



3
Lej. 11282
Universidad Nacional Autónoma de México

FACULTAD DE MEDICINA

**ACTIVACION DE LA VIA SEROTONINERGICA
CEREBRAL POR DESNUTRICION GESTACIONAL.
CINETICA DE LA ENZIMA LIMITANTE.**

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS MEDICAS

P R E S E N T A:

MAESTRO EN CIENCIAS

GABRIEL MANJARREZ GUTIERREZ

MEXICO, D. F.

AGOSTO DE 1992.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

INDICE

	Pag.
I. INTRODUCCION.....	2
I.1. SISTEMA SEROTONERGICO.....	6
I.2. CINETICA ENZIMATICA.....	12
I.3. REGULACION DE LA BIOSINTESIS DE 5-HIDROXITRIPTAMINA.....	21
I.4. SISTEMA DE SEGUNDOS MENSAJEROS.....	24
I.4.1. ADENOSIN MONOFOSFATO CICLICO.....	24
I.4.2. TRIFOSFATO DE INOSITOL Y DIACILGLICEROL.....	27
I.4.3. CALCIO COMO SEGUNDO MENSAJERO.....	29
II. JUSTIFICACION DEL ESTUDIO E HIPOTESIS.....	31
III. MATERIAL Y METODOS.....	32
III.1. METODOS ESTADISTICOS.....	35
III.2. ENSAYOS BIOQUIMICOS.....	35
III.2.1. ACTIVIDAD DE LA TRIPTOFANO-5-HIDROXILASA.....	35
III.2.2. OBTENCION DE SINAPTOSOMAS CEREBRALES.....	37
III.2.3. DETERMINACION DE PROTEINAS TISULARES.....	38
IV. RESULTADOS.....	39
IV.1.1. SOMATOMETRIA.....	39
IV.1.2. PROTEINAS CEREBRALES.....	42
IV.1.3. ACTIVIDAD DE LA TRIPTOFANO-5-HIDROXILASA.....	42
IV.1.4. CINETICA DE LA TRIPTOFANO-5-HIDROXILASA.....	43
IV.1.5. ACTIVACION DE LA TRIPTOFANO-5-HIDROXILASA POR SEGUNDOS MENSAJEROS.....	44
V. DISCUSION.....	45
VI. BIBLIOGRAFIA.....	59
VII. TABLAS Y GRAFICAS.....	91
VIII. ABREVIATURAS.....	107

I. INTRODUCCION

La desnutrición constituye una patología altamente prevalente en los países en desarrollo. Diferentes estadísticas indican que dos a cinco porciento de la población menor de 5 años sufren déficit nutricional severo. Ciertamente es la causa más frecuente de enfermedad y muerte de niños de corta edad en el mundo y una de las primeras causas de ocupación de camas pediátricas en los hospitales infantiles del tercer mundo (1-6).

La desnutrición es un estado patológico inespecífico, sistémico y potencialmente reversible que se origina como resultado de la toma inadecuada de alimento o como resultado de la incapacidad para la utilización de los nutrimentos por el organismo, específicamente por la célula (3, 7-10). Muchos científicos han tratado de atribuir las alteraciones de la desnutrición sólo a la falta de alimento y otros al medio ambiente. Sin embargo la interacción entre el medio ambiente y nutrición es compleja y difícil de separar (8, 11-17).

La etiopatogénia de estas alteraciones ha sido largamente discutida y hasta el momento no se ha llegado a un modelo que cuente con la aceptación general, en todo caso existe consenso en que el desarrollo y crecimiento del desnutrido grave se afecta por factores derivados tanto de la privación nutricional como de las condiciones de pobreza en que habitualmente se presenta la

enfermedad (8, 11-18).

La desnutrición infantil grave incluye en primer lugar el marasmo, que es la forma severa de la desnutrición proteínica-calórica que se observa de preferencia en el lactante menor; en segundo lugar el Kwashiorkor, forma severa de la desnutrición proteínica-calórica que aparece en el lactante mayor y en el preescolar y por último la desnutrición grave mixta que tiene elementos de ambos síndromes (8, 19-23).

La prevalencia de estos cuadros es diferente en las distintas áreas geográficas, la cual depende de las diferentes pautas culturales, de la disponibilidad de alimentos y de otros factores propios de cada región. Sin embargo cualquiera de ellos afecta severa y globalmente al niño que la padece (19-23).

La magnitud del cuadro clínico de la desnutrición hace que el enfoque terapéutico del niño grave debe de partir generalmente de la base de una hospitalización, que muchas veces es bastante prolongada y en la cual los mayores esfuerzos van encaminados a una recuperación biológica del niño. Con frecuencia se posterga o no se da suficiente importancia a su rehabilitación psicológica. La relevancia del problema es mayor aún si se considera que aquellos niños que sobreviven a una desnutrición grave presentan secuelas en el plano psicológico, siendo la más documentada el bajo rendimiento intelectual, con evidentes repercusiones humanas sociales y económicas (11-13, 14, 24-31).

A partir de estudios en animales de experimentación, se ha postulado que en la condición de desnutrición grave se produce un aislamiento funcional del animal con respecto de su ambiente, por tanto, este no percibe toda la información disponible o no la

puede utilizar completamente, afectándose así el desarrollo. Esta hipótesis es extrapolable al ser humano, puesto que las alteraciones de conducta tales como apatía y la pasividad, dejarán también al niño en desventaja en cuanto a percibir y procesar los estímulos ambientales (11-13, 24-29).

Se sabe que para el desarrollo y crecimiento prenatal normal del organismo se requiere la interacción de factores feto-maternos, tales como la integridad de las membranas feto-placentarias, la transferencia de nutrimentos, la excreción de catabolitos a través de la placenta, además de los mecanismos de difusión y área placentaria de intercambio e interacción inmunológica y sanguínea del feto y la madre, que permiten una adecuada multiplicación y crecimiento celular (32-38).

Cuando no se alcanza la interacción feto-materna de los diferentes factores señalados anteriormente se origina un retraso del desarrollo intrauterino, cuyo grado de severidad está en relación al inicio de la desnutrición durante la vida intrauterina. Si comienza en la etapa temprana de la gestación el trastorno es la falta de división celular, si se presenta en la última etapa del desarrollo fetal, el crecimiento celular es el afectado (32, 33, 38).

En diversos estudios en animales en los que se ha producido experimentalmente desnutrición pre y postnatal se ha comprobado un bajo contenido de ácido desoxirribonucleico (DNA) y del ácido ribonucleico (RNA) en el cerebro, hígado y riñón; disminución de la síntesis de mielina y sinapsis cerebrales (32, 33, 39-47); reducción del peso y alteraciones en la estructura, composición y función intestinal (48, 49); también se ha comprobado una

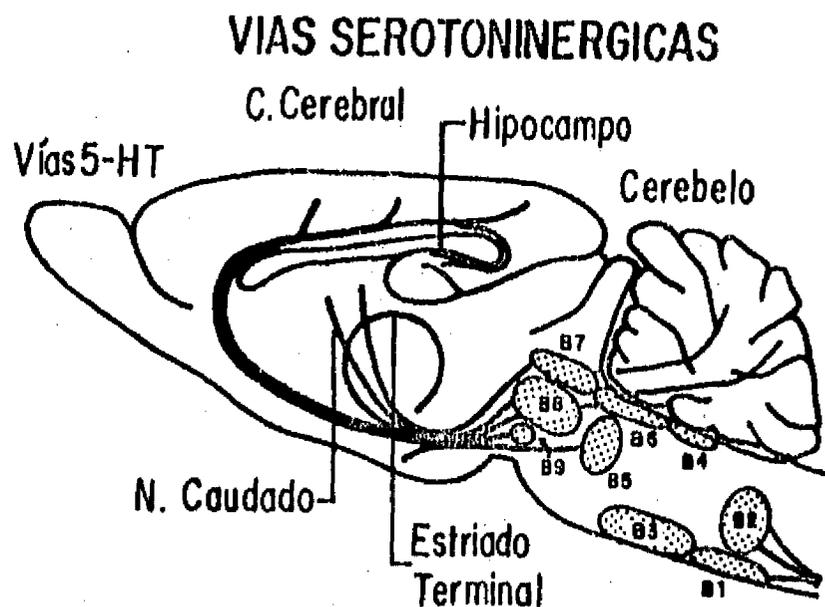
disminución del peso de las gónadas y órganos accesorios de la reproducción (50). Además se ha demostrado que la restricción severa de nutrimentos en los periodos vulnerables del desarrollo del sistema nervioso central (SNC), que para la especie humana van desde el tercer trimestre de la gestación hasta el segundo año de vida postnatal, produce un daño irreversible en su estructura y composición bioquímica (39-47).

Sin embargo es difícil establecer relaciones precisas entre la morfología y la función, más aún en periodos en que el SNC posee gran plasticidad y está sujeto a la influencia de gran cantidad de variables estimulativas ambientales. Por esta razón la hipótesis planteada hace algún tiempo acerca de la irreversibilidad del daño producido por la desnutrición debe de ser revaluada.

La desnutrición es por tanto un trastorno de orden general que hace difícil su relación con alteraciones funcionales sobre todo en el sistema nervioso central. La búsqueda de estos cambios es el punto de partida para la mejor comprensión de sus efectos sobre la función neuronal. Estos cambios en un sistema neuronal específico pueden ser las bases de trastornos posteriores de la conducta en individuos con antecedentes de desnutrición severa. Existe evidencia experimental que un sistema de neuronas con función específica se altera en el cerebro de ratas con desnutrición temprana durante el desarrollo, es el sistema serotoninérgico (51-59).

I.1. SISTEMA SEROTONERGICO

FIGURA 1



El sistema serotoninérgico en la rata se localiza en el tallo cerebral, está compuesto de nueve grupos de neuronas, las cuales se denominan con la letra B y son enumerados del uno al nueve (60-64). El grupo B 1 se localiza dentro del núcleo del rafe pallidus, alrededor de la superficie medial y ventral del haz piramidal; B 2 está en el rafe obscurus; B 3 es más anterior que B 1 y también está rodeado del haz piramidal. El grupo B 4 es pequeño y está localizado abajo del cuarto ventrículo y en la parte dorsal del núcleo vestibular y del núcleo del nervio Abducens. Los grupos 5 y 6 están localizados dentro del núcleo pontis. En el cerebro medio los grupos B 7 y B 8 también ocupan la posición media del núcleo dorsal y rafe medio. El grupo B 9 está localizado ventral y lateralmente alrededor del Lemniscus medial.

Las prolongaciones axónicas de estos grupos de neuronas se dirigen a diferentes áreas del SNC; los grupos de neuronas serotoninérgicas B 1, B 2 y B 3 inervan a la médula espinal en el cuerno ventral y la columna lateral simpática. El cerebelo recibe inervación principalmente de los grupos B 7 y B 8, pero también del B 5 y B 6. Los grupos B 7 y B 8 inervan la mayor parte de todas las áreas del cerebro anterior. Entonces las lesiones de estos dos grupos de neuronas causan disminución de la concentración del neurotransmisor en esta región (65). Por métodos histoquímicos ha sido posible describir las fibras nerviosas que inervan el cerebro anterior, desde el núcleo del cerebro medio, el haz medial del cerebro anterior asciende hacia el fornix, septum y otras áreas del cerebro. Una vía ascendente medial inerva al hipotálamo y al área preóptica, esta vía se origina de los grupos neuronales B 5, B 6, B 7 y B 8. La vía ascendente lateral inerva áreas corticales que se origina de los núcleos B 7, B 8 y B 9. Existe un haz lateral que inerva principalmente el sistema motor extrapiramidal, que también se deriva de los grupos B 7, B 8 y B 9. Los núcleos del raquí del cerebro medio además inervan la línea de células endimarias del ventrículo (64).

Estas neuronas se diferencian tempranamente e inician su función en el periodo fetal como los demuestran los hallazgos de Takahashi (66), Olson y Seiger (67, 68) quienes describieron su existencia y distribución en el tallo cerebral por técnicas de inmunohistoquímica, usando anticuerpos antiserotonina, en fetos de rata y humanos en estos últimos desde las 15 a 27 semanas de edad gestacional (66-69). Este sistema cerebral se regula a través de un neurotransmisor específico, la serotonina (5-hidroxitriptamina,

5-HT), que también actúa como neuromodulador y que es sintetizado en las neuronas serotoninérgicas de los núcleos del rafe (70).

Por evidencia experimental se ha concluido que la 5-HT cerebral llena todos los requisitos para ser considerado un neurotransmisor (71-73). Su maquinaria biosintética se localiza en las terminales nerviosas de las células serotoninérgicas así como las enzimas catabólicas, además de haberse identificado un sistema de receptores específicos a la 5-HT en neuronas blanco de diferentes regiones del cerebro adulto y en desarrollo (74-78).

Este neurotransmisor participa en diversas funciones del SNC, durante la embriogénesis y etapas posteriores de maduración cerebral, tiene un papel importante en el crecimiento y diferenciación neuronal (79-82). Además se ha relacionado a otras funciones cerebrales como: la regulación de los ciclos de sueño y vigilia (83, 84), de los impulsos nociceptivos (85-88), de la termorregulación (89, 90), del comportamiento alimentario (91, 92), y sexual (93), de la conducta afectiva y emocional (93-97), de la liberación de hormonas hipofisarias (98), se ha relacionado también a conductas de control temporal (99). A nivel celular está involucrado en la regulación de la actividad de la $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ATPasa (53, 54, 100-103).

El L-triptofano plasmático (L-Trp), precursor de la síntesis de 5-HT, es un aminoácido no sintetizado en el organismo. Por lo tanto se obtiene de las proteínas de la dieta. Se encuentra en el plasma sanguíneo en dos fracciones, una de ellas unida a albúmina y la otra libre (104). La primera se utiliza en su mayor parte en las vías metabólicas de los ácidos cinurénico y nicotínico así como en la síntesis de proteínas (105). La segunda fracción tiene

la función especial de servir como precursor de la síntesis de 5-HT cerebral (105-111). La relación que guardan las fracciones ligada a albúmina y la libre determina la disponibilidad de esta última para su paso en mayor o menor concentración a través de la barrera hematoencefálica (BHE), por un mecanismo de transporte activo (112, 113), que está mediado por un sistema de acarreador membranal y es captado por las neuronas serotoninérgicas en el cerebro para la síntesis del neurotransmisor.

Hay dos líneas de evidencia que apoyan la relación entre la de la nutrición, el L-Trp y la síntesis de 5-HT cerebral. Por un lado los experimentos en ratas, las cuales se sometieron a periodos de ayuno corto o a regimenes de nutrición hipoproteínica-hipocalórica prolongados durante la vida intrauterina y postnatal, el L-Trp se encontró elevado en favor de la fracción libre y en el cerebro aumentó la concentración de dicho aminoácido y la de 5-HT (114-116). Por otra parte en animales normales a los que se administraron cargas de L-Trp a dosis de 50 a 150 mg/Kg de peso, por vía intraperitoneal, se observó una elevación de la fracción libre del L-Trp plasmático, del L-Trp y 5-HT cerebral (54, 103, 117). Por último cuando se da un suplemento de L-Trp, de 50 mg/Kg de peso, a ratas durante la gestación, aumenta la actividad de la enzima triptofano-5-hidroxilasa en el cerebro fetal (54, 103), y en la etapa postnatal la concentración del neurotransmisor y del ácido 5-hidroxiindolacético, lo que indica una activación importante de la vía metabólica serotoninérgica similar a la observada en el animal con desnutrición intrauterina (54, 56-59, 103).

Una vez que el L-Trp pasa la BHE, ingresa a las neuronas, en

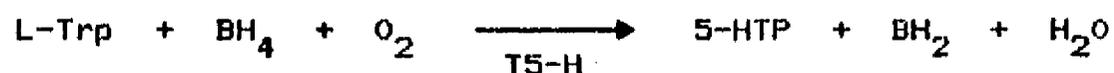
donde es hidroxilado mediante la enzima triptofano-5-hidroxilasa (L-triptofano-5-monooxigenasa, EC 1.14.16.4, T5-H) (118-120), para formar el 5-hidroxitriptofano (5-HTP) (121, 122), que de inmediato es descarboxilado por la enzima descarboxilasa de los aminoácidos aromáticos, para producir el neurotransmisor (123-125).

La T5-H es una enzima que se clasifica como una oxidoreductasa, que mediante técnicas de inmunohistoquímica con anticuerpos policlonales específicos, se ha logrado conocer su concentración tanto en el tejido cerebral como en las neuronas serotoninérgicas. La apoenzima de la T-5H en el cerebro de rata adulta tiene una concentración aproximada de 11 nM con un peso molecular de 260,000 Da. Esta concentración de la apoenzima es semejante a la concentración que tiene en el tallo cerebral, región del SNC rica en neuronas serotoninérgicas con una elevada actividad de la enzima (126-133). A nivel celular, la enzima se localiza en el soma, dendritas proximales, varicosidades axónicas y en las terminales nerviosas (129, 134-139). Además tiene una estrecha relación con estructuras citoplásmicas semejantes a microtúbulos localizados en el soma neuronal (135). Se ha demostrado que las dendritas de las neuronas serotoninérgicas tienen todos los elementos de la maquinaria biosintética para la síntesis de 5-HT, estas dendritas realizan contacto sináptico con otras dendritas de las mismas neuronas serotoninérgicas de los núcleos del rafe. Es probable que la 5-HT producida en estas estructuras tenga la función de autorregulación de la síntesis del neurotransmisor en la misma célula serotoninérgica (140-146).

Hay evidencia de que la enzima también se localiza en los trayectos de las fibras nerviosas procedentes de las neuronas del

tallo cerebral, estos axones inervan gran parte de los vasos sanguíneos cerebrales, además se ha demostrado que tienen la capacidad de sintetizar a la 5-HT, cuya función es la de intervenir en la regulación del flujo sanguíneo cerebral (136, 147-149).

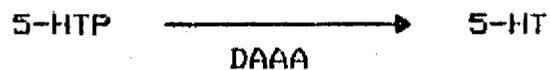
La T5-H cataliza la inserción de un átomo del oxígeno molecular en el sustrato orgánico, en tanto que el otro átomo de oxígeno es reducido a agua, esta reacción química requiere la participación de un cofactor que es la tetrahidrobiopterina (BH_4), que dona electrones para reducir el oxígeno y formar oxhidrilos (118, 150). La ecuación general de la reacción es:



La reducción del quinonoide dihidrobiopterina (BH_2), es llevada a cabo por la enzima dihidrobiopterina reductasa (DBR), dependiente de piridin nucleótido, según la reacción:



Una vez que es sintetizado el 5-HTP, de inmediato es descarboxilado por la enzima descarboxilasa de los aminoácidos aromáticos (AADC) para producir 5-HT (123-125). La ecuación de la reacción es:



La 5-HT cerebral sintetizada se almacena en vesículas sinápticas que se encuentran en las terminales nerviosas serotoninérgicas, estas vesículas sinápticas varían de tamaño según

su localización. Recientemente se han descrito en varias partes del SNC terminales nerviosas no sinápticas. Este tipo de terminales le confiere también a la 5-HT un papel de neuromodulador (70).

En condiciones normales la actividad de la T5-H en el cerebro adulto es de 70 a 100 veces menor a la actividad que tiene la enzima descarboxilasa de los aminoácidos aromáticos, además su constante de afinidad por el L-Trp es mayor a la concentración del aminoácido en el tejido cerebral, estos aspectos bioquímicos de la enzima, le confieren la característica de una enzima limitante, reguladora de la cadena biosintética de la 5-HT (118-121, 150).

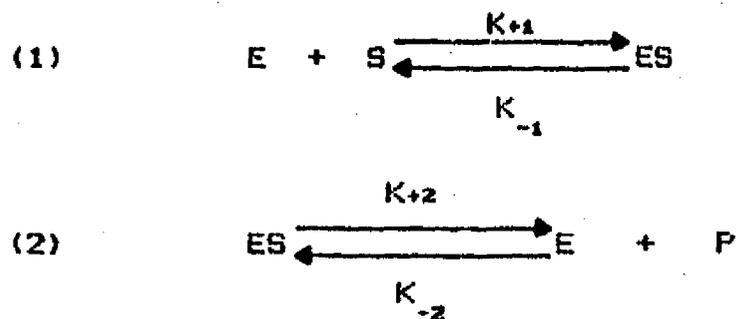
I.2. CINÉTICA ENZIMÁTICA

En el análisis de la reacción enzimática de la T5-H, se aplican los principios generales para la cinética de las reacciones químicas. A diferencia de éstas, las reacciones catalizadas por las enzimas muestran las características de saturación por el sustrato. A medida que aumenta la concentración de sustrato, manteniendo fija la concentración de la enzima, se produce al principio un incremento considerable en la velocidad de la reacción, sin embargo, si continua aumentando la concentración de sustrato, la velocidad de la reacción llega al máximo y permanece constante. Por este comportamiento se planteó la hipótesis mediante la cual se podría explicar el mecanismo de la reacción enzimática

En 1902, J. Brown y V. Henry (151, 152), fueron los primeros en establecer la hipótesis de que la enzima forma un complejo

reversible con el sustrato, en la etapa esencial de la reacción; en esta hipótesis, se relaciona el concepto enunciado por E. Fischer (153), para explicar el alto grado de especificidad que exhiben las enzimas por el sustrato, que supone un acoplamiento del tipo llave-cerradura de la molécula de sustrato a una porción de la molécula de la enzima, la cual más tarde se denominó centro activo o centro catalítico (154).

El mecanismo de reacción enzimática fue ampliamente formulado y desarrollado por Michaelis y Menten (155), para el caso sencillo de una reacción enzimática con un sólo sustrato. La teoría propone el modelo siguiente:



En la primera etapa la enzima libre E se une al sustrato S, para formar el complejo enzima-sustrato ES y en una segunda etapa el complejo ES se escinde, formando E y el producto P. Ambas etapas tienen sus respectivas constantes de velocidad K. A partir de este modelo se dedujo la ecuación de Michaelis-Menten (155). La ecuación se deriva de la siguiente manera: Se define E como la concentración de la enzima libre o no combinada, ES la concentración del complejo enzima-sustrato, Et la concentración total de la enzima, P el producto formado y S la concentración del sustrato.

La concentración del sustrato se supone que es mucho mayor que la concentración de la enzima por lo que la cantidad de sustrato unido a la enzima en cualquier instante es despreciable al compararse con la concentración total del sustrato. La velocidad inicial de la reacción v es igual a la velocidad de ruptura del complejo ES por lo que la ecuación de velocidad de primer orden es:

$$dP/dt = K_2 (ES) = v$$

v = velocidad inicial de formación de P

K_2 y ES no pueden determinarse directamente, por lo que es necesario buscar otra expresión para v en función de otras variables que puedan medirse con más facilidad, por lo que a partir de la formación del complejo ES se obtiene la ecuación de velocidad de segundo orden:

$$\frac{d(ES)}{dt} = K_{+1} (Et) - (ES) \quad (9)$$

K_{+1} = constante de velocidad de segundo orden.

La ecuación de velocidad para la descomposición del complejo ES se obtiene por la suma de dos reacciones, una que rinde el P y la otra que produce (E + S) y es la siguiente:

$$\frac{-d(ES)}{dt} = K_{-1} (ES) + K_{+2} (ES)$$

En el estado estacionario la concentración de ES permanece constante por lo que la velocidad de formación del complejo ES es igual a la velocidad de su desaparición:

$$K_{+1} [(Et) - (ES)] (S) = K_{-1} (ES) + K_{+2} (ES)$$

reordenando la ecuación tenemos que :

$$\frac{(S) [(Et) - (ES)]}{(ES)} = \frac{K_{-1} + K_{+2}}{K_{+1}} = K_m$$

K_m = constante de Michaelis

La concentración del complejo ES en el estado estacionario es:

$$(ES) = \frac{(Et) (S)}{K_m + (S)}$$

si $S = K_m$;
$$v = K_{+2} \frac{(Et) (S)}{K_m + (S)}$$

si $S = K_m$, todas las moléculas de E están en forma de ES, por lo tanto la velocidad alcanzó su máximo, V_{max} , por lo que; $v = K_{+2} (Et) = V_{max}$.

