

65
zej



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

ACTIVIDAD DE LA DIHIDROBIOPTERINA REDUCTASA
EN EL TALLO CEREBRAL DE RATA DESNUTRIDA IN-UTERO
CON ACTIVACION DE LA SINTESIS DE SEROTONINA

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
B I O L O G O
P R E S E N T A:
GONZALEZ RAMIREZ MISAEL



DIRECTOR DE TESIS: DR. GABRIEL MANJARREZ GUTIERREZ



MEXICO, D.F., CD. UNIV. DE CIENCIAS

MAYO 1997

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

M. en C. Virginia Abrin Batule
Jefe de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
P r e s e n t e

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis:
"ACTIVIDAD DE LA DIHIDROBIOPTERINA REDUCTASA EN EL TALLO
CEREBRAL DE RATA DESNUTRIDA IN-UTERO CON ACTIVACION DE
LA SINTESIS DE SEROTONINA"
realizado por GONZALEZ RAMIREZ MISAEI

con número de cuenta 7614937-7 , pasante de la carrera de
BIOLOGIA
Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis DR. GABRIEL MANJARREZ GUTIERREZ
Propietario

Propietario M. C. MA. TERESA BENITEZ RODRIGUEZ

Propietario DRA. MA. LUISA FANJUL PEÑA

Suplente M. C. MANUEL MIRANDA ANAYA

Suplente BIOLOGO JULIO A. PRIETO SACREDO

FACULTAD DE CIENCIAS

Consejo Departamental de Biología

COORDINADOR

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Neuroquímica de la Unidad de Investigación Médica en Patología Experimental del Hospital de Oncología del C.M.N. S XXI del I.M.S.S. Bajo la dirección del Dr. Gabriel Manjarrez Gutiérrez.

AGRADECIMIENTOS

A mis padres Pablo y Mari; por su amor y ejemplo.

A Alejandra mi esposa; por su paciencia y comprensión.

**A mis hijas Itzel y Jatziri; por que son el motivo de mi
alegría y esfuerzo.**

**Al Dr. Gabriel Manjarrez Gutiérrez; por su excelente
dirección y su amistad.**

**Al Dr. Emilio Castellanos; por las facilidades que me dió
para la elaboración de esta Tesis en la U.I.M. en
Patología Experimental.**

**A mis compañeros de la U.I.M. en Patología
Experimental y del Bioterio; por su amistad y críticas.**

" El problema de la tierra, el problema de la industrialización, el problema de la vivienda, el problema del desempleo, el problema de la educación y el problema de la salud del pueblo; he ahí concretados los seis puntos a cuya solución se hubieran encaminado resueltamente nuestros esfuerzos, junto con la conquista de las libertades públicas y la democracia política. "

" De tanta miseria sólo es posible librarse con la muerte; y a eso sí los ayuda el estado a morir. El 90 % de los niños del campo están devorados por parásitos que se les filtran desde la tierra por las uñas de los pies descalzos. La sociedad se conmueve ante la noticia del secuestro o el asesinato de una criatura, pero permanece criminalmente indiferente ante el asesinato en masa que se comete con tantos miles y miles de niños que mueren todos los años por falta de recursos, agonizando entre los estertores del dolor y cuyos ojos inocentes, ya en ellos el brillo de la muerte, parecen mirar hacia lo infinito como pidiendo perdón para el egoísmo humano y que no caiga sobre los hombres la maldición de Dios. Y cuando un padre de familia trabaja 4 meses al año, ¿con qué puede comprar ropas y medicinas a sus hijos?. Crecerán raquíticos, a los treinta años no tendrán una pieza sana en la boca, habrán oído 10 millones de discursos, y morirán al fin de miseria y decepción. " (1).

Fidel Castro

INDICE

1. Introducción.	
1.1 Epidemiología y Patogenia	1
1.2 Clasificación de la desnutrición	2
2. Sistema serotoninérgico.	
2.1 Localización	7
3. Bioterinas.	
3.1 Historia	12
3.2 Composición química	12
3.3 Síntesis de la tetrahidrobiopterina	14
3.4 Dihidrobiopterina reductasa	16
4. Planteamiento del problema e hipótesis	18
4.1 Objetivos e Hipótesis	19
5. Material y método.	
5.1 Animales de laboratorio	20
5.2 Ensayos bioquímicos	
5.2.1 Determinación de proteínas cerebrales	22
5.2.2 Cuantificación de 5-hidroxitriptamina	23
5.2.3 Actividad de la dihidrobiopterina reductasa	25
6. Resultados.	
6.1 Somatometría	26
6.2 Ensayos bioquímicos	
6.2.1 Proteínas cerebrales	27
6.2.2 5-Hidroxitriptamina cerebral	28
6.2.3 Actividad de la dihidrobiopterina reductasa	28
6.2.4. Tablas	
Tabla 1	30
6.2.5. Gráficas	
Grafica 1	31

Gráfica 2	32
Gráfica 3	33
Gráfica 4	34
Gráfica 5.....	35
Gráfica 6.....	36
7. Discusión	37
8. Conclusiones	43
9. Bibliografía	44
10. Abreviaturas	59

RESUMEN

Esta demostrado que la 5-hidroxitriptamina (5-HT, serotonina) cerebral, se encuentra elevada en el cerebro de las ratas desnutridas durante el desarrollo. La elevación es ocasionada por una mayor afinidad de la triptofano-5-hidroxilasa (TrpOH) por el L-triptofano (L-Trp) y una gran capacidad de fosforilación. El L-Trp del plasma pasa al cerebro en donde es hidroxilado por la TrpOH, que cataliza la inserción de un átomo de oxígeno en la posición 5 del aminoácido, en tanto que el otro átomo es reducido a agua; esta reacción requiere de un cofactor que es la tetrahidrobiopterina (BH4), que dona electrones para reducir el oxígeno, formar oxhidrilo y el quinonoide dihidrobiopterina (QBH2), que de inmediato es reducido a BH4 mediante la enzima dihidrobiopterina reductasa (DBHR), dependiente de nicotinamida-adenin-dinucleótido (NADH).

Con estos antecedentes nos planteamos la hipótesis que la actividad de la DBHR debe de estar aumentada en el tallo cerebral de las ratas desnutridas *in-utero* como un mecanismo necesario en la donación de electrones para la activación de la vía serotoninérgica cerebral.

Se utilizaron ratas hembras, cepa Wistar, adaptadas dos semanas a condiciones ambientales estándar. Al término de este período se formaron dos grupos experimentales: El primero con desnutrición (D), al cual se le restringió la dieta al 50% de la consumida por los controles (C). Después de dos semanas las ratas fueron cruzadas con machos normales. Al nacimiento las crías fueron redistribuidas y mezcladas al azar en camadas de 8 animales. A las edades de 1, 10 y 15 días se obtuvo el tallo cerebral, el cual fue homogeneizado en una solución apropiada para los ensayos bioquímicos; actividad de la DBHR y la concentración de 5-HT; además se realizaron curvas de peso corporal, cerebral y de la longitud céfalo-sacra.

Se observó en el grupo desnutrido un retraso significativo del crecimiento corporal, cerebral y de la longitud céfalo-sacra. Además una elevación de la concentración de 5-HT cerebral en comparación al grupo control. En cuanto a la actividad de la DBHR existió un aumento significativo en relación al grupo control a las edades estudiadas.

Los resultados confirman que la desnutrición gestacional produce un déficit en el crecimiento físico y una aceleración de la síntesis de 5-HT cerebral. Además sugieren un aumento en la actividad de la DBHR en el cerebro desnutrido, como mecanismo compensador en la donación de electrones necesarios en la síntesis del neurotransmisor.

1. INTRODUCCION

1.1 Epidemiología y patogenia

La desnutrición representa actualmente un problema de salud pública a nivel mundial, los países del tercer mundo, principalmente los países latinoamericanos son los más agobiados por este mal. Diversas estadísticas señalan que aproximadamente el 44 % de la población presenta algún grado de desnutrición; siendo los más afectados, los niños, las mujeres, los jóvenes, los discapacitados y los indígenas (2-7).

La desnutrición la podemos definir como un estado patológico inespecífico, sistémico y potencialmente reversible que se puede producir por la toma inadecuada de alimento o por la incapacidad del organismo de utilizar los nutrimentos, específicamente las células (3, 8-11). Varios autores han tratado de señalar que las causas de la desnutrición son; la falta de alimento y otros más lo atribuyen al ambiente; sin embargo la interacción entre el ambiente y la nutrición es compleja y difícil de separar (9, 12-18). Las principales causas que originan la desnutrición han sido ampliamente discutidas y existen datos que permiten afirmar que el desarrollo y crecimiento del organismo se afecta por factores derivados, tanto por la restricción de los alimentos como por el ambiente de pobreza en que habitualmente se presenta (9, 12-19).

La incidencia de la desnutrición en sus distintos cuadros clínicos es variable y depende de cada área geográfica, del entorno cultural, de la disponibilidad de los alimentos y de los factores propios de cada región (clima,

precipitación pluvial, etc); sin embargo cualquiera de estos factores participa en la etiología de la desnutrición (20-24).

1.2 Clasificación de la desnutrición

Existen varias formas de clasificar a la desnutrición: Por su etiología puede ser primaria, secundaria y mixta. La desnutrición primaria es la que depende de la inadecuada ingesta cuantitativa o cualitativa de los nutrimentos; la desnutrición secundaria es la que obedece a las pérdidas calóricas aumentadas o a defectos en la absorción o asimilación, lo que resulta es una desproporción metabólica entre el catabolismo exagerado y un anabolismo deficiente, no obstante que la ingestión de los nutrimentos sean satisfactorios y adecuados. La desnutrición mixta, tal vez la más frecuente, ocurre cuando además de la insuficiente ingestión de alimentos, existen al mismo tiempo otras condiciones patológicas (fiebre, diarrea, etc), que aumentan el desgaste calórico, las excreciones y el catabolismo en el organismo (25).

La desnutrición en los niños por lo general es primaria, aún cuando un gran número de casos resultan con desnutrición mixta. Clínicamente comprende numerosos cuadros patológicos que van desde los muy cercanos a la normalidad, hasta aquellos que son de extrema gravedad y que desde el punto de vista social constituyen un grave problema de salud pública (2-7, 25).

La desnutrición además ha sido dividida en tres grados de acuerdo al dato somatométrico más importante que es el peso de los niños para la edad (8). La de primer grado es aquella en la que el niño pesa de 10 a 25 % menos

de lo normal; la de segundo grado corresponde a niños que pesan 26 a 40 % menos de lo normal. Y la de tercer grado es la condición en la que se encuentran los niños que les faltan más del 40 % del peso normal. Por supuesto, que al valorar las condiciones clínicas de un caso de desnutrición, no sólo se debe tener en cuenta el dato fundamental que es el peso corporal, sino igualmente las otras medidas somatométricas, esencialmente la talla, así como las condiciones clínicas integrales (25).

La desnutrición puede ser clasificada también por el tiempo de evolución en: Aguda, al existir la restricción completa de los nutrimentos que le impide al organismo emplear sus mecanismos de adaptación metabólica. Al ser tratada oportunamente esta cederá con facilidad. La subaguda, de recuperación más lenta y la mayoría de los daños son reversibles. Y la grave, este tipo de desnutrición es habitualmente de larga evolución y por lo tanto requiere mayor tiempo para su recuperación y en ocasiones esta no es completa (9, 20-25). Por tal razón el enfoque terapéutico del niño desnutrido grave, debe ser por lo general la hospitalización, las más de las veces por tiempo prolongado y el tratamiento va encaminado a la recuperación física del niño y con frecuencia se retrasa o simplemente no se le da la importancia debida a la rehabilitación psicológica. La magnitud del problema es mayor si se considera que los niños que sobreviven a una desnutrición grave presentan secuelas en el plano psicológico, siendo el más documentado el bajo rendimiento intelectual, con evidentes repercusiones humanas, sociales y económicas (12-15, 26-33).

