



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE MÉXICO  
FACULTAD DE MEDICINA

INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL  
CENTRO MÉDICO NACIONAL SIGLO XXI  
UNIDAD MÉDICA DE ALTA ESPECIALIDAD  
HOSPITAL DE PEDIATRÍA  
DR. SILVESTRE FRENK FREUND

**EFFECTOS DE LA RECUPERACIÓN NUTRICIA NEONATAL  
TEMPRANA EN LA ACTIVIDAD DE LA VÍA  
SEROTONINÉRGICA EN EL TALLO CEREBRAL DE LA RATA  
DESNUTRIDA *IN-ÚTERO***

TESIS  
PARA OBTENER LA ESPECIALIDAD  
DE PEDIATRÍA

PRESENTA  
MÉDICO CIRUJANO KARINA DENISSE MARTÍNEZ RADILLA

TUTOR DE TESIS  
DR. GABRIEL MANJARREZ GUTIÉRREZ.  
UNIDAD DE INVESTIGACIÓN BIOMOLECULAR DEL HOSPITAL DE  
CARDIOLOGÍA, CENTRO MÉDICO NACIONAL SIGLO XXI  
MÉXICO, DF. 2015



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 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.

## ÍNDICE DE CONTENIDO

<b>1. RESUMEN</b> .....	1
<b>2. MARCO TEÓRICO</b> .....	3
2.1 DESNUTRICIÓN FETAL O <i>IN-ÚTERO</i> .....	3
2.2 SISTEMA SEROTONINÉRGICO CEREBRAL.....	4
2.3 SEROTONINA (5- HIDROXITRIPTAMINA).....	5
2.4 TRIPTOFÁNO-5-HIDROXILASA.....	7
2.5 DESNUTRICIÓN <i>IN-ÚTERO</i> Y EFECTOS SOBRE EL SISTEMA SEROTONINÉRGICO.....	7
<b>3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b> .....	10
<b>4. JUSTIFICACIÓN</b> .....	11
<b>5. OBJETIVO</b> .....	12
5.1 OBJETIVO GENERAL.....	12
5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	12
<b>6. HIPÓTESIS</b> .....	13
<b>7. MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	14
7.1 DISEÑO DEL ESTUDIO.....	14
7.2 UNIVERSO DE TRABAJO.....	14
7.3 DEFINICIÓN DE VARIABLES.....	15
7.3.1 VARIABLES INDEPENDIENTES.....	15
7.3.2 VARIABLES DEPENDIENTES.....	15
7.4 TAMAÑO DE LA MUESTRA.....	16
7.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	16

7.6 DESCRIPCIÓN GENERAL DEL ESTUDIO.....	17
7.7 ENSAYOS BIOQUÍMICOS.....	20
<b>8.- RESULTADOS.....</b>	<b>21</b>
<b>9.- DISCUSIÓN.....</b>	<b>30</b>
<b>10.- CONCLUSIONES.....</b>	<b>35</b>
<b>11.- REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>36</b>
<b>12.- ANEXOS.....</b>	<b>43</b>
11.1 ANEXO 1.....	43
11.2 ANEXO 2.....	45

## ÍNDICE DE TABLAS Y GRÁFICAS

### Tablas:

Tabla 1.- Composición de la leche materna durante la lactancia.....	26
---	----

### Figuras:

Figura 1.- Representación de un corte sagital de cerebro de la rata que muestra la localización de los núcleos serotoninérgicos, B1-B9, según la clasificación de Dahlström y Fuxe (1964).....	5
Figura 2.- Metabolismo de la L-Triptófano y síntesis de 5-hidroxitriptamina.....	6
Figura 3- Peso corporal de las madres, antes y durante el embarazo y en la lactancia.....	21
Figura 4.- Datos somatométricos de las crías.....	22
Figura 5.- Concentración de albúmina en el plasma de las crías.....	23
Figura 6.- Composición corporal de las crías.....	24
Figura 7.- Ingesta de leche materna de las crías durante un período de amamantamiento de 30 minutos.....	25
Figura 8.- Concentración de L-triptófano en el plasma de las crías. ....	27
Figura 9.- Actividad serotoninérgica en el tallo cerebral de las crías.....	29

## ABREVIATURAS

DIU.- Desnutrición *in-útero*

SNC.- Sistema Nervioso Central

5-HT.- 5-Hidroxitriptamina

L-Trp.- L-Triptófano

FL.- Fracción Libre

BH<sub>4</sub>.- Tetrahidrobiopterina

TPH.- Triptófano-5-Hidroxilasa

AMPc.- Adenosín Monofosfato Cíclico

BHE.- Barrera Hemato-encefálica

D.- Desnutrido

C.- Control

DNR.- Desnutrido Nutricionalmente Recuperado

HPLC.- Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución

## 1. RESUMEN

**Marco teórico.** La desnutrición *in-útero* (DIU) produce una aceleración de la síntesis de 5-hidroxitriptamina (5-HT) cerebral secundaria a una elevación del L-triptófano (L-Trp) y de la actividad de la triptófano-5-hidroxilasa (TPH) debido a un aumento de la afinidad por el L-Trp y mayor actividad por mecanismo de fosforilación. Además un aumento de neuronas serotoninérgicas que expresan la TPH1, y mayor concentración de esta isoforma.

**Objetivo.** Determinar si la recuperación nutricia neonatal temprana produce un retorno a lo normal de la actividad de la vía serotoninérgica en el tallo cerebral de las crías con DIU.

**Material y métodos.** Se utilizó un modelo de DIU. Al nacimiento de las crías se efectuó un entrecruzamiento para formar tres grupos: madres controles amamantaron a sus crías (Grupo C) y a crías desnutridas (grupo DNR) y las madres desnutridas alimentaron a sus crías (Grupo D). En los días 1, 10, 15 y 21 de vida, a las crías se les determinaron el consumo de leche en un período de 30 minutos de succión. A las madres se les extrajo la leche para determinar lactosa, lípidos y proteínas. Y a las crías se les tomó un mililitro de sangre para medir albúmina y L-Trp plasmático. Después se les disecó el tallo cerebral para medir el L-Trp, 5-HT y la TPH. Los resultados fueron analizados por ANOVA de 2 vías y prueba de Tukey, aceptado un nivel de significación de  $P < 0.05$ .

**Resultados.** Las madres restringidas de alimento en el embarazo y lactancia tuvieron un déficit de peso corporal ( $P < 0.001$ ). También las crías de estas madres mostraron un retraso del crecimiento físico y de la composición corporal ( $P < 0.001$ ), una menor ingesta de leche ( $P < 0.001$ ), con menor cantidad de lípidos y lactosa

desde el primer día de vida ( $P < 0.001$ ). El grupo DNR ingirió más leche ( $P < 0.0011$ ), con mayor cantidad de lípidos ( $P < 0.001$ ) y mostró una franca recuperación física y de la composición corporal a partir del 15 días de vida ( $P < 0.001$ ). EL L-Trp plasmático y cerebral, así como la actividad de la TPH y la 5-HT estuvieron significativamente elevadas en el grupo D ( $P < 0.001$ ). Nótese que la TPH y la 5-HT permanecieron aumentadas en el grupo DNR, a pesar del retorno a lo normal del L-Trp, tanto en el cerebro como en la sangre.

**Conclusiones.** Los resultados confirman que la DIU produce un déficit en la composición corporal y un aumento de la actividad serotoninérgica cerebral. Además apoyan que la alimentación *ad-libitum* en los desnutridos es el principal factor que participa en la recuperación nutricia. Sin embargo, los hallazgos de que el L-Trp plasmático y cerebral se normalizaran en las crías desnutridas nutricionalmente recuperadas y que la TPH permaneciera elevada y persistiera un aumento de 5-HT, sugieren que el mecanismo de activación de este importante neurotransmisor, 5-HT, es debido probablemente a cambios relacionados con la estructura o a los mecanismos de regulación de la TPH inducidos durante la DIU.

