

1994 - B

087655946

UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS

DIVISION DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AMBIENTALES



UNION DE ESPERONA-(³H) A RECEPTORES A SEROTONINA
(5-HT₂) Y ADOPOMINA (D₂) EN CEREBRO DE RATAS
BAJO RESTRICCIÓN PROTEICA

TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
LICENCIADO EN BIOLOGIA

P R E S E N T A

LETICIA RAMIREZ CORTES

GUADALAJARA, JAL. AGOSTO DE 1995

UNION DE ESPIPERONA-[³H] A RECEPTORES A SEROTONINA
(5-HT₂) Y A DOPAMINA (D₂) EN CEREBRO DE RATAS
BAJO RESTRICCIÓN PROTEICA.

DEDICATORIA:

El presente trabajo lo dedico con todo cariño y respeto a **MI MAMA**, a quien le debo todo lo que tengo y lo que soy; por el apoyo incondicional en todos los momentos de mi vida y por ser alguien a quien admiro enormemente.

G r a c i a s

Mamá

AGRADECIMIENTOS:

A mis padres, hermanos y a mi Tia Carmen, por el apoyo y amor que me han brindado.

A Manuel por el cariño, ayuda, comprensión y los gratos momentos compartidos en los últimos años.

A mis maestros, ya que con sus enseñanzas he logrado esta meta, en especial a: M. en C. Carlos Beas Zárate, M. en C. Daniel Ortuño S., M. en C. Alberto Morales V. Por su apoyo, académico, moral y económico. Así como a la M. en C. Alma Rosa Del Angel, Q.F.B. Rosa Ma. Domínguez y Q.F.B. Adolfo Cardenas. Mil Gracias.

A todos y cada uno de los amigos que conforman una lista innumerable, en particular a Rosario, Benito, Silvia Zalapa, Paco, Rocio, Paty, Celia, Katy, Marychuy, Maricarmen, Lulú, Yessica, Silvia López, Enrique, David, Fernando, Rodolfo, Sergio, Ricardo y Consuelo.

En una forma muy especial a dos grandes amigas Mayra y Gris que con su apoyo incondicional me han facilitado el camino recorrido.

A Monica Ureña G. y Fco. Garza B. por la ayuda y paciencia brindada para la realización de este trabajo.

Este trabajo fué realizado en el Laboratorio de Neurobiología del Departamento de Biología Celular y Molecular de la División de Ciencias Biológicas y Ambientales, Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias de la Universidad de Guadalajara, bajo la dirección del M. en C. Carlos Beas Zárate. Así como con la colaboración del Laboratorio de Nutrición del Centro de Investigaciones Biomédicas de Occidente, IMSS, a cargo de la M. en C. Alma Rosa Del Angel Meza.

INDICE

CONTENIDO	PAGINA
INDICE.....	vii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	viii
RESUMEN.....	x
INTRODUCCION.....	1
ANTECEDENTES.....	7
HIPOTESIS.....	16
OBJETIVOS.....	18
MATERIAL Y METODOS.....	20
DIAGRAMA EXPERIMENTAL.....	24
RESULTADOS.....	25
DISCUSION.....	29
CONCLUSIONES.....	34
BIBLIOGRAFIA.....	36
RELACION DE TABLAS Y FIGURAS.....	47

LISTA DE ABREVIATURAS.

Acido gamma amino butírico	GABA
Acido hidroxindolacético	5-HIAA
Centímetros cuadrados	cm ²
Centímetros cúbicos	cm ³
Cerebelo	Cb
Constante de disociación	Kd
Corteza Cerebral	Cx
3,4,dihidroxifenilalanina	DOPA
Dioxido de Carbono	CO ₂
Dopamina	DA
Dopaminérgicas	DAérgicas
Espiperona marcada con tritio	Esp-[³ H]
Fentomol	fmol (1X10 ⁻¹⁵ moles)
Grados centigrados	°C
Gramo	g
5-Hidroxitriptofano	5-HTP
Iodo radioactivo	[¹²⁵ I]
Ión calcio	Ca ⁺⁺
Ión cloro	Cl ⁻
Ión magnesio	Mg ⁺⁺
Ión potasio	K ⁺
Ión sodio	Na ⁺
Kilogramo	Kg
Microlito	μl
Micromolar	μM
Miligramo	mg
Mililitro	ml
Milimolar	mM
Minutos	min
Monoamino oxidasa	MAO

Nanomolar	nM
Norepinefrina	NE
Por ciento	%
Receptor a DA tipo 2	D ₂
Receptor a 5-HT tipo 2	5-HT ₂
Serotonina	5-HT
Serotoninérgicas	5-HTérgicas
Sistema Nervioso Central	SNC
Sistema Nervioso Periférico	SNP
Tálamo	T
Tallo Cerebral	TC
Triptofano	TP
Triptofano hidroxilasa	TpOH
Tritio	[³ H]

R E S U M E N

Diversos autores han determinado un gran número de efectos que se derivan de la restricción proteica, tales como; disminución en el peso corporal y cerebral, talla, contenido de ácidos nucleicos y proteínas en el cerebro, así como la disminución en los niveles de algunos neurotransmisores entre ellos la serotonina (5-HT) y dopamina (DA) sobre todo en las etapas posteriores al nacimiento en donde se han demostrado modificaciones en la neurotransmisión nerviosa tipo 5-HTérgica. Resultados preliminares de nuestro laboratorio demuestran una importante reducción en el contenido de 5-HT y DA en el tallo cerebral y cerebelo de animales con restricción proteica en la etapa postnatal, por lo que en el presente trabajo se determinó la unión de espiperona (Esp-[³H]) como ligando marcado para estos dos receptores, en corteza cerebral, cerebelo, tallo cerebral y tálamo, de ratas con restricción proteica (8%) a los 18 y 20 días de gestación 1, 14, 21, 30, 60 y 90 días de edad posnatal. Los resultados muestran un incremento en la unión de Esp-[³H] en el encéfalo de animales con restricción proteica durante la etapa de gestación respecto al grupo testigo. Sin embargo, a partir del nacimiento se encontró una disminución en la unión de Esp[³H] en todas las regiones estudiadas y en todas las edades, excepto a los 60 días de edad en corteza donde se observó un incremento, al igual que a los 14 días de edad en el tálamo del grupo restringido respecto al testigo. Mientras que en la corteza cerebral se observó una unión de Esp-[³H] más oscilante a lo largo de las diferentes edades postnatales estudiadas, particularmente un incremento significativo a los 14, 30 y 90 días de edad. Los resultados en conjunto con los previamente obtenidos, indican que los 14 días de edad es un período crítico para el desarrollo del sistema monoaminérgico, además sugieren la existencia de cambios importantes en la fisiología de la neurotransmisión monoaminérgica que son vulnerables a las condiciones de restricción proteica.

I N T R O D U C C I O N

El sistema nervioso es un conjunto de estructuras funcionalmente especializadas mediante las cuales el organismo responde a los estímulos que recibe, tanto del medio externo como del medio interno. Comúnmente se le divide en: a) Sistema Nervioso Central (SNC), que representa el nivel integrativo, y está compuesto por el encéfalo y la médula espinal. b) Sistema Nervioso Periférico (SNP), que comprende los nervios espinales y craneales que contienen las prolongaciones de las neuronas aferentes y eferentes, las cuales constituyen el nivel de aferentación y eferentación, respectivamente, y c) Sistema Nervioso Autónomo el cual comprende elementos tanto del SNC como del SNP, se subdivide en parasimpático y simpático.(1)

Los elementos básicos que componen el Sistema Nervioso son: 1) células nerviosas (Neuronas), 2) células intersticiales, denominadas células gliales, astrocitos, oligodendrocitos, células de Schwann, células satélite y 3) elementos de tejido conjuntivo, fibroblastos, microglia, vasos sanguíneos y líquido extracelular.

Las neuronas son los pilares básicos del Sistema Nervioso, constan de un cuerpo celular o soma y de prolongaciones rodeadas por una membrana (axón y dendritas). Cada neurona es un receptor complejo y un procesador de impulsos aferentes que al integrarse son transmitidos a otras neuronas, fibras musculares o células granulares. Así el espacio que hay entre cada extremo terminal y la célula hacia la cual se proyectan los elementos que intervienen y la parte de la célula receptora que responde a la información transmitida, recibe el nombre de sinapsis.

Ubicación Anatómica de las Regiones en Estudio.

El encéfalo se encuentra parcialmente dividido en dos mitades, los hemisferios cerebrales, por una profunda y vertical cisura longitudinal y en la parte caudal se encuentra el cerebelo que está conectado mediante tres brazos o pilares; el inferior, el medio y el superior.

El cerebelo es un órgano lobulado cuya superficie presenta una gran cantidad de cisuras (Fig. 1), y su constitución comprende; 1) Dos tipos de axones aferentes, fibras trepadoras y musgosas- 2) cinco tipos de neuronas: Células granulares, estelares, en cesta, de Golgi y de Purkinje y de un tipo de neuronas eferentes que son las células de los núcleos profundos. Aunque las fibras aferentes conducen impulsos excitatorios hacia el cerebelo, todos los impulsos de la corteza cerebelar son inhibitorios gracias a las células estrelladas, en cesta, de Golgi y Purkinje (2). El tallo cerebral se halla en la fosa posterior del cráneo y descansa ventralmente sobre el canal basilar. Rostralmente, llega hasta el dorso de la silla turca, caudalmente rebasa el agujero magno, llega hasta el atlas, y continúa con la médula espinal. Dorsalmente, está en relación en su parte más rostral con la epífisis y en el resto de su extensión con el cerebelo con el cual limita el cuarto ventrículo. Así, el tallo cerebral es una estructura infratentorial, es decir, está bajo el tentorium (tienda del cerebelo) excepto en su parte más rostral (Fig. 1). Por lo que el cerebelo tiene una relación muy estrecha con el tallo cerebral tanto en desarrollo filogenético y embriológico, como en el funcional. El tallo cerebral se constituye por tres estructuras cerebrales: mesencéfalo, metencéfalo (puente) y mielencéfalo (bulbo). La primera de ellas se forma dorsalmente por un gran

núcleo de células que contienen pigmentos melánicos de color oscuro (sustancia negra) y dorsomedialmente a dicha sustancia aparece un gran núcleo de aspecto rojizo, debido a que sus células tienen pigmentos a base de hierro: es el núcleo rojo. El puente presenta una banda transversal (porción basilar) formada por fibras pontocerebelosas y fibras de haces córtico espinales. En cuanto al bulbo, los haces de fibras córticoespinales forman las pirámides en la parte ventral (1). La corteza cerebral es una capa delgada de tejido neuronal cuya superficie (en el hombre) es de aproximadamente 2,200 cm², y cuyo grosor oscila en las distintas porciones del cerebro de 1.3 a 4.5 mm (Fig. 2). Su volumen es de unos 600 cm³. Contiene de 10⁹ a 10¹⁰ neuronas de varios tipos: células piramidales, satélite, granulares, estrelladas, células de Martinotti, horizontales de Cajal y fusiformes, así como un número elevado pero desconocido de células gliales (3). En la corteza cerebral alternan capas que contienen principalmente cuerpos celulares, de acuerdo a su forma y disposición relativa, se pueden diferenciar 6 capas, molecular, granular externa, piramidal externa, granular interna, piramidal interna y multiforme (4). Las funciones principales de la corteza son la de llevar a cabo procesos tales como la percepción, aprendizaje, memoria y lenguaje, así como también la elaboración del pensamiento y organización de la conducta.(1)

Por lo que respecta al tálamo, es un complejo de estaciones nucleares de procesamiento que coordinan y regulan la actividad funcional de la corteza cerebral. El tálamo está interconectado con la corteza ipsilateral y con complejos nucleares subcorticales (hipotálamo y núcleos basales) (Fig. 2). El tálamo desempeña funciones básicas en 1) los sistemas sensoriales, todas las vías sensoriales a excepción del sistema olfatorio, tienen proyecciones directas hacia tálamo, 2) los sistemas motores, en la proyección de impulsos hacia la corteza

que se relacionan con la actividad motora y somática, 3) en el procesamiento de las influencias neurales básicas a través de sus conexiones y 4) un papel en los aspectos afectivos y en las expresiones más elevadas de la corteza cerebral (2).

Comunicación Interneuronal.

Estudios morfológicos, bioquímicos y fisiológicos muestran que la transferencia de información de una neurona a otra se lleva a cabo a través de señales eléctricas o a través de la liberación de sustancias químicas. El primer caso es una sinápsis de tipo eléctrico, en donde el potencial de acción propagado se transmite a la célula inmediata (5). El segundo tipo es el más común en el SNC de mamíferos, se conoce como sinapsis química y se presenta cuando una célula emisora (presináptica) segrega una señal química que difunde a través del espacio sináptico e interacciona con las otras células (célula postsináptica) (6) (Fig. 3). Esta liberación puede llevarse a cabo a través de un mecanismo dependiente de Ca^{++} (7). La acción del transmisor sobre la célula postsináptica termina al removerse del espacio intersináptico mediante un proceso activo de recaptura que se lleva a cabo tanto en la terminal presináptica como en células gliales circunvecinas, o bien mediante procesos de degradación enzimática que tienen lugar en el espacio intersináptico. (8,9,11). Generalmente los transmisores son sustancias de bajo peso molecular, entre ellos algunos amino ácidos tales como el ácido gamma amino butírico, (GABA), glicina, ácido aspártico, ácido glutámico; algunas aminas como, dopamina (DA), norepinefrina, epinefrina, serotonina (5-HT) y otros como la acetilcolina. Una vez liberado el transmisor se difunde a través del espacio intersináptico para unirse a receptores específicos en la membrana postsináptica. (2,4,11). Cuando el transmisor liberado posee efecto excitatorio, su interacción con el receptor postsináptico propicia la entrada de iones Na^+ a la célula postsináptica lo que produce una

depolarización de la membrana, mientras que, si el transmisor liberado posee efecto inhibitor, éste propicia la salida de potasio (K^+) y la entrada de iones cloro (Cl^-) a la célula postsináptica y produce una hiperpolarización de membrana (12,13).