Se sabe que para el desarrollo y crecimiento normal del organismo durante la época fetal, se requiere de la interacción de factores feto-maternos, tales como: la integridad de las membranas feto-placentarias, el paso adecuado de nutrimentos, la excreción de catabolitos a través de la placenta y de los mecanismos de difusión y área de intercambio placentario, así como la adecuada interacción inmunológica y sanguínea del feto y la madre, lo que permite una adecuada multiplicación y crecimiento celular (ver figura 1) (34-40). Cuando no se logra la interacción de estos factores feto-maternos, se origina un retraso del crecimiento y desarrollo intrauterino (RCDI), que también se conoce como desnutrición intrauterina (DIU); cuyo grado de severidad está en relación a la etapa fetal en la que se inicia; si da comienzo en la etapa temprana de la gestación, el daño que se produce es la falta de la división celular, si se presenta en la parte final del crecimiento fetal; el desarrollo celular es el afectado (34-35, 40).

Diversos estudios en animales de experimentación en los que se ha producido desnutrición pre y posnatal se han observado efectos generales sobre el crecimiento y desarrollo del organismo; a nivel molecular se observa un bajo contenido de ácido desoxirribonucleico (ADN) y del ácido ribonucleico (ARN) en las células del cerebro, hígado y riñón; disminución de la síntesis de mielina y de las sinápsis cerebrales (34, 35, 41-44), reducción del peso corporal, alteraciones en la estructura, composición y función intestinal (45-46), además se ha comprobado que existe una disminución del peso de las gónadas y de los

órganos accesorios del aparato reproductor (47). También estos modelos experimentales de la desnutrición han permitido confirmar que la restricción de nutrimentos en los diferentes periodos vulnerables del desarrollo y crecimiento del Sistema Nervioso Central (SNC), que para los humanos van desde la gestación hasta el segundo año de vida posnatal, producen un daño irreversible en su estructura y composición bioquímica (41-44).

La desnutrición por lo tanto, produce alteraciones de orden general que hace difícil la interpretación de los cambios funcionales en el SNC. La búsqueda de estas alteraciones sobre sistemas de neuronas con función específica causados por la DIU, se pueden considerar como el punto de partida para la mejor comprensión de sus repercusiones funcionales. Diversas evidencias experimentales han demostrado que un grupo de neuronas que se altera en el cerebro durante la gestación es el sistema serotoninérgico (48-53).

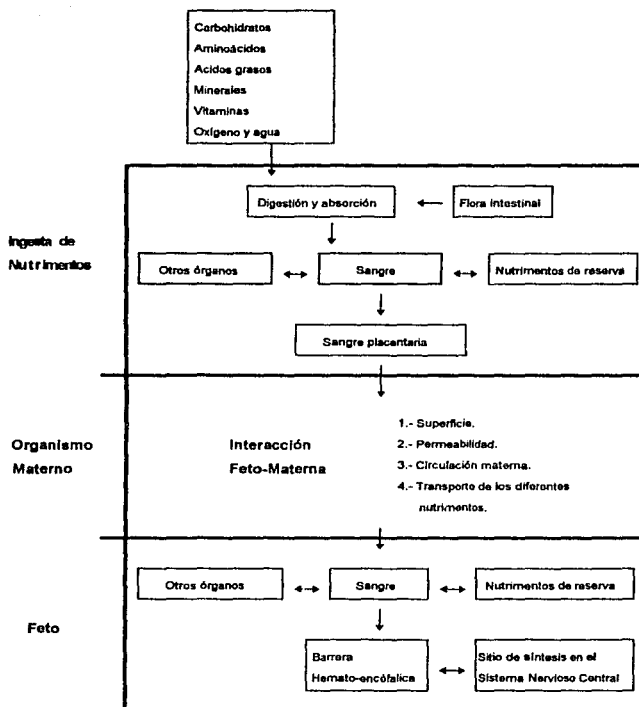


Figura 1. Representación esquemática del flujo de nutrientes al sitio de síntesis de los componentes celulares. Modificado de Zamenhof & Van Marthens (1978).

2. SISTEMA SEROTONINERGICO

2.1 Localización

El sistema serotoninérgico en la rata se localiza en el tallo cerebral, se halla integrado por nueve grupos de neuronas, a los cuales se les ha denominado con la letra B y han sido enumerados del 1 al 9 (ver figura 2), (54-59). El grupo B1 se localiza dentro del núcleo del *rafé pallidus*, alrededor de la superficie medial y ventral del haz piramidal. B2 está en el *rafé obscurus*; el B3 es más anterior que el B1 y también está rodeado por el haz piramidal; el grupo B4 es pequeño y está localizado abajo del cuarto ventrículo y en la parte dorsal del núcleo vestibular y del núcleo del nervio *Abducens*. En el cerebro medio los grupos B7 y B8 también ocupan la posición media del núcleo dorsal y del *rafé medio*. El grupo B9 está localizado ventral y lateralmente alrededor del *Lemniscus* medial. Las prolongaciones axónicas de estos grupos de neuronas forman las vías serotoninérgicas que se dirigen a diferentes áreas del SNC; los grupos B1, B2 y B3, inervan el cuerno ventral de la médula espinal y la columna lateral simpática, el cerebelo es inervado principalmente por los grupos B7 y B8, pero también se encuentran proyecciones del B5 y el B6, los grupos B7 y B8 inervan la mayor parte de las áreas del cerebro anterior (60).

Por métodos inmunocitoquímicos, ha sido posible conocer la trayectoria de las fibras serotoninérgicas que inervan al cerebro anterior, que parten desde el núcleo del *rafé medio* y se continúan por el haz medial del cerebro anterior ascendiendo al *forhix*, *septum* y otras áreas del cerebro. Una vía ascendente

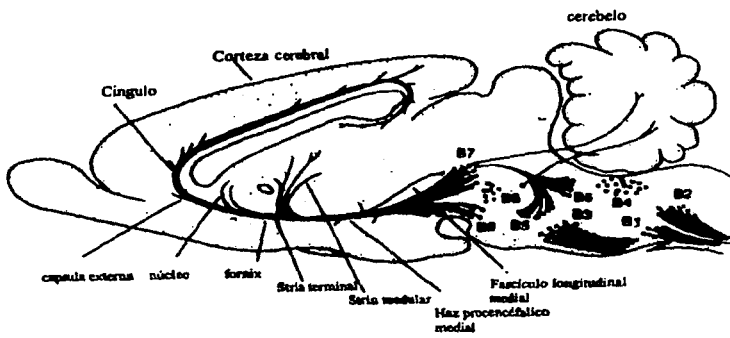


Fig. 2. Esquema de las vías serotoninérgicas del cerebro de rata (modificado de Role L. y Kelly J., 1991).

media inerva al hipotálamo y al área preóptica, esta vía se origina de los grupos neuronales B7, B8 y B9. Existe un haz lateral que inerva principalmente al sistema motor extrapiramidal y que también deriva de los grupos B7, B8 y B9. Además los núcleos del rafé medio, también inervan la línea de células ependimarias de los ventrículos (59).

Se ha descrito el desarrollo y distribución del sistema serotoninérgico en el encéfalo de fetos de rata (61) y de humanos, en estos últimos desde la semana 15 de gestación (62-64). Este sistema de neuronas se regula por un neurotransmisor específico que es la 5-hidroxitriptamina (5-HT, serotonina), que también actúa como un neuromodulador (65).

La 5-HT cerebral llena todos los requisitos para ser considerada un neurotransmisor (66-68), su maquinaria biosintética se localiza en el soma y en las terminales nerviosas de las células serotoninérgicas, así como las enzimas catabólicas correspondientes; además se ha identificado un sistema de receptores específicos en neuronas blanco de diferentes regiones del cerebro de rata adulta y durante el desarrollo (69-73). Este neurotransmisor participa en diversas funciones del SNC, durante la embriogénesis y etapas posteriores de maduración cerebral, tiene un importante papel en el crecimiento y diferenciación neuronal (74-77), además interviene en la regulación de los ciclos de sueño y vigilia (78-79), en los impulsos nociceptivos (80-83), en la termorregulación (84-85), en el control de la ingesta de alimentos (86-87), en el comportamiento sexual (88), en la liberación de hormonas hipofisarias (89);

también se le ha relacionado con diferentes aspectos de la conducta temporal (89, 90-93). A nivel celular está involucrada en la regulación de la actividad de la $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPasa o bomba de $\text{Na}^+\text{-K}^+$ (94-97). De ahí la relevancia de que cualquier modificación temprana de este sistema produzca alteraciones a corto y largo plazo y se manifiesten en el desarrollo ulterior del cerebro adulto (98-100).

Existe suficiente evidencia experimental que apoya la relación entre la nutrición, el contenido de L-triptofano plasmático (L-Trp) y la síntesis de 5-HT cerebral. En experimentos con ratas que fueron sometidas a períodos de ayuno corto o bajo regímenes de nutrición hipoproteínica-hipoenergética prolongada durante la vida intrauterina y posnatal, se observó que la fracción libre del L-Trp plasmático aumentó y en el cerebro se elevó la concentración de dicho aminoácido y de la 5-HT (98-100). Por otro lado en animales normales a los que se les 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. Además cuando se les dió un suplemento de L-Trp a razón de 50 mg/Kg de peso a ratas durante la gestación, aumentó la actividad de la enzima triptofano-5-hidroxilasa (L-triptofano-5-monooxigenasa, EC 1.14.16.4, TrpOH) en el cerebro fetal (97,101-102) así como en la etapa posnatal, lo mismo ocurrió con la concentración del neurotransmisor y del ácido 5-hidroxiindolacético, lo que sugiere que existe una activación importante de esta vía metabólica cerebral (49-53, 97,101).

Estudios en ratas sometidas a un esquema de desnutrición temprana han demostrado que el metabolismo de la 5-HT cerebral se encuentra alterado (97-99) y sus niveles aumentados, este incremento esta ocasionado por una elevación del L-Trp y de la actividad de la TrpOH, esto a su vez secundario a un desequilibrio entre la fracción libre y unida del L-Trp plasmático, en favor de la primera (49-53, 96-100).

El L-Trp es un aminoácido esencial en el organismo, por lo que se debe obtener de las proteínas de la dieta. Se encuentra en el plasma sanguíneo en dos fracciones, una de ellas unida a la albúmina y la otra libre (103). La primera se utiliza en varias vías metabólicas, como la de los ácidos cinurénico, nicotínico, y en la síntesis de proteínas (104). La segunda tiene la función especial de servir como precursor de la síntesis de serotonina (105-110). La relación que guarda la fracción del L-Trp unido a la albúmina y la libre, determina que ésta última pase en mayor o menor concentración al cerebro a través de la barrera hemato-encéfalica (BHE) por un mecanismo de transporte activo que está mediado por un sistema de transporte membranar. Una vez que el L-Trp se encuentra en el tejido nervioso (111-112), de inmediato es captado por las neuronas serotoninérgicas donde es hidroxilado en su posición cinco por la triptofano 5 hidroxilasa (113-115), el 5-hidroxitriptofano (5-HTP) formado, es descarboxilado por la descarboxilasa de los aminoácidos aromáticos (116-117) para producir serotonina (118-120).

La TrpOH es la enzima limitante de la biosíntesis de 5-HT cerebral, requiere de la participación de un cofactor, que es la tetrahidrobiopterina (BH₄) que dona electrones para la hidroxilación del aminoácido. La BH₄ pertenece al grupo de las biopterinas (121-123).