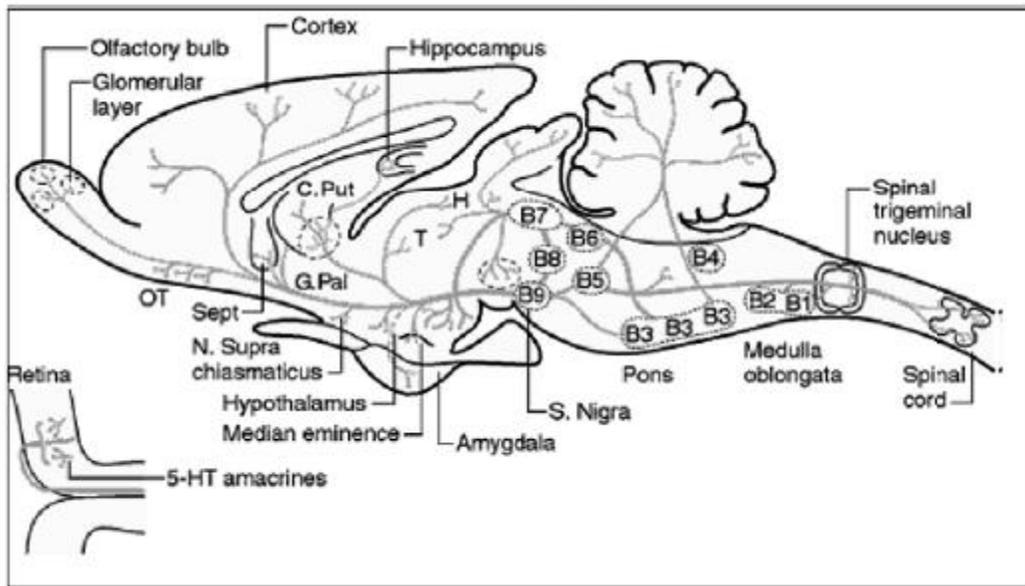
## **2. MARCO TEÓRICO**

### **2.1 Desnutrición Fetal o *In-Útero*.**

La desnutrición fetal o *in-útero* (DIU) también conocida como restricción del crecimiento intrauterino (RCIU) se define como la incapacidad del organismo para adquirir la cantidad normal de nutrientes durante el crecimiento intrauterino (1). Es un problema de salud pública mundial que impacta en gran medida sobre la mortalidad neonatal e infantil en menores de un año (2). La DIU, término acuñado por Scott y Usher (3,4) puede encontrarse en todos los países con diversos niveles culturales y socioeconómicos. Cerca del 90% de nacimientos con DIU ocurren en países en vías de desarrollo con una prevalencia global del 19% (2). En México, se presenta aproximadamente en el 10% de los embarazos y en países desarrollados se ha considerado por debajo del 6%. Junto con la prematuridad, la DIU más fuertemente asociado a la mortalidad, por lo que ha quedado demostrada una relación inversamente proporcional entre el peso al nacimiento y la mortalidad neonatal (5). La relevancia del problema es mayor aún cuando se considera que aquellos pacientes que sobrevivan a un cuadro clínico de DIU, presentan secuelas en el desarrollo psicomotor, siendo los más documentados los problemas de aprendizaje y comportamiento, detención del crecimiento postnatal, disminución en el número de neuronas, alteraciones de la mielina, trastornos neurológicos diversos, con importantes consecuencias humanas, sociales y económicas (1, 6).

### **2.2 Sistema Serotoninérgico Cerebral.**

La importancia de éste sistema neuronal se refleja por su amplia distribución de fibras nerviosas en el cerebro, procedentes de un grupo de neuronas multipolares localizadas sobre la línea media del tallo cerebral (B1-B9) (8-11). En la rata y en el humano, está compuesto por dos grupos de neuronas que han sido clasificadas de acuerdo a su origen embrionario: el grupo superior, procede del mesencéfalo y está constituido por cuatro subgrupos: núcleo caudal lineal, núcleo del rafe medio, núcleo del rafe dorsal y núcleo del lemniscus medial. El grupo inferior tiene su origen en el mielencéfalo y consta de cinco subgrupos: núcleo del rafé obscurus, núcleo del rafé pallidus, núcleo del rafé magnus, núcleo ventro-lateral medular y núcleo reticular intermedio (Figura 1). Además, se ha identificado un grupo de neuronas serotoninérgicas localizadas en el hipotálamo a nivel del núcleo dorsomedial (8-11). El neurotransmisor específico es la serotonina (5-hidroxitriptamina, 5-HT) que también actúa como neuromodulador y factor neurotrófico (9, 12, 13).

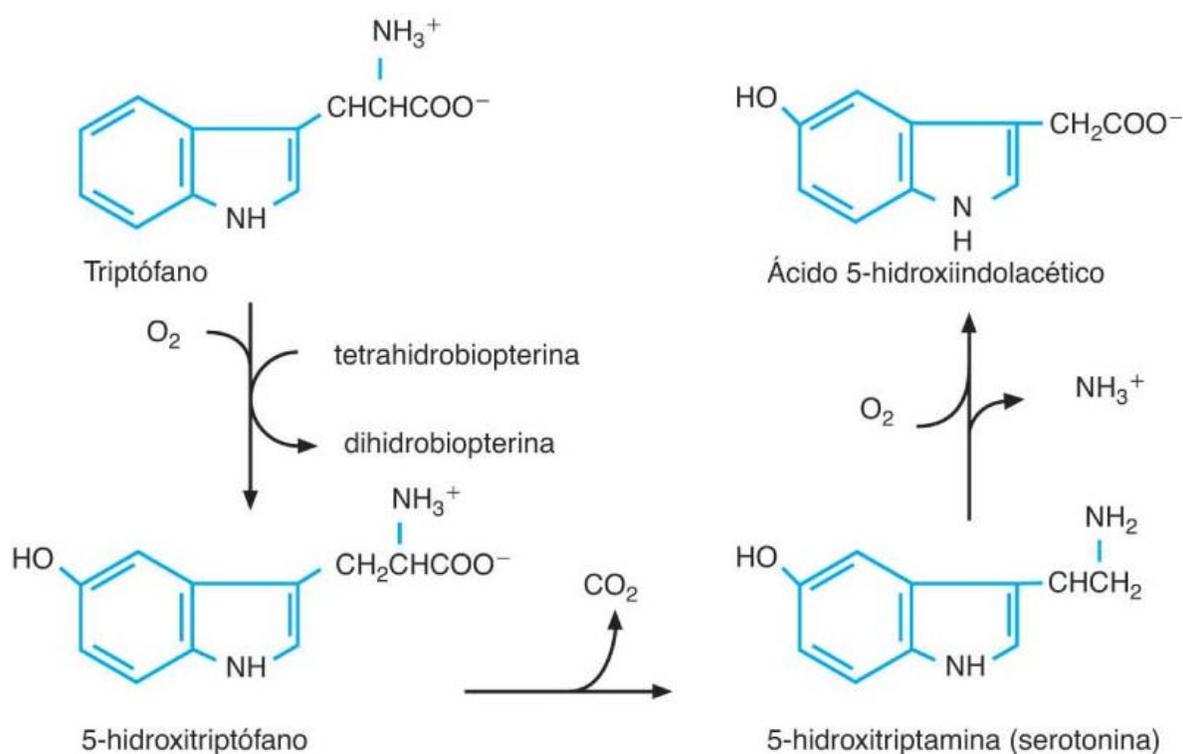


**Figura 1.** Representación de un corte sagital del cerebro de rata que muestra la localización de los núcleos serotoninérgicos B1-B9, según la clasificación de Dahlström y Fuxe (1964), así como las principales proyecciones de los mismos núcleos.

### 2.3 Serotonina (5-Hidroxitriptamina).

La serotonina se sintetiza a partir del L-triptófano (L-Trp). El L-Trp es un aminoácido esencial que se obtiene de las proteínas de la dieta (semillas de girasol, calabaza, garbanzos, amaranto, cacahuates, cereales). Su requerimiento diario es alrededor de 12 a 40 mg/ Kg de peso corporal en los infantes. Existen dos fracciones del aminoácido en el plasma: una unida a albúmina y la otra libre (FL) (15). La FL participa en varias vías metabólicas, como la del ácido nicotínico, del ácido cinurénico, de la acetil coenzima A y en la síntesis de proteínas. Además tiene la función especial de servir de precursor de la síntesis de 5-HT. La relación que guardan estas dos fracciones del aminoácido en el plasma, es la que determina que la FL pase en mayor o menor concentración la barrera hemato-encefálica y sea

captada por las neuronas serotoninérgicas donde es hidroxilada en su posición cinco por la triptófano-5-hidroxilasa (EC 1.14.16.4, TPH) (16,17), esta reacción requiere del cofactor tetrahidrobiopterina ( $BH_4$ ), que dona los electrones para reducir al oxígeno y formar oxhidrilos (17-19). Así, la FL del L-Trp se transforma en 5-hidroxitriptófano que de inmediato es descarboxilado por la descarboxilasa de los aminoácidos aromáticos (EC 4.1.1.26), para producir 5-HT (20,21). (Figura 2).



**Figura 2.** Metabolismo de L-Triptófano y síntesis de 5-Hidroxitriptamina. Bioquímica de Laguna. 5ª Ed. Editorial Manual Moderno. México, D.F. 2002.

#### **2.4 Triptofano-5- Hidroxilasa (TPH).**

La TPH, representa el paso limitante regulador de la biosíntesis del neurotransmisor (10,16,17). En condiciones normales la enzima no se encuentra saturada por su sustrato, L-Trp, de esta manera cambios en la disponibilidad de la FL del L-Trp plasmático rápidamente modifica la síntesis de 5-HT cerebral (22,23). La enzima es un tetrámero de subunidades idénticas, con un peso molecular aproximado de 240 kDa. Existen dos isoformas, la TPH1 se localiza en los tejidos periféricos y la TPH2 en el Sistema Nervioso Central (25-27). Tiene tres regiones funcionales: un dominio regulador amino terminal, un dominio catalítico y una interfase carboxilo terminal. Esta última región es la responsable de la estructura tetramérica y de la actividad catalítica debido a la presencia de una región  $\alpha$ -hélice (21,26-29), además en esta zona de la molécula se encuentran los sitios de unión del  $Fe^{++}$ , de  $BH_4$  y el sustrato, L-Trp (27-29).