En los últimos años, los estudios bioquímicos relacionados con los eventos postsinápticos de la transmisión neuronal se han enfocado en la identificación y caracterización de los receptores a los diferentes transmisores (13). En la actualidad se considera que un receptor es una proteína integral de membrana, misma que posee un sitio activo al cual se une un ligando específico (transmisor) capaz de originar una respuesta.

Entre los sistemas de neurotransmisión más importantes y estudiados, por sus diversas implicaciones funcionales y la densidad con que se encuentran distribuidos en el SNC, se encuentran el sistema Dopaminérgico (DAérgico) y el Serotoninérgico (5-HTérgico).

A N T E C E D E N T E S

Sistema Dopaminérgico.

La DA no sólo está considerada como un precursor de la norepinefrina (NE), sino como un transmisor independiente. En la actualidad existen evidencias claras de que la DA es un transmisor de tipo inhibitorio ampliamente distribuido en el SNC, ya que ésta representa más del 50% del contenido total de catecolaminas en el encéfalo en la mayor parte de los mamíferos. Esto se ha demostrado gracias a estudios histoquímicos, bioquímicos y electrofisiológicos (14-16).

Las concentraciones más altas de DA se localizan en: estriado, corteza límbica, el cerebelo medio, tubérculo olfatorio, e hipotálamo (4,17). El estriado recibe fibras DAérgicas que se originan en la porción compacta y reticular de la sustancia negra, ascienden al subtálamo y hacen blanco en caudado y putamen principalmente (4,18). Además el estriado recibe fibras DAérgicas de los núcleos denominados intralaminares, del centro mediano y dorsomedial del tálamo, proyecciones estriado-talámicas (1,19,22). (Fig. 4)

La síntesis de DA se lleva a cabo a partir de la ingestión de nutrientes que contengan su precursor, la tirosina (o se puede derivar de la fenilalanina)(23). Este aminoácido precursor se encuentra normalmente en la circulación en una concentración aproximada de 50-80 mM. Es captado de la corriente sanguínea y concentrado dentro del cerebro, por medio de un mecanismo de transporte activo. Una vez dentro de la neurona periférica, la tirosina se transforma en L-dihidroxifenilalanina (L-DOPA) a través de la acción de la enzima tirosina hidroxilasa. Posteriormente la L-DOPA se descarboxila mediante la descarboxilasa de los aminoácidos aromáticos para formar finalmente DA y CO₂ (24). La degradación metabólica de la DA está a cargo de la enzima monoamino oxidasa (MAO), que interviene en la desaminación oxidativa de catecolaminas (4). (Fig.5)

En las neuronas exclusivamente DAérgicas la DA se

almacena en las vesículas sinápticas DAérgicas por medio de un transporte activo dependiente de energía metabólica y de iones Mg^{++} localizados en las membranas de tales vesículas para ser liberadas bajo un estímulo fisiológico apropiado. Al llegar un estímulo o impulso nervioso a la terminal sináptica se da un aumento en la permeabilidad de la membrana a Ca^{++} principalmente, lo cual permite la movilización de las vesículas que contienen el neurotransmisor para fusionarse con la membrana presináptica y de ésta forma el neurotransmisor se libera por un proceso de exocitosis, para interactuar con su receptor específico (23) (Fig. 6). En la actualidad se han reportado varios tipos de receptores a DA: D_1 , D_2 , D_4 , y D_5 los cuales difieren parcialmente en su estructura, por alguna de sus subunidades, estos grupos de receptores interactúan con sus agonistas y antagonistas específicos, para D_1 y D_5 algunos de los agonistas son SKF38393 y fenoldopam, como ejemplo de antagonistas específicos son SCH23390, SKF83566 y SCH39166; por lo que respecta a D_2 y D_4 sus agonistas específicos son N-0437 y bromocriptina, como antagonistas sulpirida, M091512, domperidona y espiperona. Los radioligandos que se han utilizado para el estudio de todos los subtipos son tritio [3H] y Yodo [^{125}I] (25).

Sistema Serotoninérgico

La 5-HT es un de los principales neurotransmisores en el SNC, el cual es de vital importancia durante ciertos períodos de la vida, en la adquisición de conductas específicas y de respuesta a estímulos del medio ambiente, en la regulación del ciclo sueño-vigilia, la sensibilidad al dolor, la locomoción, el sexo y en la transmisión de información durante los procesos de crecimiento. El sistema 5-HTérgico desempeña un papel importante en la evocación de las sensaciones de satisfacción

y del apetito, a pesar de estas funciones múltiples en el organismo, las dos funciones principales que se le han asignado en el SNC son, como ya se hizo referencia, 1) actuar como neurotransmisor y 2) participar en la regulación hormonal (26).

Los núcleos del rafé poseen un papel importante dentro del sistema nervioso ya que se caracterizan por contener la mayoría de las células 5-HTérgicas del SNC (27,28). En el rafé se forman contingentes de fibras ascendentes hacia la corteza cerebral y en dicho núcleo se entremezclan algunas fibras que descienden al área hipotálamica y terminan alcanzando su mayor descendencia en los bulbos olfatorios. Otro grupo de fibras gira lateralmente para llegar a la formación hipocampal, tálamo ventral y cuerpo estriado (29). Algunos estudios demuestran que los axones serotoninérgicos también se localizan en la porción inferior del tallo cerebral (30). Por otra parte existen estudios que evidencian la presencia de fibras indolaminérgicas en el cerebelo (31) y que consideran a la 5-HT como el principal neurotransmisor, que ocupa la corteza cerebelosa a nivel de todas sus capas, pero principalmente a nivel de la capa molecular y a través del pedúnculo cerebeloso superior dentro del cerebelo (32,33). Estudios autoradiográficos para receptores a serotonina en rata muestran sus altas densidades en las diferentes áreas cerebrales, encontrando las densidades más elevadas en hipocampo, hipotálamo y núcleos del rafé, densidades altas pero menores a las anteriormente citadas en el núcleo acumbens, la amígdala, núcleo caudado, corteza frontal y tálamo, finalmente la densidad menor se encontró en cerebelo, cuerpo calloso y habénula (34). (Fig. 7)

El precursor de la 5-HT, el L-triptofano (TP), se obtiene a partir de la ingestión de nutrientes que lo contienen y por medio de un mecanismo de transporte activo de las células endoteliales de los vasos sanguíneos (Fig. 8). El segundo paso en la formación de 5-HT es la hidroxilación del TP que tiene

lugar, en la fracción citosólica celular, y está dado por la enzima triptofano-5-hidroxilasa (TpOH) y forma el producto, 5-hidroxitriptofano (5-HTP), que es descarboxilado por la 5-hidroxitriptofano descarboxilasa para formar la 5-HT (35). Finalmente la degradación metabólica de la 5-HT es a través de la enzima monoamino oxidasa(MAO) (36), la cual oxida el grupo amino de la 5-HT para formar el 5-hidroxiacetaldehído que posteriormente se oxida a 5-HIAA (35,37). Esta enzima puede inhibirse por drogas como la iproniacida, nialamida, harmalina y la pargilina (23). (Fig. 9)

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) (38). La liberación se lleva a cabo mediante una 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 se libera por exocitosis (39). De esta manera el proceso de liberación muestra una dependencia absoluta de la concentración de calcio extracelular (40). Una vez liberado viaja al espacio sináptico para interactuar con su receptor específico localizado en la membrana postsináptica o con su autorreceptor. (Fig. 10)

La acción que generalmente posee la 5-HT al interactuar con su receptor es de tipo inhibitorio. Aunque, en ciertas regiones del SNC algunas células responden en forma excitatoria (41), lo cual indica la existencia de diversos tipos de receptores que reaccionan a la 5-HT.

Diversos estudios farmacológicos y fisiológicos nos indican la existencia de varios subtipos de receptores a 5-HT, designados como 5-HT_{1A}, 5-HT_{1B}, 5-HT_{1D}, 5-HT_{1E}, 5-HT_{1F}, 5-HT_{2A}, 5-HT_{2B}, 5-HT_{2C}, 5-HT₃ y 5-HT₄. De éstos los 5-HT₂ son los más abundantes en el SNC (42). Los agonistas al receptores 5-HT₂ son a menudo alucinógenos

como ejemplo de ellos el α -metil-5-HT; entre los antagonistas específicos a este subtipo se encuentran la ketanserina, el LY53857, la mesulergina y la espiperona entre otros (43), esta última es un ligando con afinidad por receptores a serotonina tipo 5-HT₂ y D₂. Dicho compuesto, espiperona C₂₃H₂₆FN₃O₂, tiene un peso molecular de 395.46 g/mol (44). Lo que permite hasta el momento un avance considerable en el análisis de receptores, es el uso de radioligandos, en este caso la espiperona-[³H].

Desnutrición.

La desnutrición se contempla como una problemática mundial en amplios sectores de la población (45), esto hace urgente la realización de estudios cada vez más profundos, de las causas que la producen así como sus consecuentes efectos (46). Para ello se utiliza la rata, que presenta una ventaja para su uso como modelo en estos estudios, ya que en las primeras etapas de su vida posnatal tiene un requerimiento de aminoácidos similar al de los seres humanos, por lo menos durante las primeras etapas del desarrollo.(47)

En el cerebro de la rata, la división celular termina aproximadamente a los 21 días posnatales (23), de aquí que los efectos de la desnutrición en el desarrollo cerebral, son tanto más severos cuanto más joven es el individuo (40). Diversos estudios muestran que la desnutrición protéica en ratas, instituida posteriormente a su concepción y durante su desarrollo, produce cambios sustanciales en el crecimiento del cuerpo, así como en algunos parámetros neuroquímicos, neuroanatómicos y el contenido cerebral de ADN y ARN, en el metabolismo de aminas biogénicas y en general en el desarrollo cerebral y conductual (40).

Debido a que el problema de crecimiento de infantes desnutridos y al hecho de que el desarrollo del sistema nervioso parece ser especialmente vulnerable a este tipo de alimentación, se han realizado numerosos estudios los cuales demuestran que existe una estrecha relación entre los factores

nutricionales, el crecimiento celular y la maduración del cerebro. La información sugiere que el desarrollo de ambos elementos neural y no neural son significativamente afectados por la desnutrición. Esto incluye procesos y sustancias importantes para la neurotransmisión como la síntesis, degradación y transporte de neurotransmisores, así como sitios de receptores. Por lo que algunas disfunciones en la neuroquímica sináptica induce algunas anormalidades del SNC, las cuales resultan de la desnutrición infantil como posible consecuencia en la modificación de la fisiología sináptica.(60)

Numerosas investigaciones en ratas, demuestran el efecto de la desnutrición sobre el SNC. Así, la desnutrición causa retardo en el crecimiento y desarrollo del cerebro, ya que este órgano, al igual que todos los tejidos 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. De esta manera, la desnutrición produce retardo en el establecimiento de contactos sinápticos, encontrándose de tal modo alteraciones en la memoria, aprendizaje y en el comportamiento entre otros aspectos adicionales (48).

La forma más prevalente de malnutrición en humanos se caracteriza por su naturaleza crónica y generacional. Estudios preliminares en ratas indican que una moderada restricción de proteínas en la primera generación se vuelve restricción más severa de proteínas en la segunda generación. Esto es con base a ganancias de peso de las madres durante el embarazo, el bajo o pobre número de cachorros por camada, el bajo peso del cuerpo del cachorro y el peso del cerebro al nacimiento, las curvas de crecimiento, el incremento en los niveles de triptófano, serotonina, ácido hidroxindolacético (5-HIAA), en el cerebro de la cría al destete (45). Estudios recientes de nuestro laboratorio demuestran que con el modelo de desnutrición en donde se utiliza como fuente única de proteína

el maíz, el cual es limitado en el contenido de triptófano y lisina, se encontró una importante reducción en el peso corporal y órganos, así como varios parámetros del crecimiento celular disminuídos, como son el ADN, ARN, proteínas, aminoácidos y nucleótidos totales en los animales restringidos de dieta (49). Por lo que un suministro bajo de proteínas durante el embarazo es responsable de pequeñas modificaciones en el peso de los fetos hacia el final de la gestación (50). También, se ha demostrado una correlación en el peso cerebral y corporal, mismo que puede ser perturbado por la desnutrición (40). Por lo que se ha demostrado que los pesos de los cerebros así como los contenidos de ácidos nucléicos y proteínas fueron dañados por una dieta baja en proteínas, es decir con restricción protéica, y dichas alteraciones se acentuaron con la dieta a base de maíz (51,57).

