

---

---

**UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA**

---

*Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias*

---

**MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**



**EFFECTO DE LA DISMINUCIÓN DE SEROTONINA  
CEREBRAL POR RESTRICCIÓN DE TRIPTOFANO  
SOBRE LA ACTIVIDAD DEL SISTEMA GABAERGICO,  
DURANTE EL DESARROLLO DE LA RATA.**

---

---

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS  
ÁREA NEUROBIOLÓGÍA  
P R E S E N T A  
BIOL. LETICIA RAMIREZ CORTES  
GUADALAJARA, JALISCO. 2000

---

---

**DR. EULOGIO PIMIENTA BARRIOS**  
**COORDINADOR DEL POSGRADO**  
**EN CIENCIAS BIOLÓGICAS, C.U.C.B.A., U. de G.**  
**P R E S E N T E**

Por medio de la presente nos permitimos informarle a usted que habiendo revisado el trabajo de tesis realizado por la BIOL. LETICIA RAMIREZ CORTES código 087655946 titulado "EFECTO DE LA DISMINUCIÓN DE LOS NIVELES DE SEROTONINA CEREBRAL POR LA RESTRICCIÓN DE TRPTOFANO SOBRE LA ACTIVIDAD DEL SISTEMA GABAERGICO, DURANTE EL DESARROLLO DE LA RATA", consideramos que ha quedado debidamente concluido por lo que ponemos a su disposición el escrito final para autorización de impresión y programación de fecha de grado.

Agradeciendo de antemano las atenciones prestadas a la presente quedamos de Usted, aprovechando la ocasión para enviarle un cordial saludo.

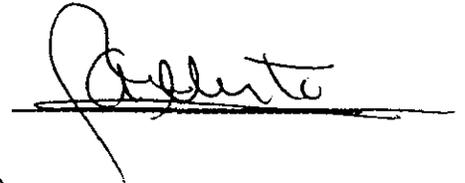
**A T E N T A M E N T E**

Las Agujas, Nextipac, Zapopán, Jal, 1999

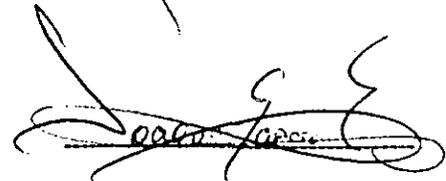
M. en C. ALMA ROSA DEL ANGEL MEZA  
DIRECTOR DE TESIS Y  
TERCER VOCAL DEL COMITÉ EVALUADOR



Dr. en C. ALBERTO MORALES VILLAGRAN  
PRESIDENTE DEL COMITÉ EVALUADOR



Dr. en C. JOAQUÍN GARCÍA ESTRADA  
SECRETARIO DE COMITÉ EVALUADOR



Dr. en C. CARLOS BEAS ZÁRATE  
PRIMER VOCAL DEL COMITÉ EVALUADOR



Dr. en C. IGNACIO GONZÁLEZ BURGOS  
SEGUNDO VOCAL DEL COMITÉ EVALUADOR



## **DEDICATORIA**

El presente trabajo lo dedico a una gran mujer que ha sabido guiar mis pasos y a quien debo todo lo que tengo y lo que soy a la señora Rosa María Cortés Damian, mi madre, así como también dedico el fruto de mi esfuerzo a mi esposo, compañero y amigo, quien con su apoyo, cariño y comprensión me ha ayudado a lograr algunas metas de suma importancia en mi vida.

## **AGRADECIMIENTOS**

A mis hermanos y muy especialmente a Carmen, quien siempre esta presente de manera incondicional para apoyarme en todo lo necesario.

A la M. en C. Alma Rosa Del Angel Meza de una manera muy especial por su gran ayuda en la elaboración de este trabajo, por la amistad que me ha brindado, así como por todos y cada uno de los momentos compartidos, lo que hizo mucho más fácil la realización de esta tesis.

A los asesores de este trabajo por su valiosa colaboración en la realización de este trabajo al Dr. Ignacio González Burgos, Dr. Joaquin Garcia Estrada, Dr. Alberto Morales Villagran y de manera muy especial al Dr. Carlos Beas Zárate quien me ha brindado su confianza al permitirme colaborar con el durante tantos años.

A mis grandes amigas Gricelda, Mayra y Lety quienes han sabido demostrarme el valor de la amistad.

A mis compañeras de trabajo que de alguna manera me facilitaron el camino durante la realización de este trabajo Patricia, Maritza, Monica, Verónica, María de la Luz e Isabel.

**Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Nutrición de la División de Neurociencias del Centro de Investigación Biomédica de Occidente, IMSS, bajo la dirección de la M. en C. Alma Rosa Del Angel Meza y la asesoría del Dr. en C. Carlos Beas Zárate y el Dr. en C. Ignacio González Burgos.**

## INDICE

| CONTENIDO                  | PÁGINA |
|----------------------------|--------|
| GLOSARIO DE FIGURAS .....  | i      |
| LISTA DE ABREVIATURAS..... | ii     |
| RESUMEN.....               | iv     |
| ABSTRACT.....              | v      |
| INTRODUCCIÓN.....          | 1      |
| ANTECEDENTES.....          | 3      |
| FIGURAS.....               | 15     |
| JUSTIFICACION.....         | 28     |
| HIPÓTESIS.....             | 29     |
| OBJETIVOS.....             | 30     |
| MATERIAL Y MÉTODOS .....   | 31     |
| DIAGRAMA EXPERIMENTAL..... | 35     |
| RESULTADOS.....            | 38     |
| GRAFICAS.....              | 42     |
| DISCUSIÓN.....             | 56     |
| CONCLUSIONES.....          | 62     |
| BIBLIOGRAFÍA.....          | 63     |

## GLOSARIO DE FIGURAS

|                                                                |    |
|----------------------------------------------------------------|----|
| FIGURA 1. SINTESIS DEL GABA.....                               | 16 |
| FIGURA 2. DIAGRAMA DE LA NEUROTRANSMISION GABAERGICA.....      | 17 |
| FIGURA 3. DISTRIBUCION DE LAS VIAS 5HT-ERGICAS EN EL SNC.....  | 19 |
| FIGURA 4. SINTESIS Y DEGRADACION DE LA SEROTONINA.....         | 21 |
| FIGURA 5. SINAPSIS SEROTONINERGICA CENTRAL.....                | 22 |
| FIGURA 6. CONEXIONES AFERENTES DEL HIPOCAMPO.....              | 24 |
| FIGURA 7. CONEXIONES EFERENTES DEL HIPOCAMPO.....              | 26 |
| FIGURA 8. COMPARACION DE PESOS CORPORALES.....                 | 42 |
| FIGURA 9. COMPARACION DE PESOS CEREBRALES.....                 | 43 |
| FIGURA 10. ACTIVIDAD DE LA GAD EN CORTEZA CERBRAL.....         | 44 |
| FIGURA 11. ACTIVIDAD DE LA GAD EN HIPOCAMPO.....               | 45 |
| FIGURA 12. LIBERACION DE GABA EN CX DURANTE EL DESARROLLO..... | 46 |
| FIGURA 13. LIBERACION DE GABA EN HP DURANTE EL DESARROLLO..... | 47 |
| FIGURA 14. LIBERACION DE GABA EN CX 14 Y 21 DIAS.....          | 48 |
| FIGURA 15. LIBERACION DE GABA EN CX 30 Y 60 DIAS.....          | 50 |
| FIGURA 16. LIBERACION DE GABA EN HP 14 Y 21 DIAS.....          | 52 |
| FIGURA 17. LIBERACION DE GABA EN HP 30 Y 60 DIAS.....          | 54 |

### *TABLAS*

|                                                          |    |
|----------------------------------------------------------|----|
| TABLA I: COMPONENTES DE LAS DIETAS.....                  | 36 |
| TABLA II: COMPOSICION DE LOS MEDIOS PARA LIBERACION..... | 37 |

## LISTA DE ABREVIATURAS

|                                |                                           |
|--------------------------------|-------------------------------------------|
| AA                             | Aminoácidos                               |
| ATP                            | Adenosín trifosfato                       |
| B.M.                           | Baño María                                |
| °C                             | Grados centígrados                        |
| Ca <sup>++</sup>               | Ion calcio                                |
| CAT                            | Colina acetiltransferasa                  |
| Cx                             | Corteza cerebral                          |
| CO <sub>2</sub>                | Bióxido de carbono                        |
| <sup>14</sup> C                | Radioisotopo Carbono 14                   |
| dpm                            | Desintegraciones por minuto               |
| g                              | Gramos                                    |
| GABA                           | Acido $\tau$ -Aminobutírico               |
| GABA-[ <sup>3</sup> H]         | Acido $\tau$ -Aminobutírico tritiado      |
| GAD                            | Descarboxilasa del Acido Glutámico        |
| Glu                            | Acido Glutámico                           |
| <sup>14</sup> C-Glu            | Acido Glutámico marcado con carbono 14    |
| Hp                             | Hipocampo                                 |
| H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> | Acido Sulfurico                           |
| 5-HIAA                         | 5-Hidroxiindolacético                     |
| 5-HT                           | Serotonina                                |
| 5-HTP                          | 5-Hidroxitriptofano                       |
| K <sup>+</sup>                 | Ion potasio                               |
| Lis                            | Lisina                                    |
| M                              | Molar                                     |
| MA                             | Dieta a base de Maíz                      |
| MAO                            | Monoamino oxidasa                         |
| mg                             | Miligramos                                |
| ML                             | Dieta a base de Maiz suplementado con Lis |
| ml                             | Mililitros                                |

|                 |                                       |
|-----------------|---------------------------------------|
| mm              | Milímetros                            |
| mM              | Milimolar                             |
| μM              | Micromolar                            |
| μmol            | Micromol                              |
| N               | Normal                                |
| NE              | Norepinefrina                         |
| Na <sup>+</sup> | Ion sodio                             |
| PLP             | Fosfato de piridoxal                  |
| RP              | Restricción Proteica (8% de proteína) |
| SNC             | Sistema Nervioso Central              |
| SNP             | Sistema Nervioso Periférico           |
| T               | Dieta Testigo (23% proteína)          |
| Tp              | Triptofano                            |
| TpOH            | 5-Triptofano-hidroxilasa              |

## RESUMEN

El impacto de la privación proteica y de aminoácidos (AA) indispensables en hembras gestantes sobre el perfil neuroquímico de las crías durante el desarrollo se ha manifestado a través de alteraciones en la concentración y metabolismo de aminas biogénicas, tales como la serotonina (5-HT) y norepinefrina (NE) que inducen cambios tanto en el número como en la morfología de neuronas que liberan otros neurotransmisores como el Ácido Gama Aminobutírico (GABA). En el presente trabajo se analizaron los efectos de la disminución de 5-HT por la alimentación a base de maíz, sobre la actividad del sistema GABAérgico en el cerebro de ratas (Corteza e Hipocampo) durante el desarrollo. Las hembras se alimentaron con las dietas restringidas durante 5 semanas previas al apareamiento, durante la gestación, lactancia y las crías se alimentaron con la dieta correspondiente hasta el sacrificio (14, 21, 30 y 60 días de edad), se evaluó la actividad del sistema GABAérgico a través de la liberación estimulada de GABA y la actividad de la GAD. Los Resultados muestran una reducción en la liberación de GABA en las primeras edades de los Animales alimentados con la dieta restringida en proteínas (RP), maíz suplementado con lisina (ML) y maíz (MA) en comparación con el grupo testigo (T) en ambas regiones estudiadas. En corteza (Cx) a los 30 y 60 días de edad, se observó un incremento en la liberación de GABA comparable con los valores alcanzados por los animales testigo. En el hipocampo (HP), este incremento se observó hasta los 60 días de edad. De igual manera, la actividad de GAD se vio significativamente disminuida en las primeras etapas de la vida (14 y 21 días de edad) e incrementada después de los 30 días de edad en el grupo RP en relación al T en ambas regiones estudiadas mientras que en los grupos ML y MA, la actividad para la enzima se incrementó significativamente en todas las edades y regiones en comparación con el grupo T. Los resultados indican la relación entre ambos sistemas de neurotransmisión, al mostrar la vulnerabilidad del sistema GABAérgico ante la disminución de 5-HT en ambas regiones estudiadas, así como la aparente plasticidad manifestada por el incremento de GAD ante la disminución de 5-HT.

## ABSTRACT

The effect of prenatal protein and essential aminoacid deficiency could induced a serious damage in the neurotransmission of the central nervous system, since the neurotransmitters levels depend of their precursor as in case of serotonin (5-HT) directly related with tryptophan (Tp) intake. Serotonergic neurons innervate GABAergic interneurons, suggesting that this interneuron are excited by the serotonergic system which seems to be related between them and to be sensitive to malnutrition.

This study was performed to evaluate the GABAergic system throughout the glutamic acid decarboxylase (GAD) activity and the GABA release during in development hippocampus and cerebral frontal cortex using a model of protein restriction and corn, based food whose protein en TP deficient and produces a decrease in 5-HT brain levels.

The results obtained, showed a significant decrease in bath body and brain weight in all experimental groups studied, while GAD activity was significant increased all experimental groups compared control animals.

The GABA release was found significantly decrease in experimental groups compared control and at all ages studied except at 30 and 60 day old. Protein deficiency as well as reduction of 5-HT concentration produced by less Tp intake in early life induced an increase in a GAD activity significantly and a reduction in GABA release, affecting the GABAergic system maturation. It could modify some behavioral aspect.

## INTRODUCCION

La investigación sobre nutrición a través del tiempo ha conducido al conocimiento de un gran número de efectos adversos que se derivan de la restricción proteica o bien de la disminución o ausencia en la dieta de algún nutriente en particular, sobre todo aquellos que participan en más de un proceso metabólico como es el caso del triptofano (Tp), un aminoácido indispensable que, además de participar en la síntesis de proteínas y de niacina, es precursor del neurotransmisor serotonina (5-HT) (1-3). La 5-HT a su vez se relaciona estrechamente con otros sistemas de neurotransmisión como el glutamatérgico, el colinérgico y el GABAérgico (4-6), mismos que están involucrados en procesos neurodegenerativos que se observan en padecimientos tales como la enfermedad del Alzheimer, la Corea de Huntington, la epilepsia y el mal de Parkinson; entre otros (7,8,116).

En modelos experimentales con animales se ha observado que la restricción proteica o de AA indispensables afecta la liberación de la 5-HT al igual que altera el número de células GABAérgicas (11,12,49,66), del mismo modo, la aplicación de 5-HT induce estimulación de las células piramidales de corteza cerebral (Cx)(13,136) y la lesión de los núcleos del rafe disminuye la actividad de la descarboxilasa del ácido glutámico (GAD) en hipocampo (Hp) y área preóptica (61-63), mientras que, la estimulación electroquímica de éste núcleo incrementa la actividad de la enzima (14,140).

Por otro lado, estudios experimentales previos realizados en nuestro laboratorio sugieren que el sistema 5-HTérgico no es el único blanco del daño celular inducido por la restricción nutricional en diversas áreas del Sistema Nervioso Central (SNC)(9,111), en este sentido las células GABAérgicas podrían constituir otra estirpe de neuronas susceptibles a las alteraciones inducidas por la disminución de nutrientes (11,12). Ahora bien, ya que se conoce que el sistema GABAérgico puede ser estimulado ó inhibido por la presencia ó ausencia de 5-HT en ciertas áreas del SNC (13-15), en el presente trabajo, se pretende saber si la disminución de 5-HT inducida por la dieta, afecta tanto la liberación de ácido gama aminobutírico (GABA), como la actividad de la

descarboxilasa del ácido glutámico (GAD) en la Cx y el Hp durante el desarrollo de ratas sujetas a restricción proteica y alimentación a base de maíz, cuya proteína es deficiente en los AA Lis y Trp.

## **A N T E C E D E N T E S**

En el SNC de mamíferos se pueden clasificar y distinguir diferentes tipos de neuronas de acuerdo al neurotransmisor que utilizan preferentemente las diversas estructuras, así se encuentran distribuidas en el SNC neuronas colinérgicas que utilizan acetilcolina, glutamatérgicas que emplean glutamato y GABAérgicas cuyo neurotransmisor es GABA. Todas ellas interactúan entre sí en sistemas altamente organizados para facilitar un funcionamiento normal del sistema nervioso (2, 16, 17).

### **E I G A B A**

Es una de las sustancias neuroactivas más ampliamente distribuidas en el SNC. Su concentración total en el cerebro es de aproximadamente 2  $\mu\text{mol/g}$  de tejido, por lo que resulta ser al menos dos órdenes de magnitud mayor que la de otros neurotransmisores como la acetilcolina o las catecolaminas (15, 17, 18). El GABA no penetra fácilmente a través de la barrera hematoencefálica, por lo que es difícil incrementar las concentraciones cerebrales del mismo por administración periférica, a menos que se altere la permeabilidad de dicho obstáculo natural. Por otro lado, este es el neurotransmisor más abundante y más ampliamente distribuido en cuanto a su función sináptica (18).

### **Distribución del GABA en el SNC**

En las décadas de los cincuentas y sesentas se estudió la distribución del GABA en varias regiones del cerebro de diferentes especies tales como la rata (19), el gato (20), el mono (21, 22) y el humano (23); en general se encontró en forma predominante en la materia gris. Posteriormente, se realizó un estudio de la distribución del GABA en 20 áreas del cerebro del mono Rhesus (24), en donde los niveles más altos se encontraron en sustancia nigra, globus pallidus y el hipotálamo (24).

Los estudios realizados en el SNC de los mamíferos demuestran que el GABA se encuentra primordialmente en las interneuronas inhibitoras de la Cx, el Hp y la médula espinal, donde se ha encontrado la mayor parte de la GAD (2). El GABA también se considera como el principal neurotransmisor inhibitor en el Hp y la Cx (25-26); diversos estudios inmunocitoquímicos han mostrado que las terminales de neuronas GABAérgicas están distribuídas en todas las capas del Hp y de la Cx, aunque en la rata la distribución parece ser más uniforme (27-29).

### Síntesis y degradación de GABA

La enzima responsable de la síntesis de GABA es la descarboxilasa del ácido glutámico (GAD; EC. 4.1.1.15) (Fig. 1) y, a diferencia de otras vías metabólicas que son multienzimáticas, esta enzima es el único paso limitante en la vía biosintética del GABA. La reacción catalizada por la GAD es la descarboxilación del carboxilo alfa del ácido glutámico, dando como productos directamente el GABA y  $\text{CO}_2$  (2, 30) (Fig. 1).

En el cerebro se encuentran dos isoformas de GAD:  $\text{GAD}_{65}$  y  $\text{GAD}_{67}$ ; esta clasificación de acuerdo con el peso molecular de las subunidades que la componen, la primera con un peso de 65,400 daltones, requiere de fosfato de piridoxal como cofactor PLP y se encuentra en terminales nerviosas principalmente, por lo que se le ha involucrado principalmente en la síntesis de GABA, mientras que la segunda con un peso de 66,600 daltones es más abundante en los somas de las neuronas GABAérgicas y se le relaciona con la síntesis de GABA implicado en el metabolismo de los ácidos tricarbóxicos. Dentro de las terminales nerviosas GABAérgicas, el GABA se transporta hacia el interior de las vesículas sinápticas en donde es almacenado. (17, 31).

La degradación metabólica del GABA se lleva a cabo mediante la actividad de la enzima transaminasa del GABA (GABA-T, EC. 2.6.1.19). Esta enzima al igual que la GAD también se ha purificado del cerebro de varias especies; su peso molecular es de 109 KDa y parece estar constituida por dos subunidades no idénticas, una de 53 KDa y la otra de 58 KDa. Se localiza fundamentalmente en las mitocondrias y al igual que la GAD, también requiere de fosfato de piridoxal como cofactor (18). Algunos estudios muestran la

existencia de la compartimentalización del metabolismo del GABA. Se conoce que existe un pequeño depósito de glutamato en la astrogliá y un depósito grande que corresponde al glutamato de las terminales que, a su vez, son el sitio de síntesis del GABA. (35) El GABA captado por la astrogliá se transamina por la GABA-T para sintetizar glutamato, que a su vez se utiliza por la enzima glutamino-sintetasa para formar glutamina, la cual puede ser transportada a las terminales sinápticas donde, mediante la acción de la glutaminasa, se sintetiza nuevamente a glutamato, precursor para la síntesis de GABA (2, 23).

## Mecanismo de liberación de GABA

Un criterio importante para considerar a una sustancia como neurotransmisor es el hecho de que sea liberada de las terminales nerviosas como resultado de la estimulación presináptica. Se ha demostrado que en diversas preparaciones experimentales del SNC tanto *in vivo* como *in vitro*, el GABA se libera de las terminales sinápticas por estimulación de las fibras aferentes, o por despolarización producida por una concentración alta de K en el medio, y que la liberación depende de la presencia de Ca (18, 32). En condiciones fisiológicas, la depolarización de la membrana aumenta la conductancia al Ca, lo que facilita la unión de la membrana vesicular con la membrana de la terminal sináptica y se activan los mecanismos responsables de la liberación del neurotransmisor (2) (Fig.2).

La existencia de un mecanismo de eliminación del neurotransmisor del espacio intersináptico es otro de los criterios aceptados para identificar una sustancia como tal; para el GABA, este mecanismo consiste en una recaptura del transmisor hacia la propia terminal sináptica a través de un proceso que requiere de Na y Cl y que es de afinidad alta ( $K_m$  del orden de 10-40  $\mu\text{M}$ ) y otro de afinidad baja, en el que participan las células gliales ( $K_m$  aprox. 300  $\mu\text{M}$ ) (18). Por último, existe otro criterio que es el de identidad, el cual se relaciona con la presencia de receptores postsinápticos. El GABA ejerce sus acciones fisiológicas sobre dos clases de receptores, designados como GABA<sub>A</sub> y GABA<sub>B</sub> (33, 34); el receptor GABA<sub>A</sub> se encuentra en la membrana postsináptica. El receptor GABA<sub>B</sub> se localiza en la terminal nerviosa presináptica y reduce la salida de otros neurotransmisores como la norepinefrina, dopamina, glutamato y serotonina; este receptor está acoplado a canales de Ca y K (2, 34) (Fig. 2).

## **SISTEMA SEROTONINERGICO**

La 5-HT es una amina biogénica que actúa como neuromodulador, neurotransmisor y como hormona en el SNC y Sistema Nervioso Periférico (SNP) de los mamíferos (35-37). Dentro del cerebro, las neuronas 5-HTérgicas se originan principalmente en los núcleos del rafe del tallo cerebral y se proyectan a otras áreas del SNC, donde regulan una amplia variedad de funciones sensoriales y motoras (8, 17, 35).

