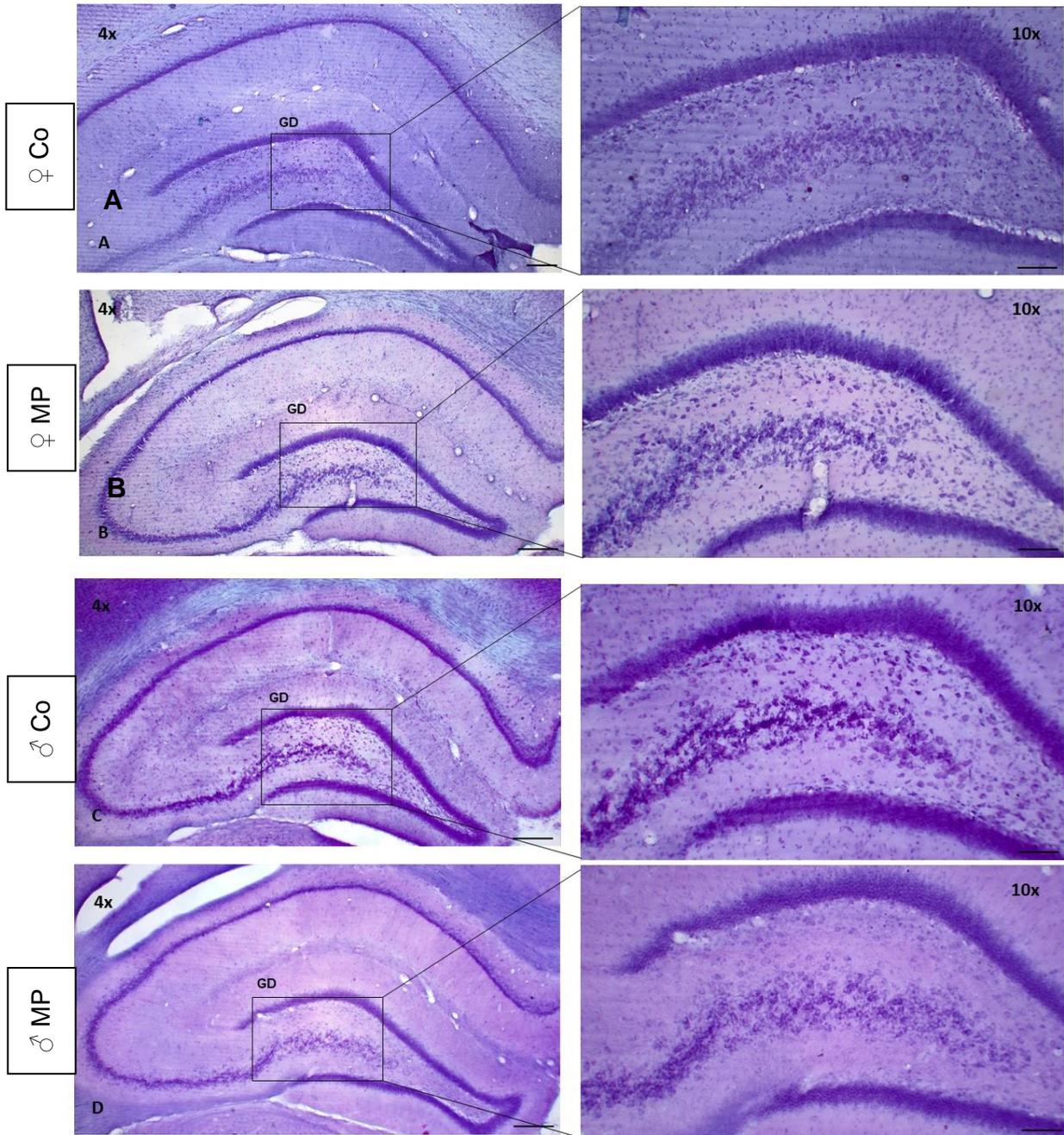


Figura 13. Tinción con violeta de cresilo del giro dentado del hipocampo dorsal de la rata. (A, C) Expresión de las células en el CA1 del grupo control de ratas hembra (A) y macho (C). (B, D) Expresión de células en el CA1 del hipocampo de ratas hembra (B) y macho (D) bajo malnutrición prenatal. Fotografías tomadas a diferentes aumentos: 4x, y 10x. Escala 1mm.