Los efectos de la desnutrición sobre varios órganos depende de la duración y severidad de la deficiencia dietética. La malnutrición puede afectar ciertas regiones del cerebro más que otras, dependiendo de la susceptibilidad al momento en que ésta se aplique.

Por otro lado, recientemente se han reportado trabajos sobre la relación que existe entre la nutrición y el desarrollo de los sistemas de neurotransmisión, destacándose entre ellos los estudios que tratan sobre el desarrollo normal de las células 5-HTérgicas y DAérgicas en el SNC, dadas sus implicaciones funcionales. La 5-HT y la DA son de vital importancia por sus 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 (52,53,58,59).

La 5-HT es una amina biogénica que funciona como neurotransmisor y como hormona en el SNC y SNP de los mamíferos. Dentro del cerebro, las neuronas 5-HTérgicas se originan principalmente en los núcleos del rafé del tallo cerebral y se proyectan a otras áreas del SNC, donde regulan

una amplia variedad de funciones sensoriales y motoras (54).

Es indudable que el metabolismo central de la 5-HT y la DA puede ser influenciado por factores dietéticos, ya que el triptófano es el único aminoácido precursor de la síntesis cerebral de la 5-HT y la tirosina el precursor para la DA, es importante señalar que dicho aminoácido participa en diversos procesos metabólicos, por lo que el presente trabajo se diseñó para determinar el efecto de la restricción protéica sobre la unión de espiperona como ligando que reconoce los receptores a 5-HT₁ para 5-HT y D₂ para DA y durante el desarrollo, como uno de los parámetros de la neurotransmisión para 5-HT y DA respectivamente.

H I P O T E S I S

Si una dieta hipoproteica produce un incremento en la concentración de 5-HT y DA en el cerebro de la rata, luego entonces la cantidad de receptores a estas monoaminas se reducirá en el S.N.C. como un mecanismo compensatorio y de plasticidad cerebral.

O B J E T I V O S

- GENERAL:

Determinar el efecto de una dieta baja en proteínas sobre la cantidad de receptores a 5-HT del tipo (5-HT₂) y dopamina tipo (D₂) mediante la unión de espiperona en diferentes regiones del cerebro de ratas durante el desarrollo.

- PARTICULAR:

Cuantificar la unión de espiperona [Esp-³H] a receptores a 5-HT tipo (5-HT₂) y DA (D₂) en corteza cerebral, tálamo, tallo cerebral y cerebelo de ratas bajo restricción proteica.

M A T E R I A L Y M E T O D O S

La Esp-[³H] se adquirió de Dupont New Products (Boston, Massachusetts), la Sacarosa, Acído Ascórbico, Sulfato Cúprico (CuSO₄) y el Tartrato de Sodio y Potasio se adquirió de Merck (México), la Pargilina, el reactivo de Folín, el Trizma Base, la 5-HT y la DA fueron adquiridos de Sigma Chemical Co, (St. Louis, Mo.). El resto de los reactivos fueron de la máxima calidad disponible en el mercado.

Animales de Experimentación:

Se utilizaron 25 ratas de la cepa Wistar, hembras, adultas, de un peso aproximado de 250 a 300 gs., 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 22°C ± 2, con libre acceso al agua y alimento.

Se utilizaron dos tipos de dietas:

- A) Dieta de Chow (nutricubos para roedores), como grupo testigo. (23% Proteína)
- B) Dieta de restricción proteica al 8%. (Tabla I).

Las ratas se alimentaron con la dieta correspondiente desde 5 semanas antes del apareamiento y se mantuvo el tipo de alimentación, durante la gestación y lactancia. Para los animales que se sacrificaron en etapa gestacional (18 y 20 días) la deteminación de la edad se consideró la presencia de espermatozoides en la vagina de las hembras y se tomo como el primer día de gestación, previa citología exfoliativa y tinsión mediante la técnica de Papanicolau (55). Los sacrificios en crías de etapa posnatal son realizados en recién nacidos, 14, 21, 30 60 y 90 días de edad.

Los animales sacrificados después del destete (21 días) continuaron con la misma dieta hasta su sacrificio, 30, 60 y 90 días de edad.

El peso corporal de cada animal se registró antes del sacrificio, los cerebros se extrajeron en frío previa decapitación, para las camadas de 18, 20 días de gestación y 1 día de nacimiento se utilizó el cerebro completo y para las edades de 14, 21, 30, 60 y 90 días se obtuvieron 4 regiones diferentes: 1) Corteza Cerebral, 2) Talámo, 3) Tallo Cerebral y 4) Cerebelo. Las muestras obtenidas de cada región fueron pesadas, los tejidos se mantuvieron en sacarosa 0.32 M a -20°C hasta que se procedió a la extracción de membranas para la cuantificación de unión de espiperona.

Para la extracción de membranas, el tejido se suspendió en 1 ml de Tris-HCl 50 mM, pH=7.7 a 25°C y se homogeneizó mecánicamente con un polytron. El tejido se centrifugó durante 10 min. El sobrenadante se desechó y la pastilla se rehomogeneizó y de nuevo se centrifugó a 17,000 rpm durante 10 min (diametro del rotor 20cm.). El sobrenadante se eliminó y el sedimento fue resuspendido y rehomogenizado en Tris-HCl 50mM, pH=7.4 con 0.1% de ácido ascórbico y $10\mu\text{M}$ de pargilina (Tris de incubación). Se realizaron diluciones de tejido para trabajar con una concentración protéica final de aproximadamente 1 mg/ml, la determinación de proteínas se realizó por el método de Lowry y col.(56) y se utilizó la albúmina de suero de bovino como patrón de referencia.

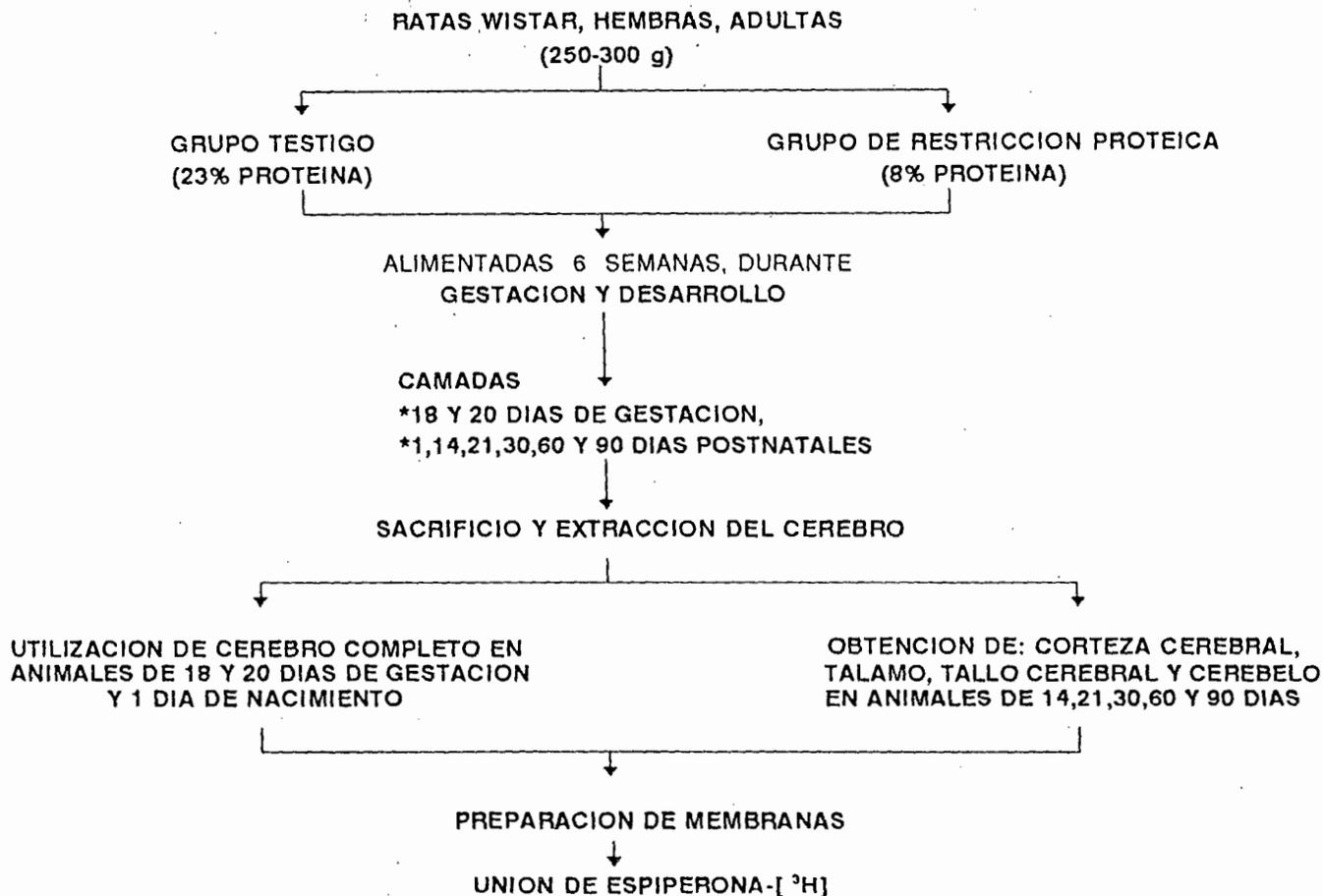
Una vez determinadas las diluciones se tomaron las siguientes cantidades por ensayo para cada muestra de la siguiente manera:

Unión Inespecífica.	Unión específica.
200 μl de muestra.	200 μl de muestra.
10 μl de 5-HT 1mM en Tris	20 μl de Tris de inc.
10 μl de DA 1mM en Tris	

Posteriormente se adicionó 20 μ l de Esp-[3 H] 5nM (concentración superior a las constantes de disociación (Kd) de ambos receptores) a cada una de las mezclas antes mencionadas, mismas que se incubaron a 37°C durante 10 min. La reacción se detuvo con 1 ml de tris de incubación frío y las muestras se lavaron con 4 ml del amortiguador por filtración en fibra de vidrio, para eliminar la Esp-[3 H] que no se incorporó. Los filtros fueron colocados en viales de cristal que contenían 5 ml de líquido de centelleo para cuantificar la radioactividad en un contador de centelleo líquido. El número de experimentos fué entre 4 a 5 y los ensayos se realizaron por triplicado. Los calculos se expresan en fmoles/mg de proteína. Los resultados se evaluaron tomando en consideración la prueba paramétrica t-student y analisis de varianza (ANOVA). (Cuadro 1)

DIAGRAMA

EXPERIMENTAL



R E U L T A D O S

Peso Corporal.

Los resultados obtenidos muestran una importante disminución en el peso corporal de los animales alimentados con una dieta deficiente en proteínas en comparación con el grupo testigo. Esta reducción es más evidente conforme avanza la edad del animal, es decir a medida que el desarrollo del animal es mayor la diferencia de los pesos corporales entre el grupo testigo y experimental resulta ser mayor. De ésta manera el porcentaje de disminución entre las diferentes edades oscila desde los 18 y 20 días de gestación, en un 12-16% respectivamente, mientras que a la edad del recién nacido hasta los 60 días ésta diferencia oscila del 26% hasta el 74%, en tanto que a los 90 días de edad resulta ser del 57% .(Tabla II).

Peso Cerebral.

En relación al peso cerebral, los resultados muestran que las diferencias entre los grupos estudiados no fueron significativas como las que se observaron en los pesos corporales, sin embargo estas diferencias existen y oscilan entre el 7 y 23% de disminución del grupo experimental respecto al grupo testigo. También se encontró una ligera reducción en cuanto al peso de cada región del grupo con restricción proteica respecto al grupo testigo, misma que oscila desde el 7% hasta el 30% .(Tabla III), a pesar de estas diferencias estadísticamente no significativas se observa claramente una tendencia a la disminución del peso.

Unión de Espiperona

Edad gestacional y Recién Nacidos:

Los estudios de receptores muestran que a la edad prenatal se encontró un incremento en la unión de Esp-[³H] en los animales alimentados con dieta hipoprotéica del 32 y 22% a los 18 y 20 días de gestación respectivamente en relación al grupo testigo. Mientras que en las crías recién nacidas el incremento que se registró en la unión de Esp-[³H] fué en menor proporción equivalente a sólo el 7%. (Grafica 1)

Edad Posnatal

Corteza Cerebral

En esta región, los resultados se mostraron muy oscilantes ya que en los animales del grupo experimental de 14, 30 y 90 días se presentó un incremento en la unión de Esp-[³H] del 161%, 14% y 65% respectivamente con respecto al testigo, mientras que en las edades de 21 y 60 días se encontró una disminución en la unión de Esp-[³H] el grupo experimental del 49% y 67% respectivamente en comparación al testigo. (Grafica 2)

Tálamo.

En esta región se encontró a los 14 días de edad un incremento del 56% en la unión de Esp-[³H] en los animales alimentados con dieta hipoprotéica en relación al grupo testigo. En tanto que en el resto de las edades la unión de Esp-[³H] se disminuyó en el grupo experimental en relación al grupo testigo, dicha disminución fué del 20%, 73%, 44% y 71% a la edad de los 21, 30, 60 y 90 días respectivamente en comparación al grupo testigo. (Grafica 3)

Tallo Cerebral.