#### **2.5 Desnutrición *in-útero* y su efecto sobre el sistema serotoninérgico.**

Existe evidencia experimental que sustenta que la DIU es capaz de producir una aceleración de la actividad del sistema serotoninérgico cerebral, como una consecuencia del aumento crónico del ingreso del L-Trp libre al cerebro (30-34). El aumento del L-Trp, tanto en el plasma como en el cerebro y la mayor actividad de la TPH, son algunos de los mecanismos que pueden explicar el aumento de la actividad de la vía biosintética de la 5-HT en las ratas con DIU (30-34). Sin embargo, el aumento inicial de la FL del L-Trp plasmático observado durante la DIU parece no ser el único mecanismo bioquímico involucrado en la aceleración de la TPH, ya

que también se ha reportado que la DIU induce cambios cinéticos en la TPH que se caracterizan por un aumento de la afinidad por su sustrato ( $K_m$ ), el L-Trp y una mayor capacidad de respuesta de la enzima en condiciones de fosforilación en donde intervienen el adenosín monofosfato cíclico (AMPc), el inositol 1,4,5 trifosfato (IP3), el diacilglicerol y la proteína cinasa II calcio/calmodulina dependiente, estos son los mecanismos implícitos en la activación de esta vía metabólica cerebral ocasionada por la DIU (35).

Recientemente nuestro grupo de trabajo reportó que ambas isoformas de la TPH se expresan en las neuronas serotoninérgicas desde el nacimiento en las crías normales y con DIU, las cuales tienen un patrón de expresión ontogénica ascendente durante la lactancia. Pero, es importante mencionar que las crías desnutridas durante gestación, tuvieron un mayor número de neuronas serotoninérgicas que expresaron la TPH1 y un aumento significativo de la proteína enzimática, además mostraron una disminución significativa del número de neuronas inmunoreactivas a la TPH2, así como una menor concentración de la proteína enzimática en comparación a las crías normales (34).

Tomando en cuenta todas estas observaciones en conjunto sugieren, que el aumento de la población de neuronas serotoninérgicas que expresan la TPH1 y el aumento de la proteína de esta isoforma 1 en el tallo cerebral, podrían ser los mecanismos que explicaran el aumento crónico de la síntesis de 5-HT en las crías desnutridas *in-útero*. Estos hallazgos son interesantes puesto que se ha señalado y aceptado que la TPH1 preferentemente se expresa en la rata adulta en distintos

órganos periféricos (glándula pineal, glándulas mamarias, intestino, páncreas, corazón, timo, bazo, pulmones, etc) en comparación a la TPH2 que principalmente se expresa en las neuronas serotoninérgicas ubicadas en el tallo cerebral y últimamente se ha reportado que también se encuentran en las neuronas de los plexos nerviosos del intestino (24-27,36). De tal forma, que la TPH1 parece tener un papel importante en la síntesis de serotonina en el cerebro durante los estadios tardíos del desarrollo y no se ha observado que intervenga en la síntesis del neurotransmisor en los adultos (37). Además, la TPH1 participa en la maduración fina de las neuronas serotoninérgicas (37), por lo que cualquier cambio en su expresión puede producir alteraciones permanentes que se manifiesten en desordenes del comportamiento en los adultos. Al respecto, existe datos en la literatura donde se menciona que las ratas que sufrieron DIU frecuentemente presentan un déficit en el aprendizaje y memoria (38), aumento de la susceptibilidad al estrés (39), modificaciones en la conducta alimentaria y alteraciones en la regulación de la selección de nutrimentos (40,41), trastornos que son considerados factores de riesgo para desarrollar obesidad, diabetes, enfermedad cardiovascular en los adultos y déficit en las repuestas corticales (42-44).

Por lo tanto, la finalidad del presente estudio fue evaluar si los diferentes cambios observados en la actividad serotoninérgica cerebral de las crías desnutridas *in-útero* se mantienen o se normalizan cuando estas crías son sometidas a un esquema de recuperación nutricia neonatal temprana.

### **3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.**

¿La recuperación nutricia neonatal temprana producirá un retorno a los normal de la actividad de la vía serotoninérgica en el tallo cerebral de las crías desnutridas *in-útero*?

#### 4. JUSTIFICACIÓN

Dado que la DIU ocasiona una elevación de la síntesis de 5-HT cerebral secundario a un aumento de la FL del L-Trp plasmático, mayor afinidad de la TPH por el L-Trp, un aumento de la actividad por mecanismos de fosforilación, mayor número de neuronas serotoninérgicas que expresan la TPH1 y un aumento significativo de la proteína de la isoforma 1, además de una disminución del número de neuronas inmunoreactivas a la TPH2 y una menor concentración de la proteína de la isoforma 2, indican que la DIU produce cambios en la expresión de las TPHs y en la población de neuronas serotoninérgicas que expresan ambas isoformas, lo que se refleja como un tono serotoninérgico elevado durante la vida fetal, ocasionando trastornos en la plasticidad cortical y alteraciones en la modulación de las respuestas sensoriales.

Por lo tanto, el estudiar si los diferentes cambios en la actividad de la vía serotoninérgica cerebral se mantienen o se normalizan en las crías desnutridas *in-útero* sometidas a un esquema de recuperación nutricia neonatal temprana, es el siguiente paso para obtener mayor información básica que nos permita conocer los mecanismos de activación de esta importante vía metabólica cerebral, que tiene un impacto negativo en la biosíntesis y función de este importante neurotransmisor, neuromodulador y factor trófico en los individuos con DIU y que puede ser el sustrato de desórdenes neuropsicopatológicos y de alteraciones del desarrollo cognoscitivo en el adulto relacionados con el sistema serotoninérgico cerebral.

## **5. OBJETIVOS**

### **5.1 OBJETIVO GENERAL**

Determinar que la recuperación nutricia neonatal temprana produce un retorno a lo normal de la actividad de la vía serotoninérgica en el tallo cerebral de las crías desnutridas *in-útero*.

### **5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.**

-Evaluar la composición corporal de las crías controles, desnutridas *in-útero* y desnutridas nutricionalmente recuperadas a través del método de Carcass.

-Cuantificar la ingesta de leche de las crías controles, desnutridas *in-útero* y desnutridas nutricionalmente recuperadas mediante la diferencia de peso corporal antes y después de un periodo de amamantamiento de 30 minutos.

-Determinar la composición de la leche (proteínas, lípidos y lactosa) que produce las ratas madre bien nutrida y desnutrida, si la demanda en la producción de la leche la ejercen las crías controles, desnutridas *in-útero* y desnutridas nutricionalmente recuperadas.

-Medir las concentraciones de L-Trp en el plasma (libre, unido a albúmina y total) en las crías controles, desnutridas *in-útero* y desnutridas nutricionalmente recuperadas por cromatografía de líquidos de alta resolución.

-Determinar la actividad de la TPH, y las concentraciones de L-Trp y 5-HT en el tallo cerebral de las crías controles, desnutridas *in-útero* y desnutridas nutricionalmente recuperadas por cromatografía de líquidos de alta resolución

## 6. HIPÓTESIS

La recuperación nutricia neonatal temprana durante el período neonatal inmediato producirá un retorno a lo normal de la actividad de la vía serotoninérgica en el tallo cerebral en las crías desnutrida *in-útero*.

## **7. MATERIAL Y MÉTODOS.**

### **7.1 Diseño del estudio.**

Experimental, longitudinal

### **7.2 Universo de trabajo.**

Ratas de la cepa Wistar desnutridas *in-útero* secundario a la restricción de alimento a las madres, dos semanas previas a la gestación, durante el embarazo y en la lactancia.

### 7.3 Descripción de variables.

#### 7.3.1 Variables independientes

Variable	Unidad de Medición	Definición Conceptual	Definición Operacional	Categoría / Escala
Recuperación Nutricia Neonatal Temprana	Gramos (g)	Aumento de la velocidad de crecimiento por encima de lo esperado para la edad, luego de un período en que éste fue retrasado o parado por alguna condición	Se consideró cuando las crías <i>desnutridas in-útero</i> sometidas a un esquema normal de nutrición al nacer, presenten aumentos somatométricos suficientes que les permitió alcanzar un crecimiento físico similar a las crías controles	Cuantitativa.
Desnutrición <i>in útero</i>	Porcentaje (%)	Número o cantidad que representa la proporcionalidad de una parte respecto a un total que se considera dividido en cien unidades.	Se consideró cuando el peso corporal de las crías al nacer este significativamente menor a las crías controles, con un déficit mayor del 10% de peso corporal.	Cuantitativa.