La 5-HT es uno de los principales neurotransmisores en el SNC, de vital importancia durante ciertos periodos de la vida, en la regulación de ciclos de sueño-vigilia, de los estados afectivos, de la atención, la conducta sexual, la ansiedad, la motivación y de respuesta a estímulos del medio ambiente, la sensibilidad al dolor, la locomoción, la liberación hormonal, en la transmisión de información durante los procesos de crecimiento y en los procesos de memoria y aprendizaje (8, 17, 35, 41). Asimismo, el sistema 5-HTérgico desempeña un papel importante en la evocación de las sensaciones de satisfacción del apetito y algunos autores lo han señalado como regulador de otros sistemas de neurotransmisión, tales como el GABAérgico y el Colinérgico (61, 62).

### **Distribución de 5-HT en SNC**

Los núcleos del rafe se caracterizan por contener la mayoría de las células 5-HTérgicas del SNC (42). En los núcleos del rafe se forman contingentes de fibras ascendentes hacia la corteza cerebral y se entremezclan algunas fibras que descienden al área hipotálamica y hasta alcanzar los bulbos olfatorios. Otro grupo de fibras gira lateralmente para llegar a la formación hipocámpal, al tálamo ventral y al cuerpo estriado (38-40). Algunos estudios demuestran que los axones 5-HTérgicos también se localizan en la porción inferior del tallo cerebral (44). Por otra parte, existen estudios que evidencian la presencia de fibras indolaminérgicas en el cerebelo (4, 6, 45) y que consideran a la 5-HT como uno de los principales neurotransmisores, que ocupa la corteza cerebelosa a nivel de todas sus capas, principalmente a nivel de la capa molecular a través del pedúnculo cerebeloso superior dentro del cerebelo (46, 47). Estudios autorradiográficos muestran diferente densidad de receptores a 5-HT en cada región del SNC; así, se encuentra la mayor cantidad de estos en el Hp, el hipotálamo

y en los núcleos del rafe, cantidades menores en el núcleo acumbens, la amígdala, núcleo caudado, la corteza frontal y el tálamo. Finalmente, la menor densidad se encontró en el cerebelo, cuerpo caloso y la habénula (48) (Fig.3).

### **Síntesis y degradación de 5-HT**

La ingesta de nutrientes altera la cantidad de 5-HT en el SNC debido a que el Tp, precursor de la misma, se obtiene con la dieta. El Tp es un aminoácido indispensable (49, 50), sus reservas dependen del consumo de proteínas que lo contengan. El Tp es también el aminoácido menos abundante en las proteínas de la dieta, consecuentemente su aporte al organismo de los mamíferos es pequeño (15, 36, 49). Una vez ingerido este aminoácido, por medio de un mecanismo de transporte activo de las células endoteliales de los vasos sanguíneos es transportado por el plasma, para que en la célula sea hidroxilado por la enzima TpOH, el producto formado de la hidroxilación del Tp es la 5-HTP que se descarboxila por la 5-hidroxitriptofano descarboxilasa para formar la 5-HT (51, 52). Finalmente la degradación metabólica de la 5-HT es a través de la enzima MAO (53), la cual oxida el grupo amino de la 5-HT para formar el 5-hidroxiacetaldehído que posteriormente se oxida a 5-HIAA (53). La actividad de ésta enzima puede ser inhibida por drogas como la iproniaca, la nialamida, la harmalina y la pargilina (17) (Fig.4).

### **FACTORES QUE INFLUYEN EN LA SINTESIS DE 5-HT:**

El transporte de Tp de la sangre al cerebro aumenta cuando no existe competencia por otras moléculas tales como AA neutros; ésto permite establecer una relación entre Tp/AA Neutros. Asimismo, una dieta rica en carbohidratos, al estimular la secreción de insulina, tiende a incrementar esta proporción, mientras que una dieta rica en proteínas al elevar el nivel de los AA competidores en la sangre tiende a disminuir la disponibilidad del Tp en el cerebro (36, 56).

## Mecanismos de liberación de 5-HT

La 5-HT se forma y almacena en vesículas sinaptosomales dentro de las terminales nerviosas 5-HTérgicas a través de un transporte activo dependiente de energía (hidrólisis de ATP) (57). La liberación se lleva a cabo mediante estimulación presináptica y su magnitud es proporcional a la estimulación. Una entrada de Ca en la terminal nerviosa posterior a la estimulación permite la movilización de las vesículas que contienen al neurotransmisor, mismas que se fusionan con la membrana presináptica y la 5-HT se libera por exocitosis (58). De esta manera, el proceso de liberación muestra una dependencia absoluta de la concentración de calcio extracelular. Una vez liberada la 5-HT viaja al espacio intersináptico para interactuar con un receptor específico localizado en la membrana postsináptica, o con su autorreceptor (32, 54) (Fig.5).

## ANATOMIA Y FISIOLOGIA DEL HIPOCAMPO

La formación hipocampal se constituye por el arquipalio que corresponde a la corteza filogénicamente más primitiva. Esta estructura, que forma parte del sistema límbico, se encuentra en todos los mamíferos. Presenta tres zonas: el giro dentado (vecino a la cisura coroidea), el Asta de Ammon (intermedia) y el subículo (contiguo al neopalio). Posee una corteza trilaminar muy primitiva a nivel del giro dentado y del Asta de Ammon, pero en el subículum hay una zona transicional hacia la corteza neopalial de seis capas (16).

### Conexiones aferentes del hipocampo

El Hp recibe impulsos del área entorrinal, de la región septal, del cíngulo y del lado opuesto del Hp. *La corteza entorrinal* es la principal fuente de fibras aferentes para el Hp al cual llegan a través de la vía perforante y de la *región septal*; los impulsos son conducidos por el fórnix. Las que proceden del Hp *opuesto* pasan a la fimbria y después cruzan la línea media por la comisura hipocámpica (16, 27) (Fig.6).

## Conexiones eferentes del hipocampo

El Hp descarga sus impulsos a través del *fórnix*, que está formado por los axones de las células piramidales y en pequeña proporción por los de células situadas en la fascia dentada. Al llegar a la parte caudal del Hp, la mayor parte de las fibras de la fimbria pasan a las columnas posteriores del fórnix en donde un número pequeño cruza en la comisura hipocámpica y otras alcanzan la superficie dorsal del cuerpo calloso, donde se incorporan a las estrías mediales y laterales y forman el fórnix principal. A través de la *fimbria* y el *fórnix*, el Hp envía impulsos a los núcleos de la región septal, al área preóptica, a los núcleos anteriores del hipotálamo (componente precomisural), a las áreas hipotalámicas ventral y lateral, al núcleo anterior del tálamo y a los núcleos del cuerpo mamilar (componente postcomisural), (16) (Fig.7).

Las complejas relaciones anatómicas del Hp sugieren que interviene en variadas funciones, en las que participan diferentes niveles neurales. Esta región ha sido implicada en funciones sensoriales, en la conducta emocional, en la regulación visceral y endocrina, en los procesos de condicionamiento, así como en el aprendizaje y memoria (16, 27).

## ANATOMIA Y FISIOLOGIA DE LA CORTEZA CEREBRAL

La Cx embriológicamente se deriva del telencéfalo y es una capa de sustancia gris que cubre los hemisferios cerebrales. Se ha calculado su área total entre  $200 \times 10^3$  a  $248 \times 10^3 \text{ mm}^2$  en el humano, de la cual, un tercio corresponde a las circunvoluciones y dos se hallan ocultas en la profundidad de los surcos. El espesor de la Cx varía de 1.4 a 4.5 mm (16).

En la Cx se reconocen seis capas dentro de las cuales se encuentran los siguientes tipos de células: piramidales, granulosas o estrelladas, fusiformes, las horizontales de Cajal, las células de Martinotti y células especiales como las piramidales gigantes de Betz (en la capa V de la corteza motora), las gigantes de Meynert (en la corteza occipital) y las células mitrales y de candelabro (del bulbo olfatorio), (16).

La Cx recibe fibras aferentes que proceden del tálamo (talamocorticales), de regiones corticales del mismo hemisferio (asociación intrahemisférica) o del hemisferio del lado opuesto (comisurales); sus fibras eferentes pueden terminar en otras regiones corticales del mismo hemisferio (asociación intrahemisférica), del hemisferio opuesto (comisurales), o en niveles subcorticales (fibras de proyección) (16, 60).

La Cx interviene de manera predominante en la organización de las actividades superiores, que representan las funciones nerviosas de más alto nivel, y en la corteza se originan y rigen los movimientos voluntarios (16).

## **RELACIONES ENTRE EL HIPOCAMPO Y LA CORTEZA CEREBRAL.**

Existe una estrecha relación entre ambas regiones y los sistemas de neurotransmisión 5-HTérgico y GABAérgico, a través de las aferencias del rafe hacia las interneuronas inhibitoras en el Hp (61-63). Este es el componente principal del sistema límbico, y recibe influencias corticales y subcorticales de las áreas que modulan los procesos cognoscitivos. Existe un circuito hipocampal basado en una serie de sinapsis que llevan información de la Cx entorrinal a las células granulares del giro dentado, células piramidales de la zona CA3 se proyectan al área entorrinal. En el Hp existen interneuronas GABAérgicas que modulan la transmisión sináptica. En esta área existe una importante regulación entre mecanismos excitadores e inhibidores que integran y procesan éstas sinapsis; por esta razón, se ha centrado el interés en el estudio del Hp en numerosos estudios de malnutrición y daño cerebral (64, 65, 132). Estudios neuropatológicos en humanos y de comportamiento en animales validan el papel esencial de la formación hipocampal en la consolidación de la memoria (66).

## DESNUTRICION

La forma más prevalente de malnutrición en humanos se caracteriza por su naturaleza crónica y generacional (67, 81). Estudios preliminares en ratas indican que una restricción moderada de proteínas en la primera generación se vuelve restricción más severa de proteínas en la segunda (9, 10, 68, 76). Esto es con base a los principales parámetros para evidenciar la malnutrición, ganancia de peso durante la gestación, menor número de crías por camada, peso bajo al nacimiento, menor peso cerebral, alteración en la curva de crecimiento, niveles de neurotransmisores ó aminas biogénicas (69-72).

Entre los principales efectos de la desnutrición en las primeras etapas de la vida se encuentran el daño al desarrollo normal del sistema nervioso que es vulnerable a la restricción de nutrientes, como ha sido ampliamente demostrado, provocando una reducción en el número, crecimiento y maduración celular, estas alteraciones incluyen procesos de síntesis, degradación, transporte de neurotransmisores y la presencia de sitios receptores. Así; el desequilibrio neuroquímico sináptico, contribuye al retardo en el desarrollo del SNC. Estos efectos han sido observados en niños desnutridos como posible consecuencia de modificación en la fisiología sináptica como consecuencia del trastorno nutricional (73-75).

La desnutrición causa retardo en el crecimiento y desarrollo del cerebro de ratas (9), ya que éste presenta una etapa de división celular en la que requieren de aminoácidos, vitaminas, minerales, sustratos de energía y ácidos grasos para construir y mantener su gran cantidad de neuronas y células de la neuroglia (76-78). La desnutrición también produce retardo en el establecimiento de contactos sinápticos, por lo que resultan alteraciones en la memoria y el aprendizaje, entre otros aspectos cognoscitivos (80).

La desnutrición aparece ante la falta de alimentos que aporten las cantidades mínimas de nutrientes requeridas por el individuo, lo que induce la aparición de cambios que podrían ser permanentes (68). Esto hace urgente la realización de estudios cada vez más profundos de sus efectos, para lo cual han sido empleados diversos modelos en animales entre los que destacan aquellos en los que se utilizan ratas, para realizar estudios durante el desarrollo, ya que estos animales muestran un requerimiento de AA indispensables y un desarrollo del SNC similar al de los seres humanos, con la ventaja de observar en menor tiempo los cambios (82). Igual que en el hombre, el período crítico de maduración cerebral de la rata sucede en la etapa posterior al nacimiento, en este período se establecen contactos sinápticos y se incrementa la mielinización neuronal y migración celular en diversas áreas del SNC (17), de aquí que los efectos de la desnutrición sobre el desarrollo cerebral, son tanto

más severos cuánto más joven es el individuo (78). Diversos estudios muestran que la desnutrición proteica en ratas, inducida posteriormente a su concepción y durante su desarrollo, produce cambios sustanciales en el crecimiento del cuerpo, así como en algunos parámetros neuroquímicos, neuroanatómicos y en el contenido cerebral de ADN y ARN, en el metabolismo de aminos biogénicas y, en general, en el desarrollo cerebral y conductual (77, 83-85).

Diversos estudios muestran que un aporte proteico bajo durante el embarazo produce modificaciones en el peso de los fetos hacia el final de la gestación (77). Estas alteraciones se acentúan con la alimentación a base de maíz como fuente única de proteínas (bajo contenido de Trp y Lis), como lo demuestran los resultados obtenidos en nuestro laboratorio mediante el uso de este modelo (84, 87) al igual que los descritos por otros autores quienes han observado disminución en el peso corporal en las concentraciones de ADN, ARN, proteínas y 5-HT así como un efecto sobre la utilización de AA indispensables y de proteínas en el cerebro de ratas (83, 86).

Asimismo se han reportado los efectos sobre algunos eventos de la neurotransmisión mediada por diversos AA, los estudios de Fernstrom y Morgane han demostrado que la disminución de Trp afecta la concentración de serotonina en el cerebro. (87-89)

Los efectos que podrían atribuirse a la disminución de 5-HT en el cerebro de ratas con una dieta a base de maíz son:

- \* Disminución en el número de neuronas que sintetizan 5-HT (84, 90, 91),
- \* Reducción en la actividad de la enzima que sintetiza la 5-HT (79, 92),
- \* Modificación en la enzima TrpOH (93, 124),
- \* Aceleración en la degradación de la 5-HT (93-95),
- \* Disminución en el almacenamiento de 5-HT (93, 94),
- \* Modificación en algunos procesos cognitivos, como; memoria de corto plazo y comportamiento (8, 80, 94, 103).

Los niveles de 5-HT en el cerebro solo se reducen significativamente con la dieta a base de maíz, pero no con una dieta de restricción proteica, cuyo mecanismo sobre el sistema 5-HTérgico es diferente, ya que

al consumir esta dieta en el plasma están presentes menos AA neutros, lo que permite un incremento del ingreso del Tp al cerebro y un aumento de la concentración de 5-HT y 5-HIAA, principalmente en la región del diencefalo, tallo cerebral y telencefalo (71, 84).

Por otro lado, la restricción proteica, durante el desarrollo disminuye la molaridad de la albúmina en el sitio de unión para el Tp, lo que dificulta la unión de ambas moléculas y se incrementa el Tp libre en el plasma que puede ser utilizado por el cerebro para sintetizar 5-HT, aunque también puede aumentar la concentración de los ácidos grasos en el plasma (89).

Por otro lado, se ha reportado en algunos trabajos la relación que existe entre la nutrición y el desarrollo de los sistemas de neurotransmisión, destacándose entre ellos los estudios sobre el desarrollo normal de las células 5-HTérgicas y GABAérgicas en el SNC (97), ya que tanto la 5-HT como el GABA son de vital importancia por su participación en diversos aspectos de la neurotransmisión, regulación de expresión de factores de crecimiento, ciclos del sueño, factores hormonales, sensibilidad al dolor, aprendizaje y memoria (73).

Es de esperarse que el metabolismo central de la 5-HT y el GABA pueda ser influenciado por factores dietéticos, ya que el Tp es el único aminoácido precursor de la síntesis cerebral de la 5-HT y ésta a su vez regula la acción del GABA, de acuerdo a diversos trabajos que muestran esta relación entre sistemas de neurotransmisión. (5, 12, 14) Existen cambios en la neuroquímica cerebral de sujetos denutridos que afectan la síntesis, liberación y/o captación de diversos neurotransmisores que dependen de un precursor, que pueda ser un aminoácido indispensable, como son: DA, NA y 5-HT, así se ha establecido que la concentración de esta última depende tanto del contenido de proteína como de Tp en la dieta (36, 49).

Estudios realizados en nuestro laboratorio, así como los de Morgane y los realizados por diversos autores (47, 50, 65, 93) han determinado una elevación en la concentración de 5-HT cerebral, en animales sujetos a restricción proteica y establecen que dicho incremento se manifiesta por un aumento en la concentración de Tp en el plasma, lo que sugiere que existe activación en la síntesis del sistema 5-HTérgico ante el stress nutricional y por ello un aumento en la concentración de 5-HT, mientras que, con la restricción de Tp inducida con una dieta a base de maíz la concentración de 5-HT disminuye (87,93,133). Las fluctuaciones en la

concentración de este neurotransmisor son importantes, ya que además de actuar en los procesos de sueño y vigilia, sensibilidad al dolor, locomoción, regulación hormonal (86,88,94,103), también actúa como modulador de diversos sistemas de neurotransmisión como el glutamatérgico, colinérgico y GABAérgico entre otros (4,5,6), cuya interacción ejerce un efecto modulador sobre el factor neurotrófico del sistema nervioso (134,135), el cual a su vez interviene en la regulación del sistema 5-HTérgico, mientras que la 5-HT participa en su expresión, así el aumento observado de este neurotransmisor en los animales sujetos a restricción proteica, probablemente aumenta la proliferación celular, mientras que en la dieta de maíz, al disminuir la concentración de 5-HT, el número de células se verá disminuido. Algunos trabajos mencionan como regulador del sistema 5-HTérgico al factor neurotrófico del sistema nervioso, ya que a este se le involucra en la diferenciación, y dado que la 5-HT influye en la expresión de éste, es de esperarse que con una elevación de 5-HT se incremente la proliferación celular, y que con la disminución de este neurotransmisor la misma suceda el efecto contrario (66).

Del mismo modo, ha sido observado que la administración de una dieta de restricción proteica ó de algunos amino ácidos indispensables afecta los niveles cerebrales de 5-HT y altera la densidad de las células GABAérgicas (11,12) y que la aplicación de este neurotransmisor induce estimulación prolongada de las mismas (136). Algunos trabajos, en donde se ha utilizado al maíz para la alimentación de los animales de experimentación demuestran como las células inhibitoras se encuentran disminuidas, y este hecho se le atribuye a la ausencia de Tp en la dieta, mismo que es considerado como un factor trófico para las interneuronas inhibitoras (5, 11-14, 19).

Por otro lado, Munaro y col. (14) han demostrado la interacción entre el sistema GABAérgico y 5-HTérgico, que permite suponer la existencia de un mecanismo regulador entre ambos sistemas (62, 138), al mostrar que la lesión del núcleo dorsal del rafe disminuyó la actividad de GAD en hipotálamo y área preóptica y que por el contrario, la estimulación electroquímica de estos núcleos incrementa la actividad de la enzima, a pesar de que dicha actividad en el cerebro, parece estar regulada a través de diversos mecanismos, entre los que se encuentran, la interconversión Apo-holo-enzima y cambios en la dinámica metabólica o vía de síntesis durante el desarrollo (140).

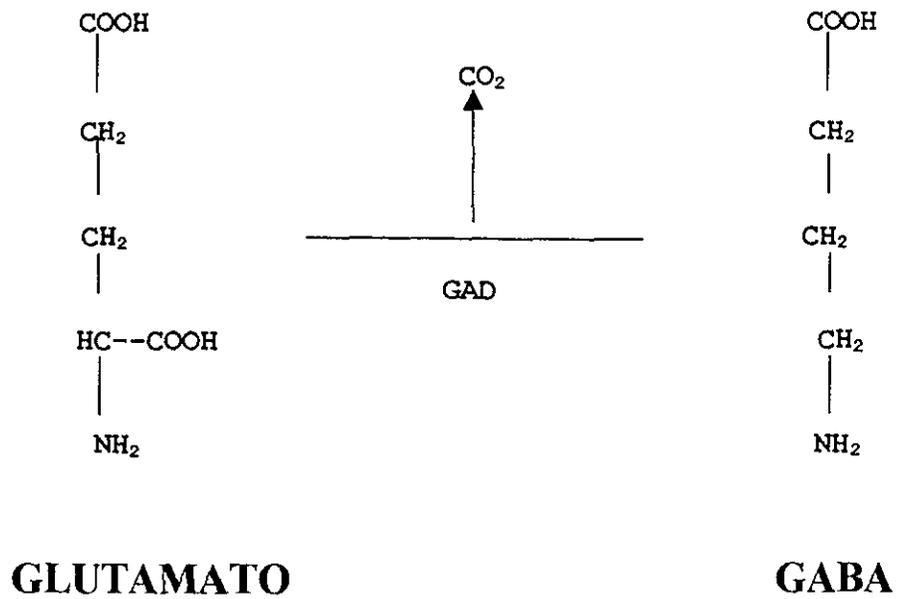
Se ha descrito que la 5-HT modula las inhibiciones en Hp, ya que la activación de los receptores 5-HT<sub>2A</sub> (136, 138) sobre interneuronas GABAérgicas aumentan la liberación de GABA e incrementan de esta manera el control inhibitor de las células granulares, por tanto la 5-HT ejerce un control global sobre Hp vía modulación local de interneuronas inhibitoras (61, 62). Los receptores 5-HT<sub>2A</sub> se expresan en niveles relativamente elevados sobre las interneuronas GABAérgicas y se dice que la activación de éstos incrementa la liberación espontanea de GABA (138).

La presencia de receptores 5-HT<sub>3</sub> en células GABAérgicas puede indicar que la 5-HT es un regulador de la neurotransmisión mediada por GABA en Telencéfalo (138) y ejercer una influencia inhibitora sobre las respuestas reflejas del corazón, probablemente a través de la activación del sistema GABAérgico local (142).

Algunos trabajos indican que más del 90% de las células de neocorteza y células piramidales del área CA1 en Hp, que expresan receptores 5-HT<sub>3</sub> son GABAérgicas y sugieren que la 5-HT puede modular la excitabilidad de las neuronas, a través de la activación de los receptores 5-HT<sub>3</sub> y que la respuestas de la interneuronas depende de potenciales de membrana que incrementan la despolarización de las células, permitiendo la entrada de 5-HT, la cual puede simultaneamente modular la salida de GABA y participar en la regulación inhibitora del cerebro, independientemente de la cantidad de enzima sintetizadora del GABA (138, 143). Dada esta regulación entre el sistema 5-HTérgico y GABAérgico y debido a que el Tp es el aminoácido precursor de la 5-HT, el presente trabajo se diseñó para caracterizar el efecto de la disminución prenatal de Tp sobre la actividad del sistema GABAérgico a través de la actividad de la GAD y la liberación estimulada de GABA en diferentes regiones del cerebro y durante el desarrollo de la rata, lo que podría a su vez determinar la posible regulación de el sistema GABAérgico por el sistema 5-HTérgico.