En esta área se encontró una disminución en la unión de Esp-[³H] respecto al grupo testigo, en todas las edades estudiadas excepto a los 90 días donde por el contrario se encontró un incremento del 41%, para el grupo experimental con relación al grupo testigo. (Grafica 4)

Cerebelo.

En ésta región se encontró una disminución en la unión de Esp-[³H] en el grupo de animales con alimentación hipoprotéica en relación al grupo testigo en la mayoría de las edades estudiadas, esta disminución fue del 70%, 25%, 20% y 12% en las crías de 14, 21, 30 y 90 días respectivamente. Mientras que a los 60 días de edad se encontró un incremento del 112% en el grupo experimental respecto al grupo testigo. (Grafica 5)

D I S C U S S I O N

La restricción protéica en ratas, inducida previamente a la concepción y durante el desarrollo, se ha utilizado ampliamente como un modelo de estudio de la desnutrición, así se conoce que en los animales sometidos a estas condiciones de alimentación se producen cambios en el crecimiento corporal, cerebral y en la neurotransmisión nerviosa (61-63). En el presente trabajo se utilizó el modelo de restricción protéica para conocer los cambios en la neurotransmisión mediada por 5-HT y DA, particularmente por la presencia de receptores del tipo 5-HT₂ y DA₂ que unen a la espiperona.

Los resultados sobre la reducción del peso corporal de las crías de los animales sometidos a restricción (Fig. 11) concuerdan con los resultados obtenidos por otros autores (52,64), y nos indica que el modelo es reproducible por lo que los animales desnutridos prenatalmente ganan menos peso durante la gestación, nacimiento y el desarrollo posnatal (65).

Por otro lado, se conoce que los requerimientos necesarios para la síntesis de proteínas en el organismo, se adquieren a través de la circulación sanguínea como aminoácidos simples, carbohidratos y fuentes de nitrógeno, elementos que deben ser suministrados en la alimentación (66). Con esta base, la disminución en el peso corporal de los animales alimentados con dieta de restricción protéica podría explicarse por una inadecuada disponibilidad de los aminoácidos y por ésta razón la síntesis de proteínas podría ser uno de los parámetros más afectados en éstas condiciones. Lo anterior se apoya con estudios preliminares en este mismo modelo, donde se ha demostrado una

reducción en la cantidad de proteínas, así como una baja en el contenido de ácido ribonucléico y desoxirribonucléico (67).

Respecto al peso de los encéfalos no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos estudiados (TABLA III), lo que permite suponer que una restricción protéica en la alimentación no afecta en forma drástica a éste órgano como a otros tejidos, ya que posiblemente durante la gestación y el desarrollo de los animales, el cerebro, puede favorecerse nutritivamente en forma primordial por la existencia de mecanismos homeostáticos que protegen al SNC, sobre todo a nivel de síntesis de proteínas de tipo estructural. Sin embargo las fluctuaciones en la disponibilidad de nutrientes esenciales pueden modificar otros parámetros neuroquímicos (60).

Los resultados del presente trabajo muestran diferencias en la unión de espiperona en las diversas regiones estudiadas, éste resultado es de esperarse ya que existe gran variabilidad en la inervación 5-HTérgica y DAérgica que llega a cada una de éstas regiones. En este sentido, existen estudios citoquímicos que muestran que el grado de inervación es mayor en corteza cerebral que en tálamo o cerebelo, sobre todo después de la edad del destete, etapa en la que se establecen la mayor parte de las vías monoaminérgicas (62).

Por otro lado, se ha demostrado que los niveles de 5-HT en SNC se incrementan con la edad hasta aproximadamente a los 60 días en la rata, sin embargo, estudios con animales con restricción protéica muestran que los niveles de triptofano (Tp), 5-HT y 5-HIAA en el SNC, son más elevados que los normales (68,69). También, se ha observado que la elevación en la concentración de los neurotransmisores se modifica en forma inversamente proporcional la cantidad de sus receptores como una respuesta compensatoria ó de plasticidad neuronal que permite

mantener el equilibrio en el grado de excitabilidad celular en el SNC (70). De ésta manera, los resultados del presente trabajo muestran un aumento en la unión de espiperona en los animales con restricción protéica durante la edad prenatal (Fig. 13), esto podría sugerir una reducción en la concentración del neurotransmisor en esta etapa en particular del desarrollo del SNC, lo que podría indicar un aumento en el metabolismo de las monoaminas, por un incremento en la disponibilidad del precursor libre ó reducción en la actividad de las enzimas responsables de la degradación como la MAO (63). Aunque experimentos preliminares realizados en este mismo modelo indican una posible muerte celular manifestada por una reducción en el contenido de ADN en estas mismas regiones (71,72). Por otro lado, la restricción protéica produce un retardo de 2 ó 3 días para manifestar el establecimiento de diversos parámetros bioquímicos en el SNC (64,65). Lo anterior, también apoya los resultados obtenidos en la etapa posnatal (hasta los 14 días de edad) la cual presenta un aumento en la unión de espiperona en el grupo experimental en relación al grupo testigo. Sin embargo, después de los 21 días de edad, se observó una reducción en la unión de espiperona prácticamente en todas las regiones estudiadas en el grupo experimental en relación al grupo control, esto podría deberse a un aumento en el contenido de monoaminas como se ha reportado por diversos autores con el uso de modelos de restricción protéica (58,60,72). Así, se han propuesto algunos factores que pueden determinar un incremento en la concentración de neurotransmisores bajo éstas condiciones de nutrición: a) reducción en la actividad de las enzimas que degradan a la 5-HT ó DA, b) una disminución en la cantidad de proteína enzimática degradante y c) una reducción en los aminoácidos que compiten con el precursor para entrar al SNC (73).

Por otro lado, la disminución en la unión de espiperona que se observa en la mayor parte de las edades y regiones estudiadas, también puede ser el reflejo de una reducción en el número de

receptores ó una reducción en la expresión del gen que codifica para estos receptores, ya que resultados preliminares demuestran una disminución en el contenido de RNA y proteínas en diversas regiones del SNC de ratas alimentadas bajo el modelo utilizado para este trabajo (74-76). Por lo tanto, sí existe un cambio en la afinidad del receptor por el ligando ó cambios en la estructura molecular de las proteínas que conforman estos receptores con modificación en el reconocimiento del receptor por su ligando, con los resultados del presente trabajo no es posible conocerlo, por lo que será necesario realizar estudios adicionales de cinética de unión para comprobar esta posibilidad, así como estudios de hibridización in-situ para el RNAm del receptor a 5-HT₂ ó DA₂, para demostrar plenamente una reducción en la expresión selectiva del gen(es) correspondiente(s), su posible modificación estructural del receptor, ó el desarrollo de posibles mecanismos de compensación bajo condiciones de restricción protéica.

C O N C L U S I O N E S

- 1.- Los resultados obtenidos en relación al peso corporal y cerebral, son acordes con los reportados por otros autores.
- 2.- La restricción proteica induce un incremento en la unión de Esp-[³H] durante la etapa prenatal.
- 3.- La resticción proteica induce una reducción en la unión de Esp-[³H] durante la edad posnatal y en la mayoría de las regiones estudiadas.
- 4.- La etapa de los 14 días de edad puede ser un período crítico para el desarrollo de los sistemas monoaminérgico en condiciones de restricción proteica mientras que éste puede ser menos vulnerable en las otras edades estudiadas.
- 5.- Los resultados indican que la desnutrición afecta la cantidad de receptores a monoaminas, lo que pudiera implicar algunos cambios en la fisiología de la neurotransmisión.

B I B L I O G R A F I A

- 1) López Antúnez. (1983): **Anatomía Funcional del Sistema Nervioso**, Ed. LIMUSA, 1a. Ed., México, p.433-465.
- 2) Noback, C.R. y Robert J. Demarest. (1980): **Sistema Nervioso Humano. Fundamentos de Neurobiología**, Ed. Mc Graw Hill, 1a.Ed. México, p.1,10,33-34,223-234,310.
- 3) Gilman, S., S. Winans, M. Newman and Gatz. **Essential of clinical neuroanatomy and neurophysiology**. 7a. Ed. Philadelphia p. 252-276.
- 4) Schmidt, R. y J. Dudel, W. Janig y M. Zimmermann. (1980): **Fundamentos de Neurofisiología**, Ed. Alianza Editorial, Madrid pp. 11-13, 104-139, 141- 150.
- 5) Pappas, G. D. y Waxman, S. G. (1972): Synaptic fine structure-morphological correlates of chemical and electronic transmission. En: G. D. Pappas and D. P. Purpura (Eds.), **Structure and function of synapses**. Raven Press, New York, pp. 1-43.
- 6) Bruce, A., D. Bray, J. Lewis y J.D. Watson. (1986): **Biología Molecular de la Célula**
- 7) Llinás, R., y Nicholson, C. (1975): Calcium role in depolarization secretion coupling: An aequorium study in squid giant synapse. **Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)** 72:187-190.
- 8) Roberts, E. y Hammerschlag, R. (1976): Amino acid

- transmitters. En: **Basic Neurochemistry**, Siegel, G.J. Wayne Albus, R., Katzman, R. y Agranoff, B.W. Boston p. 218-245.
- 9) De feudis, F. V. (1975): Amino acids as central neurotransmitters. **Ann. Rev. Pharmac.** 15:105-130.
- 10) Pasantes, H., J. Sánchez y R. Tapia. (1994): **Neurobiología Celular**. Ed. Fondo de Cultura Económica, México. pp.167.
- 11) Krnjjevic, ZK. (1974): Chemical nature of synaptic transmission in vertebrates **Physiol. Rev.** 54: 418-450
- 12) Schwartz, J.H. (1981): Chemical Basis of Synaptic Transmission. En: **Principles of Neuronal Sciences**, Kandel, E.R. y Schwartz, J.H. pp. 106-120.
- 13) Lindstrom, J.M. (1978): Biochemical studies of receptors solubilization, purification, characterization, and studies with antibodies. En: **Neurotransmitter Receptor Binding**. Yamamura, H.I., Enna, S.J. y Kuhar, M.J., Raven Press, New York, pp 91-111.
- 14) Carlsson, A., Falck, B., and Hillarp, A. (1962): Cellular localization of monoamines by a fluorescence method. **Acta. Physiol. Scand**, 56: 1-26.
- 15) Poirier, L. J., Sing, P., Sourkes, T. R., and Borchert, R. (1967): Effect of amine precursors on the concentration of striatal dopamine and serotonin in cats with and

- without unilateral brain stem. **Brain Res.**, 6: 654-666.
- 16) McLennan, H. and York, D. H. (1967): The activity of dopamine on neurons of the caudate nucleus. **J. Physiol. (Lond.)**, 189: 393-404.
 - 17) Bliss, E. L. Ailion, J y Zwanziger, J. (1968): Metabolism de norepinephrine, serotonin and dopamine in the rat brain with stress. **J. Pharmac. Exp.** 164: 122-134.
 - 18) Andén, N.E. Dahlström A., Fuxe N. y Larsson K. (1975): Futher evidence for the presence of nigro-neostriatal dopamine neurons in the rat. **Amer. J. Anat.** 116: 329-333.
 - 19) Webster, D.E. (1971): Corticostriate interrelations in the albino rat. **J. Anat.** 95:532-544.
 - 20) Carman, J.B., Cowan, W. N. Powell, T.P.S. (1963): The organization of the corticostriate conexions in the rabbit. **Brain.** 86: 525-562.
 - 21) Webster, K.E. (1965): The cortico-striatal projection in the cat. **J. Anat.** 99: 329-337.
 - 22) Kemp, J.M. y Powell, T.P.S. (1970): The cortico-striate projection in the monkey. **Brain.** 93: 525-546.
 - 23) Cooper, J.R., F.E. Bloom, M.D., R.H. Roth, Ph.D. (1984): **Las Bases Bioquímicas de la Neurofarmacología**, Ed. El Manual Moderno, 4a. Ed. México, p. 175-201.
 - 24) Glowinski, J. (1970): Storage and release of monoamines in the central nervous system. En: **Handbook of -neurochemistry**. Lajtha, A. (Ed.) Plenum press, New York-Londres, pp. 91-111.

- 25) Receptor nomenclature supplement. (1994): **Trends in Pharmacological Sciences**. pp. 13,21,22.
- 26) Page, I. H. y Carlsson, A. (1970): En: **Handbook of Neurochemistry**. Lajtha, A. (Ed.) Plenum Press, New York, pp. 251-262.
- 27) 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.** 362, 63-73.
- 28) McGeer P. L., McGeer E. G. y Hattori T. (1979): Biochemical Interactions in the Basal Ganglia. **Prog. Brain Res.** 51, 285-301.
- 29) 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.
- 30) 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.
- 31) Beaudet, A. y Sotelo, C. (1981): Synaptic remodeling of serotonin axon terminals in rat agranular cerebellum. **Brain Res.** 206: 305-326.
- 32) Moore R. Y. **The Anatomy of Central Serotonin Neurons System in the Rat Brain**. Jacobs B.L. y Gelperin A. The MIT Press. Massachusetts, U.S.A.
- 33) Beas-Zárate, C., Sandoval M. E., Feria-Velasco A.