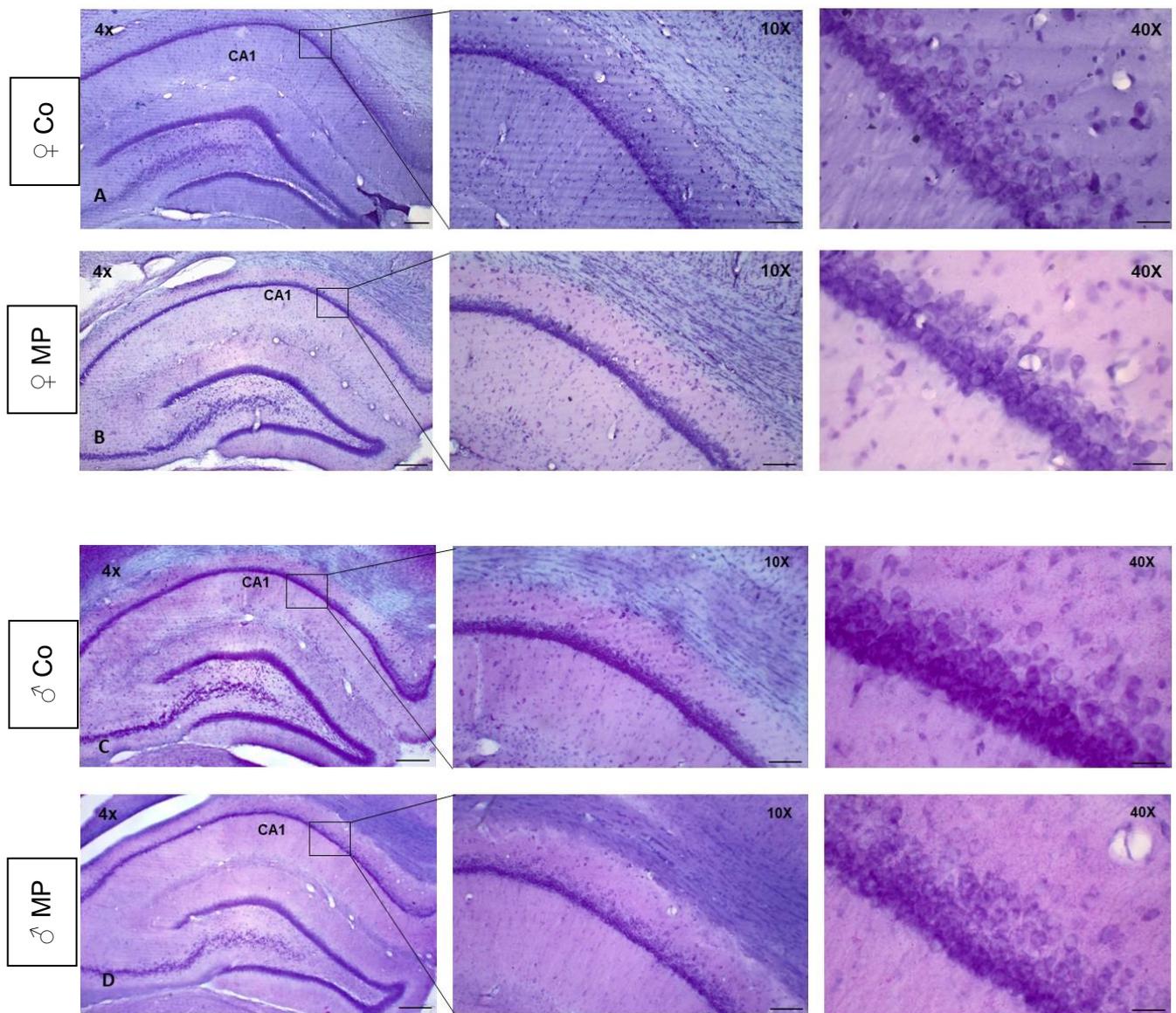


Figura 14. Tinción con violeta de cresilo del CA1 del hipocampo dorsal de la rata. (A-D) Expresión de las células en el CA1 del grupo control de ratas hembra (A) y macho (C). (B, D) Expresión de células en el CA1 del hipocampo de ratas hembra (B) y macho (D) bajo malnutrición prenatal. Fotografías tomadas a diferentes aumentos: 4x, 10x y 40x. Escala 1mm.

8. Discusión

La serotonina (5-hidroxitriptamina; 5-HT) es una amina biogénica que actúa como morfógeno en las etapas tempranas del desarrollo embrionario, juega un papel importante en la maduración del ovocito, la migración de la cresta neural, el desarrollo de las extremidades, la encefalización (Levin et al, 2005) y la maduración del sistema nervioso central, regulando los periodos críticos de la migración, establecimiento, especialización y conectividad neuronal (Morgane et al, 1978 , 1993, 2002, Romero-Reyes et al., 2021). Aunque las neuronas serotoninérgicas surgen por el día embrionario E10 a E12 en el tallo cerebral (núcleos del rafe) de roedores, comienzan a sintetizar el metabolito activo un día después E11 (Herlenius & Lagercrantz, 2004). Al ser un producto del metabolismo secundario, su regulación en etapas tempranas del desarrollo depende de un suministro exógeno de triptófano, siendo así que el metabolito secundario 5HT en esta etapa, es proporcionado por la madre a través del flujo placentario (Booij et al., 2015).

Está bien documentado que una dieta baja en proteínas (6% caseína) durante la gestación compromete los periodos críticos del desarrollo cerebral, y en particular el suministro de nutrientes, entre ellos los aminoácidos esenciales, de la madre hacia al embrión, alterando la síntesis de proteínas y los procesos de maduración del sistema nervioso (Morgane et al., 2002). Estudios en modelos animales de malnutrición perinatal han reportado un aumento en la concentración del neurotransmisor serotonina, a pesar de presentar bajos niveles de su precursor, triptófano (Hernández et al., 1989; Resnick et al., 1979; Resnick & Morgane, 1984b).