FIGURA No. 1

## S I N T E S I S D E G A B A



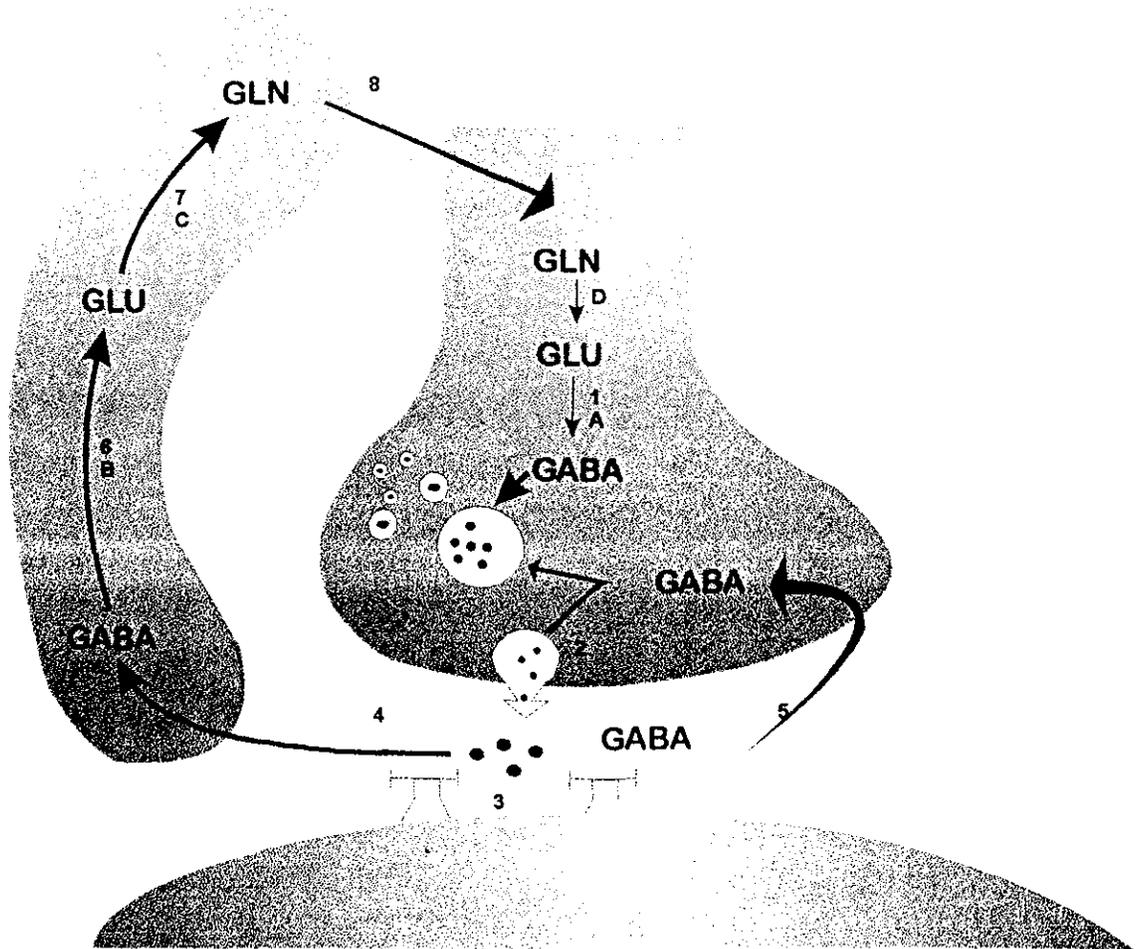
SÍNTESIS DE GABA APARTIR DE GLU POR ACTIVACIÓN DE LA GAD.

FIGURA No. 2

## DIAGRAMA ESQUEMATICO DE LA NEUROTRANSMISION GABAERGICA

ENZIMAS: (A) Descarboxilasa del Acido Glutámico (GAD)  
(B) Transaminasa del Acido Glutámico (GABA-T)  
(C) Glutamino sintetasa  
(D) Glutaminasa

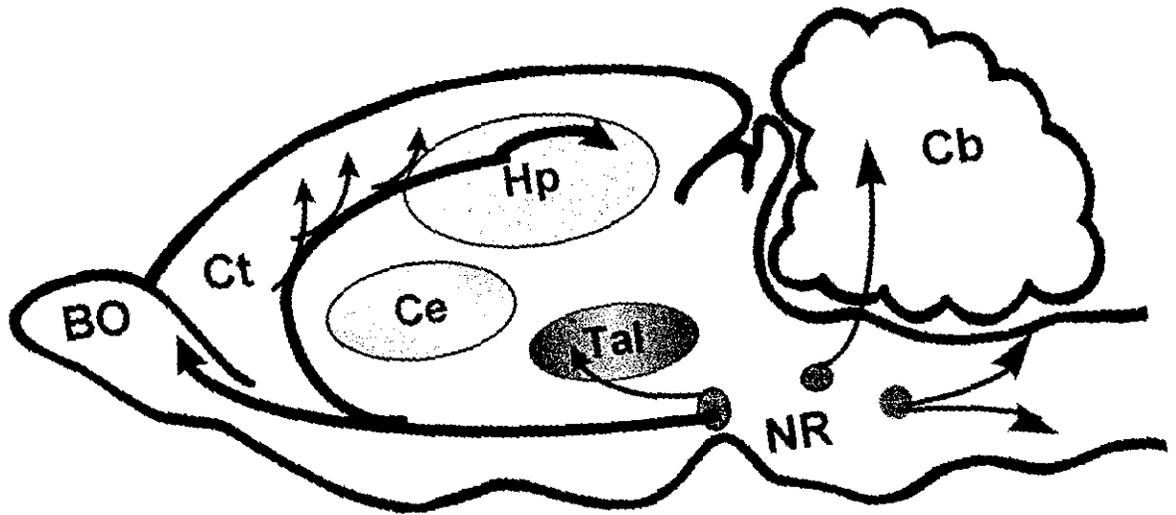
- 1.- Síntesis de GABA
- 2.- Liberación de GABA dependiente de Ca
- 3.- Interacción con el receptor de la membrana postsináptica
- 4.- Captura de GABA por células gliales
- 5.- Captura de GABA por la terminal presináptica
- 6.- Conversión a glutamina (Gln)
- 7.- Liberación y captura de glutamina
- 8.- Síntesis de Glutamato



**FIGURA No. 3**

**DISTRIBUCION DE LAS VIAS SEROTONINERGICAS EN EL SNC**

Representa la localización de los principales cuerpos celulares que contienen serotonina Hipocampo (Hp), Bulbo Olfatorio (BO), Núcleos del Rafé (NR), Cuerpo estriado (Ce), Corteza (Ct), Cerebelo (Cb) y Tálamo (Tal).



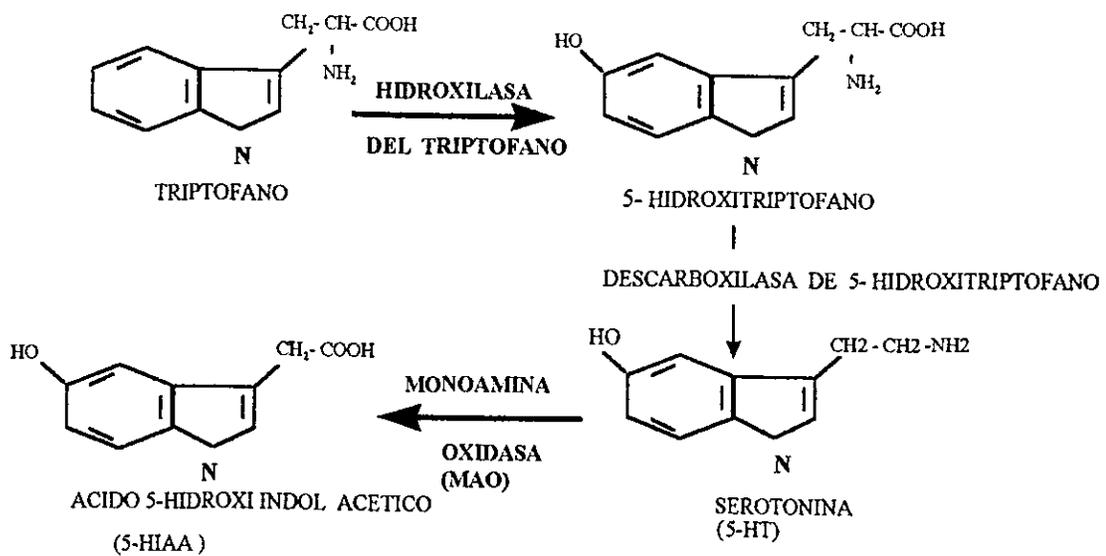


FIGURA No. 4

## SINTESIS Y DEGRADACION DE LA SEROTONINA

Tomado de: Snyder, S.H.: Catecholamines, Serotonin and Histamine. En: Basic Neurochemistry. Segal, G.J., Alberts, R.W., Katzman, R. and Agranoff, B.W. (Eds.) Little, Brown and Co. Boston. Cap. 10

FIGURA No. 5

## SINAPSIS SEROTONINERGICA CENTRAL

- 1.- Sitio de acción de la hidroxilasa del triptofano, la enzima más importante en la formación de 5-HT.
- 2.- La 5-HT formada se transporta al interior de vesículas intrasináptica.
- 3.- La 5-HT contenida en vesículas se vierte al espacio intersináptico después que llega a la terminal nerviosa en estímulo despolarizante.
- 4.- La 5-HT liberada actúa sobre receptores específicos localizados en la membrana postsináptica.
- 5.- Después de que la 5-HT ejerce su acción se recapturada a la misma terminal nerviosa.
- 6.- Finalmente, la 5-HT puede ser captada por vesículas o ser degradada a 5-HIAA por la MAO.

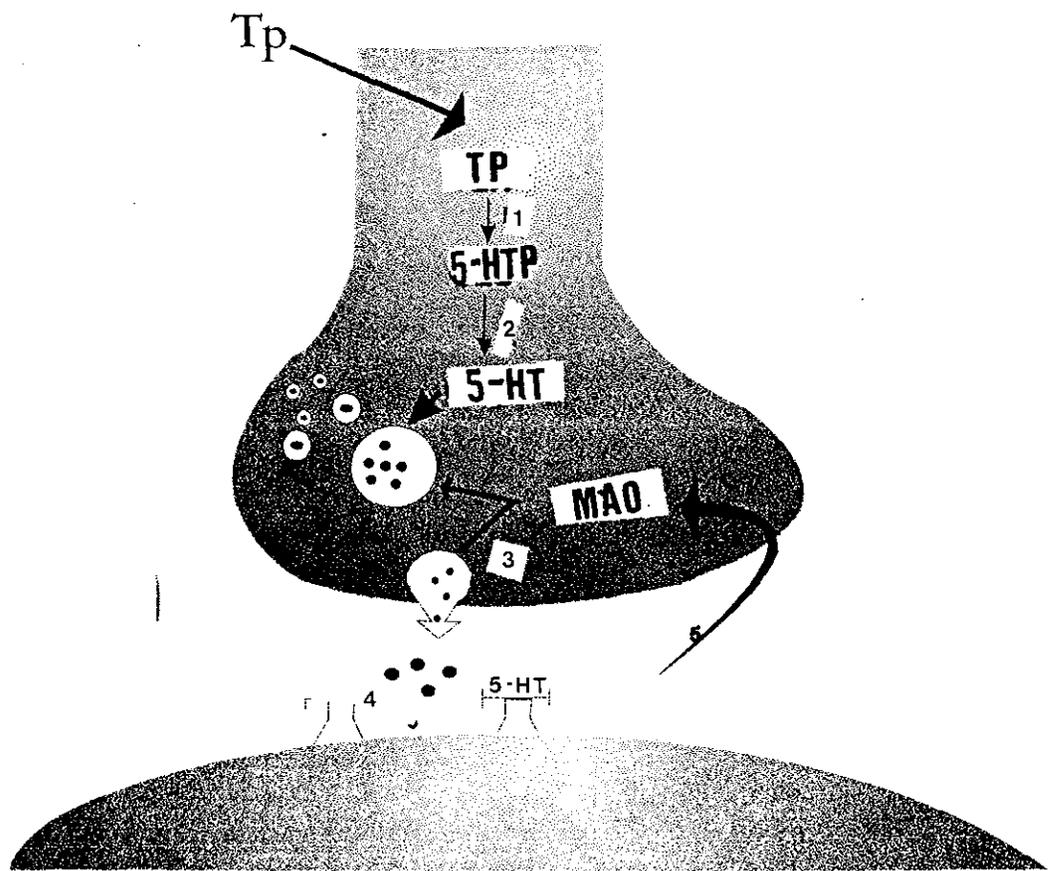


FIGURA No. 6

## CONEXIONES AFERENTES DEL HIPOCAMPO

EL HIPOCAMPO RECIBE IMPULSOS:

- 1) DEL AREA ENTORRINAL (AE)
- 2) DE LA REGION SEPTAL (RS)
- 3) DEL CINGULO (C)
- 4) DEL HIPOCAMPO DEL LADO OPUESTO (HO)

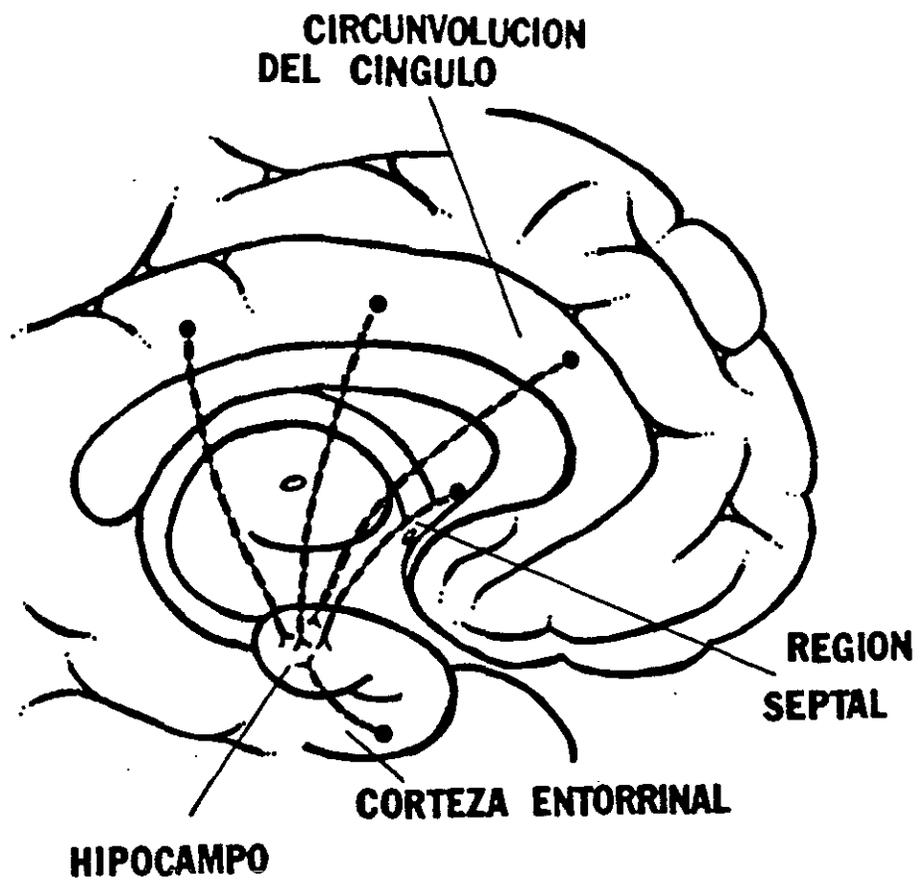
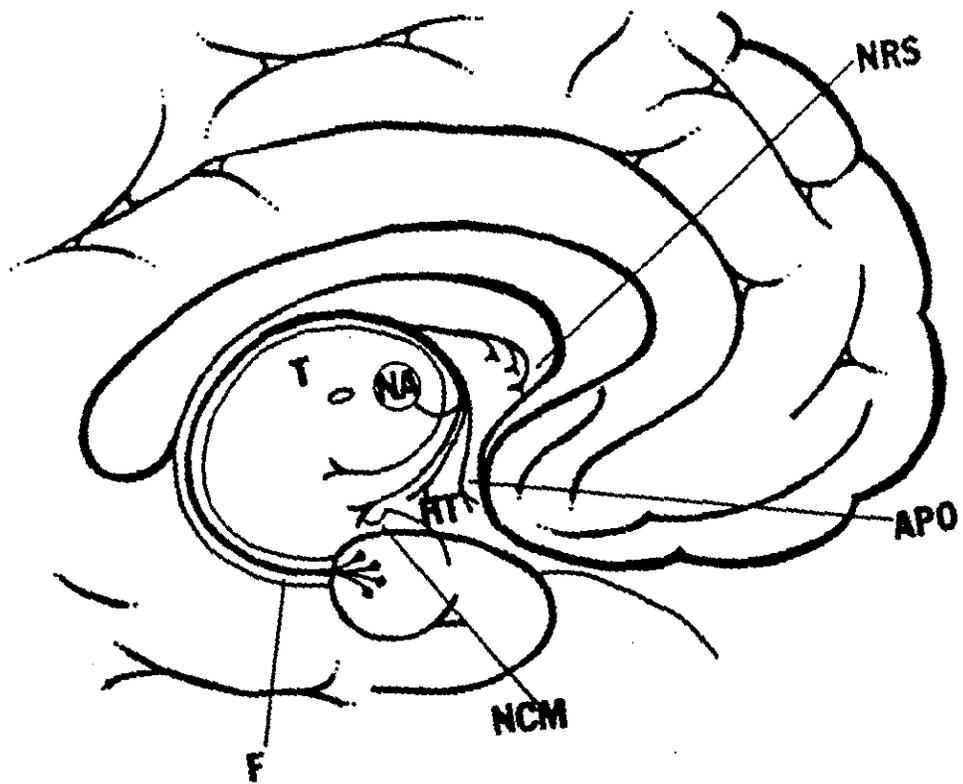


FIGURA No. 7

**CONEXIONES EFERENTES DEL HIPOCAMPO**

A TRAVES DEL FORNIX EL HIPOCAMPO ENVIA IMPULSO:

- 5) A LOS NUCLEOS DE LA REGION SEPTAL (NRS)
- 6) AL AREA PREEPTICA (APO)
- 7) A LAS AREAS HIPOTALAMICAS VENTRAL Y LATERAL (AHT)
- 8) AL NUCLEO ANTERIOR DEL TALAMO (NAT)
- 9) NUCLEOS DEL CUERPO MAMILAR (NCM)



## JUSTIFICACION

El impacto de la privación de proteínas y AA indispensables durante el desarrollo sobre el perfil neuroquímico, se ha manifestado a través de alteraciones en la concentración y metabolismo de aminas biogénicas como son la 5-HT y NE, que inducen cambios en la Neuroquímica cerebral al modificar tanto el número como la morfología de las neuronas que liberan otros neurotransmisores, entre los que se encuentra el GABA, este modula procesos neuropsicológicos, como los que se alteran en los procesos de neurodegeneración en la enfermedad de Alzheimer, Corea de Huntington, Epilepsia y mal de Parkinson.

Diversos estudios han mostrado la existencia de inervación 5-HTérgica en las células GABAérgicas, que permite suponer la presencia de un mecanismo regulador entre estos sistemas; ya que al seccionar o estimular electroquímicamente los núcleos del rafé se altera la actividad de la GAD, enzima sintetizadora del GABA.

Del mismo modo, en trabajos previos con la utilización de animales muestran que cuando se altera farmacológicamente la relación entre ambos sistemas, se afectan los procesos de memoria y aprendizaje, en los individuos desnutridos, sin embargo, a la fecha no se conocen los mecanismos de acción de un neurotransmisor sobre otro, por lo que el presente trabajo pretende determinar el efecto de la disminución alimenticia del aminoácido Tp, precursor de la 5-HT, a través de la alimentación a base de maíz, cereal que contiene un bajo contenido de Tp, sobre la actividad de la GAD y la liberación estimulada de GABA.

## **HIPOTESIS**

Si la serotonina participa en la regulación del sistema gabaérgico luego entonces una disminución en la cantidad de serotonina, reducirá la neurotransmisión GABAérgica manifestada a través de la actividad de la GAD y de la liberación de GABA en Cx e Hp.

## **OBJETIVOS**

### **GENERAL:**

Caracterizar la actividad del sistema GABAérgico en la Cx e Hp durante el desarrollo posnatal de ratas bajo restricción de Tp y 5-HT.

### **PARTICULARES:**

Cuantificar la liberación de GABA tritiado en rebanadas de tejido de Cx e Hp de ratas de 14, 21, 30 y 60 días de edad posnatal, sujetas a restricción de Tp.

Determinar la actividad de la GAD en tejido de Cx e Hp de ratas de 14, 21, 30 y 60 días de edad posnatal, sujetas a restricción de Tp.

## MATERIAL Y METODOS

Los componentes empleados para la elaboración de las dietas fueron: alimento para roedores (Nutricubos), harina de maíz (MASECA), aceite de maíz comercial, las mezclas de vitaminas, minerales, fibra alfacel, glucosa, sacarosa y dextrina fueron obtenidos de International Customer Service (ICN). Las sales y solventes empleados, de Merck y Sigma Chemical Company y los compuestos radiactivos de Du-pont.

### **Animales de experimentación:**

Se utilizaron 60 ratas de la cepa *Swiss-wistar*, hembras adultas, de un peso aproximado de 250gr., las cuales se mantuvieron en condiciones de bioterio con ciclos de luz y oscuridad 12 x 12 horas, humedad relativa del ambiente (40% a 50%), temperatura de  $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ , con libre acceso a agua y alimento.

### **Diseño experimental:**

Se administraron cuatro tipos de dieta (TABLA I)(84):

- A) Dieta Testigo, a base de alimento convencional para roedores, (23% proteína) (T).
- B) Dieta Hipoproteica, con 8% de proteína a base de alimento para roedores, (8% proteína) (RP).
- C) Dieta de Maiz-Lisina, a base de harina de maíz suplementada con Lis, (8% proteína) (ML).
- D) Dieta de Maíz, a base de harina de maíz, (8% proteína) (MA).

Las ratas madres se alimentaron con la dieta correspondiente desde 5 semanas antes del apareamiento y se mantuvo el tipo de alimentación durante la gestación, la lactancia y hasta las crías alcanzaron 60 días de edad. Los estudios se realizaron a los 14, 21, 30 y 60 días de edad de las crías. (El promedio de individuos utilizado por etapa fue de 7 a 10).