- (1984): Serotonin uptake and release from rat cerebellum in vitro. **Journal of Neuroscience Research** 12:129-136.
- 34) Biegon, A., Rainbow C. T., McEwen B. (1981): Quantitative autoradiography of serotonin receptors in the rat brain. **Brain Res.** 242: 197-204.
- 35) Feria V. A. Martínez M. D. y Rubio D. F. (1986): **Epilepsia, Un Enfoque Multidisciplinario.** Ed. Trillas; 1a. Ed. México, p. 125-127.
- 36) Levitt P., Pintor J. E. y Breakefield X.O. (1982): Immunocytochemical Demonstration of Monoamine Oxidase in Brain Astrocytes and Serotonergic Neurons. **Proc. Nat. Acad. Sci. USA**, 79, 6385-89.
- 37) Snyder S. H. (1976): Catecholamines, serotonin and histamine. En: **Basic neurochemistry.** Siegel, G. J., Albers, R. W., Katzman, R. y Agranoff, B.W. (Eds.). Little, Brown and Col. Boston. pp. 203-217.
- 38) Slotkin, T.A., Seidler, F.J., Withmore, W.L., Lau, Ch., Salvaggio, M. y Kirksey, D. (1978): Rat brain synaptic vesicles: uptake specificities of ³H-norepinephrine and ³H-serotonin in preparations from whole brain and brain regions. **J. Neurochem.** 31: 961-968.
- 39) Katz B. y Miledi R. (1967): A Study of Synaptic Transmission in the Absence of Nerve Impulse. **J. Physiol. Lond.** 192, 407-436.
- 40) Fagg, G. E. y Lane, J.D. (1979): The uptake and release of putative amino acid neurotransmitter. **Neuroscience.** 4:1015-1036.

- 41) Woodward, D. L., Hoffer, B. J. y Altman, J. (1974): Physiological and pharmacological Properties of Purkinje Cells in Rat Cerebellum Degranulated by Postnatal x-irradiation, **J. Neurol.** 5, 283-304.
- 42) Julius D. (1991): Molecular Biology of Serotonin Receptors, **Annu. Rev. Neurosci.** 14, 335-60.
- 43) Quirion R., J. Richard y T.V. Dam. (1984): Evidence for the Existence of Serotonin Type-2 Receptors on Cholinergic Terminals in Rat Cortex, **Brain Res.** 333, 345-349.
- 44) Windholz M. y Budavari S, (1983): **The merck index.** Ed. 10a. Merck & Co., Inc. pp.1252-1253.
- 45) Avitabile M., Serra I. Mathias A.P. y Guifrida A.M. (1981): Effect of undernutrition on RNA synthesis in various regions of developing rat brain. **Bull. Mol. Biol. Med.** 6, 32-43.
- 46) Van Geijn H.P., Kaylor, W.M., Nicola K.R. y Zuspan E. (1980): Induction of several intrauterine growth retardation in Sprague-Dawley rat. **Am. J. Obstet. Gynecol.** 137-43.
- 47) Snyder S. H. (1976): Catecholamines, serotonin and histamine. En: **Basic neurochemistry.** Siegel, - G.J., Albers, R.W., Katzman, R. y Agranoff, B.W. (Eds.). Boston. pp. 203-217.
- 48) Lindstrom, J. M. (1978): Biochemical studies of receptors: solubilization, purification, characterization, and studies with antibodies. En: **Neurotransmitter receptor binding.** Yamamura, H.I., -

- Enna, S.J. y Kuhar, M.J., Raven Press, New York, pp 91-111.
- 49) Srivastava U.S. (1985): Nucleic acid and protein metabolism in undernutrition and protein deficiency. **Prog. Food Nutr. Sci.** 9 (1-2), 63-107.
- 50) 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.
- 51) C. Adolfo (1981): Nutrición y desarrollo cerebral. **Información científica y tecnológica.** 3 (4), 4-8
- 52) Mayron W. (1976): **Malnutrition and brain development.** Edit. Oxford University Press, 35-92.
- 53) Morgane P.J., Miller M., Kemper T., Forbes W., Hall - R., Bronzino J., Kissane J., Hawrylewicz E. y Resnick O. (1978): The effects of protein malnutrition on the developing Central Nervous System in the rat. **Neurosc. and Biobehav. Rev.** 23, 137-320.
- 54) Wurtman R.J. y Wurtman J.J. (1977): **Nutrition and the brain.** Reven. Press. Book. LTD. 2, 148-213.
- 55) López A. G. y Aguirre V. O. (1975): **Introducción al citodiagnóstico.** 1a. Ed. Comisión editorial de la Universidad de Guadalajara.
- 56) Lowry, O.H., Rosenbrough, N.H., Farr, A.L., and Ransal, R.J. (1951): Protein measurement with the folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.** 193:265-275.

- 57) Tirapegui, J. O. and De Angelis R.C. (1984): Quality of maternal diet and biochemical changes in the brain of the off spring. Study in rats. **Arq. Gastroenterol.** 21 (2), 78-82.
- 58) Tissari A. H. (1973): Serotonergic mechanisms on ontogenesis. **Fetal Pharmacology.** Edit, by L. Boreus, Raven Press. 237-257.
- 59) Fernstrom J. D. (1981): Physiological control of brain serotonin synthesis: Relevance to physiology and behavior. In: **Serotonin neurotransmission and behav.** (Ed) Jacobs B. L. and Gelperin A. The MIT Press, London, Eng. S, 75-102.
- 60) Wiggins R. C., Fuller G. y Enna S.J. (1984): Under nutrition and the development of brain neurotransmitter systems. **Life Sci.** 35 (21), 2085-94.
- 61) Del Angel A. R. y Sotelo A. (1982): Nutrive value of mixtures using chik-peas with, triticale, normal and opaque-2 corns. **J. Nutr.** 112, 1474-80.
- 62) Hirose-T. (1992): Effects of nutritional status on contens of tryptophan, serotonin and 5-hydroxyindolacetic acid in rat brain. **Nippon-Eiseigaku-Zaschi.** 47 (2), 627-633.
- 63) Gambardella P., Greco A. M. Sticchi R. y D' Aponte D. (1990): Circadian rhythm variations in the adult rat induced by low and high protein diets administered at various stages of development. **Chronobiol. Int.** 7 (1), 43-50.
- 64) Beas-Zarate C., Del Angel A. R., Morales Villagran A.

- y Feria-Velasco A. (1989): Serotonin uptake in the central nervous system of the rats fed a corn-diet. **Comp. Biochem. Physiol.** 89 (2), 173-177.
- 65) Forbes W. A., Tracy C., Resnick O. y Morgan P.J. (1977): Effects of maternal dietary protein restriction on growth of the brain and body in the rat. **Brain Res. Bull.** 2, 131-35.
- 66) Mayes P. A., Rodwell V. W. y Martín D. W. (1984): **Bioquímica de Harper.** Ed. El Manual Moderno, Ed. 9 591-612.
- 67) Romero C.J.T. (1984): Tesis de Lic. en Biología, Fac. de Ciencias, U. de G. Reg. 080600615.
- 68) Resnick, O., and Morgane, P. J. (1984): Ontogeny of levels of serotonin in various parts of the brain in severaly protein malnourished rats. **Brain Res.** 303:163-170.
- 69) De Marte, M.L., and Enesco, H. E. (1985): Influence of diet on plasma tryptophan an brain serotonin levels in mice. **Experientia.** 41: 48-50.
- 70) Peters. D. (1986): Prenatal stress: Effect on development of rat brain serotonergic neurons. **Pharmacol. Biochem. and Behav.** 40 (6), 1199-1206.
- 71) Hall R. D., Leahy, J. P., and Robertson, W. M. (1983): Hyposensitivity to serotonergic stimulation in protein malnourished rats. **Physiology & Behavior,** 1: 187-195.
- 72) Del Angel A. R., C. Beas y A. Morales. (1989): Effects on corn-fed and protein restriction on rat cerebellum

and brain stem maturation. **Nutrition Reports International**, 40 (6),1199-1206.

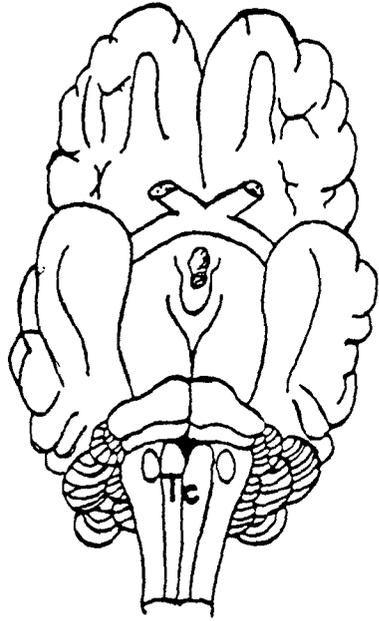
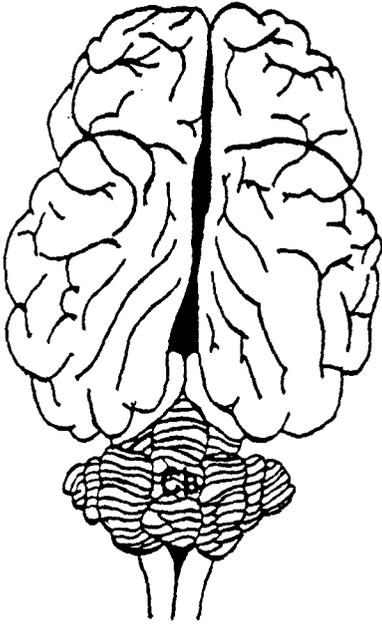
- 73) R. J. Hernández. (1973): Developmental Pattern of the serotonin synthesizing enzyme in the brain of postnatally malnourished rats. **Experientia**. 29:12 1487-1488.
- 74) Fernstrom J. D. y Hirsch M. J. (1977): Brain serotonin synthesis: Reduction in corn-malnourished rat. **J. Neurochem**. 26,877-879.
- 75) Cervantes S. S. G. Tesis Lic. en Biología Fac. Cs. Biológicas U. de G. Reg. 078032111 mzo. (1987).
- 76) Bouton, A., Baker, Glen., B. and Hrdina P. (1986): The Human Pres. Clifton New Jersey. **Neuromethods 4. Receptor Binding**. pp 145.

RELACION DE TABLAS Y FIGURAS

F I G U R A 1

UBICACION ANATOMICA DEL CEREBELO Y EL TALLO CEREBRAL

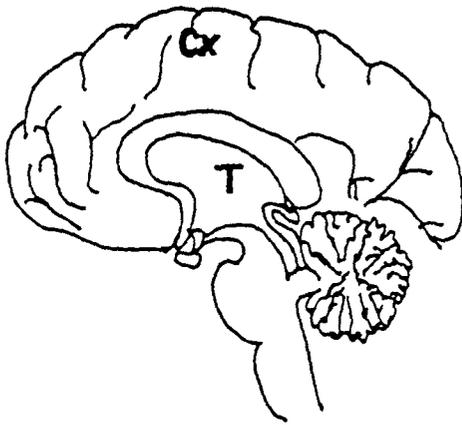
En la figura se muestra la localización del cerebelo (Cb) el cual se encuentra en la parte caudal de los hemisferios cerebrales y el tallo cerebral (Tc) que está muy relacionado con el cerebelo, ya que se encuentra bajo este excepto en su parte más rostral.



F I G U R A 2

UBICACION ANATOMICA DEL TALAMO Y LA CORTEZA CEREBRAL

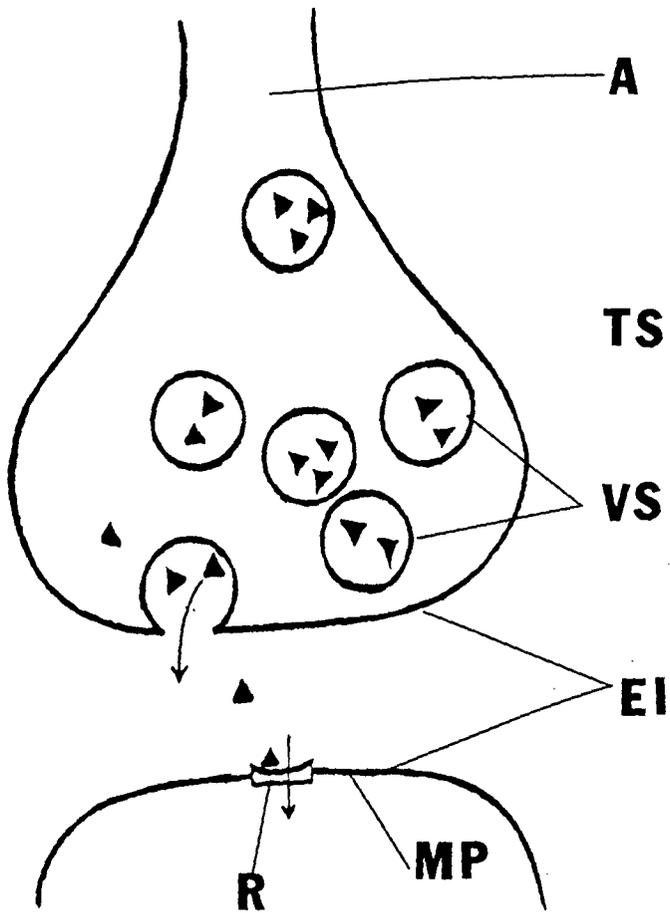
En la figura se muestra la localización de la corteza cerebral (Cx) y del tálamo (T) el cual está interconectado con la primera, que es una capa delgada que cubre el total del volumen cerebral.