La ecuación de Michaelis-Menten es la siguiente:

$$(3) \quad v = \frac{V_{max} (S)}{K_m + (S)}$$

Donde:

v = velocidad de reacción

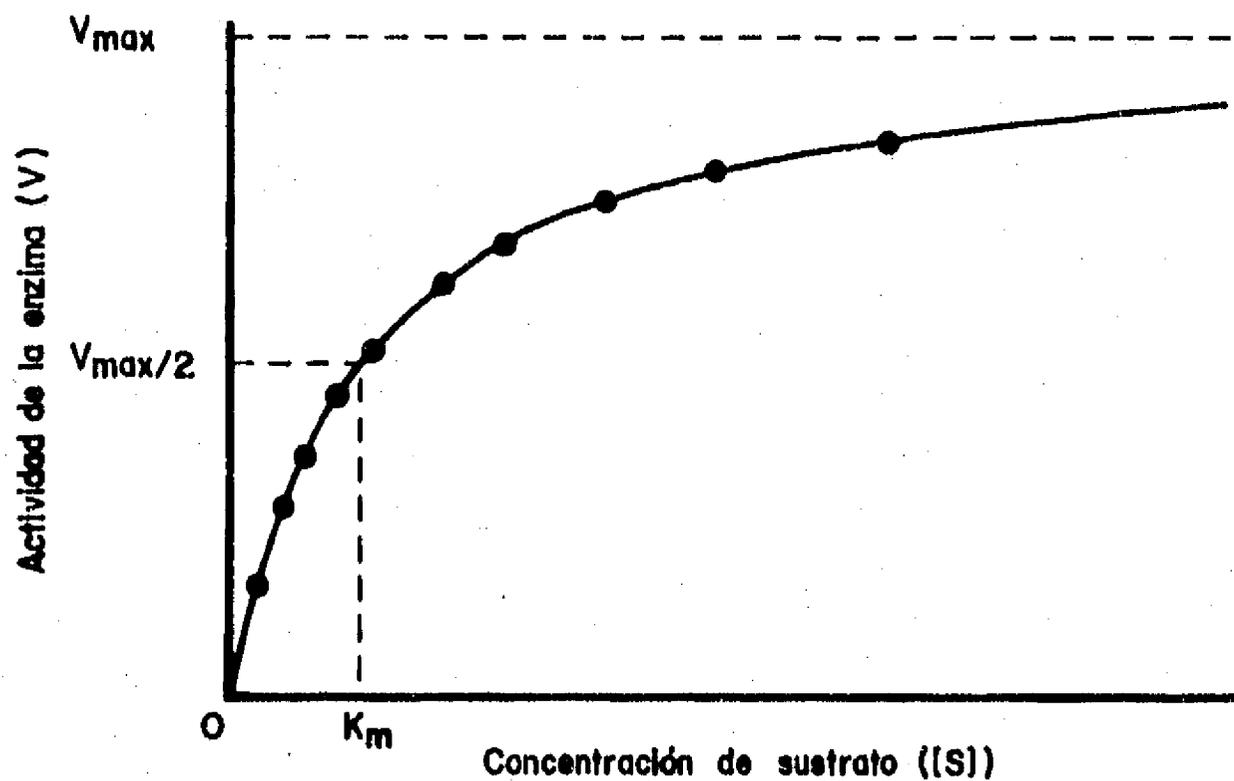
V_{max} = velocidad máxima de la reacción

K_m = constante de Michaelis

La velocidad de una reacción enzimática varía con la concentración del sustrato, aumenta en relación a la concentración del sustrato, hasta alcanzar un valor máximo. En este punto, todas las moléculas de la enzima están ocupadas y la velocidad de la reacción está limitada por la velocidad del proceso catalítico sobre la superficie de la enzima. Para la mayoría de las enzimas la concentración del sustrato a la velocidad de reacción iguala la mitad de la velocidad máxima, K_m , es una medida de la intensidad de enlace con los sustratos, de forma que una K_m elevada representa una débil intensidad de enlace y una K_m baja, significa que la enzima alcanza su máxima velocidad catalítica a una baja concentración del sustrato y por lo general indica que la enzima une su sustrato con gran intensidad (155).

Debido a la manera como trabajan las enzimas, existe un límite a la cantidad del sustrato que la enzima puede transformar a un tiempo determinado. Si se aumenta la concentración del sustrato, la velocidad a la que se forma el producto también aumenta hasta alcanzar un valor máximo, como se representa en la figura 2.

FIGURA 2
REPRESENTACION GRAFICA DE MICHAELIS-MENTEN



S= concentración de sustrato

v= velocidad de la reacción

V_{max} = velocidad máxima de reacción

K_m = constante de Michaelis-Menten

En este punto, la molécula está saturada de sustrato y la velocidad de la reacción depende únicamente de la rapidez con que pueda ser procesada la molécula de sustrato. Esta velocidad se expresa en el número de recambio, que para muchas enzimas es del orden de 1000 moléculas de sustrato por segundo.

La importancia de la ecuación de Michaelis-Menten radica en

que describe el comportamiento cinético de la reacción enzimática y en el significado de las constantes K_m y V_{max} , para las reacciones catalizadas por enzimas que actúan sobre un sólo sustrato, a diferencia de las enzimas alostéricas que generalmente no muestran la relación cinética de Michaelis-Menten entre la concentración del sustrato, la V_{max} y la K_m , ya que su comportamiento cinético está muy alterado por las variaciones de la concentración del modulador alostérico (156-158).

Los valores aparentes de K_m y V_{max} pueden obtenerse al graficar la velocidad inicial de reacción contra la concentración de sustrato. La ecuación de Michaelis-Menten es la de una hipérbola rectangular como se muestra en la figura 2. El valor de V_{max} se obtiene de la asíntota a la curva en v y el valor de K_m es aquel de la concentración de sustrato a la cual la velocidad es igual a la mitad de la V_{max} .

A una concentración baja de sustrato la velocidad inicial de la reacción es casi directamente proporcional a la concentración de sustrato, ya que esta región de la curva se puede aproximar a una línea recta.

La relación entre la variable independiente S y la variable dependiente v es curvilínea, se pueden efectuar transformaciones lineales de la ecuación de Michaelis-Menten para obtener valores más exactos de K_m y V_{max} de una reacción enzimática. Una de las transformaciones lineales más utilizada es la doble recíproca de Lineweaver-Burk (159), en la cual se grafica el recíproco de la velocidad contra el recíproco de la concentración de sustrato. La ecuación se deriva de la siguiente manera:

A partir de la ecuación 3

$$v = \frac{V_{\max} (S)}{K_m + S}$$

$$\frac{v}{V_{\max}} = \frac{S}{K_m + S}$$

se toman los recíprocos:

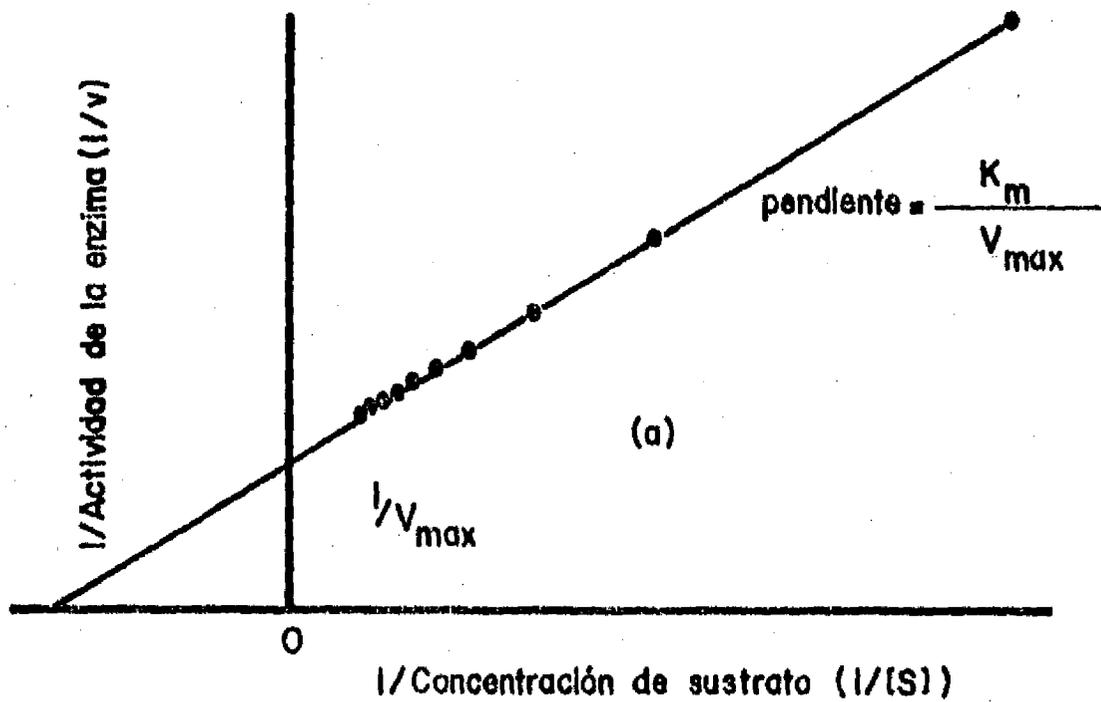
$$\frac{V_{\max}}{v} = \frac{K_m + S}{S} = \frac{K_m}{S} + 1$$

Reordenando la ecuación tenemos:

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{V_{\max}} + \frac{K_m}{V_{\max}} \left(\frac{1}{S} \right)$$

La representación gráfica de esta ecuación se muestra en la figura 3.

FIGURA 3
REPRESENTACION DE LINEWEAVER-BURK



Cuando $1/v$ se representa frente $1/S$, se obtiene una línea recta cuya pendiente es igual a K_m/V_{max} , la intersección en el eje $1/v$ es igual a $1/V_{max}$ y la intersección en el eje de $1/S$ es igual a $-1/K_m$. La representación doble recíproca tiene la ventaja de que permite una determinación más exacta del valor de la velocidad máxima de reacción, ya que en la representación sencilla de v contra S se obtiene solo un valor aproximado, puesto que la V_{max} , es un valor límite a una concentración infinita de sustrato, también proporciona información valiosa acerca de la inhibición enzimática que es otro de los aspectos importantes de un sistema enzimático, ya que con el empleo de inhibidores se obtiene información sobre el mecanismo de la catálisis enzimática, la especificidad del sustrato de las enzimas, la naturaleza de los grupos funcionales en el centro activo y la participación de ciertos grupos funcionales en el mantenimiento de la conformación activa de la molécula de la enzima.

Gráficamente se obtienen familias de curvas y a partir de ellas se puede obtener información sobre el tipo de inhibición que se presenta en un sistema enzimático. El método de la doble recíproca presenta la desventaja de que a bajas concentraciones de sustrato existe una dispersión grande de la velocidad de la reacción.

Otras transformaciones lineales de la ecuación de Michaelis-Menten se obtienen multiplicando ambos miembros de la ecuación por V_{max} :

$$\frac{1}{V_o} = \frac{K_m}{V_{max}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}}$$

y reordenando:

$$V_o = -K_m \frac{V_o}{[S]} + V_{max}$$

Esta transformación se conoce como la de Eadie-Hofstee (160), consiste en graficar v Vs $v/[S]$. Este método amplía las desviaciones de carácter lineal que pueden no aparecer en una representación de doble recíproca.

La representación de Hanes (161) se trata de una línea recta con pendiente de $1/V_{max}$, con intersección en el eje $-(S)/v = V_{max}/K_m$ y la intersección en el eje de $v = -K_m$.

En este trabajo la K_m y la V_{max} de la actividad de la T-5H en las diferentes edades estudiadas, pre y postnatal inmediata, fue valorada mediante un programa de computación (ROSFIT) descrito por Greco y col (162). Este método tiene la peculiaridad de tomar como base para el cálculo de las constantes cinéticas la ecuación de Michaelis-Menten y la linearización de Lineweaver-Burk; realiza un análisis de regresión no lineal de la curva de saturación y pondera estadísticamente cada uno de los puntos de la hipérbola rectangular.

1.3. REGULACION DE LA BIOSINTESIS DE 5-HIDROXITRIPTAMINA

Varios factores están involucrados en la regulación de la síntesis de 5-HT en el SNC. Arbitrariamente se pueden englobar en tres grupos: El primero corresponde a los cambios de la disponibilidad del sustrato, tanto a nivel plasmático, como en el

transporte a través de la BHE y su compartimentalización en el tejido cerebral. Por ello los cambios en la disponibilidad del L-Trp rápidamente aumentan o disminuyen la síntesis del neurotransmisor (104, 108-110).

El segundo grupo lo constituyen los mecanismos que regulan la actividad de la T5-H para hidroxilar al L-Trp. Entre estos factores se encuentra la disponibilidad del oxígeno, la concentración del cofactor, BH_4 , el medio iónico del tejido cerebral, así como la concentración de la proteína y los diferentes mecanismos que intervienen en su regulación que son: inhibición de la actividad enzimática por el producto final, 5-HT, cambios en la cinética y aumento en la concentración de moléculas de la enzima. Los primeros cambios se observan en forma inmediata y el último se presenta después de 24 horas del estímulo de activación (118, 139, 163-168).

El tercer grupo de factores que intervienen en la regulación de la enzima son los mecanismos de autorregulación de la propia neurona serotoninérgica mediante autorreceptores específicos para la 5-HT (140-146). Se conoce que la autorregulación de la liberación de 5-HT por las neuronas serotoninérgicas se lleva a cabo mediante la participación de autorreceptores específicos para el neurotransmisor. Los autorreceptores pertenecen al subgrupo $5-HT_{1A}$, los cuales han sido identificados mediante técnicas de autorradiografía con ligandos específicos como lo son el 8-hidroxi-2(dipropilamino) tetralina (8-OH-DPAT) y el RU 24969 (140-146, 169). Estos métodos bioquímicos han permitido conocer su distribución a nivel del soma y dendritas de las células serotoninérgicas (140-146). Así mismo, han demostrado que entre las

neuronas de los núcleos serotoninérgicos del rafe existen contactos sinápticos dendro-dendritas y con axones terminales. Además, que en estos contactos sinápticos se encuentran todos los elementos de la maquinaria biosintética de la 5-HT cerebral.

El neurotransmisor sintetizado en estas regiones celulares es liberado al espacio extracelular y probablemente ejerza su acción inhibitoria sobre la función de la célula serotoninérgica, a través de los autorreceptores para 5-HT, esta interacción produce una hiperpolaridad de los canales de potasio, modificando así el impulso eléctrico de la neurona, este mecanismo ha sido propuesto como uno de los principales en la regulación de la síntesis del neurotransmisor a nivel de la célula serotoninérgica (140, 141, 170).

Cambios rápidos y reversibles del impulso nervioso en el interior de la célula serotoninérgica, activan mecanismos de fosforilación de la T5-H, esta fosforilación fue observada cuando homogeneizados de tallo cerebral de rata adulta fueron incubados en un medio compuesto por adenosin trifosfato (ATP), magnesio (Mg^{++}) y calcio (Ca^{++}), con esta maniobra experimental se demostró un aumento de la actividad de la enzima (171-176). Este hallazgo recientemente fue confirmado, además se demostró que en este mecanismo de fosforilación interviene una proteína cinasa II Ca^{++} /calmodulina dependiente (128, 177-179).

Existe controversia en la literatura acerca de que otros sistemas de segundos mensajeros activen a la T5-H, como en el caso de la tirosina hidroxilasa (TH). Se sabe que el adenosin monofosfato cíclico (AMP_c), la proteína cinasa C dependiente de Ca^{++} /fosfatidilserina y la proteína cinasa dependiente de guanósil

monofosfato cíclico (GMP_c) tienen la capacidad de activarla. Por lo tanto, nosotros consideramos necesario dilucidar si el AMP_c y el PI tienen la capacidad de fosforilar a la enzima T-5H y concomitantemente producir un aumento de su actividad enzimática.

I.4 SISTEMA DE SEGUNDOS MENSAJEROS

I.4.1. ADENOSIN MONOFOSFATO CICLICO (AMP_c)

El papel que juega el AMP_c en la regulación de la enzima T-5H no se conoce con exactitud. Esta interacción ha sido observada en sinaptoneurosomas procedentes del tejido nervioso de los núcleos del rafe, incubados con forskolina. La forskolina tiene la capacidad de estimular a la subunidad catalítica de la adenilil ciclasa, que al activarse produce un aumento en la síntesis de AMP_c , que sirve como cofactor para la proteína cinasa A dependiente de este nucleótido, y como resultado de esta reacción produce una fosforilación y una mayor actividad de la T-5H (180-182). Consideramos importante aclarar en este trabajo si este nucleótido participa en los mecanismos de regulación de la actividad de la T-5H durante el desarrollo del SNC.

Se sabe que entre los mecanismo de transmisión de la señal hacia el interior de la célula, el más importante conocido es el que utiliza AMP_c como segundo mensajero. La interacción del estímulo externo con el receptor, resulta en activación de la enzima adenilil ciclasa (EC 4.6.1.1.), que es responsable en la formación de AMP_c a partir de ATP. En este proceso participan dos tipos de proteínas G: una estimuladora (G_e) y una inhibitoria (G_i), las cuales se unen a dos tipos de receptores específicos. La

proteína G_e , se une al receptor conocido como R_e , mientras la G_i , se une al receptor R_i . La unión de una molécula con el receptor R_e induce cambios conformacionales en este último, que le permite interactuar con la proteína adyacente G_e sensibilizándola al guanosin trifosfato (GTP), que proviene del interior de la célula. La unión del GTP a la proteína G_e constituye la reacción de apertura de la vía, e induce en G_e una nueva conformación, esto es, un cambio en su forma, que a su vez le permite activar a la enzima responsable de la formación de AMP_c . De esta manera, la información transportada por el estímulo externo se ha transmitido a través de la membrana y se ha formado un segundo mensajero, capaz de difundir la información en el interior de la célula. La actividad del complejo G_e -GTP termina con la hidrólisis del GTP por la enzima guanosin trifosfatasa (GTPasa), la cual hidroliza la unión entre los fosfatos α y β del nucleótido, para formar guanosin difosfato (GDP), lo que constituye la reacción de cierre de la vía (183-191).

El otro tipo de proteína que participa en la ruta del AMP_c , actúa como mediador del tipo inhibitorio en la transmisión de la señal. En este caso, la llegada de la señal externa a los receptores denominados R_i da lugar a una nueva conformación de la proteína G llamada G_i que también se activa al unirse al GTP, e inhibe a la enzima adenilil ciclasa (189, 190, 192).

El AMP_c regula una gran variedad de procesos celulares, modulando la acción de algunas hormonas y neurotransmisores. Este proceso de regulación se lleva a cabo cuando dicho nucleótido interacciona con la proteína cinasa A , la cual cataliza la transferencia de un grupo fosfato del ATP a residuos de serina y

treonina de ciertas proteínas presente en las células blanco (189, 193, 194).

La cinaasa está formada estructuralmente por dos subunidades diméricas, una reguladora y una catalítica; el AMP_C es el estimulador alostérico de la enzima y cuando dos moléculas de nucleótido se unen a cada monómero de la subunidad reguladora, se libera la porción catalítica que contiene el sitio activo y es la responsable de adicionar grupos fosfato a proteínas, regulando de esta forma diferentes procesos metabólicos (189, 195-197).

La concentración intracelular de AMP_C es aproximadamente de 10^{-6} M y puede cambiar rápidamente, en respuesta a determinado tipo de señales extracelulares, ya sea aumentando o disminuyendo su concentración. El nucleótido puede ser inactivado rápidamente por enzimas específicas llamadas fosfodiesterasas (EC 3.1.4.17; 3'5'cíclico 5'nucleótido hidrolasas), que hidrolizan el enlace éster de la posición 3'; formando adenosin 5' monofosfato (5'AMP) (189, 195-197).

Esta enzima es estimulada por iones de calcio y su efecto se establece una vez que el catión divalente se une a la proteína denominada calmodulina, formando así un complejo, que a su vez se une a la fosfodiesterasa y como consecuencia, el AMP_C es hidrolizado. A medida que la concentración citosólica de AMP_C disminuye, el nucleótido que está unido a la proteína A, es liberado de la subunidad reguladora y como consecuencia esta última se recombina con la subunidad catalítica, convirtiendo nuevamente a la enzima en su forma original, que es inactiva (189, 195-198).

1.4.2. TRIFOSFATO DE INOSITOL (IP_3) y DIACILGLICEROL (DG)

Existe la interrogante si el IP_3 y el DG tienen algún papel en los mecanismos de regulación de la actividad de la T-5H en las neuronas serotoninérgicas. Recientemente, se han demostrado con técnicas de autorradiografía, receptores del subtipo $5-HT_{1c}$ y $5-HT_2$ acoplados al sistema de recambio del fosfatidil inositol en la membrana celular, además al ser estimulados estos receptores, se produce una activación de la fosfolipasa C y un aumento de la concentración del IP_3 y DG. El IP_3 induce la liberación de calcio de los sitios de almacenamiento intracelular y el DG permanece en la membrana y sirve como sustrato para la actividad de la proteína cinasa C (169). Consideramos conveniente investigar si este sistema de segundos mensajeros interviene en la regulación de la actividad de la T-5H cerebral, durante la vida pre y postnatal inmediata.

El fosfatidilinositol (PI) representa el 2 % de la fracción total de fosfolípidos de la membrana celular, su función principal es el mantener la integridad de la membrana celular (199, 200). Existe evidencia que un grupo de fosfolípidos están localizados en la monocapa orientada hacia el citoplasma, estos fosfolípidos sirven como precursores de segundos mensajeros. En condiciones basales, el PI experimenta dos fosforilaciones sucesivas en las posiciones 4 y 5 del anillo del inositol, se forma el fosfatidilinositol 4-fosfato (IP_1) y el fosfatidilinositol 4,5 bisfosfato (IP_2) (199, 200). Ambas reacciones están catalizadas por dos cinasas ubicadas en la membrana plasmática y dado su requerimiento de ATP, no se producen en condiciones de

anaerobiosis. El PI se regenera por acción de dos fosfatasa que catalizan la desfosforilación del IP_2 y del IP_1 . Este proceso de fosforilación y de desfosforilación se produce continuamente, implica un gasto de energía, razón por la cual se ha denominado ciclo infructuoso (200).

El IP_2 representa el uno por ciento del inositol (201), es el más relevante desde el punto de vista funcional, ya que cuando un tejido es estimulado con algún agonista es el primer derivado del PI, que disminuye (201, 202, 203). Es el precursor inmediato de dos sustancias que tienen todas las características para ser consideradas como segundos mensajeros: inositol 1,4,5 trifosfato (IP_3) y el diacilglicerol (DG) (199, 200, 204).

La enzima que cataliza la formación del IP_3 y el DG, es una fosfodiesterasa denominada fosfolipasa C, que se localiza en la membrana plasmática de todos los tipos celulares. La unión de neurotransmisores a sus respectivos receptores modifica la actividad de la fosfolipasa C, pasando de la forma inactiva a la activa (204). Esta activación requiere de la proteína G y GTP en la molécula (204, 205-207), El sustrato principal para la fosfolipasa C es el IP_2 , cataliza la hidrólisis del enlace éster entre el carbono 3 de la cadena del glicerol y el fosfato en la posición 1 del inositol, con la consiguiente formación del IP_3 y del DG, éste último, una vez sintetizado permanece en la membrana, mientras el IP_3 , que es soluble en agua, llega al citoplasma, en donde induce la liberación de calcio de los sitios de almacenamiento intracelular, principalmente del retículo endoplásmico. La movilización de este catión puede llevarse a cabo incluso cuando la célula está en reposo; sin embargo, al ser

estimulada, el IP_3 induce la liberación del ión de los organelos intracelulares y también regula su recaptura una vez liberado, lo que explica que el aumento en los niveles de calcio sea momentáneo. Si los sitios de almacenamiento tienen bajas concentraciones del ión mencionado, y los requerimientos son mayores, es necesario que el calcio provenga de fuera de la célula; tal es el caso de células activadas eléctricamente como las neuronas (195, 208, 209).

Como se ha mencionado, la ruta de transmisión de la señal que utiliza fosfolípidos que contienen inositol, resulta particularmente importante, ya que se bifurca en dos vías: la que induce liberación de calcio y la que, al utilizar el DG, activa a una enzima que se encuentra unida a la membrana plasmática, la proteína cinasa C, que fosforila residuos de serina o treonina de proteínas endógenas (208, 209-211). La activación de alguna de las dos vías del ciclo del PI no es suficiente para la completa transmisión de la señal; para que ello ocurra, es necesaria la acción combinada de ambas vías.

1.4.3. CALCIO COMO SEGUNDO MENSAJERO

El ión calcio modula una gran variedad de procesos celulares y tiene una participación esencial en la transmisión de la señal, ya que puede actuar como segundo mensajero en el interior de la célula. La concentración citosólica de dicho ión es de aproximadamente $10^{-6}M$, pero puede incrementarse por diversos mecanismos; uno de ellos, resulta de la activación de la célula por estímulos extracelulares (212-217). El proceso se realiza

mediante un complicado mecanismo que libera calcio de los sitios de almacenamiento intracelular. La concentración de calcio también puede elevarse experimentalmente con la utilización de sustancias químicas, como los ionóforos, pero en este caso, la concentración aumenta de manera incontrolable y excesiva y depende del número de moléculas del catión fuera de la célula. Para regular un proceso de manera eficaz, la movilización de calcio, así como su función, deben de estar controladas. Por tal motivo, las células poseen un determinado grupo de proteínas que interactúan con dicho ión, modulando aquellos procesos que dependen de él para llevarse a cabo. Las proteínas que unen el calcio son de dos tipos; las que se encuentran en la membrana y las que se localizan en el citoplasma. Las primeras regulan el paso de moléculas a través de dicha membrana, así como al interior de los organelos intracelulares y actúan como transportadoras, ya que cada molécula puede unirse al calcio de un lado de la membrana, translocarlo hacia el otro lado, liberarlo y repetir este proceso. Este mecanismo requiere energía, proporcionada generalmente por el ATP (218-224).

El otro tipo de proteínas a las que se une el calcio, se encuentran en el citoplasma y en el interior de algunos organelos; su función es la de mediar los efectos de dicho ión en el interior de la célula. Dentro de este grupo se encuentra la calmodulina (225-231). Esta última está constituida por 148 aminoácidos, estructurados en una sola cadena polipeptídica, tiene cuatro sitios de unión para el catión y presenta un cambio conformacional al unirse el calcio. El complejo calmodulina-calcio, al unirse a una enzima, modifica la estructura espacial de ésta y como

consecuencia, su actividad. Las propiedades de la calmodulina son diferentes cuando se une a sólo una o dos moléculas del ión, lo que puede explicar el gran número de proteínas con las que interactúa y el gran número de procesos en los que participa (225-231).