#### 7.3.2 Variables dependientes:

Variable	Unidad de Medición	Definición Conceptual	Definición Operacional	Categoría / Escala
Composición corporal de las crías.	Gramos (g) Centímetros (cm)	Medida del porcentaje de grasa, hueso y músculo en el cuerpo.	Se cuantificó a través del crecimiento físico de las crías (peso corporal y longitud céfalo-sacra) y la concentración de albumina en el plasma, así como la determinación del Carcass	Cuantitativa

Actividad serotoninérgica en el tallo cerebral.	L-Trp en el plasma (μmol/L) L-Trp en tallo cerebral μmol/g de tejido 5-HT: nmol/g tejido TPH: nmolde 5-HTP/mg protein/h	Es la Cantidad del producto que produce en una reacción enzimática al catalizar la conversión del sustrato por hora.	Se determinó a través de la actividad de la TPH y de las concentraciones el L-Trp y 5-HT.	Cuantitativa
---	--	--	---	--------------

#### 7.4 Tamaño de la muestra.

Se calculó de acuerdo a estudios previos (28,32) y mediante la fórmula  $N = 2\alpha(2 + 2\beta)^2 p(1-p)(r+1)/d^2$ . Con un valor  $\alpha = 0.05$  y  $\beta = 0.10$ , se calcularon seis animales por experimento para cada uno de los tiempos del estudio

Se integraron tres grupos:

Grupo 1. Crías desnutridas *in-útero* (D)

Grupo 2. Crías desnutridas *in-útero* nutricionalmente recuperadas (DNR)

Grupo 3. Crías controles (C)

#### 7.5 Análisis Estadístico

Se formaron bases de datos, se realizaron cuadros de salida en cada una de las mediciones de los diferentes grupos del estudio. Se obtuvieron los valores promedio y las desviaciones estándar. El análisis de varianza mostró homogeneidad de los grupos de datos, por lo que para la significación estadística entre los grupos se empleó ANOVA de 2 vías (tiempo y condición nutricia) y prueba de Tukey, aceptando un nivel de significancia de  $P < 0.05$ .

## 7.6 Descripción del estudio

El presente proyecto se realizó en el Laboratorio de Patología Molecular de la Unidad de Investigación Biomolecular del Hospital de Cardiología, Centro Médico Nacional, Siglo XXI, del Instituto Mexicano del Seguro Social. El estudio se llevó a cabo en un modelo experimental de DIU en rata blanca. Se utilizaron ratas de la cepa Wistar, hembras, nulíparas, con peso corporal promedio de  $250 \pm 10$  g. Durante dos semanas fueron adaptadas a las siguientes condiciones ambientales: temperatura de  $22 \pm 2$  °C, períodos de luz de 7:00 a 19:00 h y de oscuridad de 19:00 a 7:00 h, humedad atmosférica entre 50 y 60%, con mínima manipulación. Durante este período se mantuvieron con un régimen de alimentación *ad-libitum* de agua y alimento Rodent diet 5001. Cuya composición de nutrimentos es a base de 26.85% de proteínas, 16.7% de grasas (colesterol, ácido linoléico, ácido linolénico, ácido araquidónico, ácidos grasos saturados), 56.4% de carbohidratos (almidón, glucosa, fructuosa, sacarosa, lactosa), 9% de minerales ( $\text{Ca}^{+2}$ ,  $\text{Na}^{+}$ ,  $\text{K}^{+}$ ,  $\text{Mg}^{+2}$ ,  $\text{Mn}^{+2}$ , Se,  $\text{Co}^{+2}$ ), 8% de cenizas, 6% de fibra y vitaminas A, K, D<sub>3</sub>, E, B<sub>12</sub>, biotina, riboflavina, tiamina, niacina, ácido pantoténico, ácido fólico, piridoxina, ácido ascórbico y los siguientes aminoácidos: arginina, cistina, glicina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, tirosina, treonina, L-triptófano, valina, serina, ácido aspártico, ácido glutámico, alanina, prolina, taurina. Con una densidad calórica de 3.04 kcal/g de alimento.

Al término del período de adaptación, las ratas se dividieron en dos grupos: el control (C) que se alimentó con Rodent diet 5001 y agua *ad-libitum* y el grupo

experimental al cual se le produjo desnutrición (D), proporcionándole el 50% del alimento que consumió el grupo C en 24 h. En ambos grupos este esquema de alimentación se mantuvo durante dos semanas, al término de este período las ratas de ambos grupos se aparearán con machos alimentados normalmente. Durante la gestación de ambos grupos se mantuvieron las mismas condiciones descritas.

Al nacimiento, las crías de cada grupo se mezclaron entre sí y se redistribuyeron al azar en camadas de ocho miembros para disminuir las diferencias individuales y de camada. Al mismo tiempo se efectuó un entrecruzamiento de las crías de estos grupos para formar tres grupos; el grupo D lo formó crías desnutridas y que al nacer fueron alimentadas por las mismas madres desnutridas tanto en el embarazo como en la lactancia; el desnutrido nutricionalmente recuperado (DNR) el cual lo constituyó crías provenientes de madres desnutridas durante la gestación y que al nacer fueron alimentadas por madres del grupo C y el grupo control (C) lo formó crías del grupo C alimentadas por sus mismas madres.

En los días 1, 10, 15 y 21, a las madres de los diferentes grupos experimentales, dos horas antes del período de amamantamiento se les retiró las crías, las cuales se mantuvieron en una cámara de acrílico a 37°C y una humedad de 50 a 60%, 30 minutos antes de la succión de las crías, las madres fueron anestesiadas con etil carbamato a razón de 110 mg/100 gramos peso corporal y se colocaron en posición ventral para el inicio del amamantamiento. A otras madres de los mismos grupos, en los mismos tiempos se les extrajo manualmente toda la leche posible para su análisis bromatológico (proteínas, lípidos totales y lactosa).

Además, a las crías de los 3 grupos experimentales, se les determinó el consumo de leche durante un período de 30 minutos de succión, en cada uno de los días del estudio (1, 10, 15 y 21 días), mediante la diferencia de peso corporal, antes y después del periodo de succión de las crías.

A todas las crías de los mismos grupos y a las mismas edades, se les tomó un mililitro de sangre e inmediatamente fueron sacrificadas por decapitación, se les disecó el tallo cerebral el cual fue colocado en una solución amortiguadora apropiada para cada ensayo bioquímico. Además se les determinó la composición corporal a través del método de Carcass (proteínas y lípidos).

El criterio de desnutrición que se consideró fue que el peso corporal estuviera significativamente menor al peso corporal de los controles (mayor del 10% de déficit) (29), y, con el fin de disminuir las variaciones circadianas, la obtención y disección del tejido nervioso siempre fue entre las 09:00 y 11:00 h a 4°C. El manejo de los animales de experimentación se hizo de acuerdo a las normas del bioterio del Centro de Investigación de Estudios Avanzado del Instituto Politécnico Nacional bajo las normas sanitarias y de ética vigentes en investigación en animales de experimentación (ver anexos).

## **7.7 Ensayos bioquímicos. (ver anexos)**

-Se determinó la concentración de albúmina plasmática por el método espectrofluorométrico de Doumas y col (45)

-La composición corporal de las crías se determinó por el método Carcass descrito por Leshner y col (46).

-En la leche materna se le determinó las concentraciones de lípidos totales por el método descrito de Grigor & Warre, 1980 (47). La cantidad de lactosa mediante un método enzimático de Kuhn NJ 1972 (48), y las proteínas totales por el método de Lowry y cols (49)

-El L-Trp plasmático se determinó en sus fracciones libre y total, la diferencia entre estas dos se consideró el L-Trp unido a la albúmina. Las concentraciones de 5-HT y de L-Trp en el tallo cerebral fueron determinadas por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) de acuerdo al método de Peat y col (50).

-La actividad de la TPH en el tallo cerebral fue evaluada por la determinación del 5-hidroxitriptófano formado, mediante HPLC, con un detector fluorométrico (Waters model 474) (51,52).

## 8 RESULTADOS.

Como era de esperarse, la restricción de alimento a las madres antes, durante el embarazo y en la lactancia originó una disminución significativa de peso corporal, en comparación a las madres alimentadas normalmente ( $P < 0.001$ ) (Figura 3).

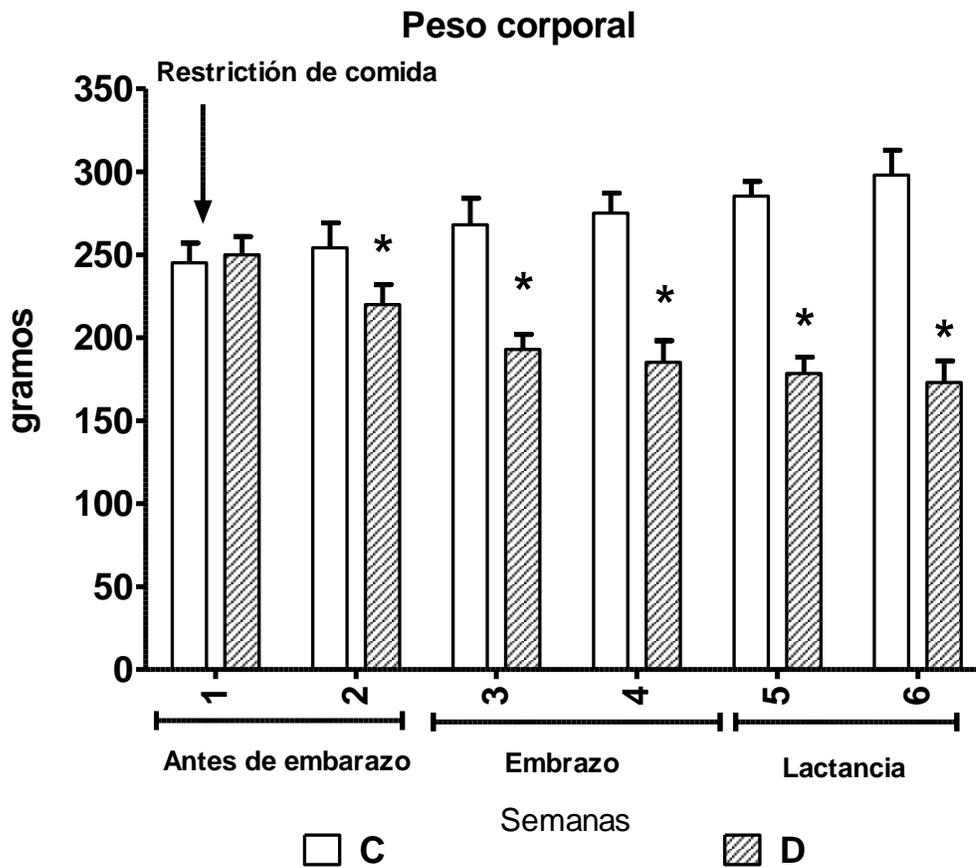


Figura 3. Peso corporal de las madres, antes, durante el embarazo y en la lactancia. C, controles; D, desnutridas. Cada barra corresponde a los valores promedio  $\pm$  desviación estándar de 50 ratas. \*  $P < 0.001$ . ANOVA dos vías y prueba de Tukey