F I G U R A 3

MORFOLOGIA DE LA SINAPSIS QUIMICA

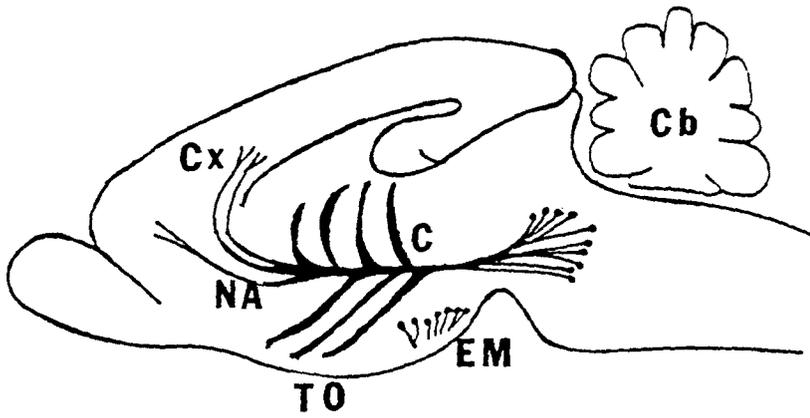
En la figura muestra una sinapsis clásica, en el elemento presináptico o terminal presináptica (TS) se encuentran las vesículas sinápticas (VS) que almacenan el transmisor, mismas que mediante un proceso de exocitosis liberan este neurotransmisor al espacio observado entre los elementos pre y postsináptico (espacio intersináptico, EI), para interactuar con la zona de recepción del transmisor, receptor, (R), localizado en la membrana postsináptica (MP). Axón (A).



F I G U R A 4

DISTRIBUCION DE LAS VIAS DOPAMINERGICAS EN EL SNC

En esta figura se representa la localización de los principales cuerpos celulares que contienen las concentraciones más elevadas de DA; cuerpo estriado (C), corteza límbica (Cx), Nucleo accumbens (NA), tubérculo olfatorio (TO), tálamo, hipotálamo y eminencia media (EM).



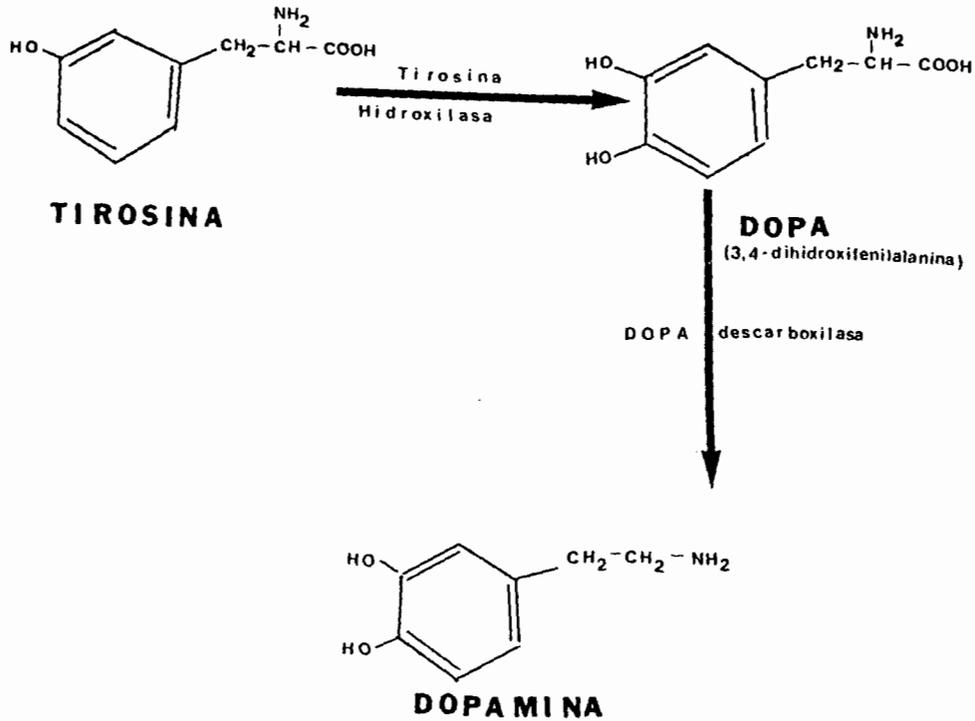
F I G U R A 5

METABOLISMO DE LA DOPAMINA

En esta figura se describen las vías metabólicas que inducen a la síntesis de la DA a partir de la tirosiona, y la degradación a su metabolito final, así como las enzimas que intervienen en cada caso.



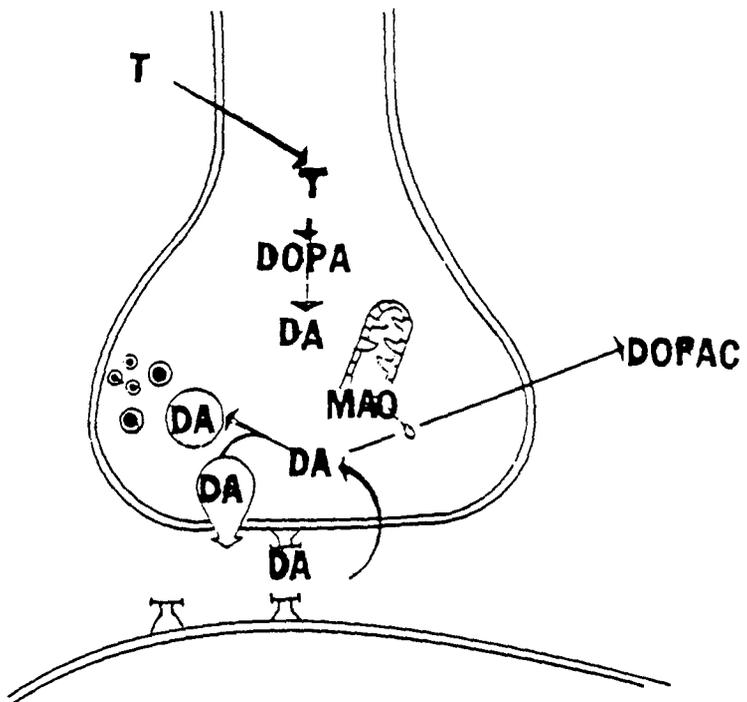
METABOLISMO DOPAMINA



F I G U R A 6

SINAPSIS DOPAMINERGICA

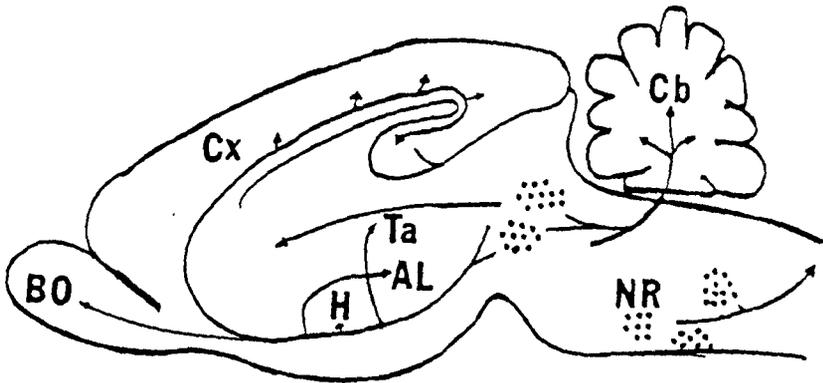
En esta figura se puede apreciar la síntesis de la DA a partir de la tirosina, su almacenamiento en vesículas y la liberación al espacio al espacio intersináptico, así como la unión con el receptor en la terminal postsináptica y su inactivación por recaptura.



F I G U R A 7

DISTRIBUCION DE LAS VIAS SEROTONINERGICAS EN EL SNC

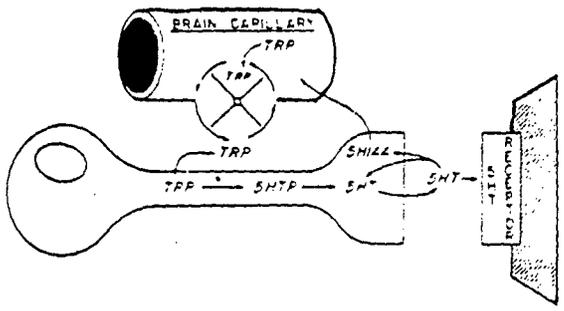
En esta figura se representa la localización de los principales cuerpos celulares que contienen 5-HT; el núcleo del rafe (NR), el cerebelo (Cb), algunas areas límbicas (AL), hipocampo (H), tálamo (Ta), bulbo olfatorio (BO), corteza cerebral (Cx) y cuerpo estriado (C).



F I G U R A 8

TRANSPORTE DE SEROTONINA AL SNC

En esta figura se representa el transporte activo del precursor de la 5-HT, el triptófano, del torrente sanguíneo a el cerebro.

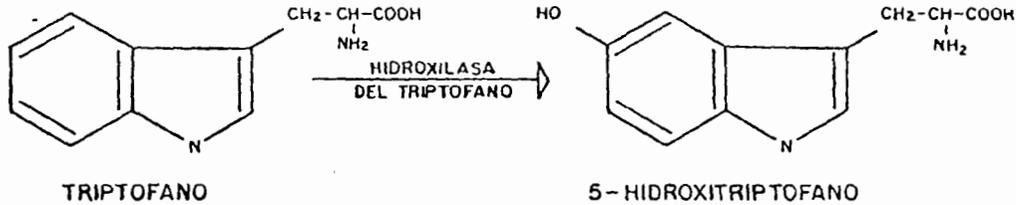


F I G U R A 9

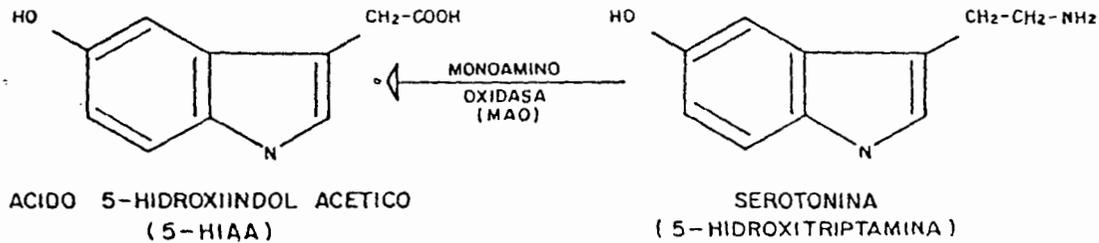
METABOLISMO DE LA SEROTONINA

En esta figura se describen las vías metabólicas que inducen a la síntesis de la 5-HT a partir del triptófano, y la degradación a su metabolito final, el ácido 5-HIAA, así como las enzimas que intervienen en cada caso.

METABOLISMO DE LA SEROTONINA



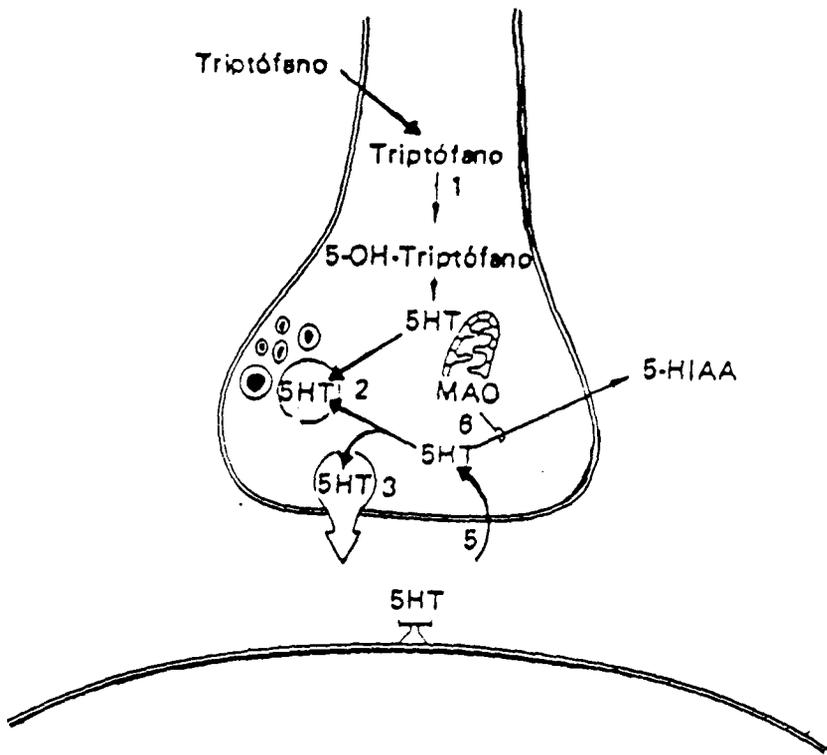
DESCARBOXILASA DE 5-HIDROXITRIPTOFANO
(DESCARBOXILASA DE LOS AMINOACIDOS AROMATICOS)



F I G U R A 1 0

SINAPSIS SEROTONINERGICA

En esta figura se puede apreciar la síntesis de la 5-HT a partir del triptófano, su almacenamiento en vesículas y la liberación al espacio al espacio intersináptico, así como la unión con el receptor en la terminal postsináptica y su inactivación por recaptura.