II. JUSTIFICACION DEL ESTUDIO E HIPOTESIS

Existe suficiente evidencia de que el metabolismo serotoninérgico cerebral se encuentra alterado en animales con desnutrición temprana (55-59). Resultados recientes de nuestro laboratorio han demostrado que desde la etapa fetal hay una aceleración de la síntesis de 5-HT, precedida de un aumento de la concentración de L-Trp cerebral, saturando probablemente a la T5-H que en condiciones normales se encuentra insaturada (56-59). Si se toma en cuenta la secuencia de estos resultados veremos que los principales elementos de esta vía metabólica cerebral: el sustrato L-Trp, la actividad de la enzima iniciadora de la biosíntesis y la concentración del producto, el neurotransmisor, están elevados, por lo que se deduce que existe un aumento de la actividad metabólica en las neuronas serotoninérgicas cerebrales ocasionado por un aumento del paso del L-Trp libre al cerebro, este a su vez, secundario a un desequilibrio entre la fracción unida a albúmina y la libre, en favor de esta última (104, 108-110).

El aumento de la actividad de la T5-H observado, sugiere una modificación funcional de esta enzima y de los mecanismos que la activan; por lo que nos planteamos las hipótesis de que la aceleración de la síntesis de 5-HT en ratas desnutridas sea

secundaria a una modificación del comportamiento cinético de la enzima limitante, T5-H y del mecanismo por el que aumenta la actividad de la enzima en condiciones de fosforilación, durante la etapa perinatal en el cerebro de rata desnutrida. Esto lleva al concepto de que durante la desnutrición existen alteraciones de los mecanismos normales de regulación de la enzima que modifican su actividad por períodos largos con los consecuentes cambios en la síntesis del neurotransmisor y en su liberación.

III. MATERIAL Y METODOS

En el presente trabajo fueron seleccionadas 200 ratas blancas, cepa Wistar, hembras, nulliparas, con peso aproximado de 200 g, las ratas fueron adaptadas durante dos semanas a las siguientes condiciones ambientales: temperatura de $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$, períodos de luz y oscuridad de 12 h, el período de luz de 07:00 a 19:00 h, la manipulación y el ruido fueron mínimos, la humedad relativa osciló entre 50 y 60 %. Durante este período de adaptación las ratas fueron alimentadas con un régimen nutricional ad libitum tanto de agua como de alimento purina (Chow), cuya composición de nutrimentos es a base de 23% de proteínas, 4.5% de grasas, 45.5% de carbohidratos, 9% de cenizas, 6% de fibra, 12% de humedad, vitaminas B₁₂, riboflavina, levadura seca de cerveza, pantotenato de calcio, ácido fólico, vitamina E, tiamina, niacina, vitamina A, vitamina D, 0.05% de roca fosfórica, 0.5% de sal yodada, 0.75% de citrato de amonio, 0.2% de sulfato de manganeso y trazas de óxido de manganeso, carbonato de cobalto, óxido cúprico, óxido de zinc.

Al término del período de adaptación las ratas fueron divididas en los siguientes grupos experimentales: el grupo

control (C), el cual recibió un esquema de alimentación nutricional a base del alimento (purina Chow) y agua ad libitum. El segundo grupo (D) lo constituyó ratas con desnutrición proteínico-calórica, a este grupo de ratas se les restringió el alimento al 50 % del consumido en 24 h por las ratas del grupo control y se les permitió el agua a libre demanda. En ambos grupos el esquema nutricional se mantuvo durante dos semanas y al término de este período las ratas de los grupos fueron pareadas con machos normales. Durante el período de gestación los animales de los grupos D y C, se mantuvieron bajo las mismas condiciones descritas.

En el día 17 y 19 de gestación, bajo anestesia general con pentobarbital sódico a dosis de 40 mg/Kg de peso, por vía intraperitoneal, se practicó una operación cesárea a una parte de los individuos de los grupos D y C. Los fetos obtenidos in situ, se pesaron y se les determinó la longitud céfalo-sacra (232), de inmediato se les disecó el encéfalo sin cerebelo, se hizo una mezcla de tejido de 6 a 8 encéfalos, se homogeneizaron en una solución amortiguadora a 0-4 °C, para los diferentes ensayos bioquímicos.

A otra parte de las ratas gestantes de cada grupo, se les permitió terminar el embarazo. Al nacimiento las crías de cada grupo fueron mezcladas entre sí y redistribuidas al azar a diferentes madres del mismo grupo experimental, para formar camadas de 8 individuos y con ello se disminuyó las diferencias individuales y de camada. A las edades de 1, 2, 3, 6 y 10 días de vida postnatal, se tomaron 3 a 4 crías de tres camadas diferentes de cada grupo. Las crías se pesaron y se les midió la longitud

céfalo-sacra y fueron sacrificadas por decapitación, se disecó el encéfalo, se hizo una mezcla de tejido la cual fue homogeneizada y colocada en una solución amortiguadora para los ensayos neuroquímicos. En estas muestras de tejido se realizaron curvas de saturación de la T5-H con L-Trp como sustrato a concentraciones de 0.02 a 0.4mM, sin modificar los otros elementos del sistema enzimático.

A otro grupo de muestras de tejido encefálico obtenido en forma similar de ambos grupos D y C, a las edades de 17 días de gestación y al primero, 10 y 21 días de vida postnatal, se les realizó activación de la enzima mediante ATP 0.5 mM, MgCl₂ 8 mM y CaCl₂ 0.1 mM (171). Además para explorar qué otros sistemas de segundos mensajeros intervienen en la activación de la T5-H se tomaron crías a la edad de 10 días de vida extrauterina de los grupos D y C, se les disecó el encéfalo y se obtuvieron sinaptosomas por centrifugación diferencial (233). Estos sinaptosomas sirvieron como fuente de la actividad enzimática, los cuales fueron incubados durante 20 minutos a 37 °C, en agitación constante, una parte con forskolina a una concentración de 20 µM (182) y teofilina 50 µM. La otra parte con fosfatidilinositol a razón de 0.3 µM (200). Además en cada experimento fueron incubados controles de tejido encefálico no activado (basales).

El criterio de desnutrición que se empleó fue que el peso corporal de las ratas fuera significativamente menor al peso de las ratas controles y para disminuir las variaciones circadianas las intervenciones quirúrgicas, la obtención y disección del tejido cerebral y los ensayos experimentales, siempre fueron realizados entre las 09:00 y 11:00 h.

A cada una de las madres gestantes de ambos grupos D y C se les identificó el tapón vaginal durante el período de apareamiento y a los fetos provenientes de estas madres se les midió la longitud céfalo-sacra, ambos métodos sirvieron para determinar la edad gestacional. Además a las crías de los grupos D y C, se les efectuó curvas de peso corporal, cerebral y de la longitud céfalo-sacra.

III.1. METODOS ESTADISTICOS

El cálculo de las constantes cinéticas se efectuó mediante un programa de computación Rosfit, descrito por Greco y col (162), el cual valora las constantes por una regresión no lineal de la ecuación de Michaelis-Menten (155) y pondera estadísticamente cada uno de los puntos de la curva de saturación. El análisis de varianza mostró homogeneidad de los grupos de datos, por lo que para la significación de la diferencia entre grupos de datos, se utilizó la prueba t Student, para datos independientes con un nivel de significación de $p < 0.05$ (234).

III.2. ENSAYOS BIOQUIMICOS

III.2.1. ACTIVIDAD DE LA TRIPTOFANO-5-HIDROXILASA

La actividad de la enzima, se determinó por el método espectrofluorométrico de Gal y col (235). El tejido cerebral se homogeneizó a 1425 rpm, durante un minuto, en una solución amortiguadora de tris acetato de sodio 50 mM, pH 7.6 más 10^{-3} M de mercaptoetanol en una relación volumen/peso (V/P) de 3:1; mediante

un homogeneizador Thomas de émbolo de teflón con 0.15 mm de tolerancia en su diámetro. El homogeneizado se centrifugó en una centrífuga Sorvall RC 5C a 30,000 x g, durante 20 minutos a 4°C. La pastilla del tejido obtenida fue descartada, se midió el volumen del sobrenadante el cual se utilizó como fuente de la actividad enzimática.

La reacción se inició al agregar alícuotas del sobrenadante que contenían 1.5 mg de proteína a tubos de borosilicato que fueron previamente preparados con el siguiente medio de incubación: 2-mercaptoetanol 1 mM, pargilina 0.3mM, 6-metil 5,6,7,8 tetrahidrobiopterina (6-MPH₄) 0.16 mM, L-triptofano a concentraciones de 0.02 a 0.4 mM, catalasa 10 ug y tris acetato de sodio 50 mM, pH 7.6 para completar un mililitro de volumen final, este medio sirvió para la determinación de las curvas de saturación de la enzima. Además a otras muestras obtenidas en forma similar se les efectuó activación de la enzima con ATP 0.5 mM, MgCl₂ 8 mM y CaCl₂ 0.1 mM, que fueron añadidos al anterior medio de incubación. En cada ensayo se incluyeron: a) muestras del mismo volumen de sobrenadante incubado sin sustrato, para corregir por los 5-hidroxiindoles endógenos. b) muestras conocidas de 5-HT (100 ng), para determinar el porcentaje de 5-HT perdida durante el procedimiento bioquímico (estándar interno), c) tubos blancos sin la enzima para medir la fluorescencia inespecífica de los reactivos.

Después de 30 minutos de incubación a 37°C en un baño metabólico (Dubnoff), con agitación constante, la reacción enzimática se paró por desnaturalización térmica de las proteínas a 100°C durante 5 minutos, la mezcla fue transferida a tubos de

polipropileno. Los tubos de la reacción se lavaron con un mililitro de agua tridestilada, la cual se añadió a la mezcla de incubación. Las proteínas desnaturalizadas se separaron por centrifugación en una centrifuga Sorvall RC 5C a 7,000 x g, durante 10 minutos a 4°C. 0.5 ml de este sobrenadante fue transferido a tubos de borosilicato que contenían 0.1 ml de una solución de cisteína al 1%, se les añadió 1.15 ml de HCl 10 N, se agitó vigorosamente en un agitador Vortex y para obtener la fluorescencia se les agregó 0.5 ml de ortoftaldialdehído (OPT) al 0.004 % V/P en HCl 10 N y se calentaron las muestras a 80°C durante 15 minutos.

Al enfriarse los tubos de la reacción enzimática a temperatura ambiente, la fluorescencia se midió en un espectrofluorómetro Aminco Bowman a 470 nm de emisión y 360 nm de activación. La actividad de la enzima fue expresada como la cantidad de 5-hidroxiindoles producidos en nanomoles por miligramo de proteína por hora (actividad específica).

III.2.2. OBTENCIÓN DE SINAPTOSOMAS CEREBRALES

La obtención de sinaptosomas del tejido cerebral fue mediante la técnica de Kurokawa y col (233). El tejido encefálico fue lavado en una solución de manitol 0.3 M, EGTA 0.2 mM y BSA 1 mg/ml de solución. Después el tejido fue homogeneizado a 1425 rpm durante un minuto en la misma solución, en una relación de V/P de 10:1, mediante un homogeneizador Thomas de émbolo de teflón con 0.15 mm de tolerancia en su diámetro. El homogeneizado se centrifugó en una centrifuga Sorvall RC 5C a 600 x g, durante 10 minutos a 4°C, la pastilla del tejido fue descartada y la fracción

sinaptosomal-mitocondrial-cruda se obtuvo al centrifugar el sobrenadante a $10,000 \times g$, 10 minutos a 4°C . Después de la centrifugación, el sobrenadante fue descartado y la pastilla del tejido encefálico fue resuspendido en 6 mililitros de una solución de manitol a 0.3 mM, EGTA 0.2 mM y BSA 1 mg/ml de solución, de los cuales un mililitro fue colocado cuidadosamente en un gradiente discontinuo de ficoll 5-13 % en sacarosa 0.35 M. Una hora antes fueron preparados los gradientes de ficoll, los cuales permanecieron en reposo durante este tiempo. Fueron utilizados tubos con una capacidad de 4 ml en donde fueron colocados los gradientes en una cantidad de 1.5 ml de cada uno de ellos.

Los tubos con las muestras fueron centrifugados en una ultracentrifuga Beckman L5-75 y el rotor SW 56 a $40,000 \times g$, durante 20 minutos a 2°C . Después de esta centrifugación la fracción sinaptosomal fue obtenida de la interfase 5-13 de los gradientes de ficoll. Esta pastilla fue diluida en 20 ml de una solución amortiguadora de tris-HCl 0.1 M, pH 7.4, se centrifugó a $12,000 \times g$, 10 minutos a 4°C . La pastilla final fue resuspendida en 3 ml de una solución amortiguadora de tris acetato de sodio 50 mM, pH 7.6. Estos sinaptosomas sirvieron como fuente de la actividad de la TS-H.

III.2.3. DETERMINACION DE PROTEINAS TISULARES

Las proteínas fueron cuantificadas por el micrométodo espectrofotométrico descrito por Lowry y col (236), usando albúmina bovina como estándar. El tejido cerebral se diluyó 40 veces; de esta dilución se tomaron alícuotas de 0.05 ml, en ellas se inició la reacción al agregarles 0.5 ml del reactivo A; este

consta de los siguientes componentes: 0.5 ml de CuSO_4 1%, 0.5ml de tartrato de sodio y potasio al 2% en 50 ml de Na_2CO_3 2% diluido en NaOH 0.1 N. La mezcla de la reacción se agitó vigorosamente y se dejó en reposo a temperatura ambiente. Después de 10 minutos se agregó 0.05 ml del reactivo B: el reactivo B es reactivo de Folin diluido 1:1 con agua tridestilada volumen a volumen (V/V): la muestra se agitó y a los 30 minutos se midió el color en un espectrofotómetro Varian DM 590 a 700 m μ .

En cada ensayo se incluyó una curva estándar de cantidades conocidas de albúmina y las concentraciones de proteínas cerebrales se expresaron en microgramos por microlitro del sobrenadante para la actividad de la enzima y miligramos por gramo de tejido cerebral.

IV. RESULTADOS

IV.1.1. SOMATOMETRIA

En la figura 4, se muestran las curvas de desarrollo del peso corporal en los grupos D y C. Como puede verse en el grupo C el patrón de desarrollo fue ascendente desde el día 17 de la gestación al día 10 de vida extrauterina. En la misma figura se puede observar el patrón de desarrollo en el grupo D, fue similar al del grupo C; sin embargo el grupo D presentó una disminución significativa del peso corporal, con un déficit de 13, 15 a los 17 y 19 días de gestación y de 27, 27, 35, 40 y 55 % a las edades de 1, 2, 3, 6 y 10 días de vida postnatal comparado con el peso de las ratas sin déficit nutricional, grupo C ($p < 0.05$).

En relación a las curvas de la longitud céfalo-sacra en ambos grupos D y C, se muestran en la figura 5. El patrón de desarrollo

en el grupo C fue con un ascenso mínimo del día 17 al 19 de la gestación (p NS), después el crecimiento fue rápido del día 19 de gestación hasta el primer día de vida postnatal (p < 0.01). Posteriormente se observó un aumento progresivo hasta el día 10 de la vida extrauterina (p < 0.05). En la misma figura se puede ver el comportamiento de la curva en los desnutridos, ésta fue similar al grupo C, sin embargo existió una disminución significativa de la longitud céfalo-sacra a partir del día 19 de la gestación hasta el décimo día de vida postnatal, el déficit fue de 36% y de 14.3, 19.6, 19.3, 16.3 y 12.6 % a las edades de 1, 2, 3, 6 y 10 días de vida postnatal respectivamente en comparación con el grupo C (p < 0.05).

Con respecto a los patrones de crecimiento pre y postnatal del peso cerebral en los grupos D y C, se muestran en la figura 6. En el grupo C, el patrón fue ascendente desde el día 17 de la gestación hasta el día 10 de la vida extrauterina. En la misma figura se ilustra el patrón de desarrollo que mostró el grupo D, fue similar al grupo C, además se observó una disminución significativa del crecimiento desde el día 17 de la gestación al décimo día de vida extrauterina, el déficit en el peso cerebral fue de 13.1, 16.3 a los 17 y 19 días de gestación y de 15, 14.1, 15.8, 15 y 19.3 % a los días 1, 2, 3, 6 y 10 días de vida postnatal en el grupo D con respecto a las ratas del grupo C (p < 0.05).

En la tabla I se pueden observar los incrementos de peso corporal, peso cerebral y longitud céfalo-sacra en los grupos D y C. En relación a los incrementos del peso corporal en el grupo D durante el período prenatal, fue mayor que el del grupo C (p <

0.05). Este incremento de peso corporal en el grupo D durante el periodo postnatal inmediato fue menor en comparación al que presentó el grupo control de alimentación ($p < 0.05$). Sin embargo los incrementos totales observados tanto en la etapa prenatal como la postnatal inmediata fueron similares en ambos grupos (p N.S.). Estos incrementos de peso corporal en el grupo desnutrido fueron de 86% durante la vida prenatal, de 35% en la vida postnatal inmediata y de 94% durante todo el periodo estudiado, y en el grupo control de 78, 60 y 92%, respectivamente. En lo concerniente a los incrementos de la longitud céfalo-sacra en el grupo D, fue menor durante la vida prenatal en relación al grupo C ($p < 0.05$). Este incremento durante la vida postnatal inmediata y el incremento total fue similar en ambos grupos D y C (p N.S.). Los incrementos en el grupo D fueron de 39, 18 y 68%, y en el grupo C de 58, 17 y 70%, respectivamente. En la misma tabla se pueden ver los incrementos observados en el peso cerebral, en el grupo D, fue menor en relación al grupo C ($p < 0.01$). Además los incrementos observados en ambos grupos D y C fueron similares tanto en el periodo postnatal inmediato como en todo el periodo estudiado (p N.S.). Estos incrementos del peso cerebral en el grupo D fueron de 19% en la vida fetal, 75% en la vida postnatal inmediata y un incremento total de 84% y en el grupo C de 41, 72 y 85%, respectivamente.

En relación al índice peso cerebral/peso corporal en el grupo D, se observó una disminución desde el día 17 de gestación al primer día de vida postnatal de 0.168 a 0.036 y a partir del día dos al décimo día de vida postnatal aumentó el índice de 0.037 a 0.067 como se puede ver en la tabla II. También en el grupo C, se

observó el mismo patrón, con una disminución durante la etapa prenatal de 0.071 a 0.026 y un incremento en la vida postnatal de 0.026 a 0.040. El índice peso cerebral/peso corporal fue siempre mayor en el grupo D que en el grupo C ($p < 0.05$).

IV.1.2. PROTEINAS CEREBRALES

El patrón de desarrollo de las proteínas cerebrales en el grupo D, se observó un retraso significativo de la concentración ($p < 0.01$), desde el período prenatal hasta los 10 días de vida postnatal, como se ilustra en la figura 7, comparado con el grupo C. Además se observó que la concentración de proteínas cerebrales en las ratas del grupo D a la edad de dos días de vida postnatal, fue alcanzado por el grupo C a la edad prenatal de 19 días.

IV.1.3. ACTIVIDAD DE LA TRIPTOFANO-5-HIDROXILASA

La actividad específica de la T5-H cerebral, expresada en nM de 5-hidroxiindoles/mg de proteína/hora, mostró en el grupo C, un patrón de desarrollo ascendente que de 0.2 nM a los 17 días de gestación alcanzó una actividad de 0.5nM a la edad postnatal de 10 días, los valores en el adulto fueron de 1nM, ver figura 8. En la misma figura se puede ver que la curva de desarrollo en el grupo D, mostró un aumento ontogénico de 0.3nM a los 17 días de gestación a 0.6nM a los 10 días de vida extrauterina, pero la actividad se aceleró desde el período fetal, alcanzando a las 24 horas de vida extrauterina la actividad de los controles a los 10 días. La actividad de la T5-H estuvo siempre significativamente elevada en el grupo D comparada con sus controles ($p < 0.05$).

IV.1.4. CINÉTICA DE LA TRIPTOFANO-5-HIDROXILASA

Las figuras 9, 10, 11 y 12, muestran las características morfológicas que presentaron las curvas de saturación de la actividad de la T5-H en ambos grupos D (+) y C (o) a las diferentes edades estudiadas. Se tratan de curvas clásicas de saturación del tipo de Michaelis-Menten. También en las mismas figuras se puede ver la transformación algebraica, tomando los recíprocos de ambos miembros de la ecuación, tal representación corresponde a la de Lineweaver-Burk. De estas curvas fueron calculadas las constantes cinéticas K_m y V_{max} de la T5-H que se muestran en las figuras 13 y 14.

En cuanto a la K_m , en el grupo C, mostró un patrón de desarrollo con dos elevaciones, la primera de 0.111 mM a los 17 días de gestación a 0.193 mM a la edad de 24 horas de vida postnatal ($p < 0.05$). La segunda de 0.123 mM a los 3 días a 0.184 mM a los 10 días de vida extrauterina ($p < 0.01$), con valores en el adulto de 0.265 ± 0.023 mM ver figura 13. En la misma figura se puede apreciar el patrón de desarrollo de la K_m en el grupo D, fue muy parecido al grupo C, la primera elevación de 0.077 mM a la edad de 17 días de vida intrauterina a 0.112 mM a la edad de dos días de vida postnatal ($p < 0.05$). La segunda elevación fue de 0.072 mM a los 3 días a 0.120 mM a los 10 días de vida extrauterina ($p < 0.01$). Sin embargo tanto en el período fetal como en el postnatal inmediato, la constante de afinidad fue siempre significativamente más baja, en comparación a los del grupo C ($p < 0.05$).

La figura 14, muestra la velocidad máxima de la reacción de la T5-H en los grupos D y C. En el grupo C, el patrón

de desarrollo fue con dos elevaciones, la primera de 0.739 nM a los 17 días de gestación a 1.296 nM a la edad de 2 días de vida postnatal ($p < 0.05$) y la segunda de 1.081 nM a los 3 días a 1.535 nM a los 10 días de vida extrauterina ($p < 0.01$), con valores en el adulto de 3.338 ± 0.030 nM. En la misma figura se puede observar el patrón de desarrollo de la V_{max} en el grupo D, fue parecido al grupo C, la primera elevación de 0.723 nM a los 17 días de vida fetal a 1.351 nM a los 2 días de vida postnatal ($p < 0.01$). La segunda de 1.180 nM a los 3 días a 1.594 nM a los 10 días de vida postnatal ($p < 0.05$). Sin mostrar diferencias estadísticas entre los dos grupos a las diferentes edades estudiadas.

IV.1.5. ACTIVACION DE LA TRIPTOFANO-5-HIDROXILASA POR SEGUNDOS MENSAJEROS

La activación de la T5-H por ATP, Mg^{++} y Ca^{++} en los grupos D y C se muestran en la figura 15. Como puede verse los patrones de desarrollo de la actividad de la enzima sin activación en los dos grupos son similares a los observados en la figura 8; también se confirmó que los desnutridos tienen una mayor actividad de la enzima que los controles a las diferentes edades estudiadas ($p < 0.01$). En la misma figura, también pueden observarse las curvas de desarrollo de la actividad de la enzima activada en ambos grupos Dp y Cp. El patrón de desarrollo fue similar en los grupos Dp y Cp en relación a los grupos D y C, sin embargo la actividad de la enzima siempre estuvo significativamente elevada en los grupos activados Dp y Cp ($p < 0.01$). Además se puede ver que la actividad

de la enzima fosforilada en los desnutridos siempre estuvo significativamente elevada en relación a la de los grupos controles fosforilados y al grupo desnutrido no fosforilado, tanto en la vida prenatal como postnatal inmediata ($p < 0.05$).

La tabla III muestra la actividad de la T5-H en sinaptosomas obtenidos del encéfalo de los grupos D y C, activada mediante forskolina y fosfatidilinositol. Como era de esperarse, la actividad de la enzima no activada en los desnutridos es significativamente mayor a los controles ($p < 0.01$), pero cuando la enzima es activada, aumenta su función en los grupos D y C en relación a la actividad no fosforilada ($p < 0.05$). Sin embargo la actividad que presenta la enzima en sinaptosomas procedentes del encéfalo de ratas con desnutrición ontogénica activados es la mayor en relación a la observada en los grupos D no activados y C fosforilados ($p < 0.05$).

V. DISCUSION

Se sabe que la desnutrición produce una serie de alteraciones a nivel corporal, que son englobados en estructurales, metabólicas y bioquímicas (8, 19-21, 237-249). Estos cambios han sido extensamente evaluados por diferentes autores en el mundo y existe consenso general que los trastornos del crecimiento y desarrollo son los más marcados durante la evolución de la enfermedad, cuya gravedad esta ligada al tiempo de duración de la privación nutricional (14, 15, 20, 250-255). Nuestros resultados de las diferentes medidas somatométricas realizadas a los animales en este estudio, confirman una vez más los datos anteriores. Que la desnutrición produce una modificación en el crecimiento y

desarrollo físico, lo que constituye un hallazgo universalmente observado. En casos extremos de desnutrición se produce una verdadera detención del crecimiento, que cuando es intensa y prolongada, el retraso del desarrollo físico se convierte en regresión de algunas medidas somatométricas, lo que implica un desequilibrio de los diversos mecanismos homeostáticos que regulan el crecimiento (256-260).

También se confirmó que el peso corporal es una medida que se altera con más facilidad que la talla. Estos hallazgos son similares a los observados en los humanos desnutridos, que al reanudar su crecimiento por una adecuada terapia nutricional, cuando más pequeños son se acentúa más la disminución en los incrementos diarios de peso y talla, o sea, que la edad de desarrollo óseo previamente alcanzada no permite incrementos mayores del crecimiento (15, 250, 255, 258, 260).