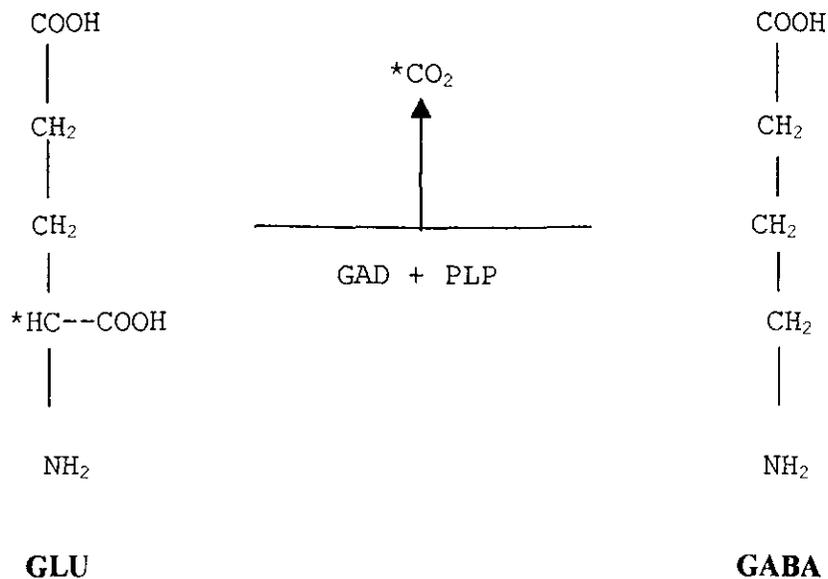
El peso corporal de cada animal se registró antes del sacrificio, los cerebros se extrajeron en frío previa decapitación y se obtuvieron 2 regiones diferentes: 1) Corteza cerebral frontal e 2) Hipocampo; mismas que fueron utilizadas para determinar la actividad de la GAD y la liberación estimulada de GABA.

El análisis de los datos obtenidos se realizó con la prueba analisis de varianza ANOVA seguido de T-student, para la comparación entre grupos. El nivel de significancia aceptado fue  $p < 0.05$ .

### Determinación de la Actividad de la GAD

#### FUNDAMENTO:

La GAD elimina el carboxilo alfa del glutamato para producir GABA y  $\text{CO}_2$ , el cual se libera. Esta reacción es irreversible y dependiente de PLP en el medio. Así, la manera de cuantificar la actividad de esta enzima, consiste en la determinación del  $\text{CO}_2$  liberado, el cual se marca con el radioisotopo  $^{14}\text{C}$  y es retenido en el sistema captador de  $\text{CO}_2$  (30, 98).



Las muestras obtenidas para la determinación de la GAD se homogenizaron con sacarosa 0.32 M en el volumen necesario para obtener una concentración aproximada de 800 a 1,000  $\mu\text{g}$  de proteína por ensayo (99). Las muestras obtenidas se mantuvieron a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta que se procedió a la determinación de la actividad de la enzima GAD.

La actividad de la GAD, se determinó de acuerdo con la metodología propuesta por Tapia y Salazar (30), los tubos en los que se realizó el ensayo fueron colocados en Baño Frío a  $4^{\circ}\text{C}$ , y se les agregó 90  $\mu\text{l}$  de tejido homogenizado, 20  $\mu\text{l}$  de PLP 0.2 mM y 20  $\mu\text{l}$  de Glu frío; se agitaron y se dejaron en el hielo.

Al ensayo se agregan 20  $\mu\text{l}$  de  $^{14}\text{C}$ -Glu y cada tubo se transfirió a un B.M. con agitación a  $37^{\circ}\text{C}$  donde se conectó a un tubo que contenía 200  $\mu\text{l}$  de hiamina y que capturó el  $\text{CO}_2$  marcado. Los tubos se mantuvieron en B.M. con agitación por 30 minutos, al termino de los cuales se agregó 200  $\mu\text{l}$  de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  8 N. para detener la reacción; posteriormente se dejó el sistema en incubación durante una hora, para finalmente tomar los tubos con hiamina y transferirlos a un vial con 10 ml. de líquido de centelleo.

### **Experimentos de Liberación de GABA (100)**

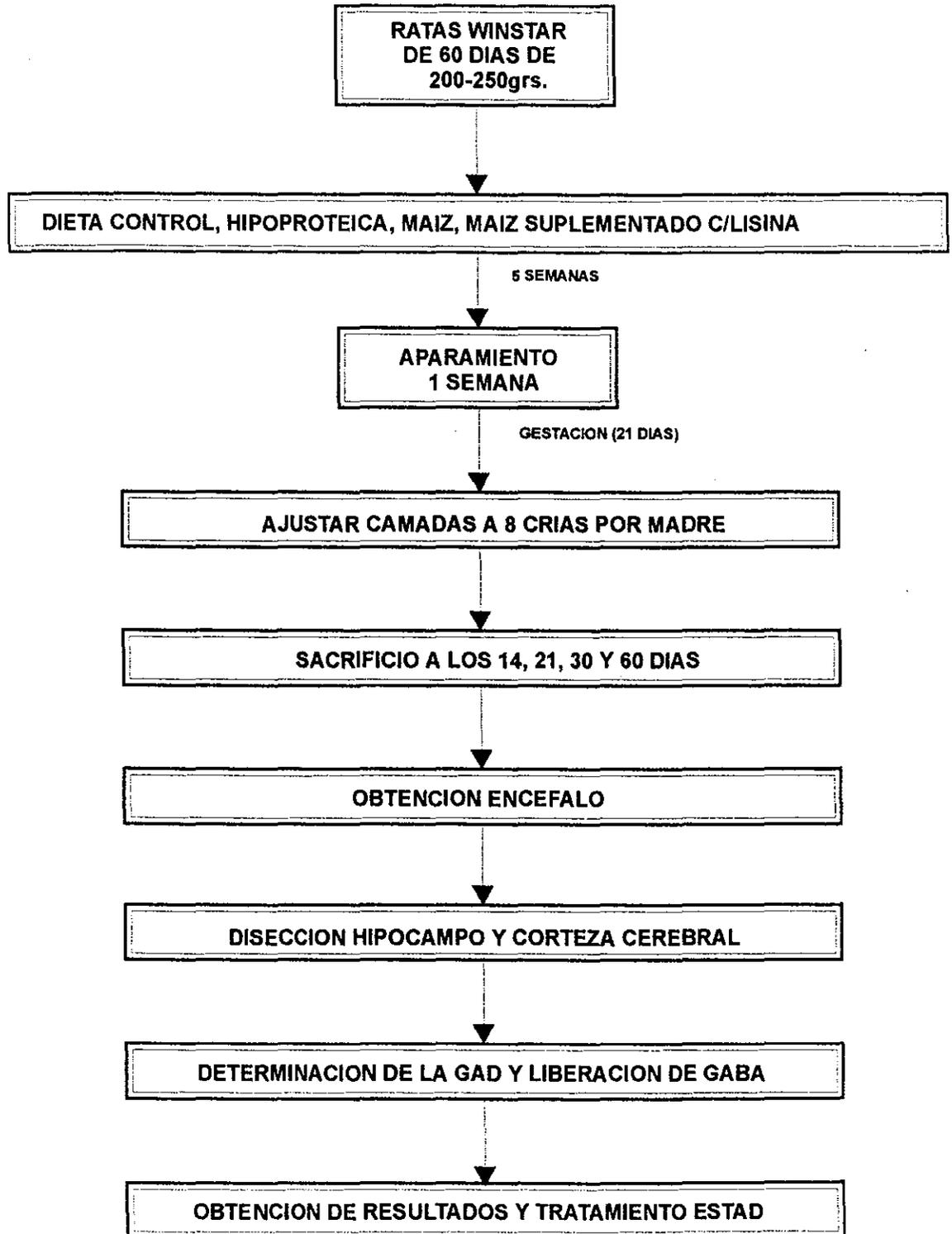
Los tejidos obtenidos se cortaron en rebanadas (25 mg de tejido por ensayo); las rebanadas se transfirieron a un B.M. a  $37^{\circ}\text{C}$  y se preincubaron durante 10 minutos en un medio Krebs-bicarbonato que además contenía ácido aminooxiacético (10  $\mu\text{M}$ ). Después se les adicionó 10  $\mu\text{l}$  de GABA- $[\text{}^3\text{H}]$  (10  $\mu\text{M}$ ) y la incubación se prolongó 20 minutos más. Al término de este tiempo, el tejido se depositó en un sistema de perfusión Brandel y se hicieron dos lavados con medio Krebs-bicarbonato (TAB.II) a con centración baja de potasio (3 mM); el primer lavado se realizó a velocidad rápida 5 minutos, mientras que el segundo lavado se realizó a velocidad normal (0.5 ml. por minuto) con el mismo medio y por el mismo lapso. Una vez concluidos los lavados se procedió a la recolección de fracciones, haciendo un total de 10 fracciones por cada vía con una duración de 5 minutos por fracción y con un flujo de 0.5 ml por minuto.

Para cada región se utilizaron dos vías: una de ellas para determinar la liberación basal de GABA, en donde el tejido recibió medio bajo en potasio (3 mM) durante el transcurso de todas las colectas; mientras que a la otra vía se le aplicó un estímulo con alta concentración de potasio (53 mM) a partir de la cuarta fracción hasta la octava. Al finalizar las tomas se adicionó 5 ml de líquido de centelleo y se cuantificó la radiactividad en un contador de centelleo líquido (BECKMAN L-S-6000 SE) en donde los resultados se expresaron en porcentaje de GABA liberado respecto a la cantidad total incorporado al tejido, de acuerdo a:

$$\% \text{ LIBERACION} = \frac{\text{Radiactividad Incorporada}}{\text{Radiactividad Total}} \times 100$$

Los resultados obtenidos se procesaron mediante la prueba de análisis de varianza ANOVA y la T-student y se expresaron como el promedio  $\pm$  EEM (error estándar de la media) de 5 a 7 experimentos realizados.

## DIAGRAMA EXPERIMENTAL



**COMPOSICION DE LA DIETA**

| <b>COMPONENTES</b> | <b>TESTIGO</b> | <b>RP</b> | <b>MAIZ</b> | <b>M-L</b> |
|--------------------|----------------|-----------|-------------|------------|
| Chow (proteína     | 98             | 34        | *           | *          |
| Maíz               | *              | *         | 86          | 86         |
| Aceite Vegetal     | 2              | 3.1       | 2           | 2          |
| Sales Minerales    | *              | 1         | 2.1         | 2.1        |
| Vitaminas          | *              | 1         | 1           | 1          |
| Sacarosa           | *              | 20.1      | *           | *          |
| Glucosa            | *              | 19        | *           | *          |
| Dextrina           | *              | 12.6      | *           | *          |
| Celulosa           | *              | 9         | 8.9         | 8.9        |
| Lisina             | *              | *         | *           | 0.4        |

**TABLA I**

**COMPONENTES DE LAS DIETAS**

En esta tabla se muestran los elementos que constituyen las diferentes dietas utilizadas por 100 gramos de dieta.

Todas las dietas son isocalóricas.

| RECAPTURA                        |        | LIBERACION BASAL                 |        | LIBERACION ESTIMULADA            |        |
|----------------------------------|--------|----------------------------------|--------|----------------------------------|--------|
| NaCl                             | 10 mM  | NaCl                             | 115 mM | NaCl                             | 65 mM  |
| KCl                              | 3 mM   | KCl                              | 3mM    | KCl                              | 53 mM  |
| MgCl                             | 1.2 mM | NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> | 1.2 mM | NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> | 1.2 mM |
| Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> | 1.2 mM | MgSO <sub>4</sub>                | 1.2 mM | MgSO <sub>4</sub>                | 1.2 mM |
| NaHCO <sub>3</sub>               | 25 mM  | NaHCO <sub>3</sub>               | 25 mM  | NaHCO <sub>3</sub>               | 25 mM  |
| CaCl <sub>2</sub>                | 1.5 mM | Glucosa                          | 10 mM  | Glucosa                          | 10 mM  |
| Glucosa                          | 10 mM  | CaCl <sub>2</sub>                | 1.5 mM | CaCl <sub>2</sub>                | 1.5 mM |

TABLA II

## COMPOSICION DE LOS MEDIOS PARA LIBERACION

En esta tabla se muestran los elementos que constituyen los diferentes medios utilizados para los ensayos de liberación de GABA. Los datos representan la molaridad de cada compuesto en el medio de recaptura, de liberación basal y estimulada.

# RESULTADOS

## Peso corporal

Los resultados obtenidos mostraron una disminución estadísticamente significativamente ( $p < 0.001$ ) en el peso corporal de los animales de los grupos restringidos en comparación con los del grupo T; esta reducción fue mas evidente conforme avanzó la edad. De esta manera, el porcentaje de disminución entre las diferentes edades en relación al grupo T, fueron; para el grupo RP entre 52 y 74%, para el grupo ML osciló del 57 al 86% y para el grupo MA fueron del 70 al 87.6%. Al comparar el grupo RP con el de MA y ML los porcentajes de disminución fueron de entre 12 y 52% contra MA y con respecto a ML entre 10 y 48% la diferencia entre el grupo MA y M-L fue desde un 9 hasta un 30% (Fig.8).

## Peso cerebral:

En relación al peso cerebral, los resultados mostraron que las diferencias entre los grupos estudiados no fueron tan elevados como las que se observaron en los pesos corporales, pero también fueron significativas. Sin embargo, estas diferencias existen y oscilaron entre 7 y 13% en el grupo RP respecto al grupo T, y de un 9 a un 32% en los grupos MA y ML en relación al grupo T. Al comparar los pesos cerebrales de los animales del grupo RP contra MA y ML, se observaron diferencias de un 2.2% para animales de 14 días, las cuales fueron incrementando conforme a la edad y llegaron a un 26% a la edad de 60 días. (Fig.9)

## Actividad de la GAD

### CORTEZA CEREBRAL:

En los animales alimentados con RP la actividad de la GAD se disminuyó significativamente ( $p < 0.01$ ) a los 14 y 21 días de edad mientras que a los 30 y 60 esta actividad se incrementó significativamente ( $p < 0.01$ ) con respecto al grupo T. (Fig.10)

En los animales alimentados con MA y ML la actividad de la GAD presentó una dinámica muy similar entre ellos y se observó una mayor actividad de GAD que la del grupo T y que la del grupo RP en todos los casos excepto a los 21 días en donde la actividad de GAD fue menor ( $p < 0.05$ ) en comparación con el grupo T (Fig.10). Sin embargo, la actividad de GAD de los grupos MA y ML siguió mayor que el de RP. En esta edad (21 días), la actividad de la GAD en el grupo de MA fue superior en un 12% respecto a la del grupo ML.

El patrón de actividad de la GAD que describen los diversos grupos durante el desarrollo, fué muy similar, pero con retraso de aproximadamente una semana en los grupos experimentales con relación al grupo T.

### HIPOCAMPO:

Los resultados mostraron que en los animales alimentados con RP la actividad de GAD se disminuyó significativamente ( $p < 0.01$ ) con respecto a T a los 14, 21 y 60 días de edad con un incremento del 17% a los 30 días (Fig.11), el comportamiento de este grupo con respecto a MA y ML fue significativamente menor ( $p < 0.01$ ) en todas las edades excepto a los 30 días en donde el valor es semejante respecto a RP (Fig.11).

En cuanto a los grupos MA y ML se comportaron de una forma similar y en todos los casos fueron significativamente más altos que el grupo T ( $p < 0.01$ ) excepto a los 21 días de edad posnatal donde el grupo ML presenta actividad similar a la del grupo T. Generalmente la actividad de la GAD en el grupo de MA fué mayor que el observado en el grupo de ML excepto a los 60 días donde la actividad de GAD fue más baja que ML.

## **Liberación Estimulada de GABA**

### **SOBREFLUJO.**

Con base a las diferencias que se observaron en la liberación basal de los grupos estudiados, la liberación real se calculó tomando en cuenta la basal correspondiente de cada grupo, esto permitió obtener el sobreflujo, valor que representa las diferencias reales en la liberación estimulada con mayor claridad, el sobreflujo se obtuvo de la fracción número seis, que es la fracción en la cual se obtiene la mayor liberación. (Fig.12,13)

### **CORTEZA CEREBRAL:**

Los resultados mostraron que la alimentación a base de maíz indujo una reducción importante en la liberación estimulada de GABA a los 14 y 21 días de edad ( $P < 0.01$ ) (Fig.12) comparado con el grupo T mientras que a las edades de 30 y 60 días se observó un incremento en la liberación, que llegó a ser muy similar a la liberación del grupo T.

Por lo que respecta a la liberación en el grupo RP, fue similar a la del grupo T a excepción de los 21 días en donde se redujo en un 38%.

En cuanto al grupo de ML la liberación fue muy similar al grupo MA, solo que a los 60 días de edad, mostró un incremento significativo ( $p < 0.05$ ) con respecto a los demás grupos. (Fig.12)

### **HIPOCAMPO**

Los resultados mostraron una dinámica muy homogénea en todas las edades estudiadas, así; a los 14, 21 y 30 días, en los grupos con alimentación RP, MA y ML se disminuyó significativamente ( $p < 0.01$ ) con respecto al grupo T, no así a los 60 días en donde la liberación se vio incrementada hasta alcanzar los valores del grupo T.

Por lo que respecta a las diferencia entre los grupos RP MA y ML unicamente resultó significancia estadística ( $p < 0.01$ ) a los 14 días en donde la liberación de MA fue menor en un 38% con respecto a ML y en un 50% comparado con RP.(Fig.13)

En las figuras se muestran tanto las liberaciones basales como las estimuladas, estas últimas sirvieron de base para la obtención del sobreflujo.

Es de hacer notar que la liberación basal fue menor en los grupos restringidos en relación al grupo T en ambas regiones, en todas las edades estudiadas, excepto en la Cx a los 21 días de edad donde ML fue más elevada. (Fig.14-17)

# PESOS CORPORALES

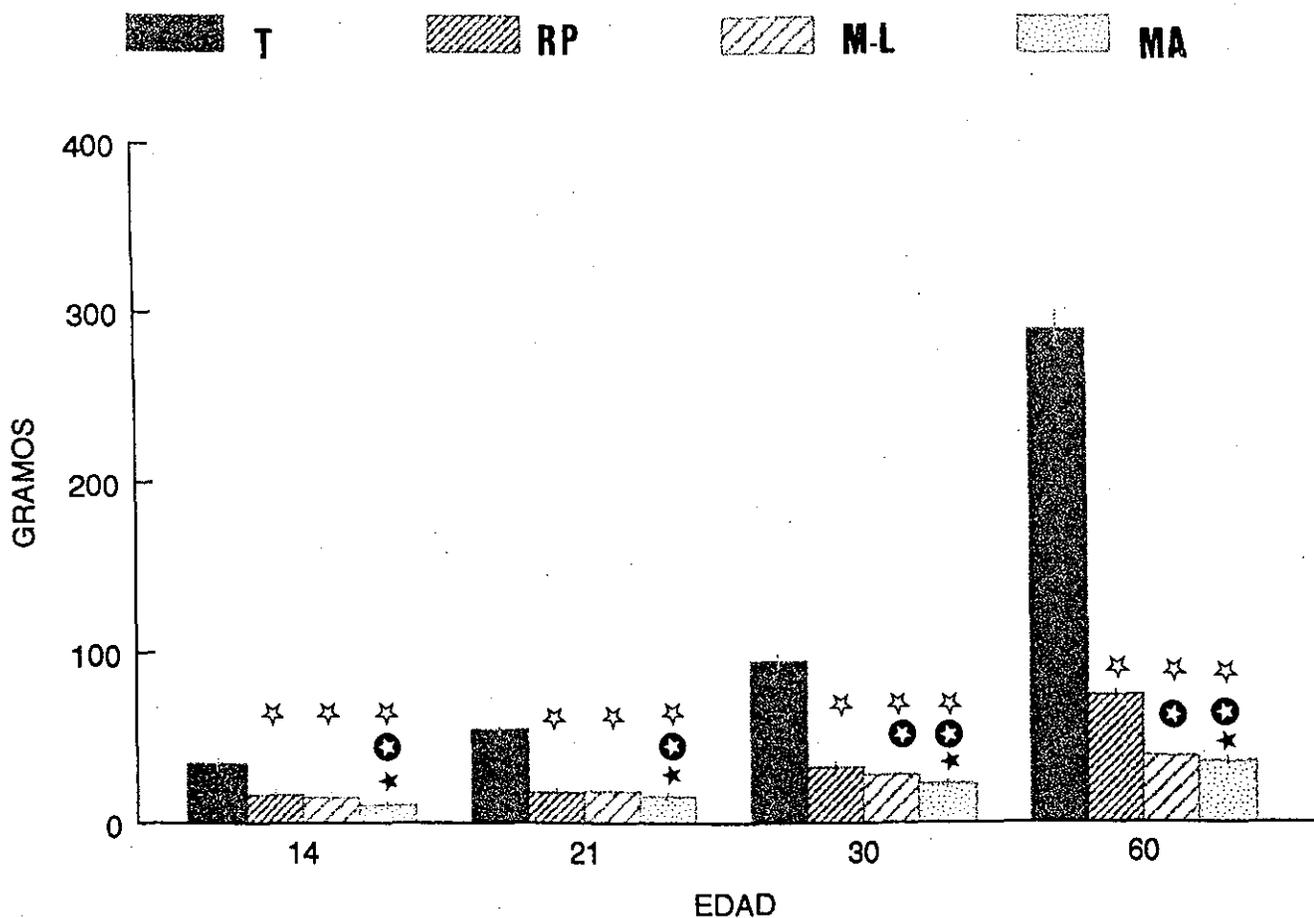


FIGURA No. 8

## COMPARACION DE PESOS CORPORALES

Los valores representan la media  $\pm$  la D.E., con una n= 8-12. La restricción proteica y de triptofano induce reducción en el peso corporal, el efecto es menor en los animales bajo restricción proteica que los alimentados con maíz.  $P < 0.05$  vs T ☆