T A B L A I

COMPONENTES DE LA DIETA HIPOPROTEICA

En esta tabla se muestran los elementos que constituyen la dieta hipoprotéica (con un contenido de proteínas del 8%). Los datos representan los gramos del componente por kilogramo de dieta.

COMPONENTES DE LA DIETA AL 8%
(g/Kg. de dieta)

COMPONENTES	CANTIDADES
Chow (Proteína)	340.00
Aceite Vegetal	31.50
Sales Minerales	10.00
Vitaminas	10.00
Sacarosa	201.00
Glucosa	190.00
Dextrina	126.70
Celulosa	90.80

T A B L A I I

PESO CORPORAL

En esta tabla se muestra el peso corporal de las crías durante el desarrollo a las diferentes edades estudiadas. @Los resultados se expresan en g y representan la media \pm la desviación estándar de la n correspondiente.

Estadísticamente significativo con respecto al control:

*P<0.001 ● P<0.05 ☆ P<0.01 □ N.S.

EDAD/DIAS	T E S T I G O	H I P O P R O T E I C A
1 2	1.390 ± 0.134 (N=12)	1.218 ± 0.234 (N=12) ☆
2 0	3.498 ± 0.293 (N= 9)	2.922 ± 0.154 (N=10) *
R.N.	6.988 ± 0.460 (N= 9)	5.184 ± 0.374 (N= 8) *
1 4	49.12 ± 2.740 (N=10)	14.54 ± 0.710 (N=10) *
2 1	49.98 ± 0.570 (N=10)	16.57 ± 0.920 (N=10) *
3 0	112.05 ± 9.680 (N= 9)	26.31 ± 2.440 (N= 8) *
6 0	289.98 ± 29.25 (N= 5)	76.00 ± 8.510 (N= 5) *
9 0	305.33 ± 59.84 (N= 5)	133.00 ± 7.280 (N= 5) *

T A B L A I I I

PESO CEREBRAL

En esta tabla se muestra el peso del encéfalo de las crías en las diversas edades estudiadas. Los resultados se expresan en g y representan la media \pm la desviación estándar de la n correspondiente. $P < 0.05$ ★ □ N.S.

EDAD DIAS	TESTIGO	HIPOPROTEICA
18	0.393 ± 0.013 (N=12)	0.088 ± 0.011 (N=12) <input type="checkbox"/>
20	0.150 ± 0.014 (N= 9)	0.120 ± 0.001 (N=10) <input checked="" type="checkbox"/>
R.N.	0.289 ± 0.018 (N= 9)	0.240 ± 0.010 (N= 8) <input checked="" type="checkbox"/>
14	1.285 ± 0.036 (N=10)	1.190 ± 0.129 (N=10) <input type="checkbox"/>
21	1.570 ± 0.047 (N=10)	1.285 ± 0.036 (N=10) <input checked="" type="checkbox"/>
30	1.720 ± 0.060 (N= 9)	1.345 ± 0.032 (N= 8) <input type="checkbox"/>
60	2.020 ± 0.503 (N= 5)	1.563 ± 0.510 (N= 5) <input type="checkbox"/>
90	2.028 ± 0.090 (N= 5)	1.660 ± 0.073 (N= 5) <input type="checkbox"/>

G R A F I C A 1

UNION DE ESP-[³H] EN ETAPA PRENATAL

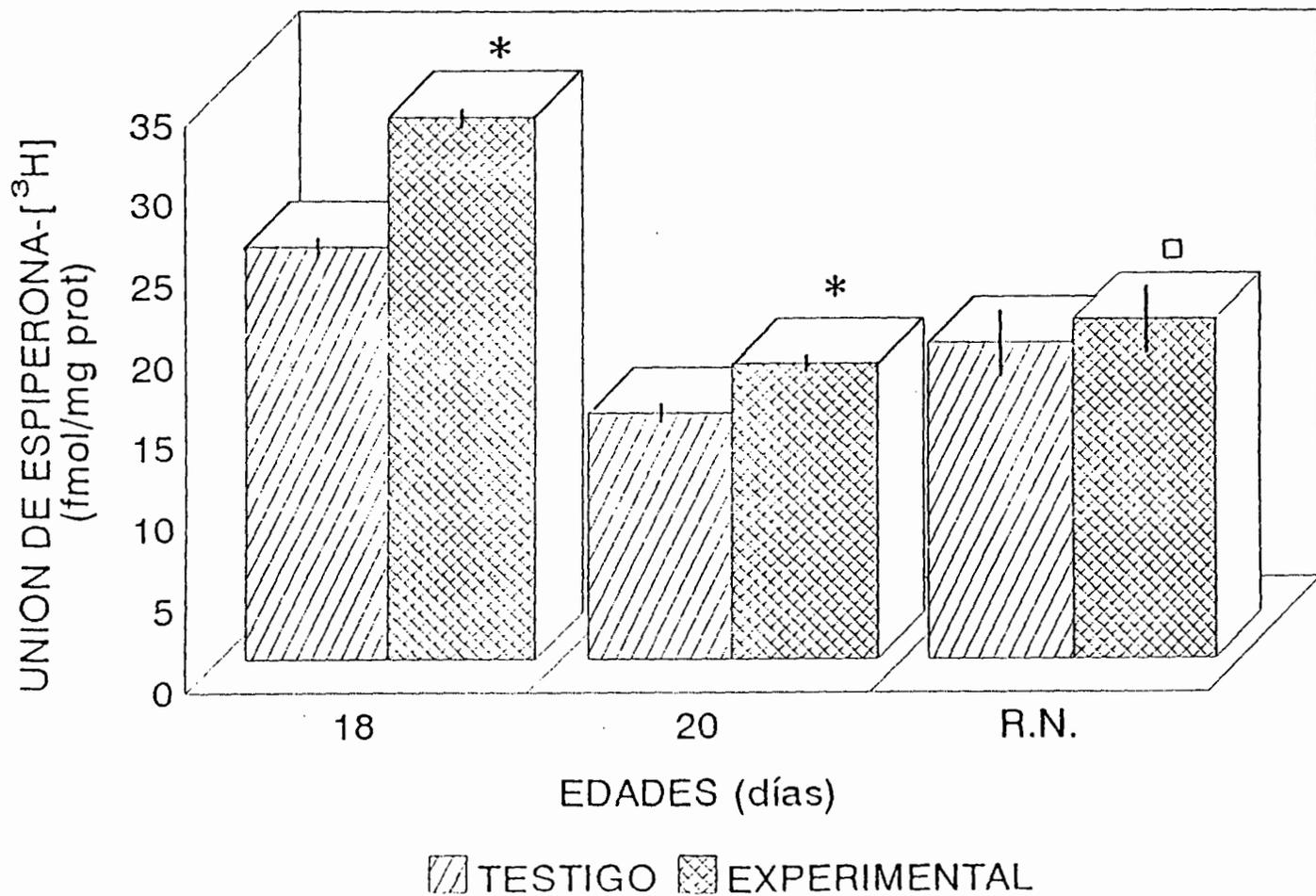
La gráfica muestra que la restricción proteica en etapa de gestación induce un incremento en la unión de Esp-[³H] respecto al grupo testigo.

*Los resultados representan la media \pm la desviación estándar de 4-5 experimentos con determinación por triplicado.

* $p < 0.001$

N.S.

PRENATALES



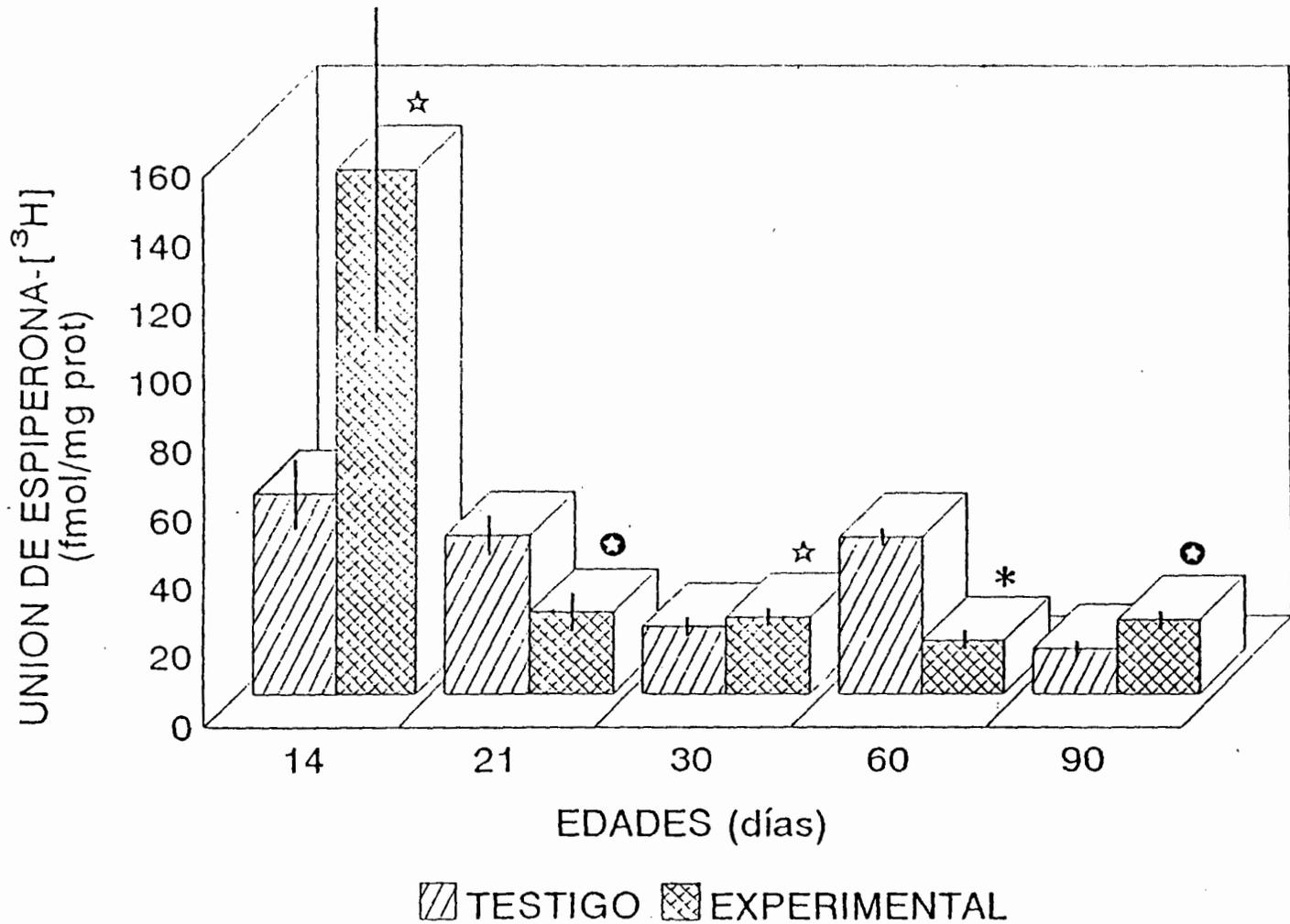
G R A F I C A 2

UNION DE ESP-[³H] EN CORTEZA CEREBRAL

La unión de Esp-[³H] en Corteza Cerebral, se observa más oscilante a lo largo de las diferentes edades posnatales estudiadas.*