3. BIOPTERINAS

3.1 Historia

El término pterina originalmente se le aplicó al factor que se hallaba en los pigmentos de las alas de las mariposas, en la actualidad se usa para la pteridina de origen natural, que tiene la estructura de 2-amino-4-hidroxipteridina, como se muestra en la figura 3. Hay dos grupos de pteridinas naturales, uno es el grupo conjugado, como los derivados del ácido fólico y el otro grupo es el de la pteridina no conjugada que tiene una cadena lateral en la posición 6; las biopterinas pertenecen a este grupo (124-127).

3.2 Composición química

El grupo "biopterina" abarca varios compuestos que tienen la estructura 2-amino-4-hidroxipteridina, los que existen en sus formas tetrahidro, dihidro o completamente oxidadas. Las biopterinas, la molibdopterinas y las pterinas pertenecen al grupo de pteridinas no conjugadas, en tanto que el folato se conoce como pteridina conjugada; esto se debe a la unión del p-aminobenzilglutamato a la pteridina (ver figura 3), (128-129).

La BH₄ es el cofactor principal de una familia de hidrolasas de los aminoácidos aromáticos (130). Las tres hidroxilasas pteridin-dependientes son:

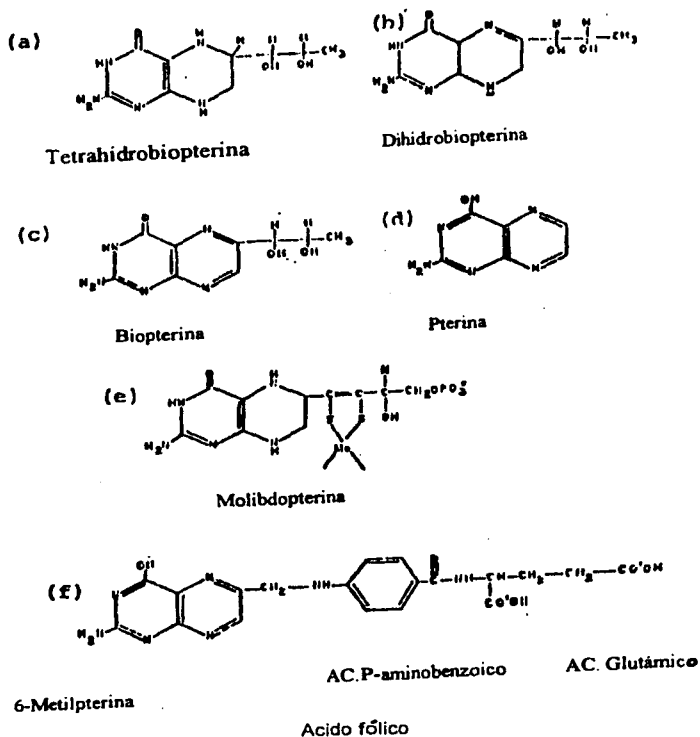
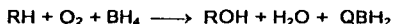


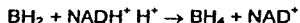
Fig. 3. Estructuras químicas de las pteridinas no conjugadas (a,b,c,d y e) y conjugada (f). La familia de las biopterinas está constituida por a,b y c (modificado de Nagatsu T y col. 1989).

la fenilalanina hidroxilasa (EC 1.14.16.1), la tirosina hidroxilasa (EC 1.14.16.2) y la triptofano-5-hidroxilasa; las dos primeras enzimas catalizan la biosíntesis de las catecolaminas (dopamina, noradrenalina y adrenalina) y la última es la enzima limitante en la biosíntesis de la 5-HT y de la melatonina (131). La reacción química general que cataliza cualquiera de las tres hidroxilasas como la TrpOH, es la siguiente:



Donde el RH corresponde al L-Trp; BH_4 a la tetrahidrobiopterina; ROH al producto y QBH_2 al quinonoide dihidrobiopterina.

El QBH_2 sufre una tautomerización espontánea y se transforma a dihidrobiopterina (BH_2) que es el catabolito de la BH_4 . Además la mayor parte del QBH_2 es reducido a BH_4 (132), por medio de la dihidrobiopterina reductasa (DBHR) dependiente de nicotinamida adenin dinucleótido ($NADH^+$). La reacción química general que cataliza la DBHR es la siguiente:

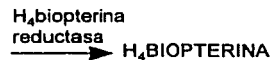
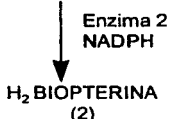
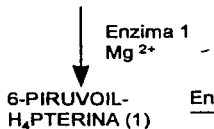
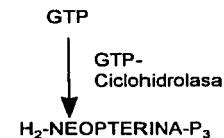


Esta reacción se conoce como "vía de salvamento o recuperación" (132).

3.3 Síntesis de tetrahidrobiopterina

La biosíntesis de la BH_4 se lleva a cabo en el tejido nervioso, esta se resume en la figura 4. El guanosin-5-trifosfato (GTP) es el precursor metabólico de esta cadena bioquímica, es catalizado por la GTP ciclohidrolasa (GTP CH) enzima limitante de esta vía y forma la dihidroneopterina trifosfato; este compuesto es transformado a 6-piruvoil tetrapterina por medio de la enzima 1

**VIA DE NOVO O
(PRIMARIA)**



**VIA DE SALVAMENTO O
(SECUNDARIA)**

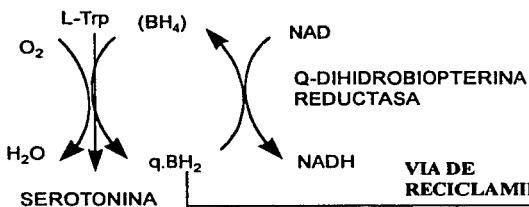
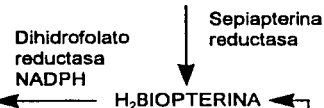
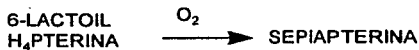


FIG. 4 Esquema de la vía biosintética de la tetrahydrobiopterina. (Modificado de Nichol et al., 1983 and Smith and Nichol, 1984.)

dependiente de magnesio (Mg^{2+}). La 6 piruvoil tetrapterina por medio de la actividad de la enzima 2 dependiente de NADH, es reducida a tetrapterina y a su vez este compuesto es catalizado por la enzima tetrabiopterina sintetasa o probablemente por la sepiapterina reductasa, mecanismo aún no estudiado completamente. El producto de esta reacción es la tetrahidrobiopterina la cual ingresa al ciclo para formar dihidrobiopterina. Esta vía es considerada como la vía primaria o de síntesis *de novo*. El 6 piruvoil tetrapterina es el sustrato que da origen a la vía secundaria o de salvamento, por la acción de una enzima aún no determinada produce el 6-lactoil tetrapterina; este compuesto es oxidado a sepiapterina, luego es reducido en presencia de NADH por la sepiapterina reductasa para formar BH_2 , que a su vez es oxidado por la enzima dihidrofolato reductasa dependiente de NADH para formar tetrahidrobiopterina, la cual ingresa al ciclo y forma el QBH_2 y la BH_2 (133).

3.4 Dihidrobiopterina reductasa (EC 1.6.99.7, DBHR)

La DBHR ha sido aislada en el hígado de oveja, de bovino, en el cerebro de los humanos y de las ratas; también se ha demostrado en una especie de pseudomonas (134-135). Es una proteína dimérica constituida de dos péptidos idénticos, sus pesos moleculares oscilan entre 21000 y 27000 Da. Existe una estrecha similitud en la secuencia de los aminoácidos entre las enzimas del cordero, de los bovinos y de los humanos. Además se ha clonado el gen que la codifica y tiene un patrón de expresión similar en todas las DBHR aisladas (136-137)

La DBHR participa activamente en la cadena biosintética de la serotonina cerebral, juega un papel básico en la hidroxilación del precursor metabólico, el L-Trp para la formación del neurotransmisor; es la enzima encargada de mantener la concentración necesaria de BH_4 , a través de la reducción del QBH_2 , que requiere de la participación activa de $NADH^+$ como donador de electrones en la cadena biosintética de la 5-HT cerebral (138-140).

4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La desnutrición proteínico-energética produce una aceleración de la cadena biosintética de la 5-HT cerebral (100-105), debido a un mayor paso de la fracción libre del L-Trp plasmático al cerebro a través de la BHE, esto a su vez secundario a un desequilibrio entre la fracción unida a albúmina y la libre del aminoácido en favor de esta última. En base a los resultados reportados por nuestro laboratorio (48-53, 97), se observa que los principales elementos de esta vía metabólica cerebral: el sustrato L-Trp, la actividad de la enzima TrpOH y la concentración del producto, la 5-HT están elevados; lo que sugiere que existe un aumento de la actividad metabólica en las neuronas serotoninérgicas (98, 102-104). Esto nos permite plantear que al haber una mayor actividad de la TrpOH y en consecuencia una mayor hidroxilación del L-Trp en la posición cinco, se requiere de una mayor concentración del cofactor, la BH_4 , a través de un aumento de la actividad de la DBHR como un mecanismo compensador en la donación de electrones para la síntesis acelerada del neurotransmisor.

4.1 OBJETIVOS

4.1.2 Objetivo general

Conocer los efectos que produce la desnutrición *in utero* sobre la actividad de la dihidrobiopterina reductasa en el tallo cerebral de rata.

4.1.3. Objetivos específicos

- a) Medir la concentración de serotonina cerebral en rata desnutrida *in utero* y controles.
- b) Cuantificar la concentración de proteínas cerebrales en rata desnutrida *in utero* y controles.
- c) Determinar la actividad de la dihidrobiopterina reductasa en el tallo cerebral de rata desnutrida durante la gestación.
- d) Somatometría de ratas con desnutrición proteínico energética y sin déficit nutricional.

4.2 HIPOTESIS

La desnutrición *in utero* produce un aumento de la actividad de la dihidrobiopterina reductasa en el tallo cerebral de ratas con aceleración de la síntesis de serotonina cerebral.

5. MATERIAL Y METODO

5.1 Animales de laboratorio

En el presente trabajo se utilizaron 90 ratas, de la cepa Wistar, hembras nuliparas, con peso de 229.5 ± 21.6 g desviación estándar (DE), adaptadas durante dos semanas a condiciones ambientales estándar; 65 % de humedad, temperatura $23 \text{ }^\circ\text{C} \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$, períodos de luz y oscuridad de 12 h, el período de luz de las 7:00 a las 19:00 h y el de oscuridad de las 19:00 a las 7:00 h; procurando darles un manejo mínimo. Durante este período de adaptación las ratas fueron alimentadas con un régimen nutricional a libre demanda tanto de agua como de alimento (Laboratory rodent diet 5001 The Richmond Standar PMI feeds Inc), cuya composición es a base de maíz, harina de frijol, pulpa de remolacha, harina de pescado, avena, preparado seco de levadura, melaza, alfalfa, suero seco, germen de trigo, grasa animal, sal, carbonato de calcio, cloruro de colina, colecalciferol, acetato de vitamina A, hidrocloreuro de piridoxina, mononitrato de tiamina, ácido nicotínico, pantotenato de calcio, acetato DL-alfa-tocoferol , DL metionina, riboflavina, ácido fólico, cianocobalamina, sulfato ferroso, óxido de manganeso, óxido de zinc, carbonato ferroso, sulfato de cobre, sulfato de zinc, carbonato de cobalto, proteínas 23 %, grasas 4.5 %, fibra 6.0 %, ceniza 8.0 % y minerales 2.5 %.