vs RP ⊙

vs ML★

# PESOS CEREBRALES

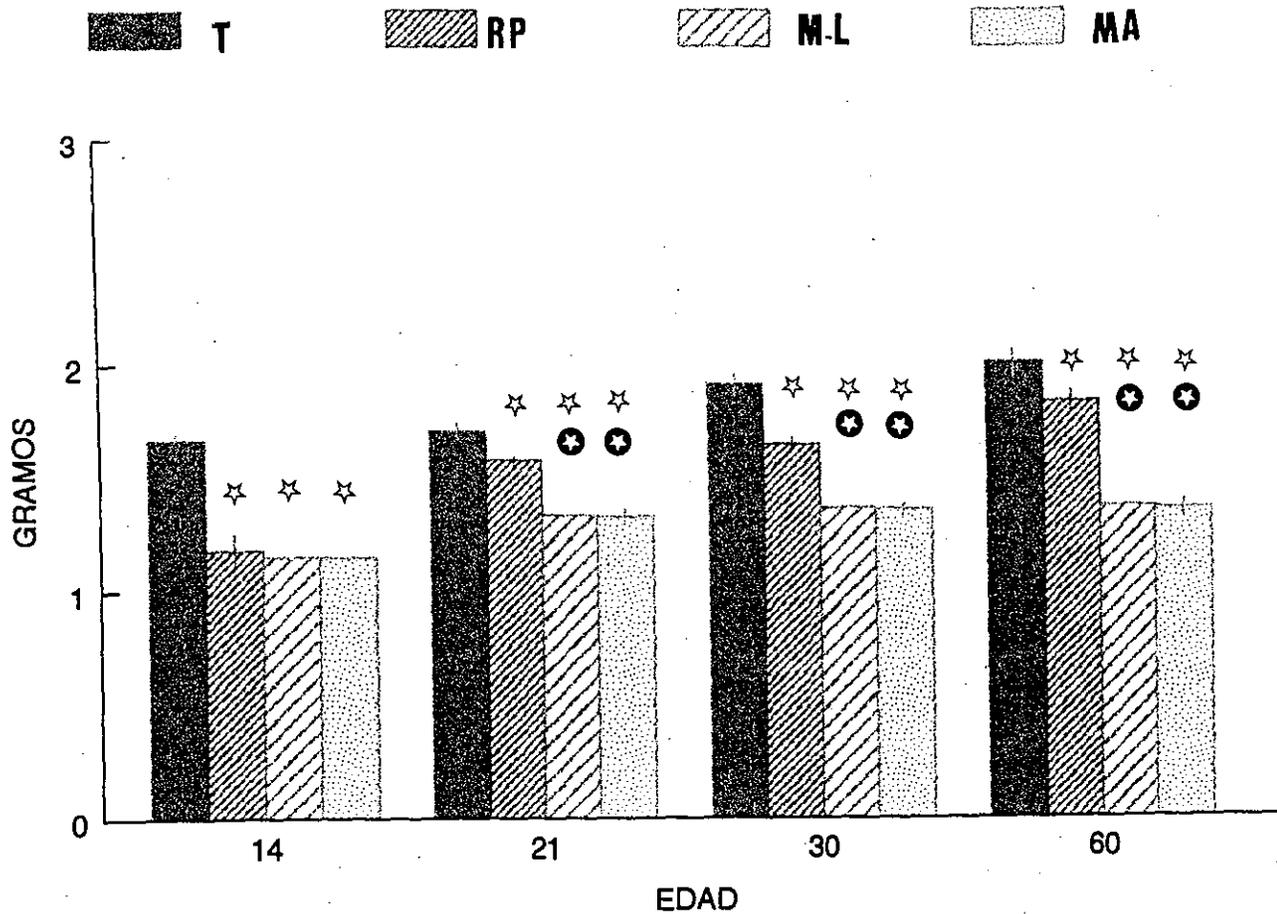


FIGURA No. 9

## COMPARACION DE PESOS CEREBRALES

Los valores representan la media  $\pm$  la D.E., con una n= 8-12. La restricción proteica y de triptofano induce reducción en el peso corporal, el efecto es menor en los animales bajo restricción proteica que los alimentados con maíz.  $P < 0.05$  vs T ☆

vs RP ⊙

# ACTIVIDAD DE LA GAD CORTEZA CEREBRAL

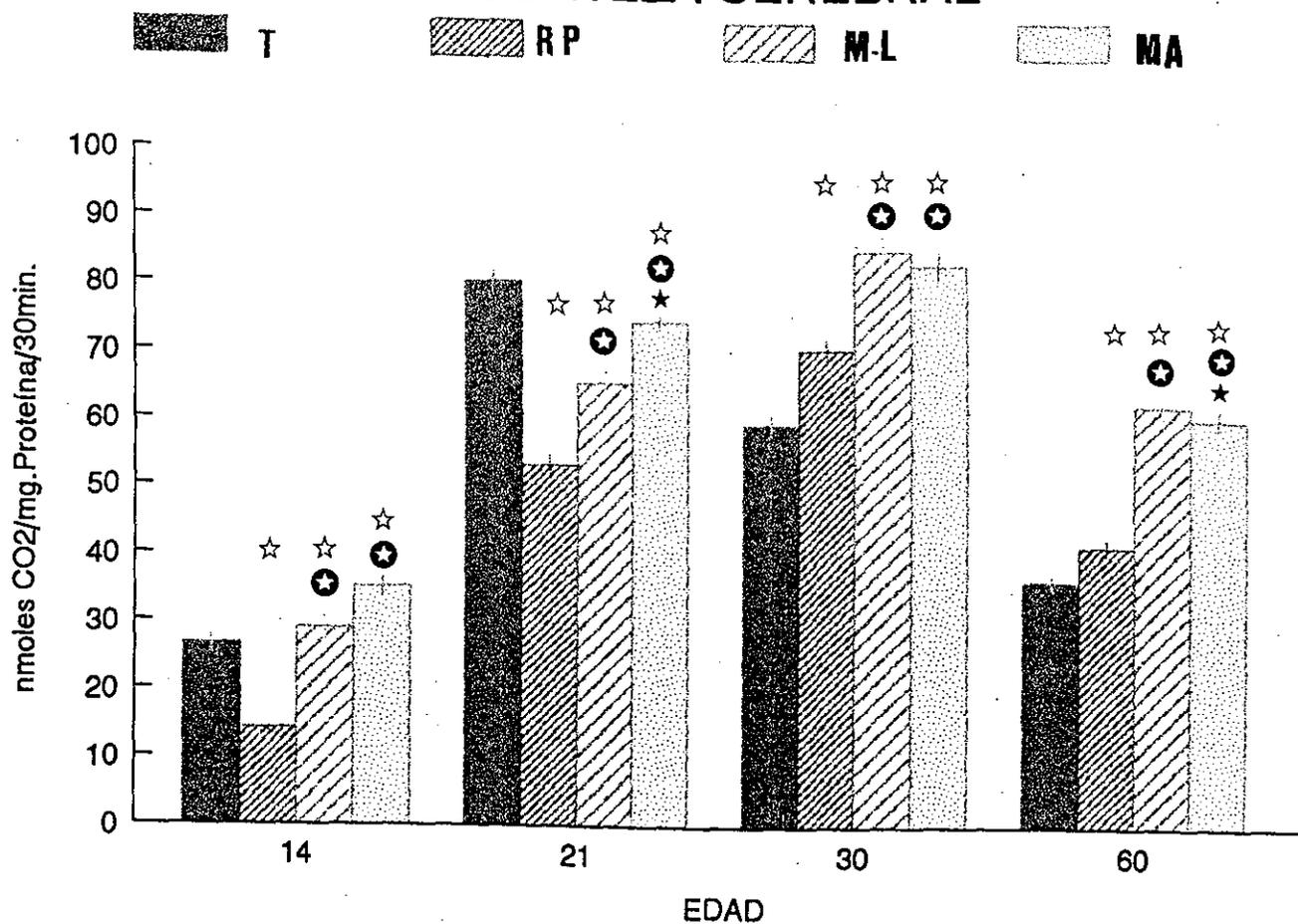


FIGURA No. 10

## ACTIVIDAD DE LA GAD EN CORTEZA CEREBRAL

Los valores representan la media  $\pm$  la D.E., con una  $n= 5-7$  experimentos. La restricción proteica induce disminución en la actividad de la GAD y la restricción de triptofano provoca un incremento en la actividad de esta enzima en las edades adultas.  $P<0.05$  vs T ☆

vs RP ⊕

vs M-L ★

# ACTIVIDAD DE LA GAD HIPOCAMPO

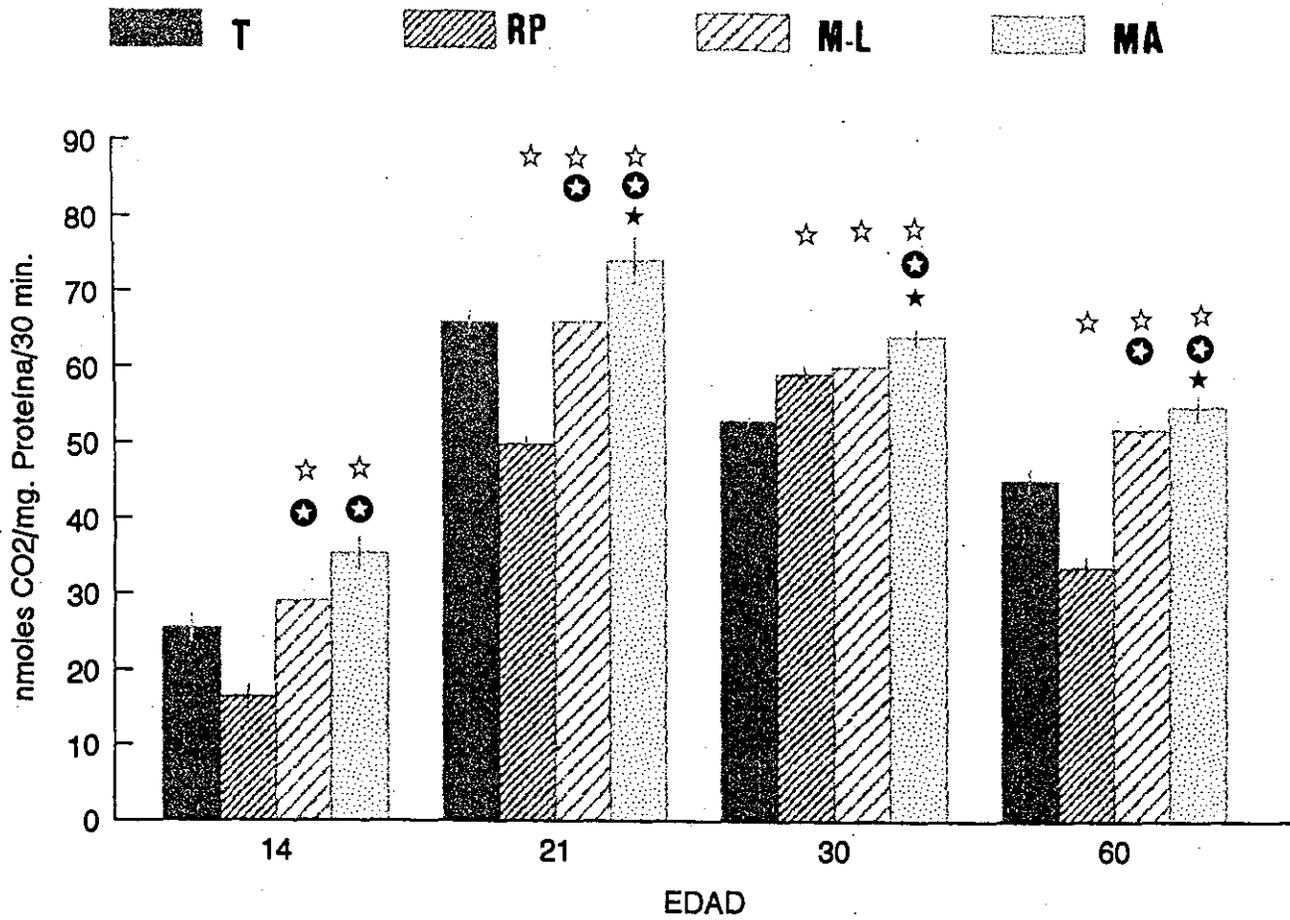


FIGURA No. 11

## ACTIVIDAD DE LA GAD EN HIPOCAMPO

Los valores representan la media  $\pm$  la D.E., con una n= 5-7 experimentos. La restricción proteica induce disminución en la actividad de la GAD a excepción de los 30 días y la restricción de triptofano provoca un incremento en la actividad.  $P < 0.05$  vs T ☆

vs RP ●

vs ML ★

# Liberación de Gaba Corteza Cerebral

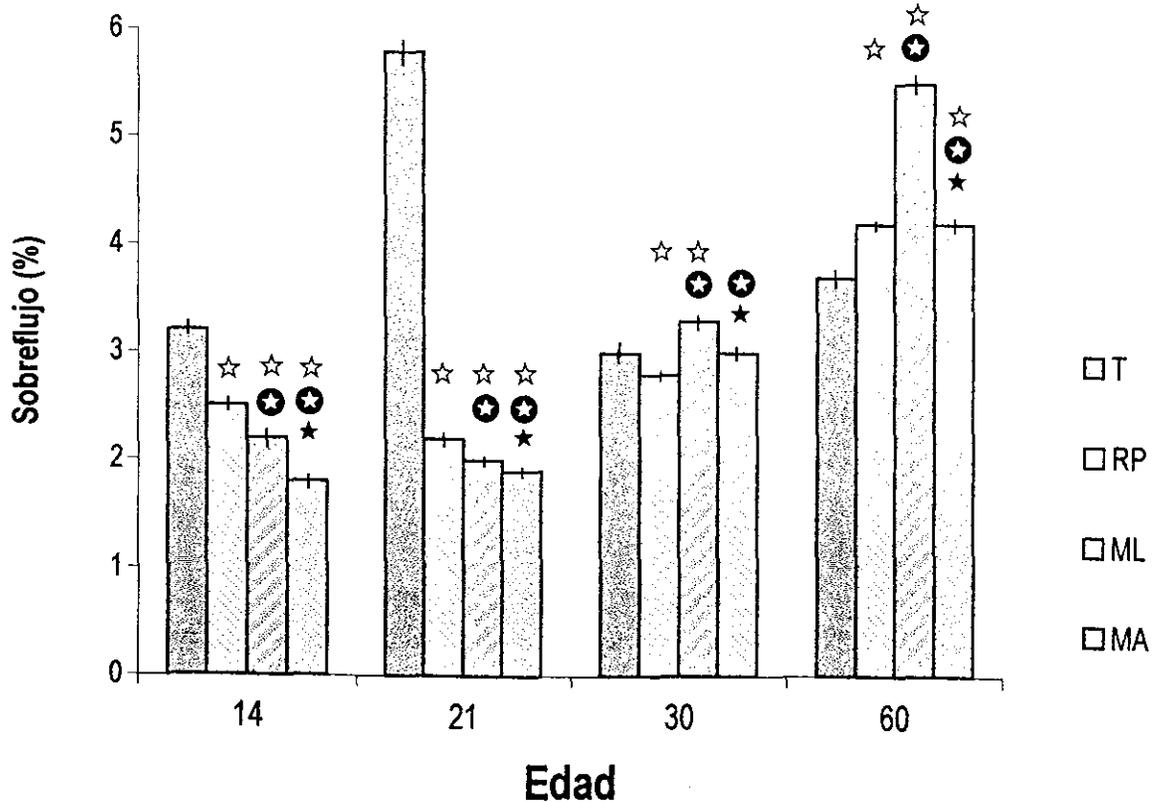


FIGURA No. 12

## LIBERACION DE GABA EN COTEZA CEREBRAL DURANTE EL DESARROLLO

Comparación entre la liberación por estimulación con K, para lo cual se tomó el valor promedio correspondiente de la fracción No. 6 y se grafica sobreflujo, considerando la liberación basal como cero. La abcisa representa la edad de los animales y la ordenada el porcentaje de liberación de GABA. La restricción proteica y/o de triptofano reduce la liberación de GABA, en las primeras etapas de la vida.

$P < 0.05$  vs T ☆

vs RP ⊕

vs ML★

# Liberación de Gaba Hipocampo

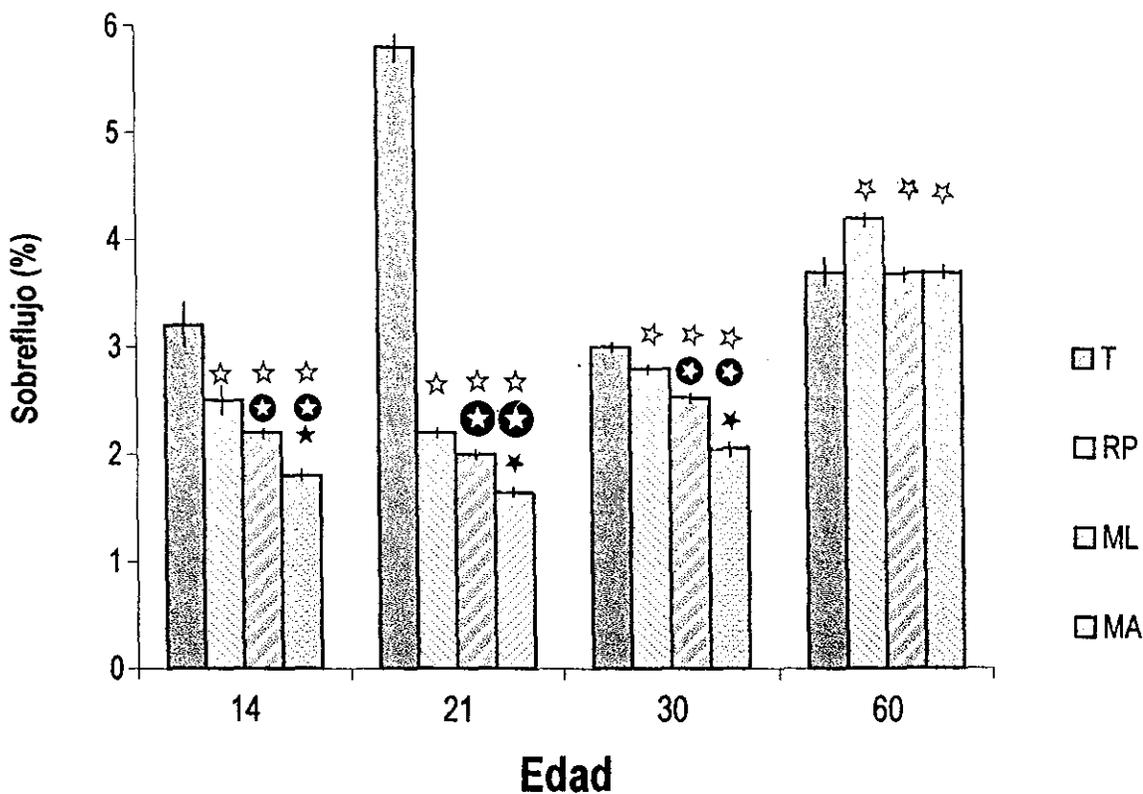


FIGURA No. 13

## LIBERACION DE GABA EN HIPOCAMPO DURANTE EL DESARROLLO

Comparación entre la liberación por estimulación con K, para lo cual se tomó el valor promedio correspondiente de la fracción No. 6 y se grafica sobreflujo, considerando la liberación basal como cero. La abcisa representa la edad de los animales y la ordenada el porcentaje de liberación de GABA. La restricción proteica y/o de triptofano reduce la liberación de GABA, hasta la edad de 60 días, en donde se observa una recuperación que alcanza los valores del grupo T.  $P < 0.05$  vs T ☆

vs RP ⊙

vs ML ☆

FIGURA No. 14

## LIBERACION DE GABA EN COTEZA CEREBRAL 14 y 21 DIAS

En esta grafica se muestra la liberación basal y estimulada de GABA en corteza cerebral a los 14 y 21 días de edad de los animales alimentados con una dieta Testigo (T), Restricción proteica (RP), Maíz-Lisina (M-L) y Maíz (M). La abcisa representa el número de fracción colectada y la ordenada el porcentaje de liberación de GABA. Los valores representan la media  $\pm$  la D.E., con una n=6-8 experimentos. Las células GABAérgicas son susceptibles a la restricción proteica y de triptofano, lo cual se manifiesta por una disminución en la liberación basal de GABA.  $P < 0.05$  vs RP, MA, M-L. A) Liberación basal a los 14 días de edad, B) Liberación estimulada a los 14 días de edad, C) Liberación basal a los 21 días de edad, D) Liberación estimulada a los 21 días.