*P<0.001 ☆ P<0.01 ⊕ P<0.05

CORTEZA CEREBRAL



G R A F I C A 3

UNION DE ESP-[³H] EN TALAMO

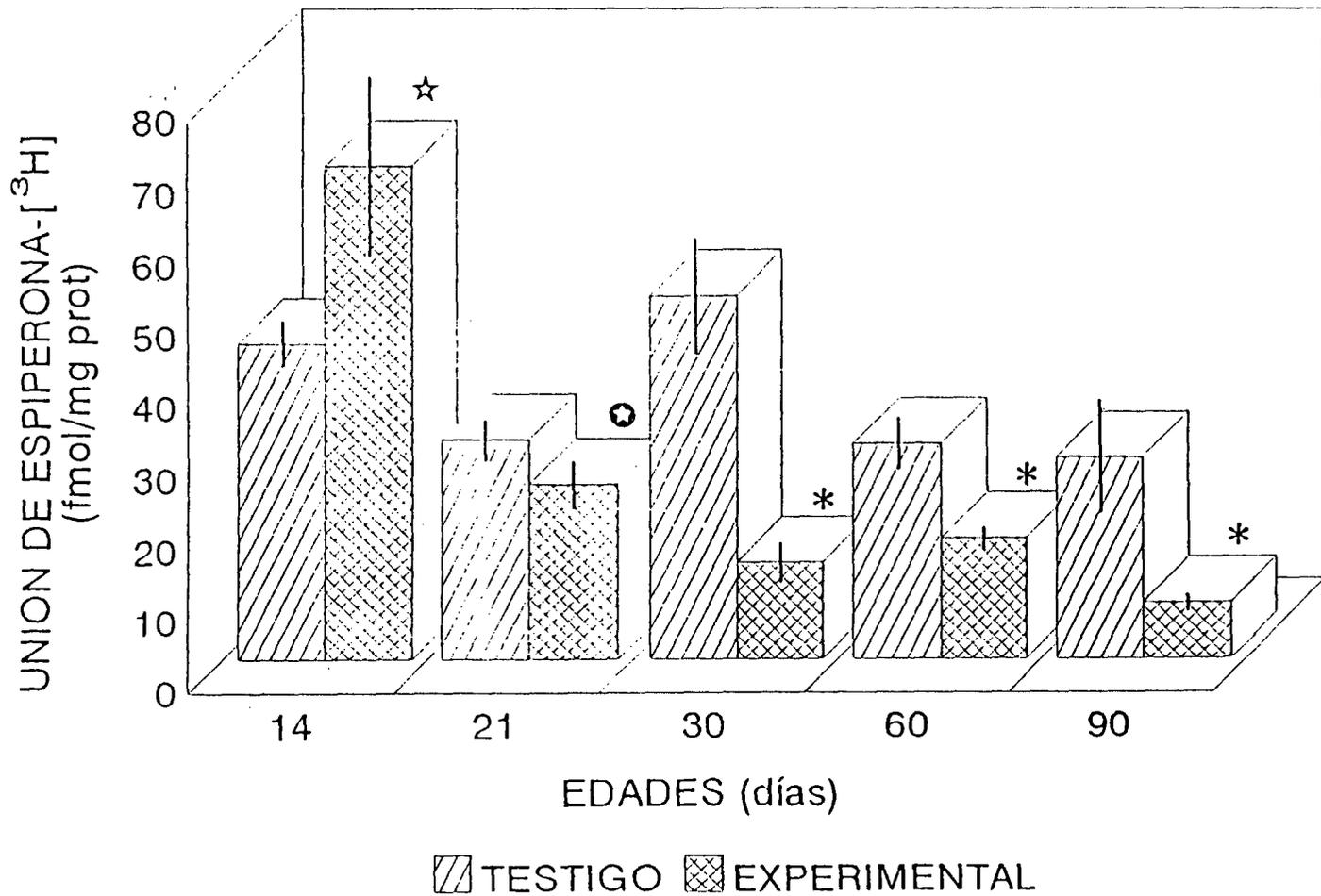
Los resultados muestran que la unión de Esp-[³H] en tálamo disminuyó significativamente a excepción del grupo de 14 días donde por el contrario el incremento fue significativo.*

*P < 0.001

☆ P < 0.01

⊛ P < 0.05

TALAMO



G R A F I C A 4

UNION DE ESP-[³H] EN TALLO CEREBRAL

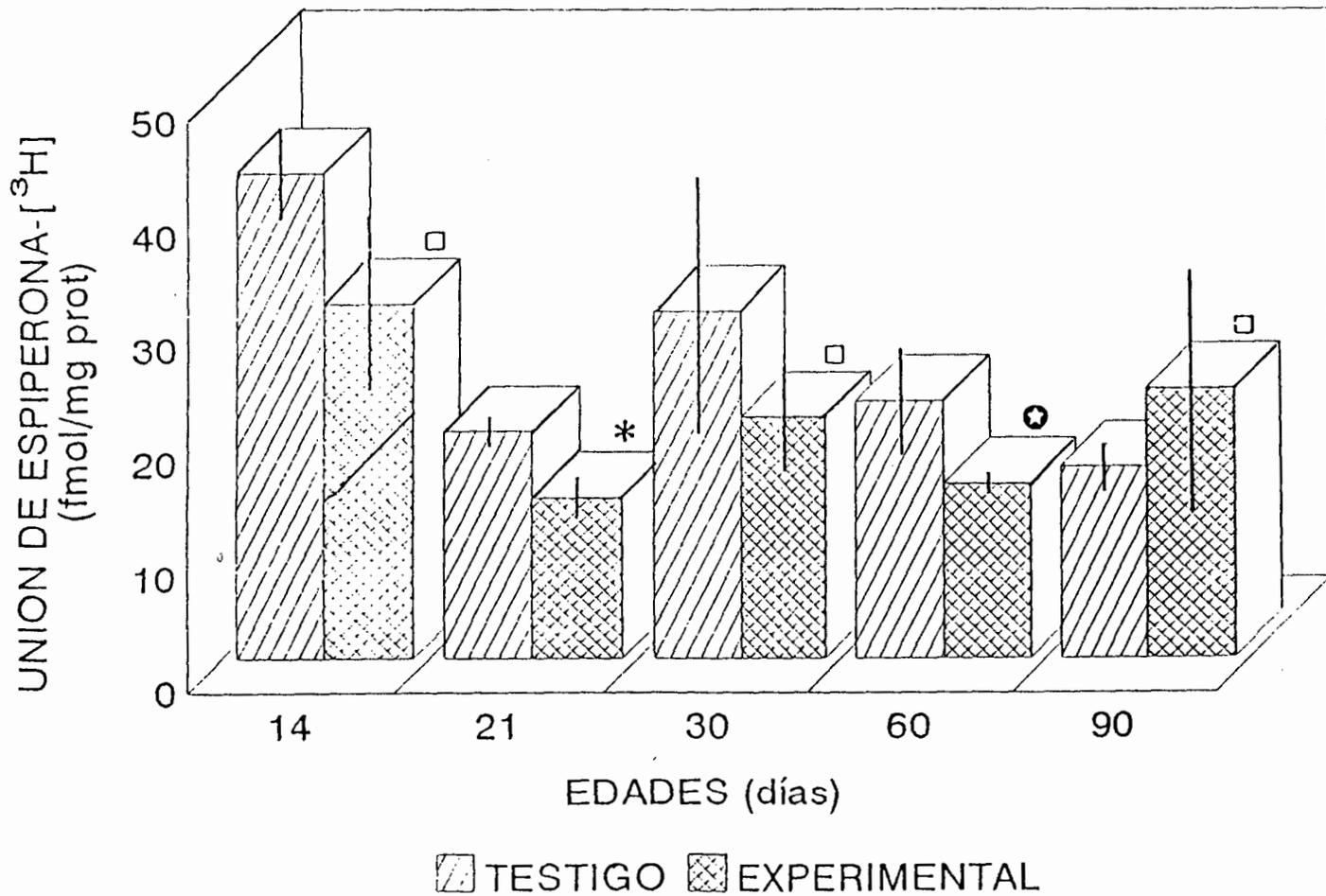
En la gráfica se indica la unión de Esp-[³H] en Tallo Cerebral y se observa una disminución en ésta durante el desarrollo, excepto a los 90 días en donde por el contrario se encontró un aumento considerable.*

□ N.S

* P < 0.001

★ P < 0.05

TALLO CEREBRAL



G R A F I C A 5

UNION DE ESP-[³H] EN EL CEREBELO

La unión de Esp-[³H] en Cerebelo disminuyó en todas las edades del grupo experimental a excepción de los animales de 60 días, en esta etapa la unión se incrementó.*

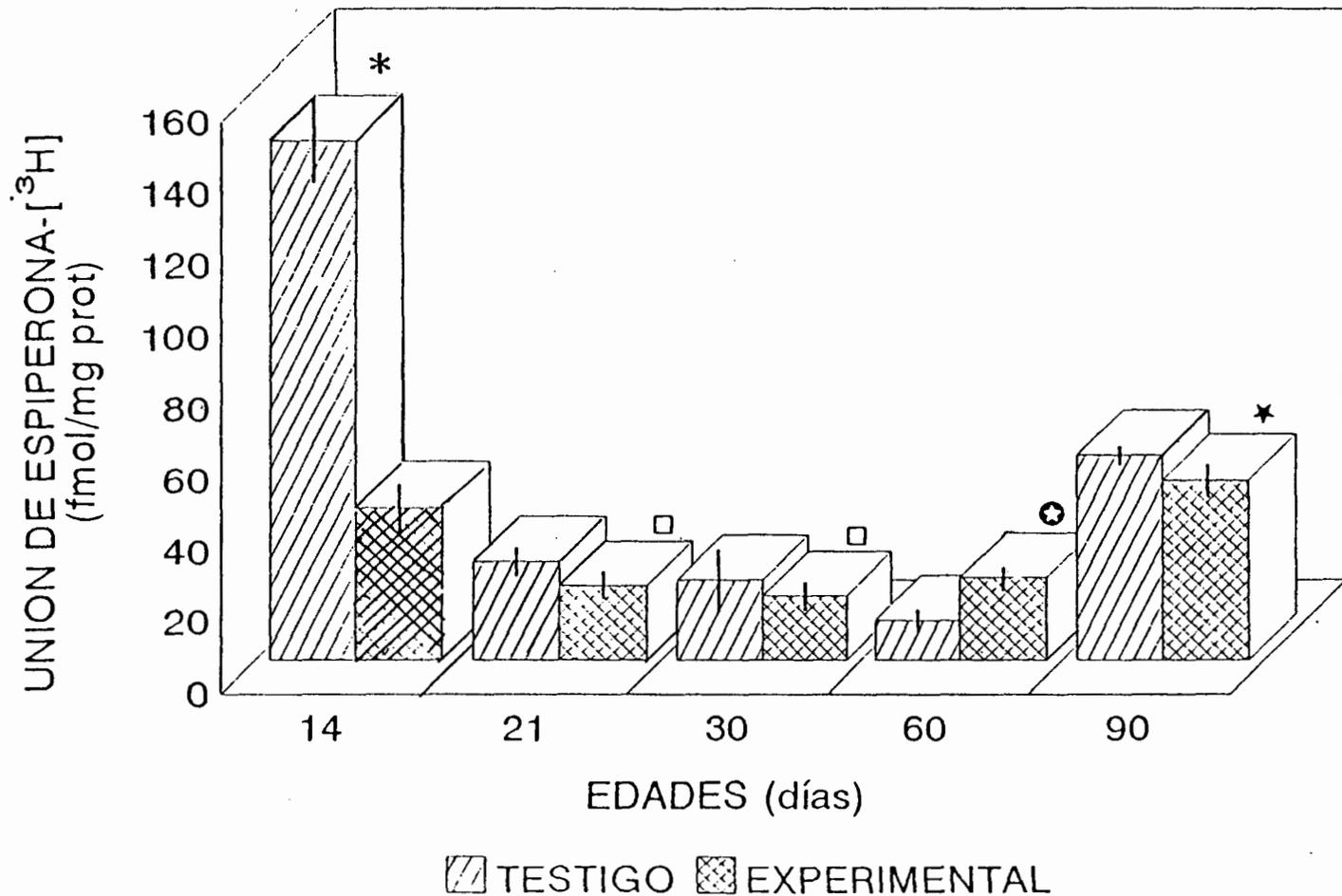
□ N.S

* P < 0.001

⊕ 0.05

★ P < 0.02

CEREBELO



C. LETICIA RAMIREZ CORTES
P R E S E N T E . -

Manifestamos a usted, que con esta fecha, ha sido aprobado el tema de Tesis "UNION DE ESPIPERONA A RECEPTORES TIPO SEROTONINA (5 - HT2) Y A DOPAMINA (D2) EN CEREBRO DE RATAS BAJO RESTRICCIÓN PROTEICA" para obtener la Licenciatura en Biología.

Al mismo tiempo le informamos que ha sido aceptado como Director de dicha Tesis el M.en C. Carlos Beas Zarate

A T E N T A M E N T E
" PIENSA Y TRABAJA "
Las Agujas, Zapopan, 12 de Julio de 1994
EL DIRECTOR
DE LA DIVISION DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AMBIENTALES


DR. FERNANDO ALFREDO BUSTAMANTE


FACULTAD DE
CIENCIAS BIOLÓGICAS

EL SECRETARIO


BIOL. GUILLERMO BARBA CALVILLO

c.c.p.- M.en C.Carlos Beas Zarate, Director de tesis.-pte.
c.c.p.- El expediente del alumno.

FAB>GBC>Cglr.

C. Dr. Alfonso Islas
Jefe de la Division de Ciencias
Biologicas y Ambientales de la
Universidad de Guadalajara.

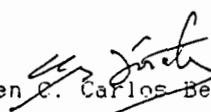
P R E S E N T E :

Por medio de la presente, nos permitimos informar a usted, que habiendo revisado el trabajo de tesis que realizo la Pasante LETICIA RAMIREZ CORTES codigo número 087655946 con el titulo "UNION DE ESPIPERONA ($^{\pm}$ H) A RECEPTORES A SEROTONINA (5-HT₂) Y A DOPAMINA (D₂) EN EL CEREBRO DE RATAS BAJO RESTRICCIÓN PROTEICA" consideramos que reúne los méritos necesarios para la impresion de la misma y la realizacion de los exámenes profesionales respectivos.

. Comunicamos lo anterior para los fines a que haya lugar.

Guadalajara, Jal. a 7 de Junio de 1995

A T E N T A M E N T E


M. en C. Carlos Beas Zarate

SINODALES:

Alberto Morales Villagran

Arturo Orozco

Alfredo Burgos