Después de este período las ratas fueron divididas en dos grupos; un grupo control (C) al cual se le alimentó a libre demanda y agua *ad-libitum* y el otro grupo se formó con ratas a las que se les provocó desnutrición proteínico-

energética (D), para lo cual fueron alimentadas con el 50 % del alimento ingerido en 24 h por el grupo C. En ambos grupos experimentales el esquema nutricional se mantuvo durante dos semanas. Posterior a este período las ratas de ambos grupos fueron apareadas con machos alimentados normalmente. Durante el periodo de gestación los animales de ambos grupos experimentales continuaron con las mismas condiciones ambientales y nutricionales.

Al nacimiento las crías de ambos grupos fueron mezcladas entre sí y redistribuidas al azar a diferentes madres del mismo grupo experimental para formar camadas de ocho animales y con ello se disminuirán las diferencias individuales y de camada. A las edades de 1, 10, 15 y 21 días de vida, se tomaron crías de cada grupo, se pesaron y se les tomó la longitud céfalo-sacra (LCS). Después fueron sacrificadas por luxación cervical, se les disecó el tallo cerebral, y en otras se obtuvo el cerebro completo, se pesó y posteriormente se formó una mezcla de ocho tallos y ocho cerebros. Inmediatamente después el tejido fue homogeneizado en soluciones amortiguadoras específicas para cada ensayo. Con estos tejidos se realizaron los siguientes ensayos bioquímicos: actividad de la DBHR, proteínas totales y 5-HT cerebral.

El criterio de desnutrición que se empleó fue que el peso corporal de las ratas fuera significativamente menor al peso del grupo C, con un déficit mayor al 10 % del peso corporal y para disminuir las probables variaciones inducidas por los ciclos circadianos, la obtención y disección del tejido cerebral, siempre se realizaron entre las 09:00 y 11:00 h.

La cantidad de alimento ingerido en 24 h por los animales del grupo C fue de 18.9 ± 1.2 g DE antes de la gestación, durante la gestación de 23.2 ± 1.9 g DE y en la lactancia de 52.1 ± 8.2 g DE, por lo tanto la cantidad de alimento proporcionado a los animales del grupo D en cada período estudiado fue de 9.45 ± 0.6 , 11.6 ± 0.9 y de 26.05 ± 4.1 g DE respectivamente.

5.2 ENSAYOS BIOQUIMICOS

5.2.1 Determinación de proteínas cerebrales

Las proteínas tisulares fueron cuantificadas mediante Lowry (141), usando albúmina bovina como estándar. El tejido cerebral se diluyó 40 veces, de esta dilución se tomaron 0.1 ml; la reacción se inició al agregar 0.5 ml del reactivo A; el cual contiene 0.5 ml de CuSO_4 al 1 % y 0.5 ml de tartrato de sodio y potasio al 2% en 50 ml de Na_2CO_3 al 2 % diluido en NaOH 1N. La mezcla de la reacción se agitó vigorosamente y se dejó en reposo a temperatura ambiente; después de 10 min se agregó 0.05 ml del reactivo B: el reactivo B es reactivo de Folin diluido 1:1 con agua bidestilada volumen/volumen (v/v), la muestra se agitó y a los 30 min se midió el color en un Espectrofotómetro PYE Unicam SP8-100 UV/VIS a 700 nm. En cada ensayo se incluyó una curva estándar de cantidad conocida de albúmina; la concentración de las proteínas cerebrales se expresaron en mg por g de tejido húmedo.

5.2.2 Cuantificación de 5-hidroxitriptamina

La 5-HT cerebral se cuantificó por el método espectrofluorométrico descrito por Curzon y Green (142). El tejido cerebral se homogeneizó en HClO_4

0.4 N, más pargilina 10^{-4} M y ácido ascórbico al 5 %, en un politrón Brinkmann Instruments, a velocidad de 5, durante diez segundos, el vástago fue lavado con un ml de agua bidestilada y un ml de HClO_4 , 0.4 N, el cual se agregó al homogeneizado; se centrifugó a $3000 \times g$ durante 15 min en una centrifuga Sorvall RC5C refrigerada a 4°C . Del homogeneizado desproteinizado, la pastilla fue descartada y al sobrenadante se le adicionó 0.5 ml de una solución amortiguadora de fosfato de sodio, 0.01 M, pH de 6.0, más una gota del indicador universal Merck con rango de pH de 4 a 10, se ajustó el pH del sobrenadante a 6 con K_2CO_3 4 N; se aforó a diez ml con agua bidestilada y permaneció en reposo durante 24 h a 4°C . Después las muestras fueron centrifugadas a $3000 \times g$, 5 min en una centrifuga Sorvall RC5C a 4°C .

El sobrenadante se pasó a través de columnas de resina de intercambio catiónico Bio Rad 70, 200 a 400 de malla, en forma de sodio. Las columnas de vidrio de 3.5 cm de diámetro y 9 cm de altura fueron montadas en una gradilla, se les colocó en la punta lana de vidrio; en agitación constante fueron llenadas con resina previamente lavada, a una altura de 1.5 cm, con una dimensión de 252.1 mm^3 , se eliminaron las burbujas de aire de la resina y las columnas fueron equilibradas a pH 6.1 con 3 ml de amortiguador de fosfatos de sodio 0.2 M. La 5-HT cerebral se separó al pasar el sobrenadante por las columnas de resina, las cuales fueron lavadas con 4 ml de agua bidestilada. El eluido se obtuvo con 1.5 ml de ácido acético 1N; del eluido se tomó 0.5 ml para la cuantificación de la serotonina separada, el eluido fue transferido a tubos de borosilicato que

contenían 0.05 ml de una solución de cisteína al 1%, se les agregó 0.6 ml de HCl 12 N y la fluorescencia fue inducida al agregarles a los tubos 0.05 ml de orto-ftaldialdehído (OPT) en metanol al 0.1%, la mezcla de la reacción se agitó vigorosamente y se calentó a 95 °C por 10 min.

En cada ensayo se incluyeron: a) una cantidad conocida de 5-HT como estándar interno, así como a la resina para determinar su rendimiento. b) además se incluyó una curva estándar de 5-HT sin pasar por las columnas, c) los tubos blanco fueron hervidos con todos los componentes de la reacción menos OPT, el cual se agregó a los tubos al enfriarse a temperatura ambiente. La fluorescencia se midió en un espectrofluorómetro Aminco Bowman a 360 nm de excitación y 485 nm de emisión. La concentración de 5-HT cerebral fue expresada en ng por g de tejido húmedo.

La resina de intercambio catiónico Bio Rad 70, de 200 a 400 de malla en forma de sodio se preparó en la forma siguiente (142), se lavó en agitación constante 70 g de resina (peso húmedo); cuatro ocasiones con 250 ml de agua bidestilada, 15 min en cada lavado; 4 ocasiones con NaOH 1N una hora en cada lavado y 5 veces con 250 ml de agua bidestilada, la resina se dejó toda la noche con el último lavado. Al día siguiente la resina se lavó una ocasión con 250 ml de agua bidestilada durante 10 min, el pH fue aproximadamente de 9, después se lavó una ocasión con 170 ml de HCl 1 N en etanol v/v durante 4 h, se enjuagó 4 veces con 250 ml de agua bidestilada y se dejó la resina con el último enjuague por 24 h, el pH del sobrenadante fue aproximadamente de 3. Al

día siguiente se le agregó NaOH 1N para alcanzar en el sobrenadante un pH entre 8 y 9, se decantó y se lavó dos veces con 250 ml de metanol en agua 60% v/v; el primero durante una hora y el segundo toda la noche. Por último la resina se lavó 4 veces con 250 ml de agua bidestilada y 4 ocasiones con una solución amortiguadora de fosfato de sodio 0.1 M, pH 6.5, la resina se almacenó a 4 °C.

5.2.3 Actividad de la dihidrobiopterina reductasa

El tallo cerebral fué homogeneizado en en una solución amortiguadora de tris-HCl 0.1 mmol, pH 6.8 en un volumen final de 2.5 ml, se centrifugó 10 min a 12398 x g en una centrifuga Sorvall superspeed RC2-B a 4°C, posteriormente el sobrenadante fue desalado en columnas de Sephadex G-25 y se centrifugó a 279 x g, durante 1.5 min (143). La actividad de la dihidrobiopterina reductasa se llevó a cabo por el método espectrofotométrico de Nielsen (139), el cual consistió en adicionar 0.1 mmol de H₂O₂, peroxidasa 5 µl, en tris 0.1 mmol, pH 6.8 y 1 mg de proteína a dos celdas colocadas en un espectrofotómetro con doble haz de luz, a 30 °C. Inmediatamente después se les adicionó 0.1 mmol de 6-metil-tetrahidrobiopterina a una de las celdas y la reacción se inició al agregar 0.1 mmol de NADH⁺ a ambas celdas. La diferencia de extinción a 340 nm de los dos sistemas fue observada cada 15 segundos, hasta que la densidad óptica (DO) alcanzó un valor constante. La diferencia de ambas curvas correspondió a la actividad de la dihidrobiopterina reductasa expresada en µmoles de NADH oxidado/minuto/mg de proteína.

6. RESULTADOS

6.1. Somatometría

En la gráfica 1 se muestra el patrón de desarrollo del peso corporal en ambos grupos de ratas D y C. Como se puede observar el grupo C mostró un crecimiento ascendente desde el nacimiento hasta los 21 días de vida posnatal, el mismo patrón se observó en el grupo D; sin embargo existió una disminución significativa del peso corporal ($p < 0.001$), en comparación al grupo C a todas las edades estudiadas. El déficit de peso fue de 26.0, 49.3, 38.5, y 56.0 % a las edades de 1, 10, 15 y 21 días respectivamente.

Con respecto a las curvas de crecimiento de la longitud céfalo-sacra de los grupos D y C, se muestran en la gráfica 2. Se observó en el grupo C un patrón ascendente, al igual que en el grupo D. Además se encontró que el grupo D tuvo un incremento total del 46 % desde el nacimiento hasta los 21 días de vida posnatal, con un retraso significativo desde el nacimiento hasta los 21 días de vida extrauterina ($p < 0.0001$) (ver tabla 1). El déficit de la LCS fue de 12.8, 29.8, 25.2 y 22.3 % a las edades de 1, 10, 15 y 21 días de vida posnatal respectivamente en comparación con el grupo C.

En la gráfica 3 se muestran los patrones de crecimiento del peso cerebral en los grupos D y C, como se ilustra, el grupo C presentó un patrón de desarrollo ascendente desde el nacimiento hasta los 21 días de vida posnatal. En la misma figura se observa el patrón de desarrollo que mostró el grupo D, fue menor al grupo C; y existió una disminución significativa del peso cerebral a

todas las edades estudiadas ($p < 0.0001$); el déficit fue de 19.7, 27.1, 20.4 y 34.9 % a los días 1, 10, 15 y 21 días de vida posnatal en el grupo D con respecto al grupo de ratas sin déficit de peso.

En la tabla 1, se pueden observar los incrementos de peso corporal, peso cerebral y la LCS en los grupos de ratas con desnutrición *in-utero* y controles. En relación al incremento del peso corporal en el grupo D se observó un déficit significativo durante el período estudiado ($p < 0.0001$) en relación al grupo C. Además se observó que el incremento total del peso corporal fue de 48 % en este grupo, menor que el 86 % que se observó en las ratas sin déficit nutricional ($p < 0.0001$). En lo que respecta al incremento del peso cerebral, existió un déficit significativo ($p < 0.0001$), en relación al grupo C, los incrementos fueron del 53 % en el grupo D y 84 % en el grupo control durante todo el período estudiado. Con respecto a la LCS en el grupo D se observó un incremento del 46 % y en el grupo C del 62 % y existió un déficit significativo ($p < 0.0001$) en relación al grupo control.