El aparente aumento en los niveles de serotonina sugiere que mecanismos en la síntesis del neurotransmisor podrían estar alterados, en particular Hernández y

cols., (1989) reportaron que en animales malnutridos hay un aumento en la concentración de la fracción libre de triptófano, lo que en consecuencia aumenta la actividad enzimática del triptófano hidroxilasa, enzima limitante en la síntesis de serotonina.

El aumento en la concentración de fracción libre de triptófano podría deberse a la deficiencia proteínica en general, ya que para que este aminoácido pueda atravesar la barrera hematoencefálica, éste debe estar en su forma de fracción libre, lo que representa un 10% del triptófano total, ya que el resto está unido a albumina (Ruddick et al., 2006), por lo que si el organismo no tiene un suministro adecuado de proteínas es probable que el porcentaje de triptófano unido a albumina disminuya, lo que en consecuencia aumenta los niveles de fracción libre disponible para la síntesis de serotonina.

Así mismo, una serie de estudios *in vitro* e *in vivo* han descrito un aumento en la liberación basal de serotonina en el hipocampo de animales malnutridos (Chen et al., 1992; Mokler et al., 1999, 2003), y si bien un aumento en la liberación de serotonina reportada podría deberse a la síntesis elevada de este neurotransmisor, es importante considerar que el sistema serotoninérgico tiene una expresión y regulación compleja que debe analizarse de manera global.

En contraste con investigaciones que reportan una liberación exacerbada de serotonina, otros estudios han reportado una disminución en la densidad de inervaciones 5-HT en el hipocampo. Particularmente, Cintra y cols., (1981) observaron una disminución en la cantidad de espinas, ramificaciones y extensión dendrítica de neuronas del núcleo del rafe dorsal, lo que podría explicar el aumento en la concentración de serotonina, por un aumento en la liberación, pues este grupo

de neuronas expresan receptores del tipo 5-HT1a que, como hemos mencionado anteriormente, regulan la liberación serotoninérgica de áreas límbicas. Mokler y cols., (1999) proponen que el aumento de la liberación basal de 5-HT puede ser resultado de un mecanismo compensatorio que resulta de la pérdida postnatal temprana de fibras 5-HT en el sistema hipocampo-rafe.

Antes o alrededor de la primera síntesis de serotonina por las neuronas, empiezan a aparecer algunos receptores, proteínas y enzimas serotoninérgicas importantes, algunos de los cuales aumentan exponencialmente después de una expresión inicial temprana. Dentro de éstos se encuentra el receptor 5-HT1a. Los receptores 5-HT1a se expresan en las primeras etapas de la vida embrionaria, principalmente en los núcleos del rafe y el hipocampo, además se expresan transitoriamente en las neuronas motoras espinales y el cerebelo después del nacimiento (Booij et al., 2015).

Contrario a los resultados obtenidos en este proyecto, un estudio realizado por Blatt y cols., (1984) reportó una disminución en la densidad de receptores 5HT1a en el CA3, pero ningún cambio significativo en el giro dentado y CA1 en ratas de 220 días de edad bajo una dieta de malnutrición hipoproteínica (6% caseína). Sin embargo, es importante considerar que la expresión del receptor 5-HT1a no es uniforme y presenta picos a lo largo del desarrollo del cerebro, incluso en etapas post natales (Patel & Zhou, 2005), y se caracteriza también por tener una expresión transitoria en diferentes áreas del sistema nervioso (Daval et al., 1987). Por lo que el periodo de desarrollo en el que se encuentre el organismo influye en los niveles de expresión de este receptor en particular. En este sentido, sería importante evaluar la expresión del receptor 5-HT1a durante diferentes etapas del

desarrollo, especialmente en ventanas temporales donde se ha reportado un pico en su expresión, pues estos aumentos se han relacionado con periodos críticos del desarrollo del cerebro.

Por otra parte, los resultados obtenidos en este proyecto son un indicador de que una deficiencia de proteínas (8.78%) acompañada de una ingesta elevada en carbohidratos y grasas (67.16% y 13.73% respectivamente) como en las dietas de cafetería tiene un impacto diferencial tanto en el desarrollo del cerebro como en el metabolismo energético (Bustamante Valdez, 2015; Huang et al., 2022) lo cual podría predisponer al organismo a desarrollar trastornos como el síndrome metabólico o la diabetes en el desarrollo del cerebro en comparación con una dieta únicamente baja en proteínas.

En diferentes modelos de malnutrición prenatal y crónica, se han reportado deficiencias en los procesos de aprendizaje y memoria, tanto espacial como contextual (Bronzino et al., 1997; Tonkiss & Galler, 1990; Wang & Xu, 2007). El receptor 5-HT_{1a} está ampliamente expresado en el giro dentado y CA1 del hipocampo de la rata (Bombardi et al., 2021). La importancia funcional de este receptor en el aprendizaje y la memoria se ha estudiado utilizando tareas de aprendizaje aversivo, como el aprendizaje de evitación pasiva y miedo condicionado (Ögren, et al., 2008) y tareas de memoria espacial (Glikmann-Johnston, et al., 2015).

