



FACULTAD DE MEDICINA HUMANA
SECCIÓN DE POSGRADO

**ESTUDIO SOBRE PROPORCIONES DE TRIPTÓFANO,
AMINOÁCIDOS NEUTROS Y GLUCOSA PARA LA SÍNTESIS DE
SEROTONINA CEREBRAL EN NIVELES FISIOLÓGICOS
NORMALES RELACIONADOS A LA NEUROCONDUCTA**

**PRESENTADA POR
SARA ABU-SABBAH MITRE**

ASESOR

ALBERTO ALCIBÍADES SALAZAR GRANARA

TESIS

**PARA OPTAR EL GRADO ACADÉMICO DE MAESTRA EN
MEDICINA CON MENCIÓN EN BIOQUÍMICA**

LIMA – PERÚ

2015



Reconocimiento - No comercial - Compartir igual
CC BY-NC-SA

La autora permite entremezclar, ajustar y construir a partir de esta obra con fines no comerciales, siempre y cuando se reconozca la autoría y las nuevas creaciones estén bajo una licencia con los mismos términos.

<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>



**FACULTAD DE MEDICINA HUMANA
SECCIÓN DE POSGRADO**

**ESTUDIO SOBRE
PROPORCIONES DE TRIPTÓFANO, AMINOÁCIDOS NEUTROS Y
GLUCOSA PARA LA SÍNTESIS DE SEROTONINA CEREBRAL EN
NIVELES FISIOLÓGICOS NORMALES RELACIONADOS A LA
NEUROCONDUCTA**

**TESIS
PARA OPTAR AL GRADO ACADÉMICO DE MAESTRO
EN CIENCIAS BÁSICAS MÉDICAS CON MENCIÓN EN BIOQUÍMICA**

**PRESENTADA POR
SARA ABU-SABBAH MITRE**

**ASESOR
ALBERTO ALCIBÍADES SALAZAR GRANARA**

LIMA-PERÚ

2015

ASESOR

Alberto Alcibíades Salazar Granara, cirujano, maestro en ciencias básicas médicas-farmacología, doctor en medicina.

JURADO

Presidente : Emilio Teodoro Guija Poma, químico farmacéutico, doctor en farmacia y bioquímica.

Miembro : Jhon Eloy Ponce Pardo, químico farmacéutico, magister en docencia e investigación.

Miembro : Miguel Angel Inocente Camones, químico farmacéutico, magister en productos naturales.

A Nader, Vivian y Nadim mi esposo e hijos, por su esfuerzo y sacrificio compartido

A mis padres que me formaron y guiaron siempre

A mis hermanos por su apoyo incondicional

AGRADECIMIENTOS

Al doctor Benjamín Castañeda, por su consentimiento y apoyo en el desarrollo del presente trabajo de investigación.

Al doctor Alberto Salazar, por guiarme incansablemente e inculcar profesionalismo y esmero durante su asesoría.

ÍNDICE

Asesor y jurado

Dedicatoria

Agradecimiento

Resumen

Abstract

| | Pág. |
|--|-----------|
| INTRODUCCIÓN | 15 |
| CAPÍTULO I | 21 |
| MARCO TEÓRICO | 21 |
| 1.1 Antecedentes de la investigación | 21 |
| 1.2 Bases teóricas | 28 |
| 1.2.1 Aminoácidos generalidades | 28 |
| 1.2.2 Clasificación aminoácidos neutros | 29 |
| 1.2.3 Triptófano | 30 |
| 1.2.4 Metionina | 32 |
| 1.2.5 Valina | 33 |
| 1.2.6 Requerimientos de aminoácidos | 33 |
| 1.2.7 Serotonina | 34 |
| 1.3 Definición de términos | 37 |
| CAPÍTULO II | 39 |
| METODOLOGÍA | 39 |
| 2.1. Tipo y diseño de investigación | 39 |
| 2.2. Diseño muestral | 39 |
| 2.2.1. Población de estudio | 39 |
| 2.2.2. Criterios de selección | 39 |
| 2.2.3. Muestra | 39 |
| 2.2.4. Muestreo | 44 |
| 2.3. Lugar donde se ejecutó la investigación | 45 |
| 2.4. Instrumentos y procedimientos de recolección de datos | 45 |
| 2.4.1 Instrumentos | 45 |
| 2.4.2 Procedimientos de recolección de datos | 45 |
| 2.5. Procesamiento y análisis de datos | 46 |
| 2.6. Aspectos éticos | 46 |

| | |
|---|-----------|
| CAPÍTULO III | 47 |
| RESULTADOS | 47 |
| CAPÍTULO IV | 73 |
| DISCUSIÓN | 73 |
| CONCLUSIÓN | 78 |
| RECOMENDACIONES | 79 |
| REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 80 |
| ANEXOS | 88 |
| ANEXO 01: Certificado de calidad de alimento balanceado para roedores | |
| ANEXO 02: Certificado de pureza aminoácido triptófano | |
| ANEXO 03: Certificado de pureza aminoácido metionina | |
| ANEXO 04: Certificado de pureza aminoácido valina | |
| ANEXO 05: Carta de autorización para ejecución de estudio | |
| ANEXO 06: Carta de aceptación de asesor de tesis | |
| ANEXO 07: Infografía de la prueba de nado forzado | |
| ANEXO 08: Imágenes fotográficas de la prueba de nado forzado del presente estudio | |
| ANEXO 09: Base de datos tiempos de inmovilidad registrados por día de prueba | |

RESUMEN

El objetivo del estudio fue conocer las proporciones de triptófano, aminoácidos neutros (metionina, valina) y glucosa requeridos para favorecer la síntesis de serotonina cerebral en niveles fisiológicos relacionados a la neuroconducta. Observar el efecto dosis respuesta sobre el tiempo de inmovilidad para la prueba de nado forzado en ratones frente a la manipulación de las proporciones de triptófano, metionina, valina y glucosa dietética.

Se emplearon 90 ratones albinos machos de la especie *Mus musculus* formados aleatoriamente en 8 grupos experimentales de 10 ratones cada uno y un grupo control de 10 ratones. Cada grupo recibió por tres días 5g de un tipo de formulación dietética en la que se manipuló la proporción de triptófano, metionina, valina y/o glucosa, adicionalmente recibieron 20 ml de agua destilada. Las dietas fueron administradas a las 8a.m., transcurridas seis horas cada ratón fue sometido a la prueba de nado forzado donde se midió el tiempo de inmovilidad, procedimiento que se repitió por tres días. Para el análisis de las variables se emplearon las siguientes pruebas: ANOVA de un factor, T de Student y correlación de Pearson.

Los tiempos de inmovilidad para el grupo 4 y 8 mostraron una tendencia similar dosis respuesta frente al grupo control para los tres días de observación. La formulación dietética del grupo 4 evidenció mejor dosis respuesta frente al grupo control, con una proporción de triptófano Vs. aminoácidos competidores de 3:1. Respuesta similar se obtuvo para el grupo 8 con una proporción de L- triptófano, L- metionina, L-valina, glucosa de 1:3:3:1. Las pruebas de ANOVA y T de Student no revelaron diferencia significativa frente al grupo control salvo el día dos para el grupo 8 Vs. grupo control ($p=0.0255$). La prueba de correlación de Pearson mostró tendencia negativa significativa para los grupos 2, 7 y 8 ($r = -0,5292$; $p = 0,0198$; IC = $-0,7929$ a $-0,09856$; $R=0,2800$).

Palabras clave: L-triptófano, L-metionina, L-valina, glucosa, serotonina, trastornos mentales, dieta.

ABSTRACT

The objective of the study was to know the proportions of tryptophan, neutral amino acids (methionine, valine) and glucose that benefit cerebral serotonin synthesis in normal physiological levels related to neurobehavioral in rodents. To observe dosis response related to immobility time in forced swim test when proportions of tryptophan, methionine, valine and dietetic glucose are manipulated.

90 albino male mice of the species *Mus musculus* were used. 8 groups of 10 mice each were randomly formed and one control group. Each group received for three days 5g of diet experimental formulation with different proportions of tryptophan, metione, valine and or glucose, additionally 20 ml of distilled water. The diets were fed at 8a.m., after 6 hours each individual was subjected to forced swim test where immobility time was measured; procedure was repeated for three days. For analysis of the variables, the following tests were used: one-tailed ANOVA, T Student test and Pearson correlation.

The immobility time for group 4 and 8 showed similar trend dose response related to control group for the three days of observation. The dietetic formulation of group 4 showed better dosis response in relation to group control with a ratio of tryptophan vs. amino acid competitors 3:1. Similar response had formulation of group 8 with a ratio of tryptophan, L-methionine, L-valine, glucose 1:3:3:1. The ANOVA and T Student test revealed no significant difference related to control group except on day two for group 8 vs. control group ($p = 0,0255$). For Pearson correlation test, diets showed significant negative trend for groups 2, 7 and 8 ($r = -0,5292$; $p = 0,0198$; $CI = -0,7929$ to $-0,09856$; $R = 0,2800$).

Keywords: L-tryptophan, L-methionine, L-valine, glucose, serotonin, mental disorders, diet.

INTRODUCCIÓN

La falta o exceso de nutrientes por una dieta desequilibrada, ocasiona un desbalance bioquímico en el organismo que puede generar enfermedades. En particular, se ha demostrado la asociación con el triptófano y la salud mental, este es un aminoácido considerado esencial, y uno de los menos abundantes en la dieta. ¹

Triptófano es precursor de serotonina (5-HT, 5-hidroxitriptamina), neurotransmisor que regula el estado afectivo y el ánimo de la personas, así, concentraciones inadecuadas de este neurotransmisor a nivel cerebral, genera enfermedades psiquiátricas, entre ellas depresión y ansiedad. ²

Es conocido que triptófano requiere de transporte activo, para lo cual debe competir con aminoácidos neutros (alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, metionina, fenilalanina), por lo que el aumento de triptófano dietético, incrementaría la cantidad transportada, a través de la barrera hematoencefálica, y visceversa al incrementar la carga dietética de aminoácidos neutros. ¹⁻⁴

Por otra parte, la ingesta de carbohidratos, favorece el incremento de triptófano en el sistema nervioso central, este tipo de nutriente provoca la liberación de insulina, esta hormona polipeptídica estimula la absorción por los músculos, de aminoácidos de cadena ramificada como leucina, isoleucina y valina, por lo tanto, reduce la competencia por transportador. ^{1,5}

La serotonina cerebral, se forma únicamente dentro de las neuronas, y aun cuando la serotonina se sintetiza también en la periferia, ésta no es capaz de atravesar la barrera hematoencefálica, mientras que el triptófano sí. ¹

Estos conocimientos, abren la posibilidad que una dieta desproporcionada en nutrientes, puede afectar la concentración de serotonina en el cerebro, en consecuencia, se comportaría como un factor de riesgo más, que puede condicionar la presencia de enfermedades mentales las que además, afectan a millones de personas en el mundo. Se proyecta que para el 2030 la depresión sea la primera causa de años de vida perdidos por discapacidad, actualmente la depresión unipolar afecta a 151 millones de personas en el mundo, siendo uno de los principales motivos de años de perdidos de vida saludable como resultado de

discapacidad. La psiquiatría considera varios factores influyentes en el desarrollo de enfermedades mentales como la depresión, factores sociales, ambientales, psicológicos del comportamiento, de origen genético, hormonales, del sistema inmune, bioquímicos hasta neurodegenerativos. Sin embargo, actualmente se viene desarrollando investigación en psiquiatría nutricional motivada por evidencia en investigaciones en el que se devela la asociación entre depresión y estilos de alimentación. ⁶

Dash et al, 2016 analizan la situación actual respecto de los desórdenes mentales comunes y la dieta, hacen referencia a la transición nutricional y la alta presencia de alimentos procesados de poca calidad nutricional, ricos en energía y cómo se traducen en problemas de salud pública como la obesidad y los desórdenes mentales comunes como depresión y ansiedad. Recientemente la ciencia reconoce que existe relación entre la dieta y la salud mental, proponen que intervenciones dietéticas pueden resultar en oportunidad como medida preventiva e incluso como tratamiento para atender desórdenes mentales comunes. ⁷

Otros investigadores como O'Neil et al, 2013 probaron los efectos de un tratamiento y asesoría dietética en pacientes con diagnóstico de depresión mayor en la que participaron 176 personas, fue un ensayo controlado randomizado cuyo objetivo fue evaluar el costo beneficio de la intervención en el tratamiento del episodio de la depresión, aunque no cuantificaron en términos económicos los beneficios los resultados mostraron el potencial costo beneficio para los pacientes. ⁸

Jacka et al, 2012 realizaron un estudio en 1047 mujeres en el este de Australia con edades entre 20 y 93 años a las que se registró sus hábitos de alimentación mediante cuestionario de frecuencia de consumo de alimentos validados para hábitos de ingesta dietética en población australiana, el cuestionario registraba el consumo de 74 tipos de alimento y seis tipos de bebida alcohólica en los 12 meses precedentes y evaluaba la presencia de algún desorden mental común como ansiedad, depresión o distimia aplicando la entrevista clínica estructurada del DSM-IV-TR versión para investigación. Encontraron que dietas mejor balanceadas en las que la desviación estándar se incrementaba en relación a magnesio, folato y zinc reducía la posibilidad de depresión y distimia. ⁹

En otro estudio Jacka et al, 2012 hace referencia a una serie de estudios que sugieren que estilos de vida modificables no sólo son factores de riesgo para enfermedades crónicas no transmisibles sino también resultarían ser un alto factor de riesgo para los desórdenes mentales más comunes. Entre los factores de riesgo se hace referencia a una mala alimentación, la falta de actividad física e incluso el tabaquismo. También comenta estudios hechos en China en la que se observa que adolescentes con dietas predominantes en comida rápida y carnes rojas manifestaban desórdenes conductuales. Otro estudio en China realizado en 5000 adolescentes con buenos hábitos de alimentación estuvo asociado con menor prevalencia de síntomas psicológicos. De otro lado, otros estudios encontraron en otros grupos poblacionales una disminución en el riesgo de depresión en adultos con buenos hábitos de alimentación. ¹⁰

Ya hace algunos años en el Perú se avisa el impacto de los problemas de salud mental, Velásquez A., 2009 confirmó que las enfermedades neuropsiquiátricas, causan la mayor carga de enfermedades en el país y producen la mayor pérdida de años de vida saludable (AVISA), afectando a 826 253 personas que representan el 16% de todos los AVISA, y 28% de los AVISA de las enfermedades no transmisibles. ¹¹

En el Perú existen diversos problemas nutricionales derivados por dietas deficientes y/o desequilibradas, así, el Informe Final Perfil Nutricional y Pobreza en el Perú, ENAHO I, trimestre 2008 del CENAN, encontró que el 53% de todos los hogares con uno o más miembros menores y mayores de 18 años, tienen algún miembro mayor de 18 años con exceso de peso, 15% presentó una dualidad parcial de malnutrición, es decir déficit de talla/edad y exceso de peso. ¹²

Por otra parte, el promedio de ingesta de hierro es insuficiente y muy crítica para el caso de mujeres, ya que, estarían cubriendo menos del 50% de sus requerimientos (45% de adecuación), mientras que es apropiado para los varones alcanzando el 131% de adecuación. El consumo de calcio también resultó muy insuficiente para la población en general alcanzando solo el 37% de adecuación, y siendo más crítica en mujeres (34% de las recomendaciones). Respecto al consumo de colesterol, los varones cubren el 40% de las recomendaciones y las mujeres consumen menos colesterol en su dieta habitual (33% de las recomendaciones). En cuanto al

consumo de fibra dietaria es muy insuficiente (<50% de adecuación de las recomendaciones). (12)

La Encuesta Nacional de Indicadores Nutricionales, Bioquímicos, Socioeconómicos y Culturales, relacionados con las Enfermedades Crónicas Degenerativas 2006, mostró una elevada prevalencia de consumo de comidas rápidas en Lima Metropolitana (66%), contrariamente a lo observado en la sierra rural (34%), así, la proporción de calorías que provienen del consumo de carbohidratos (74%), se encuentra cerca del límite máximo recomendado (75%), ubicándose con valores de 134% de adecuación a las recomendaciones de FAO/OMS 2003. ¹³

Un estudio a nivel Lima Metropolitana, donde se observa que el 100% de mujeres adolescentes, no cubren las recomendaciones nutricionales de hierro, calcio y en menor proporción otros nutrientes como tiamina, niacina y vitamina A. Asimismo, en mujeres adolescentes de Lima Metropolitana, se observa un 16% de sobrepeso y un 22% de exceso de grasa corporal. Además, el 72% consume más energía de la que gasta, y no se llega a cubrir ni la mitad de la recomendación de fibra. ¹⁴

Según lo indicado, existe evidencia que a nivel nacional se consumen dietas desequilibradas, que el impacto social y económico de las enfermedades neuropsiquiátricas son causas principales de años de vida perdidos por muerte prematura y por discapacidad, es necesario buscar factores que contribuyen con la prevención y disminución de riesgos de la enfermedad.

Se justifica el presente estudio ya que conocer la proporción adecuada de triptófano, aminoácidos neutros y glucosa que pudiera favorecer la síntesis de serotonina relacionada a la neuroconducta, podría permitir elaborar recomendaciones nutricionales específicas para pacientes que padezcan trastornos mentales asociados a serotonina, como tratamiento coadyuvante a dichos trastornos. Además, las mismas recomendaciones nutricionales se podrían incluir dentro de un manejo preventivo de las mismas enfermedades, especialmente para pacientes en riesgo o más vulnerables.

No existe en el Perú ningún estudio similar ni estimaciones aproximadas de ingesta dietética promedio de triptófano ni de aminoácidos neutros para población peruana.

Si bien la comunidad científica ha dado a conocer la ingesta recomendada de aminoácidos para la población general, no se conoce qué proporción del aminoácido triptófano en relación a aminoácidos neutros y glucosa se requiere para favorecer una síntesis de serotonina cerebral normal.

Una de las pruebas más utilizadas para evaluar neuroconducta es a través de modelos experimentales en roedores, se trata de la prueba de nado forzado en donde se mide el tiempo de inmovilidad y sirve como indicador en la simulación de estados depresivos, a mayor tiempo de inmovilidad indicaría síntomas de desesperanza o ánimo depresivo. Dicha prueba está validada como método experimental en la evaluación de la potencial eficacia y comportamiento de fármacos antidepresivos en roedores. Fueron Porsolt y sus colegas quienes desarrollaron el método debido a la falta de modelos experimentales que pudiera simular la enfermedad depresiva y al mismo tiempo mostrar la sensibilidad al tratamiento farmacológico para la depresión. ^{15,16}

Por otro lado, existen diversos métodos para estudiar irregularidades en la síntesis de serotonina. Se sabe que la concentración de serotonina está en relación al triptófano dietético, una de las formas típicas de estudiar estas irregularidades es disminuyendo el sustrato triptófano para la síntesis cerebral de serotonina. Una de las prueba de mayor efecto sobre la concentración de triptófano sérico es la prueba de depleción y recarga de triptófano mediante la ingesta de un brebaje depletado en triptófano. ¹⁷

El objetivo principal del presente estudio experimental es conocer una proporción dietética adecuada de triptófano en relación a aminoácidos competidores por transportador (metionina y valina) que favorecería la síntesis de serotonina a niveles fisiológicos relacionados a la neuroconducta expresada en tiempos de inmovilidad de la prueba de nado forzado.

Evaluar si la incorporación de glucosa dietética resultaría favorable para disminuir la competición entre triptófano y aminoácidos neutros (metionina y valina) comparando el efecto dosis respuesta sobre el registro del tiempo de inmovilidad en la prueba de nado forzado.

Así mismo determinar si existe correlación entre el incremento en las proporciones de dichos nutrientes y el tiempo de inmovilidad al ser manipulados en las diferentes formulaciones.

CAPÍTULO I

MARCO TEÓRICO

1.1 Antecedentes de la investigación

Dawn M Richard, Micahel A Dawes, et al., (2009), publicaron una revisión que incluye la farmacocinética de triptófano así como las influencias y modelos experimentales sobre la biodisponibilidad del mismo y sus efectos en la reducción en la síntesis de serotonina. Uno de los modelos experimentales contemplaba el uso de paraclorfenilalanina (PCPA) conocido también como fenclonina en ratas, la cual bloquea la síntesis de serotonina pero observaron que el proceso se revierte al ingerir más triptófano. Otro modelo examinado fue la reducción de la síntesis de serotonina mediante la restricción de ingesta dietética de triptófano, comprobaron que la restricción redujo lentamente su biodisponibilidad, sin embargo, presentaron limitaciones por el periodo relativamente largo en restricciones dietéticas en humanos (10 días en promedio). La depleción aguda y recarga de triptófano fue el modelo que resultó en un máxima depleción plasmática transitoria de triptófano sugiriendo dicho método como el más efectivo. ¹⁷

Hood SD, Bell CJ y Nutt DJ (2005), en su estudio cuyo objetivo fue proveer una revisión respecto del triptófano como aminoácido esencial, con énfasis en su rol para la síntesis de serotonina cerebral, investigan sobre las metodologías para la manipulación de triptófano. Indican que uno de los métodos más usados para reducir la síntesis de serotonina cerebral es reduciendo la biodisponibilidad de triptófano en ratones manipulando la enzima triptófano hidroxilasa, paso primero limitante para la ruta metabólica en la síntesis de serotonina. Esto se logra con el uso de paraclorofenilalanina (PCPA), aminoácido sintético inhibidor selectivo de la triptófano hidroxilasa. ¹⁸

Marsh DM, Dougherty DM, et al., (2002), indican que la depleción aguda de triptófano, es uno de los métodos más utilizados y que logra alcanzar un máximo de depleción transitoria en cinco a seis horas. El procedimiento incluye la administración de un brebaje que contiene 100g de 15 aminoácidos excepto triptófano (ver tabla 1). La ingesta de este brebaje

resulta en dos procesos separados que reducen la biodisponibilidad de triptófano para atravesar la barrera hematoencefálica. Primero la gran cantidad de aminoácidos estimulan la síntesis proteica en el hígado aprovechando el triptófano circulante preexistente. Segundo, la poca concentración de triptófano plasmático en proporción a los aminoácidos neutros maximiza la competencia por transportador para atravesar la barrera hematoencefálica. El resultado es una reducción significativa de la síntesis de serotonina cerebral en humanos, primates no humanos y en cerebro de ratas. ¹⁷⁻²³

Tabla 1: Formulación de aminoácidos en 50g y 100g de brebaje para depleción y recarga de L-triptófano.

| Formulación :Triptófano | 50g | 100g |
|-----------------------------------|------------|-------------|
| Depleción L-Triptófano | 0,0 | 0,0 |
| Recarga L-Triptófano | 5,15 | 10,30 |
| 15 aminoácidos | | |
| L-alanina | 2,75 | 5,50 |
| L-arginina | 2,45 | 4,90 |
| L-cisteína * | 1,35 | 2,70 |
| Glicina hidromonoclorhidro | 1,60 | 3,20 |
| L-histidina* | 1,60 | 3,20 |
| L-leucina* | 4,00 | 8,00 |
| L-lisina | 4,45 | 8,90 |
| L-metionina* | 1,50 | 3,00 |
| L-fenilalanina* | 2,85 | 5,70 |
| L-prolina | 6,10 | 12,20 |
| L-serina | 3,45 | 6,90 |
| L-treonina* | 3,25 | 6,50 |
| L-tirosina* | 3,45 | 6,90 |
| L-valina* | 4,45 | 8,90 |
| Depleción, total gramos | 50,00 | 100,00 |
| Recarga, total gramos | 55,15 | 110,30 |

***Aminoácidos competidores (CAA)**

Fuente: Dawn M Richard et al. L-Tryptophan: Basic metabolic functions, behavioral research and therapeutic indications. International Journal of Tryptophan Research, 2009.