En cuanto al crecimiento físico de las crías, se muestra en la Figura 4. Las crías de madres desnutridas tuvieron una disminución significativa del peso corporal y de la longitud céfalo-sacra al compararlas con las crías controles alimentadas por madres normales ( $P < 0.001$ ). En la misma figura se ve el patrón que mostraron las crías desnutridas que fueron alimentadas por madres controles, mostraron una franca recuperación del crecimiento físico a partir del décimo día de vida y a los 21 días alcanzaron el valor de las crías controles.

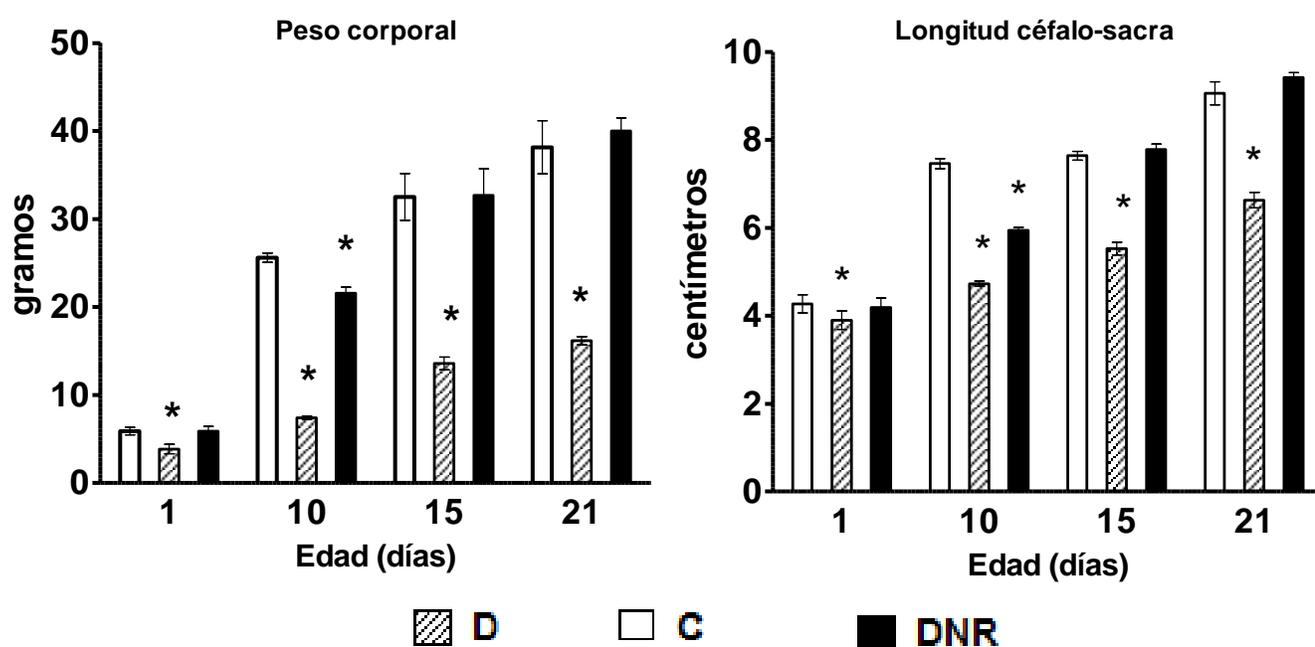


Figura 4. Datos somatométricos de crías. C, controles, D, desnutridas *in-útero* y DNR, desnutridas nutricionalmente recuperadas. Cada barra corresponde a los valores promedio  $\pm$  desviación estándar de 30 animales en cada grupo. \*  $P < 0.001$ . ANOVA dos vías y prueba de Tukey.

La concentración de albúmina en el plasma se muestra en la Figura 5. Como se puede observar, existió una disminución significativa en las crías desnutridas en relación a las controles ( $P < 0.001$ ). Además en la misma figura se puede ver el patrón de desarrollo que presentó las crías desnutridas nutricionalmente recuperadas (grupo DNR), al igual que el peso corporal, se observó una franca recuperación a partir del décimo día de vida y a los 21 días alcanzó el valor de la albúmina que tuvieron las crías controles.

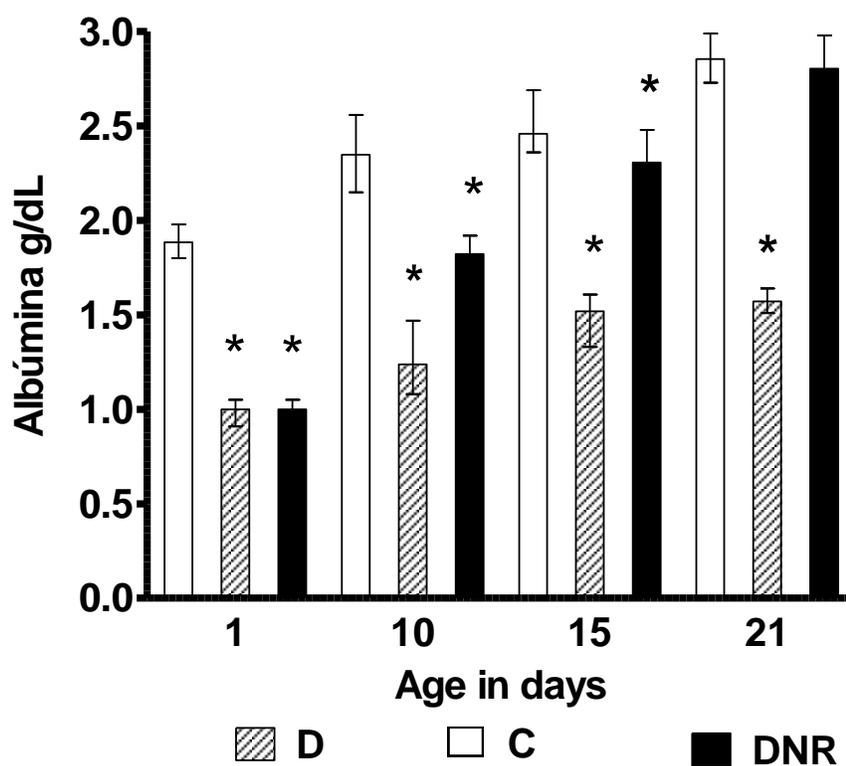


Figura 5. Concentración de albúmina en el plasma de las crías. C, controles D, desnutridas *in-utero* y DNR, desnutridas nutricionalmente recuperadas. Cada barra corresponde a los valores promedio  $\pm$  desviación estándar de 10 crías en cada grupo. \*  $P < 0.001$ . ANOVA dos vías y prueba de Tukey.

La Figura 6 muestra la composición corporal de las crías. Se observó una disminución significativa de la concentración de proteínas y lípidos totales en las crías desnutridas desde el nacimiento ( $P < 0.001$ ). Interesantemente, cuando a estas crías desnutridas fueron alimentadas por madres controles (grupo DNR) mostraron una recuperación de la concentración de proteínas a partir del día 15 de vida y un aumento significativo de la cantidad de lípidos totales a partir del día 10 de vida posnatal, e inclusive el aumento fue mayor a partir del día 15 en comparación a las crías controles ( $P < 0.001$ ).