La disminución de receptores 5HT_{1a} en el hipocampo de la rata malnutrida podría impactar de manera negativa procesos a nivel cognitivo, ya que, en condiciones normales, el receptor 5-HT_{1a} genera una respuesta excitatoria indirecta al inhibir la actividad de las interneuronas GABAérgicas, por lo que una disminución

en la expresión del receptor podría desencadenar una respuesta inhibitoria aumentada.

En el presente proyecto se reportó que hay una disminución en la expresión de receptores 5-HT_{1a} en el CA1 y GD de ratas macho y hembras con malnutrición hipoproteínica/hipercalórica. Morfológicamente observamos un aumento en el número de células en el CA1 del hipocampo en el grupo de hembras con malnutrición. Esta posible relación entre el número de células y la expresión de receptores 5-HT_{1a} nos habla de un dimorfismo sexual que conductualmente podría estar asociada cambios en el estado de ánimo, como la ansiedad y la depresión jugando un papel determinante en la prevalencia de estas alteraciones en el humano, en particular las mujeres (Pavlidis, et al., 2023).

Por otra parte, se ha reportado que el sustrato neuroanatómico de varias estructuras cerebrales se encuentra alterado por la malnutrición; es decir, bajo peso, disminución de número de neuronas, disminución de la arborización dendrítica, disminución de espinas sinápticas, etc (Díaz-Cintra, et al., 1981; Morgane, et al., 1978). Lister et al en 2005 encontraron que animales de 90 días de edad bajo una dieta hipoproteínica presentaban una menor cantidad de células neuronales en el CA1 del hipocampo al igual que un menor volumen en la capa de células piramidales en el CA1 y el subiculum. De igual manera, estudios realizados por Díaz-Cintra y cols. (1981) reportaron cambios en la morfología de las células del hipocampo, específicamente una disminución en el tamaño del soma de las células granulares del giro dentado y de las células piramidales del CA1 y CA3.

Los resultados obtenidos de la tinción con violeta de cresilo muestran un aumento aparente en la cantidad de células en el CA1 del hipocampo, generando un

contraste con lo ya reportado en la literatura. Sin embargo, estos resultados podrían estar influenciados por una serie de factores que deben ser considerados. Este aumento “aparente” podría ser el resultado de un efecto compensatorio (catch up) que ya ha sido reportado en modelos de malnutrición hipoproteínica crónica y sólo prenatal, ya que morfológicamente podemos observar que la disposición de células en el grupo control es más compleja que en el grupo de malnutrición, principalmente porque las células en el CA1 y GD de animales control están más agregadas, en un área menor. Funcionalmente se ha descrito que el ritmo theta hipocámpal y el ciclo de sueño y vigilia se encuentran alterados desde edades tempranas (30 días) hasta muy longevas de 785 días (Cintra et al., 2002; Durán et al., 2005, 2006, 2008).

Por el contrario, en la histología del grupo de malnutrición observamos que las células neurales están más disgregadas y aparentemente solo hay una capa, y si bien, esta distribución permitió diferenciar mejor estas células, también puede ser un indicador de una disminución en el volumen celular (glía o neuronas). Resultados similares han sido reportados en el cerebelo de ratas malnutridas (Hassanzadeh et al., 2013). Es claro con los resultados obtenidos que es necesario realizar análisis morfométricos más puntuales que permitan determinar la estructura neuronal, sináptica y conectividad tanto de las neuronas serotoninérgicas como del sustrato neuroanatómico de animales con malnutrición provocada por una dieta hipoproteínica/ hipercalórica).

Por otra parte, estudios recientes sugieren que el receptor 5-HT_{1a} podría tener un papel neuroprotector debido a su expresión en astrocitos, en particular un estudio reportado por Miyazaki & Asanuma, (2016) describe que la estimulación de los receptores 5-HT_{1a} en los astrocitos promueve la secreción de S100 β , seguida

de la proliferación de astrocitos y la activación de Nrf2 lo que podría llevar a un aumento en la expresión de moléculas antioxidantes, como el glutatión (GSH) y la metalotioneína (MT).

Finalmente, se ha reportado que el receptor 5-HT1a está expresado ampliamente en células astrogliales de áreas como el hipocampo y septum (Whitaker-Azmitia et al., 1993). La expresión de este receptor en elementos no neuronales nos lleva a pensar en el papel de la glía en patologías como la depresión o ansiedad, así como su respuesta a la administración de ciertos fármacos y la interacción y comunicación con células neuronales. Sería importante realizar estudios que nos permitan diferenciar entre tipos celulares ya que la disminución de receptores 5-HT1a en astrocitos podría sugerir otro tipo de alteraciones en el desarrollo e implicaciones en la conducta del organismo.

9. Conclusiones y perspectivas

La malnutrición perinatal provocada por una dieta hipercalórica/hipoproteínica disminuye la densidad de receptores 5HT1a tanto en el giro dentado como en el CA1 del hipocampo.