Comai S, Bertazzo A, Caretti N, Podigurna-Stopa A, Luisi S y Costa CVL (2013), analizaron los niveles séricos de triptófano, serotonina y 5-hidroxitriptófano en mujeres con tres formas distintas de amenorrea: 16 pacientes diagnosticadas con anorexia nerviosa, 60 pacientes con amenorrea funcional del hipotálamo, 14 pacientes con hiperprolactinemia. Los datos fueron comparados con un grupo de 25 mujeres sanas. El triptófano sérico fue significativamente menor ($p < 0,05$) en el grupo de anoréxicas ($11,64 \pm 0,53 \mu\text{g/ml}$). El estudio también mostró que las mujeres afectadas por diversas causas de amenorrea presentaban alteraciones en el metabolismo de triptófano vía serotonina pero en particular, hubo una mayor y marcada diferencia entre los subgrupos de pacientes con anorexia nerviosa. ²⁴

Cruz Rubens et al., (1991), realizaron un estudio experimental en roedores para observar el efecto de dietas con distintos niveles de triptófano (Try), para ello utilizaron alimentos con diversas concentraciones de triptófano como harina de soja (alta disponibilidad de Try) y zeína suplementada con Try (igual disponibilidad de la soja) fueron observados en el "open field", durante el 8-13 y 25-30 días de vigencia de las respectivas dietas. El grupo alimentado con zeína presentó promedios de locomoción y de exploración vertical (alzarse) significativamente mayores ($p < 0,05$) que los demás en el primer periodo de observaciones. Estas diferencias no fueron observadas en la segunda fase de observaciones cuando los grupos mantenidos con zeína y zeína + Try se presentaban bajo fuerte depleción proteica. Los resultados sugieren que la menor disponibilidad del Try de la dieta y por extensión de la 5-HT cerebral aumenta la actividad exploratoria, lo que puede significar menor nivel de emocionalidad. ²⁵

Betancourt López et al., (2005), estudiaron el comportamiento y parámetros reproductivos de 288 codornices (Cotumix Cotumix Japónica) en una granja comercial suplementadas con triptófano como precursor del neurotransmisor serotonina. Se utilizaron niveles 0 (T1), 1,25mg/día (T2) y 2,5mg/día (T3). El grupo control presentó un mayor número de aves ($p < 0,05$) con posición agresiva ante un estímulo externo, comprobándose con este estudio que el triptófano reduce la agresión y estabiliza el comportamiento social.

Igualmente, el número de aves con dorso desplumado fue superior en el grupo testigo. Durante el periodo evaluado se presentó un mejor peso del huevo, mejor conversión de alimento y mayor ganancia de peso de los grupos suplementados con triptófano. Demostrándose claramente el efecto positivo del triptófano sobre el comportamiento agresivo de la codorniz.(26)

Se realizó una búsqueda virtual en la Biblioteca Cochrane para la frase Triptófano y hidroxitriptamina (5-HT o serotonina) para la depresión. Shaw k, Turner J, Del Mar C, en la revisión Cochrane traducida (2008), encontraron 108 ensayos donde el objetivo era determinar si el 5-HT y el triptófano son más eficaces que el placebo, y si su uso es fiable para tratar trastornos depresivos en personas adultas. Los investigadores que participaron informaron que los síntomas de depresión disminuyeron cuando se compararon el 5-HT y el triptófano con un placebo no farmacológico. Cabe señalar que en dichos estudios se reportó que se habían presentado efectos secundarios (mareos, náuseas y diarrea). Del mismo modo se evidenció asociación del triptófano con la aparición de una enfermedad mortal. Una de las conclusiones de dicha revisión fue que se necesitan más pruebas para evaluar la eficacia y seguridad del triptófano antes de poder establecer conclusiones significativas o determinantes. Mientras tanto, los revisores sugieren que resulta más conveniente el uso de antidepresivos ampliamente estudiados y que no presentan efectos secundarios potencialmente mortales reportados. ²⁷

Madelyn H Fernstrom y John D Fernstrom (1995), midieron la concentración de triptófano y serotonina cerebral, luego de alimentar a ratas secuencialmente con dos comidas. Un grupo de ratas ingirió en ayunas, primero una comida a base de carbohidrato y luego de 2 horas, una comida a base de proteínas. Otro grupo de ratas ingirió en ayunas primero la comida a base de proteína y luego de 2 horas la comida a base de carbohidratos. Los resultados mostraron que cuando la primera comida era de carbohidratos, la concentración de triptófano y síntesis de serotonina cerebral se incrementaban pasadas las 2 horas. Estos resultados se extienden a 4 horas si primero ingerían la proteína. A las 2 horas de ingerir primero proteína no había cambios en la síntesis de serotonina ni

concentración de carbohidratos tampoco se registraron cambios en una segunda comida de carbohidratos 2 horas después. Sin embargo, la ingesta de carbohidratos 3 horas después a la ingesta de proteínas incrementó la concentración de triptófano y síntesis de serotonina cerebral luego de 2 horas. El artículo concluye que la concentración de triptófano y síntesis de serotonina responden a una ingesta secuencial de comidas con carbohidratos o proteínas si hay un intervalo de tiempo suficiente entre cada comida. ²⁸

Ardis TC, Cahir M, Elliott JJ, Bell R, Reynolds GP, Cooperen SJ (2009), examinaron los efectos de la depleción de triptófano sobre la concentración de noradrenalina, dopamina y serotonina. Haciendo un seguimiento a la administración oral de mezclas de aminoácidos con triptófano y de aminoácidos libre de triptófano determinaron la concentración de los neurotransmisores y triptófano libre en plasma mediante High Performance Liquid Chromatography (HPLC) con detección electroquímica. Encontraron que la concentración plasmática de triptófano libre se redujo significativa y sustancialmente en un 79% en ratas que ingirieron la mezcla de aminoácidos libre de triptófano, en comparación con aquellas que ingirieron la mezcla de aminoácidos con triptófano. Se registró una reducción significativa de la serotonina y del 5-hidroxiindolacético en diversas regiones del cerebro de la rata, mas no se alteró significativamente la concentración de noradrenalina y dopamina en ninguna de las regiones del cerebro analizadas en dicho estudio. Este es otro estudio que evidencia que la administración de una mezcla de aminoácidos libre de triptófano en ratas, puede reducir significativamente la concentración de triptófano libre en plasma a niveles comparables en los reportados en estudios en humanos. Estos resultados indican que cambios conductuales y cognitivos producidos por la depleción de triptófano en estudios preclínicos y clínicos, están relacionados a efectos específicos en el sistema serotoninérgico. ²⁹

Dawn M Richard, Michael A Dawes, Charles W Mathias, Ashley Acheson, Nathalie Hill-Kapturczak y Donald M Dougherty (2009), indican que como precursor de serotonina, estudios experimentales han mostrado que el rol de

L-triptófano en la síntesis de serotonina, es un factor importante en el estado de ánimo, la conducta y capacidad cognitiva. ¹⁷

Badawy et al. (2010), indican que el triptófano plasmático es un parámetro periférico importante para evaluar el ingreso de triptófano al cerebro para la síntesis de serotonina cerebral. Sin embargo el triptófano libre en plasma es muy lábil y fácilmente influenciado por diversos moduladores como el ayuno, la ingesta de alimentos, medicamentos, consumo de alcohol y bebidas calientes comunes, consumo de drogas ilícitas, algunas hormonas, ejercicios y estrés. La interpretación de los cambios plasmáticos del triptófano libre requiere de una metodología analítica y la consideración de moduladores fisiológicos y farmacológicos descritos en la revisión. ³⁰

Newsholme et al. (2006), publican un artículo en el que explica que los cambios en la concentración de serotonina cerebral han sido sugeridos como una de las causas de fatiga ante la actividad física. Similar a lo que otros autores sostienen respecto de la biodisponibilidad de triptófano sérico y su relación en la síntesis de serotonina cerebral, sostiene que el paso limitante para la síntesis de serotonina es el transporte de triptófano a través de la barrera hematoencefálica. Afirma que el transporte está influenciado por la fracción biodisponible de triptófano y la concentración de aminoácidos neutros que incluyen leucina, isoleucina y valina y que además son transportados por la misma vía. Se han publicado estudios en humanos que han mostrado que el ratio plasmático de triptófano libre/aminoácidos neutros, se incrementa y que el triptófano es captado por el cerebro durante el ejercicio de resistencia, sugiriendo que esto podría incrementar la síntesis de serotonina en el cerebro. Menciona también que la ingesta de carbohidratos durante el ejercicio, retrasa el posible efecto de los aminoácidos neutros sobre la fatiga, aspectos que se pueden contrastar en el presente estudio. ³¹

El modelo experimental de nado forzado fue publicado hacia el año 1977 por Porsolt y colaboradores, es una prueba validada y ampliamente utilizada desde su desarrollo hasta la actualidad por investigadores en diversas partes del mundo incluyendo el Perú. ^{15,16}

Este modelo experimental se utiliza para la evaluación del comportamiento de los fármacos antidepresivos, la eficacia antidepresiva de nuevas drogas, y las pruebas experimentales que requieren la simulación o la prevención de estados depresivos. Para la prueba los roedores son sometidos a nadar en cilindros con agua sin lugar a escape y en un margen estrecho de espacio. Lo que se observa en la dinámica es un primer periodo de nado vigoroso luego del cual puede producirse momentos de inmovilidad en la que se observa una postura característica con esfuerzo por sostener la cabeza fuera del agua, como respuesta al aprendizaje de no poder escapar y que los autores interpretan como pérdida de esperanza. A estos momentos de inmovilidad se le conoce también como “conducta de desesperanza”. En las pruebas con el modelo experimental se demostró que los tiempos de inmovilidad se reducían significativamente con el uso de antidepresivos, la medición del tiempo de inmovilidad cuando el roedor está frente a una situación de la cual no puede escapar es el indicador para medir el efecto o dosis respuesta de la sustancia en estudio. La prueba de nado forzada tiene buena validez predictiva y presenta ventajas en relación a otras pruebas similares: permite obtener resultados en tiempos cortos y a bajo costo para la detección de sustancias con potencial efecto antidepresivo. ³²⁻³⁵

Estudios que comparan la acción farmacológica de sustancias antidepresivas utilizan la prueba de nado forzado para observar la neuroconducta. Un estudio cubano compara los efectos de D-004, imipramina y sertralina en el modelo de nado forzado en ratones, allí se observó que las sustancias antidepresivas redujeron el tiempo de inmovilidad para dicha prueba en roedores. Consideran la prueba como uno de los más empleados para evaluar eficacia de antidepresivos, aun cuando existen patrones distintivos según su modo de acción, por ejemplo los inhibidores selectivos de la recaptura noradrenérgica y dopaminérgica (desipramina, maprotilina, y bupropion) disminuyen la inmovilidad y aumentan la conducta de escalado y los inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina (5HT) (fluoxetina, paroxetina, sertralina) reducen la inmovilidad y aumentan el nado. ³⁶

Investigadores peruanos de la Facultad de Medicina de la Universidad San Martín de Porras estudiaron el efecto antipsicótico y conductual de *Maytenus macrocarpa*, árbol nativo de la región amazónica del Perú popularmente denominado como Chuchuhuasi, para dicho estudio utilizaron pruebas en roedores como la prueba de Irwin para evaluar presencia o ausencia de letalidad, convulsiones, sedación, excitación entre otros, así como la prueba de nado forzado para evaluar efectos antidepresivos. Encontraron mayor tiempo de inmovilidad para *Maytenus macrocarpa* en comparación con el fármaco haloperidol. ³⁷

1.2 Bases teóricas

1.2.1 Aminoácidos generalidades

Los aminoácidos son moléculas biológicas que cumplen con ciertas características estructurales, están constituidas por un grupo carboxilo (-COOH), un grupo amino (-NH²), un átomo de hidrógeno y una cadena lateral que diferencia un aminoácido de otro y que aporta propiedades particulares. Esta cadena lateral o grupo R varía en estructura y carga eléctrica, cualidad que permite su clasificación. Todos estos componentes están unidos a un átomo de carbono central (C₂) llamado alfa. Los grupos R que distinguen un aminoácido de otro, también se unen al carbón-alfa excepto en el caso de la glicina en donde el grupo R es el hidrógeno. Los aminoácidos son moléculas que desarrollan múltiples funciones en las células, una de las cuales es servir como monómeros a partir de los cuales se construyen otras moléculas biológicamente activas, forman cadenas polipeptídicas de proteínas donde los aminoácidos se presenta en la forma L-estereoisómeros. Casi todas las proteínas tiene sus estructuras constituidas, en diversas proporciones por 20 L-alfa-aminoácidos, estos resultan relevantes para hacer proteínas en los mamíferos. Otras proteínas están constituidas por otros L-alfa-aminoácidos derivados de los 20 básicos productos de procesos que ocurren después de la formación del esqueleto polipeptídico, de allí la diversidad biológica. Varios otros aminoácidos se encuentran en el cuerpo, libres o combinados (es decir no asociados a péptidos o a proteínas). Estos aminoácidos que no están asociados

a las proteínas tienen funciones especializadas. Varios de los aminoácidos que están en las proteínas también tienen funciones distintas a las de formación de péptidos y las proteínas, por ejemplo tirosina en la formación de hormonas tiroideas o glutamato que actúa como neurotransmisor.³⁸

1.2.2 Clasificación aminoácidos neutros

Se utilizan diversos criterios para clasificar los aminoácidos. La estructura química y carga eléctrica de los aminoácidos permiten clasificarlos facilitando así el conocimiento de sus propiedades, aspecto fundamental para el entendimiento de la bioquímica. Los aminoácidos pueden agruparse según la propiedad de su grupo R, su polaridad o tendencia a interactuar con el agua a un nivel de pH biológico es decir, cercano a 7. La polaridad del grupo R puede ser totalmente apolar o hidrofóbico es decir, insoluble en agua o altamente polar o hidrofílico, es decir soluble en agua. Los siguientes aminoácidos pertenecen al grupo R neutro apolar alifático, son hidrofóbicos: glicina, alanina, valina, leucina, isoleucina y prolina. Son importantes para las interacciones hidrofóbicas dentro de las estructuras proteicas. Otro grupo son los R neutros aromáticos, son relativamente apolares y pueden participar en interacciones hidrofóbicas especialmente cuando los grupos aromáticos se apilan (uno sobre otro) estos son fenilalanina, tirosina y triptófano poseen la propiedad de absorber luz ultravioleta. Los grupos R neutros polares sin carga son más solubles en agua o hidrofílicos debido a que sus grupos funcionales forman puentes de hidrógeno con el agua, los aminoácidos serina, treonina, cisteína, metionina, asparagina y glutamina comprenden este grupo. Dos aminoácidos tienen grupo R con carga neta negativa a pH 7 (ácidos), el aspartato y glutamato de ellos se deriva la asparagina y glutamina respectivamente. Finalmente los aminoácidos con carga neta positiva a pH 7 (básicos) son lisina, arginina, histidina.^{38,39}

Otro punto de vista para clasificar los aminoácidos es por su cadena lateral: aminoácidos con cadena lateral sin carga y apolar se incluyen glicina, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina,

triptófano, metionina. Por su cadena lateral sin carga y polar se incluyen serina, treonina, cisteína, tirosina, asparagina, glutamina. Por su cadena larga cargada se incluyen ácido aspártico, ácido glutámico, histidina, lisina, arginina. ⁴⁰

1.2.3 Triptófano

- **Metabolismo y fisiología**

El triptófano es un aminoácido neutro aromático que circula en la sangre de forma libre o ligada a la seroalbúmina. Se sabe que entre el 80% y el 90% del triptófano ingerido está presente en el organismo de forma conjugada y es metabólicamente inactivo. Por otro lado la unión del triptófano a proteínas puede verse influenciada por diversas sustancias como los ácidos grasos no esterificados palmítico oleico y linoleico. Existen situaciones que inducen el incremento de los ácidos grasos no esterificados una de ellas es la descarga de catecolaminas durante el estrés o el ayuno prolongado y como consecuencia aumentan el triptófano libre dado que los ácidos grasos no esterificados desplazan al triptófano de los lugares de unión a la albúmina. ^{41,42}

Un porcentaje pequeño del triptófano libre llega al sistema nervioso central, del 10% del triptófano no conjugado el 8% es metabolizado en el hígado por acción de la triptófano-2,3-dioxigenasa dando lugar a los ácidos kinureico xanturénico y nicotínico. La metabolización hepática puede influirse por causas diversas. La enzima triptófano-2-3-dioxigenasa, antes conocida como triptófano pirrolasa, puede inducirse por glucocorticoides y por el propio triptófano. El 2% restante accede al sistema nervioso central para su utilización en la síntesis proteica, se produce un acúmulo en las células gliales para actuar como sustrato en la síntesis de indolaminas. ⁴³

Otros factores pueden alterar la biodisponibilidad de triptófano. La acción de algunos antidepresivos pueden tener efecto sobre el paso de triptófano por la barrera hematoencefálica, la nicotinamida, los antidepresivos tricíclicos, la mianserina y la carbamacepina inhiben la enzima triptófano-2-3-dioxigenasa, dicha inhibición enzimática conlleva

la disminución de las kinureínas, que dificultan el paso del triptófano al cerebro. ⁴⁴

El paso del triptófano a través de la barrera hematoencefálica es un proceso activo que se realiza de modo competitivo con los aminoácidos neutros de cadena ramificada (fenilalanina, tirosina leucina, isoleucina, metionina, histidina y valina) que utilizan el mismo transportador. Depende, por tanto, de la concentración de triptófano libre en plasma y de las concentraciones plasmáticas de los otros aminoácidos. El aumento de insulina que se produce tras una ingesta rica en hidratos de carbono se traduce en una disminución de los aminoácidos que compiten con el triptófano para pasar la barrera hematoencefálica con lo que se favorece su paso al sistema nervioso central. ⁴⁵⁻⁴⁷

El triptófano se incorpora a la neurona por mecanismos de transporte activo relacionadas con una ATPasa Na^+/K^+ dependiente se consiguen concentraciones intraneuronales cuatro veces superiores a las externas. Solo la forma levógira del triptófano atraviesa la membrana neuronal. Compite con la L-metionina, L-tirosina y L-fenilalanina. ⁴⁸

- **Requerimiento y estimaciones de ingesta de triptófano dietético**

Beckmann en su publicación del año 1983 estimó que el aporte de triptófano dietético en la dieta occidental habitual es cerca de 0,5g de triptófano diario, del que solo el 2% al 3% se utiliza en la producción central de serotonina. ⁴⁹

De acuerdo al reporte del año 1985 del grupo de expertos de FAO/OMS/UNU se publicaron los requerimientos de aminoácidos esenciales por edades. Estos se detallan en la tabla 2. ⁵⁰

Tabla 2. Estimaciones de requerimiento de aminoácidos en diferentes edades (mg/kg por día)

| Aminoácidos | Infantes | Niños | Escolares | | Adultos |
|------------------------------|--------------------------|---------------------------|---------------------------|-----------|-----------|
| | (3-4 meses) (ref. 12) | (2 años) (ref. 82, 83) | (10-12 años) (ref. 12) | (ref. 86) | (ref. 12) |
| Histidina | 28 | ? | ? | ? | [8-12] |
| Isoleucina | 70 | 31 | 30 | 28 | 10 |
| Leucina | 161 | 73 | 45 | 44 | 14 |
| Lisina | 103 | 64 | 60 | 44 | 12 |
| Metionina + cisteína | 58 | 27 | 27 | 22 | 13 |
| Fenilalanina + tirosina | 125 | 69 | 27 | 22 | 14 |
| Treonina | 87 | 37 | 35 | 28 | 7 |
| Triptófano | 17 | 12.5 | 4 | 3.3 | 3.5 |
| Valina | 93 | 38 | 33 | 25 | 10 |
| Total aminoácidos esenciales | 714 | 352 | 261 | 216 | 84 |

Fuente: FAO/WHO/UNU. Energy and Protein Requirements. Report of a joint FAO/WHO/UNU Expert Consultation. Technical Report Series no. 724, World Health Organization, Geneva, Switzerland. 1985.

Otros autores presentan también recomendaciones de ingesta diaria y estimaciones de ingesta de triptófano, mencionando que la típica ingesta de triptófano para muchos individuos es aproximadamente entre 900 a 1000mg diarios, mientras que la ingesta diaria recomendada para adultos se estima entre 250mg/día y 425mg/día. Esto se traduce a una ingesta diaria recomendada de 3,5 a 6,0 mg/kg de peso por día. ¹⁷

1.2.4 Metionina

- **Metabolismo y aspectos fisiológicos**

La metionina es un aminoácido neutro apolar metabolizado principalmente en el hígado vía transmetilación/transulfuración la síntesis de novo no se da en el cuerpo humano por lo que es considerado aminoácido esencial. La cisteína, se forma a partir de la transferencia del átomo de azufre de metionina. Cuando hay exceso dietético de metionina sus átomos de carbono pueden utilizarse para la

generación de energía o para la gluconeogénesis mientras que su átomo de azufre es tomado para formar el sulfhidrilo de la cisteína. Este aminoácido es activado por la síntesis de S-adenosilmetionina, este compuesto es el principal donador de los grupos metilo para la mayoría de reacciones de transmetilación en el cuerpo humano. El 80% de la metionina se transforma en cisteína, para ello interviene el folato y sus derivados, la vitamina B12, y la homocisteína metiltransferasa. ^{40,51}

1.2.5 Valina

- **Metabolismo y aspectos fisiológicos**

Es un aminoácido neutro apolar alifático, junto a leucina e isoleucina son considerados de cadena ramificada representando entre el 20% a 30% de los aminoácidos provenientes de la dieta. A diferencia de otros aminoácidos estos no son sintetizados a nivel intestinal o hepático ambos tejidos con baja actividad enzimática para estos aminoácidos, sin embargo alguna actividad por transaminasas puede ocurrir para estos aminoácidos. La concentración plasmática de valina se incrementa post ingesta de alimentos, cantidades excedentes de valina son catabolizadas en tejidos periféricos como músculo esquelético, corazón, tejido adiposo y riñones. ^{40,51}

1.2.6 Requerimientos de aminoácidos

Las estimaciones sobre requerimientos vienen actualizándose cada cierto tiempo luego de trabajos exhaustivos de Comités de Expertos, estas mismas pueden tener variaciones según el método utilizado para dicha estimación. La tabla 3 muestra el patrón de composición aminoacídica de las proteínas dietarias estimada al año 2004 como miligramos de aminoácido en relación al total de proteína. ^{52,53}

Tabla 3: Patrón de composición (mg aa/ g proteína)

| | FAO OMS UNU 1985 Adultos | FAO OMS UNU 2001 Adultos | FNB/ USA 2002 Adultos | Reeds Comité Expertos 2004 1 a 4 años | Reeds Comité Expertos 2004 10 a 14 años | Reeds Comité Expertos 2004 14 a 18 años | Millward 1999 Adultos |
|-------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------|--|--|--|-----------------------------|
| Histidina | 16 | | 18 | | | | |
| Isoleucina | 13 | 29 | 25 | 36 | 32 | 30 | 30 |
| Lisina | 16 | 45 | 55 | 63 | 58 | 53 | 31 |
| Leucina | 19 | 59 | 47 | 52 | 47 | 42 | 33 |
| Met + Cys | 17 | 20 | 25 | 32 | 28 | 26 | 27 |
| Phen + Tyr | 19 | 59 | 47 | 52 | 47 | 42 | 33 |
| Treonina | 9 | 23 | 27 | 43 | 36 | 34 | 26 |
| Triptófano | 5 | 8 | 7 | 11 | 9 | 8 | 6 |
| Valina | 13 | 38 | 32 | 40 | 36 | 32 | 23 |

Fuente: Recomendaciones nutricionales para el ser humano: actualización. Instituto de Nutrición e Higiene de los Alimentos. Cuba, 2004.