En los animales desnutridos observamos que los incrementos en estos parámetros son diferentes en las etapas prenatal y postnatal. El incremento del peso corporal fue mayor en la etapa prenatal que la postnatal en los desnutridos, en relación a los controles. Sin embargo es interesante mencionar que los desnutridos mostraron incrementos finales similares a los controles, por lo tanto se puede concluir, que a pesar de incrementos similares a los controles, persistió un déficit ponderal y una alteración de la composición corporal en el grupo desnutrido. Este déficit no se recupera, a pesar de que los diferentes mecanismos metabólicos de compensación fetales y maternos, permiten continuar el crecimiento y desarrollo del feto durante la vida intrauterina (261).

Los incrementos de la longitud céfalo-sacra en los animales desnutridos fueron menores en la etapa prenatal que en la postnatal, en relación a los animales sin desnutrición, el incremento total de ambas etapas fue similar en ambos grupos, desnutridos y controles, indicando una vez más que se altera la velocidad de desarrollo de este parámetro, pero persiste un déficit significativo en los grupos desnutridos. Dato que se puede observar en las curvas de desarrollo de la longitud céfalo-sacra. El deterioro de la talla se inició en la última parte de la vida intrauterina, lo que corrobora que cuando la desnutrición se prolonga, la deceleración de la talla se presenta.

Otra alteración importante que la desnutrición temprana gestacional produce es sobre el crecimiento y desarrollo del SNC. Durante este período el tejido cerebral es vulnerable a factores epigenéticos, como la desnutrición, cuyo grado de severidad está en estrecha relación al inicio durante la vida intrauterina. Cuando la desnutrición comienza en etapas tempranas de la gestación, el índice de división celular disminuye, si la desnutrición se prolonga, además de la disminución del número de células también disminuye la concentración de proteínas por célula (32, 33, 261). Nuestros resultados confirman tal fenómeno, que durante la evolución de la desnutrición, existen alteraciones de la composición bioquímica cerebral, observamos que los animales desnutridos tuvieron menor concentración de proteínas cerebrales. Es posible que los diferentes mecanismos de compensación cerebral fueron insuficientes para corregir este déficit y sólo son capaces de permitir la síntesis mínima necesaria de proteínas para el desarrollo y crecimiento celular durante la vida intrauterina (258-260, 262, 263)

Además de los cambios generales, la desnutrición temprana también es capaz de producir cambios metabólicos cerebrales más específicos. Uno de estos cambios metabólicos, es el que se ha comprobado para el sistema serotoninérgico en el cerebro de rata durante el desarrollo, se ha visto que la 5-HT cerebral se encuentra elevada en diferentes tipos de desnutrición: temprana, proteínica-calórica y durante el desarrollo postnatal. Este aumento está ocasionado por una elevación en la fracción libre del L-Trp plasmático (108-111).

Resultados anteriores de nuestro laboratorio también demuestran esta alteración en el metabolismo de la 5-HT cerebral en ratas con desnutrición en la lactancia y en la edad adulta (52-55); así mismo en forma reciente se ha confirmado esta alteración desde la etapa fetal, hay una aceleración de la vía biosintética de la serotonina en el cerebro desnutrido, precedida de un aumento de la concentración del L-Trp (56-59). El aumento de la actividad de la enzima observado y su persistencia, sugiere fuertemente una modificación funcional de la T5-H y de los mecanismos que la mantienen activada. Se sabe que en su activación interviene un sistema de fosforilación de la proteína enzimática con participación de una proteína cinasa II dependiente de Ca^{++} /calmodulina (128, 177-179).

La hipótesis de este estudio fue que la aceleración de la síntesis de 5-HT cerebral en ratas desnutridas tempranamente sea debida a una modificación del comportamiento cinético de la enzima limitante, T5-H y a un cambio en el mecanismo de activación de la enzima en condiciones de fosforilación durante la etapa perinatal en ratas desnutridas.

Los resultados de este trabajo confirman una vez más esta aceleración de la cadena biosintética de la 5-HT cerebral, ya que observamos en la rata desnutrida una elevación de la actividad de la T5-H (51-59). Además el análisis de las curvas de saturación de la enzima con L-Trp, nos permite confirmar nuestra hipótesis, de que la desnutrición ontogénica es capaz de producir una alteración de la cinética de la T5-H; ya que demostramos un aumento de la afinidad (valor menor de Km) por su sustrato, L-Trp, sin ninguna alteración significativa de la Vmax de la enzima, en el encéfalo desnutrido.

La disminución de la Km de la enzima, observada en los desnutridos, plantea también la interrogante de que la T5H durante el desarrollo pre y postnatal inmediato en el cerebro, pierda su papel de enzima limitante en la síntesis del neurotransmisor. Resultados previos de nuestro laboratorio (56-59), han mostrado un aumento de la concentración cerebral de L-Trp en la rata desnutrida durante la gestación, este aumento del sustrato es menor a la constante de afinidad observada en los desnutridos en este trabajo, por tal razón podemos afirmar que la T5H durante estas etapas del desarrollo del SNC, mantiene su papel de enzima limitante, tal como se ha demostrado en el cerebro de la rata normal adulta (119, 121, 150).

Este aumento de la afinidad de la T5-H por su sustrato explica, en parte, el aumento de la actividad enzimática observada en los cerebros desnutridos y por tratarse de la enzima limitante, la aceleración en la síntesis del neurotransmisor.

El cambio de la afinidad de la enzima puede ser explicado de diferentes maneras: entre estas se encuentran el efecto alósterico

de una sustancia química, que se conoce como efector, que al unirse con la molécula de la enzima, en un sitio diferente al sitio activo, produce un aumento o disminución de la actividad de la enzima, como el caso de las coenzimas o metales que son indispensables para el inicio de la actividad de algunas enzimas. Estos compuestos desempeñan su función en el mecanismo catalítico, permaneciendo inalterados al final del proceso. Algunos de ellos pueden encontrarse íntimamente ligados a la enzima, en cuyo caso se denominan grupos prostéticos (156-158, 264).

Existe evidencia experimental que la T5-H, tiene algunas características de regulación de la actividad enzimática mediante cambios alostéricos. Los cuales fueron observados cuando la enzima fue incubada con una proteína activadora (265, 266). Recientemente esta proteína activadora ha sido aislada, se ha denominado proteína 14-3-3. La cual tiene dos subunidades polipeptídicas con un peso molecular de cada una de las cadenas de 29 y 32 Da respectivamente, con una relación de las cadenas de 9:1 en la molécula de la proteína. Estas características bioquímicas han sido demostradas mediante la utilización de técnicas con anticuerpos contra la proteína y análisis de inmunoblot en papel de nitrocelulosa (265, 266).

La proteína 14-3-3, que activa a la T-5H, requiere para la activación de la enzima la presencia de una proteína cinasa II dependiente de Ca^{++} /calmodulina (128, 177-179). Esta proteína activadora se une a la enzima y produce un cambio conformacional que es el inicio de una reacción de fosforilación de la proteína enzimática y el resultado es un aumento de la actividad (265, 266). En este trabajo nosotros observamos un aumento de la

actividad de la enzima en las preparaciones de cerebro procedentes de ratas normales y desnutridas bajo nuestras condiciones experimentales de activación, la enzima se fosforila y es probable que esta reacción se lleve a cabo mediante la participación de la proteína cinasa II dependiente de Ca^{++} /calmodulina, como fue referido previamente. Además demostramos que las preparaciones del tejido cerebral procedentes de ratas desnutridas durante la gestación desarrollaron una mayor capacidad de fosforilar en relación a la enzima procedente de ratas normales.

Algunas enzimas alostéricas responden a la unión de un modulador con un cambio en el valor de K_m por su sustrato, sin que varíe la V_{max} ; un modulador negativo producirá entonces un incremento de la K_m y un modulador positivo un descenso de dicho valor. Las enzimas alóstericas que responden a los moduladores positivos y negativos con cambio en el valor de K_m , pero sin que varíe el valor de V_{max} reciben, a veces, el nombre de enzimas K. Inversamente las enzimas alostéricas que muestran cambio en el valor de V_{max} en respuesta al modulador sin que varíe el valor de K_m , se llaman enzimas M. Esta característica de disminución de la K_m de las enzimas alostéricas, es semejante a la que observamos en el cerebro de la rata desnutrida durante la gestación, el aumento de la afinidad de la T-5H por su sustrato explica, en forma parcial la aceleración de la vía biosintética de la 5-HT cerebral.

El término K_m se emplea para designar únicamente la concentración de sustrato con la que se obtiene la mitad de la velocidad máxima; este valor no se puede emplear para calcular la velocidad inicial de una enzima alostérica. En nuestros resultados nos llama la atención que la morfología de las curvas de cinética

de la T-5H son del tipo que requiere la hipótesis de Michaelis-Menten y no del tipo descrito para las enzimas alostéricas, y aunque el comportamiento cinético de las enzimas alostéricas debe ser valorado por otros métodos matemáticos como el método de Hill (267), en nuestro caso se empleó el clásico de Michaelis-Menten. Esto podría explicarse porque la capacidad de una enzima alostérica, para ser activada o inhibida por sus moduladores específicos, a veces, puede ser abolida, sin que se lesione su actividad catalítica, por exposición con un agente químico que produzca una modificación del centro modulador. Se dice entonces, que la enzima se ha desensibilizado. Una enzima desensibilizada no sólo pierde su sensibilidad frente a los moduladores, sino que puede incluso mostrar una cinética normal del tipo de Michaelis-Menten, como se observó en la morfología de las curvas de saturación de la T-5H con L-Trp, en las diferentes edades estudiadas. Estos resultados no descartan que la enzima, como lo menciona Yamauchi (265) e Ichimura y col (266) sea una enzima que pueda tener un comportamiento alostérico.

Otro posible mecanismo que podría explicar los cambios en la K_m es la relación de enzima-sustrato, en la que participa el fenómeno de cooperativismo. Las consecuencias de la cinética de unión cooperativa del sustrato a la T-5H, es análoga a aquellas que se producen por la fijación cooperativa del oxígeno a la hemoglobina, a concentraciones bajas de sustrato, el efector alostérico es un inhibidor eficaz. De este modo la regulación es más eficiente en el momento en que la necesidad es máxima, es decir, cuando la concentración intracelular del sustrato es baja. Cuando se comienza a disponer de más sustrato, es menos necesaria

una regulación rigurosa. Pero cuando la concentración del sustrato se eleva, el grado de inhibición disminuye y se forma una cantidad mayor de producto. Al igual que la hemoglobina, se produce una curva sigmoidea de saturación del sustrato en presencia del inhibidor, significa también que cambios pequeños en la concentración del sustrato se traducen en grandes modificaciones de la actividad. Así se logra un control sensible de la actividad catalítica mediante cambios pequeños en la concentración del sustrato (268,269).

Esta característica de cooperatividad enzimática de la T-5H, ha sido ya descrita por Hamon y col (270) en rebanadas de tejido encefálico, procedente de ratas normales tratadas con metiotepina, que es un antagonista de los autorreceptores $5-HT_{1A}$, localizados en el soma de las neuronas serotoninérgicas, la función principal de estos receptores es la de participar activamente en el mecanismo de autorregulación de la liberación del neurotransmisor por las neuronas, en los núcleos del rafe del tallo cerebral (140, 146, 169). Dicha maniobra experimental produjo un aumento en la actividad de la T-5H y en la síntesis de 5-HT cerebral. Además se observó que la morfología de la curva de saturación de la enzima con $^3H-L-Trp$ mostró una línea recta con el método de Lineweaver-Burk, a diferencia de la curva observada en el tejido de cerebral normal, que fue una parábola, lo que sugiere que hay un efecto cooperador de la T-5H (270).

A pesar de que la morfología de la curva de saturación de la actividad de la T-5H con $^3H-L-Trp$ en el tejido cerebral tratado con metiotepina, fue de una línea recta, la enzima mostró un aumento significativo de la afinidad por su sustrato, sin cambio

en la V_{max} (270). Estos resultados del comportamiento cinético de la enzima en el encéfalo tratado con antagonistas de los autorreceptores $5-HT_{1A}$, son semejantes a los que observamos en el cerebro desnutrido tanto en la etapa fetal como postnatal inmediata. Estos hallazgos bioquímicos de la enzima nos permiten plantear la posibilidad de que la T-5H, durante etapas tempranas del desarrollo del SNC, tenga algunas características de una molécula que participe del fenómeno de cooperatividad.

Una posibilidad más para explicar la modificación de la afinidad observada en nuestros resultados es la modificación covalente reversible de la actividad catalítica de las enzimas por la adherencia de un grupo fosfato. Las enzimas que experimentan esta modificación covalente por fosforilación con modulación concomitante de su actividad, se denominan enzimas interconvertibles (268, 269). Las enzimas interconvertibles existen en dos condiciones de actividad, unas de eficacia catalítica elevada y otras de baja eficacia. Dependiendo de la enzima de que se trate, el catalizador más activo puede ser la fosfoenzima o la que no posee grupo fosfato. Se conoce que la fosforilación de la proteína enzimática generalmente se lleva a cabo en residuos de serina, formando el residuo O-fosfoseril o en algunos ejemplos, un residuo de tirosil es fosforilado a la forma O-fosfotirosil. Aunque una enzima interconvertible puede contener muchos residuos de serina o tirosina, sin embargo la fosforilación es sumamente selectiva y ocurre sólo en un pequeño número de sitios posibles; probablemente estos sitios no formen parte del sitio catalítico, cuando menos en los que se refiere a la estructura primaria y de este modo constituyen otro ejemplo de un

sitio alostérico (268, 269).

Estos sitios de fosforilación han sido ampliamente estudiados en la actividad de la tirosina hidroxilasa (TH), enzima limitante de la cadena biosintética de las catecolaminas (271-273), se localizan en los residuos de serina 8, 19, 31 y 40 de la cadena proteica (274-276). Si el sitio de serina 19 es fosforilado, se produce un aumento de la V_{max} de la TH, en esta reacción química interviene la asociación de dos proteínas que son: Proteína cinasa II dependiente de Ca^{++} /calmodulina y una proteína activadora (277, 278). Mientras la fosforilación del residuo de serina 40, produce una disminución de la K_m de la enzima por su cofactor que es la BH_4 , en esta reacción de fosforilación participa una proteína cinasa A dependiente de AMPc o bien una proteína cinasa C dependiente de Ca^{++} /fosfatidilserina (278-281).

La modificación covalente de la TH por fosforilación ha sido observada en varias condiciones experimentales que son: Incubación de homogeneizados de tallo cerebral con ATP, Mg^{++} y Ca^{++} (171-173). Estimulación eléctrica de las neuronas serotoninérgicas de los núcleos del rafe en el tallo cerebral (282-286). Incubación de rebanadas de tejido cerebral en un medio extracelular rico en potasio o en un medio libre de sodio (287-289). La utilización del ionóforo catiónico A23187 (290), y la utilización de medicamentos del tipo de verapamil, tetracaína y flufenazina (291). Estos métodos tienen la peculiaridad de producir una elevación intracelular de la concentración de Ca^{++} libre en las neuronas serotoninérgicas y concomitantemente el inicio de los mecanismos de fosforilación de la proteína enzimática, y un aumento de su actividad. Esta fosforilación ha sido comprobada

mediante el uso de técnicas con anticuerpos contra la enzima y análisis de inmunoblot en papel de nitrocelulosa (179). Estos métodos bioquímicos, han permitido conocer el peso molecular de la enzima, que es de aproximadamente 260 KDa, cuya estructura polipeptídica está formada por un tetramero. Además han permitido conocer la capacidad que tiene la enzima para incorporar los grupos fosfatos a la molécula, se sabe que la enzima incorpora un grupo fosfato por cada ocho subunidades de la enzima o sea 2 Moles de enzima nativa (179). La unión del grupo fosfato, produce un aumento de dos veces la actividad de la enzima. Así mismo se confirmó que en esta reacción de fosforilación de la T5-H, participa una proteína cinasa II dependiente de Ca^{++} /calmodulina (128, 177-179).

Los resultados de este trabajo confirman la modificación covalente de la T5-H, mediante fosforilación de la proteína enzimática, ya que al incubar homogeneizados de encéfalos de ratas con ATP, Mg^{++} y Ca^{++} , demostramos un aumento de la actividad de la enzima tanto en el cerebro de rata normal como desnutrida, es factible que bajo nuestras condiciones experimentales, la fosforilación de la enzima se lleve a cabo por la participación de la proteína cinasa II dependiente de Ca^{++} /calmodulina.

Así mismo, nuestros resultados apoyan el efecto activador de la forskolina y del fosfatidilinositol sobre la actividad de la T5-H. Ambos sistemas activan a la enzima en forma semejante a la TH (279, 281). La forskolina estimula la subunidad catalítica de la adenilil ciclase, como reacción inicial para la formación de AMPc y activar a la proteína cinasa A dependiente de este nucleótido (182, 279, 292), el PI produce IP_3 y DG, el primero

tiene la función de aumentar la concentración intracelular de Ca^{++} libre y el segundo activa a la proteína cinasa C. Estos sistemas de segundos mensajeros producen fosforilación de la enzima, lo que explica, en parte, el aumento de la actividad observada en el cerebro desnutrido. Este cambio en el comportamiento de la T5-H, por fosforilación, son parte de los mecanismos de regulación de la actividad de una enzima que se presentan en forma rápida como respuesta a la estimulación externa, con una duración menor de 24 horas (163,164). Este estímulo produce un aumento de la actividad enzimática y como resultado una elevación en la síntesis del producto final, como observamos en este trabajo.

Además nuestro estudio confirma (56, 59) un aumento de la actividad de la T-5H en forma crónica y como consecuencia una elevación de la síntesis del neurotransmisor, 5-HT, en el período del desarrollo estudiado, producido por desnutrición temprana; así mismo observamos que la enzima de los individuos desnutridos activada por estos sistemas, tiene una respuesta significativamente mayor que los controles. El hecho de que la enzima en condiciones de fosforilación sea significativamente más activa en el encéfalo de rata desnutrida, plantea la posibilidad de que la desnutrición ontogénica induzca un aumento de las moléculas de la enzima por un aumento en su síntesis. Este mecanismo de regulación de la actividad de una enzima se ha observado que se presenta cuando el estímulo externo tiene una duración mayor de 24 horas (163,164), como es el caso de nuestro estímulo epigenético crónico, ya que la desnutrición proteínica-calórica se inició durante la vida intrauterina y se continuó durante el período postnatal inmediato. Este hallazgo del

aumento de la actividad de la T-5H en forma crónica nos proporciona otro elemento más del posible mecanismo implícito en la activación de la T-5H relacionado a la síntesis del neurotransmisor. Este trabajo representa un ejemplo de la importancia de la nutrición temprana en el desarrollo de la síntesis de un neurotransmisor cerebral y en sus mecanismos de regulación a través de la inducción de cambios epigenéticos en la función de una proteína enzimática clave.

En conclusión, el aumento de la afinidad de la enzima y su mayor capacidad de fosforilación, nos permite plantear la hipótesis de que la desnutrición ontogénica produce un cambio estructural del complejo enzimático de la T-5H durante el desarrollo cerebral, como parte del mecanismo de aceleración de la síntesis del neurotransmisor, 5-hidroxitriptamina. Las consecuencias funcionales a nivel cerebral de este cambio crónico en el metabolismo de un grupo de neuronas específicas del cerebro, están siendo exploradas en nuestro laboratorio.

VI. BIBLIOGRAFIA

1. Peña Ch A, Saenz H C, Cordero E. Síndrome policarenal de la infancia. Rev Med Costa Rica 1948; 2: 170-174.
2. Gómez F, Galván RR, Frenk S. Mortality in second and third degree malnutrition. J Trop Pediatr 1956; 2: 77-85.
3. György P. The late effects of early nutrition. Am J Clin Nutr 1960; 8: 344-345.
4. Cravioto J. Appraisal of the effect of nutrition on biochemical maturation. Am J Clin Nutr 1962; 11: 484-491.
5. Ramos G R, Cravioto J, Navarrete J A. La letalidad en el niño desnutrido. Análisis de 100 casos internados en la sala de nutrición del Hospital Infantil de México. Bol Med Infant Méx 1958; 15: 875,
6. Gold Smith G A. Current status of malnutrition in the tropics. Am J Trop Med Hyg 1974; 22: 756-758.
7. Gómez F. Desnutrición. Bol Med Infant Méx 1946; 3: 543,
8. Ramos GR, Cravioto J. Desnutrición, concepto y ensayo de sistematización. Bol Med Infant Méx 1958; 15: 763,
9. Waterlow JC, Cravioto J, Stephen J. Protein malnutrition in man. Adv Protein Chem 1960; 15: 131,
10. Frenk S, Metcalf J, Gómez F, Ramos GR, Cravioto J Antonowicz I. Intracellular composition and homeostatic mechanisms in severe chronic infantile malnutrition. Pediatrics 1957; 20: 105;
11. Ramos GR, Pérez OB, Mariscal AC, Viniegra CA. La dinámica de la desnutrición. Bol Med Infant Méx 1964; 21: 17,

12. Ramos GR. Desnutrición, un componente del síndrome de privación social. Gac Med Méx 1966; 96: 929,
13. Viniegra CA, Ramos GR. El síndrome de privación social. Ticitl 1966; 6: 3,
14. Cravioto J, Delicardie ER. Malnutrition in early childhood. Food Nutr 1976; 2: 2-11.
15. Ramos GR. La desnutrición infantil en México, sus aspectos estadísticos, clínicos, dietéticos y social. Bol Med Infant Méx 1964; 21: 19,
16. Viniegra CA. La dinámica de la desnutrición. Factores que determinan el estado de nutrición. Bol Med Infant Méx 1964; 21: 19,
17. Cravioto J, Delicardie ER. La desnutrición infantil y el medio ambiente social. Ciencia y Desarrollo (Conacyt) 1977; 13: 63-72.
18. Levitsky DA. Malnutrition and the hunger to learn. En: Levitsky DA, ed. Malnutrition, Environment and Behavior. Ithaca: Cornell University Press, 1979; 161-179.
19. Gómez F, Ramos GR, Cravioto J, Frenk S. Malnutrition and Kwashiorkor. Acta Paediatrica (Uppsala) 1954; 43: 336,
20. Gómez F, Ramos GR, Cravioto J, Frenk S. Malnutrition in infancy and childhood with reference to Kwashiorkor. Advances Pediatrics 1955; 7: 131,
21. Ramos GR. Desnutrición en el niño. Bol Clin Asoc Med Hosp Infant Méx 1961; 1: 2-22
22. Williams CA. A nutritional disease in childhood associated with a maize diet. Arch Dis Child 1933; 8: 432-428.

23. Williams C. Kwashiorkor. A nutritional disease of children associated with a maize diet. *Lancet* 1935; II: 1151-1152.
24. Cravioto J, Delicardie ER. En: Nutrition, the nervous system and behavior. Pan American Health Organization (World Health Organization) Scientific Publication No.251, 1972: 73-94.
25. Tizard J. Early malnutrition, growth and mental development in man. *Br Med Bull* 1974; 30: 169-174.
26. Stoch MB, Smythe PM. 15 year developmental study on effects of severe undernutrition during infancy on subsequent physical growth and intellectual functioning. *Arch Dis Child* 1976; 55: 327-336.
27. Fitzhardinge PM, Steven EM. The small for date infant. II. Neurological and intellectual sequelae. *Pediatrics* 1972; 50: 50,
28. Hill RM, Verniaud WM, Deter RL, Tennyson LM, Retting GM, Zion TE, Vordeman AL, Helms FG, McCulley LB, Hill LL. The effect of malnutrition on the term infant. A 14 year progressive study. *Acta Paediatr Scand* 1984; 73: 382-487.
29. Hack M, Breslaud N. Very low birth weight infants: Effects of brain growth during infancy on intelligence quotient at 3 year of age. *Pediatrics* 1986; 77: 196-202.
30. Hoorweg J, Stanfield JP. The effects of protein-energy malnutrition in early childhood on intellectual and motor abilities in later childhood and adolescence. *Dev Med Child Neurol* 1976; 18: 230-250.
31. Galler J, Ramsey F, Solimano G, Lowell W. The influence of early malnutrition on subsequent behavioral development. II. Classroom behavior. *J Am Acad Child Psychiatr* 1983; 22: 16-22.

32. Enesco M, Leblond CP. Increase in cell numbers as a factor in the growth of the organs and tissues of the young male rat. *J Embryol Exp Morphol* 1962; 10: 530,
33. Winick M, Noble A. Quantitative changes in DNA and RNA and protein during prenatal and postnatal growth in the rat. *Dev Biol* 1965; 12: 451,
34. Kaplan SL, Grumbach MM. Immunoassay for human chorionic growth hormone-prolactin in serum and urine. *Science* 1965; 147: 751,
35. Dunsted M, Dunsted C. On the fetal growth rate. London, Heinemann, 1973; 72-75.
36. Widdowson EM. Harmony of growth. *Lancet* 1970; 69: 901.
37. Cook LN. Reconocimiento intra y extrauterino y tratamiento del crecimiento fetal desviado. *Clin Ped Nort Am* 1977; 429-453.
38. Winick M. Cellular growth in intrauterine malnutrition. *Ped Clin Nort Am* 1970; 17: 69-78.
39. Chase HP, Welch NN, Dabiere CS, Vasan NS, Butterfield LJ. Alterations in human brain biochemistry following intrauterine growth retardation. *Pediatrics* 1972; 50: 403,
40. Sarma MKJ, Roa KS. Biochemical composition of different regions in brains of small for date infants. *J Neurochem* 1974; 22: 671,
41. Vasan NS, Chase HP. Brain glycosaminoglycans (mucopolysaccharides) following intrauterine growth retardation. *Biol Neonate* 1976; 28: 196,
42. Winick M, Rosso P, Waterlow J. Cellular growth of cerebrum, cerebellum, and brain stem in normal and marasmic children. *Exptl Neurol* 1970; 26: 393-400.