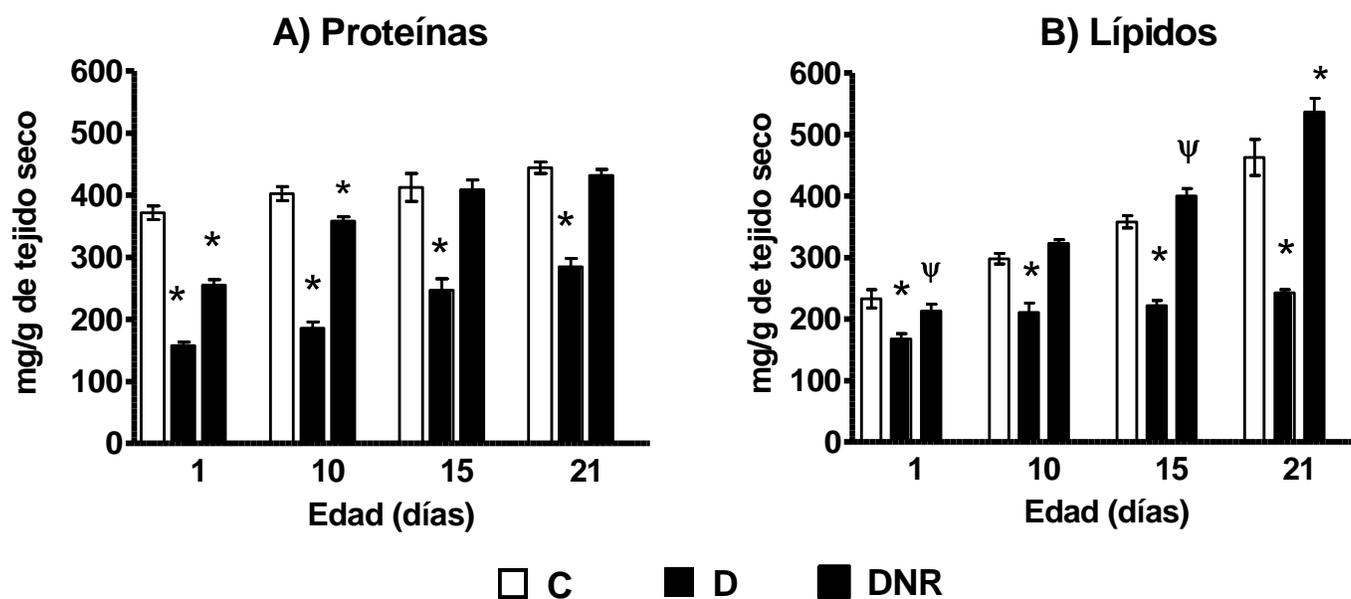


Figura 6. Composición corporal de las crías. C, controles, D, desnutridas *in-útero* y DNR, desnutridas nutricionalmente recuperadas. Cada barra corresponde a los valores promedio  $\pm$  desviación estándar de 10 crías en cada grupo.  $\Psi P < 0.01$ ,  $*P < 0.001$  (C vs DNR; C vs D). ANOVA dos vías y prueba de Tukey.

La cantidad de leche que ingirieron las crías se muestra en la Figura 7. Como se puede observar las crías desnutridas tuvieron una menor ingesta de leche en relación a las crías controles amamantadas por madres normales ( $P < 0.001$ ). Pero, cuando las crías del grupo DNR, fueron alimentadas por madres controles, mostraron un incremento significativo en la ingesta de leche a partir del día 10 de vida, alcanzado la misma ingesta de leche de las crías controles al final del período de la lactancia.

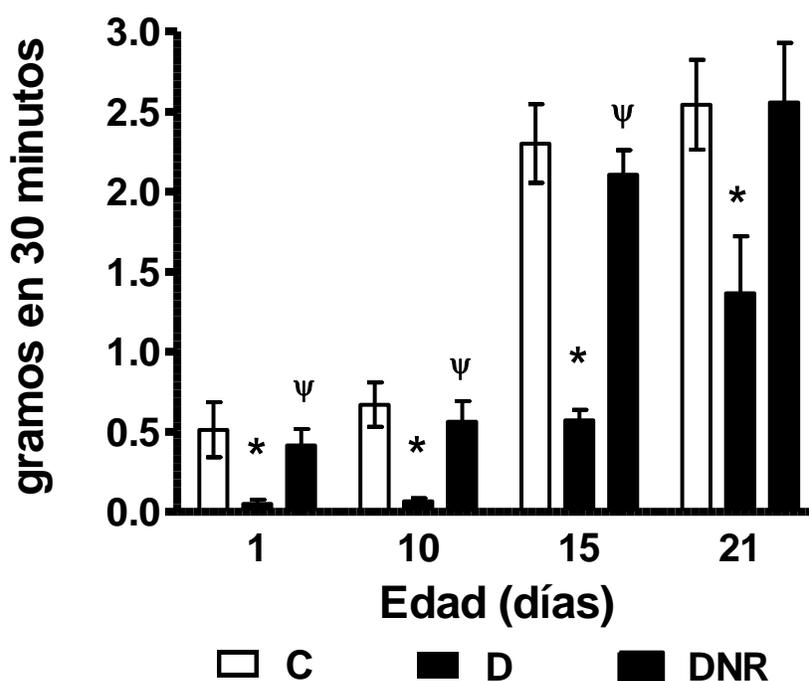


Figura 7. Ingesta de leche materna de las crías durante un período de amamantamiento de 30 minutos. C, controles, D, desnutridas *in-útero* y DNR, desnutridas nutricionalmente recuperadas. Cada barra corresponde a los valores promedio  $\pm$  desviación estándar de 10 crías en cada grupo.  $\Psi$   $P < 0.05$  (C vs DNR); \*  $P < 0.001$  (C vs D). ANOVA dos vías y prueba de Tukey.

En la tabla 1 se muestra la composición bioquímica de la leche. Se observó que el contenido de proteínas fue similar en ambas madres, controles y desnutridas. Sin embargo, las cantidades de lactosa y lípidos totales fueron menores en las madres desnutridas al compararlas con las madres controles ( $P < 0.001$ ). Nótese que las madres controles que amamantaron a crías desnutridas tuvieron un aumento significativo de la cantidad de lípidos totales en su leche en comparación a las madres controles que alimentaron a sus propias crías ( $P < 0.01$ ).

**Tabla 1. Composición de la leche materna durante la lactancia (g/dl)**

Condición nutricia	Edad (días)	Proteínas	Lípidos	Lactosa
C	1	10.46 ± 0.44	4.11 ± 0.17	10.16 ± 1.20
	10	9.50 ± 1.57	4.08 ± 0.61	11.64 ± 0.95
	15	10.87 ± 1.15	4.12 ± 0.56	12.33 ± 1.74
	21	11.86 ± 0.77	4.06 ± 0.71	12.21 ± 1.90
D	1	10.64 ± 0.84	2.72 ± 0.19*	5.16 ± 1.02*
	10	10.50 ± 0.67	2.99 ± 0.21*	5.91 ± 1.62*
	15	10.18 ± 0.59	3.88 ± 0.17*	6.14 ± 1.33*
	21	10.86 ± 0.50	2.55 ± 0.76*	6.42 ± 0.70*
DNR	1	11.27 ± 0.52	5.48 ± 0.89*	9.34 ± 0.44
	10	11.72 ± 2.09	5.78 ± 0.71*	13.29 ± 1.71
	15	12.26 ± 1.22	5.90 ± 0.57*	15.63 ± 2.12
	21	12.64 ± 1.50	5.80 ± 0.99*	13.44 ± 3.35

Cada punto representa los valores promedio ± desviación estándar de 8 determinaciones en duplicado.

C controles; D desnutridas in-útero y DNR, desnutridas nutricionalmente recuperadas. \*  $P < 0.001$ .

ANOVA dos vías y prueba de Tukey ANOVA dos vías y prueba de Tukey.

De acuerdo a previas observaciones (24-28), crías con desnutrición *in-útero* mostraron un aumento significativo de la fracción libre del L-Trp en el plasma ( $P < 0.001$ ). El L-Trp unido a la albúmina estuvo disminuido ( $P < 0.001$ ) y L-Trp total no mostró cambios en todos los grupos del estudio. Es importante hacer notar que la fracción libre del L-Trp y el unido a albúmina en las crías el grupo DNR mostraron una completa recuperación con la edad, alcanzado los valores de las crías controles en el día 21 de vida posnatal (Ver Figura 8).