6.2 Ensayos bioquímicos

6.2.1 Proteínas cerebrales

El patrón de la concentración de las proteínas cerebrales se ilustra en la figura 4, y se observó en el grupo D un retraso significativo de la concentración desde el nacimiento hasta los 21 días de vida posnatal ($p < 0.001$), en relación a los animales sin déficit nutricional. El déficit fue del 15.9, 8.0, 30.2 y 24.0 %, a los días de 1, 10, 15 y 21 días con respecto al grupo C.

6.2.2 5-Hidroxitriptamina cerebral

La evaluación de la concentración de 5-HT cerebral, producto de la acción de la TrpOH sobre el L-Trp cerebral se ilustra en la gráfica 5, en el grupo C, sin déficit nutricional, se observó un incremento del neurotransmisor que va de 120 ng/g de tejido húmedo al nacimiento hasta 300 ng/g de tejido a los 21 días de vida posnatal. En el grupo de ratas con desnutrición gestacional se observó una aceleración de la síntesis del neurotransmisor; los niveles de serotonina cerebral alcanzados al nacimiento fueron observados en los controles a los 10 días de vida posnatal. La concentración de 5-HT siempre estuvo significativamente más alta en el grupo desnutrido comparado con el grupo C ($p < 0.05$). El aumento fue del 39, 29, 30 y 32 % a los días 1, 10, 15 y 21 respectivamente en relación al grupo sin déficit nutricional.

6.2.3 Actividad de la dihidrobiopterina reductasa

La actividad específica de la DBHR en el tallo cerebral de ambos grupos experimentales se muestra en la gráfica 6. La curva de actividad de la enzima en el grupo C, presentó una disminución de 107 μmol de NADH oxidado/min/mg de proteína al nacimiento a 17 μmol a los 15 días de vida posnatal y a partir de este día aumentó hasta 47 μmol a los 21 días de vida extrauterina. En la misma gráfica se puede ver la curva de desarrollo del grupo D, mostró el mismo patrón que el grupo C, pero la actividad de la enzima estuvo significativamente elevada en el grupo D comparada con sus controles ($p < 0.01$). El aumento fue del 22.2, 43.4, 66.9 y 41.2 % a las edades de 1, 10, 15 y 21 días de vida extrauterina en

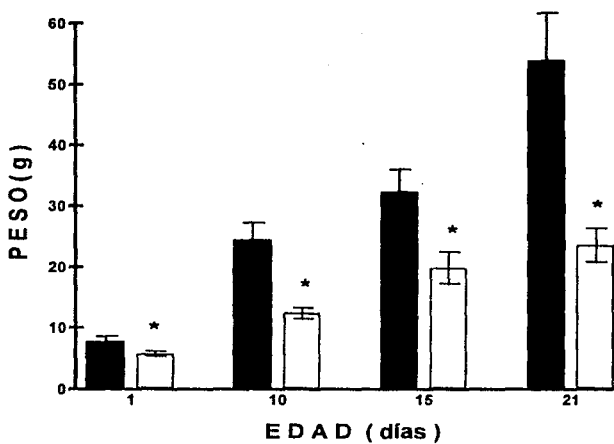
relación a sus controles. Además se observó que la actividad de la enzima se aceleró en el grupo D, alcanzando a los 15 días de vida posnatal, la actividad que presentaron los controles a los 21 días de vida extrauterina ($p < 0.01$).

6.2.4. TABLAS

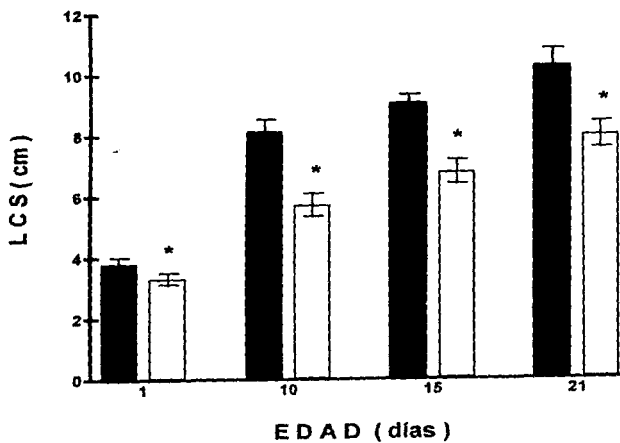
EDAD EN DIAS	PESO CORPORAL			LONGITUD			PESO CEREBRAL		
	%			CEFALO-SACRA %			%		
	C	D	p*	C	D	p*	C	D	p*
1 - 10	68	27	< 0.0001	53	30	< 0.0001	71	46	< 0.0001
10 - 15	26	19	< 0.0018	13	10	< 0.0237	22	14	< 0.0002
15 - 21	40	23	< 0.0001	15	10	< 0.0001	29	17	< 0.0001
1 - 21	86	48	< 0.0001	62	46	< 0.0001	84	53	< 0.0001

Tabla 1. Incrementos del peso corporal, de la longitud céfalo-sacra y del peso cerebral en %, de controles (C) y desnutridos (D), * t de Student.

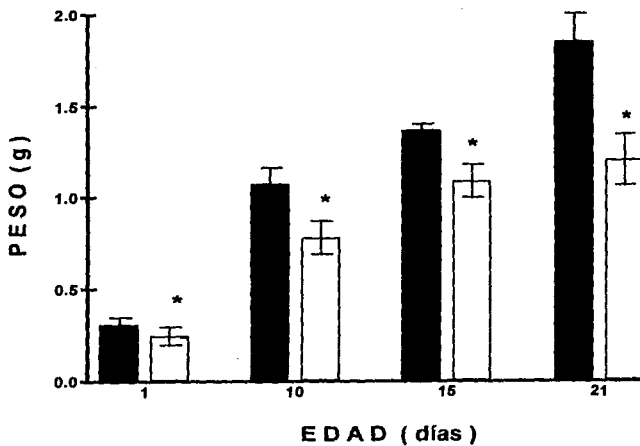
6.2.5 GRAFICAS



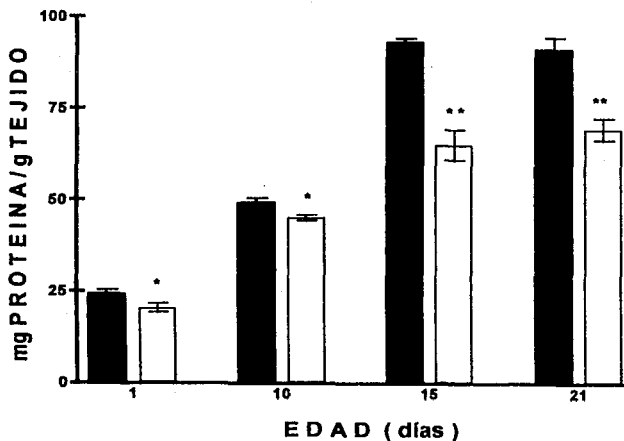
Gráfica 1. Peso corporal de ratas con desnutrición proteínico-energética y controles . Valores promedio de 16 ratas \pm desviación estándar. $p < 0.001$. t de Student.



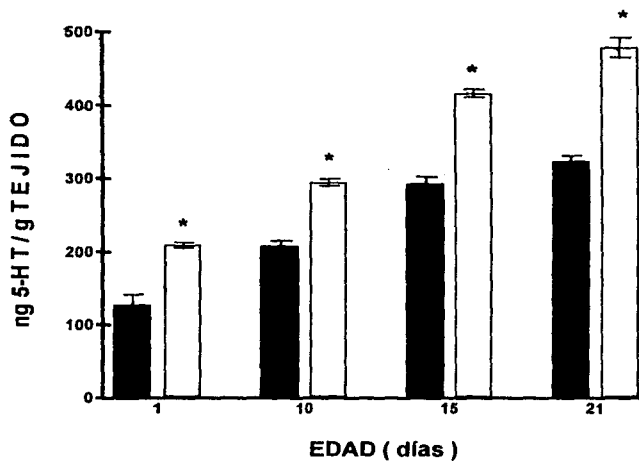
Gráfica 2. Longitud céfalo-sacra de ratas con desnutrición proteínico-energética □ y controles ■. Valores promedio de 16 ratas ± desviación estandar. * $p < 0.001$, t Student.



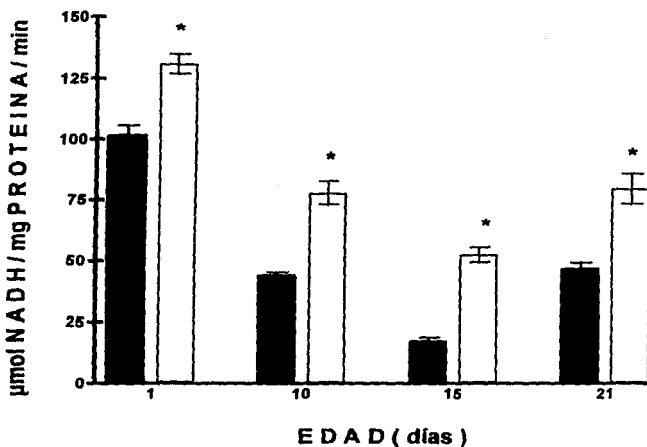
Gráfica 3. Peso cerebral de ratas con desnutrición proteínico-energética y controles . Valores promedio de 16 ratas \pm desviación estándar. * $p < 0.001$. t Student.



Gráfica 4. Concentración de proteínas totales en el cerebro de ratas con desnutrición proteínico-energética y controles . Valores promedio \pm desviación estándar de 4 experimentos por duplicado. * $p < 0.01$, ** < 0.001 . t Student.



Gráfica 5. Concentración de 5-Hidroxitriptamina en el cerebro de rata con desnutrición proteínico-energética □ y controles ■. Valores promedio \pm desviación estándar. * $p < 0.05$. t Student.



Gráfica 6. Actividad de la Dihydrobiopterina reductasa en el tallo cerebral de rata con desnutrición proteínico-energética y controles . Valores promedio \pm desviación estándar de 3 experimentos por triplicado. * $p < 0.01$. t Student.

7. DISCUSION

Los resultados obtenidos en la somatometría realizada confirman que la desnutrición proteínico-energética durante la gestación produce un retraso físico, lo que constituye una manifestación clínica universalmente observada (9, 20-22, 144-156). En casos extremos de desnutrición se produce una deficiencia del crecimiento y cuando es intensa y prolongada, el retraso del desarrollo físico se convierte en una regresión de los diferentes valores somatométricos (15, 16, 21, 157-162); esto sugiere que existe una disarmonía de los diferentes mecanismos homeostáticos que regulan el crecimiento y desarrollo (41-44, 163-167). Además se confirmó que el peso corporal es el parámetro somatométrico que se afecta con mayor proporción en relación a la LCS.

Estos hallazgos son similares a los observados en los humanos desnutridos *in utero*, en quienes al administrarles una adecuada terapia de rehabilitación nutricia, se reanuda el crecimiento; cuanto más pequeños son, se acentúa la disminución de los incrementos diarios de peso y de la talla por la edad ósea previamente alcanzada, que no les permite aumentos mayores de crecimiento físico (16, 157, 162, 164, 167).

En los animales desnutridos también observamos un déficit del peso corporal y del peso cerebral, ya que los incrementos de estos parámetros en la etapa posnatal mostraron un retraso significativo. Sin embargo es interesante mencionar que los animales del grupo D mostraron incrementos finales del 48 y del 53 % respectivamente y los del grupo C del 86 y del 84 %; por lo tanto se

puede concluir, que a pesar de los incrementos en el peso corporal y peso cerebral en los desnutridos, persistió un déficit ponderal de este grupo, en relación a los animales sin déficit nutricional. El déficit del peso corporal y cerebral es recuperable en estos animales desnutridos con una adecuada terapia de rehabilitación nutricia, lo que probablemente desencadene diferentes mecanismos metabólicos de compensación en los recién nacidos y en las madres de estos animales, que les permite continuar con el crecimiento y desarrollo posnatal (168).