# LIBERACION GABA EN CORTEZA CEREBRAL

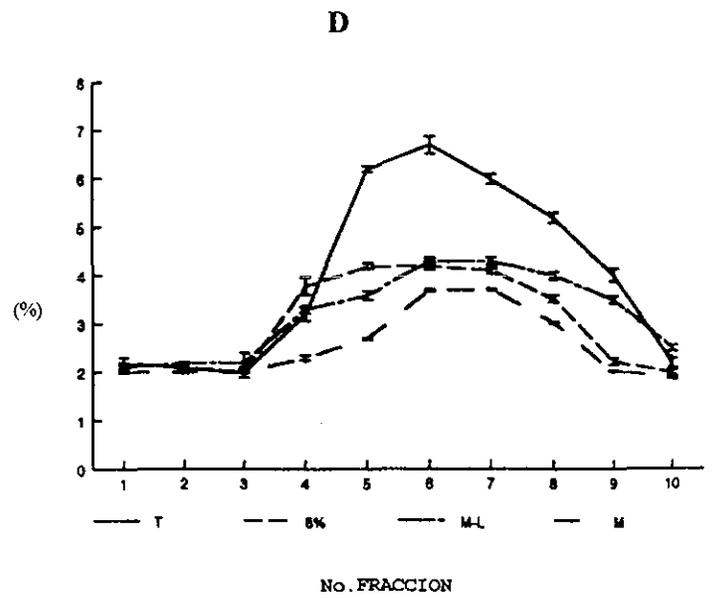
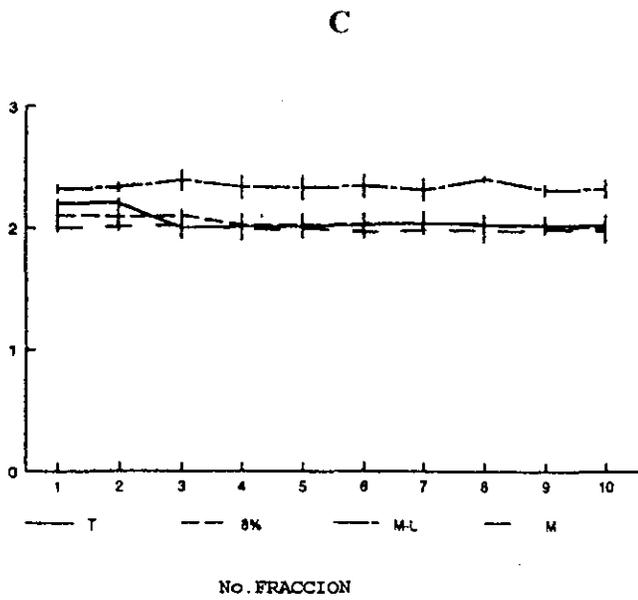
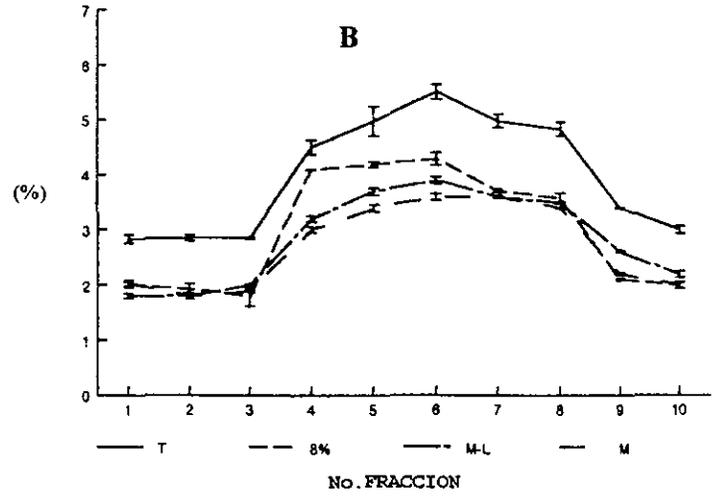
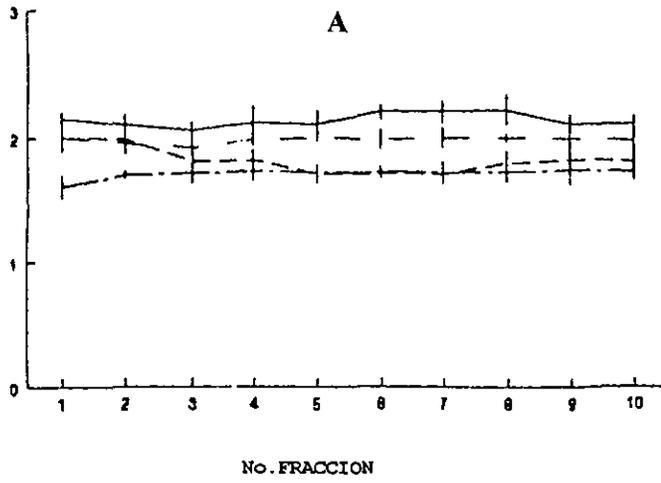


FIGURA No. 15

## LIBERACION DE GABA EN COTEZA CEREBRAL 30 y 60 DIAS

En esta grafica se muestra la liberación basal y estimulada de GABA en corteza cerebral a los 30 y 60 días de edad de los animales alimentados con una dieta Testigo (T), Restricción proteica (RP), Maíz-Lisina (M-L) y Maíz (M). La abcisa representa el número de fracción colectada y la ordenada el porcentaje de liberación de GABA. Los valores representan la media  $\pm$  la D.E., con una n=6-8 experimentos. Las células GABAérgicas son susceptibles a la restricción proteica y de triptofano, lo cual se manifiesta por una disminución en la liberación basal de GABA.  $P < 0.05$  vs RP, MA, M-L. A) Liberación basal a los 30 días de edad, B) Liberación estimulada a los 30 días de edad, C) Liberación basal a los 60 días de edad, D) Liberación estimulada a los 60 días.

# LIBERACION GABA EN CORTEZA CEREBRAL

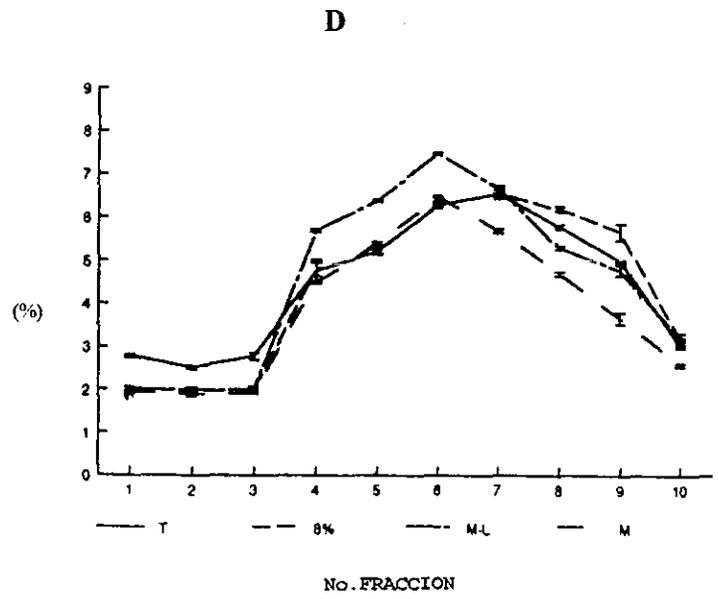
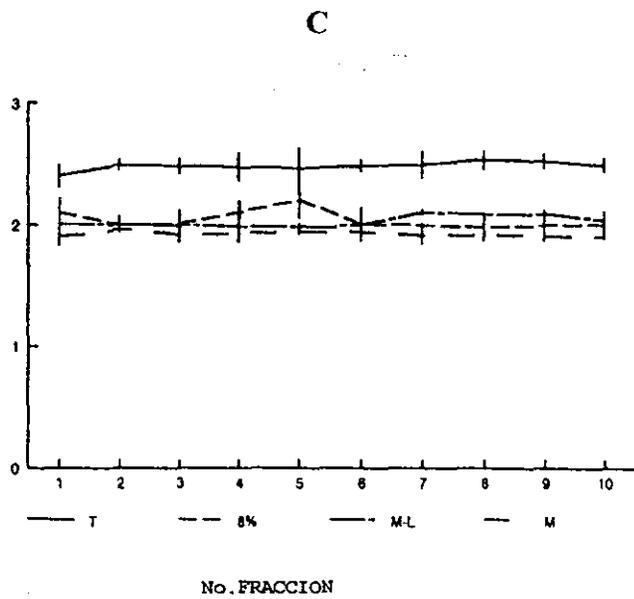
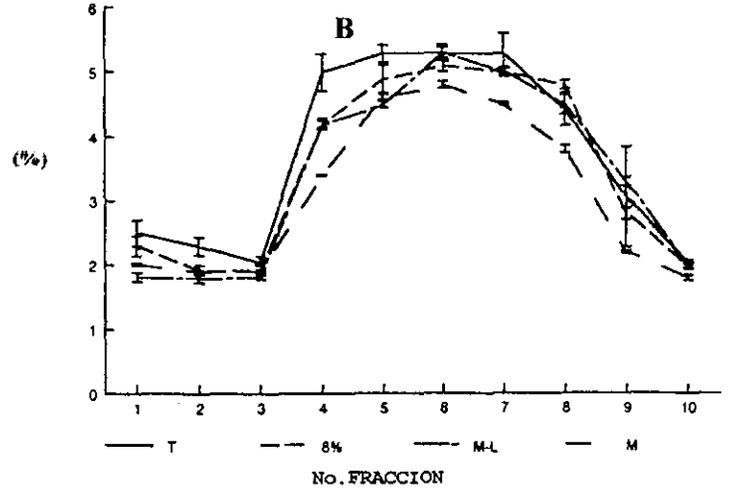
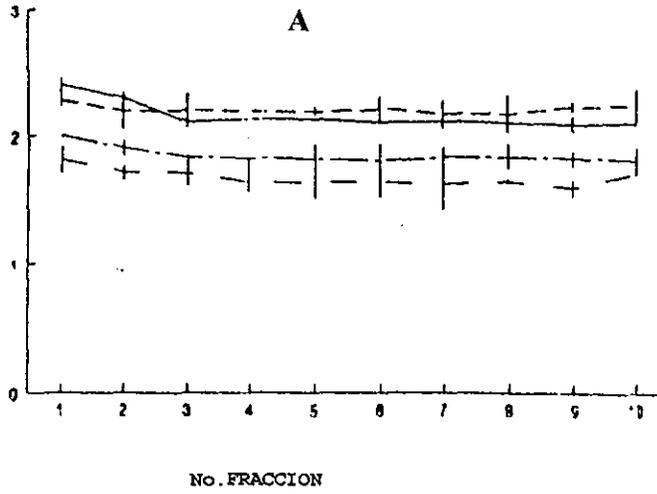


FIGURA No. 16

## LIBERACION DE GABA EN HIPOCAMPO 14 y 21 DIAS

En esta grafica se muestra la liberación basal y estimulada de GABA en Hipocampo a los 14 y 21 días de edad de los animales alimentados con una dieta Testigo (T), Restricción proteica (RP), Maíz-Lisina (M-L) y Maíz (M). La abcisa representa el número de fracción colectada y la ordenada el porcentaje de liberación de GABA. Los valores representan la media  $\pm$  la D.E., con una n=6-8 experimentos. Las células GABAérgicas son susceptibles a la restricción proteica y de triptofano, lo cual se manifiesta por una disminución en la liberación basal de GABA.  $P < 0.05$  vs RP, MA, M-L. A) Liberación basal a los 14 días de edad, B) Liberación estimulada a los 14 días de edad, C) Liberación basal a los 21 días de edad, D) Liberación estimulada a los 21 días.

# LIBERACION GABA EN HIPOCAMPO

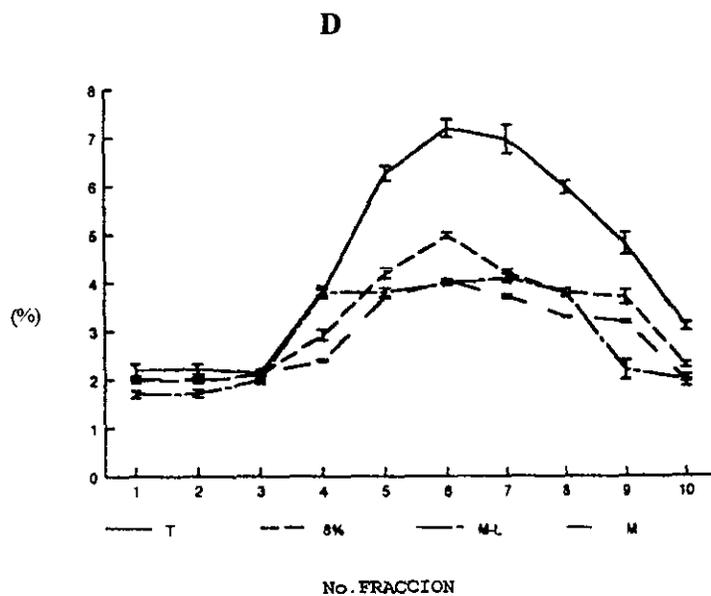
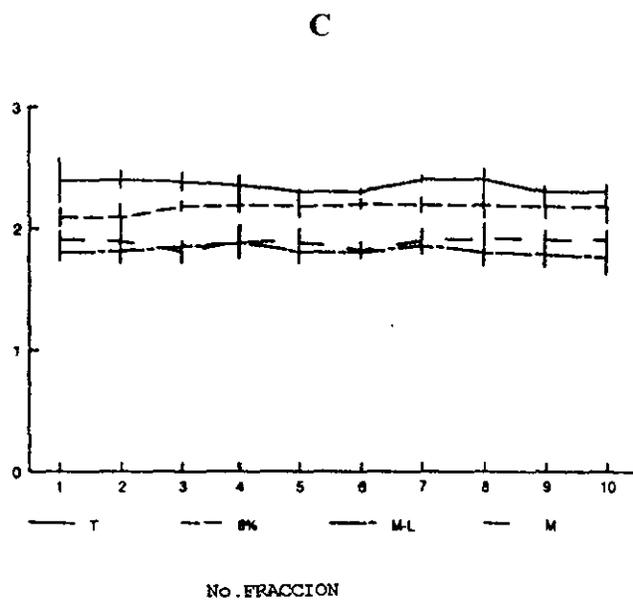
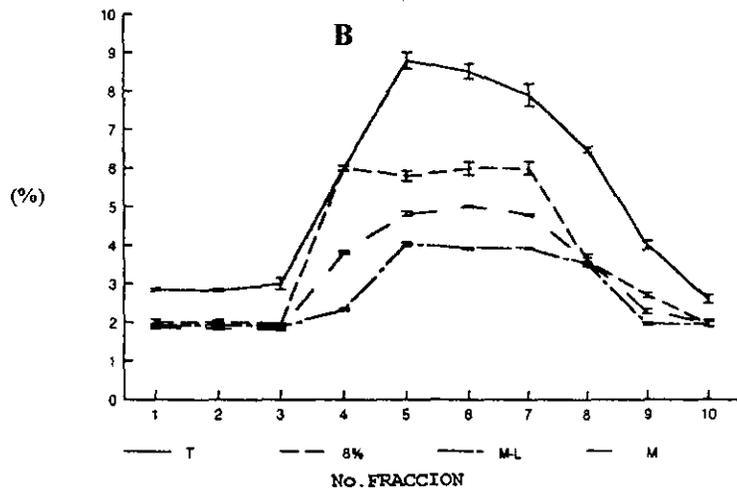
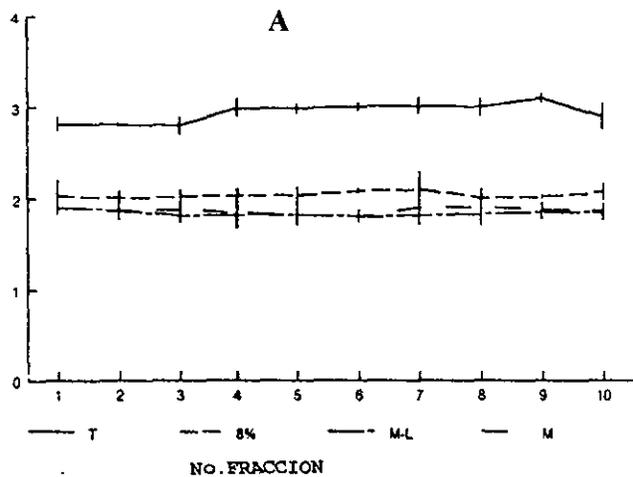
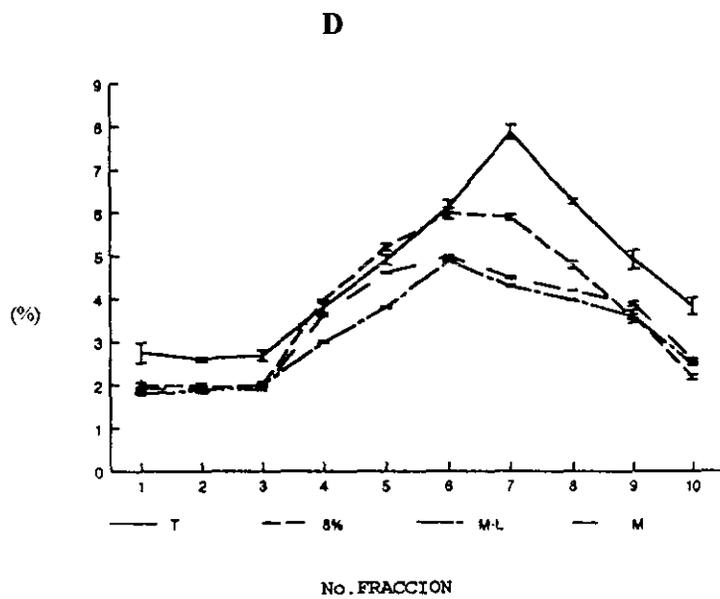
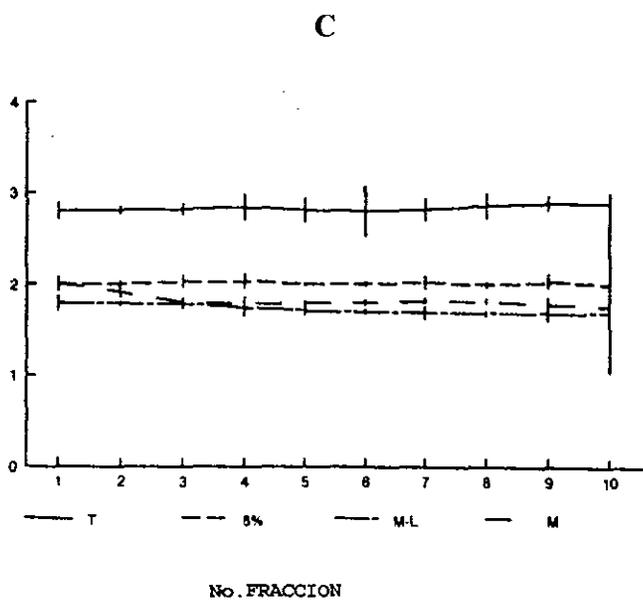
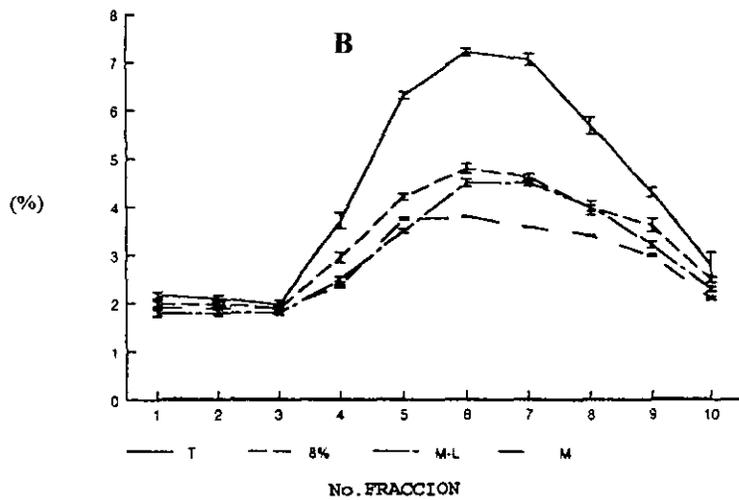
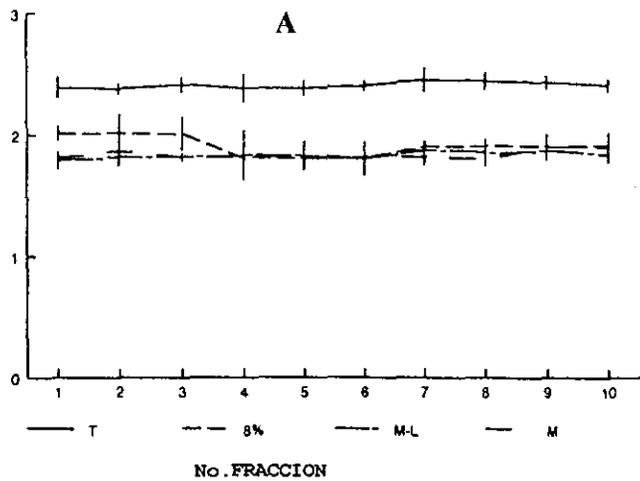


FIGURA No. 17

## LIBERACION DE GABA EN HIPOCAMPO 30 y 60 DIAS

En esta grafica se muestra la liberación basal y estimulada de GABA en Hipocampo a los 30 y 60 días de edad de los animales alimentados con una dieta Testigo (T), Restricción proteica (RP), Maíz-Lisina (M-L) y Maíz (M). La abcisa representa el número de fracción colectada y la ordenada el porcentaje de liberación de GABA. Los valores representan la media  $\pm$  la D.E., con una n=6-8 experimentos. Las células GABAérgicas son susceptibles a la restricción proteica y de triptofano, lo cual se manifiesta por una disminución en la liberación basal de GABA.  $P < 0.05$  vs RP, MA, M-L. A) Liberación basal a los 30 días de edad, B) Liberación estimulada a los 30 días de edad, C) Liberación basal a los 60 días de edad, D) Liberación estimulada a los 60 días.

# LIBERACION GABA EN HIPOCAMPO



## DISCUSION

El progreso en el desarrollo ontogenico de los diversos organismos puede seguirse a través de los parámetros somatométricos, aunque estos no permitan evaluar completamente los aspectos funcionales. Así, tanto el peso como la talla pueden indicar los efectos de una buena o mala alimentación, de acuerdo a lo establecido por diversos autores que observaron los efectos de la desnutrición a través del desarrollo. (9, 101-104)

Los resultados de nuestro trabajo, así como aquellos obtenidos por otros autores (105-107) han mostrado que la restricción de alimentos al igual que de proteínas ó de cualquier nutriente en particular, disminuye en algún grado el peso y la talla (84). Este hecho es una respuesta a la restricción proteica y/o de aquellos AA considerados como indispensables (Lis, Val, Met, Arg, Tp, Iso, Leu, Fen, Treo, Hist) para una adecuada síntesis de proteínas musculares, enzimas, neurotransmisores etc. (56, 108). El requerimiento mínimo de proteínas para la rata es de 12% (109), en nuestro caso solo se administró el 8% de proteína, por lo que se elevó en un 20% el contenido de carbohidratos de la dieta (89), mismos que producen una estimulación en la liberación de insulina, que favorece la síntesis de proteínas y la captación de AA dentro del músculo, de tal manera que cuando disminuyen los AA en suero, el organismo tiende a obtenerlos de la degradación del tejido corporal (86), lo que induce a un retardo en el crecimiento de ratas jóvenes. Se conoce que en las etapas tempranas existe una mayor vulnerabilidad a la malnutrición, (110) debido a que se requiere de un aporte importante de proteínas para su desarrollo que soporte el intenso crecimiento somático, por consiguiente la desnutrición ocasionará alteraciones en el ritmo de desarrollo, que se manifestará por una disminución en la ganancia de peso corporal, el cual no se recuperara aún en etapa adulta, como lo que se observa en los grupos restringidos de este estudio. (111, 112)

Por otro lado, la disminución de los AA Lis y Tp en la alimentación a base de maíz incrementan la disminución en el peso corporal, a pesar de que estudios recientes han demostrado que la Lis, segundo aminoácido limitante en la proteína del maíz, aporta 25 mg/g. de proteína en la dieta, cantidad ligeramente superior al requerimiento mínimo de la rata (21 mg/g. de proteína en la dieta), (96) no se considera un aminoácido determinante para el desarrollo corporal (108, 113) mientras que, el Tp que es el primer aminoácido limitante en la proteína del maíz (96), ve limitado su paso a través de barrera hematoencefálica, por la

competencia con leucina, (105, 108, 113) aminoácido neutro que se encuentra en grandes cantidades en este cereal (125mg/g. de proteína en la dieta), cuando el requerimiento en la rata es de 35mg/g. de proteína en la dieta, se considera también que el Tp es el aminoácido mas limitante en la síntesis no solo de proteínas (86, 92) sino también en la de niacina y 5-HT, además de que estimula la liberación de la hormona de crecimiento y la síntesis de proteínas en hígado. (56, 86, 114)

Estudios preliminares con este modelo de desnutrición han demostrado una reducción en la cantidad de proteínas totales y en los contenidos de ácidos ribonucleicos en algunas regiones del SNC, lo que sugiere que bajo estas condiciones se produce una reducción en la síntesis proteica. (56, 84, 86, 112) Algunos autores que han realizado estudios en ratas alimentadas con tortilla sugieren que este tipo de desnutrición produce además, cambios que hacen al cerebro más susceptible al efecto de algunas drogas, convulsivantes y compuestos alucinogenos (115-118)

Morgan y col. (1983) definen que la etapa del desarrollo es un período crítico en el cual el SNC es especialmente vulnerable al efecto o falta de diversos agentes, entre ellos los nutrientes, (119, 120, 121) principalmente desde la mitad de la gestación hasta el tiempo en que finaliza la formación de contactos sinápticos, aunque el feto toma del organismo materno todos los nutrientes que necesita, cuando las hembras estan en estado gestante y sufren restricción nutricional, el desarrollo fetal y/o su sobrevivencia se ven afectadas, esto en particular se ha demostrado en la rata en donde la restricción de proteínas en la dieta materna durante el tiempo de la implantación del feto, resulta en una reabsorción del mismo. Parece ser que una transferencia placentaria apropiada de nutrimentos al feto es el paso clave para su desarrollo normal. (69, 112, 122-124)

La disminución del peso cerebral observada en este trabajo, confirma los datos encontrados con anterioridad, por otros autores bajo la utilización de diversos modelos de desnutrición, (71, 78, 84, 93) trabajos realizados con tinción de Golgi han mostrado que la restricción de nutrimentos indujo una reducción significativa en el número de células, y diversos cambios morfológicos en diferentes áreas del cerebro, así como una disminución en su tamaño, densidad de espinas dendríticas y la complejidad de arborización dendrítica (125-127). Sin embargo se ha observado que el peso encefálico disminuye en menor proporción con la restricción de proteínas y/o Tp en la dieta en relación con la disminución de pesos corporales, esto nos indica que el cerebro es una estructura que se protege a la acción de cualquier daño (70-72), se ha establecido que este órgano es

favorecido nutritiva y metabólicamente de una forma primordial, por la existencia de mecanismos homeostáticos, que lo protegen contra las fluctuaciones en la disponibilidad de nutrientes esenciales (119), lo que puede ser interpretado como evidencia de un fenómeno de plasticidad, aún cuando el animal sea sometido a desnutrición severa (128, 129). Sin embargo, es posible que el daño infringido por la desnutrición pueda producir un tipo de trastorno permanente en el cerebro, según la etapa de la vida en que ésta se aplique, de tal manera que afecte tanto la funcionalidad como el comportamiento (130).