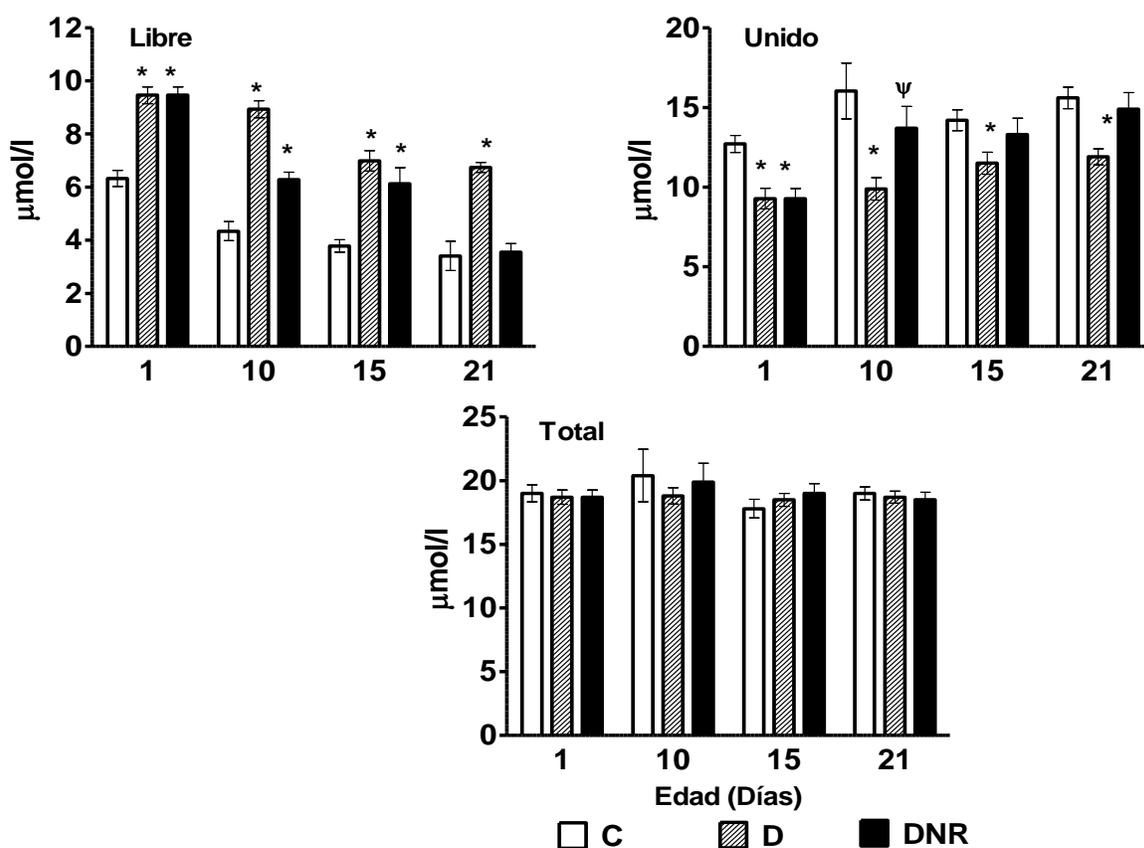


Figura 8. Concentración de L-triptófano en el plasma de crías. C, controles, D, desnutridas *in-útero* y DNR, desnutridas nutricionalmente recuperadas. Cada barra corresponde a los valores promedio  $\pm$  desviación estándar de 10 experimentos por duplicado.  $\psi P < 0.05$ , \*  $< 0.001$ . ANOVA dos vías y prueba de Tukey.

Nuevamente se confirmó que las crías desnutridas *in-útero* tuvieron un aumento significativo de la concentración de L-Trp, de la actividad de la TPH y de la 5-HT en el tallo cerebral en relación a las crías controles durante el período de lactancia ( $P < 0.001$ ) (Figura 9). También se observó que las crías del grupo DNR mostraron un regreso a lo normal de la concentración del L-Trp en el tallo cerebral a partir de días 15 de vida, sin embargo es importante hacer notar que la actividad de la TPH y la concentración de 5-HT no retornaron a los valores que tuvieron las crías controles durante el período de lactancia ( $P < 0.001$ ) (Ver Figura 9).

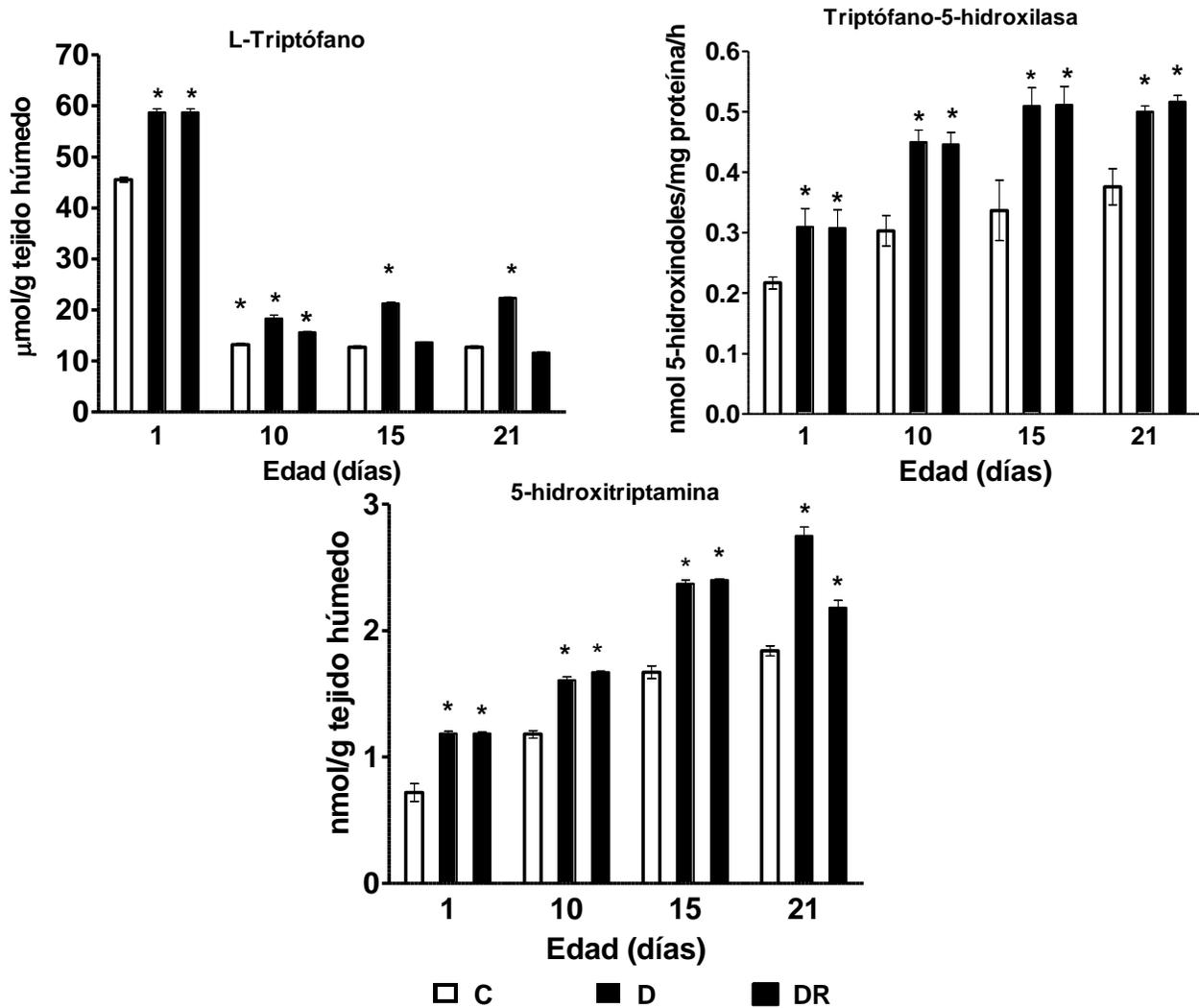


Figura 9. Actividad serotoninérgica en el tallo cerebral de las crías. C, controles, D, desnutridas *in-útero* y DNR, desnutridas nutricionalmente recuperadas. Cada barra corresponde a los valores medios  $\pm$  desviación estándar de 10 crías en cada grupo. \*  $P < 0.001$ . ANOVA dos vías y prueba de Tukey.

## 9 DISCUSIÓN.

Los presentes resultados confirman que las ratas sometidas a un régimen de restricción de alimento durante el embarazo y en la lactancia producen desnutrición. Al mismo tiempo, las crías de estas madres tuvieron desnutrición *in-útero*. Se demostró que su peso corporal se altera con más facilidad que la longitud céfalo-sacra, lo que constituye un hallazgo universalmente observado (19, 31-35,38).

Asimismo, se observó que durante la evolución de la desnutrición existen alteraciones de la composición bioquímica, ya que observó en las crías del grupo D una menor concentración de albúmina en el plasma y es importante hacer notar que las crías del grupo DNR sometidas a un esquema normal de nutrición al nacimiento tuvieron aumentos somatométricos suficientes que les permitió alcanzar el crecimiento físico y un retorno a lo normal de la concentración de la albúmina plasmática, logrando los valores que tuvieron las crías controles al final del período de lactancia.

Juntos, estos hallazgos nos permiten plantear que cuando la restricción de alimento es eliminada durante la vida fetal o neonatal temprana, las células del organismo en proceso de crecimiento pueden continuar su desarrollo genéticamente programado, siempre y cuando el medio nutricional y endócrino sea el óptimo, permitiendo de esta manera una completa recuperación nutricional (53, 54). Por otro lado, existe evidencia científica que apoya que el incremento del crecimiento físico durante la recuperación nutricional es debido a un mayor consumo de alimento y una mayor eficiencia en la utilización de la energía por las células. En este estudio nosotros

observamos que las crías DNR ingirieron más leche materna que las crías desnutridas no recuperadas, pero, interesantemente su ingesta de leche fue similar a las crías controles al final del período de la lactancia. Por otra parte, es importante hacer notar que las madres controles que alimentaron a estas crías desnutridas nutricionalmente recuperadas, tuvieron una mayor cantidad de lípidos totales en su leche en comparación a la que mostraron las madres controles que amamantaron a sus crías. Nótese también que las madres desnutridas que alimentaron a sus propias crías tuvieron una menor cantidad de lípidos y carbohidratos totales en comparación a las madres controles (ver Tabla 3). Estos resultados confirman que la cantidad y calidad de la leche materna ingerida por las crías desnutridas durante la lactancia es el principal factor que participa en la recuperación nutricia completa e inclusive las predispone a desarrollar obesidad en la edad adulta. Se conoce que el consumo de grandes cantidades de alimento y el desarrollo de obesidad se consideran causa y efecto, secundarios a características determinadas genéticamente y/o a factores epigenéticos que interactúan durante el desarrollo y crecimiento del organismo (55). Esta interacción probablemente determina la condición nutricia del individuo durante la vida adulta y la predisposición a la obesidad probablemente relacionada a cambios de la conducta alimentaria como secuela de un trastorno serotoninérgico cerebral durante la vida fetal (40,41), que se manifiesta durante la vida adulta del individuo.