Los incrementos de la LCS en los desnutridos fue de 30 % en el período de 1-10 días, de 10 % en los días 10-15 y de 10 % en los días 15-21, en relación a los animales sin déficit nutricional. El incremento total en los animales desnutridos fue del 46 % durante el período estudiado, indicando una vez más que cuando la desnutrición se prolonga, se disminuye la velocidad de desarrollo de la longitud céfalo-sacra, lo que se corrobora es la desaceleración de este parámetro somatométrico. Además se observó en nuestro estudio, que las ratas desnutridas tuvieron menor peso cerebral, que las ratas sin déficit nutricional lo que confirma una vez más, que la masa cerebral disminuye cuando la desnutrición es grave y prolongada, lo que sugiere que a pesar de los diferentes mecanismos metabólicos compensatorios en el organismo que protegen hasta cierto límite al cerebro, no son suficientes para evitar el decremento en el desarrollo y que se traduce en un daño cerebral (165-170).

Por otra parte se ha demostrado que la desnutrición gestacional en los humanos produce daños sobre el desarrollo y crecimiento del SNC y ante la imposibilidad de efectuar determinadas mediciones en ellos, se plantean modelos experimentales que demuestren todos los eventos fisiopatológicos que la desnutrición produce en un tipo de cerebro biológicamente semejante al humano. Estos modelos tienen en común la restricción de nutrimentos durante las etapas tempranas del desarrollo cerebral, durante este periodo el tejido nervioso es vulnerable a modificaciones epigenéticas, como lo es la desnutrición, factor que se conoce como productor de distintas alteraciones morfológicas, fisiológicas y bioquímicas (34-35, 39-48), cuyo grado de severidad está en relación al tiempo de inicio durante la vida intrauterina. Cuando la desnutrición se inicia durante la etapa temprana 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 (34-35, 168).

Nuestros datos confirman que durante la evolución de la desnutrición existen modificaciones en la composición bioquímica cerebral, ya que se demostró que los animales desnutridos tuvieron menor concentración de proteínas cerebrales. Es probable que los distintos mecanismos metabólicos de compensación cerebral resultan insuficientes para corregir este déficit y sólo son capaces de permitir la mínima síntesis de proteínas que se requiere para el crecimiento celular durante la vida intrauterina (164-166, 169-170).

Además de los cambios somatométricos y en la composición bioquímica, la desnutrición gestacional también es capaz de producir cambios metabólicos cerebrales más específicos; uno de estos cambios es el que se ha demostrado en el sistema serotoninérgico de la rata durante el desarrollo; se ha observado que la serotonina cerebral se encuentra elevada. Este aumento como se mencionó, está ocasionado por una elevación de la fracción libre del L-Trp plasmático (107-110), este aminoácido esencial es el precursor metabólico de la síntesis de 5-HT cerebral (105-110). La disponibilidad de la fracción libre del L-Trp para su paso al cerebro a través de la BHE, está determinado por varios factores metabólicos del organismo. El grado de unión que tiene el aminoácido a la albúmina y las concentraciones de albúmina y ácidos grasos libres, son factores que juegan un papel importante en la regulación de la concentración del aminoácido en el plasma para su transporte al tejido nervioso, en donde es captado por las neuronas serotoninérgicas y estimular la síntesis del neurotransmisor. Además la fracción libre del L-Trp compete por su transportador de membrana a nivel de los capilares de la BHE con otros aminoácidos neutros (AAN) (valina, isoleucina, leucina, tirosina y fenilalanina) (171), de tal forma que una disminución de estos AAN en el plasma, permitirán un mayor paso del L-Trp al tejido nervioso y un aumento de la síntesis de 5-HT cerebral (106-110).

Nuestros estudios bioquímicos en el cerebro de ratas desnutridas *in-utero* muestran que la síntesis de serotonina se encuentra acelerada, secundario a un

paso mayor del precursor metabólico al cerebro, esto a su vez condicionado por una concentración elevada de la fracción libre del L-Trp a nivel plasmático (107-110). En estos cerebros de animales desnutridos se ha observado que existe un aumento de la actividad de la TrpOH enzima limitante de la cadena biosintética de la 5-HT, que en condiciones normales, la enzima está insaturada por su sustrato; al existir un aumento de la concentración del L-Trp en las células serotoninérgicas, se produce un aumento de la actividad enzimática en la hidroxilación del aminoácido. El 5-hidroxitriptofano formado es descarboxilado por la enzima descarboxilasa de los aminoácidos aromáticos y produce serotonina (116-119). Existen varios factores que regulan la síntesis de 5-HT cerebral, arbitrariamente se pueden agrupar en dos: el primero corresponde a los cambios de la disponibilidad del sustrato, tanto a nivel plasmático como en el tejido nervioso. Por ello, los cambios en la disponibilidad del L-Trp, aumentan o disminuyen rápidamente la síntesis del neurotransmisor (103, 107-109). El segundo grupo lo forman los mecanismos que regulan la actividad de la Trp-OH para hidroxilar al L-Trp. Entre estos factores se encuentran la disponibilidad del oxígeno, el medio iónico del tejido cerebral, los cambios en la cinética enzimática y el aumento de la concentración de las moléculas de la TrpOH, los primeros cambios se observan en forma inmediata y el último se presenta después de 24 h del estímulo de activación (102, 172-177). Además se sabe que la concentración del cofactor BH_4 , es necesaria para que se lleve a cabo la

hidroxilación del L-Trp en las neuronas serotoninérgicas para producir 5-HT cerebral (130-131).

La hipótesis del presente estudio fue que la DBHR se encuentra elevada en el cerebro desnutrido durante la gestación. Los resultados bioquímicos confirman nuestra hipótesis; la desnutrición proteínico-energética durante la gestación es capaz de producir una elevación de la actividad de esta enzima en las neuronas serotoninérgicas del tallo cerebral. La DBHR es la enzima que dona electrones para la hidroxilación del L-Trp y es la encargada de mantener la concentración óptima del cofactor, tetrahidrobiopterina a través de la reducción del QBH₂.

Por lo tanto, se puede concluir en este trabajo que el aumento de la síntesis de 5-HT cerebral secundario a desnutrición *in utero*, requiere de una mayor concentración de la BH₄ a través de la DBHR, como un mecanismo compensador en la donación de hidrogeniones necesarios para la hidroxilación del L-Trp en la síntesis elevada del neurotransmisor en los animales desnutridos.

8. CONCLUSIONES

1.- Se confirma que la desnutrición gestacional produce un cambio en la composición corporal y cerebral, reflejado por la baja significativa del peso corporal, cerebral, y de la longitud céfalo-sacra y de la concentración de proteínas totales.

2.- Los resultados apoyan la existencia de una aceleración de la síntesis de serotonina cerebral secundaria a desnutrición *in utero*.

3.- Se demostró que la desnutrición gestacional produce una elevación de la actividad de la dihidrobiopterina reductasa como un mecanismo compensador en la donación de electrones necesarios para la hidroxilación del L-Trp en la aceleración de la biosíntesis de serotonina cerebral.

9. BIBLIOGRAFIA

1. Araujo BL, Lloréns FJ. La lucha por la salud en Cuba, 1a. Ed. Edit. Siglo XXI, México. 1985; 22.
2. Peña Ch A, Saenz H C, Cordero E. Síndrome policarencial de la infancia . Rev Med Costa Rica 1948; 2: 170-174.
3. György P. The late effects of early nutrition. Am J Clin Nutr 1960; 8: 344-345.
4. Salud y condiciones de vida. En: Las condiciones de la salud en las Américas. Organización Panamericana de la Salud (OPS), Publicación Científica 549. 1994; 1: 1-11.
5. Cravioto J. Appraisal of the effect of nutrition on biochemical maturation. Am J Clin Nutr 1962; 11: 484-491.
6. Ramos GR, Cravioto J, Navarrete JA. La letalidad en el niño desnutrido. Análisis de 100 casos internados en la sala de nutrición del Hospital Infantil de México. Bol Med Hosp Infant Méx 1958; 15: 875-923.
7. Gold Smith GA. Current status of malnutrition in the tropics. Am J Trop Med Hyg 1974; 22: 756-758.
8. Gómez F. Desnutrición. Bol Med Hosp Infant Mex. 1946; 3: 543-551.
9. Ramos GR, Cravioto J. Desnutrición, concepto y ensayo de sistematización. Bol Med Hosp Infant Méx 1958; 15: 763-780.
10. Waterlow JC, Cravioto J, Stephen J. Protein malnutrition in man. Adv Protein Chem 1960; 15: 131-145.
11. Frenk S, Metcalf J, Gómez F, Ramos GR, Cravioto J, Antonowics I. Intracellular composition and homeostatic mechanisms in severe chronic infantile malnutrition. Pediatrics 1957; 20: 105-120.
12. Ramos GR, Pérez OB, Mariscal AC, Viniestra CA. La dinámica de la desnutrición. Bol Med Hosp Infant Méx 1964; 21: 17-18.
13. Ramos GR. Desnutrición un componente del síndrome de privación social. Gac Med Méx 1966; 96: 929-945.
14. Viniestra CA, Ramos Gr. El síndrome de privación social. Ticitl 1966; 6: 3-9.

15. Cravioto J, Delicardie ER. Malnutrition in early childhood. *Food Nutr* 1976; 2: 2-11.
16. Ramos GR. La desnutrición infantil en México, sus aspectos estadísticos, clínicos, dietéticos y sociales. *Bol Med Hosp Infant Méx* 1964; 21:19-25.
17. Viniestra CA. La dinámica de la desnutrición. Factores que determinan el estado de nutrición. *Bol Med Hosp Infant Méx* 1964; 21:27-40.
18. Cravioto J, Delicardie ER. La desnutrición infantil y el medio ambiente social. *Ciencia y Desarrollo (Conacyt)* 1977; 13:63-72.
19. Levitsky DA. Malnutrition and the hunger to learn. En: Levitsky DA. *Malnutrition, Environment and Behavior*. Ithaca, Cornell University Press. 1979; 161-179.
20. Gómez F, Ramos Gr, Cravioto J, Frenk S. Malnutrition and Kwashiorkor. *Acta Paediatr (Uppsala)* 1954; 43:336-357.
21. Gómez F, Ramos GR, Cravioto J, Frenk S. Malnutrition in infancy and childhood with reference to Kwashiorkor. *Advances Pediatrics* 1955; 7: 131-136.
22. Ramos Gr. Desnutrición en el niño. *Bol Clin Asoc Med Hosp Infant Méx* 1961; 1: 2-22.
23. Williams CA. A nutritional disease in childhood associated with a maize diet. *Arch Dis Child*. 1933; 8: 432-428.
24. Williams C. Kwashiorkor. A nutritional disease of children associated with a maize diet. *Lancet* 1935; II: 1151-1152.
25. Juárez FA, Fajardo GA. Desnutrición infantil. En: Palacios TJC, Games EJ. *Introducción a la Pediatría 4a. Ed. Edit. Méndez Oteo-Méndez Cervantes. México* 1990; 119-121.
26. Cravioto J, Delicardie ER. Nutrition, the nervous system and behavior. Pan American Health Organization (World Health Organization) Scientific Publication No. 251, 1972: 73-94.
27. Tizard J. Early malnutrition, growth and mental development in man. *Br Med Bull* 1974; 30: 169-174.