La disminución en la densidad de receptores 5HT1A en los grupos expuestos a una malnutrición perinatal, nos indica que la presencia de un ambiente hipercalórico-hipoproteínico podría tener consecuencias en el desarrollo del sistema serotoninérgico del hipocampo con posibles implicaciones en el ciclo sueño vigilia, procesos de atención, aprendizaje y memoria en el mediano y largo plazo.

El dimorfismo sexual en la densidad de receptores serotoninérgicos no ha sido reportado en GD o CA1 del hipocampo en la rata, y puede tener implicaciones conductuales que deben ser estudiadas.

Por otra parte, es necesario realizar análisis morfométricos que nos permitan observar si hay alteraciones en el tamaño o forma de las células, además de llevar a cabo una inmunohistoquímica con marcadores específicos para determinar el tipo celular (glía o neuronas).

Así mismo, pruebas conductuales que evalúen respuesta al estrés, conductas de tipo ansiedad, o conducta motivada podrían enriquecer los resultados obtenidos en este proyecto.

10. Anexos

10.1 Soluciones

PB 0.2 M

- a) 5.5gr Fosfato de sodio monobásico en 200 ml (NaH_2PO_4)
- b) 25.4gr Fosfato de sodio dibásico en 900ml (Na_2HPO_4)

190ml de a) 810ml b) = 1000ml

Ajustar pH a 7.4

Se puede almacenar a temperatura ambiente

PBS 0.01M

50ml de PB 0.2M + 50ml de agua destilada = 100ml + 0.85gr de NaCl

Ajustar a pH 7.4 y almacenar a 4°C

PBS-Tween 20 al 1%

100ml de PBS + 100 μ l de tween 20

Paraformaldehido a 4%

Calentar 500ml de agua destilada a 55-58°C, en agitación agregar 40 gr de paraformaldehido + 240 μ l de NaOH para facilitar dilución. Una vez que la solución sea transparente enfriar a 15°C y agregar 500 ml de PB 0.2M, ajustar pH 7.4 y almacenar a 4°C.

*54.05ml = 4% si se toma del 37% agregar 445.95 PB

Buffer de Citratos

Citrato a pH 6

Para 100ml – 0.294gr de citrato

200ml – 0.588 gr de citrato

300ml – 0.882gr de citrato

400ml – 1.176gr de citrato

12. Referencias

- Albert, P. R. (2012). Transcriptional regulation of the 5-HT1A receptor: Implications for mental illness. In *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* (Vol. 367, Issue 1601, pp. 2402–2415). Royal Society. <https://doi.org/10.1098/rstb.2011.0376>
- Albert, P. R., & Lemonde, S. (2004). 5-HT1A receptors, gene repression, and depression: Guilt by association. In *Neuroscientist* (Vol. 10, Issue 6, pp. 575–593). <https://doi.org/10.1177/1073858404267382>
- Albert, P. R., & Vahid-Ansari, F. (2019). The 5-HT1A receptor: Signaling to behavior. In *Biochimie* (Vol. 161, pp. 34–45). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2018.10.015>
- Alenina, N., Bashammakh, S., & Bader, M. (2006). *Specification and Differentiation of Serotonergic Neurons*.
- Berumen, L. C., Rodríguez, A., Miledi, R., & García-Alcocer, G. (2012). Serotonin receptors in hippocampus. In *The Scientific World Journal* (Vol. 2012). <https://doi.org/10.1100/2012/823493>
- Bianchi, L. (n.d.). *Developmental neurobiology*.
- Black, M. M. (2018). Impact of nutrition on growth, brain, and cognition. *Nestle Nutrition Institute Workshop Series*, 89, 185–195. <https://doi.org/10.1159/000486502>
- Blatt, G. J., Chen, J., Rosene, D. L., Volicers, L., Gallers, J. R., Chen, J., Rosene, D. L., Volicer, L., & GALLER Prenaral, J. R. (1994). Prenatal Protein Malnutrition Effects on the Serotonergic System in the Hippocampal Formation: An Immunocytochemical, Ligand Binding, and Neurochemical Study. In *Pergamon Brain Research Bulletin* (Vol. 34, Issue 5).
- Boldrini, M., Underwood, M. D., Mann, J. J., & Arango, V. (n.d.). *Serotonin-1A autoreceptor binding in the dorsal raphe nucleus of depressed suicides*.
- Bombardi, C., Grandis, A., Pivac, N., Sagud, M., Lucas, G., Chagraoui, A., Lemaire-Mayo, V., de Deurwaerdère, P., & di Giovanni, G. (2021). Serotonin modulation of hippocampal functions: From anatomy to neurotherapeutics. In *Progress in Brain Research* (Vol. 261, pp. 83–158). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/bs.pbr.2021.01.031>
- Bombardi, C., Grandis, A., Pivac, N., Sagud, M., Lucas, G., Chagraoui, A., Lemaire-Mayo, V., De Deurwaerdère, P., & Di Giovanni, G. (2021). Serotonin modulation of hippocampal functions: From anatomy to neurotherapeutics. In *Progress in Brain Research* (Vol. 261, pp. 83–158). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/bs.pbr.2021.01.031>
- Booij, L., Richard, T., Szyf, M., & Benkelfat, C. (2015). Genetic and early environmental influences on the serotonin system: Consequences for brain development and risk for psychopathology. *Journal of Psychiatry and Neuroscience*, 40(1), 5–18. <https://doi.org/10.1503/jpn.140099>