43. Guttmie HA, Brown ML. Effects of severe undernutrition in early life on growth, brain size and composition in adult rats. *J Nutr* 1968; 94: 419-426.
44. Chase HP, McKhann GM. The effects of malnutrition on the synthesis of myelin lipid. *Pediatrics* 1967; 40: 551-559.
45. Bourre JM, Morand O, Chanez C, Dumont O, Flexor MA. Influence of intrauterine malnutrition on brain development alteration of myelination. *Biol Neonate* 1981; 39: 96-99.
46. Gambetti P, Gambetti AL, Gonatas KN, Shafer B, Stieber A. Synapses and malnutrition morphological and biochemical study of synaptosomal fractions from rat cerebral cortex. *Brain Res* 1972; 47: 477-484.
47. Cragg GB. The development of cortical synapses during starvation in the rat. *Brain Res* 1972; 95: 143-150.
48. Shrader RE, Ferlatte M, Zeman FJ. Early postnatal development of intestine in progeny of protein deprived rats. *Biol Neonate* 1977; 31: 181-198.
49. Loh KR, Shrader EE, Zeman FJ. Effect of maternal protein deprivation on neonatal intestinal absorption in rats. *J Nutr* 1971; 101: 1663-1671.
50. Srebnik HH. Sex differences in pituitary gonadotrophic function of protein deficient rats. *Endocrinology* 1964; 75: 716-720.
51. Hernández RJ. Developmental pattern of the serotonin synthesizing enzyme in the brain of postnatally malnourished rats. *Experientia* 1973; 29: 1487-1488.

52. Hernández RJ. Ontogenetic malnutrition and interaction of monoamines and enzymes in the brain. En: Usdin E, Kopin JJ, Barchas J. Catecholamines Basic and Clinical Frontiers. Pergamon Press Oxford, 1979; 2: 830-832.
53. Hernández RJ. Effects of malnutrition and quipazine on rat cerebral cortex ATPase activity during development. Dev Neurosci 1980; 3: 277-282.
54. Hernández RJ. Na⁺-K⁺ATPase activity in the brain cortex of rats ontogenetically malnourished and treated with serotonin precursors. Brain Res 1979; 162: 348-352.
55. Hernández RJ. Effects of malnutrition and 6-hydroxydopamine on the early postnatal development of noradrenaline and serotonin content in the rat brain. Biol Neonate 1976; 30: 181-186.
56. Manjarrez GG, Chagoya GG, Hernández RJ. Perinatal brain serotonin metabolism in rats malnourished in-utero. Biol Neonate 1988; 54: 232-240.
57. Manjarrez GG, Chagoya GG, Hernández RJ. Desnutrición intrauterina. II. L-triptofano, triptofano-5-hidroxilasa y serotonina en el cerebro de rata. Bol Med Infant Méx 1988; 45: 808-816.
58. Manjarrez GG, Chagoya GG, Hernández RJ. Desnutrición intrauterina: I. L-triptofano, serotonina y aminoácidos plasmáticos en humanos. Bol Med Infant Méx 1988; 45: 729-744.
59. Hernández RJ, Manjarrez GG, Chagoya GG. Newborn humans and rats malnourished in utero: free plasma L-tryptophan, neutral amino acids and brain serotonin synthesis. Brain Res 1989; 488: 1-13.

60. Dahlström A, Fuxe K. Evidence for the existence of monoamine containing neurons in the central nervous system. *Acta Physiol Scand* 1964;62: Suppl 232, 1-55.
61. Levitt P, Moore RY. Developmental organization of raphe serotonin neuron groups in the rat. *Ant Embryol* 1978; 154: 241-251.
62. Steinbusch HW. Distribution of serotonin immunoreactivity in the central nervous system of the rat-cell bodies and terminals. *Neurosci* 1981; 6: 557-618.
63. Lidov HG, Molliver ME. Immunohistochemical study of the development of serotonergic neurons in the rat CNS. *Brain Res Bull* 1982; 9: 559-604.
64. Kuhar MJ, Atwech SF. Distribution of some suspected neurotransmitters in the central nervous system. In: *Reviews of Neuroscience*. Ehrenpreis E, Kopin L, Raven Press, New York, 1978; 3: 35-76.
65. Kuhar MJ, Aghajanian GK, Roth RH. Tryptophan hydroxylase activity and synaptosomal uptake of serotonin in discrete brain regions after mild-brain raphe lesions. *Brain Res* 1972; 44: 165-176.
66. Takahashi H, Nakashima S, Ohama E, Takeda S, Ikuta F. Distribution of serotonin-containing cell bodies in the brainstem of the human fetus determined with immunohistochemistry using antiserotonin serum. *Brain Dev* 1986; 8: 355-365.
67. Olson L, Seiger A. Early prenatal ontogeny of central monoamine neurons in the rat: Fluorescence histochemical observations. *Z Ant Entwickl Gesch* 1972; 137: 301-316.

68. Olson L, Boréus LO, Seiger A. Histochemical demonstration and mapping of 5-hydroxytryptamine and catecholamine containing systems in the human fetal brain. *Z Anat Entwickl* 1973; 139: 259-282.
69. Chagoya GG, Hernández RJ. L-Tryptophan during gestation induce an increase in brain tryptophan-5-hydroxylase activity and serotonin synthesis. *Proc West Pharmacol Soc* 1983; 26: 369-372.
70. Beaudet A, Descarries L. The fine structure of central serotonin neurons. *J Physiol Paris* 1981; 77: 193-203.
71. Andén NE, Carlsson A, Häggendal J. Adrenergic mechanisms. *Ann Rev Pharmacol* 1969a; 119-133.
72. Carlsson A. Basic action of psychoactive drugs. *Int J Neurol* 1967; 6: 27-45.
73. Amin AH, Crawford TBB, Gaddum JH. The distribution of substance P and 5-hydroxytryptamine in the central nervous system of the dog. *J Physiol (Lond)* 1954; 126: 596-618.
74. Fillion G, Rouselle JC, Fillion MP, Beaudoin DM, Goiny MR, Denieau JM, Jacob JJ. High affinity binding of (³H) 5-hydroxytryptamine of brain synaptosomal membranes; comparison with (³H) lysergic acid diethylamide binding. *Mol Pharmacol* 1978; 14: 50-59.
75. Fillion G, Beaudoin D, Rouselle JC, Denieau JM, Fillion MP, Dray F, Jacob J. Decrease of (³H) 5-HT high affinity binding and 5-HT adenylate cyclase activation after kainic acid lesion in rat brain striatum. *J Neurochem* 1979; 33: 567-570.
76. Fillion MP, Hernández RJ, Bauguen C, Fillion G. Postnatal development of high affinity neuronal recognition sites for (³H) 5-HT in rat brain. *Dev Neurosci* 1982; 5: 484-491.

77. Hernández RJ, Martínez FD, Chagoya GB, Fillion MP, Fillion G. Existence of (³H)serotonin binding sites in the rat spinal cord. A developmental study. *Int J Devl Neurosci* 1984; 2: 33-41.
78. Peroutka SJ, Lebovitz RM, Snyder SH. Two distinct central serotonin receptors with different physiological function. *Science Wash* 1982; 212: 827-829.
79. Lauder JM. Hormonal and humoral influences on brain development. *Psychoneuroendocrinology* 1983; 8: 121-155.
80. Lauder JM, Wallace JA, Krebs H, Petrusz P. Serotonin as a timing mechanism in neuroembryogenesis. En: *Progress in Psychoneuroendocrinology*. Elsevier North Holland Biomedical Press 1980; 539-555.
81. Haydon PG, McCobb DP, Kater SB. Serotonin selectively inhibits growth cone motility and synaptogenesis of specific identified neurons. *Science* 1984; 226: 561-564.
82. Whitaker-Azmitia PM, Azmitia EC. Autoregulation of fetal serotonergic neuronal development: Role of high affinity serotonin receptors. *Neurosci Lett* 1986; 67: 307-312.
83. Jouvet M. Biogenic amines and the states of sleep. *Science* 1969; 163: 32-41.
84. Jouvet M. Serotonin and sleep in the cat. En: *Serotonin and Behavior*. Ed. Barchas J, Usdin E. Academic Press, New York 1973; 385-400.
85. Messing RB, Lytle LD. Serotonin containing neurons: Their possible role in pain and analgesia. *Pain* 1977; 4: 1-21.
86. Randic M, Yu HH. Effects of 5-hydroxytryptamine and bradykinin in cat dorsalhorn neurones activated by noxious stimuli. *Brain Res* 1976; 111: 197-203.

87. Akil H, Mayer DJ. Antagonism of stimulation-produced analgesia by p-CPA a serotonin synthesis inhibitor. Brain Res 1972; 44: 692-697.
88. Yaksh TL. Direct evidence that spinal serotonin and noradrenaline terminals mediate the spinal antinociceptive effects of morphine in the periaqueductal gray. Brain Res 1979; 160: 180-185.
89. Gorgnia K. Effects of repeated 5-hydroxytryptamine injection on temperature regulating the functional activity of brain 5-hydroxytryptamine. Nature 1976; 260: 487-491.
90. Goodrich C, Choy M. Body temperature and 5-hydroxytryptamine during early postnatal maturation in mice. Dev Psychobiol 1978; 11: 531-540.
91. Wurtman JJ, Wurtman RJ. Drugs that enhance central serotonergic transmission diminish selective carbohydrate consumption by rats. Life Sci 1979; 24: 895-904.
92. Shor-Posner G, Grinker AJ, Marinescu C, Brown O, Leibowitz FS. Hypothalamic serotonin in the control of meal patterns and macronutrient selection. Brain Res Bull 1986; 17: 663-671.
93. Shillito EE. The effects of p-chlorophenylalanine on social interaction of male rats. Br J Pharmacol 1970; 36: 193.
94. Schildkraut JJ, Kety SS. Biogenic amines and emotion. Science 1967; 156: 21-30.
95. Barchas JD, Akil H, Elliott GR, Holman RB, Watson SJ. Behavioral neurochemistry; Neuroregulators and behavioral states. Science 1978; 200: 964-973.
96. Van Praag HM, De Haan S. Central serotonin metabolism and frequency of depression. Psychiatry Res 1979; 1: 219-224.

97. Aznes RB. Serotonin and Behavior. Academic Press New York, 1973.
98. Van de Borch LD, Lorens SA. Differential serotonergic innervation of individual hypothalamic nuclei and other forebrain regions by the dorsal and medial midbrain raphe nuclei. Brain Res 1979; 162: 45-54.
99. Oscós A, Hernández RJ. Gestational malnutrition and drugs affecting brain serotonin: Effects on temporal control behavior. Behavioral Neural Biol 1982; 34: 358-371.
100. Hernández RJ. A serotonin agonist-antagonist reversible effect on $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ATPase activity in the developing rat brain. Dev Neurosci 1982; 5: 326-331.
101. Hernández RJ. Brain $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ATPase activity possibly regulated by a specific serotonin receptor. Brain Res 1987; 408: 399-402.
102. Yoshimura K. Activation of $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ activated ATPase in rat brain by catecholamine. J Biochem 1973; 74: 389-391.
103. Hernández RJ, Chagoya GG. Brain serotonin synthesis and $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ATPase activity are increased postnatally after prenatal administration of L-Tryptophan. Dev Brain Res 1986; 25: 221-226.
104. McMenamy RH, Oncley JL. The specific binding of L-tryptophan to serum albumin. J Biol Chem 1958; 233: 1436-1447.
105. Poitou F, Boulu R. Psychopharmacologie du tryptophane. Path Biol 1977; 25: 565-571.
106. Miller M, Leahy PJ, Stern CW, Morgane JF, Resnick O. Tryptophan availability: Relation to elevated brain serotonin in developmentally protein-malnourished rats. Expl Neurol 1977; 57: 142-157.

107. Stern WC, Resnick O, Miller M, Forbes WB, Morgane FJ. Protein malnutrition during development changes in metabolism of biogenic amines in brain. *Fedn Proc* 1974; 33: 661-670.
108. Tagliamonte A, Biggio G, Vargiu L, Gessa GL. Free tryptophan in serum controls brain tryptophan level and serotonin synthesis. *Life Sci* 1973; 12: 277-287.
109. Gessa GL, Tagliamonte A. In: Wolstenholme GEW, Fitzsimons DW. Aromatic amino acids in the brain. Serum free tryptophan: control of brain concentrations of tryptophan and of synthesis of 5-hydroxytryptamine. Elsevier Amsterdam 1974; 207-216.
110. Miller M, Leahy JP, McConville F, Morgane FJ, Resnick O. Effects of developmental protein malnutrition on tryptophan utilization in brain and peripheral tissues. *Brain Res Bull* 1977; 2: 347-353.
111. Curzon G, Knott PJ. Drugs influencing plasma and brain tryptophan. *Brit J Pharmacol* 1973; 48: 352-353.
112. Yuwiler A, Oldendorf WH, Geller E, Braun L. Effects of albumin and amino acid competition on tryptophan uptake into brain. *J Neurochem* 1977; 28: 1015-1023.
113. Sourkes TL. Kinetics of tryptophan transport into the brain. *J Neural Transm Suppl* 1977; 15: 107-114.
114. Zeisel HS, Mauron C, Watkins CJ, Wurtman RJ. Developmental changes in brain indoles, serum tryptophan and other serum neutral amino acids in the rat. *Develop Brain Res* 1981; 1: 551-564.
115. Perez-Cruet J, Tagliamonte A, Tagliamonte P, Gessa GL. Changes in brain serotonin metabolism associated with fasting and satiation in rats. *Life Sci* 1972; 11: 31-39.

116. Spear LP, Scalzo FM. Ontogenetic alterations in the effects of food and/or maternal deprivation on 5-HT, 5-HIAA and 5-HIAA/5-HT ratios. *Develop Brain Res* 1985; 18: 143-157.
117. Bourgoin S, Faivre-Bauman A, Benda P, Glowinski J, Hamon M. Plasma tryptophan and 5-HT metabolism in the CNS of the newborn rat. *J Neurochem* 1974; 23: 319-327.
118. Neckers LM, Biggio G, Moja E, Meek JL. Modulation of brain tryptophan hydroxylase activity by brain tryptophan content. *J Pharmacol Exp Ther* 1971; 177: 475-480.
119. Jequier E, Robinson DS, Lovenberg W, Sjoerdsma A. Further studies on tryptophan hydroxylase in rat brain stem and beef pineal. *Biochem Pharmacol* 1969; 18: 1071-1081.
120. Hamon M, Glowinski J. Regulation of serotonin synthesis. *Life Sci* 1974; 15: 1533-1548.
121. Grahame-Smith DG. Tryptophan hydroxylation in brain. *Biochem Biophys Res Commun* 1964; 16: 586-692.
122. Jequier E, Lovenberg W, Sjoerdsma A. Tryptophan hydroxylase inhibition the mechanism by which p-chlorophenylalanine depletes rat brain serotonin. *Mol Pharmacol* 1967; 3: 274-278.
123. Hernández RJ, Illnerova H. Activity of 5-hydroxytryptophan decarboxylase during the first twenty days of postnatal life in the rat pineal gland. Effect of light. *Neuroendocrinology* 1970; 6: 343-349.
124. Lovenberg W, Weissbach H, Udenfriends S. Aromatic L-amino acid decarboxylase *J Biol Chem* 1962; 237: 89-93.
125. Sims KL, Davis GA, Bloom FE. Activities of 3,4-dihydroxy-L-phenylalanine and 5-hydroxy-L-tryptophan decarboxylase in rat brain. Assay characteristics and distribution. *J Neurochem* 1973; 20: 449-464.

126. Ehret M, Gobaille S, Cash CD, Mandel P, Maitre M. Regional distribution in rat brain of tryptophan hydroxylase apoenzyme determined by enzyme-linked immunoassay. *Neurosci Lett* 1987; 73: 71-76.
127. Cash CD, Vayer P, Mandel P, Maitre M. Tryptophan 5-hydroxylase. Rapid purification from whole brain and production of a specific antiserum. *Eur J Biochem* 1985; 149: 239-245.
128. Fujisawa H, Yamauchi T, Okumo S, Nakata H. Regulation of monoamine biosynthesis by calmodulin-dependent protein kinase in the nervous system. *Adv Cyclic Nucleotide Prot Phos Res* 1984; 17: 503-510.
129. Joh TH, Shikini T, Pickel VM, Reis DJ. Brain tryptophan hydroxylase; purification of production of antibodies to, and cellular and ultrastructural localization in serotonergic neurons of rat midbrain. *Proc Natl Acad Sci USA* 1975; 72: 3575-3579.
130. Nakata H, Fujisawa H. Purification and properties of tryptophan 5-monoxygenase from rat brainstem. *Eur J Biochem* 1982; 122: 41-47.
131. Pickel VM, Joh TH, Reis DJ. Monoamine-synthesizing enzymes in central dopaminergic, noradrenergic and serotonergic neurons. Immunocytochemical localization by light and electron microscopy. *J Histochem Cytochem* 1976; 27: 792-806.
132. Pickel VM, Joh TH, Reis DJ. A serotonergic innervation of noradrenergic neurons in nucleus locus coeruleus: demonstration by immunocytochemical localization of the transmitter specific enzymes tyrosine and tryptophan hydroxylase. *Brain Res* 1977; 131: 197-214.

133. Cash CD, Vayer P, Mandel P, Maitre M. Tryptophan 5-hydroxylase. Rapid purification from whole rat brain and production of a specific antiserum. *Eur J Biochem* 1985; 149: 239-245.
134. Robinson D, Lovenberg W, Sjoerdsma A. Subcellular distribution and properties of rat brain stem tryptophan hydroxylase. *Arch Biochem Biophys* 1968; 123: 419-420.
135. Weissmann D, Belin MF, Aguera M, Meunier C, Maitre M, Cash CD, Ehret M, Mandel P, Pujol JF. Immunohistochemistry of tryptophan hydroxylase in the rat brain. *Neuroscience* 1987; 23: 291-304.
136. Pickel VM, Joh TH, Reis DJ. Monoamine synthesizing enzymes in central dopaminergic noradrenergic and serotonergic neurons. Immunocytochemical localization of transmitter specific enzymes tyrosine and tryptophan hydroxylase. *J Histochem Cytochem* 1976; 24: 792-806.
137. Chédotal A, Hamel E. Serotonin-synthesizing nerve fibers in rat and cat cerebral arteries and arterioles: immunohistochemistry of tryptophan-5-hydroxylase. *Neurosci Lett* 1990; 116: 269-274.
138. Diaz-Cintra S, Cintra L, Kemper T, Resnick O, Morgane PJ. Nucleus raphe dorsalis: a morphometric golgi study in rats of three age groups. *Brain Res* 1981; 207: 1-16.
139. Weissmann D, Chamba G, Debure L, Rousset C, Richard F, Maitre M, Pujol JF. Variation of tryptophan-5-hydroxylase concentration in the rat raphe dorsalis nucleus after p-chlorophenylalanine administration. II. Anatomical distribution of the tryptophan-5-hydroxylase protein and regional variation of its turnover rate. *Brain Res* 1990; 536: 46-55.

140. Becquet D, Faudon M, Hery F. Effect of thalamic parafascicularis nucleus stimulation in regulation of serotonergic transmission in the cat caudate nucleus: involvement of autoreceptors in the dorsalis raphe nucleus. *Neuroscience* 1989; 33: 293-300.
141. Becquet D, Faudon M, Hery F. The role of serotonin release and autoreceptors in the dorsalis raphe nucleus in the control of serotonin release in the cat caudate nucleus. *Neuroscience* 1990; 39: 639-647.
142. Sharp T, Bramwell SR, Clark D, Grahame-Smith DG. In vivo measurement of extracellular 5-hydroxytryptamine in hippocampus of the anaesthetized rat using microdialysis: changes in relation to 5-hydroxytryptaminergic neuronal activity. *J Neurochem* 1989; 53: 234-240.
143. Aghajanian GK. Chemical-feedback regulation of serotonin-containing neurons in brain *Ann NY Acad Sci* 1972; 193: 86-94.
144. Bloom FE, Hoffer BJ, Siggins BG, Barker JL, Nicoll RA. Effects of serotonin on central neurons: microiontophoretic administration. *Fedn Proc* 1972; 31: 97-106.
145. Descarries L, Beaudet A, Watkins KC, Garcia S. The serotonin neurons in nucleus raphe dorsalis of adult rat. *Anat Rec* 1979; 193: 520.
146. Descarries L, Watkins KC, Garcia S, Beaudet A. The serotonin neurons in the nucleus raphe dorsalis of adult rat. *J Comp Neurol* 1982; 207: 239-254.
147. Edvinsson L, Deguerce A, Duverger D, MacKenzie ET, Scatton B. Central serotonergic nerves project to the pial vassels of the brain. *Nature* 1985; 306: 55-57.

148. Scatton B, Duverger D, L'Heureux R, Serrano A, Fage D, Nowicki JF, MacKenzie ET. Neurochemical studies on the existence, origin and characteristics of the serotonergic innervation of small pial vessels Brain Res 1985; 345: 219-229.
149. McBean DE, Sharkey J, Ritchie IM, Kelly PAT. Evidence for a possible role for serotonergic systems in the control of cerebral blood flow. Brain Res 1990; 537: 307-310.
150. Lovenberg W, Jequier E, Sjoerdsma A. Tryptophan hydroxylase: measurement in pineal gland, brainstem and carcinoid tumor. Science 1967; 155: 217-219.
151. Brown AJ. J Chem Soc 1902; 81: 373-388.
152. Henry V. Acad Sci Paris 1902; 135: 916-919.
153. Fischer E, Ber Dt. Chem Ges 1894; 27: 2985-2993.
154. Sigman DS, Mooser G. Chemical studies of enzyme active sites. Annu Rev Biochem 1975; 44: 889,
155. Michaelis L, Menten ML. Biochem Z 1913; 49: 333-369.
156. Koshland DE Jr. En: Boyer PD. The molecular basis for enzyme regulation. Academic, New York 1970: 341-396.
157. Mildvan AS. Mechanism of enzyme action. Annu Rev Biochem 1974; 43: 357,
158. Wimmer MJ, Rose IA. Mechanisms of enzyme-catalyzed group transfer reactions. Annu Rev Biochem 1978; 47: 1031,
159. Lineweaver H, Burk D. The determination of enzyme dissociation constants. J Amer Chem Soc 1934; 56: 658-666.
160. Hofstee BH. On the evaluation of the constants V_m and K_m in enzyme reactions. Science 1952; 116: 329-331.

161. Hanes CS. CLXII Studies on plant amylases. I. The effect of starch concentration upon the velocity of hydrolysis by the amylase of germinated barley. *Biochem J* 1932; 26: 1406-1421.
162. Greco RW, Priore LR, Sharma M, Korytnyk W. Rosfit: An enzyme kinetics no linear regression curve fitting package for a microcomputer. *Comp Biomed Res* 1982; 15: 39-45.
163. Costa E, Guidotti A, Zivkovic B. Short and long term regulation of tyrosine hydroxylase. En: *Neuropsychopharmacology of Monoamines and Their Regulatory Enzymes*. Editor Usdin E. Raven Press New York 1974; 161-175.
164. Carlsson A, Kehr W, Lindqvist M. Short term control of tyrosine hydroxylase. En: *Neuropsychopharmacology of Monoamine and Their Regulatory Enzymes*. Editor Usdin E. Raven Press New York 1974 ; 135-142.
165. Mandell AJ, Knapp S. Regulation of function of tryptophan hydroxylase. En: *Neuropsychopharmacology of Monoamine and Their Regulatory Enzymes*. Editor Usdin E. Raven Press New York 1974; 177-188.
166. Hamon M, Bourgoin S, Artaud F, Mestikawy SEL. The respective roles of tryptophan uptake and tryptophan hydroxylase in the regulation of serotonin synthesis in the central nervous system. *J Physiol Paris* 1980; 77: 269-279.
167. Lovenberg W, Kuhn DM. Substrate regulation of serotonin synthesis. En: *Serotonin in Biological Psychiatry*. Raven Press New York 1982; 73-83.
168. Richard F, Sanne JL, Bourde O, Weissmann D, Ehret M, Cash C, Maitre M, Pujol JF. Variation of tryptophan-5-hydroxylase concentration in the rat raphe dorsalis nucleus after p-chlorophenylalanine administration. I. A model to study the turnover of the enzymatic protein. *Brain Res* 1990; 536: 41-45.