Existen cambios en la neuroquímica cerebral de sujetos denutridos (131) que afectan la síntesis, liberación y/o captación de diversos neurotransmisores que dependen de un precursor, que pueda ser una aminoácido indispensable, como son: DA, NA y 5-HT, así se ha establecido que la concentración de esta última depende tanto del contenido de proteína como de Tp en la dieta. (36, 49) Estudios realizados en nuestro laboratorio así como los de Morgane y los realizados por diversos autores (3, 47, 50, 65, 93) han determinado una elevación en la concentración de 5-HT cerebral, en animales sujetos a restricción proteica y establecen que dicho incremento se manifiesta por un aumento en la concentración de Tp en el plasma, lo que sugiere que existe una activación en la síntesis del sistema 5-HTérgico ante el estrés nutricional y por ello un aumento en la concentración de 5-HT, mientras que con la restricción de Tp inducida por una dieta a base de maíz la concentración de 5-HT disminuye. (87, 93, 133) Las fluctuaciones en la concentración de este neurotransmisor son importantes, ya que además de actuar en los procesos de sueño y vigilia, sensibilidad al dolor, locomoción, regulación hormonal, (86, 88, 94, 103) también actúa como modulador de diversos sistemas de neurotransmisión como el glutamatérgico, colinérgico y GABAérgico entre otros (4-6), cuya interacción ejerce un efecto modulador sobre el factor neurotrófico del sistema nervioso, (134, 135) el cual a su vez interviene en la regulación del sistema 5-HTérgico, mientras que la 5-HT participa en su expresión, así el aumento observado de este neurotransmisor en los animales sujetos a restricción proteica, probablemente aumenta la proliferación celular, mientras que en la dieta de maíz al disminuir la concentración de 5-HT, el número de células se verá disminuido. Algunos trabajos mencionan como regulador del sistema 5-HTérgico al factor neurotrófico del sistema nervioso, ya que a este se le involucra en la diferenciación y dado que la 5-HT influye en su expresión, es de esperarse que con una elevación de 5-HT como la observada con la dieta RP, se incremente la proliferación celular y que con la dieta de MA suceda el efecto contrario. (66, 134)

Del mismo modo ha sido observado que la administración de una dieta de restricción proteica ó de algunos amino ácidos indispensables afecta los niveles cerebrales de 5-HT y altera la densidad de las células GABAérgicas (11, 12) y que la aplicación de este neurotransmisor induce estimulación prolongada de las mismas (136). Algunos trabajos, en donde se ha utilizado al maíz para la alimentación de los animales de experimentación demuestran como las células de tipo inhibidor se encuentran disminuídas y este hecho se le atribuye a la ausencia de Tp en la dieta, mismo que es considerado como un factor trófico para las interneuronas inhibitoras. (11, 12)

Por otro lado, Munaro y col. (14) han demostrado la interacción entre el sistema GABAérgico y 5-HTérgico, que permite suponer la existencia de un mecanismo regulador entre ambos sistemas (62, 138), al mostrar que la lesión del núcleo dorsal del rafé disminuyó la actividad de GAD en hipotálamo y área preóptica y que por el contrario, la estimulación electroquímica de estos núcleos incrementa la actividad de la enzima, a pesar de que dicha actividad en cerebro, parece estar regulada a través de diversos mecanismos, entre los que se encuentran, la interconversión Apo-holo-enzima y cambios en la dinámica metabólica o vía de síntesis durante el desarrollo.(99, 140)

Los resultados del presente trabajo muestran una disminución de la actividad de la GAD a los 14 y 21 días en los animales sujetos a restricción proteica, donde se ha demostrado un incremento en los niveles de 5-HT (3, 49-52) y un retardo en la maduración, lo que puede relacionarse con el hecho de que el cerebro inmaduro mantiene niveles elevados de GABA a pesar de una actividad baja de la GAD, que indicaría por un lado, actividad baja neuronal, alteraciones en la degradación de la enzima ó que ésta no opera a su máxima actividad (99). Sin embargo, en los animales alimentados con maíz, que inducen una reducción de 5-HT (133), la actividad de la enzima es elevada en ambas regiones y todas las edades estudiadas, lo que podría indicar un efecto compensatorio en la formación de la enzima para la utilización del sustrato correspondiente.

Por otro lado se ha estudiado el comportamiento de otras enzimas que participan en la síntesis de neurotransmisores, bajo condiciones de desnutrición, como el caso de la TpOH, observandose cambios en la especificidad y elevación ó disminución de la afinidad por el ligando que se ha llegado a proponer la existencia de modificaciones conformacionales de las enzimas que redundarían en cambios en su actividad.(51, 52, 73, 124)

Se ha descrito que la 5-HT modula la neurotransmisión inhibitoria en el Hp, ya que la activación de los receptores 5-HT<sub>2A</sub> (62, 141) sobre interneuronas GABAérgicas aumentan la liberación de GABA e incrementan de esta manera el control inhibitorio de las células granulares, por tanto la 5-HT ejerce un control global sobre Hp vía modulación local de interneuronas inhibitorias (61, 62). Los receptores 5-HT<sub>2A</sub> se expresan en niveles relativamente elevados sobre las interneuronas GABAérgicas y se cree que la activación de estos incrementa la liberación espontánea de GABA. (134)

La presencia de receptores 5-HT<sub>3</sub> en células GABAérgicas puede indicar que la 5-HT es un regulador de la neurotransmisión mediada por GABA en Telencéfalo (138) y que ejercen una influencia inhibitoria sobre las respuestas reflejas del corazón probablemente a través de la activación del sistema GABAérgico local. (142)

Los experimentos realizados por Morales y col. (1996) (143) indican que más del 90% de las células de neocórtex y células piramidales del área CA1 en Hp, que expresan receptores 5-HT<sub>3</sub> son GABAérgicas y sugieren que la 5-HT puede modular la excitabilidad de las neuronas, a través de la activación de los receptores 5-HT<sub>3</sub>, y que las respuestas de las interneuronas depende de potenciales de membrana que incrementan la despolarización de las células, permitiendo la entrada de 5-HT la cual puede simultáneamente modular la salida de GABA y participar en la regulación inhibitoria del cerebro, independientemente de la cantidad de enzima sintetizadora del GABA. (135, 136, 138, 142)

En los experimentos de liberación de GABA realizados en este trabajo se observó como la liberación basal de los grupos restringidos fue menor que la observada en el grupo T, durante las etapas estudiadas y en ambas regiones, lo anterior sugiere la existencia de un número menor de células, ya que éste es directamente proporcional a la liberación basal, lo que concuerda con los resultados encontrados por otros autores, quienes se enfocaron al análisis del efecto de la restricción proteica en ratas en etapa pre y postnatal sobre la densidad de las células GABAérgicas y observaron una disminución significativa en la densidad de estas células. (4, 5)

De esta manera el menor sobreflujo de GABA observado en los grupos restringidos durante las primeras edades estudiadas en el presente trabajo, podría estar relacionado con el hecho de que en las primeras

etapas de la vida (14 días), las neuronas tienen una cromatina muy condensada (núcleos hipercromáticos), que sugiere que las células no han alcanzado su madurez y por lo tanto no pueden ejercer sus funciones (121), aunque el incremento en el sobreflujo observado a la edad de 60 días pudiera ser explicado por los datos encontrados en algunos trabajos (90, 120) en los que se muestra que la mayoría de eventos funcionales en los organismos bajo desnutrición aparecen en etapas posteriores, al igual que los resultados reportados en este trabajo, en donde el grupo T mostró un sobreflujo incrementado a los 21 días de edad en Cx mientras que en los grupos restringidos, esta elevación se encontró a los 60 días, aún en los animales con MA, los cuales mostraron menor liberación de GABA que los alimentados con dieta RP por lo que se hace notar que en una dieta con menor concentración de 5-HT la liberación estimulada de GABA se ve más afectada que en los animales alimentados con una dieta que induce elevaciones en la concentración de ésta, estas alteraciones se hacen más evidentes en Hp que en Cx, hecho que concuerda con lo descrito por diversos autores (64) que han encontrado que existe un efecto por desnutrición diferente en cada región, ya que el mismo modelo de desnutrición aplicado muestra diferencias en el tipo de cambios morfológicos en cada una de ellas al observar diferencias en la composición celular resultante según el área de estudio (64, 90, 125). Por otro lado existen mecanismos de plasticidad cerebral, los cuales tienden a mantener la estabilidad del sistema ya que tanto en Cx como en Hp, a la edad de 60 días los valores de la liberación tienden a alcanzar lo encontrado en animales del grupo T e incluso para la Cx este valor es mayor en los grupos restringidos, parece ser, que a menor número de células el sistema trabaja al máximo para asegurar la cantidad de neurotransmisor necesario, ya que algunos trabajos (145) muestran que el espesor de la Cx se ve severamente afectado aún más que cualquier otra región del SNC ante la restricción de AA y proteínas realizados, principalmente a los 14 y 21 días de edad, donde nuestro trabajo mostró disminución en el sobreflujo. (90)

La disminución en la liberación de GABA, puede alterar la reactividad emocional con decremento en la capacidad de aprendizaje, lo cual se apoya con los datos obtenidos en trabajos con animales bajo restricción de Tp que presentan hiperactividad, cambios en la conducta, disminución en el aprendizaje, deficiencia en la memoria y desórdenes de atención (40, 80, 93). La reducción en la liberación de GABA podría estar en relación con el síndrome de hiperactividad, el cual involucra posiblemente un decremento en la respuesta a la inhibición.

## CONCLUSIONES

- Tanto la restricción proteica como la de Tp (alimentación a base de maíz) reducen significativamente los pesos corporal y cerebral.
- La restricción proteica induce un incremento en la actividad de la GAD.
- La restricción de Tp induce un incremento en la actividad de GAD.
- La liberación de GABA se reduce significativamente ante la restricción de proteínas y/o Tp en la dieta principalmente en Hp.
- Las células GABAérgicas son susceptibles a la restricción de proteínas y Tp, lo cual se manifiesta por una disminución en la liberación basal.
- La disponibilidad de 5-HT cerebral modifica el patrón normal de la actividad de la GAD y la liberación de GABA en las diferentes etapas del desarrollo postnatal.

## BIBLIOGRAFIA:

- 1) Bruce, A., D. Bray, J. Lewis y J.D. Watson. 1986. *Biología Molecular de la Celula*. Ed. Trillas
- 2) Pasantes, H., J. Sánchez y Tapia, R. 1994. *Neurobiología Celular*. Ed. Fondo de Cultura Económica, México. pp. 167, 308-326.
- 3) Poirier, J.L., Sing, P., Sourkes, T.R., y Borchert, R. 1967. Effect of Amine Precursor on the Concentration of Strial Dopamine and serotonin in Cats with and without Unilateral Brain Stem. *Brain Res.*, 6: 654-666.
- 4) Lee, R.S., Strahlendorf, H.K., y Strahlendorf, J.C. 1985. Enhanced Sensitivity of Cerebellar Purkinje Cells to Ionotoporetically-Applied Serotonin in Thiamine Deficiency. *Brain Res.* 327: 249-258.
- 5) Afione S., Duvilanski B., Selicovich A., Lasaga M., Díaz M., Debeljuk L. 1996. Effects of Serotonin on the Hypothalamic-Pituitary GABAergic System. *Brain Res. Bull.* 25:245-249.
- 6) Munhyang L., Strahlendorf, J.C., Strahlendorf, H.K. 1986. Modulatory Action of Serotonin on Glutamate-Induced Excitation of Cerebellar Purkinje Cells. *Brain Res.* 361: 107-113.
- 7) Gross-Isseroff, R., Salama, D., Israeli, M. Y Biegon, A. 1990. Autoradiographic Analysis of Age-dependent Changes in Serotonin in 5-HT<sub>2</sub> Receptor of the Human Brain Postmortem. *Brain Res.* 519: 223-7.
- 8) McEntee, W.J. y Crook, T.H. 1991. Serotonin, Memory and the Aging Brain. *Psychopharmacology.* 103: 143-9.
- 9) Del Angel A., y Feria, V. A. 1982. Effects of the Protein Restriction on Growth of Adult and Developing Rat (First and Second Generation). *Arch. Invest. Med. (Mex.)*, 13: 43-49.

- 10) L.E. Abel. 1990. Effects of Paternal and Maternal Undernutrition on Growth of Offspring in Rats Growth, Development & Aging. 54: 125-129.
- 11) Orozco, S., Feria, A. y Del Angel A.R. 1995. Efecto de una Dieta a Base de Maíz sobre el Desarrollo de la Inervación GABAérgica de la Corteza Somatosensorial de la Rata. Estudio Inmunoquímico. Memorias XXXVII Congreso Nacional de Ciencias Fisiológicas 032.
- 12) González-Maciél, A. Díaz-Cintra, S., Morales, M.A. 1995. La Desnutrición Protéica afecta la Densidad de Células GABAérgicas del Hipocampo y Giro Dentado de la Rata. Memorias del XXXVII Congreso Nacional de Ciencias Fisiológicas 039.
- 13) Belin, M.F., Favre, M.M., Reboul, A., Didier, Bazes, M., Ehret, M., Maitre, M., Tardy, M. 1991. Primary dissociated Cell Culture of Embryonic Rat Metencephalon; Presence of GABA in Serotonergic Neurons. Neurosci. Lett. 125: 101-6.
- 14) Munaro, N.I. Morello, H. and Taleisnik, S. 1991. Glutamic Acid Descarboxylase Activity of the Preoptic Area and Hypothalamus is Influenced by the Serotonergic System. J. Neurochem. 57: 1302-06.
- 15) Wurtman, R. J. and Wurtman J. 1977. Nutrition and the Brain. Reven. Press. Book. Vol. 2: 148-213.
- 16) López-Antúnez, L. 1983. Anatomía Funcional del Sistema Nervioso, Ed. LIMUSA, 1ª Ed., México, pp.433-465.
- 17) Cooper, J.R., Bloom, F.E., Roth, R.H. 1984. Las Bases Bioquímicas de la Neurofarmacología, Ed. El Manual Moderno, 4ª Ed. México, pp. 175-201.
- 18) Tapia, R. 1983. Acido  $\gamma$ -aminobutírico: en Aminoácidos y péptidos en la integración del sistema nervioso, Pasantes-Morales, H. y Aréchiga, H., eds., UNAM, México. pp. 57-82.

- 19) Baxter, C.F., y Roberts, E. 1959. Elevation of Gamma-aminobutyric Acid in Rat Brain with Hydroxylamine, Proc. Soc. Exp. Biol. 101: 811-815.
- 20) Sillito, A.M. 1975. The Contribution of Inhibitory Mechanisms to the Receptive Field Properties of Neurones in the Striate Cortex of the Cat, J. Physiol. (London) 250: 365-379.
- 21) Singh, S.I. y Malhotra, C.L. 1962. Amino Acid Content of Monkey Brain I. General Pattern and Quantitative Value of Glutamic Acid, Glutamine, gamma-aminobutyric acid and aspartic acid. J. Neurochem. 9: 37-42.
- 22) Sytinsky, I.A. y Tinh, N.T. 1964. Distribution of Gamma-aminobutyric Acid in the Monkey brain During Picrotoxin Induced Seizures. J. Neurochem. 11: 551-556.
- 23) Awapara, J., Landua, A.J., Fuerst, R., y Seale, B. 1950. Free Gamma-aminobutyric Acid in Brain. J. Biol.Chem. 187: 35-39.
- 24) Fahn, S. y Côte, L.J. 1968. Regional Distribution of Gamma-aminobutyric Acid (GABA) in Brain of the Rhesus Monkey. J. Neurochem. 15: 209-213.
- 25) Fahn, S. 1976. Regional Distribution Studies of GABAA receptor and other putative neurotransmitters and their enzymes. En Roberts, E. Chase, T.N. y Tower, D.B. ed: GABA in Nervous System Function. Raven Press, Nueva York, pp. 169-186.
- 26) Celio, M.R. 1986. Parvalbumin Most  $\gamma$ -Aminobutyric Acid-Containing Neurons of the Rat Cerebral Cortex. Science. 231: 995-997.
- 27) Chan P.V., y Köhler, C. 1989. The hippocampus, New vistas. Ed. Alan R. Liss. Inc. 1989. pp. 107-111.

- 28) Tsumoto, T., Eckart, W. And Creutzfeldt, O.D. 1979. Modification of Orientation Sensitivity of Visual Cortex Neurons by Removal of GABA-mediated inhibition. *Exp. Brain Res.* 34: 351-363.
- 29) Krnjevic, K. 1981. Transmitters in Motor Systems, in *Handbook of Physiology, Section 2, The Nervous System, Vol. II, Motor control* (V.B. Brooks, ed.) American Physiol. Soc. Baltimore. Pp. 107-154.
- 30) Tapia, R. and Salazar, P. 1991. Glutamate Decarboxylase Activity in the Substantia Nigra and the Hippocampus of Rats Microinjected with Inhibitors of the Enzyme. *Neurochem. Res.* 16: 263-267.
- 31) Romijn, H.J., Van Marle, J. y Janszen, A. W.J. 1993. Permanent Increase of the GAD<sub>67</sub> Synaptophysin Ratio in the Rat Cerebral Cortex Nerve Endings as a Result of Hypoxicischemic Encephalopathy Sustained in Early Postnatal. Life: A Confocal Laser Scanning Microscopic Study. *Brain Res.* 630: 315-329.
- 32) Kandel, E.R. 1981. Synaptic Transmission II. Presynaptic Factor Controlling Transmitter Release. En: *Principles of Neuronal Sciences*, Kandel, E.R. y Schwartz, J.H. Eds. pp. 81-90.
- 33) Chu, D.C., Albin, R.L., Young A.B. y Penney, J.B. 1990. Distribution and Kinetics of GABA<sub>B</sub> Binding Sites in Rat Central Nervous System: A Quantitative Autoradiographic study. *Neurosci.* 34: 347-357.
- 34) Bormann, J. 1988. Electrophysiology of GABA<sub>A</sub> and GABA<sub>B</sub> Receptor subtypes. *Trends Neurosci.* 11: 112-116.
- 35) Page, I.H. y Carlsson, A. 1970. In: *Handbook of Neurochemistry*. Lajtha, A. Ed. Plenum Press, New York, pp. 251-262.
- 36) Ferstrom, J.D. y Faller, D.V. 1978. Neutral Amino Acids in the Brain: Changes in Response to Food Ingestion, *J. of Neurochem.* 30: 1531-1538.

- 37) Roberts, E. y Hammerschlag, R. 1976. Amino Acid Transmitters. In: Basic Neurochemistry, Siegel, G.J. Wayne Albus, R., Katzman, R. y Agranoff, B.W. Boston pp. 218-245.
- 38) O' hearm, E. y Molliver, M. E. 1984. Organization of Raphe-cortical Projections in Rat: A Quantitative Retrograde Study. *Brain Res. Bull.* 13: 709-26.
- 39) Watanabe, M. 1996. Reward Expectancy in Primate Prefrontal Neurons. *Nature.* 382: 629-632.
- 40) Wilson, M. A. y Molliver, M. E. 1991. The organization of serotonergic projection to cerebral cortex in primate: retrograde transport studies. *Neurosci.* 44: 555-570.
- 41) Vanderwolf, C.H. 1989. A General Role for Serotonin in the Control of Behavior: Studies with Intracerebral 5,7-dihydroxytryptamine. *Brain Res.* 504: 192-198.
- 42) Leger, L., Charnay Y., Dubois P.M. y Jouvét M. 1986. Distribution of Serotonin Containing in the Raphe Nuclei of the Cat: Immunohistochemical Evidence for the Coexistence of Enkephalins and Serotonin in Certain Cells. *Brain Res.* 51: 285-301.
- 43) Lauder, J.M., Wallace, J.A., Krebs, H., Petrusz, P. y McCart K. 1982. In Vivo and In Vitro Development of Serotonin Neurons. *Brain Res. Bull.* 9: 605-625.
- 44) Dahlstrom, A. y Fuxe, K. 1965: Evidence for the Existence of Monoamine Neurons in the Central Nervous System. II. Experimentally Induced of Bulbospinal Neuron System. *Acta Physiol. Scand.* 64 suppl. 247: 1-36.
- 45) Beaudet, A. y Sotelo, C. 1981. Synaptic Remodeling of Serotonin Axon Terminals in Rat Agranular Cerebellum. *Brain Res.* 206: 305-326.