- Bronzino, J. D., Austin-Lafrance, R. J., Mokler, D., & Morgane, P. J. (1997). *Effects of Prenatal Protein Malnutrition on Hippocampal Long-Term Potentiation in Freely Moving Rats 1*.
- Bustamante Valdez, D. J. (2015). "Efecto de un ambiente hipercalórico perinatal sobre la expresión del ritmo diario de glucosa, insulina y leptina en la rata juvenil". [Universidad Nacional Autónoma de México].
<https://repositorio.unam.mx/contenidos/351102>
- Cintra, L., Durán, P., Guevara, M. A., Aguilar, A., & Castaón-Cervantes, O. (2002). Pre- and post-natal protein malnutrition alters the effect of rapid eye movements sleep-deprivation by the platform-technique upon the electrocorticogram of the circadian sleep-wake cycle and its frequency bands in the rat. *Nutritional Neuroscience*, 5(2), 91–101. <https://doi.org/10.1080/10284150290018964>
- Conti, P., & Shaik-Dasthagirisahab, Y. B. (2015). Mast Cell Serotonin Immunoregulatory Effects Impacting on Neuronal Function: Implications for Neurodegenerative and Psychiatric Disorders. In *Neurotoxicity Research* (Vol. 28, Issue 2, pp. 147–153). Springer New York LLC.
<https://doi.org/10.1007/s12640-015-9533-0>
- Daval, G., Vergé, D., Becerril, A., Gozlan, H., Spampinato, U., & Hamon, M. (1987). Transient expression of 5-HT_{1A} receptor binding sites in some areas of the rat CNS during postnatal development. *International journal of developmental neuroscience: the official journal of the International Society for Developmental Neuroscience*, 5(3), 171–180. [https://doi.org/10.1016/0736-5748\(87\)90027-x](https://doi.org/10.1016/0736-5748(87)90027-x)
- De Vadder, F., Grasset, E., Holm, L. M., Karsenty, G., Macpherson, A. J., Olofsson, L. E., & Bäckhed, F. (2018). Gut microbiota regulates maturation of the adult enteric nervous system via enteric serotonin networks. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115(25), 6458–6463. <https://doi.org/10.1073/pnas.1720017115>
- Durán, P., Cintra, L., Galler, J. R., & Tonkiss, J. (2005). Prenatal protein malnutrition induces a phase shift advance of the spontaneous locomotor rhythm and alters the rest/activity ratio in adults rats. *Nutritional Neuroscience*, 8(3), 167–172. <https://doi.org/10.1080/10284150400026117>
- Durán, P., Galler, J. R., Cintra, L., & Tonkiss, J. (2006). Prenatal malnutrition and sleep states in adult rats: Effects of restraint stress. *Physiology and Behavior*, 89(2), 156–163. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2006.05.045>
- Durán, P., Miranda-Anaya, M., Mondragón-García, I., & Cintra, L. (2008). Protein malnutrition and aging affects entraining and intensity of locomotor activity and body temperature circadian rhythms in rats. *Nutritional Neuroscience*, 11(6), 263–268. <https://doi.org/10.1179/147683008X344228>
- Rubenstein J. L. (1998). Development of serotonergic neurons and their projections. *Biological psychiatry*, 44(3), 145–150.
[https://doi.org/10.1016/s0006-3223\(98\)00133-4](https://doi.org/10.1016/s0006-3223(98)00133-4)
- Fernstrom J. D. (1977). Effects on the diet on brain neurotransmitters. *Metabolism: clinical and experimental*, 26(2), 207–223. [https://doi.org/10.1016/0026-0495\(77\)90057-9](https://doi.org/10.1016/0026-0495(77)90057-9)