28. 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.
29. Fitzhardinge PM, Steven EM. The small for date infant. II. Neurological and intellectual sequelae. *Pediatrics* 1972; 50: 57.
30. Hill RM, Verniaud WM, Deter RL, Tennyson LM, Retting GM, Zion TE, Vordeman AL, Helms PG, McCulley LB, Hill LL. The effect of malnutrition on the term infant. A 14 year progressive study. *Acta Paediatr Scand* 1984; 73: 382-487.
31. 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.
32. 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.
33. 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.
34. 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; 10:530-543.
35. Winick M, Noble A. Quantitative Changes in DNA and RNA and protein during prenatal and postnatal growth in the rat. *Dev Biol* 1965;12:451-461.
36. Kaplan SL, Grumbach MM. Immunoassay for human chorionic growth hormone-prolactin in serum and urine. *Science* 1965;147:751-759.
37. Chavez A, Martínez C. Growing up in a developing community. 1a. Ed., Edit. Nueva editorial Interamericana, México 1986; 56-69
38. Widdowson EM. Harmony of growth. *Lancet* 1970; 69: 901-905.
39. Zamenhof S, Van Marthens E. Nutritional influences on prenatal brain development: En: Gottlieb G. Early influences. Academic Press, New York 1978; 4:149-186.

40. Winick M. Cellular growth in intrauterine malnutrition. *Ped Clin Nort Am* 1970; 17: 69-78.
41. 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; 95: 143-150.
42. Shrader RE, Ferlatte M, Zeman FJ. Early postnatal development of intestine in progeny of protein deprived rats. *Biol Neonate* 1977; 31: 181-198.
43. Loh KR, Shrader EE, Zeman FJ. Effect of maternal protein deprivation on neonatal intestinal absorption in rats. *J Nutr* 1971; 101: 1663-1671.
44. Srebnik HH. Sex differences in pituitary gonadotrophic function of protein deficient rats. *Endocrinology* 1964; 75: 716-720.
45. Chase HP, Welch NN, Dabiere CS, Vasan NS, Butterfield LJ. Alterations in human brain biochemistry following intrauterine growth retardation. *Pediatrics* 1972; 50: 403-419.
46. Chase HP, McKhann GM. The effects of malnutrition on the synthesis of myelin lipid. *Pediatrics* 1967; 40: 551-559.
47. 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.
48. 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.
49. Manjarrez GG, Chagoya GG, Hernández RJ. Perinatal brain serotonin metabolism in rats malnourished *in-utero*. *Biol Neonate* 1988; 54: 232-240.
50. Manjarrez GG, Chagoya GG, Hernández RJ. Desnutrición intrauterina. II. L-triptofano, triptofano-5-hidroxilasa y serotonina en el cerebro de rata. *Bol Med Hosp Infant Méx* 1988; 45: 808-816.
51. Manjarrez GG, Chagoya GG, Hernández RJ. Desnutrición intrauterina: I. L-triptofano, serotonina y aminoácidos plasmáticos en humanos. *Bol Med Hosp Infant Méx* 1988; 45: 729-744.

52. Hernandez 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.
53. Manjarrez GG, Magdaleno VM, Hernández RJ. Cambios inducidos por rehabilitación nutricional temprana en la vía serotoninérgica cerebral activada por desnutrición gestacional. *Bol Med Hosp Infant Méx* 1995; 52: 69-76.
54. 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.
55. Takeuchi Y, Kimura H, Matsuura T. Distribution of serotonergic neurons in the Central Nervous System. *J Histochem Cytochem* 1983; 31: 181-185.
56. Levitt P, Moore RY. Developmental organization of raphe serotonin neuron groups in the rat. *Anat Embryol* 1978; 154: 241-251.
57. Lidov HG, Molliver ME. Immunohistochemical study of the development of serotonergic neurons in the rat CNS. *Brain Res Bull* 1982; 9: 559-604.
58. Steinbusch HW. Distribution of serotonin immunoreactivity in the central nervous system of the rat-cell bodies and terminals. *Devl Neurosci* 1981; 6: 557-618.
59. Romero G, Toscano E, Montero D, De Felipe MC, Del Rio. Effect of prenatal exposure to tianeptine on different neurotransmitter receptors and 5-HT-stimulated inositol phosphate formation in rat brain. *J Neural Transm.* 1992; 113-124.
60. 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.
61. Olson L, Selger A. Early prenatal ontogeny of central monoamine neurons in the rat: Fluorescence histochemical observations. *Z Anat Entwickl Gesch* 1972; 137: 301-316.
62. 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.

63. 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 Gesch.* 1973; 259-282.
64. 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.
65. Beaudet A, Descarries L. The fine structure of central serotonin neurons. *J Physiol Paris* 1981; 77: 193-203.
66. Andén EN, Carlsson A, Häggendal J. Adrenergic mechanisms. *Ann Rev Pharmacol* 1969a; 119-133.
67. Carlsson A. Basic action of psychoactive drugs. *Int J Neurol* 1967; 6: 27-45.
68. 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.
69. Fillion G, Rouselle JC, Fillion MP, Beaudoin DM, Goigny 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.
70. Fillion G, Beaudoin D, Rousselle JC, Deniau JM, Fillion MP, Dray F, Jacob J. Decrease of (³H) 5-HT adenylate cyclase activation after kainic acid lesion in rat brain striatum. *J Neurochem* 1979; 33: 567-570.
71. 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.
72. Hernández RJ, Martínez FD, Chagoya GG, Fillion MP, Fillion G. Existence of (³H) serotonin binding sites in the rat spinal cord. A developmental study. *Int J Dev Neurosci* 1984; 2: 33-41.
73. Peroutka SJ, Lebovitz RM, Snyder SH. Two distinct central serotonin receptors with different physiological function. *Science Wash* 1982; 212: 827-829.
74. Lauder JM, Hormonal and humoral influences on brain development. *Psychoneuroendocrinology* 1983; 8:121-155.

75. 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.
76. Haydon PG, McCobb DP, Kates SB. Serotonin selectively inhibits growth cone motility and synaptogenesis of specific identified neurons Science. 1984; 226: 561-564.
77. Whitaker-Azmitia PM, Azmitia EC. Autoregulation of fetal serotonergic neuronal development: Role of High affinity serotonin receptors. Neurosci Lett. 1986; 67: 307-312.
78. Jouvet M. Biogenic amines and the states of sleep. Science 1969; 163: 32-41.
79. Jouvet M. Serotonin and sleep in the cat. En: Serotonin and Behavior. Barchas J, Usdin E. Academic Press, New York. 1973; 385-400.
80. Messing RB, Lytle LD. Serotonin containing neurons: their possible role in pain and analgesia. Pain 1977; 4: 1-21.
81. Randic M, Yu HH. Effects of 5-hydroxytryptamine and bradykinin in cat dorsals horn neurones activated by noxious stimuli. Brain Res 1976; 111: 197-203.
82. Akil H, Mayer DJ. Antagonism of stimulation produced analgesi by p-CPA a serotonin synthesis inhibitor. Brain Res 1972; 44: 692-697.
83. 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.
84. Gorgnia K. Effects of repeated 5-hydroxytryptamine injection on temperature regulating the functional activity of brain 5-hydroxytryptamine. Nature 1976; 260: 487-491.
85. Goodrich C, Choy M. Body temperature and 5-hydroxytryptamine during early postnatal maturation in mice. Dev Psychobiol 1978; 11: 531-540.
86. Wurtman JJ, Wurtman RJ. Drugs that enhance central serotonergic transmission diminish selective carbohydrate consumption by rats. Life Sci 1979; 24: 895-904.

87. 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.
88. Shillito EE. The effects of p-chlorophenyl alanine on social interaction of male rats. *Br J Pharmacol* 1970; 36:193.
89. Van de Kar LD, Lorens SA. Differential serotonergic innervation of individual hypothalamic nuclei and other fore brain regions by the dorsal and medial mid brain raphé nuclei. *Brain Res* 1979; 162: 45-54.
90. Schildkrant JJ, Kety SS. Biogenic amine and emotion. *Science* 1967; 156:21-30.
91. Barchas JD, Akil H, Elhott GR, Holman RB, Watson SJ. Behavioral neurochemistry; neuroregulators and behavioral states. *Science* 1978; 200: 964-973.
92. Van Praag HM, De Haan S. Central serotonin metabolism and frequency of depression. *Psychiatry Res* 1979; 1: 219-224.
93. Myres RD. Serotonin and Behavior. Academic Press New York. 1973
94. Hernández R. A serotonin agonist-antagonist reversible effect on $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPase activity in the developing rat brain. *Dev Neurosci* 1982; 5: 326-331.
95. Hernández RJ. Brain Na^+K^+ ATPase activity possibly regulated by a specific serotonin receptor. *Brain Res* 1987; 408: 389-391.
96. Yoshimura K. Activation of $\text{Na}^+\text{-K}^+$ activated ATPase in rat brain by catecholamine. *J Biochem* 1973; 74: 389-391.
97. 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.
98. Zeisel HS, Mauron C, Watkins CJ, Wurtman RJ. Developmental changes in brain indols, serum tryptophan and other serum neutral amino acids in the rat. *Dev Brain Res* 1981; 1:551-564.
99. Perez-Cruet J, Tagliamonte A, Tagliamonte P, Gessa GL. Changes in brain serotonin metabolism associated with fasting and satiation in rats. *Lif Sci* 1972; 11: 31-39.

100. 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. *Dev Brain Res* 1985; 18: 143-157.
101. Hernández RJ. $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPase activity in the brain cortex of rats ontogenetically malnourished and treated with serotonin precursors. *Brain Res* 1979; 162: 348-352.
102. 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.
103. McMenamy RH, Onchy JC. The specific binding of L-tryptophan to serum albumin. *Biol Chem* 1958; 1436-1447.
104. Poitou P, Boum R. Psychopharmacologie du tryptophane. *Path Biol* 1977; 25: 565-571.
105. Miller M, Leahy PJ, Stern CW, Morgane JP, Resnick O. Tryptophan availability: Relation to elevated brain serotonin in developmentally protein-malnourished rats. *Expl Neurol* 1977; 57: 142-157.
106. Stern WC, Resnick O, Miller M, Forbes WB, Morgane PJ. Protein malnutrition during development changes in metabolism of biogenic amines in brain. *Fed Proc* 1974; 33: 661-670.
107. 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.
108. Gessa GL, Tagliamonte A. Serum free tryptophan: control of brain concentrations of tryptophan and synthesis of 5-hydroxytryptamine. In: Wolstenholme GEW, Fitzsimons DW. *Aromatic amino acid in the brain*. Elsevier Amsterdam. 1974; 207-216.
109. Miller M, Leahy JP, MacConville F, Morgane PJ, Resnick O. Effects of developmental protein malnutrition on tryptophan utilization in brain and peripheral tissues. *Brain Res Bull* 1977; 2: 347-353.
110. Curson G, Knott PJ. Drugs influencing plasma and brain tryptophan. *Brit J Pharmacol* 1973; 48: 352-353.