1.2.7 Serotonina

- **Descripción y síntesis**

La 5-hidroxitriptamina o 5-HT o serotonina es una amina biógena compuesta por un anillo indólico y una cadena lateral tilamino. Se puede detectar neuroquímica e histoquímicamente. Es una sustancia muy difundida en los reinos animal y vegetal. En los mamíferos, aproximadamente el 90% de la serotonina total se localiza en las células enterocromafines del intestino, alrededor del 8% en las plaquetas y el 2% restante en el sistema nervioso central, particularmente en la glándula pineal y en el hipotálamo. En la rata y en el ratón, la serotonina se encuentra también en los mastocitos junto con la histamina. Los mastocitos humanos probablemente no contienen serotonina. La serotonina se sintetiza en las diversas localizaciones mencionadas excepto en las plaquetas, donde se concentra activamente. La forma usual de serotonina consiste en una sal doble de sulfato de creatinina. Algunas frutas como los plátanos contienen gran cantidad de serotonina, pero su consumo no supone amenaza de intoxicación debido a que la amina no se absorbe bien en el tubo digestivo y es rápidamente metabolizada. Sin embargo, la ingestión de alguna de ellas puede aumentar la excreción urinaria de sus

metabolitos. ⁴⁹

La síntesis de serotonina cerebral se encuentra íntimamente relacionada al triptófano. Este aminoácido es precursor del neurotransmisor y pasa por un proceso de hidroxilación por oxigenasa y tetrahidrobiopterina en el carbono 5, como resultado se tiene 5-hidroxitriptófano, paso previo a la formación de serotonina y 5-hidroxitriptamina. La relevancia del triptófano no sólo se debe al hecho de ser sustrato sino también a que varios estudios han demostrado que la concentración de serotonina cerebral es directamente proporcional al triptófano plasmático y cerebral. Así la ingesta dietética de triptófano, se sabe influye en la cantidad de serotonina cerebral y en general en el cuerpo humano. ¹

- **Implicancia fisiológica y patológica de la serotonina**

La serotonina se ha implicado en numerosos procesos fisiológicos y patológicos. Entre las funciones fisiológicas en las que se cree interviene la 5-KT se incluyen el sueño, el dolor, la tensión arterial, composición del líquido cefalorraquídeo, el control de la temperatura, el funcionamiento del sistema nervioso a nivel entérico, la ovulación, la conducta sexual, la respuesta al estrés y los procesos de aprendizaje. Se han descrito alteraciones serotoninérgicas en el síndrome carcinoide, en los trastornos afectivos, obsesivo-compulsivo, por angustia, por déficit de atención, de la alimentación, en la conducta suicida, en la agresión, en la toxicomanía, alcoholismo, en el síndrome afectivo estacional y el hiperkinético, en los síndromes psicóticos de la infancia, en la fenilcetonuria, en la migraña, en la hipotonía del Síndrome de Down y en la enfermedad de Alzheimer. ⁴⁹

- **Anatomía del sistema serotoninérgico**

El sistema serotoninérgico consiste en un grupo morfológicamente diverso de neuronas, cuyos cuerpos celulares se sitúan en los núcleos del rafe del tronco cerebral y en algunas regiones de la formación reticular, y complejos sistemas axonales que se extienden virtualmente a todas las regiones del cerebro pero con particular densidad al cortex

cerebral sistema límbico, ganglios basales, muchas regiones del tronco y materia gris del cordón espinal. Los estudios en mamíferos coinciden en dividirlo en dos grupos: grupo caudal, cuyas proyecciones se extienden fundamentalmente al cordón espinal y grupo rostral cuyos cuerpos celulares se sitúan en el puente y mesencéfalo y aseguran la innervación de la parte anterior del cerebro. ^{49,54}

- **Metabolismo de la serotonina**

El metabolismo serotoninérgico se inicia a partir del aminoácido esencial triptófano, que sólo puede obtenerse a través de la dieta. Las etapas en la biosíntesis serotoninérgica son: una hidroxilación y una descarboxilación. El triptófano es hidroxilado y la reacción es catalizada por la triptófano hidroxilasa, enzima muy específica de la serotonina. Requiere la presencia de la tetrahidrobiopterina como cofactor y del oxígeno. Su valor de Km frente al triptófano es muy superior a la concentración intracerebral por tanto la enzima no está saturada. Una variación en la concentración intracerebral del triptófano puede provocar variaciones en la síntesis de 5-HT. La descarboxilación tiene lugar por una descarboxilasa con propiedades comunes con la DOPA descarboxilasa, enzima que interviene en la biosíntesis catecolaminérgica. Exige fosfato de piridoxal como cofactor el 5-HTP se descarboxila en la cadena lateral para convertirse en 5-hidroxitriptamina o serotonina. La administración de 5-HTP, provoca un aumento de 5-HT en el cerebro, ello también ocurre en menor proporción en las neuronas catecolaminérgicas debido al reconocimiento del sustrato por la DOPA. ^{49,54-57}

La etapa limitante de la síntesis serotoninérgica es la de la hidroxilación ya que la velocidad de la reacción es muy inferior a la de la descarboxilación. La hidroxilación es inhibida por la paraclorofenilalanina que se fija de modo irreversible sobre la enzima. La triptófano hidroxilasa puede inhibirse por el producto final. Dicha inhibición disminuye al aumentar la liberación o con el tratamiento con el fármaco reserpina. ^{49,54-57}

1.3 Definición de términos

Alimentación: es el proceso que inicia desde que se elige un alimento, ingresa al cuerpo y es absorbido por las vellosidades intestinales. ⁵⁸

Aminoácidos aromáticos: se incluye los aminoácidos fenilalanina, triptófano y tirosina y están incluidos además en los neutros polares o apolares. ⁵⁹

Aminoácidos competidores de triptófano (CAA): grupo de aminoácidos neutros cuya competencia radica en la afinidad por el mismo transportador sérico en relación al aminoácido triptófano entre ellos se incluye la valina y metionina. ^{17,60}

Aminoácidos neutros: son moléculas constituyentes de las proteínas. Existen muchas formas de clasificarlas, comúnmente va en función a las propiedades que se observan en su cadena lateral o grupo R. Así se tiene aminoácidos neutros polares, aminoácidos neutros apolares, aminoácidos de carga negativa, positiva o aminoácidos aromáticos. ^{38,39}

Aminoácidos ramificados (BCAAs): agrupa a los aminoácidos esenciales leucina, valina, isoleucina poseen en su estructura química un residuo ramificado comparten una ruta y destino metabólico. ^{59,61}

Biodisponibilidad: cantidad o grado de nutriente, sustrato o sustancia disponible para las células o tejido. ⁵⁹

Dieta: es el conjunto de alimentos o materia habitualmente elegidos e ingeridos por un individuo para su alimentación. ⁵⁸

Dieta desequilibrada: alimentación desproporcionada en nutrientes con posibles deficiencias o excesos de los mismos. ⁵⁸

Dieta equilibrada: Es el conjunto de alimentos que ingiere el individuo y que cumple con las cuatro leyes básicas de la nutrición: ser suficiente en energía, completa en nutrientes, guardar las proporciones de nutrientes según el requerimiento diario recomendado, adecuada al organismo en relación a su estado de salud, edad y hábitos individuales. ⁵⁸

Estimación de ingesta: cantidad promedio que se estima una población consume de un nutriente o alimento. ^{62,63}

Ingesta adecuada (AI): es el valor estimado de nivel de ingesta empleado cuando no puede establecerse un valor de RDA o valor de ingesta recomendada. Este dato es resultado de aproximaciones que se obtienen de observaciones o de experimentación en uno o más grupos de personas sanas. ^{62,63}

Metabolismo: comprende múltiples reacciones químicas en que la materia se utiliza como energía o pasa por múltiples transformaciones para formar materiales que constituyen las diferentes células o son almacenadas. Empieza en el momento en que los nutrientes son absorbidos. ⁵⁸

Nutrición: hace referencia a la resultante de tres procesos que comprenden la alimentación, el metabolismo y la excreción de sustancias que ingresan al organismo con el objetivo de mantener la integridad del individuo y la vida. ^{58,59}

Requerimiento diario recomendado (RDA): es el valor del nivel de ingesta diaria de un nutriente que resulta suficiente, es decir sin carencia ni excedente para cubrir las necesidades de casi todos (97,5%) los individuos sanos, según edades, sexo y situaciones de embarazo y lactancia de la población. ^{62,63}

Serotonina cerebral: biomolécula que ejerce función de neurotransmisor es sintetizado a partir de triptófano dietético. ⁶⁴

CAPÍTULO II

METODOLOGÍA

2.1. Tipo y diseño de investigación

Estudio experimental, analítico, prospectivo, longitudinal triple ciego de variables cuantitativas, realizado en el Instituto de Investigación de la Facultad de Medicina Humana de la Universidad de San Martín de Porres.

2.2. Diseño muestral

2.2.1. Población de estudio

Ratones albinos especie *Mus musculus*. Los roedores procedieron del bioterio del Centro Nacional de Productos Biológicos del Instituto Nacional de Salud del Perú.

2.2.2. Criterios de selección

Ratones albinos machos de la misma cepa BALB/c albino 1 especie *Mus musculus*, y de peso promedio 25g. Se siguieron los lineamientos éticos citados en el *Current Protocols and Pharmacology*⁶⁵ y en *The Mouse in Biomedical Research Normative Biology Husbandry*.⁶⁶

2.2.3. Muestra

2.2.3.1 Muestra biológica

Se emplearon 90 ratones albinos machos de la misma cepa BALB/c albino 1, especie *Mus musculus*, y de peso promedio 25g.

2.2.3.2 Formulaciones en evaluación

2.2.3.2.1. Muestra dietética

Dieta normal o estándar para roedor, dieta especial para depleción y recarga. Aminoácidos aislados en polvo, L-triptófano, L-metionina y L-valina, grado Feed. Dextrosa al 5% de laboratorio B/BRAUN, agua destilada. La dieta normal y las dietas de depleción y recarga se elaboraron y adquirieron en la Fundación para el Desarrollo Agrario de la Facultad de Ingeniería de Industria Alimentaria de la Universidad Agraria La Molina. Los aminoácidos L-triptófano, L-metionina y L-valina fueron donaciones de la

empresa Montana S.A. se adjunta en el anexo 2, 3 y 4 certificación y grado de pureza de los aminoácidos.

2.2.3.2.2. Formulación dietética

Para el desarrollo de las formulaciones se tomaron los valores del brebaje descritos en la metodología de la prueba de depleción aguda de triptófano y recarga según Dawn M Richard, et al., (2009).¹⁷ A los ingredientes de la dieta normal estándar para roedores, se le eliminó el ingrediente torta de soya (fuente proteica) e incrementó maíz que naturalmente es pobre en triptófano y de costo accesible, así se obtuvo la dieta depleta. A partir de la dieta depleta se desarrollaron las recargas con distintas concentraciones de triptófano, metionina y valina agregando cada aminoácido en proporciones distintas según el diseño de cada grupo experimental. Adicionalmente dos de los grupos recibieron dextrosa al 5% vía oral. Para la elaboración de las formulaciones, los especialistas de la Universidad Nacional Agraria la Molina con ayuda de la computadora utilizaron el método de programación lineal en el cual se generan cuatro archivos con la siguiente data: el valor nutritivo de los ingredientes, otro archivo con los requerimientos nutricionales, los archivos de restricción de ingredientes (listas con niveles de ingredientes para cada dieta), otro de restricción de nutrientes (listas con las restricciones de nutrientes es decir los niveles mínimos de requerimientos) para cada dieta, en base a esta información, el programa define los niveles de ingredientes que aportan nutrientes solicitados al mínimo costo. Según estos resultados se prepararon los ingredientes los cuales fueron molidos hasta alcanzar un tamaño de partícula de 600 micrones (0,6 mm de diámetro). Luego se pesó y para lograr la uniformidad de 95% (homogenidad) se mezcló utilizando un micro mezclador horizontal de paletas de acero inoxidable, durante 6 minutos. Finalmente fueron etiquetados y embolsados por tipo de formulación. La tabla 4 y 5 describen los ingredientes y valor

nutricional de la dieta normal y dieta depletada. La tabla 6 detalla las proporciones de triptófano, metionina, valina y/o glucosa recibida por cada grupo experimental.

Tabla 4. Ingredientes de la dieta normal y dieta depletada

| Ingredientes | Dieta normal | Dieta depletada |
|------------------------------|---------------------|------------------------|
| Maíz | 65,72g | 95g |
| Torta de soya, 47 | 26,29g | 0 |
| Aceite de soya | 6,32g | 2,6g |
| Carbonato de calcio | 1,16g | 1,19g |
| DL-Metionina | 0,21g | 0,33g |
| Pre mezcla de | 0,1g | 0,1g |
| Vitaminas y Minerales | | |
| CL-Colina, 60 | 0,1g | 0,1g |
| Sal | 0,1g | 0,1g |
| Fosfato dicalcico | 0 | 0,28g |
| L-Lisina | 0 | 0,22g |
| L-Treonina | 0 | 0,08g |
| Total kilos | 100 | 100 |
| Contenido nutricional | | |
| Triptófano | 0,25% | 0,09% |
| Metionina | 0,50% | 0,50% |
| Valina | 0,91% | 0,48% |

Tabla 5: Composición nutricional de la dieta normal y dieta depletada

| Nutriente | Dieta normal | Dieta depletada |
|-------------------------------|---------------------|------------------------|
| Materia seca | 88,07% | 86,63% |
| Proteína | 18,0% | 8,82% |
| Fibra | 2,70% | 2,38% |
| Grasa | 8,88% | 6,00% |
| Energía Metabólica | 3,50 MCAL/KG | 3,50 MCAL/KG |
| Lisina | 0,94% | 0,40% |
| Metionina | 0,50% | 0,50% |
| Met-Cist | 0,81% | 0,67% |
| Arginina | 1,22% | 0,44% |
| Treonina | 0,72% | 0,40% |
| Triptófano | 0,25% | 0,09% |
| Glicina | 0,77% | 0,34% |
| Gli-Ser | 1,68% | 0,72% |
| Histidina | 0,47% | 0,19% |
| Leucina | 1,70% | 1,05% |
| Isoleucina | 0,77% | 0,30% |
| Fenilalanina | 0,89% | 0,40% |
| Fen-Tir | 1,65% | 0,76% |
| Valina | 0,91% | 0,48% |
| Fosfolípido total | 0,33% | 0,30% |
| Fosfolípido disponible | 0,11% | 0,13% |
| Calcio | 0,50% | 0,50% |
| Sodio | 0,05% | 0,05% |
| Ácido linoleico | 4,71% | 3,39% |

Tabla 6. Proporciones de triptófano, metionina, valina y/o glucosa recibida por cada grupo experimental.

| Dieta | Grupo | Grupo | Grupo | Grupo | Grupo | Grupo | Grupo | Grupo | Grupo |
|---------------------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| | control | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 |
| L-Triptófano | 0,25g | 0,09g | 10,21g | 20,42g | 30,63g | 10,21g | 10,21g | 10,21g | 10.21g |
| L-Metionina | 0,5g | 0,5g | 2,5g | 2,5g | 2,5g | 5g | 7,5g | 5g | 7.5g |
| L-Valina | 0,91g | 0,48g | 8,42g | 8,42g | 8,42g | 16,84g | 25,26g | 16,84g | 25.26g |
| Dextrosa 5% | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0,25ml | 0,25ml |
| Ingredientes de la dieta | varios dieta normal | varios dieta normal | varios dieta normal | varios dieta normal | varios dieta normal | varios dieta normal | varios dieta normal | varios dieta normal | Varios dieta normal |

2.2.4. Muestreo

Aleatoriamente se formaron 8 grupos experimentales y un grupo control de 10 ratones cada uno. Los roedores, luego de pasar por una semana de aclimatación, recibieron a las 8 a.m., 5g de la dieta indicada y agua destilada. Para ello se colocó en cada jaula un pocillo con 5g de la dieta en polvo y un pocillo con agua destilada. De acuerdo a la metodología descrita en las pruebas de depleción y recarga, luego de seis horas pos ingesta, se procedió con la prueba de nado forzado. Dicha prueba se diseñó en base a la prueba de nado forzado en ratones descrito por Roger D. Porsolt ^{15,16} Para esta prueba se utilizaron cuatro tanques cilindros de vidrio tipo Macrolon de 30 cm de altura por 20 cm de diámetro. Se utilizó como separados láminas opacas individuales para cada tanque cilindro. Estos se llenaron con agua a una altura de aproximadamente 20 cm, la temperatura del agua fue de 23°C. Se verificaron las siguientes condiciones: temperatura ambiental de 21+/- 3°C, humedad de 30 a 70%, niveles de ruido menores de 70dB. Cada ratón fue colocado individualmente en el tanque cilindro para grabar y luego medir su movimiento durante 6 minutos. Los primeros dos minutos fueron de aclimatación y los últimos cuatro se contabilizaron para la medición. El parámetro de medición fue el tiempo de inmovilidad. ³⁵ Este procedimiento se repitió tres días consecutivos. Para la asignación de grupos se aplicó un sistema de triple ciego en el que, el administrador, el evaluador y el digitador, no conocieron las dietas asignadas a cada grupo. Así, los grupos experimentales fueron:

- Grupo control: Recibió dieta normal
- Grupo 1: Recibió dieta depletada en triptófano
- Grupo 2: Recibió dieta con una recarga de triptófano y una recarga de metionina y valina
- Grupo 3: Recibió dieta con doble recarga de triptófano y una recarga de metionina y valina
- Grupo 4: Recibió dieta con triple recarga de triptófano y una recarga de metionina y valina

- Grupo 5: Recibió dieta con una recarga de triptófano y doble recarga de metionina y valina
- Grupo 6: Recibió dieta con una recarga de triptófano y triple recarga de metionina y valina
- Grupo 7: Recibió dieta con una recarga de triptófano, doble recarga de metionina y valina, más glucosa
- Grupo 8: Recibió dieta con una recarga de triptófano, triple recarga de Metionina y valina, más glucosa

2.3. Lugar donde se ejecutó la investigación

El estudio se desarrolló en el bioterio de la Facultad de Medicina Humana de la Universidad San Martín de Porres.

2.4. Instrumentos y procedimientos de recolección de datos

2.4.1 Instrumentos

Se utilizó los siguientes instrumentos, materiales y equipos:

- 90 jaulas de metal enumeradas de 20cm de ancho por 30cm de largo y 15cm de altura.
- Termómetro para medir la temperatura del agua
- Cuatro tanques cilindro de vidrio transparente de 30cm de alto por 20cm de diámetro y sus respectivas cubiertas laterales opacas
- Cronómetro
- Higrómetro digital Thermo-Hygro marca VWR Internacional (T°:5-34 °C; humedad: 32-82%)
- Sensor de ruido marca Digital Sound Level Meter© (60-120 dB).
- Videocámara
- Balanza de alimento
- Video cámara
- Papel toalla y lámpara de luz cálida
- Soporte informático GraphPad versión 5

2.4.2 Procedimientos de recolección de datos

La video cámara se ubicó frente a los tanques cilindros y registró la prueba de nado forzado, junto a ella se colocó el cronómetro que marcó los 6 minutos que duró la prueba. Las jaulas fueron enumeradas para

identificar a cada ratón, pasadas las 6h pos ingesta en tandas de cuatro y por orden numérico de menor a mayor, con ayuda de profesional técnico se colocó cada ratón individualmente en cada tanque cilindro previamente acondicionado para la prueba de nado forzado, con el termómetro se controló la temperatura del agua. Inmediato al ingreso de la tanda de cuatro roedores, se inició el conteo por cronómetro y se inició la filmación la cual también registra el tiempo, ambos detenidos a los 6 minutos. Con apoyo del profesional técnico se retiró del cilindro a cada ratón, se le secó individualmente con papel toalla junto a una lámpara para evitar hipotermia en el roedor. Inmediato a ello se le retornó a la jaula correspondiente. En una ficha de recolección de datos se registró el número de video y el número de jaula que identifica a cada roedor. Este procedimiento se repite tres días consecutivos. Concluida la prueba para los 90 roedores, se visualizó cada video en computadora, se utilizó cronómetro para el registro del tiempo de inmovilidad de cada ratón. Los datos obtenidos fueron ingresados a la base de datos del software estadístico para las pruebas correspondientes.

2.5. Procesamiento y análisis de datos

Los datos descriptivos se presentan como medias y desviación estándar, y para la validación estadística se aplicaron las pruebas de ANOVA de un factor, T-Student de dos colas y la prueba de correlación de Pearson. Se utilizó como soporte informático el software GraphPad versión 5.

2.6. Aspectos éticos

Se respetó los principios y los lineamientos para las investigaciones en animales de laboratorio, referidos por la *International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals*,⁶⁶ y la Declaración sobre el uso de Animales en la Investigación Biomédica.⁶⁷ El estudio fue aprobado para su ejecución por el Instituto de Investigación de la Facultad de Medicina Humana de la Universidad de San Martín de Porres.