- Garcia-Garcia, A. L., Newman-Tancredi, A., & Leonardo, E. D. (2014). P5-HT1A receptors in mood and anxiety: Recent insights into autoreceptor versus heteroreceptor function. In *Psychopharmacology* (Vol. 231, Issue 4, pp. 623–636). Springer Verlag. <https://doi.org/10.1007/s00213-013-3389-x>
- Gaspar, P., Cases, O., & Maroteaux, L. (2003). The developmental role of serotonin: News from mouse molecular genetics. In *Nature Reviews Neuroscience* (Vol. 4, Issue 12, pp. 1002–1012). European Association for Cardio-Thoracic Surgery. <https://doi.org/10.1038/nrn1256>
- Glikmann-Johnston, Y., Saling, M. M., Reutens, D. C., & Stout, J. C. (2015). Hippocampal 5-HT1A receptor and spatial learning and memory. *Frontiers in Pharmacology*, 6. <https://doi.org/10.3389/fphar.2015.00289>
- Herlenius, E., & Lagercrantz, H. (2004). Development of neurotransmitter systems during critical periods. In *Experimental Neurology* (Vol. 190, Issue SUPPL. 1, p. 8). Academic Press Inc. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2004.03.027>
- Hermidez, J., Manjarrez, G. G., & Chagoya, G. (1989). Newborn humans and rats malnourished in utero: free plasma L-tryptophan, neutral amino acids and brain serotonin synthesis. In *Brain Research* (Vol. 488).
- Huang, X., Zhuo, Y., Jiang, D., Zhu, Y., Fang, Z., Che, L., Lin, Y., Xu, S., Hua, L., Zou, Y., Huang, C., Li, L., Wu, D., & Feng, B. (2022). Maternal Low-Protein Diet during Puberty and Adulthood Aggravates Lipid Metabolism of Their Offspring Fed a High-Fat Diet in Mice. *Nutrients*, 14(19). <https://doi.org/10.3390/nu14194057>
- Kiyasova, V., & Gaspar, P. (2011). Development of raphe serotonin neurons from specification to guidance. *European Journal of Neuroscience*, 34(10), 1553–1562. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2011.07910.x>
- Miyazaki, I., & Asanuma, M. (2016). Send Orders for Reprints to reprints@benthamscience.ae Serotonin 1A Receptors on Astrocytes as a Potential Target for the Treatment of Parkinson's Disease. In *Current Medicinal Chemistry* (Vol. 23).
- Mohammad-Zadeh, L. F., Moses, L., & Gwaltney-Brant, S. M. (2008). Serotonin: A review. In *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* (Vol. 31, Issue 3, pp. 187–199). <https://doi.org/10.1111/j.1365-2885.2008.00944.x>
- Mokler, D. J., Bronzino, J. D., Galler, J. R., & Morgane, P. J. (1999). The effects of median raphe electrical stimulation on serotonin release in the dorsal hippocampal formation of prenatally protein malnourished rats. In *Brain Research* (Vol. 838). www.elsevier.com/locate/bres
- Mokler, D. J., Galler, J. R., & Morgane, P. J. (2003). Modulation of 5-HT release in the hippocampus of 30-day-old rats exposed in utero to protein malnutrition. *Developmental Brain Research*, 142(2), 203–208. [https://doi.org/10.1016/S0165-3806\(03\)00093-2](https://doi.org/10.1016/S0165-3806(03)00093-2)
- Mokler, D. J., Lariviere, D., Johnson, D. W., Theriault, N. L., Bronzino, J. D., Dixon, M., & Morgane, P. J. (1998). Serotonin neuronal release from dorsal hippocampus following electrical stimulation of the dorsal and median raphe

- nuclei in conscious rats. *Hippocampus*, 8(3), 262–273.
[https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-1063\(1998\)8:3<262::AID-HIPO8>3.0.CO;2-L](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-1063(1998)8:3<262::AID-HIPO8>3.0.CO;2-L)
- Mokler, D. J., Torres, O. I., Galler, J. R., & Morgane, P. J. (2007). Stress-induced changes in extracellular dopamine and serotonin in the medial prefrontal cortex and dorsal hippocampus of prenatally malnourished rats. *Brain Research*, 1148(1), 226–233. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2007.02.031>
- Mongeau, R., Blier, P., & de Montigny, C. (1997). The serotonergic and noradrenergic systems of the hippocampus: their interactions and the effects of antidepressant treatments. In *Brain Research Reviews* (Vol. 23).
- Nautiyal, K. M., Dailey, C. A., Jahn, J. L., Rodriguez, E., Son, N. H., Sweedler, J. V., & Silver, R. (2012). Serotonin of mast cell origin contributes to hippocampal function. *European Journal of Neuroscience*, 36(3), 2347–2359.
<https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2012.08138.x>
- Nava Zisapel, C., & Zisapel, N. (2018). *New perspectives on the role of melatonin in human sleep, circadian rhythms and their regulation LINKED ARTICLES*.
<https://doi.org/10.1111/bph.v175.16/issuetoc>
- Patel, T. D., & Zhou, F. C. (2005). Ontogeny of 5-HT_{1A} receptor expression in the developing hippocampus. *Developmental Brain Research*, 157(1), 42–57.
<https://doi.org/10.1016/j.devbrainres.2005.03.006>
- Peleg-Raibstein, D., Luca, E., & Wolfrum, C. (2012). Maternal high-fat diet in mice programs emotional behavior in adulthood. *Behavioural Brain Research*, 233(2), 398–404. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2012.05.027>
- Morgane, P. J., Austin-LaFrance, R., Bronzino, J., Tonkiss, J., Díaz-Cintra, S., Cintra, L., Kemper, T., & Galler, J. R. (1993). Prenatal malnutrition and development of the brain. *Neuroscience and biobehavioral reviews*, 17(1), 91–128. [https://doi.org/10.1016/s0149-7634\(05\)80234-9](https://doi.org/10.1016/s0149-7634(05)80234-9)
- Polter, A. M., & Li, X. (2010). 5-HT_{1A} receptor-regulated signal transduction pathways in brain. In *Cellular Signalling* (Vol. 22, Issue 10, pp. 1406–1412).
<https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2010.03.019>
- Popova, N. K., & Naumenko, V. S. (2013). 5-HT_{1A} receptor as a key player in the brain 5-HT system. *Reviews in the Neurosciences*, 24(2), 191–204.
<https://doi.org/10.1515/revneuro-2012-0082>
- Hillion, J., Milne-Edwards, J. B., Catelon, J., de Vitry, F., Gros, F., & Hamon, M. (1993). Prenatal developmental expression of rat brain 5-HT_{1A} receptor gene followed by PCR. *Biochemical and biophysical research communications*, 191(3), 991–997. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1993.1315>
- Resnick, O., Miller, M., Forbes, W., Hall, R., Kemper, T., Bronzino, J., Morgane, P. J., & Devel, P. J. M. (1979). Developmental Protein Malnutrition: Influences on the Central Nervous System of the Rat I. In *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* (Vol. 3).
- Resnick, O., & Morgane, P. J. (1984). Ontogeny of the Levels of Serotonin in Various Parts of the Brain in Severely Protein Malnourished Rats*. In *Brain Research* (Vol. 303).