111. Yuwiler A, Oldendorf H, Geller E, Braun L. Effect of albumin binding and amino acid competition on tryptophan uptake into brain. *J Neurochem.* 1977; 28: 1015-1023.
112. Sourkes TL. Kinetic of tryptophan transport into the brain. *J Neural Transm suppl* 1977; 15: 107-114.
113. Neckenrs LM, Biggion G, Moja E, Meek JL. Modulation of brain tryptophan hydroxylase activity by brain tryptophan content. *J Pharmacol Exp Ther* 1971; 177: 475-480.
114. 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.
115. Hamon M, Glowinski J. Regulation of serotonin synthesis. *Life Sci* 1974; 15: 1533-1548.
116. Grahame-smith DG. Tryptophan hydroxylation in brain. *Biochem Biophys Res Commun* 1964; 16: 586-692.
117. Jequier E, Lovernberg W, Sjoerdsma A. Tryptophan Hydroxylase inhibition the mechanism by which p-chlorophenylalanine depletes rat brain serotonin. *Mol Pharmacol* 1967; 3: 274-278.
118. Hernández RJ, Ilnerova 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: 343-348.
119. Lovenberg W, Weissbach H, Odenriends S. Aromatic L-amino acid decarboxylase. *J Biol Chem* 1962; 237: 89-93.
120. 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.
121. Armarego WLF, Randles D, Taguchi H. Peroxidase catalysed aerobic degradation of 5,6,7,8-tetrahydrobiopterin at physiological pH. *Eur J Biochem* 1983; 135: 393-403.
122. Collette SP, Fitzpatrick PF. Lysine 241 of tyrosine hydroxylase is not required for binding of tetrahydrobiopterin substrate. *Arch Biochem Biophys* 1993; 302: 455-460.

123. Matsuura S, Sugimoto T, Hasegawa H. Studies on biologically active pteridines. *J Biochem* 1980; 87: 951-957.
124. Nagatsu T, Matsuura S, Sugimoto T. Physiological and Clinical Chemistry of Biopterin. *Med Res Rev* 1989; 9-1: 25-44
125. Werner-Felmayer G, Golderer G, Werner R, Gröbner P, Wachter H. Pteridine biosynthesis and nitric oxide synthase in *Phisarum polycephalum*. *Biochem J* 1994; 304: 105-111.
126. Furakawa Y, Nishi K, Kondo T, Tanabe K, Mizuno Y. Significance of CSF total neopterin and biopterin in inflammatory neurological diseases. *J Neurol Sci* 1992; 111: 65-72
127. Ogiwara S, Kiuchi K, Nagatsu T, Teradaira R, Nagatsu Y, Fujita K, Sugimoto T. Highly Sensitive, Specific Enzyme-Linked Immunosorbent Assay of neopterin and Biopterin in biological samples. *Clin Chem*. 1992; 38-10: 1954-1958.
128. Nagatsu T, Sawada M, Yamaguchi T, Sugimoto T, Matsuura S, Akino M, Nakazawa N, Ogawa H. Radioimmunoassay for biopterin in body fluids and tissues. *Anal Biochem* 1984; 110: 182-189
129. Kauffman. The structure of phenylalanine hydroxilation cofactor. *Proc Natl Acad Sci* 1963; 50:1085-1093.
130. Armarego WLF, Ohnishi A, Taguchi H. New pteridine substrates for dihydropteridine reductase and horseradish peroxidase. *Biochem J* 1986; 234: 335-342.
131. Kauffman S. Studies on the structure of the primary Oxidation product formed from tetrahydropteridines during phenylalanine hydroxilation, *J Biol Chem* 1964; 239-1: 332-238.
132. Nielssen KH, Simonsen V, Lind KE. Dihydropteridine reductase. A method for the measurement of activity, with particular reference to the distinctive features of the enzyme and the pteridine cofactor. *Eur J Biochem* 1969; 7: 360-369.
133. Abou-Donia MM, Wilson SP, Zimmerman TP, Nichol CA, Viveros OH. (1986). Regulation of Guanosine Triphosphate Cyclohydrolase and tetrahydrobiopterin levels and role of the cofactor in tyrosine hydroxylation in primary cultures of adrenomedullary chromaffin cells. *J Neurochem* 1986; 46-4: 1190-1199.

134. Craine JE, Hall ES, Kauffman S. The isolation and characterization of dihydropteridine reductase from sheep liver. *J Biol Chem* 1972; 247-19: 6082-6091.
135. Firgaira FA, Cotton RGH, Danks DM. Isolation and characterization of dihydropteridine reductase from human liver. *Biochem J* 1981; 197: 31-43.
136. Amarego WLF, Cotton RGH, Dahl HHM, Dixon EN. High-level expression of human dihydropteridine reductase (EC 1.6.99.7), without N-terminal amino acid protection, in *Escherichia coli*. *Biochem J* 1989; 261: 265-268.
137. Lockyer J, Cook RG, Milstien S, Kaufman S, Woo SLC, Ledley FD. Structure and expression of human dihydropteridine reductase. *Proc Natl Acad Sci* 1987; 84: 3329-3333.
138. Lind KE. Dihydropteridine reductase. Investigation of the specificity for quinoid dihydropteridine and the inhibition by 2,4-diaminopteridines. *Eur J Biochem* 1972; 25: 560-562.
139. Nielsen KH, Simonsen V, Lind KE. Dihydropteridine reductase. A method for the measurement of activity, and investigations of the specificity for NADH and NADPH. *Eur J Biochem* 1969; 9: 497-502
140. Amarego WLF, Ohnishi A, Taguchi H. New pteridine substrates for dihydropteridine reductase and horseradish peroxidase. *Biochem J* 1986; 234: 335-34.
141. Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193: 265-273.
142. Curson G, Green AR. Rapid method for the determination of 5-HT and 5 HIAA in small regions of rat brain. *Br J Pharmacol* 1970; 39: 653-655.
143. Neal WM, Florine JR. A rapid method for desalting small volumes of solution. *Anal Biochem* 1973; 55: 328-330.
144. Miller D, Crane RK. The digestion of carbohydrate in the small intestine. *Am J Clin Nutr* 1963; 12: 220-227.
145. Cravioto J, De la Peña CLG. Fat metabolism in chronic severe malnutrition. Lipoproteins in children with kwashiorkor. *Metabolism* 1959; 8: 722-733.
146. Dawson AM. Absorption of fats. *Brit Med Bull* 1967; 23: 247-251.

147. 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: 41-54.
148. 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: 682-698.
149. Frenk S, Metcalf J, Gómez F, Ramos GR, Cravioto J, Antononowitsch I. Intracellular composition and homeostatic mechanism in chronic severe infantile malnutrition. II Tissues composition. *Pediatrics* 1957; 20: 105-120.
150. Frenk S. Algunas particularidades del metabolismo de agua y sales en el preescolar con desnutrición grave. *Bol Med Hosp Infant Mex* 1950; 7: 504-513.
151. 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: 514-520.
152. 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 Méx* 1950; 7: 497-503.
153. 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: 263-281.
154. 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 Paediatr Scand* 1980; 69: 201-204.
155. Godard C, Zahand GR. Growth hormone and insuline in severe infantile malnutrition. I. Plasma growth hormone response to hypoglycemia. *Helv Paediatr Acta.* 1971; 26: 266-275.
156. 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.
157. Ramos GR. Desnutrición y crecimiento físico. *Bol Med Hosp Infant Méx* 1964; Sup:21:1-7.

- 158.Ramos GR, Cravioto J, Navarrete JA. La letalidad en el niño desnutrido. Bol Med Hosp Infant Méx. 1958; 15:875-923.
- 159.Mariscal AC, Viniegra CA, Ramos GR. Predicción de la talla en niños desnutridos y talla de los progenitores. Bol Med Hosp Infant Mex 1966; 23:465-470.
- 160.Mariscal AC, Viniegra Ca, Ramos GR. Predicción de la talla. Bol Med Hosp. Infant Mex 1967; 24:23-42.
- 161.Mariscal AC, Ramos GR, Viniegra CA, Perez OB. Predicción de la talla final en niños con peso proporcionado a la talla. Bol Med Hosp Infant Mex 1967; 24:43-65.
- 162.Ramos GR. Crecimiento en la desnutrición. Gac Med Mex 1967; 97:1527-1540.
- 163.Aguilar PR. Estudio sobre la avitaminosis y las perturbaciones del crecimiento en los niños hipoalimentados. Gac Med Mex 1944; 75: 26-39.
- 164.Down EF. Nutritional dwarfing. A syndrome of early protein calorie malnutrition. Am J Clin Nutr 1964; 15: 275-281.
- 165.Fitzhardinge PM, Steven EM. The small for dates infants. I. Later growth patterns. Pediatrics 1972; 49:671-681.
- 166.Fancourt R, Campbell S, Harvey D, Norman AP. Follow up study of the small for dates babies. Br Med J 1976; 1: 1435-1443.
- 167.Babson SG, Kangas J, Youg N, Bramhall JL: Growth and development of twins of dissimilar size at birth. Pediatrics 1964; 33:327-333.
- 168.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.
- 169.Miller CH, Hassanein K. Fetal malnutrition in white newborn infants: Maternal factors. Pediatrics 1973; 52: 504-512.
- 170.Ramos GR, Perez OB, Mariscal AC Viniegra CA. Homeorresis. Bol Med Hosp Infant Mex 1967; 24:5-22
- 171.Fernstrom JD. Role of precursor availability in control of monoamine biosynthesis in brain. Physiol Rev 1983; 63: 484-536.

172. Costa E, Guidotti A, Zivkovic B. Short and long term regulation of tyrosine hydroxylase. En: Usdin E. Neuropsychopharmacology of monoamines and their regulatory enzymes. Raven Press New York 1974; 161-175.
173. Carlsson A, Kehr W, Lindqvist M. Short term control of tyrosine hydroxylase. En: Usdin E. Neuropsychopharmacology of monoamine and their regulatory enzymes. Raven Press New York 1974; 135-142.
174. Mandell AJ, Knapp S. Regulation of function of tryptophan hydroxylase. En: Usdin E. Neuropsychopharmacology of monoamine and their regulatory Enzymes. Raven Press New York 1974; 177-188.
175. Lovenberg W, Kuhn DM. Substrate regulation of serotonin synthesis. En Serotonin in Biological Psychiatry. Raven Press New York 1982; 73-83.
176. 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.
177. Richard F, Sanne JL, Bourde O, Weissman 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.

12. ABREVIATURAS

RCDI	Retraso del crecimiento y desarrollo intrauterina.
DIU	Desnutrición intrauterina.
ADN	Acido desoxirribonucleico.
ARN	Acido ribonucleico.
SNC	Sistema Nervioso Central.
5-HT	5-Hidroxitriptamina.
Na ⁺	Sodio.
K ⁺	Potasio.
L-Trp	L-triptofano.
mg	miligramo.
Kg	kilogramo.
TrpOH	Triptofano-5-hidroxilasa.
BHE	Barrera hemato-encéfalica.
BH ₄	Tetrahidrobiopterina.
5-HTP	5-Hidroxitriptofano.
QBH ₂	Quinonoide dihidrobiopterina.
NADH	Nicotinamida adenin dinucleótido.
BH ₂	Dihidrobiopterina.
GTP	Guanosin trifosfato.
GTP CH	Guanosin trifosfato ciclohidrolasa.
DBHR	Dihidrobiopterina reductasa.
Mg ²⁺	Magnesio.
Da	Daltones.
g	Gramos.
cm	Centimetros.
nm	Nanometros.
HCl	Acido clorhídrico.

OPT	Ortoftaldialdehido.
C	Control.
D	Desnutrido.
mmol	Milimol.
ml	Mililitro
h	Hora.
°C	Grados centigrados.
%	Por ciento.
CuSO ₄	Sulfato de cobre.
Na ₂ CO ₃	Carbonato de sodio.
NaOH	Hidroxido de sodio.
N	Normalidad.
M	Molaridad.
min	Minuto.
v/v	volumen volumen.
HClO ₄	Hipoclorito.
ng	Nanogramos.
H ₂ O ₂	Peroxido de Hidrogeno.
DO	Densidad óptica.
DE	Desviación estándar
LCS	Longitud céfalo-sacra.
μmol	Micromol.
AAN	Aminoácidos neutros.