CAPÍTULO III

RESULTADOS

Los resultados del presente estudio se presentan por día. Los tiempos de inmovilidad promedio registrados en el día uno para el grupo control y los ocho grupos experimentales del uno al ocho respectivamente fueron: 7,29 +/- 5,06; 26,83 +/- 26,54; 18,33 +/- 18,26; 1,89 +/- 2,71; 5,50 +/- 3,78; 3,50 +/- 21,43; 11,67 +/- 9,75; 0,86 +/- 1,21; y 6,00 +/- 7,04; (Ver tabla 7). La prueba ANOVA mostró diferencia significativa en los grupos para el día uno con un valor $p=0.0157$ con IC al 95% (Ver figura 1)

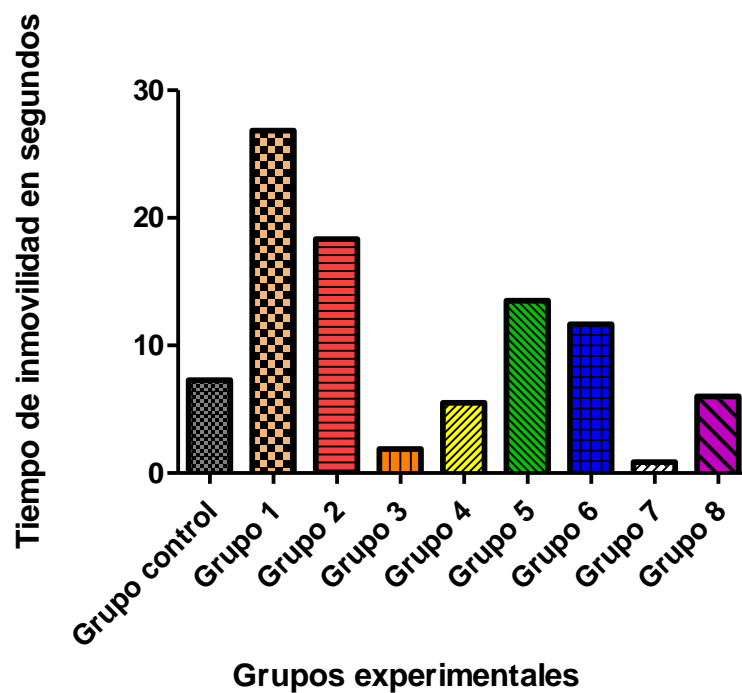


Figura 1 Tiempos promedio de inmovilidad para el grupo control y grupos experimentales en el día 1*

* En la figura 1 se observa los tiempos promedio de inmovilidad del grupo control y los ocho grupos experimentales en el día uno.

Los grupos que registraron tiempos promedio de inmovilidad similares al grupo control para el día 1 fueron los grupo 4 y 8 (ver tabla 7 y figura 2). La prueba de ANOVA para los tiempos promedio del grupo control, grupo 4 y grupo 8 no mostró diferencia significativa para el día 1.

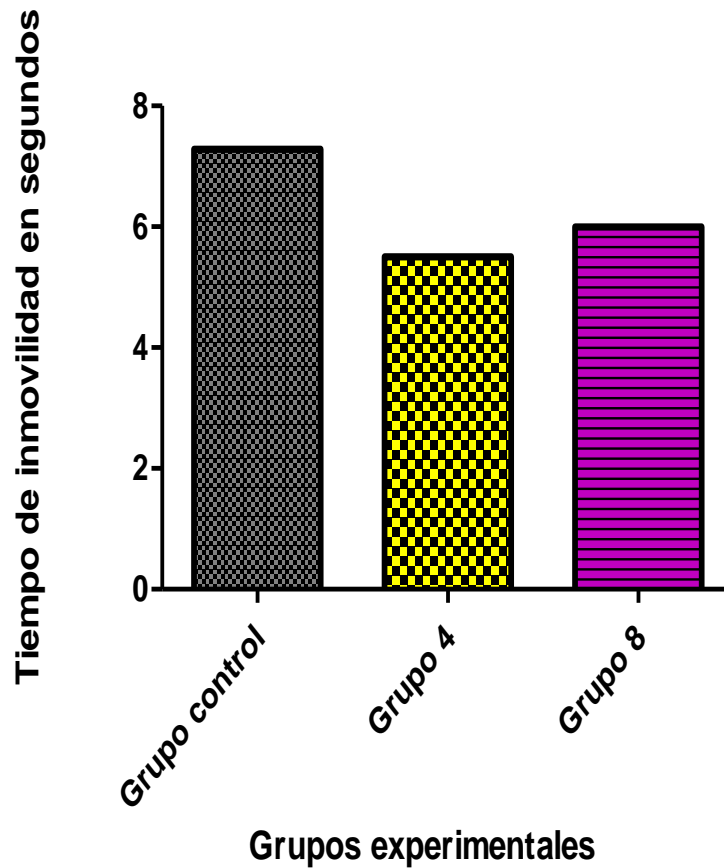


Figura 2: Comparación de tiempos promedio del grupo control, grupo 4 y grupo 8 para el día 1*

* La figura 2 muestra la comparación de los tiempos promedio de la dieta normal del grupo control, la dieta con triple recarga de triptófano del grupo 4 y la dieta con una recarga de triptófano y triple de metionina, valina más glucosa del grupo 8.

La prueba T de Student para el grupo control Vs grupo 4 y grupo control Vs grupo 8 no fueron significativos. (Ver figura 3)

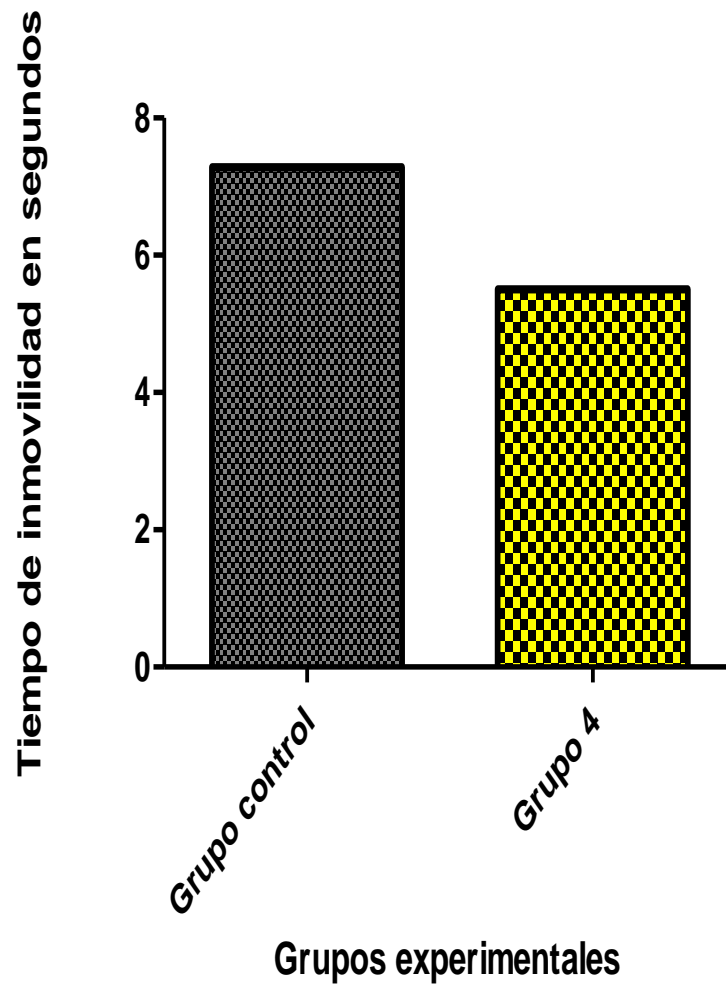


Figura 3: Comparación tiempos promedio grupo control y grupo 4 para el día 1*

* La figura 3 compara los tiempos promedio de la dieta normal del grupo control y la dieta con triple recarga de triptófano y constante en metionina y valina del grupo 4 para el día 1.

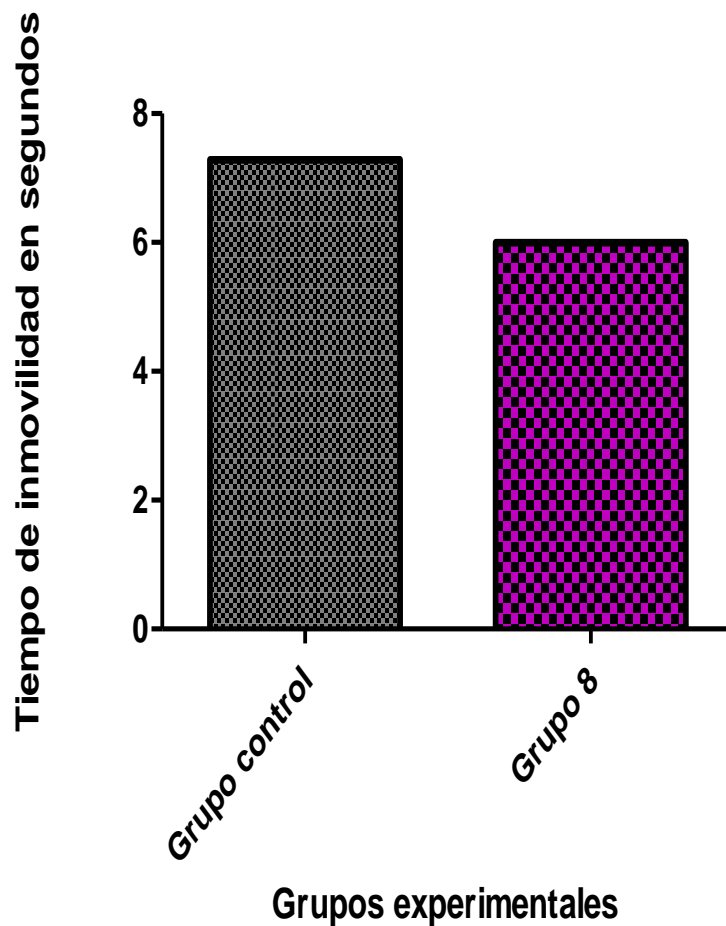


Figura 4: Comparación tiempos promedio del grupo control y grupo 8 para el día 1*

* La figura 4 compara los tiempos promedio de la dieta normal del grupo control con la dieta con una recarga de triptófano, triple recarga de metionina, valina más glucosa y constante en metionina y valina recibida por el grupo 8 para el día 1.

Se compararon los resultados del grupo control, grupo 2, grupo 3 y grupo 4 en los que la formulación dietética incrementaba la concentración de triptófano y mantenía constante los aminoácidos competidores. La prueba ANOVA para dichos grupos mostró diferencia significativa con un valor $p = 0.0168$. Ver figura 5.

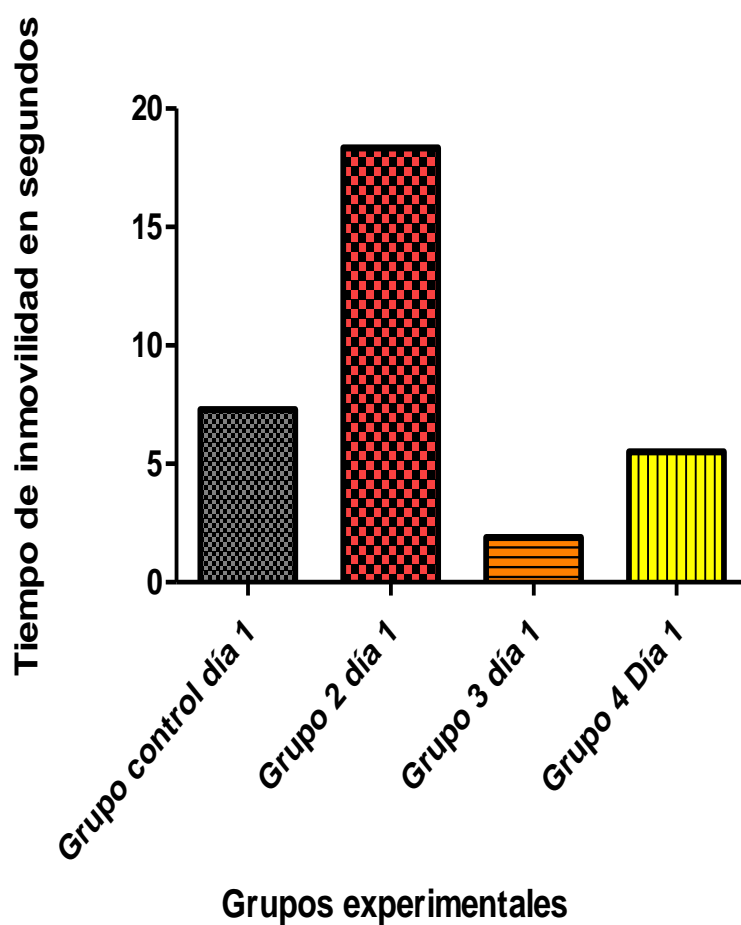


Figura 5: Efecto dosis respuesta de los grupos 2, 3 y 4 frente al grupo control.*

* La figura 5 muestra la diferencia significativa del efecto dosis respuesta de las dietas del grupo 2, 3 y 4 en las que se da una recarga, doble recarga y triple recarga de triptófano respectivamente manteniéndose la dosis de metionina y valina, frente al grupo control.

La prueba de correlación de Pearson mostró una tendencia negativa no significativa para los resultados en los grupos 2, 3 y 4 ($r=-0,4194$; $p=0,0584$; IC=-0,7207 a -0,01512; $R=0,1759$) en el día uno. (Ver figura 6)

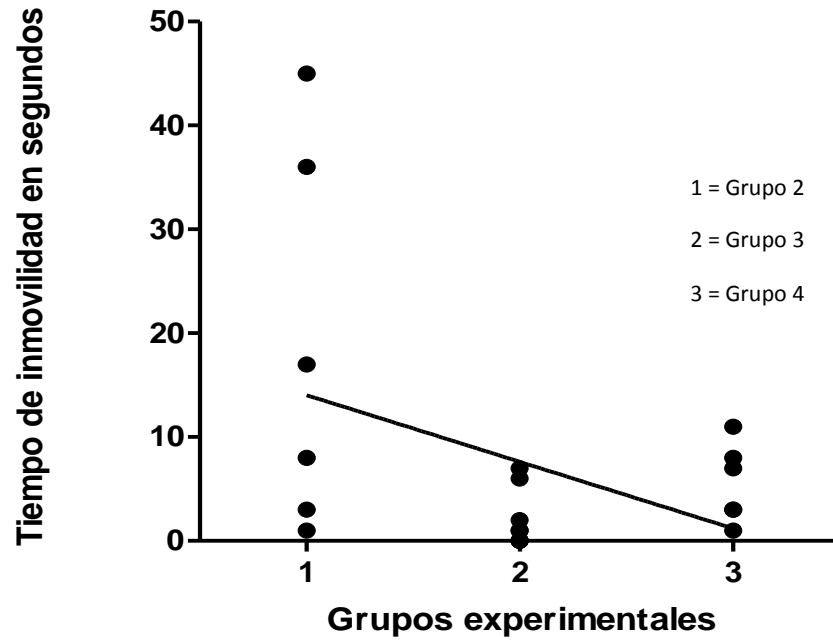


Figura 6: Correlación respecto de triptófano para el día 1*

* La figura 6 el resultado de la prueba de correlación para las dietas a las cuales se incrementaba la proporción de triptófano, muestra que a mayor concentración de triptófano, menor tiempo de inmovilidad. En estos grupos metionina y valina fueron constantes.

Tabla 7: Tiempos promedios de inmovilidad (segundos) de roedores que recibieron dietas basadas en triptófano, metionina, valina y glucosa.

| DIA | GRUPO CONTROL | GRUPO 1 | GRUPO 2 | GRUPO 3 | GRUPO 4 | GRUPO 5 | GRUPO 6 | GRUPO 7 | GRUPO 8 | P * P<0,05 |
|--------------|----------------------|-------------------|-------------------|---------------------|-------------------|-------------------|-------------------|----------------------|---------------------|--------------------------|
| DIA 1 | 7.286 +/-5,057 | 26,83 +/-26,54 | 18,33 +/-18,26 | 1.889** +/-27,13 | 5,500 +/-3,782 | 13,50 +/-21,43 | 11,67 +/-9,750 | 0,8571** +/-1,215 | 6,000 +/-7,043 | 0,0157 |
| DIA 2 | 46,71 +/-23,56 | 61,83 +/-37,48 | 47,86 +/-17,39 | 43,00 +/-39,16 | 23,67 +/-12,72 | 34,83 +/-35,77 | 28,33+/- 19,63 | 37,57 +/-37,16 | 16,83** +/-16,90 | NS |
| DIA 3 | 68,00 +/-38,36 | 64,71 +/-46,09 | 89,29 +/-40,35 | 53,00 +/-30,91 | 37,67 +/-21,63 | 71,29 +/-46,77 | 27,00 +/-13,98 | 55,14 +/-53,93 | 67,86 +/-36,69 | NS |

***Prueba de ANOVA de un factor, NS = no significativo, **Prueba T-Student frente a grupo 1 y Prueba T-Student frente a grupo control.**

Se compararon los efectos dosis respuesta de las dietas que mantenían en una carga la concentración de triptófano e incrementadas proporcionalmente metionina y valina. La prueba ANOVA para los grupos control, 2, 5 y 6 no mostró diferencia significativa para el día 1. (Ver figura 7)

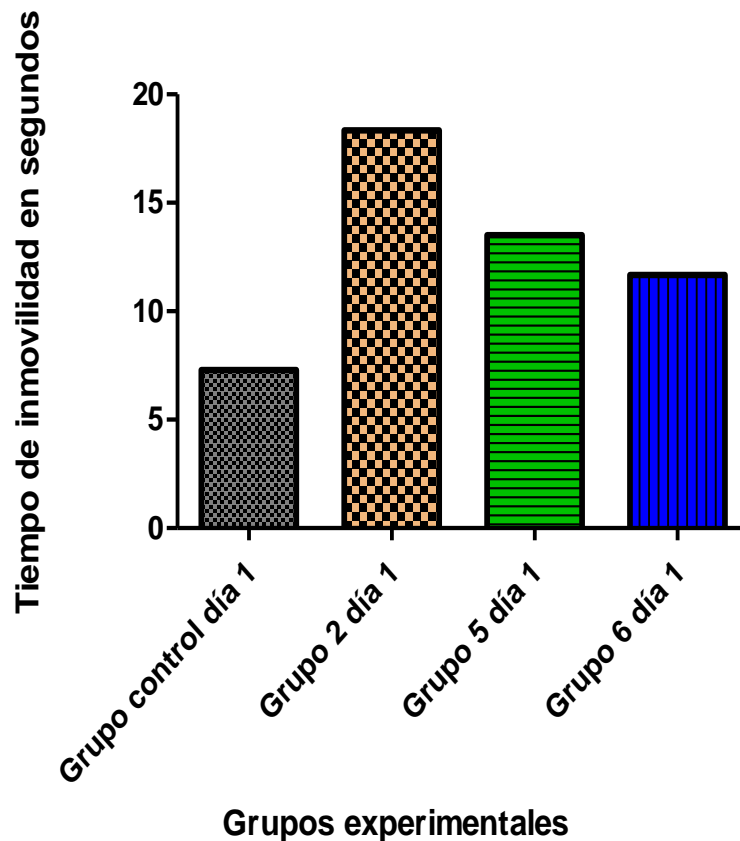


Figura 7: Efecto dosis respuesta de los grupos 2, 5 y 6 frente al grupo control para el día 1*

* La figura muestra el efecto dosis respuesta sobre el tiempo de inmovilidad de la dieta normal del grupo control y las dietas con proporciones incrementadas de metionina y valina con una recarga para el grupo 2, doble recarga para el grupo 5 y triple recarga para el grupo 6. La dosis de una recarga de triptófano se mantuvo constante para los grupos 2, 5 y 6 para el día 1.

Así mismo, la prueba de correlación mostró una tendencia negativa no significativa para los grupos 2, 5 y 6 ($r = -0,1762$; $p=0,4843$; $IC=-0,5943$ a $-0,3168$; $R=0,03105$). (Ver figura 8)

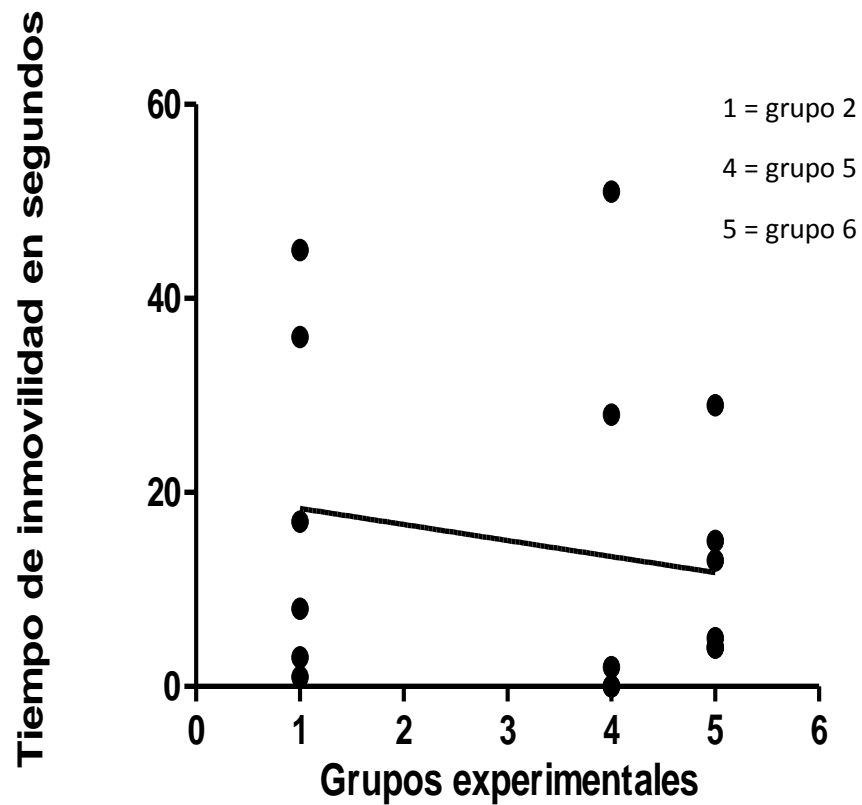


Figura 8: Correlación de Pearson respecto de aminoácidos metionina y valina para el día 1*

* En la figura 8 se refleja los resultados de la prueba de correlación la que muestra que a mayor concentración de metionina y valina, el tiempo de inmovilidad tiende levemente a disminuir. En estos grupos la concentración de triptófano fue constante y de una recarga.