169. Bonate LF. Serotonin receptor subtypes: Functional, Physiological, and Clinical Correlates. Clin Neuropharmacol 1991; 14: 1-16.
170. Sharp T, Bramwell RS, Clark D, and Grahame-Smith GD. In vivo measurement of extracellular 5-hydroxytryptamine in hippocampus of the anaesthetized rat using microdialysis: Changes in relation to 5-hydroxytryptaminergic neuronal activity. J Neurochem 1989; 53: 234-240.
171. Hamon M, Bourgoin S, Héry F, Simonnet G. Activation of tryptophan hydroxylase by adenosine triphosphate, magnesium and calcium. Mol Pharmacol 1977; 14: 99-110.
172. Lysz TW, Sze PY. Activation of brain tryptophan hydroxylase by a phosphorylating system. J Neurosci Res 1978; 3: 411-418.
173. Kuhn DM, Vogel EL, Lovenberg W. Calcium-dependent activation of tryptophan hydroxylase by ATP and magnesium. Biochem Biophys Res Comm 1978; 82: 759-766.
174. Hamon M, Bourgoin S. Characterization of the Ca^{2+} -induced proteolytic activation of tryptophan hydroxylase from the rat brainstem. J Neurochem 1979; 32: 1837-1844.
175. Yamauchi T, Fujisawa H. Regulation of rat brainstem tryptophan-5-monooxygenase. Calcium-dependent reversible activation by ATP and magnesium. Arch Biochem Biophys 1979; 198: 219-226.
176. Yamauchi T, Fujisawa H. Activation of tryptophan 5-monooxygenase by calcium-dependent regulator protein. Biochem Biophys Res Commun 1979; 90: 28-35.
177. Kuhn DM, Lovenberg W. Role of calmodulin in the activation of tryptophan hydroxylase. Fed Proc 1982; 41: 2258-2264.

178. Yamauchi T, Fujisawa H. Purification and characterization of the brain calmodulin-dependent protein kinase (Kinase II), which is involved in the activation of tryptophan 5-monoxygenase. *Eur J Biochem* 1983; 132: 15-21.
179. Ehret M, Cash ChD, Hamon M, Maitre M. Formal demonstration of the phosphorylation of rat brain tryptophan hydroxylase by Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase. *J Neurochem* 1989; 52: 1886-1891.
180. Boadle-Biber MC. Blockade by haloperidol of the increase in tryptophan hydroxylase activity induced by incubation of slices of brainstem with dibutyryl cyclic AMP. *Biochem Pharmacol* 1982; 12: 2203-2207.
181. Nagatsu T, Sawada M, Yamaguchi T. Tryptophan hydroxylase system in brain tissue slices assayed by high-performance liquid chromatography. *Neurochem Int* 1983; 5: 603-609.
182. Garber SL, Makman MH. Regulation of tryptophan hydroxylase activity by a cyclic AMP-dependent mechanism in rat striatum. *Mol Brain Res* 1987; 3: 1-10.
183. Barber R, Butcher RW. The quantitative relationship between intracellular concentration and egress of cyclic AMP from cultured cells. *Mol Pharmacol* 1980; 19: 38-43.
184. Barber R, Butcher RW. The turnover of cyclic AMP in cultured fibroblasts. *J Cyclic Nucleotide Res* 1980; 6: 3-14.
185. Barber R, Butcher RW. Cyclic nucleotide metabolism in whole cells. In: *Cell Regulation by Intracellular Signals*, editors Swillwms SS, Dumont JE. Plenum Press, New York, 1982: 117-135.
186. Barber R, Goka TJ. Cyclic AMP turnover in S49 cells. *J Cyclic Nucleotide Res*. 1981; 7: 353-361.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

187. Benovic JL, Pike LJ, Cerione RA, Staniszewski C, Yoshimasa T, Codina J, Birnbaumer L, Caron MG, Lefkowitz RJ. Phosphorylation of the mammalian β -adrenergic receptor by cyclic AMP-dependent protein kinase: Regulation of the rate of receptor phosphorylation and dephosphorylation by agonist occupancy and effects of coupling of the receptor to the stimulatory guanine nucleotide regulatory protein. *J Biol Chem.* 1985; 260: 7094-7101.
188. Benovic JL, Strasser RH, Caron MG, Lefkowitz RJ. β Adrenergic receptor kinase: Identification of a novel protein kinase that phosphorylates the agonist-occupied form of the receptor. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1986; 83: 2797-2801.
189. Vilar RC. Mecanismo de acción de hormonas no esteroides. En: *Bioquímica e Inmunología*, Vol. II. Editores Hicks JJ, Díaz-Zagoya J, Editado por la Facultad de Medicina de la UNAM, 1988; 7: 127-146.
190. Bokoch GM, Katada T, Northup JK, Ui M, Gilman AG. Purification and properties of the inhibitory guanine nucleotide-binding regulatory component of adenylate cyclase. *J Biol Chem.* 1984; 259: 3560-3567.
191. Gilman AG. G proteins and dual control of adenylate cyclase. *Cell* 1984; 36: 577-579.
192. Codina J, Hildebrandt JD, Birnbaumer L, Sekura RD. Effects of guanine nucleotides and Mg on human erythrocytes N_1 and N_5 , the regulatory components of adenylate cyclase. *J Biol Chem.* 1984; 259: 11408-11418.
193. Insel PA, Bourne HR, Coffino R, Tomkins GM. Cyclic AMP-dependent protein kinase: Pivotal role in regulation of enzyme induction and growth. *Science* 1975; 190: 896-898.

194. Kaczmarek LK, Jennings KR, Strumwasser F, Nairn AC, Walter V, Wilson FD, Greengard P. Microinjection of catalytic subunit of cyclic AMP-dependent protein kinase enhances calcium action potentials of bag cell neurons in cell culture. Proc Natl Acad Sci USA. 1980; 77: 7487-7491.
195. Cooper RJ, Meyer ME. Possible mechanisms involved in the release and modulation of release of neuroactive agents. Neurochem Int. 1984; 6: 419-433.
196. Beavo JA, Bechtel PJ, Krebs EG. Activation of protein kinase by physiological concentrations of cyclic AMP. Proc Natl Acad Sci USA. 1974; 71: 3580-3583.
197. Burger MM, Bombik BM, Breckenridge B McL, Sheppard JR. Growth control and cyclic alterations of cyclic AMP in cell cycle. Nature 1972; 239: 161-163.
198. Erlichman J, Sarkar D, Fleischer N, Rubin CS. Identification of two subclasses of type II cAMP-dependent protein kinases. J Biol Chem. 1980; 255: 8179-8184.
199. Berridge MJ. Rapid accumulation of inositol triphosphate reveals that agonists hydrolyse polyphosphoinositides instead of phosphatidylinositol. Biochem J. 1983; 212: 849-858.
200. Berridge MJ. Inositol triphosphate and diacylglycerol as second messengers. Biochem J. 1984; 220: 345-360.
201. Kirk CJ, Creba JA, Downes CP, Mitchell RH. Hormone-stimulated metabolism of inositol lipids and its relationship to hepatic receptor function. Biochem Soc Trans. 1981; 9: 377-379.
202. Mitchell RH, Kirk CJ. Studies of receptor-stimulated inositol lipid metabolism should focus upon measurements of inositol lipid breakdown. Biochem J. 1981; 198: 247-248.

203. Creba JA, Downes CP, Hawkins PT, Brewster G, Mitchell RH, Kirk CJ. Rapid breakdown of phosphatidylinositol 4-phosphate and phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate in rat hepatocytes stimulated by vasopressin and other Ca^{2+} mobilizing hormones. *Biochem J.* 1983; 212: 733-747.
204. Berridge MJ, Irvine RF. Inositol trisphosphate, a novel second messenger in cellular signal transduction. *Nature* 1984; 312: 315-321.
205. Joseph SK. Receptor-stimulated phosphoinositide metabolism. A role for GTP binding proteins?. *Trends Biochem Sci.* 1985; 10: 297-298.
206. González RA, Crews FT. Characterization of the cholinergic stimulation of phosphoinositide hydrolysis in rat brain slices. *J Neurosci.* 1984; 4: 3120-3127.
207. Cockcroft S, Stutchfield J. G-proteins, the inositol lipid signalling pathway and secretion. *Phil Trans R Soc Lond B.* 1988; 320: 247-265.
208. Chuand De-Maw. Neurotransmitter receptors and phosphoinositide turnover. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 1989; 29: 71-110.
209. Berridge MJ. Inositol trisphosphate and diacylglycerol: Two interacting second messengers. *Ann Rev Biochem.* 1987; 56: 159-193.
210. Nishizuka Y. The role of protein kinase C in cell surface signal transduction and tumour promotion. *Nature* 1984; 308: 693-697.
211. Ashendell CL. The phorbol ester receptor: a phospholipid regulated protein kinase. *Biochem Biophys Acta* 1985; 822: 219-242.

212. Borle AB. Control, modulation and regulation of cell calcium. Rev Physiol Biochem Pharmacol 1981; 90: 13-169.
213. Villereal ML, Palfrey HC. Intracellular calcium and cell function. Annu Rev Nutr 1989; 9: 347-375.
214. Walz B, Baumann O. Calcium-sequestering cell organelles: In situ localization, morphological and functional characterization. Prog Histochem Cytochem 1989; 20: 1-47.
215. Farber JL. Mini Review: The role of calcium in cell death. Life Sci 1981; 29: 1289-1295.
216. Baker PF. The regulation of intracellular calcium. SEB Symposium 1976; 30: 67-68.
217. O'Doherty J, Youmans SJ, Armstrong W McD, Stark RJ. Calcium regulation during stimulus secretion coupling: continuous measurement on intracellular calcium activities. Science 1980; 209: 510-513.
218. Gimble JM, Waisman DM, Gustin M, Goodman DBP, Rasmussen H. Studies of the Ca^{2+} transport mechanism of human erythrocyte inside-out membrane vesicles: evidence for the development of a positive interior membrane potential. J Biol Chem 1982; 257: 10781-10788.
219. Head JF, Spirlberg S, Kaminer B. Two low molecular-weight Ca^{2+} -binding proteins isolated from squid optic lobe by phenothiazine-sepharose affinity chromatography. Biochem J 1983; 209: 797-802.
220. Leach KL, James ML, Blumberg PM. Characterization of a specific phorbol ester receptor in mouse brain cytosol. Proc Natl Acad Sci USA 1983; 80: 4208-4212.
221. Reeves JP, Sutko JL. Sodium-calcium ion exchange in cardiac membrane vesicles. Proc Natl Acad Sci USA 1979; 76: 590-594.

222. Reinhart PH, Taylor WN, Bygrave FL. Calcium ion fluxes induced by the action of β -adrenergic agonists in perfused rat liver. *Biochem J* 1982; 208: 619-630.
223. Vincenzi FF, Larsen FL. The plasma membrane calcium pump: regulation by a soluble Ca^{2+} binding protein. *Fed Proc* 1980; 39: 2427-2431.
224. Waisman DM, Gimble J, Goodman DBP, Rasmussen H. Studies of the Ca^{2+} transport mechanism of human erythrocyte inside-out plasma membrane vesicles. I. Regulation of the pump by calmodulin. *J Biol Chem* 1981; 256: 409-414.
225. Wang JH, Waisman DM. Calmodulin and its role in the second messenger system. *Curr Top Cell Regul* 1979; 15: 47-107.
226. Vincenzi FF, Hinds TR, Raess BU. Calmodulin and the plasma membrane calcium pump. *Ann NY Acad Scie* 1980; 356: 232-244.
227. Scharff O, Foder B. Rate constants for calmodulin binding to Ca^{2+} -ATPase in erythrocytes membranes. *Biochim Biophys Acta* 1982; 691: 133-143.
228. Means AR, Dedman JR. Calmodulin an intracellular calcium receptor. *Nature* 1980; 285: 73-77.
229. Endo T, Tanaka T, Isobe T, Kasai H, Okuyama T, Hidako H. Calcium-dependent affinity chromatography of S-100 and calmodulin on calmodulin antagonist-coupled Sepharose. *J Biol Chem*. 1981; 256: 2485-2489.
230. DeLorenzo RJ. The calmodulin hypothesis of neurotransmission. *Cell Calcium* 1981; 2: 365-385.
231. Cheung WY. Calmodulin plays a pivotal role in cellular regulation. *Science* 1980; 207: 19-27.

232. Lauder JN, Bloom FE. Ontogeny of monoamine neurones in the locus coeruleus, raphe nuclei and substantia nigra in the rat. I. Cell differentiation. *J Comp Neurol* 1974; 155: 469-482.
233. Kurokawa M, Sakamoto T, Kato M. Distribution of activity of the Na^+/K^+ -ATPase in isolated nerve ending particles. *J Biochem* 1965; 97: 833-844.
234. Downie NM, Heath RW. Métodos estadísticos aplicados. México. Harla 1973: 193-201 y 144-257.
235. Gal EM, Patterson K. Rapid no isotopic assay of tryptophan-5-hydroxylase activity in tissues. *Anal Biochem* 1973; 52: 625-629.
236. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193: 265-273.
237. Miller D, Crane RK. The digestion of carbohydrates in the small intestine. *Am J Clin Nutr* 1963; 12: 220,
238. Cravioto J, De la Peña CLG. Fat metabolism in chronic severe malnutrition. Lipoproteins in children with kwashiorkor. *Metabolism* 1959; 8: 722,
239. Dawson AM. Absorption of fats. *Brit Med Bull* 1967; 23: 247,
240. Gómez F, Ramos GR, Cravioto J, Frenk S. Metabolismo proteico en la desnutrición crónica. Absorción y retención de nitrógeno de proteínas de alto valor biológico. *Rev Invest Clin Mex* 1957; 9: 41,
241. Gitlin D, Cravioto J, Frenk S, López ME, Ramos GR, Gómez F, Janeway ES. Albumin metabolism in children with protein malnutrition. *J Clin Invest* 1958; 37: 682,

242. Frenk S, Metcoff J, Gómez F, Ramos GR, Cravioto J, Antononowicz I. Intracellular composition and homeostatic mechanism in chronic severe infantile malnutrition. II. Tissues composition. *Pediatrics* 1957; 20: 105,
243. Frenk S. Algunas particularidades del metabolismo de agua y sales en el preescolar con desnutrición grave. *Bol Med Hosp Infant Mex* 1958; 15: 789,
244. Gómez F, Ramos GR, Cravioto J, Bienevenú B. El volumen sanguíneo y del plasma en el niño desnutrido. *Bol Med Hosp Infant Mex* 1950; 7: 514,
245. Gómez F, Ramos GR, Bienevenú B, Cravioto J. Las seroproteínas y sus fracciones en el preescolar clínicamente sano y en el desnutrido. *Bol Med Hosp Infant Mex* 1950; 7: 497,
246. Ramos GR, Alba GB. Proteínas séricas y sus fracciones en el niño desnutrido de tercer grado (estudio de 1700 casos). *Bol Med Hosp Infant Mex* 1964; 21: 263,
247. Reinhardt MC, Burkhalter JF. The cord serum free aminoacid levels in appropriate and small for gestational age newborn infants of mothers without clinical malnutrition. *Acta Pediatric Scand* 1980; 69: 201-201.
248. Godard C, Zahand GR. Growth hormone and insuline in severe infantile malnutrition. I. Plasma growth hormone response to hypoglycemia. *Helv Pediatr Acta* 1971; 26: 266-275.
249. Parra A, Klish W, Cuellar A, Serrano AP, García G, Argote EM, Canseco L, Nichols LB. Energy metabolism and hormonal profile in children with edematous protein calorie malnutrition. *J Pediatr* 1975; 87: 307-314.
250. Ramos GR. Desnutrición y crecimiento físico. *Bol Med Hosp Infant Mex* 1964; Sup 21: 1,

251. Ramos GR, Cravioto J, Navarrete JA. La letalidad en el niño desnutrido. Bol Med Hosp Infant Mex 1958; 15: 875,
252. Mariscal AC, Viniegra CA, Ramos GR. Predicción de la talla en niños desnutridos y talla de los progenitores. Bol Med Hosp Infant Mex 1966; 23: 465,
253. Mariscal AC, Viniegra CA, Ramos GR. Predicción de la talla. Bol Med Hosp Infant Mex 1967; 24: 23,
254. Mariscal AC, Ramos GR, Viniegra CA, Pérez OB. Predicción de la talla final en niños con peso proporcionado a la talla. Bol Med Hosp Infant Mex 1967; 24: 43,
255. Ramos GR. Crecimiento en la desnutrición. Gac Med Mex 1967; 97: 1527,
256. Aguilar PR. Estudio sobre la avitaminosis y las perturbaciones del crecimiento en los niños hipoaalimentados. Gac Med Mex 1944; 75: 26,
257. Down EF. Nutritional dwarfism. A syndrome of early protein calorie malnutrition. Am J Clin Nutr 1964; 15: 275,
258. Fitzhardinge PM, Steven EM. The small for dates infants. I. Later growth patterns. Pediatric 1972; 49: 671,
259. Fancourt R, Campbell S, Harvey D, Norman AP. Follow up study of the small for dates babies. Br Med J 1976; 1: 1435,
260. Babson SG, Kangas J, Youg N, Bramhall JL. Growth and development of twins of dissimilar size at birth. Pediatrics 1964; 33: 327,
261. Forbes WB, Tracy C, Resnick O, Morgane JP. Effect of maternal dietary protein restriction on growth of the brain and body in the rat. Brain Res Bull 1977; 2: 131-135.

262. Miller CH, Hassanein K. Fetal malnutrition in white newborn infants: Maternal factors. *Pediatrics* 1973; 52: 504-512.
263. Ramos GR, Pérez OB, Mariscal AC, Viniestra CA. Homeorresis. *Bol Med Hosp Infant Mex* 1967;24: 5,
264. Neet EK. Cooperativity in Enzyme Function: Equilibrium and kinetic aspects. En: *Methods in Enzymology Vol 64*. Editor Purich LD. Academic Press 1980: 139-192.
265. Yamauchi T, Nakata H, Fujisawa H. A new activator protein that activates tryptophan-5-monooxygenase and tyrosine-3-monooxygenase in the presence of Ca^{2+} , calmodulin-dependent protein kinase. *J Biol Chem* 1981; 256: 5404-5409.
266. Ichimura T, Isobe T, Okuyama T, Yamauchi T, Fujisawa H. Brain 14-3-3 is an activator protein that activates tryptophan 5-monooxygenase and tyrosine 3-monooxygenase in the presence of Ca^{2+} , calmodulin-dependent protein kinase II. *FEBS Lett* 1987; 219: 79-82.
267. Hill MC, Waight DR, Bardsley GW. Does an enzyme follow the Michaelis-Menten equation?. *Mol Cell Biochem* 1977; 15: 173-177.
268. Lehninger AL. Enzimas: Mecanismo, estructura y regulación. En *Bioquímica*. Omega SA, Barcelona 1984; 223-254.
269. Rodwell VW. Propiedades generales de las enzimas. En *Bioquímica de Harper*. Editores Martin DW, Mayes PA, Rodwell VW. El Manual moderno SA de CV, México DF 1984: 52-86.
270. Hamon H, Bourgoin S, Hery F, Ternaux JF, Glowinski. In vivo and in vitro activation of soluble tryptophan hydroxylase from rat brainstem. *Nature* 1976; 260: 61-63.

271. Levitt M, Spector S, Sjoerdsma A, Udenfriend S. Elucidation of the rate-limiting step in norepinephrine biosynthesis in the perfused guinea pig heart. *J Pharmacol Exp Ther* 1965; 148: 1-8.
272. Shiman R, Akino M, Kaufman S. Solubilization and partial purification of tyrosine hydroxylase from bovine adrenal medulla. *J Biol Chem* 1971; 246: 1339-1340.
273. Kuczenski R. Rat brain tyrosine hydroxylase. *J Biol Chem* 1973; 248: 2261-2265.
274. Campbell GD, Grahame Hardie D, Vulliet R. Identification of four phosphorylation sites in the N-terminal region of tyrosine hydroxylase. *J Biol Chem* 1986; 261: 10489-10492.
275. Haycock WJ. Phosphorylation of tyrosine hydroxylase in situ at serine 8, 19, 31 and 40. *J Biol Chem* 1990; 265: 11682-11691.
276. Haycock WY, Haycock AD. Tyrosine hydroxylase in rat brain dopaminergic nerve terminals. *J Biol Chem* 1991; 266: 5650-5657.
277. Atkinson J, Richtand N, Schworer Ch, Kuczenski R, Soderling T. Phosphorylation of purified rat striatal tyrosine hydroxylase by Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase. II: Effect of an activator protein. *J Neurochem* 1987; 49: 1241-1249.
278. Yamauchi T, Fujisawa H. In vitro phosphorylation of bovine adrenal tyrosine hydroxylase by adenosine 3':5'-monophosphate-dependent protein kinase. *J Biol Chem* 1979; 254: 503-507.

279. Mestikawy ES, Gozlan H, Glowinski J, Hamon M. Characteristics of tyrosine hydroxylase activation by K^+ -induced depolarization and/or forskolin in rat striatal slices. *J Neurochem* 1985; 45: 173-184.
280. Iuvone MF. Calcium, ATP, and magnesium activate soluble tyrosine hydroxylase from rat striatum. *J Neurochem* 1984; 43: 1359-1368.
281. Albert KA, Helmer-Matyjek E, Nairn AC, Muller TH, Haycock JW, Greene LA, Goldstein M, Greengard P, Vrana KE, Roskoski R Jr. Tyrosine hydroxylase inactivation following cAMP-dependent phosphorylation activation. *J Neurochem* 1983; 40: 1692-1700.
282. Shields JP, Eccleston D. Effects of electrical stimulation of rat midbrain on 5-hydroxytryptamine synthesis as determined by a sensitive radioisotope method. *J Neurochem* 1972; 19: 265-272.
283. Herr EB, Gallager WD, Roth HR. Tryptophan hydroxylase: activation in vivo following stimulation of central serotonergic neurons. *Biochem Pharmacol* 1975; 24: 2019-2023.
284. Bourgoin S, Oliveras LJ, Bruxelle J, Hamon M, Besson MJ. Electrical stimulation of the nucleus raphe magnus in the rat. Effects on 5-HT metabolism in the spinal cord. *Brain Res* 1980; 194: 377-389.
285. Boadle-Biber CM, Johannessen NJ, Narasimhachari N, Phan TH. Activation of tryptophan hydroxylase by stimulation of central serotonergic neurons. *Biochem Pharmacol* 1983; 32: 185-188.
286. Boadle-Biber CM, Johannessen NJ, Narasimhachari N, Phan HT. Tryptophan hydroxylase: increase in activity by electrical stimulation of serotonergic neurons. *Neurochem Int* 1986; 8: 83-92.

287. 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. *J Neurochem* 1979; 33: 1031-1042.
288. Boadle-Biber M. Activation of tryptophan hydroxylase from central serotonergic neurons by calcium and depolarization. *Biochem Pharmacol* 1977; 27: 1069-1079.
289. Boadle-Biber M. Activation of tryptophan hydroxylase from slices of rat brain stem incubated with agents with promote calcium uptake or intraneuronal release. *Biochem Pharmacol* 1979; 28: 2129-2138.
290. Elks ML, Youngblood WW, Kizer JS. Synthesis and release of serotonin by slices: effect of ionic manipulations and cationic ionophores. *Brain Res* 1979; 172: 461-468.
291. Boadle-Biber MC. Further studies on the role of calcium in the depolarization-induced activation on tryptophan hydroxylase. *Biochem Pharmacol* 1982; 31: 2495-2503.
292. Seamon KB, Daly JW. Forskolin: Its biological and chemical properties. In *Advances in Cyclic Nucleotide and Protein Phosphorylation Research*. Vol 20. Editores Greengard P, Robinson GA. Raven Press, New York 1986: 1-150.

VII. TABLAS Y GRAFICAS

TABLA I

INCREMENTOS DE PESO CORPORAL, PESO CEREBRAL Y LONGITUD
 CEFALO-SACRA EN RATAS CON DESNUTRICION PROTEINICO-CALORICA
 GESTACIONAL (D) Y CONTROLES (C)

	PESO CORPORAL			LONGITUD CEFALO-SACRA			PESO CEREBRAL		
	% D	% C	p	% D	% C	p	% D	% C	p
PRENATAL									
17-19 DIAS	86	78	0.05	39	58	0.05	19	41	0.01
POSTNATAL									
1-10 DIAS	35	60	0.05	18	17	NS	75	72	NS
PRENATAL									
17 DIAS A									
POSTNATAL	94	92	NS	68	70	NS	84	85	NS
10 DIAS									

PRUEBA ESTADISTICA: ANALISIS DE VARIANZA DE DOS VARIABLES

TABLA II

INDICE PESO CEREBRAL/PESO CORPORAL EN RATAS CON DESNUTRICION
PROTEINICO-CALORICA GESTACIONAL (D) Y CONTROLES (C)

EDAD (DIAS)	D*	C*
PRENATAL		
17	0.168	0.071
19	0.078	0.047
POSTNATAL		
1	0.036	0.026
2	0.037	0.033
3	0.047	0.036
6	0.050	0.038
10	0.067	0.040

PRUEBA ESTADISTICA: t STUDENT

D vs C P < 0.05

TABLA III

ACTIVACION DE LA TRIPTOFANO-5-HIDROXILASA POR FORSKOLINA
 Y FOSFATIDILINOSITOL EN SINAPTOSOMAS DE CEREBRO DE RATA
 CON DESNUTRICION PROTEINICO-CALORICA GESTACIONAL (D)
 Y CONTROLES (C) A LOS 10 DIAS DE EDAD POSTNATAL

	D*	C*
FORSKOLINA	0.650 ± 0.086	0.519 ± 0.089
FOSFATIDILINOSITOL	0.594 ± 0.064	0.469 ± 0.115
CONTROLES	0.453 ± 0.062	0.303 ± 0.031

* nMOL 5-HIDROXINDOLES/MG PROTEINA/H = VALORES PROMEDIO
 DESVIACION ESTANDAR, 3 EXPERIMENTOS POR DUPLICADO.