- 46) Moore R.Y. 1985. The Anatomy of Central Serotonin Neurons System in the Rat Brain. Jacobs B.L. y Gelperin A. The MIT Press. Massachusetts, U.S.A.
- 47) Beas-Zárate, C., Sandoval M.E., Feria-Velasco, A. 1984. serotonin Uptake and Release From Rat Cerebellum in vitro. *J. of Neurosci. Res.* 12: 129-136.
- 48) Biegon, A., Rainbow C.T., McEwen, B. 1981. Quantitative autoradiography of Serotonin Receptor in the Rat Brain. *Brain Res.* 242: 197-204.
- 49) Venero, L.J., Herrero, J.A., Machado, A. 1992. Changes in Neurotransmitter Levels Associated with the Deficiency of some Essential Amino Acids in the Diet, *British J. of Nutr.* 68: 409-420.
- 50) De Marte, M.L. y Enesco, H.E. 1985. Influence of Diet on Plasma Tryptophan an Brain Serotonin Leveles in Mice. *Experientia.* 41: 48-50.
- 51) P. Bauman. 1995. Transport Systems and Enzimes Involved in the Metamorphosis of Tryptophan into Serotonin. *Pharmacol.* 18: 188-192.
- 52) Ichiyama, A., Nakamura, S., Nishizuka y Hayaishi, O. 1970. Enzymatic Studies on the Biosynthesis of Serotonin in Mammalian Brain. *J.Biol. Chem.* 245: 1699-1709.
- 53) Levitt, P., Pintor, J.E. and Breakefield, X.O. 1982. Immunocytochemical Demosntration of Monoamine Oxidasa in Brain Astrocytes and Serotoninerpic Neurons. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA,* 79: 6385-89.
- 54) Bryan, L.R., Hamblin, M.W., and Ciaranelio, R. D. 1991. Developmental Regulation of 5-HT RNA and Receptor Levels. *Brain Res.* 58: 51-58.

- 55) Snyder, S.H. 1976. Catecholamines, Serotonin and Histamine. In: Basic Neurochemistry. Siegel, G.J., Katzman, R. and Agranoff, B.W. Ed. Little, Brown and Col. Boston. pp. 203-217.
- 56) Harper, A. E., Peters, J. C. 1989. Protein Intake, Brain Amino Acid and Serotonin Concentrations and Protein Self-Selection. (1,2)J. Nutr. 119: 677-689.
- 57) Slotkin, T.A., Seidler, F.J., Withmore, W.L., Lau, Ch., Salvaggio, M. y Kirksey, D. 1978. Rat Brain Synaptic Vesicles: Uptake Specificities of <sup>3</sup>H-Norepinephrine and <sup>3</sup>H-Serotonin in Preparations from whole Brain and Brain Regions. J. Neurochem. 31: 961-968.
- 58) Katz, B. y Miledi, R. 1967. A Study of Synaptic Transmission in the Absence of Nerve Impulse. J. Physiol. Lond. 192: 407-436.
- 59) Fagg, G.E. y Lane, J.D. 1979. The Uptake and Release of Putative Amino Acid Neurotransmitter. Neuroscience. 4: 1015-1036.
- 60) Streit, P. In: Cerebral Cortex. Eds Jones, E., A. Peters. Plenum Press, New York. 1985, pp. 340-370.
- 61) Freud, T.F. 1992. GABAergic Septal and Serotonergic Median Raphe Afferents Preferentially Innervate Inhibitory Interneurons in the Hippocampus and Dentate Gyrus. In: The Dentate Gyrus and its Role in Seizures. Epilepsy Res. Supp. 7, Ribak C.E., Gall C.M., Mody I., eds. Amsterdam; Elsevier, pp. 79-91.
- 62) Freud, T.F., Gulyas, A.I., Acsady, L., Gores, T., Talhk. 1990. Serotonergic Control of the Hippocampus Via Local Inhibitory Interneurons. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 87: 8501- 8505.
- 63) Miettinea, R., Freud, T.F. 1992. Convergence and Segregation of Septal and Median Raphe inputs onto Different Subsets of Hippocampal Interneurons. Brain Res. 594: 263-272.

- 64) Lewis, A.J., Patel, R., Balázs. 1979. Effect of Undernutrition on Cell Generation in the Rat Hippocampus. *Brain Res.* 168: 186-189.
- 65) Cintra, L., Aguilar A., Granados, L., Galván, A., Kemper T., De Bassio, W., Galler, J., Morgane, P. y Díaz, C.S. 1997. Effects of Prenatal Protein Malnutrition on Hippocampal CA1 Pyramidal Cells in Rats of Four Age Grups. *Hippocampus* 7: 192-203.
- 66) Chen, J., Tonkiss, J., Galler, J. R., Valicer, L. 1992. Prenatal Protein Malnutrition in Rats Enhances Serotonin Release from hippocampus. *J. Nutr.* 122: 2138-2143.
- 67) Bourges, H., Cuadernos de Nutrición. 1981. *Panorama Alimentario de México.*, Instituto Nacional de la Nutrición, México, D.F. 5: 17-31.
- 68) Savage King Felicity y Burgess Ann. 1993. *Nutrition for Developing Countries.* 2ª, New York, Oxford University Press (Eds), London. 223-243.
- 69) Van Geij, H.P., Kaylor, W.M., Nicola, K.R. y Zuspan, E. 1980. Induction of several Intrauterine Growth Retardation in Sprage-Dawley Rat An. *J. Obstet. Gynecol.* 137-143.
- 70) Morgane, P.J., Kemper, T., Stern, W., Hawrylewicz, E., Resnick, O. 1978. The Effect of Protein Malnutrition on the Developing Central Nervous System in the Rat. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 2: 137-230.
- 71) Myron Winck, M.D. 1976. *Malnutrition and Brain Development.* New York. Oxford university Press. London. 63-153.
- 72) Wurtman, Richard J. 1982. Nutrients that Modify Brain Function, *Scientific American.* 246: 42-44.

- 73) Fernstrom, J. D. 1981. Physiological Control of Brain Serotonin Synthesis: Relevance to Physiology and Behavior. In: Serotonin Neurotransmission and Behav. Ed. Jacobs B. L. y Gelperin A. The MIT Press, London, Eng. S.,75-102.
- 74) Hirose, T. 1992. Effects of Nutritional Status on Contents of Tryptophan, Serotonin and 5-Hydroxyindolacetic Acid in Rat Brain. *Nippon-Eiseigaku-Zaschi.* 47: 627-633.
- 75) Gambardella, P., Greco, A. M. Sticchi, R. and D' Apote, D. 1990. Circadian Rhythm Variations in the Adult Rat Induced by Low and High Protein Diets Administered at Various Stage of Development. *Chronobiol.* 7: 43-50.
- 76) Resnick, O., morgane, P.J., Hassen, R., Miller, M., Overt y Hidden. 1986. Froms of Chronic Malnutrition in the Rat and their Relevance to Man., *Neurosci. and Biobehav. Rev.* 6: 55-75.
- 77) Bernochi, G. y Scherini, E. 1980. Citochemical data on DNA and Protein Nuclear Content During the Prenatal Cerebellar Histogenesis in the Rat. Effects of Maternal Protein Malnutrition. *Cell. Mol. Biol.* 26: 405-413.
- 78) Morgane, P. J., Austin-La Frence, R. J., Bronzino, J. D., Tonkiss, J., Díaz-Cintra, S., Cintra, L. Temper, T., Galler, J. R. 1993. Prenatal Malnutrition and Development of the Brain *Neurosci. Biobehav. Rev.* 17: 910-928
- 79) Peters, D. 1986. Prenatal Stress: Effect on development of Rat Brain Serotonergic Neurons. *Pharmacol. Biochem. And Behav.* 40: 1199-1206.
- 80) González-Burgos, I., Pérez-Vega, M.I., Del Angel-Meza. A.R. y Feria-Velasco, A. 1998. Effect of restriction on short-term memory. *Physiol. Behav.* 63: 165-169.

- 81) Martínez, D., Cuadernos de Nutrición. 1985., Consecuencias Sociales de la Mala Nutrición., Instituto Nacional de la Nutrición., México, D.F., 8: 17-32.
- 82) Brian, M., Carter, S., USA MC., Rusell, M., R. Battaglia, C. 1991. Placental transport and Fetal and Placental Metabolism of Aminoacids. *J. Nutr. Biochem.* 2: 4-7.
- 83) Srivastava, U. S. 1985. Nuclei Acid and Protein Metabolism in Undernutrition and Protein Deficiency. *Prog. Food Nutr. Sci.* 9: 63-107.
- 84) Del Angel, A. R., Beas, Z.C., Morales, V. A. 1989. Effects of Corn-Fed and Protein Restriction on Rat Cerebellum and Brain Stem Malnutrition. *Nutri. Report internat.* 40: 1199-1206.
- 85) Tirapegui, J. O. y De Angelis, R. C. 1984. Quality of Maternal Diet and Biochemical Changes in the Brain of the offspring. Study in Rats. *Arq. Gastroenterol.* 21: 78-82.
- 86) Maravene Miller, J. P. Leahy, F. Mcconville, P.J. Morgane, O. Resnick. 1977. Effects of Developmental Protein Malnutrition on Tryptophan Utilization in Brain and Perepheral Tissues. *Brain Res. Bull.* 2: 347-353.
- 87) Beas-Zárate, C., Del Angel-Meza, A. R., Morales-Villagran, A. y Feria-Velasco, A. 1988. Serotonin Uptake in the Central Nervous System of Rats Fed a Corn-Diet., *Comp. Biochem. Physiol.*, 89: 173-177.
- 88) Schaeschter, D. J, y Wurtman R. J. 1990. Serotonin Release Varies With Brain Tryptophan Levels., *Brain Res.* 532: 203-210.
- 89) Young, S.N. 1991. Some Effects of Dietary Components (Amino Acid, Carbohydrate, Folic Acid) on Brain Serotonin Synthesis, Mood and Behavior. *J. Physiol Pharmacol.* 6: 893-903.

- 90) Shimurak, Y. Takeuchi, K. Fujwara, H. Yoshioka, Tsanada, T. Kusunoki. 1989. Effect of Malnutrition on the Serotonin Neuron System in the Developing Brain: an Immunohistochemical Study. *Developmental Brain Res.* 50: 225-231.
- 91) Barbosa, M. P., Andrade, J. P., Castedo, J. L., Azevedo, F. P., Camões, I., Volk, B. y Tavares, M. A. 1989. Cell Loss in the Cerebellum and Hippocampal Formation of Adult Rats After Long-Term Low-Protein Diet. *Experi. Neurol.* 103: 186-193.
- 92) Hernández, J. R., G.G. Manjarrez, G. Chagoya. 1989. Newborn Humans and Rats Malnourished in Utero: free Plasma L-tryptophan, Neural Amino Acids Brain Serotonin Synthesis. *Brain Res.* 488: 1-13.
- 93) Manjarrez, G. G., Magdalena, U. M., Chagoya, G., Hernández, J. 1996. Nutritional Recovery does not Reverse the Activation of Brain Serotonin Synthesis in the Ontogenically Malnourished Rat. *Int. J. Devl. Neurosci.* 14: 641-648.
- 94) Delgado, P.L., Charney, D.S., Price, L.H., Landis, H., Heinger, G.R. 1989. Neuroendocrine and Behavioral Effects of Dietary Tryptophan Restriction in Healthy Subjects. *Life Sci.* 45: 2323-2332.
- 95) Lanfumey, L. And Barry, L.J. 1982. Developmental Analysis of Raphe Dorsalis Unit Activity in the Rat. *Brain Res.* 242: 317-320.
- 96) Millward, J. 1997. Human Amino Acid Requirements. *J. Nutr.* 127: 1842-1846.
- 97) Tissari, A. H. 1973. Serotonergic Mechanisms on Ontogenesis. *Fetal Pharmacol.* Edit, by L. Boreus, Raven Press. 237-257.
- 98) Rimvall, K. y Martin, D.L. 1991. GAD and GABA in an Enriched Population of Cultured GABAergic Neurons from Rat Cerebral Cortex. *Neurochem. Res.* 16: 859-868.

- 99) Lowry, O. H., Rosenbrough, N. J., Far, H. y Randal, R. J. 1951. Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-268.
- 101) Sinclair, J. C. 1970. Energy metabolism and fetal development. En: Waisman, H.A., Kerr, G. eds. *Fetal Growth and Development*. New York, McGraw-Hill. 201-218.
- 102) Snow, M. H. 1986. Control of Embryonic Growth Rate and Fetal Size in Mammals. In: Falkner, F., Tanner, J.M. eds. *Human Growth. A Comprehensive Treatise 1. Development biology. Prenatal Growth*. New York, Plenum Press; 67-82.
- 103) Zamenhof, S., Van Marthens E. 1978. Nutritional Influences on Prenatal Brain Development: en Gottlieb G. Ed, *Studies on the Development of Behavior and the Nervous System. Early Influences: 4*. Academic Press, New York. 147-179.
- 104) Chase, H.P., Dabiere, C. S., Welch, N.N. O' Brien, D. 1971. Intrauterine Undernutrition an Brain Develop. *Pediatr.* 47: 491-500.
- 105) Fernstrom, J. D., Fernstrom, M. H., Grubb, P. E. y Volk, E. 1985. Absence of Chronic Effects of Dietary Protein Content on Brain Tryptophan Concentrations in Rat. *J. Nutr.* 115: 1337-1344.
- 106) Del Angel, A.R. y Sotelo, A. 1982. Nutritive Value of Mixtures Using Chick-peas with Wheat, Triticale, Normal and Opaque-2 Corns. *J. Nutr.* 112: 1474-1480.
- 107) Cintra, L., Galvan, A. 1991. Influencia de los Nutrientes en el Desarrollo del Sistema Nervioso Central. *Ontogenia Neural. Soc.Mex. Ciencias Fisiol. Edit. UNAM*, 146-161.
- 108) Jean K. Tews, A.M. Bradford, A. E. Harper. 1981. Induction of Lysine Imbalance in Rats: Relation to Competition for Lysine Transport into the Brain in Vitro. *J. Nutr.* 111:954-967.

- 109) Millward, J. D. 1997. Human Amino Acid Requirements. *J. Nutr.* 127: 1842-1846.
- 110) Resnick, O. y Morgan, P.J. 1984. Ontogeny of the Levels of Serotonin in Various Parts of the Brain in Severely Protein Malnourished Rats. *Brain Res.* 303: 163-170.
- 111) Velazquez, A., Del Angel, A., Feria-Velasco. 1993. Effects of a Corn Feeding and Protein Restriction on Free Amino Acid Concentration in the Rat Cerebellum. *Arch. Med. Res. (Mex.)* 24: 33-36.
- 112) Zamenhof, S., Van Marthens, E. Grauel, L. 1971. DNA (Cell Number) and Protein in Neonatal Rat Brain: Alteration by Timing of Maternal Dietary Protein Restriction. *J. Nutr.* 9: 1265-1270.
- 113) Hidehiko y Nomura, M. 1991. Effect of Amino Acid Supplementation to a Low-Protein Diet on Brain neurotransmitters and memory-Learning Ability of Rats. *Physiol.& Behav.* 50:1227-1232.
- 114) Del Angel-Meza, A.R., González-Burgos, I., Olvera-Cortés, E. and Feria-Velasco, A. 1996. Chronic Tryptophan Restriction Disrupts Grooming Chain Completion in the Rat. *Physiol.Behav.* 59: 1099-1102.
- 115) Palencia, G., Calvillo, M., Sotelo, J. 1996. Chronic Malnutrition Caused by a Corn-Based diet Lowers the Threshold for Pentylentetrazol-Induced Seizures in Rats. *Epilepsia* 37(6):583-586.
- 116) Green, A. R., Heal, D. J. y Nigel, V. 1987. The Effects of Single and Repeated Electroconvulsive Shock Administration on the Release of 5-hydroxytryptamine and Noradrenaline from Cortical Slices of Rat Brain. *Br.J. Pharmac.* 92: 25-30.
- 117) Gibbons, J. L., Barr, G. A., Bridger, W. H., Leibowitz, S. F. 1979. Manipulations of Dietary Tryptophan: Effects on Mouse Killing and Brain Serotonin in the Rat. *Brain Res.* 169:139-153
- 118) Almeida, S. S., Tonkiss, J., Galler, J. R. 1996. Malnutrition and Reactivity to Drugs Acting in the Central Nervous System. *Neurosc. And Biobehav. Rev.* 20: 389-402.

- 119) Morgane, J. P., Austin La France, R. J., Bronzino, J. D., Tonkiss, J., Galler, J. R. 1993. Malnutrition on Developing Nervous System. In: Isaacson, R., Jensen, K. Eds. *The Vulnerable Brain and Environmental Risk*. New York. Plenum Press. 3: 3-44.
- 120) Morgane, P., Austin La France, R., Bronzino, J., Tonkiss, J., Díaz-Cintra, S., Cintra, L., Kemper, T. 1993. Prenatal Malnutrition and Development of the Brain. *Neurosc. and Biobeha. Rev.* 17: 91-128.
- 121) Debassio, W.A., Kempert L. 1985. The Effects of Protein Deprivation on Neuronal Migration in Rats. *Dev. Brain Research* 20: 191-196.
- 122) L. E. Abel. 1990. Effects of Prenatal and Maternal Undernutrition on Growth of offspring in Rats *Growt. Development & Aging*. 54: 125-129.
- 123) Manjarrez, G. G., Chagoya, G. G., Hernández, R. J. 1988a. Perinatal Brain Serotonin Metabolism in Rats Malnourished in-utero. *Biol. Neonate*. 54: 232-240.
- 124) Manjarrez, G., Chagoya, G., Hernández, R. J. 1988b. Desnutricion Intrauterina. II. L-triptofano-5-hidroxilasa y Serotonina en el Cerebro de Rata. *Bol. Med. Hosp. Infant. Mex.* 45: 808-816.
- 125) Clos, J., C. Favre, M. Selme-Matrat y Legrand, J. 1977. Effects of Undernutrition on Cell Formation in the Rat Brain and Specially on Cellular Composition of the Cerebellum. *Brain Res.* 123: 13-26.
- 126) Salas, M., Díaz, S., Nieto, A. 1974. Effects de Neonatal Food Deprivation on cortical Spines and Dendritic Developmental of the Rat. *Brain Res.* 23: 139-144.
- 127) Sarkar, C., Roy, S., Gopinath, G. 1990. Effect of Neonatal Undernutrition on the Brain. *Proc. Indian Natl. Sci. Acad. Part. B., Biol.Sci.* 56: 29-36.

- 128) Bedi, K. S. y Bhide, P. G. 1988. Effects of Enviromental Diversity on Brain Morphology. *Early Hum. Dev.* 17: 107-143.
- 129) Saissi, F., B. 1973. Differential Effects of Protein-Calorie Restriction and Subsequent Repletion on Neuronal and Nonneuronal Components of Cerebral Cortex in Newborn Rats. *J. Nutr.* 103: 1625-1633.
- 130) Strupp, B. J., Levitsky, D. A. 1995. Enduring Cognitive Effects of Early Malnutrition: A theoretical Reappraisal. *J. Nutr.* 125: 2215-2223.
- 132) Freud, T.F. y Antal Miklos. 1988. GABA-Containing Neurons in the Septum Control Inhibitory Interneurons in the Hippocampus. *Nature.* 336: 170-173.
- 133) Hirsch, M. J. Fernstrom, J. D. 1977. Brain Serotonin: Reduction in Corn-Malnourished Rats. *J. Neurochem.* 28: 877-879.
- 134) Vaidya, V.A., Marek, G.J., Aghajanian, G.K., Duman, R.S. 1997. 5-HT<sub>2</sub> Receptor-Mediated Regulation of Brain-Derived Neurotrophic Factor mRNA in the Hippocampus and the Neurocortex. *J. of Neurosci.* 17 (8):2785-2795.
- 135) Tuwer, M. F. Y Garthwaite, P. 1993. The Form of Response of Body Protein Accretion to Dietary Amino Acid Supply. *J. Nutr.* 123: 1957-63.
- 136) McMahon, L.L., Kaver, J.A. 1997. Hippocampal Interneurons are excited Via Serotonin-Gated Ion Chanaels. *J. Neurophysiol.* 78: 2493-2502.
- 137) Fernstrom, J.D., Fernstrom, M. H., Grubb, P.E., Volk, e.A. 1985. Absence of Chronic Effects of Dietary Protein Content on Brain Tryprophan Concentration in Rats. *J. Nutr.* 115: 1337-1344.

- 138) Morales-M., Bloom-FE, 1997. The 5-HT<sub>3</sub> Receptor is Present in different Subpopulations of GABAergic Neurons in the Rat Telencephalon. *J. Neurosci.* 17: 3157-3167.
- 139) Resnick, O., Miller, M., Forbes, W., Hall, R., Kemper, T., Bronzino, J. y Morgane, P. J. 1979. Developmental Protein Malnutrition: Influences on the Central Nervous System of the Rat. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 3: 233-246.
- 140) Miller, L. P., Walters, J.R., Eng, N. y Martin, D. L. 1980. Glutamate Holod Descarboxylase Levels and the Regulation of GABA Synthesis. *Brain Res. Bull.* 5: 89-94.
- 141) Piguet P., Galvan M. 1994. Transient and Long-Lasting Actions of 5-HT on Rat Dentate Gyrus Neurons in vitro. *J. Physiol* 481:629-639.
- 142) Sevoz-C., Galler, J.C., Machado, B.H., Hamon, M., Laguzzi, R. 1997. Role of Serotonin 3 Receptor in the Nucleus Tractus Solitari on the Cation Chem Reflex. *Am. J. Physiol.* 272: H1250-1259.
- 143) Morales, M., Battenberg, E., Lecea, L., Bloom, F.E. 1996. The Type 3 Serotonin Receptor is Expressed in Subpopulation of GABAergic Neurons in the Rat Neocortex and Hippocampus. *Brain Res.* 731: 199-202.
- 144) Angulo, C., Vaughan, D. 1977. Rehabilitation Following Early Malnutrition in the Rat. Body Weight and Cerebral Cortex Development. *Brain Res.* 169: 121-138.