También se comparó el efecto dosis-respuesta de las dietas que mantuvieron constante una recarga de triptófano, incrementadas proporcionalmente los aminoácidos metionina y valina pero además recibieron glucosa. La prueba ANOVA para los grupos control, 7 y 8 no mostró diferencia significativa para el día 1. (Ver figura 9)

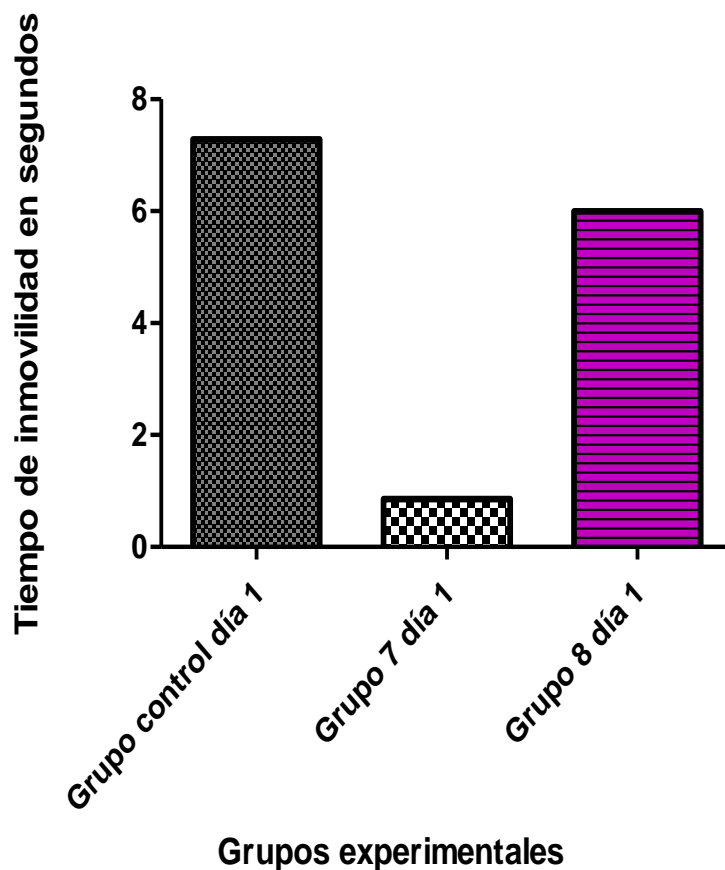


Figura 9: Efecto dosis respuesta sobre el tiempo de inmovilidad para el grupo control frente a los grupos 7 y 8 del día 1*

* La figura 9 muestra el efecto dosis respuesta sobre el tiempo de inmovilidad de las dietas con proporción incrementadas de metionina, valina en doble recarga para el grupo 7 y triple recarga para el grupo 8 ambas más glucosa frente al grupo control para el día 1.

Por otro lado, sí se observó una correlación negativa significativa para los grupos 2, 7 y 8 ($r=-0,5292$; $p=0,0198$; IC=-0,7929 a -0,09856; $R=0,2800$) que indicaría que a mayor concentración de aminoácido de competidores en presencia de glucosa, menor tiempo de inmovilidad. (Ver figura 10)

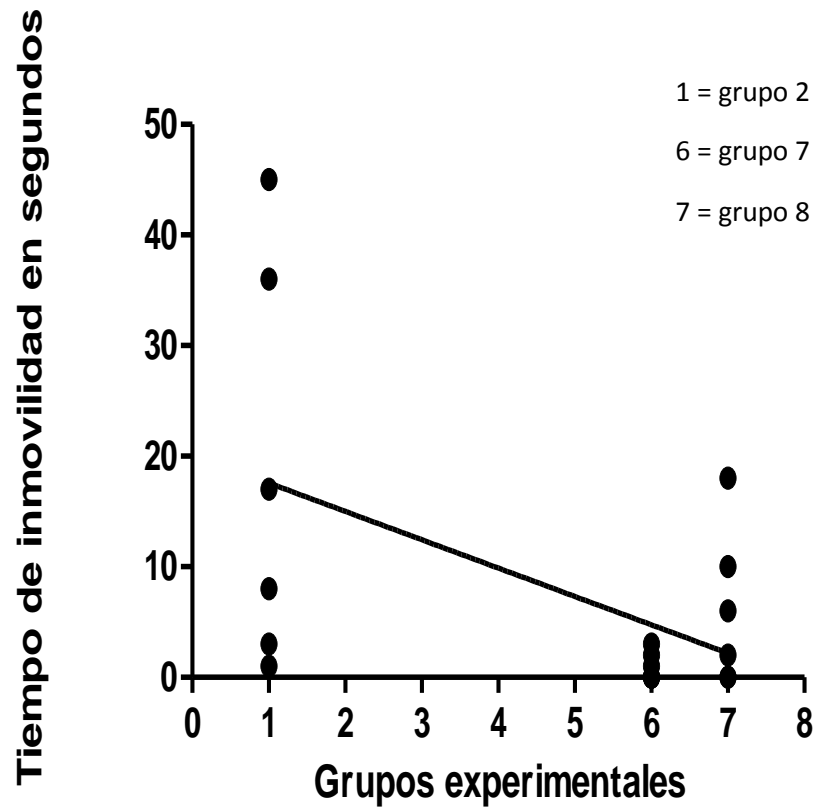


Figura 10: Correlación de Pearson respecto de aminoácidos metionina, valina y glucosa para el día 1*

* En el gráfico 10 la prueba de correlación muestra que a mayor concentración de metionina y valina, más glucosa menor tiempo de inmovilidad estadísticamente significativo. La concentración de triptófano se mantuvo constante.

Se comparó el efecto dosis- respuesta sobre el tiempo de inmovilidad de la dieta depletada del grupo 1 versus el grupo 3 y el grupo control versus del grupo 3. La prueba T de Student aplicada para ambas comparaciones, mostraron diferencia significativa con un valor $p=0,0136$ y $p=0,0156$ respectivamente lo que evidencia que a pesar de registrar menor tiempo de inmovilidad el efecto dosis respuesta no es similar al grupo control ni a la depleción. (Ver figura 11 y figura 12)

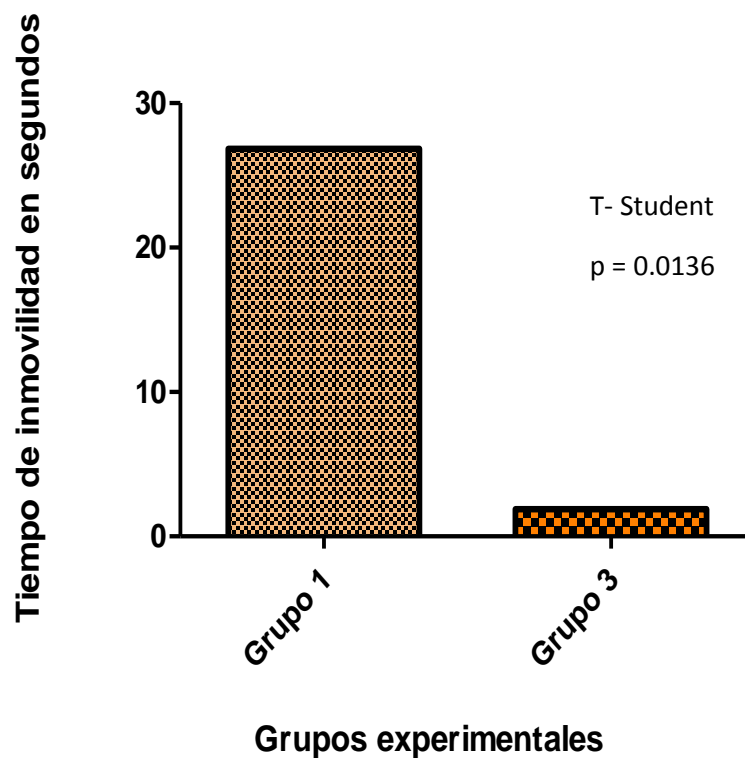


Figura 11: Comparación dosis respuesta entre el grupo 1 y grupo 3 sobre el tiempo de inmovilidad del día 1*

* La figura 11 muestra el efecto sobre el tiempo de inmovilidad entre la depleción de triptófano para el grupo 1 y una doble recarga de triptófano para el grupo 3.

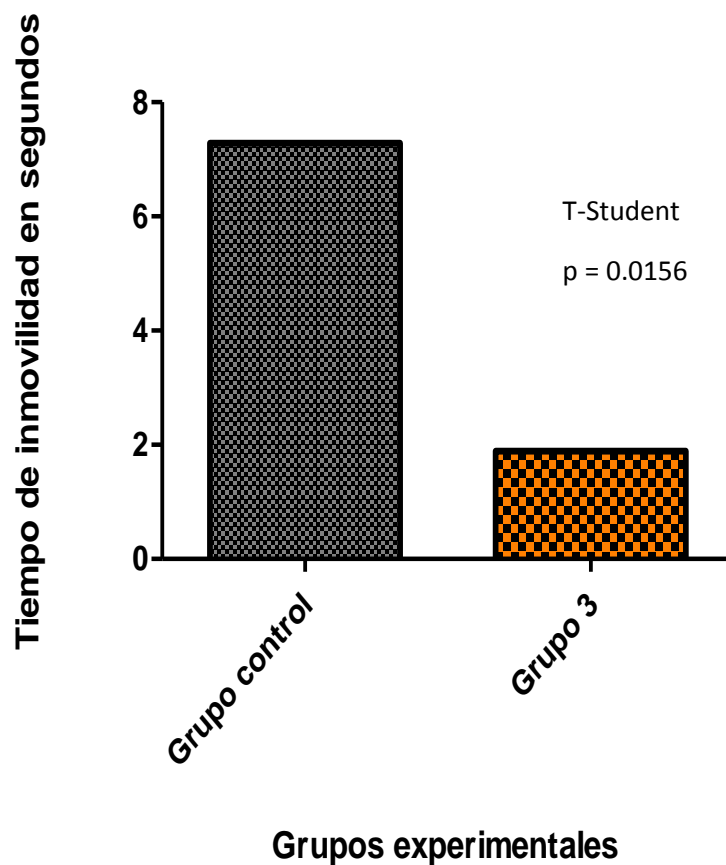


Figura 12: Comparación dosis respuesta entre el grupo control y grupo 3 sobre el tiempo de inmovilidad del día 1*

* La figura 12 muestra el efecto sobre el tiempo de inmovilidad entre la dieta normal del grupo control y una doble recarga de triptófano del grupo 3 donde la diferencia fue significativa para la prueba T de Student.

La misma prueba mostró diferencia significativa para grupo control Vs el grupo 7 y el grupo 1 Vs. grupo 7, con un valor $p=0,0067$ y $p=0,0244$ respectivamente. (Ver figura 13 y figura 14)

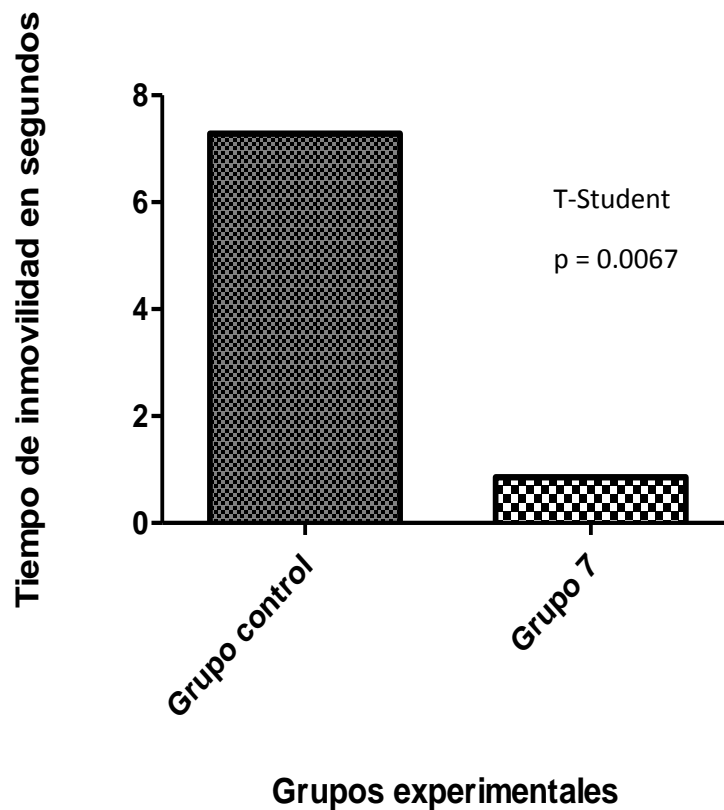


Figura 13: Comparación dosis respuesta entre grupo control y grupo 7 sobre el tiempo de inmovilidad del día 1*

* La figura 13 muestra el efecto entre la dieta normal del grupo control y la dieta con una recarga de triptófano, doble recarga de metionina y valina más glucosa del grupo 7 sobre el tiempo de inmovilidad en el día 1.

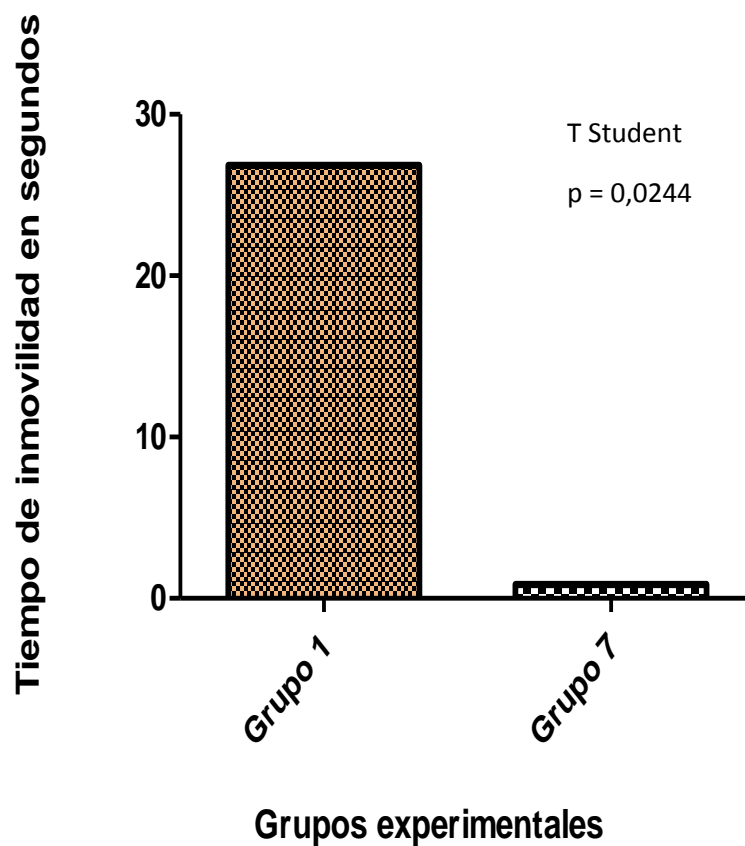


Figura 14: Comparación dosis respuesta entre a grupo 1 y grupo 7 sobre el tiempo de inmovilidad del día 1*

* La figura 14 muestra el efecto entre la dieta depletada del grupo 1 y la dieta con una recarga de triptófano, doble recarga de metionina y valina más glucosa del grupo 7 sobre el tiempo de inmovilidad en el día 1.

Los tiempos de inmovilidad promedio registrados para el día dos en el grupo control y los ocho grupos experimentales del uno al ocho respectivamente fueron: 46,71 +/- 23,56; 61,83 +/- 37,84; 47,86 +/-17,39; 43,00 +/- 39,16; 23,67 +/- 12,72; 34,83 +/- 35,77; 28,33 +/- 19,63; 37,57 +/- 37,16; y 16,83 +/- 16,90 (ver tabla 7). La prueba ANOVA no mostró diferencia significativa $p = 0,2114$ (ver figura 15).

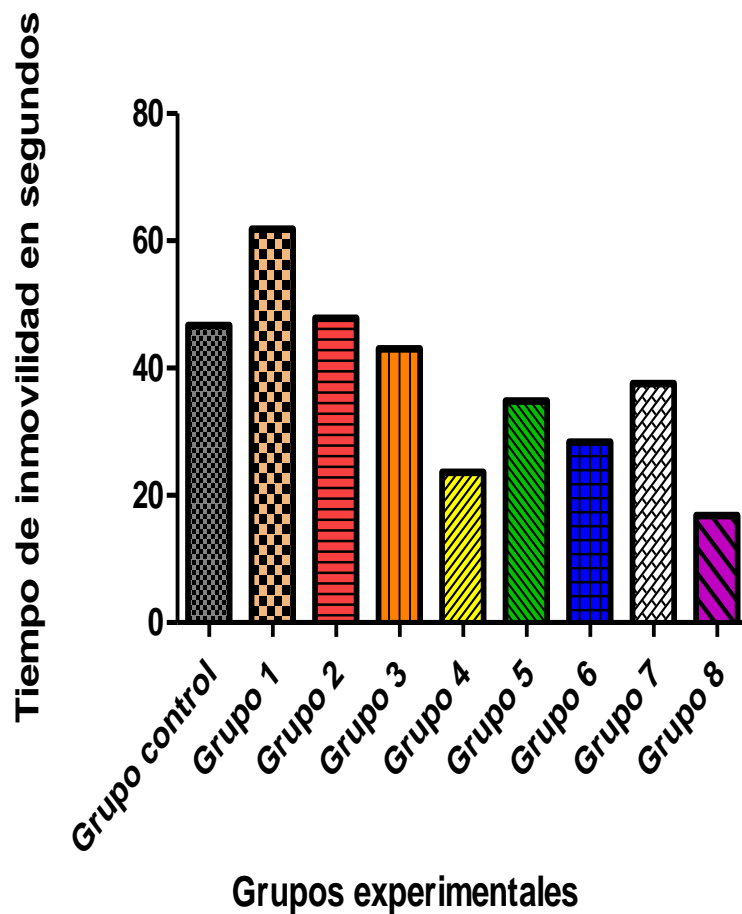


Figura 15: Tiempos promedio de inmovilidad para el grupo control y grupos experimentales en el día 2*

* La figura 15 muestra los tiempos promedio de inmovilidad del grupo control y los ocho grupos experimentales en el día dos.

La prueba de correlación de Pearson mostró una tendencia negativa no significativa para los grupos 2, 3 y 4 ($r=-0.3632$, $p=0,1154$; IC=-0.6942 a 0,09458; $R=0,1319$) en el día dos. (Ver figura 16)

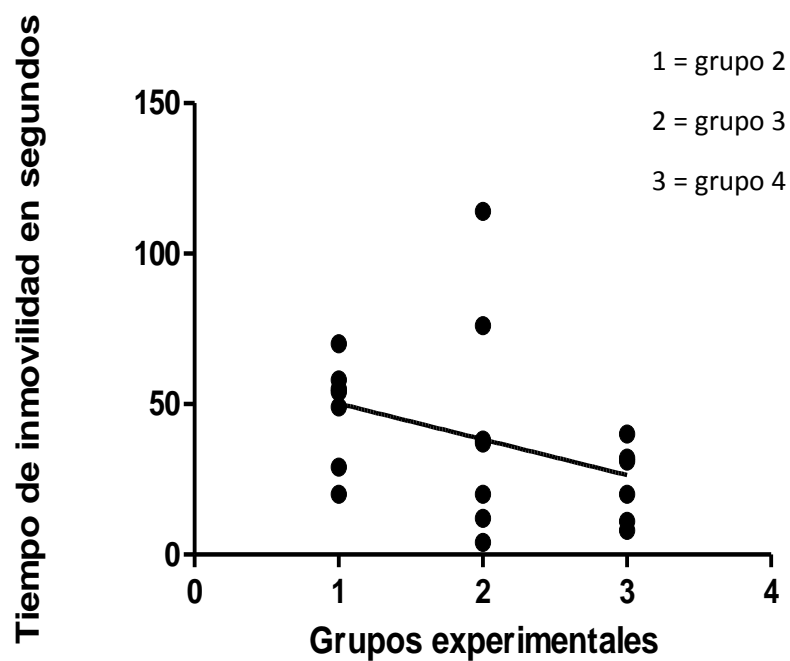


Figura 16: Correlación de Pearson respecto de triptófano para el día 2*

* En el gráfico 16 el resultado de la prueba de correlación muestra que aun cuando la tendencia no es significativa se observa que a mayor concentración de triptófano menor tiempo de inmovilidad, en estos grupos la concentración de metionina y valina se mantuvieron constantes.

Así mismo, se reveló una tendencia negativa no significativa para los grupos 2, 5 y 6 ($r=-0,3356$; $p=0,1602$; $IC=-0,6854$ a $0,1401$; $R=0,1126$). (Ver figura 17)

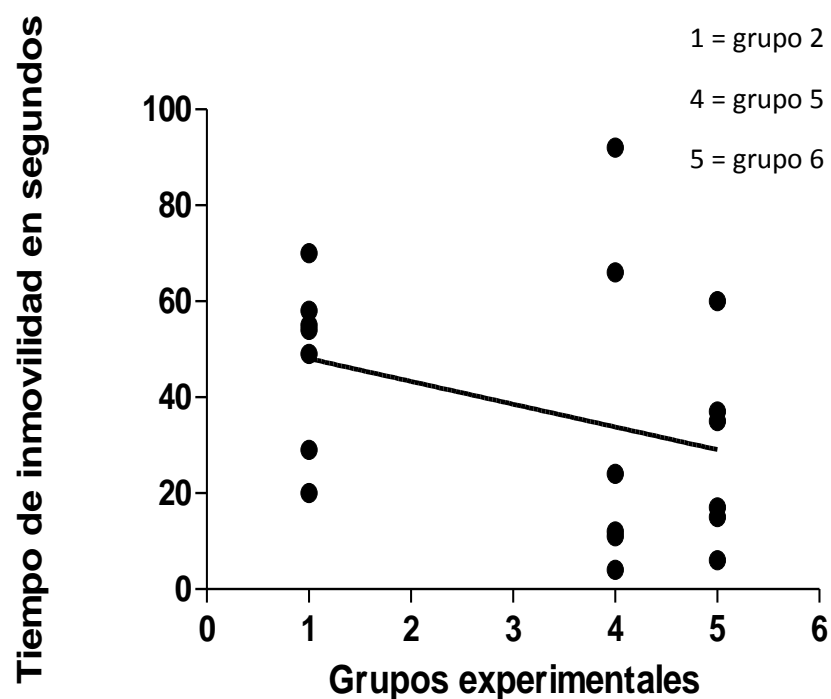


Figura 17: Correlación de Pearson respecto de aminoácidos metionina y valina para el día 2*

* En la figura 17 se observa el resultado de la prueba de correlación que muestra una tendencia negativa no significativa, a mayor concentración de metionina y valina menor tiempo de inmovilidad, en estos grupos la concentración de triptófano se mantuvo constante.