PRUEBAS ESTADISTICAS: ANALISIS DE VARIANZA DE DOS VARIABLES.

t DE STUDENT D vs C p < 0.05

FIGURA. 4

PESO CORPORAL PRE Y POSTNATAL DE RATAS CON
DESNUTRICION PROTEINICO-CALORICA GESTACIONAL 
Y CONTROLES 

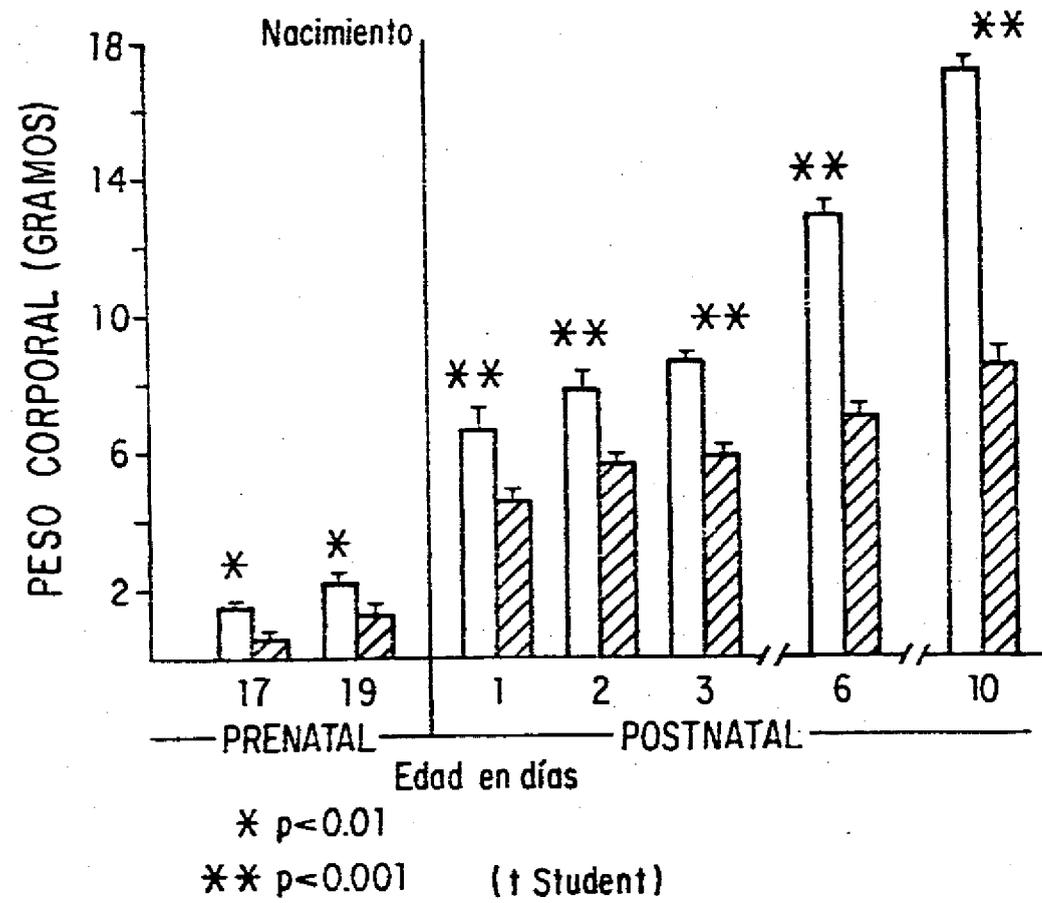
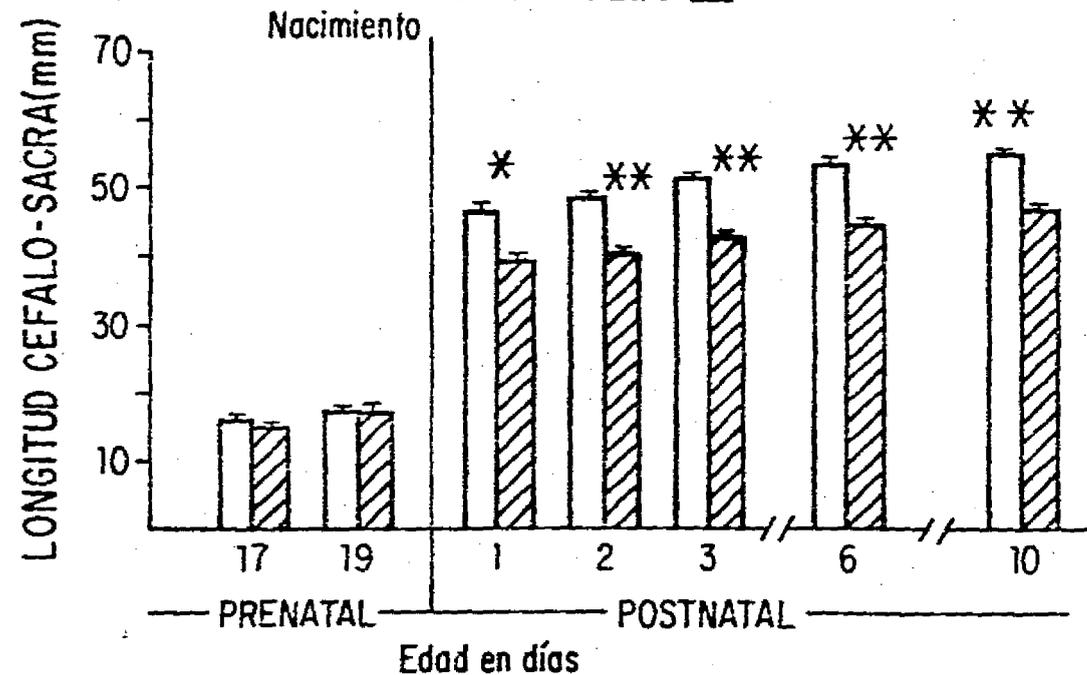


FIGURA. 5

LONGITUD CEFALO-SACRA DE RATAS CON DESNUTRICION
PROTEINICO-CALORICA GESTACIONAL 
Y CONTROLES 



* $p < 0.01$

** $p < 0.001$ (t Student)

FIGURA. 6

PESO PRE Y POSTNATAL DEL CEREBRO DE RATAS CON
DESNUTRICION PROTEINICO-CALORICA GESTACIONAL 
Y CONTROLES 

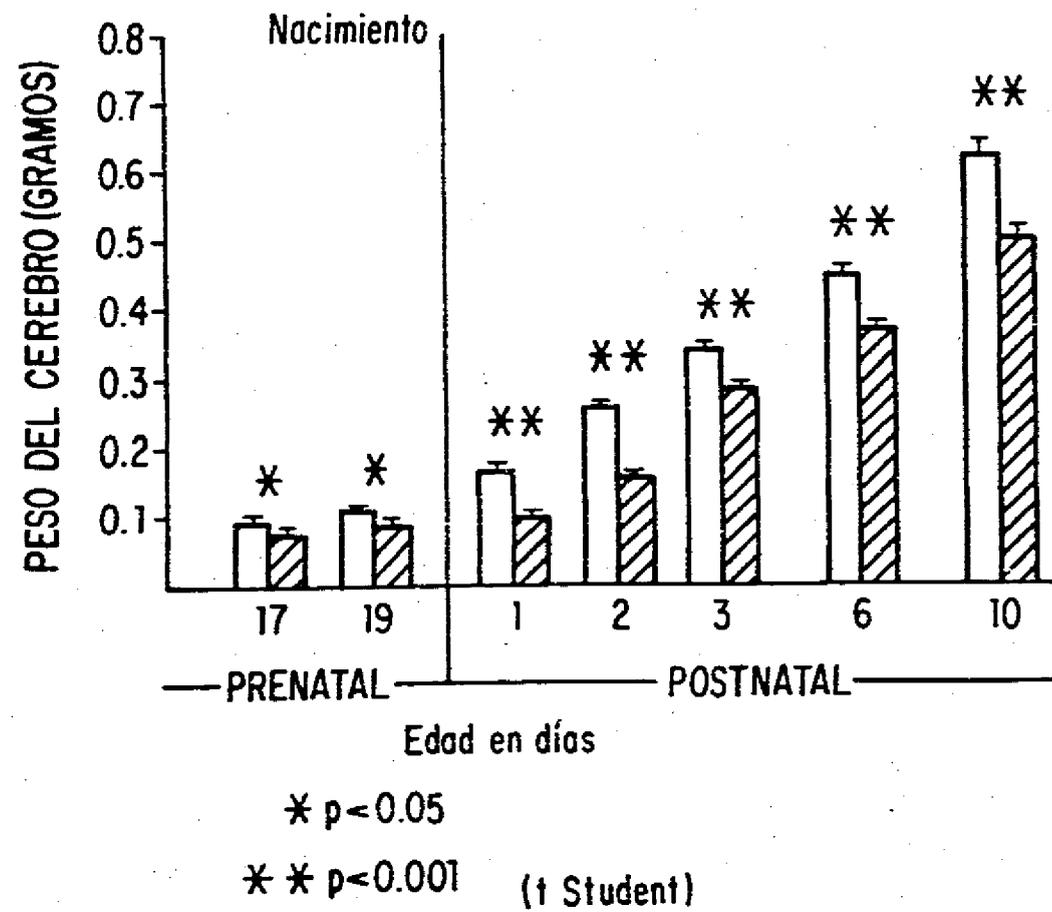
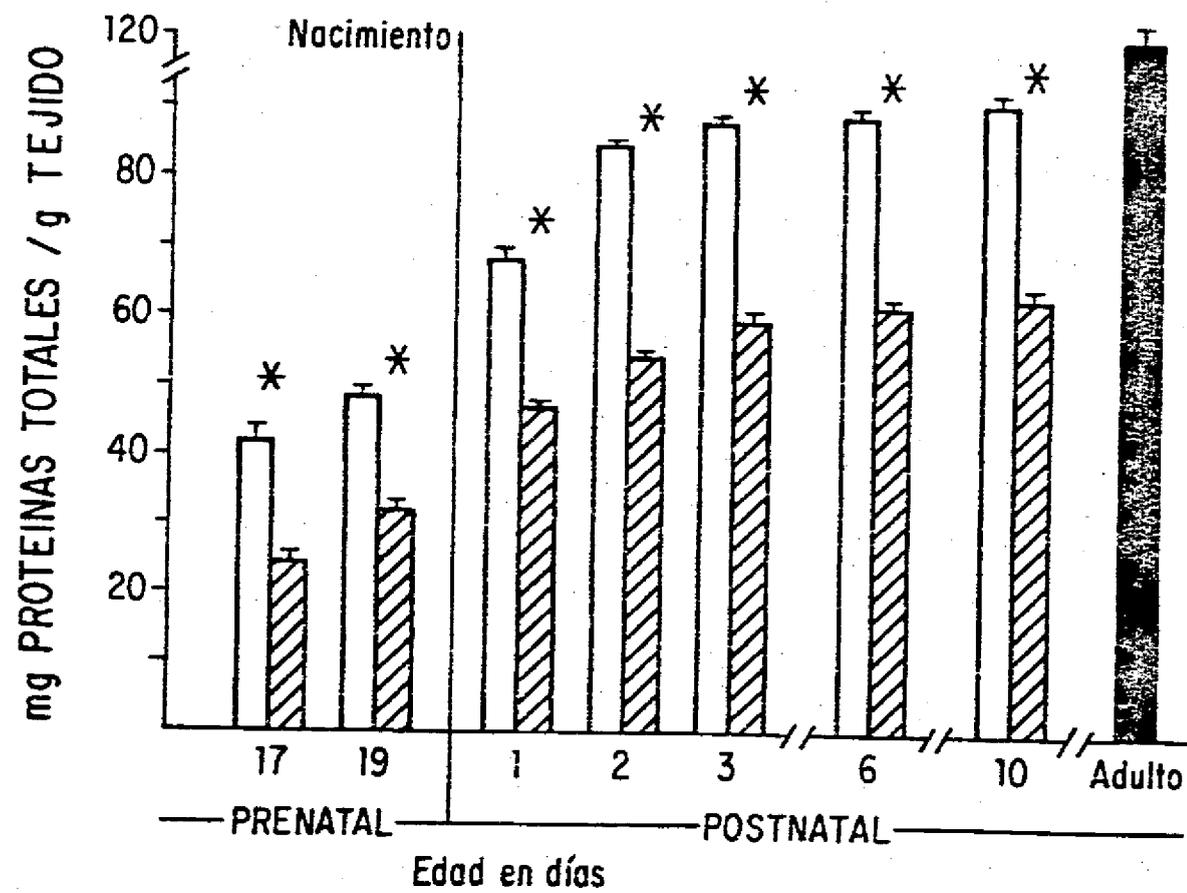


FIGURA. 7

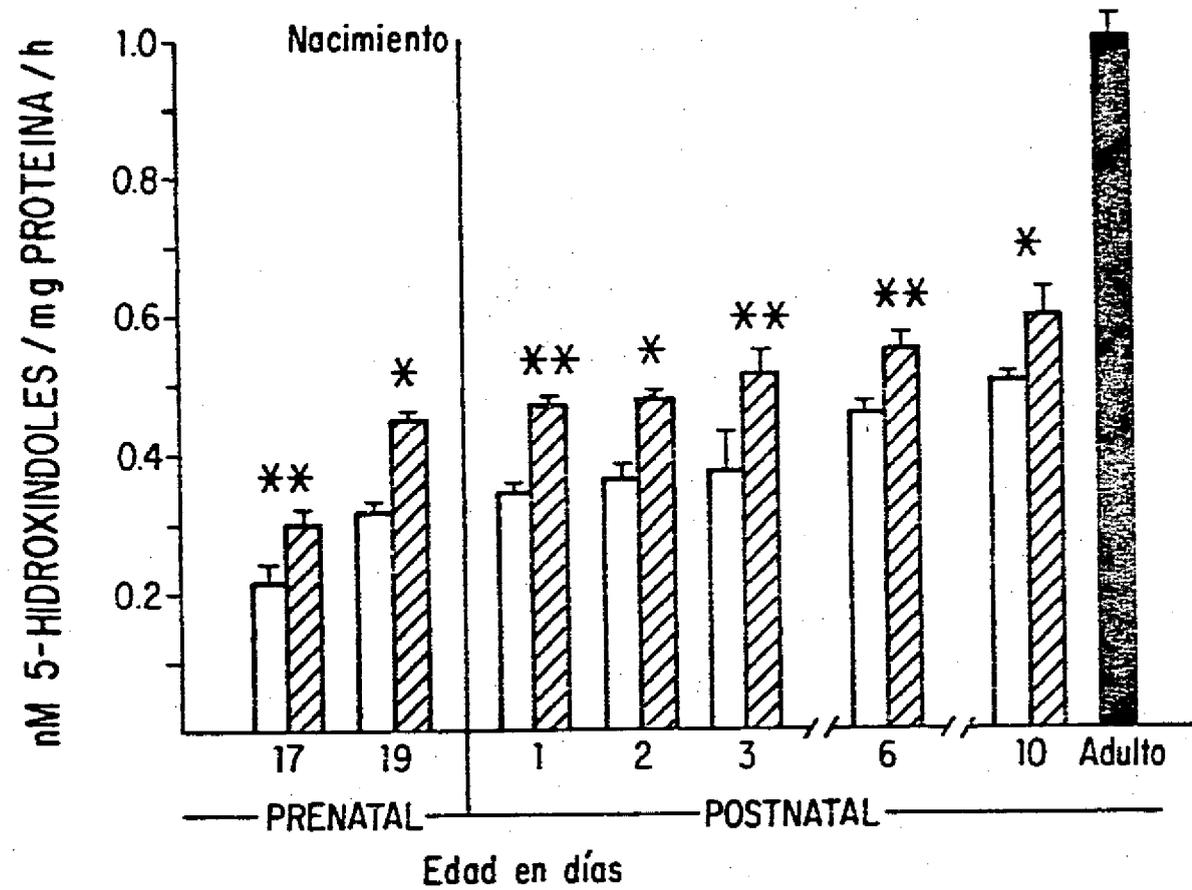
CONCENTRACION PRE Y POSTNATAL DE PROTEINAS TOTALES
EN CEREBRO DE RATA CON DESNUTRICION PROTEINICO-CALORICA
GESTACIONAL  Y CONTROLES 



* $p < 0.001$ (t Student)

FIGURA. 8

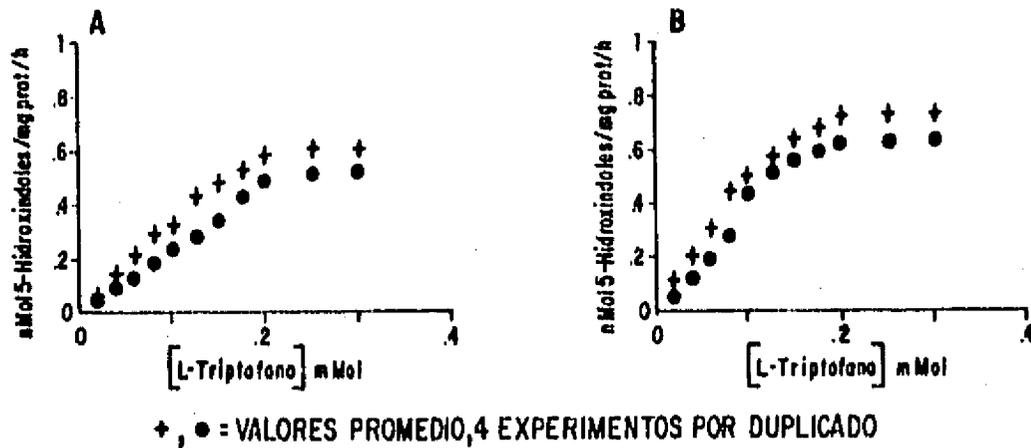
ACTIVIDAD PRE Y POSTNATAL DE LA TRIPTOFANO-5-HIDROXILASA
EN CEREBRO DE RATA CON DESNUTRICION PROTEINICO-CALORICA
GESTACIONAL \square Y CONTROLES \square



* $p < 0.05$
** $p < 0.01$ (t Student)

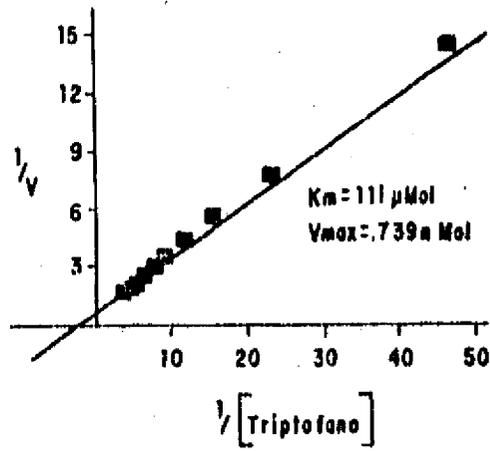
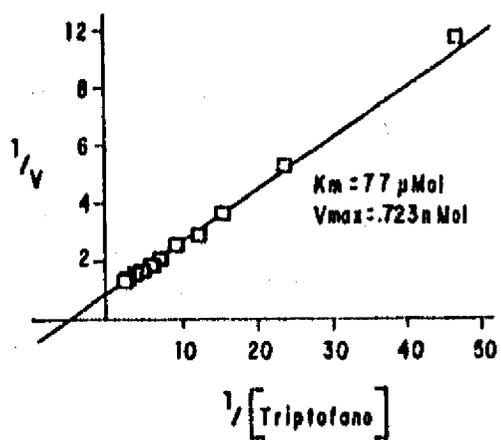
FIGURA. 9

CURVAS DE CINETICA DE LA TRIPTOFANO-5-HIDROXILASA EN CEREBRO DE RATA DE 17(A) Y 19(B) DIAS DE VIDA PRENATAL CON DESNUTRICION PROTEINICO-CALORICA(+)Y CONTROLES(●)

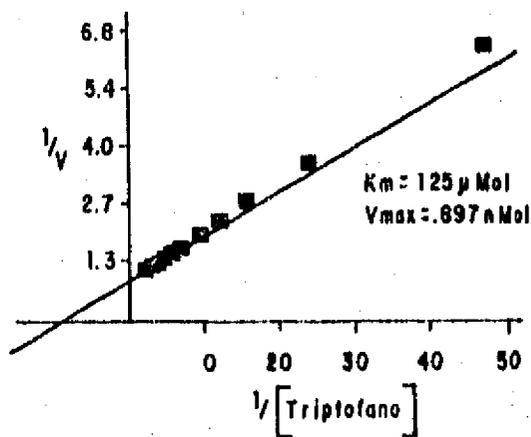
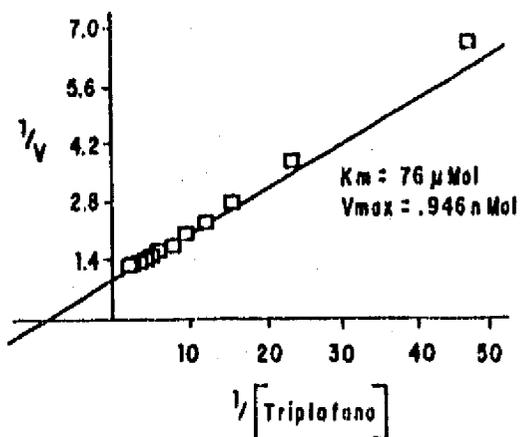


GRAFICA LINEWEAVER-BURK DE LA TRIPTOFANO-5-HIDROXILASA EN CEREBRO DE RATA CON DESNUTRICION PROTEINICO-CALORICA (□) Y CONTROLES (■)

PRENATAL
17 DIAS



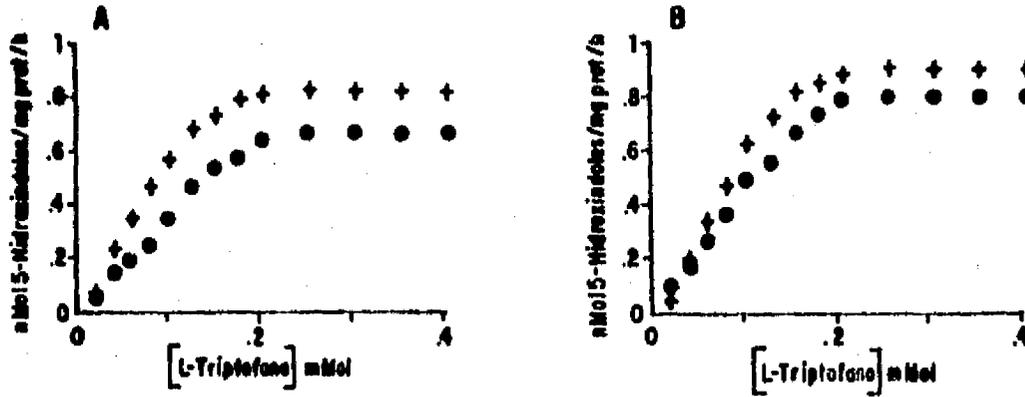
19 DIAS



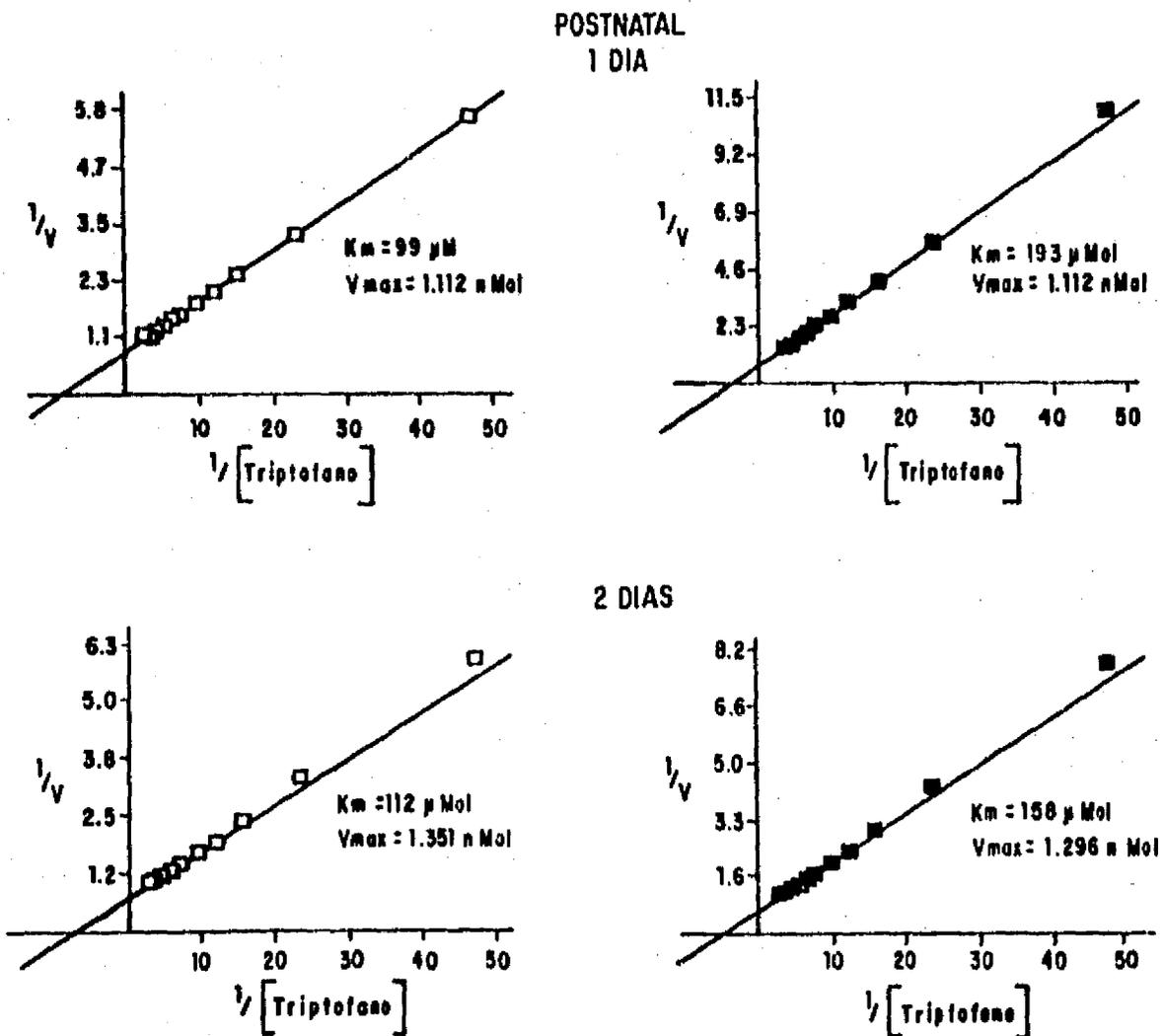
□, ■ = VALORES PROMEDIO, 4 EXPERIMENTOS POR DUPLICADO

FIGURA. 10

CURVAS DE CINETICA DE LA TRIPTOFANO-5-HIDROXILASA EN CEREBRO DE RATA DE 1(A) Y 2(B) DIAS DE VIDA POSTNATAL CON DESNUTRICION PROTEINICO-CALORICA(+) Y CONTROLES(•)