- Ruddick, J. P., Evans, A. K., Nutt, D. J., Lightman, S. L., Rook, G. A. W., & Lowry, C. A. (2006). Tryptophan metabolism in the central nervous system: Medical implications. In *Expert Reviews in Molecular Medicine* (Vol. 8, Issue 20, pp. 1–27). Cambridge University Press. <https://doi.org/10.1017/S1462399406000068>
- Sakai, N., Tanaka, C., & Tanaka, C. (1993). Inhibitory modulation of long-term potentiation via the 5-HT A receptor in slices of the rat hippocampal dentate gyrus *. In *Brain Research* (Vol. 613).
- Samuels, B. A., Mendez-David, I., Faye, C., David, S. A., Pierz, K. A., Gardier, A. M., Hen, R., & David, D. J. (2016). Serotonin 1A and Serotonin 4 Receptors: Essential Mediators of the Neurogenic and Behavioral Actions of Antidepressants. In *Neuroscientist* (Vol. 22, Issue 1, pp. 26–45). SAGE Publications Inc. <https://doi.org/10.1177/1073858414561303>
- Sodhi, M. S., & Sanders-Bush, E. (2004). Serotonin and brain development. *International review of neurobiology*, 59, 111–174. [https://doi.org/10.1016/S0074-7742\(04\)59006-2](https://doi.org/10.1016/S0074-7742(04)59006-2)
- Tonkiss, J., & Galler, J. R. (1990). Prenatal protein malnutrition and working memory performance in adult rats. In *Behavioural Brain Research* (Vol. 40).
- Wang, L., & Xu, R.-J. (2007). The effects of perinatal protein malnutrition on spatial learning and memory behaviour and brain-derived neurotrophic factor concentration in the brain tissue in young rats. In *Asia Pac J Clin Nutr* (Vol. 16, Issue 1).
- Whitaker-Azmitia, P. M., Clarke, C., & Azmitia, E. C. (1993). Localization of 5-HT1A Receptors to Astroglial Cells in Adult Rats: Implications for Neuronal-Glial Interactions and Psychoactive Drug Mechanism of Action. In *SYNAPSE* (Vol. 14).
- Whitaker-Azmitia, P. M., Druse, M., Walker, P., & Lauder, J. M. (1996). Serotonin as a developmental signal. In *Behavioural Brain Research* (Vol. 73).
- Witter, M. P., & Amaral, D. G. (2004). Hippocampal Formation. In G. Paxinos (Ed.), *The Rat Nervous System* (pp. 635–704).



FACULTAD DE CIENCIAS

Facultad de Ciencias, UNAM
Cto. Exterior s/n, C.U., 04510
Ciudad de México, CDMX

CEARC
Oficio: CEARC/Bioética/03122021
Asunto: Dictamen/Proyecto/ PI_2021_02_01 Bustamante

Folio: PI_2021_02_01 Bustamante

Nombre de la comisión: Comisión de Ética y Responsabilidad Científica de la Facultad de Ciencias.

Nombre del autor del protocolo: Dra. Pilar Durán Hernández.

Fecha de recepción: 19 de noviembre del 2021.

Título del proyecto: Efecto de una dieta de cafetería sobre la expresión circadiana del metabolismo energético en la rata.

Nombre de la institución y sede de la investigación: Facultad de Ciencias, UNAM.

Dra. Pilar Durán Hernández,

El subcomité de Bioética de la Comisión de Ética y Responsabilidad Científica de la Facultad de Ciencias revisó el proyecto de investigación: *“Efecto de una dieta de cafetería sobre la expresión circadiana del metabolismo energético en la rata”*, y resolvió que tanto la metodología como los procedimientos en él descritos cumplen con los lineamientos bioéticos.

Los miembros del comité dan una opinión ética favorable sobre las formas de aplicación de los procedimientos.

Dictamen: APROBADO

ATE NT A M E N T E

“POR MI RAZA, HABLARÁ EL ESPÍRITU”

Cd. Universitaria, CDMX, a 3 de diciembre del 2021.

Dra. Sandra Cabrera Benítez

Coordinadora de la Comisión de Ética Académica y Responsabilidad Científica de la Facultad de Ciencias, UNAM. cearc@ciencias.unam.mx



CEARC
Comisión de Ética Académica
y Responsabilidad Científica
FC - UNAM