Por otro lado, se observó correlación negativa no significativa para los grupos 2, 7 y 8 ($r=-0,3920$, $p=0,0874$; IC=-0,7112 a 0,06127; $R=0.1536$). (Ver figura 18)

12

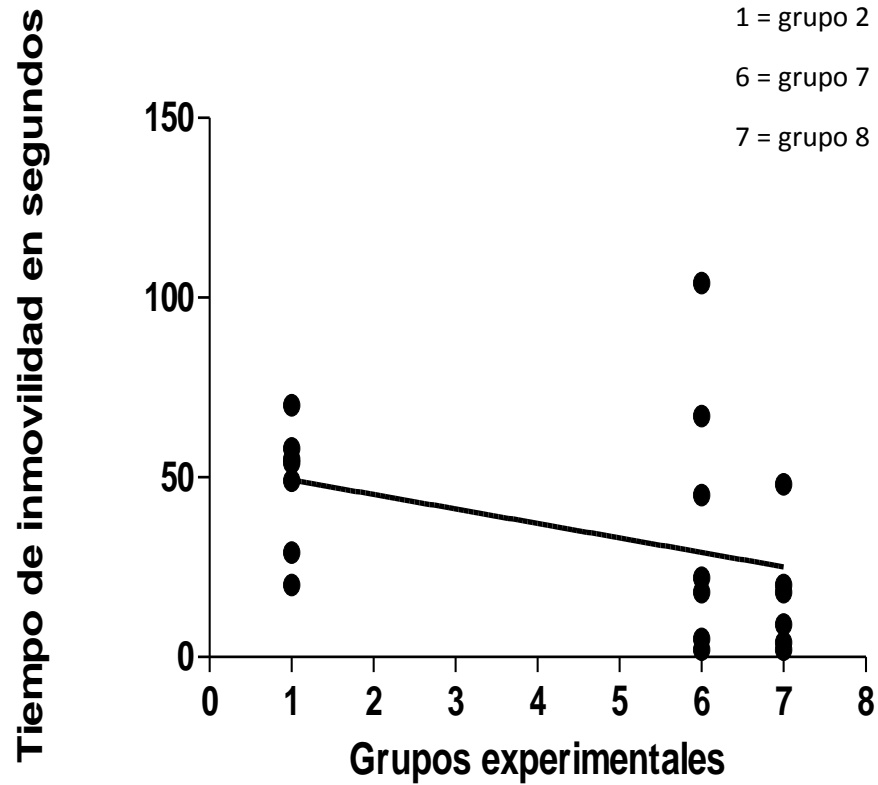


Figura 18: Correlación de Pearson respecto de aminoácidos metionina, valina más glucosa para el día 2*

* La figura 18 refleja la tendencia de la prueba de correlación de Pearson donde se muestra que a mayor concentración de metionina, valina, más glucosa menor tiempo de inmovilidad estadísticamente no significativo. La concentración de triptófano se mantuvo constante.

Se compararon los grupos cuyos tiempos de inmovilidad resultaban similares en el día 2 para determinar si existían diferencias estadísticamente significativas. Se comparó el grupo 8 versus el grupo 1 y el grupo control. La prueba T de Student aplicada al grupo control Vs grupo 8, grupo 1 Vs. grupo 8, mostró diferencia significativa con un valor $p=0,0255$ y $p=0,0231$ respectivamente. (Ver figura 19 y figura 20)

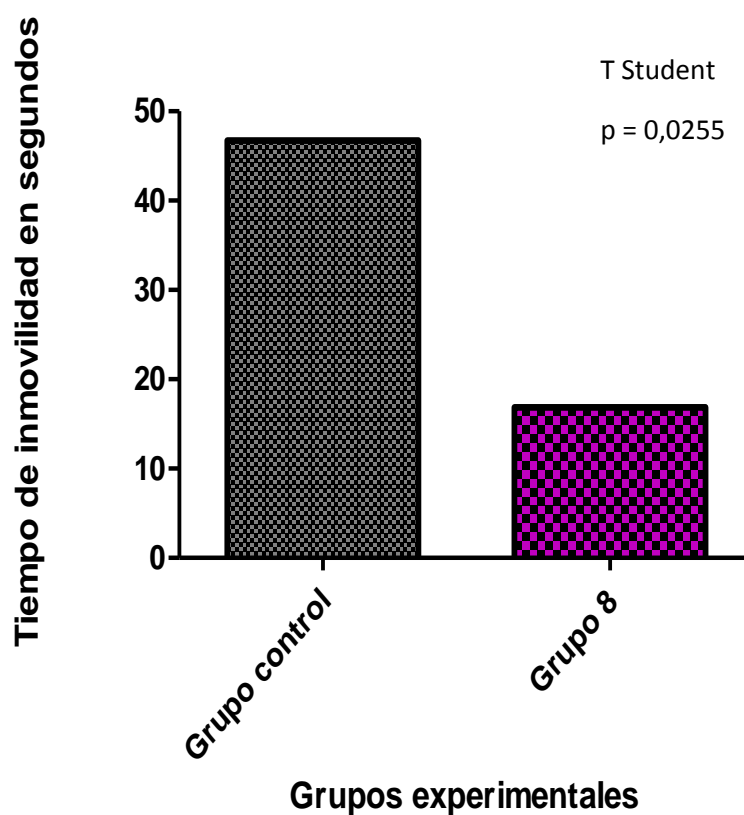


Figura 19: Comparación dosis respuesta entre el grupo control y grupo 8 sobre el tiempo de inmovilidad del día 2*

* La figura 19 se compara el efecto de la dieta normal del grupo control y la dieta con una recarga de triptófano, triple recarga de metionina y valina más glucosa del grupo 8 sobre el tiempo de inmovilidad en el día dos.

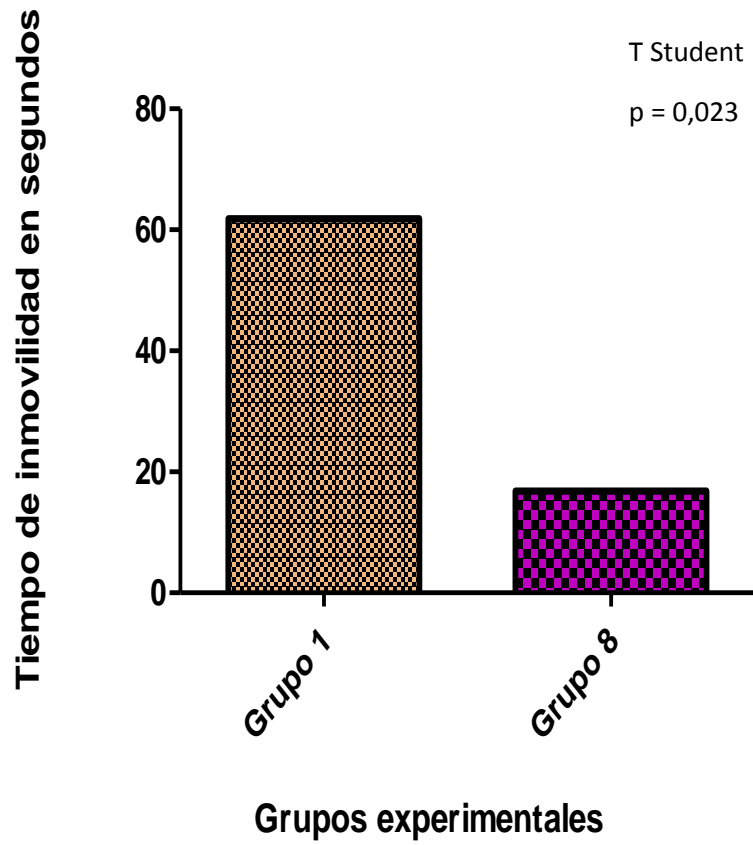


Figura 20: Comparación dosis respuesta entre el grupo 1 y grupo 8 sobre el tiempo de inmovilidad del día 2*

* En la figura 20 se compara el efecto de la dieta depleta del grupo 1 y la dieta con una recarga de triptófano, triple recarga de metionina y valina más glucosa del grupo 8 sobre el tiempo de inmovilidad en el día dos.

Los tiempos de inmovilidad promedio registrados para el día tres en el grupo control y los ocho grupos experimentales del uno al ocho respectivamente fueron: 68.00 +/- 38,36; 64,71 +/- 46,09; 89,29 +/- 40,35; 53,00 +/- 30,91; 37,67 +/- 21,63; 71,29 +/- 46,77; 27,00 +/- 13,98; 55,14 +/- 53,93; y 67,86 +/- 36,69 (ver tabla 7). La prueba ANOVA no mostró diferencia significativa $p = 0,1568$ (ver figura 21)

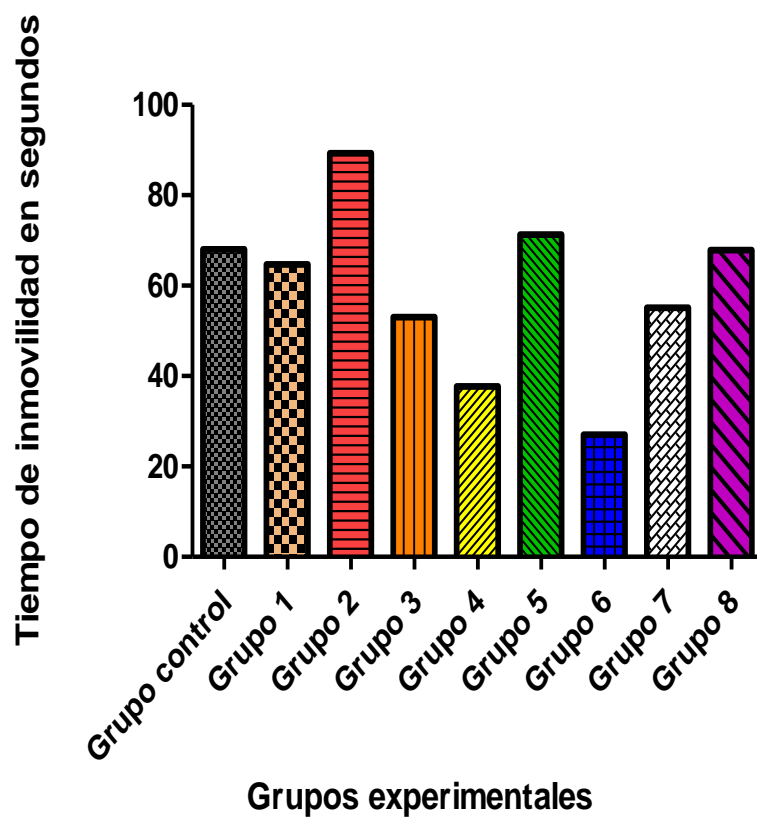


Figura 21: Tiempo promedio de inmovilidad para el grupo control y grupos experimentales en el día 3*

* En la figura 21 se observa los tiempos promedio de inmovilidad para el grupo control y los 8 grupos experimentales en el día tres.

Se aplicó la prueba de correlación de Pearson tomando los grupos con concentraciones de triptófano en aumento. La prueba mostró tendencia negativa significativa para los grupos 2, 3 y 4 ($r=-0,5802$; $p=0,0092$; $IC=-0,8187$ a $-0,1710$; $R=0,3367$). (Ver figura 22)

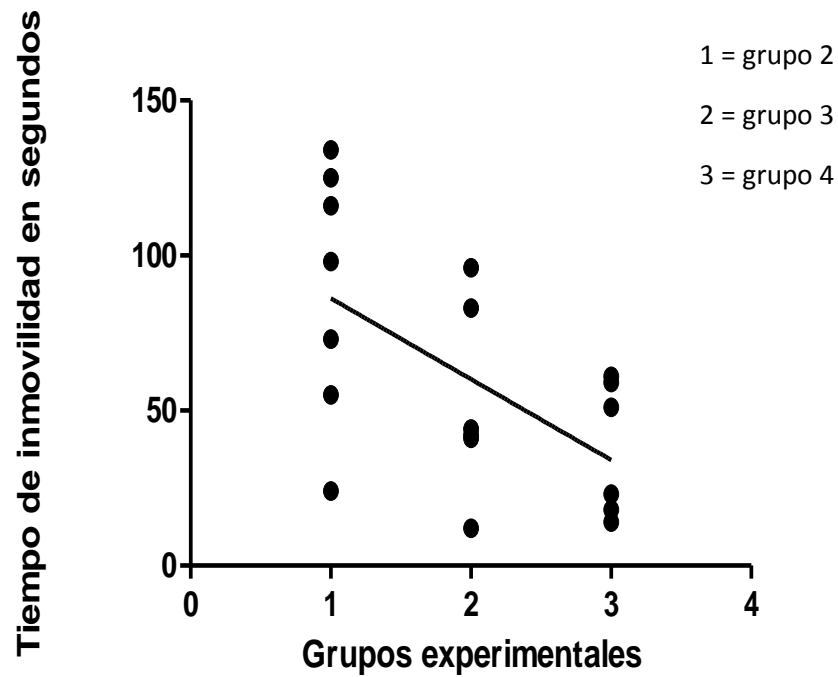


Figura 22: Correlación de Pearson respecto de triptófano para el día 3*

* En la figura 22 el resultado de la prueba de correlación muestra tendencia negativa significativa, a mayor concentración de triptófano menor tiempo de inmovilidad, en estos grupos la concentración de metionina y valina se mantuvieron constantes.

La misma prueba se realizó para los grupos que mantenían constante triptófano pero incrementaban aminoácidos competidores. Se observó una tendencia negativa significativa para los grupos 2, 5 y 6 ($r=-0,5308$; $p=0,0133$; $IC=-0,7831$ a $-0,1285$; $R=0,2818$). (Ver figura 23)

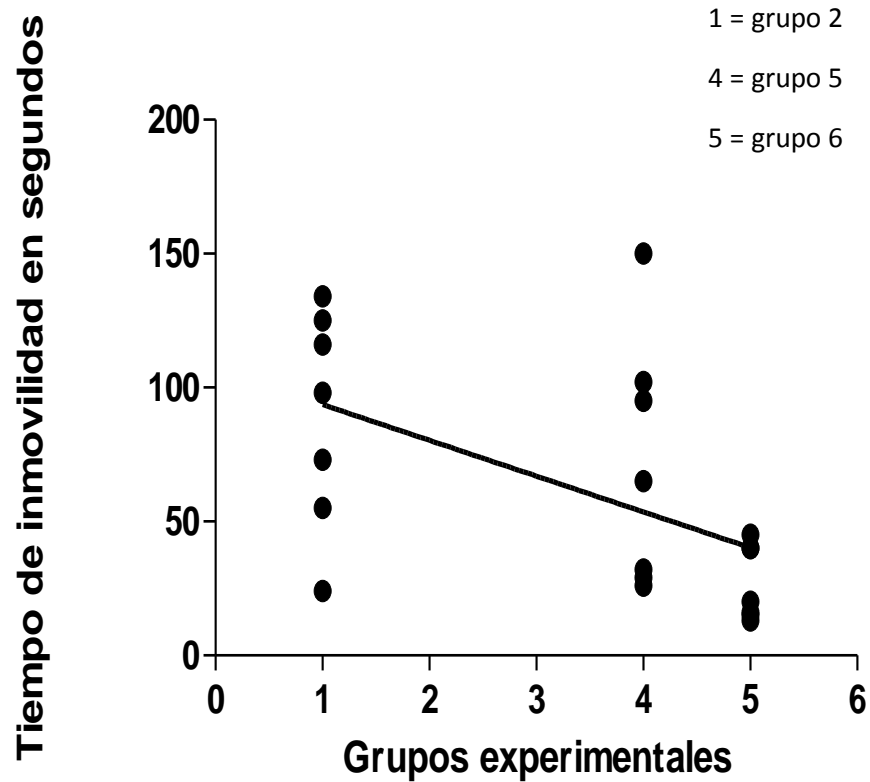


Figura 23: Correlación de Pearson respecto de aminoácidos metionina y valina para el día 3*

* La figura 23 muestra el resultado de la prueba de correlación muestra tendencia negativa significativa, a mayor concentración de metionina y valina menor tiempo de inmovilidad. En estos grupos la concentración de triptófano se mantuvo constante.

Por otro lado, se analizó la correlación entre los grupos que mantenían constante triptófano pero incrementaba aminoácidos competidores y se incluía glucosa. Resultó en una tendencia negativa no significativa para los grupos 2, 7 y 8 ($r=-0,2798$; $p=0,2192$; $IC=-0,6349$ a $0,1728$; $R=0,07831$) en el día 3. (Ver figura 24)

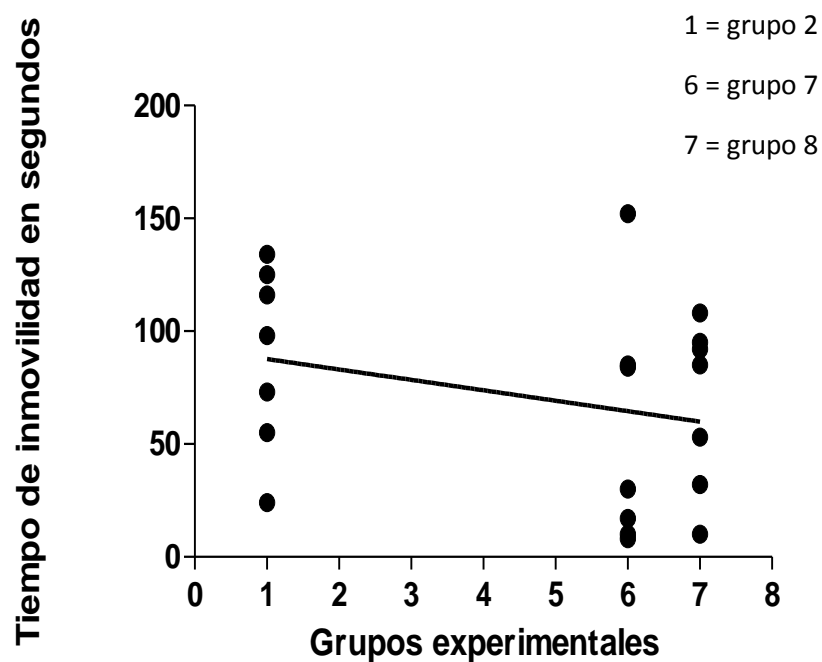


Figura 24: Correlación de Pearson respecto de aminoácidos metionina y valina más glucosa para el día 3*

* La figura 24 refleja el resultado de la prueba de correlación donde se muestra una tendencia negativa no significativa, a mayor concentración de metionina y valina más glucosa menor tiempo de inmovilidad. En estos grupos la concentración de triptófano se mantuvo constante.

Los tiempos de inmovilidad para el grupo control, grupo 4 y 8 muestran una tendencia similar dosis respuesta para los tres días de observación (ver figura 25). Las pruebas de ANOVA y T de Student no revelaron diferencia significativa salvo el día dos para los valores del grupo control Vs. grupo 8.

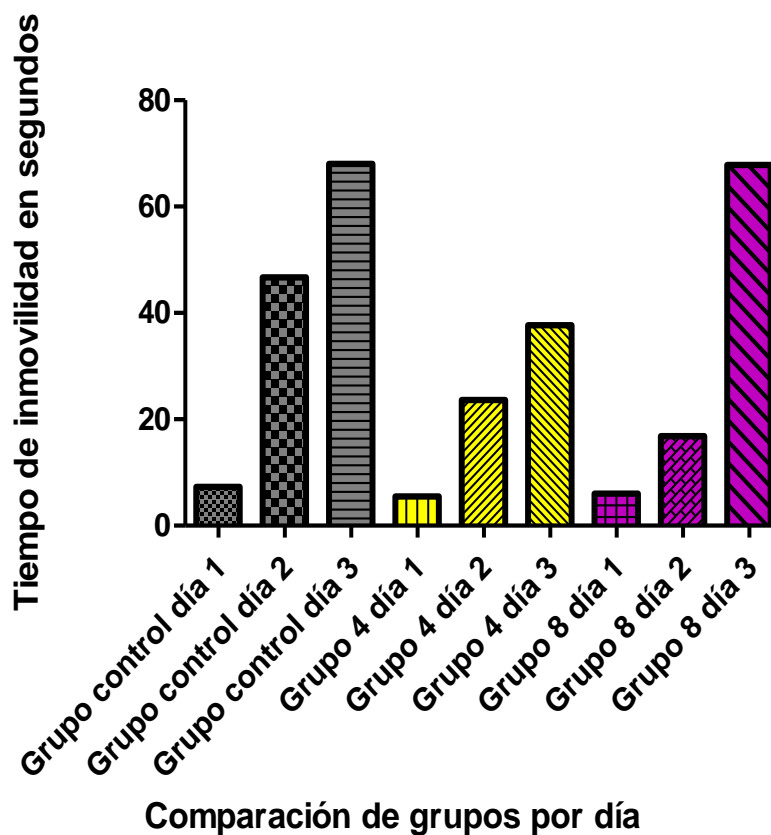


Figura 25: Comparación del efecto de las dietas en el grupo control, grupo 4 y grupo 8 sobre el tiempo de inmovilidad para los tres días*

* La figura 25 compara y muestra la tendencia similar en el efecto de las dietas recibidas sobre el tiempo de inmovilidad entre el grupo control, grupo 4 y grupo 8 para los tres días que se realizó la prueba de nado forzado.

CAPÍTULO IV

DISCUSIÓN

La prueba de depleción aguda y recarga de triptófano permite medir su máximo efecto a las 6 horas pos ingesta a la formulación es decir, desde el primer día de prueba, Dawn M Richard et al (2009) menciona que muchos estudios han medido la efectividad de la prueba sobre su capacidad de alterar los niveles plasmáticos de triptófano y que en promedio se alcanza una reducción de 81%, el rango de efectividad oscila entre 55 y 94% sin embargo, para observar la tendencia y considerando que los efectos de la depleción y recarga son transitorios se decidió realizar la prueba por tres días consecutivos, así los resultados preferentemente considerados en este estudio son los del día uno.¹⁷

Las dietas basadas en diferentes proporciones de triptófano, metionina, valina y glucosa mostraron diferentes dosis-respuesta sobre el tiempo de inmovilidad. La diferencia significativa para el día uno revelaría que proporciones inadecuadas de triptófano, metionina, valina y glucosa afectaría el tiempo de inmovilidad. Sin embargo, a pesar de las diferencias en los promedios éstas resultaron no significativas sobre los tiempos promedio para el día dos y día tres. Esto puede explicarse debido a que la duración del efecto de la prueba de depleción y recarga es transitoria, nuevamente Dawn M Richard et al (2009) lo refieren en su artículo. Sumado a ello, cabe resaltar que los mecanismos de adaptación del mismo roedor podrían responder a esta tendencia tal como se registró en los tiempos promedio del grupo control para el día uno, dos y tres en donde se observa que la duración de los tiempos promedio se prolongan con los días (ver tabla 7). Por otro lado, la desviación estándar en algunos tiempos promedio fueron valores superiores a la media, lo que evidenciaría que la respuesta individual de cada ratón puede ser muy variable, cada individuo podría mostrar mayor o menor respuesta frente al mismo estímulo. Molendijk ML de Kloet ER (2015) revisa artículos y publicaciones de la última década donde se aplica la prueba de nado forzado en roedores para evaluar el efecto de drogas antidepressivas, en sus conclusiones considera que en la prueba de nado forzado podemos observar la respuesta activa o pasiva frente a un factor estresor y que al mismo tiempo dicha respuesta activa o pasiva va en función a la respuesta cognitiva que incluye mecanismos de adaptación y de supervivencia así cada

roedor podría tener variabilidad en la intensidad de la respuesta, siempre comparable estadísticamente. Cabe también considerar la variabilidad o polimorfismo genético que podría generar diversa la respuesta entre cada individuo frente a un mismo estímulo y bajo las mismas condiciones. Algunos polimorfismos para la codificación genética del cerebro y en particular de la 2-triptófano hidroxilasa que hidroxila triptófano al interior de la célula nerviosa en la ruta metabólica para la síntesis de serotonina cerebral, podría estar asociada a susceptibilidades en la respuesta. Tzvetkov MV (2008) identificaron dos polimorfismos (rs10897346 y Pro312Pro) para el gen de la 2-triptófano hidroxilasa que podrían generar variación en la respuesta al tratamiento con drogas antidepresivas. Es sabido que los seres vivos podemos presentar variabilidad genética que podría generar respuestas distintas cuando la variabilidad genética se da en relación al transportador o en relación a enzimas.