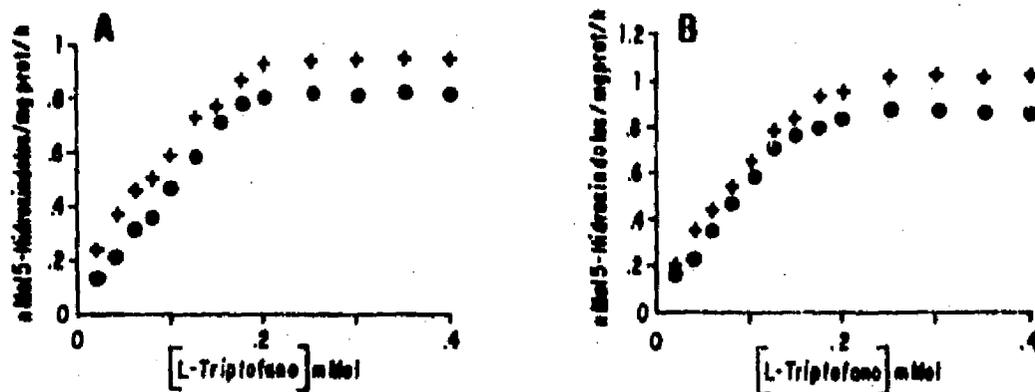
GRAFICA LINEWEAVER-BURK DE LA TRIPTOFANO-5-HIDROXILASA EN CEREBRO DE RATA CON DESNUTRICION PROTEINICO-CALORICA (□) Y CONTROLES (■)



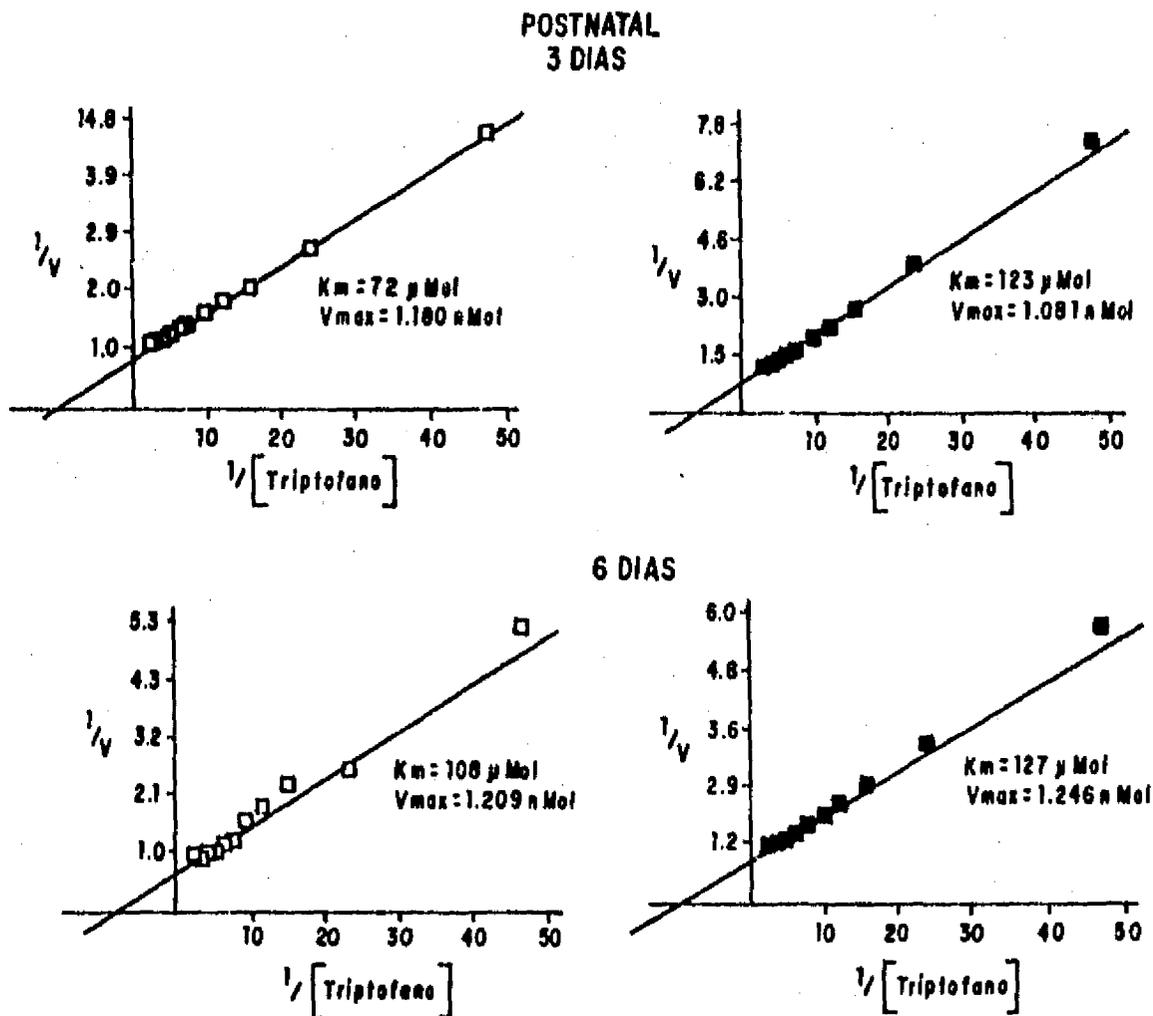
□, ■ = VALORES PROMEDIO, 4 EXPERIMENTOS POR DUPLICADO

FIGURA. 11

CURVAS DE CINETICA DE LA TRIPTOFANO-5-HIDROXILASA EN CEREBRO DE RATA DE 3(A)Y6(B) DIAS DE VIDA POSTNATAL CON DESNUTRICION PROTEINICO-CALORICA (+) Y CONTROLES (●)



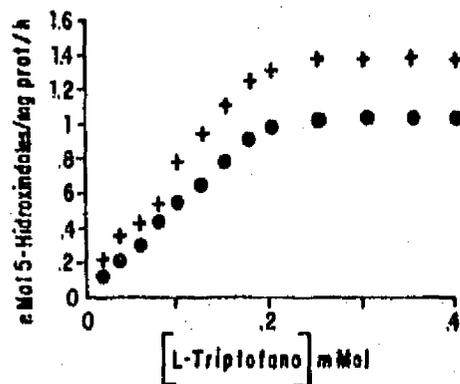
GRAFICA LINEWEAVER-BURK DE LA TRIPTOFANO-5-HIDROXILASA EN CEREBRO DE RATA CON DESNUTRICION PROTEINICO-CALORICA (□) Y CONTROLES (■)



□, ■ = VALORES PROMEDIO, 4 EXPERIMENTOS POR DUPLICADO

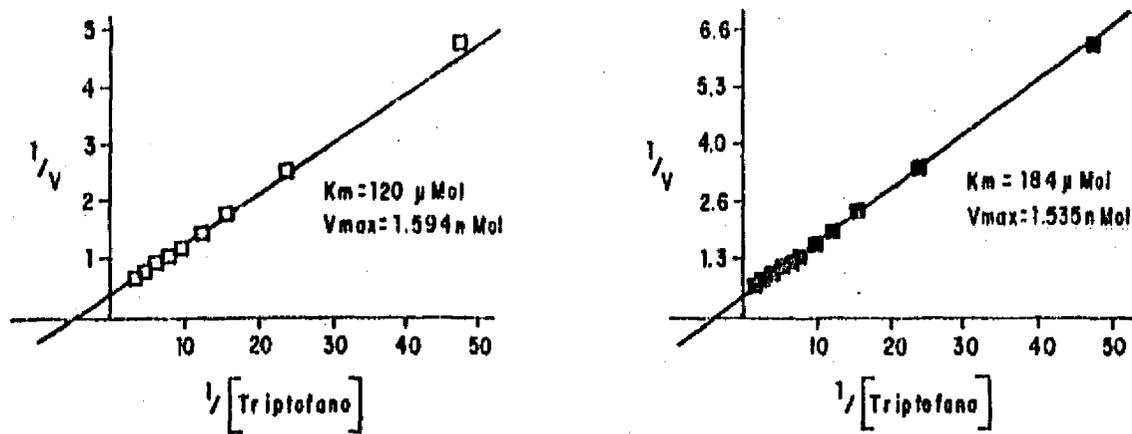
FIGURA. 12

CURVA DE CINETICA DE LA TRIPTOFANO-5-HIDROXILASA EN CEREBRO DE RATA DE 10 DIAS DE VIDA POSTNATAL CON DESNUTRICION PROTEINICO-CALORICA(+)Y CONTROLES(•)



GRAFICA LINEWEAVER-BURK DE LA TRIPTOFANO-5-HIDROXILASA EN CEREBRO DE RATA CON DESNUTRICION PROTEINICO CALORICA (□) Y CONTROLES (■)

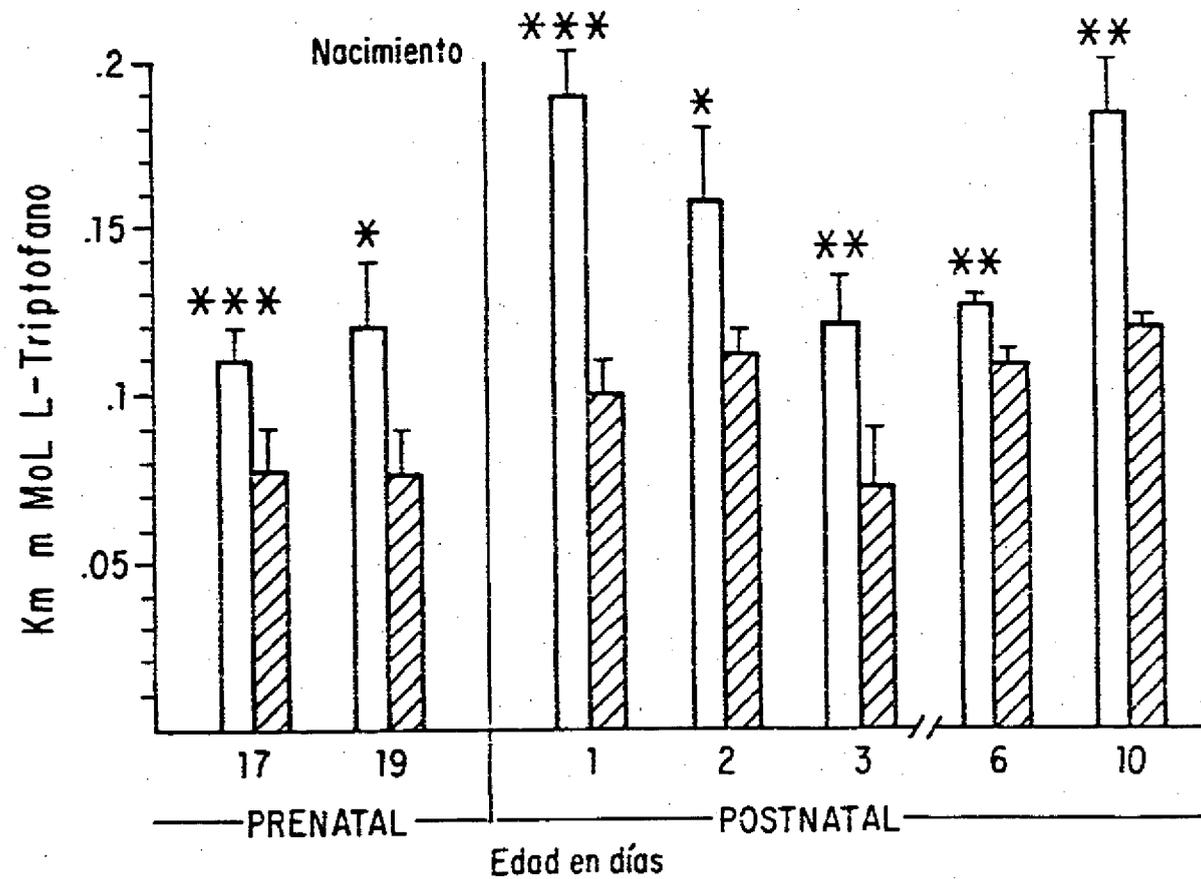
POSTNATAL
10 DIAS



□, ■ = VALORES PROMEDIO, 4 EXPERIMENTOS POR DUPLICADO

FIGURA. 13

Km DE LA TRIPTOFANO-5-HIDROXILASA EN CEREBRO DE RATA CON DESNUTRICION PROTEINICO-CALORICA GESTACIONAL  Y CONTROLES 



VALORES PROMEDIO \pm DESVIACION ESTANDAR, 4 EXPERIMENTOS POR DUPLICADO

* $p < 0.05$

** $p < 0.01$

*** $p < 0.001$

(\pm Student)

FIGURA. 14

VELOCIDAD MAXIMA DE REACCION DE LA
TRIPTOFANO-5-HIDROXILASA EN CEREBRO DE RATA CON
DESNUTRICION PROTEINICO-CALORICA GESTACIONAL 
Y CONTROLES 

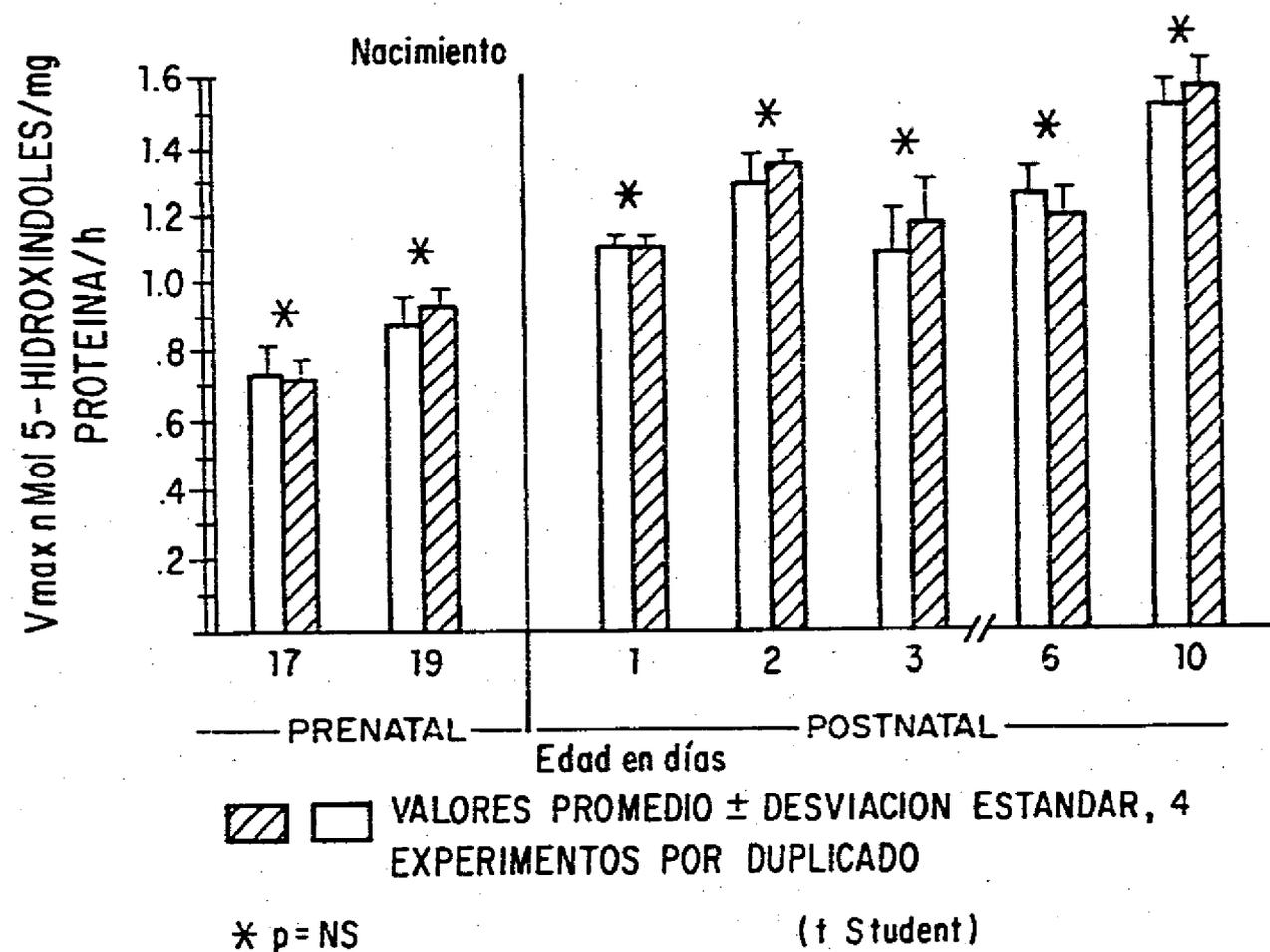
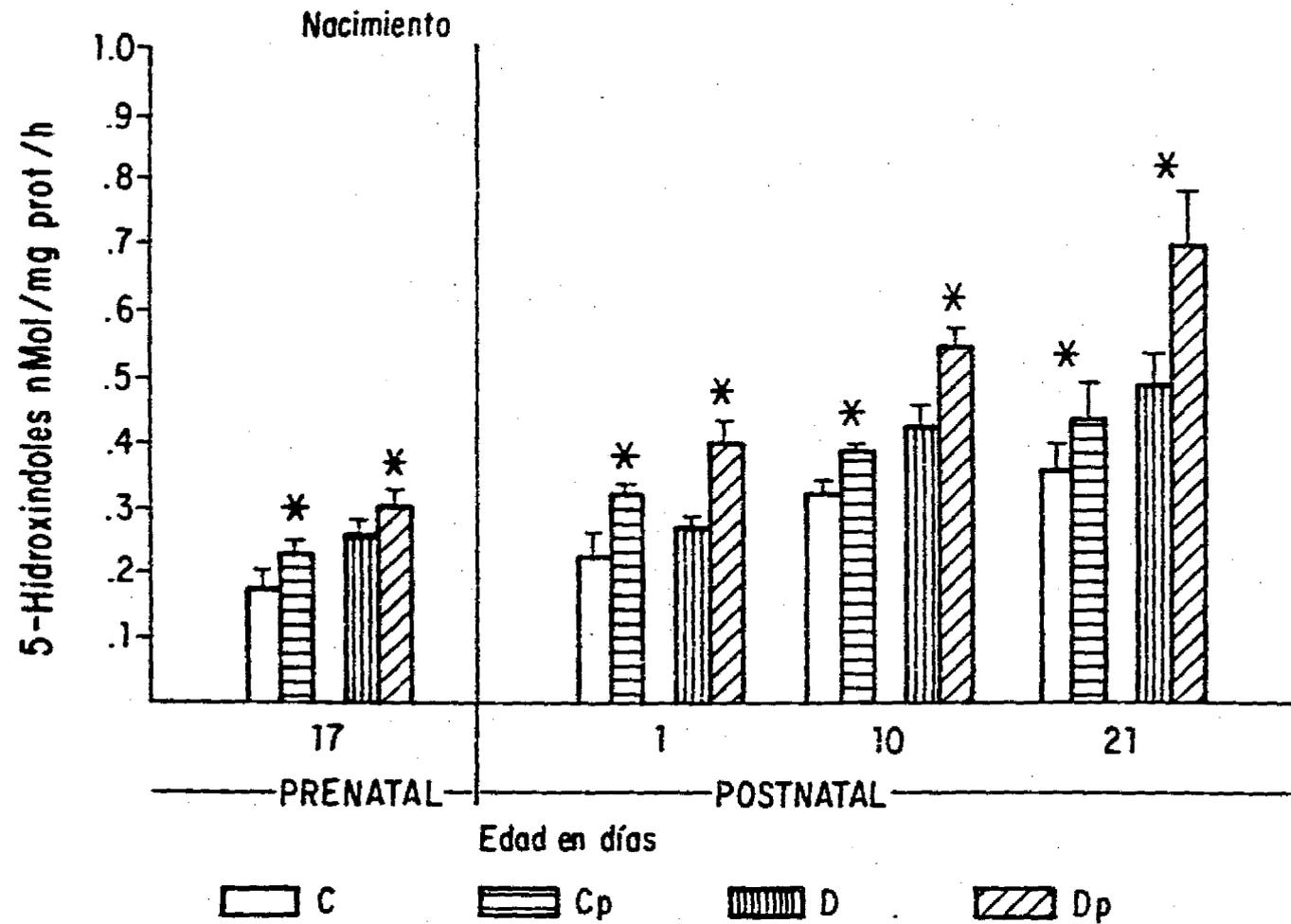


FIGURA. 15

ACTIVACION DE LA TRIPTOFANO-5-HIDROXILASA POR ADENOSIN TRIFOSFATO, MAGNESIO Y CALCIO EN EL CEREBRO DE RATA CON DESNUTRICION PROTEINICO-CALORICA GESTACIONAL Y CONTROLES



ANALISIS DE VARIANZA DE DOS VARIABLES

* $p < 0.01$ (t student)

VIII. ABREVIATURAS

DNA	Acido Desoxirribonucleico
RNA	Acido Ribonucleico
SNC	Sistema Nervioso Central
5-HT	5-Hidroxitriptamina, Serotonina
Na ⁺ /K ⁺ -ATPasa	Sodio-Potasio-Adenosin-Trifosfatasa
L-Trp	L-Triptofano
BHE	Barrera Hematoencefálica
T-5H	Triptofano-5-Hidroxilasa
nM	nanomoles
Da	Dalton
BH ₂	Dihidrobiopterina
BH ₄	Tetrahidrobiopterina
DBR	Dihidrobiopterina reductasa
DAAA	Descarboxilasa de los aminoácidos aromáticos
NAD ⁺	Nicotinamida adenina
NADH	Nicotinamida adenina, forma reducida
H ⁺	Hidrógeno
E	Enzima libre
S	Sustrato
ES	Complejo Enzima-Sustrato
P	Producto
K	Constante de velocidad
Et	Concentración total de enzima
K _m	Constante de Michaelis-Menten
V _{max}	Velocidad máxima de la reacción
B-OH-DPAT	B-hidroxi-2(dipropilamino)
ATP	Adenosin trifosfato
Mg ⁺⁺	Magnesio
Ca ⁺⁺	Calcio
TH	Tirosina hidroxilasa
AMP _o	Adenosin monofosfato ciclico

GMP _c	Guanosin monofosfato cíclico
Ge	Proteína G estimuladora
Gi	Proteína G inhibidora
Re	Receptor estimulador
Ri	Receptor inhibidor
GTP	Guanosin trifosfato
GTPasa	Guanosin trifosfatasa
GDP	Guanosin difosfato
PI	Fosfatidilinositol
IP ₁	Fosfatidilinositol-4-fosfato
IP ₂	Fosfatidilinositol 4,5, bifosfato
IP ₃	Fosfatidilinositol 1,4,5, trifosfato
DG	Diacil glicerol
M	Molar
%	Por ciento
h	horas
°C	Grados centígrados
C	Grupo control
D	Grupo con desnutrición proteínico-calórica
MgCl ₂	Cloruro de Magnesio
CaCl ₂	Cloruro de Calcio
μM	micromolar
V/P	Relación volumen/peso
mm	milímetros
mM	milimolar
6-MPH ₄	6-metil 5,6,7,8 tetrahidrobiopterina
μg	microgramo
ng	nanogramo
ml	mililitro
HCl	Acido Clorhídrico
OPT	Ortoftaldialdehido
nm	nanometros
EGTA	Acido N,N' tetracético etilen glicol bis-(β-amino-etil eter)
BSA	Albúmina de bovino

rpm	revoluciones por minuto
CuSO_4	Sulfato de Cobre
Na_2CO_3	Carbonato de Sodio
NaOH	Hidróxido de Sodio
V/V	Relación volumen/volumen
Dp	Grupo desnutrido fosforilado
Cp	Grupo control fosforilado