17,68,69

Las comparaciones estadísticas se realizaron para identificar qué formulaciones dietéticas con proporciones experimentales mostrarían una respuesta similar al grupo control sobre el tiempo de inmovilidad, la similitud reflejaría una respuesta semejante a la normal para ratones en términos de neuroconducta. En ese sentido, la dieta depletada en triptófano, en concordancia con el efecto esperado en la neuroconducta frente a la poca disponibilidad de triptófano para la síntesis de serotonina, ¹⁹ registró tiempos promedio de inmovilidad elevados en los tres días de prueba. En este grupo se pudo mostrar el efecto agudo de la depleción de triptófano a las seis horas como se señala en *L-Tryptophan: Basic Metabolic Functions, Behavioral Research and Therapeutic Indications* donde la formulación mantiene niveles normales de otros nutrientes pero depletados de triptófano. Con la formulación depletada recibida por el grupo 1, la disponibilidad se vería afectada en dos procesos metabólicos, primero la presencia de aminoácidos dietéticos estimularía la síntesis hepática de proteína que a su vez reduciría la concentración de algún remanente de triptófano circulante y en un segundo proceso, la menor concentración de triptófano en relación a la mayor concentración de aminoácidos competidores, reducirían la disponibilidad de triptófano para cruzar la barrera hematoencefálica y llegar al cerebro, tanto la

síntesis proteica como la proporción triptófano/aminoácidos competidores maximiza la competencia por transportador al cerebro .¹⁷

En contraste, el grupo 2 cuya formulación dietética fue de una recarga de triptófano y una recarga de aminoácidos competidores como metionina y valina, revela una mejor dosis respuesta con un menor tiempo de inmovilidad en comparación a la depleción de triptófano sin embargo, no es una diferencia significativa. Estos resultados podrían evidenciar la importancia de la proporción entre dichos aminoácidos para favorecer o limitar la posibilidad de atravesar la barrera hematoencefálica y servir de sustrato para la síntesis de serotonina. Aunque con otros objetivos de estudio, Maes M. et al estudiaron un grupo de mujeres cuya depresión era resistente a tratamiento, dentro de sus observaciones se mostraron niveles séricos de triptófano y cinco aminoácidos competidores valina, leucina, tirosina, fenilalanina e isoleucina bajos. Según el estudio los resultados sugerirían que la resistencia al tratamiento tendría relación con una baja biodisponibilidad sérica de triptófano. ⁷⁰

A diferencia del resto de formulaciones dietéticas experimentales, las formulaciones de los grupos 4 y 8 mostraron una tendencia dosis-respuesta similares al grupo control que recibió dieta normal en los tres días de prueba. La formulación dietética del grupo 4 fue una triple recarga de triptófano y una recarga de metionina y valina mientras que la formulación dietética del grupo 8 fue una recarga de triptófano, triple recarga de metionina y valina más glucosa. A pesar de ser proporciones inversas en el primer caso la alta concentración de triptófano habría reducido la competición mientras que en el segundo caso sería la presencia de glucosa lo que habría disminuido la competición entre los aminoácidos. Esta tendencia indicaría que dichas formulaciones tendrían proporciones de triptófano, aminoácidos competidores y glucosa más adecuados en relación a la neuroconducta y coinciden con los hallazgos de otros investigadores que han observado similares efectos en sus estudios, Flavio Kapczinski et al, publicó una revisión sobre los aspectos fisiológicos del triptófano y escribe sobre la relación con la ingesta dietética, sus observaciones tendrían coincidencias con los resultados del grupo experimental 4 y 8. Por un lado Kapczinski et al resaltan lo esencial del transportador pero también lo relevante de la concentración del aminoácido que transporta, sostienen que el transportador

tiene una baja selectividad de los aminoácidos que transportan a través de la barrera, seleccionando de preferencia los aminoácidos cuyas concentraciones sean más altas. Aun cuando la ingesta dietética fuere hiperproteica, los niveles séricos posprandiales de triptófano serían bajos debido a que es un aminoácido escaso en la dieta habitual, los competidores saturarían al transportador y triptófano sería relegado al metabolismo periférico. En el grupo experimental 4, la formulación dietética mantiene triplicada la concentración de triptófano y mantiene sólo una recarga de metionina y valina lo que permitiría ganar la competición y atravesar la barrera hematoencefálica dejando relegados los competidores al metabolismo periférico. Por otro lado el grupo experimental 8, sostiene una concentración inversa, una recarga de triptófano y triple de competidores más glucosa, en la misma revisión Kapczinski et al encuentran que la ingesta de hidratos de carbono favorece la disponibilidad de triptófano debido a que la presencia de glucosa estimula la salida de insulina y ésta a su vez estimularía la utilización de aminoácidos de cadena ramificada entre ellos valina por los músculos, esta sería otra manera de disminuir la competición por transportados. Cabe señalar que tanto los resultados del grupo 4 y grupo 8 no mostraron diferencia significativa frente al grupo control, salvo el día dos del grupo 8 que mostró diferencia significativa en relación a la dieta normal del grupo control. Tal vez esta diferencia la ubicaría en una segunda mejor formulación antecedida por la formulación administrada al grupo 4. ^{1, 17,71}

La prueba de correlación de Pearson respecto de triptófano mostró una correlación negativa, de manera que a mayor concentración de triptófano administrado, menor era el tiempo de inmovilidad. Fueron los grupos 2, 3 y 4 tomados para dicha prueba ya que se les administró una, dos y tres recargas de triptófano respectivamente manteniéndose en una recarga metionina y valina. La tendencia en este resultado mostraría que la cantidad disponible de triptófano dietético sería un factor determinante para la disponibilidad de este sustrato para la síntesis de serotonina, a esta reflexión también llegaron Wurtman RJ et al cuando midieron la proporción de triptófano plasmático mediante la prueba de HPLC separación y cuantificación por fluorescencia luego de la ingesta de un desayuno rico en hidratos de carbono y otro rico en proteínas elaborado con alimentos típicos de la dieta americana a ocho sujetos. Las mediciones revelaron

alteraciones en los niveles de triptófano plasmático, los autores sostenían que las concentraciones cerebrales de triptófano, así como el pase del mismo de la sangre al cerebro depende en parte de la concentración plasmática de triptófano y en parte de los aminoácidos competidores entre ellos tirosina, fenilalanina, leucina, isoleucina, valina y metionina. Resultado comparable se obtuvo de la correlación respecto de los aminoácidos competidores y glucosa para los grupos 2, 7 y 8 donde la correlación fue negativa y significativa para esta última en el día uno. A mayor concentración menor tiempo de inmovilidad. En concordancia a los resultados obtenidos de las pruebas estadísticas de correlación, investigadores sostienen que los niveles plasmáticos de triptófano estarían en relación a la concentración cerebral de serotonina e incluso podrían tomarse como indicadores predictivos a la síntesis del mencionado neurotransmisor, a estas conclusiones llegó Fernstrom et al en su estudio en humanos en el que administra vía oral jugo con 40g de lactoalbumina, gluten, zeína o almidón e hizo una medición inicial de triptófano sérico y determinó el ratio con aminoácidos competidores y otra a los 30 minutos. Con los resultados de su estudio llega a la conclusión que las diferencias en los ratios triptófano/aminoácidos competidores de dichas proteínas en humanos podría modificar la síntesis de serotonina.^{46,72-76}

CONCLUSIÓN

El estudio permitió identificar una proporción de 3:1 de triptófano en relación a metionina y valina que favorecería la síntesis de serotonina y que mostró una dosis respuesta similar al grupo control para los tres días de prueba. Dicha proporción se obtuvo de la formulación dietética recibida por el grupo 4.

El modelo experimental utilizado mostró que la manipulación dietética de triptófano, metionina, valina y glucosa afecta los tiempos de inmovilidad de los ratones en la prueba de nado forzado.

La investigación permitió corroborar que un bajo aporte de triptófano afectaría la neuroconducta. Situación observada en el grupo 1 que recibió dieta depletada en triptófano y que registró mayor tiempo de inmovilidad interpretada como manifestación de desesperanza.

De acuerdo a lo registrado para el grupo 8, la incorporación de glucosa dietética podría mejorar la disponibilidad de triptófano. Su formulación dietética cuya proporción de triptófano, metionina, valina, glucosa fue de 1:3:3:1 fue la que registró una segunda mejor dosis respuesta en comparación al grupo control.

La extensión del modelo experimental a tres días de prueba mostró que los roedores presentan respuestas de adaptación al estímulo y que existe variabilidad de cada individuo en la respuesta frente al mismo estímulo.

Los resultados obtenidos en el presente estudio, sugiere que a mayor concentración de triptófano o en presencia de glucosa dietética, la manifestación de desesperanza en la prueba de nado forzado se vería reducida.

RECOMENDACIONES

Los hallazgos en este estudio así como en diversos estudios epidemiológicos muestran la necesidad de generar mayor investigación respecto de los componentes y nutrientes de la dieta que beneficien o afecten la salud mental del individuo. Los profesionales de la salud en general deben tomar en cuenta los hábitos de alimentación del paciente para minimizar cualquier factor que afecte negativamente la salud de los pacientes y promover los hábitos de alimentación saludable y balanceada.

Es recomendable que estudios similares puedan implementar nuevas pruebas bioquímicas que permitan dosificar la concentración de serotonina cerebral para precisar el efecto en la síntesis respecto de la manipulación de triptófano y aminoácidos competidores. Para el desarrollo de este estudio se buscaron pruebas y modelos experimentales validados que resulten determinantes para medir la síntesis de serotonina cuantificando su concentración. El 5-hidroxiindolacético es un metabolito de la serotonina presente en la orina que puede reflejar su concentración cerebral. Debido a su laboriosidad en la recolección de orina y el costo de la prueba no fue viable su utilización.

Es aconsejable que posteriores estudios similares que incluyan la prueba de nado forzado, consideren la variabilidad de las respuestas de cada individuo así como los mecanismos de adaptación de los roedores para diseñar el modelo experimental.

Es de gran utilidad contar con apoyo técnico calificado para la ejecución de la prueba de nado forzado y lograr realizar el estudio dentro de los tiempos viables y estimados.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Kapczinski, Flavio, Busnello Joao V, Abreu Marcelo, Carrao Angelo. Aspectos da fisiologia do triptófano. *Revista Psiquiatria Clínica* (São Paulo) 1998; 25(4):158-165
2. Shaw K, Turner J, Del Mar C. Triptófano y 5-Hidroxitriptófano para la depresión (Revisión Cochrane traducida). *En la Biblioteca Cochrane Plus*, 2008 Número 2. Oxford: Update Software Ltd. Disponible en: <http://www.update-software.com>
3. Wurtman R, Fernstrom J. Control of brain neurotransmitter synthesis by precursor availability and nutritional state. *Biochemical Pharmacology* 1976; 25:1691-6.
4. Wurtman R, Hefti F, Melamed E. Precursor control of neurotransmitter synthesis. *Pharmacological Reviews* 1981; 32:315-35.
5. Blomstrand Eva. Branched-Chain Amino Acids and Central Fatigue. *The Journal of Nutrition* January 2006; 136(1):274S-276S.
6. Mariana Ontiveros Márquez. Depresión y calidad de dieta: Revisión bibliográfica. *Archivos de Medicina* 2016; 12(1):55-65.
7. Dash SR, O Neil A, Felice N, Jacka. Diet and common mental disorders: the imperative to translate evidence into action. *Front Public Health* 2016; 4:81.
8. O'Neil A, Berk M, Itsiopoulos C, Castle D, Opie R, Pizzinga J, et al. A randomised, controlled trial of a dietary intervention for adults with major depression (the "SMILES" trial): study protocol. *BMC Psychiatry* 2013; 13:1186-1471
9. Jacka FN, Maes M, Pasco JA, Williams LJ, Berk M. Nutrient intake and mental disorder in woman. *Journal Affect Disorder* 2012; 141(1):79-85.
10. Jacka FN et al. Association of western and traditional diet with depression and anxiety in woman. *American Journal of Psychiatry* 2010; 167(3):305-311.

11. Anibal Velásquez; La carga de enfermedad y lesiones en el Perú y las prioridades del plan esencial del aseguramiento universal. *Revista Peruana Medicina Experimental y Salud Pública* 2009; 26(2):22-31.
12. Informe Final: Perfil Nutricional y Pobreza en el Perú. ENAHO I Trimestre 2008. CENAN/INEI publicación 2009.
13. Encuesta Nacional de Indicadores Nutricionales, Bioquímicos, Socioeconómicos y Culturales Relacionados con las Enfermedades Crónico Degenerativas. Dirección Ejecutiva de Vigilancia Alimentaria y Nutricional, CENAN 2006.
14. Carbajal I, Estado nutricional y consumo de energía y nutrientes en un grupo de adolescentes en Lima y Callao-Perú. Tesis para optar el título de Licenciado en Nutrición. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Facultad de Medicina, Lima 2001.
15. Porsolt RD, Le Pichon M, Jalfre M. Depression a new model sensitive to antidepressant treatments. *Nature* 1977; 266,730-732.
16. Porsolt RD, Bertin A, Jafre M, Behavioral despair in mice: a primary screening test for antidepressants. *Archives Internationales de Pharmacodinamie* 1977; 327-336.
17. Dawn M R, Dawes M A, Charles W M, Acheson A, Hill-Kapturczak N, Dougherty D M. L-Tryptophan: Basic metabolic functions, behavioral research and therapeutic indications. *International Journal of Tryptophan Research* 2009; 2:45-60.
18. Hood S D, Bell C J, Nutt D J. Acute tryptophan depletion. Part I: Rationale and methodology. *Australian New Zealand Journal of Psychiatry* 2005; 39:58-64.
19. Marsh D M, Dougherty DM, Moeller FG, et al., Laboratory-measured aggressive behavior of women: acute tryptophan depletion and augmentation. *Neuropsychopharmacology* 2002; 26:60-71.
20. Young SN, Ervin FR, Pihl RO, et al., Biochemical aspects of tryptophan depletion in primates. *Psychopharmacology* 1989; 98:08-11.

21. Nishizawa S, Benkelfat C, Young SN et al. Differences between males and females in rates of serotonin synthesis in human brain. *Proceedings of the National Academies of Sciences USA* 1997; 93:08-13.
22. Carpenter LL, Anderson GM, Pelton GH, et al. Tryptophan depletion during continuous CSF sampling in healthy human subject. *Neuropsychopharmacology* 1998; 19:26-35.
23. Taffe MA, Huitron-Resendiz S, Schroeder R et al. MDMA exposure alters cognitive and electrophysiological sensitivity to rapid tryptophan depletion in Rhesus monkeys. *Pharmacology Biochemical Behaviour* 2003; 76:141-152.
24. Comai S, Bertazzo A, Carretti N, Podfigurna-Stopa A, Luisi S CVL. Serum Levels of Tryptophan, 5-Hydroxytryptophan and serotonin in patients affected with different forms of amenorrhea. *International Journal of Tryptophan Research* 2010; 3:69-75.
25. Cruz, Rubens, Godinho, Pedro Henrique, Da Silva, Avelino Leonardo, Gimenez, Sandra Regina, Bamabé, José Carlos. Distintos niveles de triptofano disponible de la dieta y actividad exploratoria de ratas en "open field". *Revista Chilena de Nutrición* 1991; 19(1):25-32.
26. Betancourt López Liliana, Cacula León Liliana, Alarcón Parra Alba. Efecto de la suplementación con triptófano en codornices (*Coturnix coturnix* Japonesa). *Revista Médica Veterinaria* 2005; 9:83-87.
27. Shaw K, Turner J, Del Mar C. Triptófano y 5-hidroxitriptófano para la depresión (Revisión Cochrane traducida). En: La Biblioteca Cochrane Plus, 2008 Número 2. Oxford: Update Software Ltd. Disponible en: <http://www.update-software.com>. (Traducida de The Cochrane Library, 2008 Issue 2. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd.).
28. Fernstrom M H y Fernstrom JD. Brain tryptophan concentrations and serotonin synthesis remain responsive to food consumption after the ingestion of sequential meals. *American Journal of Clinical Nutrition* 1995; 61: 312-319. Disponible en <http://www.ajcn.org>.

29. Ardis TC, Cahir M, Elliott JJ, Bell R, Reynolds GP, Cooper SJ. Effect of acute tryptophan depletion on noradrenaline and dopamine in the rat brain. *Journal of Psychopharmacology* 2009; 23(1):51-55.
30. Badway AA. Plasma free tryptophan revision: what you need to know and do before measuring it. *Journal of Psychopharmacology* 2010; 24: 809-815.
31. Newsholme EA, Blomstrand E. Branched-Chain Amino Acids and Central Fatigue. *The Journal of Nutrition* 2006; 136(1): 274S-276S.
32. Can A, Dao D T, Arad M, Terrillion C E, Piantadosi SC, Gould T D. The Mouse Forced Swim Test. *Journal of Visualized Experiments: JoVE* 2012; 29(59):3638-3791.
33. Rodríguez Landa Juan Francisco, Contreras Carlos M. Los fármacos antidepresivos y la conducta de inmovilidad en la prueba de nado forzado: participación de los sistemas de neurotransmisión. *Archivos de Neurociencias (Méjico)* 2000; 5(2):74-83.
34. Porsolt RD, Brossard G, Hautbois L, Roux S. Rodent models of depression: forced swimming and tail suspension behavioral despair tests in rats and mice. *Current Protocol of Neuroscience* 2001; 8(8):10A
35. Castagné V, Moser P, Roux S, Porsolt RD. Rodent models of depression: forced swimming and tail suspension behavioral despair tests in rats and mice. *Current Protocol of Neuroscience* 2010; 5(5): 711-755
36. Carbajal Quintana D, Molina Cuevas V, Ravelo Calzado Y, Mas Ferreiro R. Comparación de los efectos del D-004, imipramina y sertralina en el modelo de nado forzado en ratones. *Revista Cubana de Farmacología* 2012; 46(3): 343-351.
37. Zambrano Santoyo C, Zúñiga Espinosa L, Zanabria Puente R, Zegarra Sánchez J, Zaga Quispe N, Pante Medina C, Salazar Granara A. Antipsychotic and behavior effect of the ethanolic extract from the bark of *Maytenus macrocarpa* (Ruiz & Pav.) Briq. In mice. *Pharmacognosy Communicactions* 2015; 5(4): 244-248.

38. Murray R, Mayes P, Granner D, Rodwell V, Cedillo Jesús A. *Bioquímica de Harper*. Mexico D.F. Editorial El Manual Moderno; 2001.
39. Lehninger A, Nelson D, Cox M. *Principios de Bioquímica*. 2ª ed. Barcelona, España: Ediciones Omega S.A. 2001.
40. Belitz H-D, Grosch W. *Química de los Alimentos*. 2ª ed. Zaragoza, España: Editorial Acribia S.A.;1997
41. Curzon C et al. Availability of tryptophan to the brain and some hormonal and drug influence on it. *Advances in Biochemical Psychopharmacology* 1974; 10:263-271.
42. Fuxe K, Schubert J, Hokfelt G. Some aspects of interrelationship between central 5-hydroxytryptamine neurones and hormones. *Advances in Biochemical Psychopharmacology* 1974; 10: 67-74.
43. Knott P J, Curzon G. Free tryptophane in plasma and brain tryptophane metabolism. *Nature* 1972; 3:452-454.
44. Yuwiler A, et al. Short term and repetitive administration oral tryptophane in normal men. Effects on blood tryptophane, serotonin and kynuremine concentrations. *Archives of General Psychiatry* 1981; 38(6): 619-626.
45. Handley SL, Miskin R C. The interaction of some kynurenine pathway metabolites with 5-hydroxytryptophane and 5-hydroxytryptamine". *Psychopharmacology* 1977; 51:305-309.
46. Fernstrom J D, Larin F y Wurtman R J. Brain serotonin content increase following ingestion of carbohydrates from diet. *Science* 1971; 174: 1023-1025.
47. Gartside SE, Cowen PJ, Sharp T. Evidence that the large neutral aminoacid L-valine decreases electrically-evoked release of 5-HT in rat hippocampus in vivo. *Psychopharmacology* 1992; 109:251-253.
48. Borrego Hernando, Olga; Cabranes Díaz, José Antonio. Función serotoninérgica y dimensiones de la personalidad. *Universidad Complutense de Madrid*; 2005.
<http://site.ebrary.com/lib/blbliotecafmhsp/Doc?d=10081088&ppg=21>

49. Beckmann H, Kaspers S. Serotonin precursors as an antidepressant: An overview [Serotonin-Vorstufen als Antidepressiva: eine Übersicht]. *Fortschritte Neurologie und Psychiatrie* 1983; 51:176-182.
50. FAO/WHO/UNU. Energy and Protein Requirements. Report of a joint FAO/WHO/UNU Expert Consultation. Technical Report Series no. 724, World Health Organization, Geneva, Switzerland;1985
51. Stipanuk M H. *Biochemical and Physiological Aspects of Human Nutrition*. Filadelfia, Estados Unidos. Editorial W.B. Saunders Company; 2000.
52. Triana Hernández M. Recomendaciones nutricionales para el ser humano: Actualización. *Revista Cubana de Investigación Médica* 2004; 23(4):266-292.
53. Young VR. Adult amino acid requirements: The case for a major revision in current recommendations. *J Nutr*. 1994; 124:1517S-23S.
54. Sainio EL, Pulkki K, Young SN. L-tryptophan: Biochemical, nutritional and pharmacological agents. *Amino Acids* 1996; 10:21-47.
55. Harper AE, Yoshimura NN. Protein quality, amino acid balance, utilization, and evaluation of diets containing amino acids as therapeutic agents. *Nutrition* 1993; 9:460-469.
56. Besson MJ Sistemas noradrenérgicos y serotoninérgicos centrales. *Confrontaciones Psiquiátricas* 1983; 19(1): 11-75.
57. Hamon M, Bourgoin S, Artaud F, Glowinski J. The role of intraneuronal 5-HT and of tryptophan hydroxylase activation in the control of 5-HT synthesis in rat brain slices incubated in K⁺ enriched medium. *Journal of Neurochemistry* 1979; 33: 1031-1042.
58. Espejo Solá J. *Manual de Dietoterapia de las Enfermedades del Adulto*. 5ª ed. Buenos Aires, Argentina. Editorial El Ateneo; 1981.
59. Mahan Kathleen L, Escott-Stump S. *Nutrición y Dietoterapia de Krause*. 9ª ed. México. Editorial Mc Graw Hill Interamericana; 1996.

60. Jans LAW, Lieben CKJ, Smits LT, Blokland A. Pharmacokinetics of acute tryptophan depletion using a gelatin-based protein in male and female Wistar rats. *Amino Acids* 2009; 37: 349-357.
61. Salinas-García M, Martínez-Sanz JM, Urdampilleta A, Mielgo-Ayusso J, Norte Navarro A, Ortiz-Moncade R. Efectos de los aminoácidos ramificados en deportes de larga duración: revisión bibliográfica. *Nutrición Hospitalaria* 2015; 31(2):557-589.
62. Food and Nutrition Board/Institute of Medicine. *Recommended Dietary Allowances (RDA)*. 10^a ed. Washington D.C. National Academy Press 1989.
63. Food and Nutrition Board/Institute of Medicine. *Dietary Intakes (DRI)* 2008. Disponible en <http://www.nap.edu/catalog/dri>
64. Coveñas Rafael, Aguilar Luis. *Avances en Neurociencias: Neuropéptidos. Investigación Clínica*. Lima, Perú. Proyecto editorial Universidad Peruana de Ciencias Aplicadas; 2010.
65. Sir James Black. *Current Protocols in Pharmacology*. New Jersey, Estados Unidos. John Wiley & Sons Inc.; 1998.
66. Council for Organizations of Medical Sciences. *International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animal*; 1986. p. 553-554. Disponible en: https://grants.nih.gov/grants/olaw/guiding_principles_2012.pdf
67. Fox JG, Davidsson MT, Quimby MT, Barthold SW, Newcomer CE, Smith AL. *The Mouse in Biomedical Research Volume 3 Normative Biology Husbandry*. 2^a ed. Estados Unidos; 2007.
68. Molendijk ML, Kloet ER Inmobility in the forced swim test is adaptive and does not reflect depression. *Psychoneuroendocrinology* 2015; 62:389-391.
69. Tzvetkov MV, Brockmüller J, Roots I, Kirchheiner J. Common genetic variations in human brain-specific tryptophan hydroxylase-2 and response

to antidepressant treatment. *Pharmacogenetics and Genomics* 2008;18(6):495-506.

70. Maes M, Verkerk R, Vandoolaeghe E, Van Hunsel F, Neels H, Wasters A, Demedtsk P, Scharpé S. Serotonin immune interaction in major depression: lower serum tryptophan as a marker of an immune inflammatory response. *European Archives of Psychiatry Clinical Neurosciences* 1997; 247(3):154-161.
71. Badawy AA, Dougherty DM, Richard DM. Specificity of the Acute Tryptophan and Tyrosine Plus Phenylalanine Depletion and Loading Tests Part II: Normalisation of the Tryptophan and the Tyrosine Plus Phenylalanine to Competing Amino Acid Ratios in a New Control Formulation. *International Journal of Tryptophan Research* 2010; 3:35-47
72. Wurtman RJ, Wurtman JJ, Regan MM, McDermott JM, Tsay RH, Breu JJ. Effects of normal meals rich in carbohydrates or proteins on plasma tryptophan and tyrosine ratios 1–3. *American Journal of Clinical Nutrition* 2003; 77:128–132.
73. Young SN, Ervin FR, Pihl RO, et al. Biochemical aspects of tryptophan depletion in primates. *Psychopharmacology* 1989; 98:508-511.
74. Choi S, Disilvo B, Femstrom MH, Femstrom JD. Meal ingestion, amino acids and brain neurotransmitters: Effects of dietary protein source on serotonin and catecholamine synthesis rates. *Physiology and Behavior* 2009; 98:156-162.
75. Fernstrom JD, Langham KA, et al. The ingestion of different dietary proteins by humans induces large changes in the plasma tryptophan ratio, a predictor of brain tryptophan uptake and serotonin synthesis. *Clinical Nutrition* 2013; 32:1073-1076.
76. Rubens C, Godhino PH, et al. Distintos niveles de triptófano disponible de la dieta y actividad exploratoria de ratas en “open field”. *Revista Chilena de Nutrición* 1991; 19:25-32.

ANEXOS

ANEXO 01

CERTIFICADO DE CALIDAD DE ALIMENTO BALANCEADO PARA ROEDORES



LA MOLINA CALIDAD TOTAL LABORATORIOS

Instituto de Certificación, Inspección y Ensayos

INFORME DE ENSAYOS

N° 005942 - 2014

SOLICITANTE : UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA LA MOLINA
DIRECCIÓN LEGAL : AV. LA MOLINA NRO. SN LA MOLINA LIMA - LIMA - LA MOLINA
RUC: 20147897406 Teléfono: 6147800
PRODUCTO : ALIMENTO BALANCEADO PARA RATONES BIOTERIO "LA MOLINA"
NÚMERO DE MUESTRAS : Uno
IDENTIFICACIÓN/MTRA. : Lote: 3170-2014
CANTIDAD RECIBIDA : 1529,6 (+ envase) de muestra proporcionada por el solicitante.
MARCA(S) : S.M.
FORMA DE PRESENTACIÓN : Envasado, en bolsa de polipropileno transparente cerrada con 1 Kg aprox.
SOLICITUD DE SERVICIO : S/S N°EN-003622-2014
REFERENCIA : PERSONAL
FECHA DE RECEPCIÓN : 12/08/2014
ENSAYOS SOLICITADOS : MICROBIOLÓGICO Y FÍSICO/QUÍMICO
PERÍODO DE CUSTODIA : 3 Meses, a partir de la fecha de recepción. (Para ensayos microbiológicos no aplica)

RESULTADOS :

ENSAYOS MICROBIOLÓGICOS :

| ENSAYOS | RESULTADOS |
|-----------------------------------|-------------|
| 1.- N. Coliformes Totales (NMP/g) | <3 |
| 2.- D. Salmonella sp. (en 25g) | Ausencia |
| 3.- N. Mohos (UFC/g) | 60 Estimado |
| 4.- N. Levaduras (UFC/g) | 20 Estimado |

MÉTODOS UTILIZADOS EN EL LABORATORIO :

- 1.- ICMSF Vol. I Parte II Ed. II Pág. 131-134 (Traducción Versión Original 1978) Reimpresión 2000 (Ed. Acribia) 1983
- 2.- ICMSF Vol. I Parte II Ed. II Pág. 171-175, 176 I 1-9, 10(a) y 10(c) Pág. 177 II y Pág. 178 III (Traducción Versión Original 1978) Reimpresión 2000 (Ed. Acribia) 1983
- 3.- ICMSF Vol. I Parte II Ed. II Pág. 165-167 (Traducción Versión Original 1978) Reimpresión 2000 (Ed. Acribia) 1983
- 4.- ICMSF Vol. I Parte II Ed. II Pág. 166-167 (Traducción Versión Original 1978) Reimpresión 2000 (Ed. Acribia) 1983

ENSAYOS FÍSICOS/QUÍMICOS :

| ENSAYO | RESULTADOS |
|--|------------|
| 1.- Energía Total (Kcal / 100 g de muestra original) | 341,6 |
| 2.- Carbohidratos (g / 100 g de muestra original) | 58,6 |
| 3.- Fibra Cruda(g / 100 g de muestra original) | 3,1 |
| 4.- Humedad(g / 100 g de muestra original) | 14,7 |
| 5.- Proteína Cruda(g / 100 g de muestra original) (Factor: 6,25) | 17,8 |
| 6.- Grasa(g / 100 g de muestra original) | 4,0 |
| 7.- Cenizas(g / 100 g de muestra original) | 4,9 |

MÉTODOS UTILIZADOS EN EL LABORATORIO :

Handwritten signature and date: 02/09/2014

CONTINÚA INFORME DE ENSAYOS N° 005942 - 2014

Pág 1/2



Av. La Universidad 595 La Molina Lima - Perú
Telefaxes: (511) 3495640 - 3492507 - 3495794 - 3492191
E-mail: calitot@infonegocio.net.pe / mktg@lamolina.edu.pe

ANEXO 02

CERTIFICADO DE PUREZA AMINOACIDO TRIPTÓFANO

AJINOMOTO

CERTIFICATE OF CONFORMITY

PRODUCT : Amino acids, their salts and analogues
L-TRYPTOPHAN 98% FEED GRADE

SHIPPING DATE : 5/06/2013

DELIVERY ORDER NUMBER : 0000200580

BATCH NUMBER : 3113 / 4.000,000 KG

MANUFACTURING DATE : from 23/04/2013 at 8:00
to 24/04/2013 at 8:00

BEST BEFORE : 23/04/2016

BUYER : MONTANA S.A.

THIS CERTIFICATE IS ISSUED BY COMPUTER FROM DATA OF THE CONTROL LABORATORY
AND THE ABOVE REFERENCED BATCH CONFORMS TO THE FOLLOWING SPECIFICATIONS :

| | | |
|----------------------------------|---|-------------|
| Loss on drying | : | < or = 1 % |
| Tryptophan content (HPLC) | : | > or = 98 % |
| Purity : (Tryptophan/dry matter) | : | > or = 98 % |

AJINOMOTO EUROLYSINE S.A.S. Société par actions simplifiée à capital de 26.853.000 € - 5000000 ACS, PARIS - BRETAINES 3304500020 - AFE21102 - IONS TNA / VAL - FR - 03 22 54 70 38
REGISTRATION NUMBER: 16 40 12 13

USINE ET SERVICES ADMINISTRATIFS:
Espace Industriel Nord - 60, rue de Vieux 80084 AMIENS Cedex 2 - FRANCE
TEL. (33) 03 22 54 70 00 - FAX (33) 03 22 54 70 38

SIÈGE SOCIAL:
153, rue de Courcelles - 75017 PARIS Cedex 17 - FRANCE
TEL. (33) 01 44 40 12 12 - FAX (33) 01 44 40 12 13

ANEXO 03

CERTIFICADO DE PUREZA AMINOACIDO METIONINA



ORIGINAL

Lieu de livraison / Delivery address
 MONTANA S.A.
 RUC 20100182263
 AV. LOS ROSALES N° 280 - SANTA ANIT
 LIMA
 PÉROU

Certificat d'analyses Certificate of analysis

| | |
|--|--|
| Nos références / Our reference Client n° 301075 Client no. Date / Date 26.02.2013 Commande n° 198103 / 08.02.2013 Order no. Livraison n° 80269439 Delivery no. | Article RHODOMET® NP 99 25KG SACO Material Code EAN3531520010080 EAN Code Lot 121303610 Batch Quantité 20.000,00 KG Quantity |
| Vos références / Your reference Commande n° PER-14/13 08.02.2013 Order no. | |

| Caractéristique / Characteristic | Lim inf / Low lim | Lim sup / Up lim | Unité / Unit | Résultat / Result |
|--|--------------------------|------------------|--------------|-------------------|
| Aspecto | Polvo fino | | | Conforme |
| Color | de blanco a blanco crema | | | Conforme |
| Pérdida al secado | 0,3 | % | | < = 0,3 |
| Sulfato de sodio | 0,3 | % | | < = 0,3 |
| Contenido de DL-metionina Méthode / Method R508 | 99 | % | | > = 99 |
| Date péremption / Expiry date | 05.02.2018 | | | |
| Date fabrication / Manufacturing date | 05.02.2013 | | | |
| CONTAINER CMAU 009664/5 - PLDMB KLF 256774 | | | | |

Richard Prime
 Responsable du service analytique / analytical services manager
 Adisseo France S.A.S.
 Immeuble Antony Parc 2
 10, Boulevard Général de Gaulle

ANEXO 04

CERTIFICADO DE PUREZA AMINOACIDO VALINA



Hebei Tianning Biotech Co.,Ltd

Address: Suning Industry Park, Cangzhou, Hebei Province China

TEL:0086-317-5579975

FAX:0086-317-6127755

CERTIFICATE OF ANALYSIS

PRODUCT NAME: L-Valine

MFG DATE: 2013.07.11 ✓

BATCH NO: A20130707 ✓

EXP DATE: 2016.07.10 ✓

PACKING: 25kg/drum

QUANTITY: 1225kg

| Test Items | Specification USP24 | Test results |
|--|--|--------------|
| Description | White crystals or crystalline powder, Slightly bitter taste | Conforms |
| Specific rotation | +26.6° - +28.8° | +26.9° |
| Assay | 98.5~101.5 | 100.9% |
| pH | 5.5~7.0 | 6.03 |
| Chloride(CL) | ≤0.05% | <0.05% |
| Sulfate | ≤0.03% | <0.03% |
| Iron(Fe) | ≤30ppm | <30ppm |
| Arsenic (As) | ≤1.5ppm | <1.5ppm |
| Heavy metals(Pb) | ≤15ppm | <15ppm |
| Loss on drying | ≤0.30% | 0.22% |
| Residue on ignition | ≤0.10% | 0.07% |
| Organic volatile impurities | Conforms USP24 | Conforms |
| Conclusion: Passed test according to the Standard of USP24 | | |

Inspector: Qianqian Zhang

Checker: Chunhua Han

Quality Testing Director: Yuxiu Wang

HEBEI TIANNING BIOTECH CO., LTD
河北天宁生物科技有限公司

ANEXO 05

CARTA DE AUTORIZACION PARA EJECUCION DE ESTUDIO

La molina, 14 de noviembre del 2011

DR. RAFAEL ELGEGREN REATEGUI
DIR. SECCION DE POST GRADO
FACULTAD DE MEDICINA HUMANA
UNIVERSIDAD DE SAN MARTIN DE PORRES

Estimado Doctor,

Me dirijo a usted, a fin de expresarle, la conformidad en la autorización de la alumna de Maestría en Ciencias Básicas, SARA ABU-SABBAH MITRE, para que desarrolle su proyecto de tesis "PROPORCIONES REQUERIDAS DE TRIPTOFANO, AMINOACIDOS NEUTROS Y GLUCOSA QUE PERMITAN UNA SINTESIS DE SEROTONINA CEREBRAL EN NIVELES FISIOLÓGICOS NORMALES REALCIONADOS A LA NEUROCONDUCTA", en las instalaciones del Instituto de Investigación de la Facultad de Medicina Humana de la USMP.

Sin otro particular, me despido, no sin antes manifestarle mis sentimientos de respeto y estima personal.

Muy cordialmente,

DR. BENJAMIN CASTAÑEDA CASTAÑEDA
DIR. INSTITUTO DE INVESTIGACION
FACULTAD DE MEDICINA HUMANA
UNIVERSIDAD DE SAN MARTIN DE PORRES

ANEXO 06

CARTA DE ACEPTACION DE ASESOR DE TESIS

La Molina, 04 de diciembre de 2015.

Señor:
Dra. Rosa Falconi Sandoval.
Directora de la Sección de Posgrado
Facultad de Medicina Humana
Universidad de San Martín de Porres
Pte.-

Estimada Dra. Rosa Falconi Sandoval, la presente tiene a bien manifestar que quien suscribe es asesor de la Tesis Sara Abu-Sabbah Mitre, quien ha ejecutado su tesis titulada "ESTUDIO SOBRE PROPORCIONES DE TRIPTÓFANO, AMINOÁCIDOS NEUTROS Y GLUCOSA PARA LA SÍNTESIS DE SEROTONINA CEREBRAL EN NIVELES FISIOLÓGICOS NORMALES RELACIONADOS A LA NEUROCONDUCTA", de la misma forma señalar que he revisado el Informe de tesis y cuenta con mi aprobación.

Sin más que agregar, paso a despedirme aprovechando la misiva para expresar mis sentimientos de respeto y estima personal.

Muy cordialmente,



Dr. Alberto Alcibádes Salazar Granara

Médico Cirujano, CMP 48472, Profesor Investigador.
Doctor en Medicina, Magister en Ciencias Básicas Médico-Farmacología.
Centro de Investigación de Medicina Tradicional y Farmacología - CIMTFAR
Instituto de Investigación, Facultad de Medicina Humana, Universidad San Martín de Porres
Av. El Corregidor N° 1531, La Molina, Lima - Perú. Telf. Laboral: 365-2300 Anexo 114 / 151
Telf. Domicilio: 323-6642, Móvil: 996677271, e-mail: alberto.salazar@gmail.com, asalazarg@usmp.pe
http://www.medicina.usmp.edu.pe/investigacion/med_tradicional.php

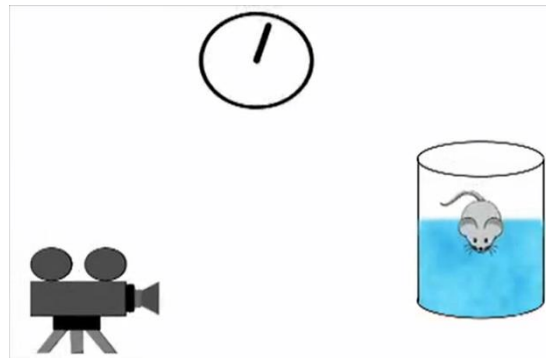
ANEXO 07

INFOGRAFÍA DE LA PRUEBA DE NADO FORZADO

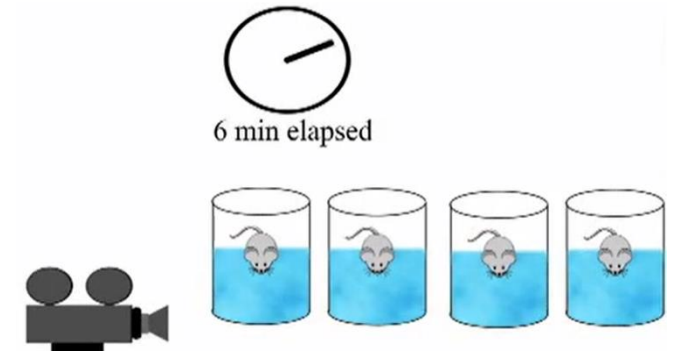
1: Preparación de muestra, instrumentos y equipos



2: Inmersión de roedores en cilindros con agua



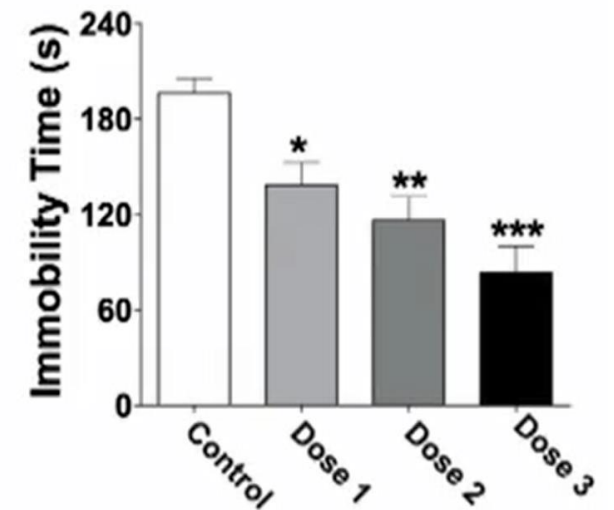
3: Medición de tiempo y grabación



4: Observación y recolección de datos



5: Tabulación y análisis estadístico



ANEXO 08

IMÁGENES FOTOGRAFICAS DE LA PRUEBA DE NADO FORZADO DEL PRESENTE ESTUDIO



ANEXO 09

BASE DE DATOS TIEMPOS DE INMOVILIDAD REGISTRADOS POR DIA DE PRUEBA

Tiempos de inmovilidad en segundos registrados por cada roedor (Día 1)

| Grupo control | Grupo 1 | Grupo 2 | Grupo 3 | Grupo 4 | Grupo 5 | Grupo 6 | Grupo 7 | Grupo 8 |
|---------------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
| 5 | 91 | 36 | 0 | 0 | 0 | 5 | 0 | 6 |
| 16 | 0 | 1 | 0 | 8 | 2 | 0 | 2 | 0 |
| 0 | 14 | 45 | 6 | 7 | 74 | 13 | 0 | 2 |
| 12 | 66 | 8 | 0 | 0 | 0 | 30 | 3 | 18 |
| 0 | 0 | 0 | 1 | 3 | 28 | 29 | 0 | 10 |
| 2 | 2 | 87 | 7 | 25 | 0 | 3 | 10 | 0 |
| 4 | 81 | 0 | 1 | 3 | 51 | 15 | 1 | 60 |
| 8 | 50 | 3 | 0 | 11 | 0 | 44 | 88 | 53 |
| 53 | 28 | 17 | 90 | 0 | 0 | 4 | 0 | 0 |
| 4 | 1 | 0 | 2 | 1 | 71 | 4 | 80 | 0 |

Tiempos de inmovilidad en segundos registrados por cada roedor (Día 2)

| Grupo control | Grupo 1 | Grupo 2 | Grupo 3 | Grupo 4 | Grupo 5 | Grupo 6 | Grupo 7 | Grupo 8 |
|---------------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
| 73 | 115 | 55 | 20 | 3 | 158 | 37 | 67 | 60 |
| 72 | 0 | 49 | 4 | 31 | 11 | 15 | 5 | 4 |
| 2 | 53 | 123 | 114 | 32 | 92 | 2 | 2 | 18 |
| 56 | 62 | 70 | 12 | 11 | 0 | 6 | 2 | 20 |
| 0 | 2 | 2 | 0 | 20 | 66 | 130 | 2 | 60 |
| 25 | 0 | 127 | 37 | 3 | 0 | 17 | 120 | 0 |
| 49 | 162 | 20 | 2 | 8 | 24 | 60 | 22 | 9 |
| 101 | 55 | 29 | 38 | 53 | 4 | 102 | 45 | 48 |
| 43 | 0 | 54 | 141 | 2 | 12 | 35 | 18 | 2 |
| 9 | 84 | 58 | 76 | 40 | 141 | 3 | 104 | 0 |

Tiempos de inmovilidad en segundos registrados por cada roedor (Día 3)

| Grupo control | Grupo 1 | Grupo 2 | Grupo 3 | Grupo 4 | Grupo 5 | Grupo 6 | Grupo 7 | Grupo 8 |
|---------------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
| 135 | 121 | 98 | 83 | 2 | 163 | 20 | 85 | 53 |
| 44 | 22 | 134 | 12 | 23 | 29 | 13 | 17 | 10 |
| 0 | 96 | 125 | 102 | 120 | 65 | 72 | 2 | 6 |
| 121 | 116 | 116 | 41 | 169 | 102 | 40 | 10 | 32 |
| 0 | 9 | 24 | 2 | 51 | 26 | 15 | 8 | 85 |
| 70 | 0 | 144 | 44 | 18 | 150 | 40 | 161 | 1 |
| 22 | 55 | 55 | 125 | 59 | 32 | 73 | 152 | 95 |
| 140 | 34 | 20 | 5 | 14 | 18 | 45 | 4 | 130 |
| 105 | 1 | 73 | 42 | 0 | 95 | 10 | 30 | 92 |
| 46 | 127 | 20 | 96 | 61 | 161 | 16 | 84 | 108 |