Actualmente hay bases sólidas para afirmar que gran parte de los mecanismos biológicos que regulan la ingesta de alimento normal o durante la recuperación nutricia residen en el cerebro. Recientemente se ha propuesto que la serotonina

cerebral participa en la regulación de la conducta alimentaria, tiene un papel inhibitorio de la saciedad; contribuye al control de la saciedad durante el día y la noche; regula el peso corporal junto con otros sistemas neuronales; interactúa con el sistema dopaminérgico para el control del comportamiento de la selección de nutrimentos; regula la cantidad de ingesta de proteínas y carbohidratos (56). Se ha reportado en otros estudios que las crías desnutridas durante la vida fetal tienen una modificación en la conducta alimentaria, que consiste en una mayor ingesta de proteína y grasa y una menor toma de carbohidratos, pero no se conoce cuál es el patrón de la conducta alimentaria de las crías desnutridas *in-útero* nutricionalmente recuperadas.

Además de los cambios generales en el crecimiento físico y composición corporal, la DIU también es capaz de producir alteraciones cerebrales más específicas. Uno de estos cambios es el que se ha demostrado para el sistema serotoninérgico en el cerebro de la rata durante el desarrollo, que consiste en una aceleración en la síntesis de 5-HT (19,30-35). El presente trabajo confirma y amplía resultados anteriores, en los que se ha demostrado un aumento de la concentración de 5-HT, del L-Trp y de la actividad de la TPH en las crías desnutridas durante la gestación y en la lactancia (19,30-35). El aumento crónico de la actividad de la TPH observada desde la etapa fetal y que se continúa en la vida posnatal secundario a un mayor paso del L-Trp plasmático al cerebro, es uno de los mecanismos que explica la activación de esta vía metabólica. Sin embargo también se ha demostrado que la DIU produce un cambio en la cinética de la TPH, se ha observado un aumento de la afinidad ( $K_m$ ) por el L-Trp y una mayor capacidad de activación por diferentes

mecanismos de fosforilación (35), y recientemente se ha reportado que estas crías desnutridas *in-útero* tienen un mayor número de neuronas serotoninérgicas que expresan la TPH1 y un aumento significativo de la proteína de esta isoforma 1, además una disminución del número de neuronas inmunoreactivas a la TPH2 y una menor concentración de la proteína de la isoforma 2, (34) lo que indican que la DIU produce cambios en la expresión de las TPHs y en la población de neuronas serotoninérgicas que expresan ambas isoformas de la enzima, lo que se refleja como un tono serotoninérgico elevado durante la vida fetal (34).

Un efecto similar también se ha observado en niños con DIU, a través de la fracción libre del L-Trp, ya que en ellos se ha demostrado una elevación significativa de este aminoácido en el plasma (22,32). Esta alteración temprana en la disponibilidad de la fracción libre del L-Trp a través de la barrera feto-placentaria parece ser una vía efectiva para activar la síntesis de serotonina cerebral y aumentar su liberación por las neuronas serotoninérgicas, que da como resultado un cambio temprano en su función trófica en el ensamblaje neuronal de la corteza cerebral. El aumento de la neurotransmisión serotoninérgica desde el período fetal puede inducir un comportamiento diferente de la corteza sensorial y diferentes respuestas de la corteza auditiva en etapas posteriores, detectadas a través de los potenciales auditivos evocados de larga latencia, como es el caso de la disminución de la amplitud del componente N1/P2, observada en niños y ratas con desnutrición *in-útero* (57).

Interesantemente en este estudio se observó que cuando las crías desnutridas *in-útero* fueron sometidas a un régimen de recuperación nutricia neonatal temprana,

mostraron una recuperación física y de la composición corporal durante el período de lactancia, además un retorno al nivel normal del precursor de la síntesis de 5-HT, el L-Trp. Pero a pesar de este hecho, la actividad de la TPH no regresó a lo normal como era de esperarse y persistió el aumento de la síntesis de 5-HT, sugiriendo que el mecanismo de activación en las crías DNR no parece ya deberse a los cambios en la síntesis de 5-HT que lo originaron en las crías desnutridas *in-útero*. El hallazgo de que el L-Trp en plasma y en el cerebro si se normalizaran en las crías recuperadas nutricionalmente deja de ser ya el factor predominante en la activación de la TPH, aunque ésta permanezca activada, lo que estaría en favor de que en el cerebro recuperado nutricionalmente ya no son los cambios en el metabolismo del L-Trp que se observan en las crías desnutridas para mantener activada la TPH. Por lo tanto, parece ser que el mecanismo que mantiene activada la vía biosintética de este neurotransmisor en las crías desnutridas nutricionalmente recuperadas es diferente al que tiene las crías desnutridas *in-útero* y podría ser explicado por cambios conformacional en el complejo proteínico de la enzima; esto apoyado, como ya que mencionó en los cambios en la cinética y en la activación de la TPH por mecanismo de fosforilación.

## 10 CONCLUSIONES.

Los presentes resultados apoyan al hecho de que la alimentación *ad-libitum* en las crías desnutridas *in-útero* desde el nacimiento es el principal factor que participa en la recuperación nutricia y los predispone a desarrollar obesidad en la vida adulta. Además, produce un retorno a lo normal de L-Trp en el plasma y en el cerebro, pero a pesar de éste hecho, la actividad de la TPH permanece elevada, acompañada de un aumento de las síntesis de 5-HT. Estos hallazgos son interesantes y nos permiten plantear que probablemente el mecanismo de activación de la síntesis de 5-HT en estos animales desnutridos nutricionalmente recuperados, sea debido a cambios en la estructura de la TPHs, o bien a la persistencia de las modificaciones en las expresiones de las poblaciones neuronales serotoninérgicas inducidas por DIU durante el desarrollo cerebral y que persisten durante la vida adulta.

## 11 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Deodhar J, Jarad R. Study of the prevalence of and high risk factors for fetal malnutrition in term newborns. *Ann Trop Paediatr* 1999;19 (3): 273-277.
2. Velázquez QN, Yunes ZJ, Avila RG 2004. Recién nacidos con bajo peso; causas, problemas y perspectivas a futuro. *Bol. Med. Hosp, Infant. Mex.* 61 (1):73-86
3. Scott KK, Usher RH. Epiphyseal development in fetal malnutrition syndrome. *N Eng J Med* 1964; 270: 822-824.
4. Crosby W. Studies in fetal malnutrition. *Am J Dis Child* 1991;145 (8): 871-876.
5. Savitz DA, Anath CV, Berkowitz GS, Lapinski R. 2000. Concordance among measures of pregnancy outcome based on fetal size and duration of gestation. *Am. J. Epidemiol.* 15:627-33.
6. Larroque B, Bertrais S, Czernichow p. 2001. School difficulties in 20 years-olds who were small for gestation age at term in a regional study. *Pediatrics.* 108:111-5.
7. Hill RM, Verniaud WM, Deter RL et al. The effect of intrauterine malnutrition on the term infant: A 14-year prospective study. *Acta Paediatr Scand* 1984; 73: 482-487.
8. Gosselin J, Amiel-Tisson C, Infante-Rivard C, Fouron JC. Minor neurological signs and developmental performance in high risk children at preschool age. *Dev Med Child Neurol* 2002; 44 (5): 323-328.

9. Steinbusch HWM. Distribution of serotonin-immunoreactivity in the central nervous system of the rat-cell bodies and terminals. *Neuroscience* 1981; 6:557-618.
10. Jacobs BL, Azmitia EC. Structure and function of the brain serotonin system. *Physiol Rev* 1992; 72:165-229.
11. Dahlstrom 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.
12. Takeuchi Y, Kimura H, Matsura T. Distribution of serotonergic neurons in the central nervous system. *J Histochem Cytochem* 1983; 31: 181-185.
13. Andrade R. Regulation of membrane excitability in the central nervous system by serotonin receptor subtypes. *Ann NY Acad Sci* 1998; 861:190-203.
14. Choi DS, Kellerman O, Richard S, et al. Mouse 5HT<sub>2B</sub> receptor-mediated serotonin trophic functions. *Ann NY Acad Sci* 1998; 861:67-78.
15. McMenamy RH, Oncley JL. The specific binding of L-tryptophan to serum albumin. *J Biol Chem* 1975; 233:1436-1447.
16. Jequier E, Robinson DS, Lovenberg W, et al. Further studies on tryptophan hydroxylase in rat brainstem and beef pineal. *Biochem Pharmacol* 1969; 18:1071-1081.
17. Boadle-Biber MC. Regulation of serotonin synthesis. *Prog Biophys Molec Biol* 1993; 60:1-15.

18. Thöny B, Auerbach G, Blau N. Tetrahydrobiopterin biosynthesis, regeneration and functions. *Biochem J* 2000; 347:1–16.
19. Manjarrez GG, Gonzalez RM, Boyzo MOA, et al. Dihydropteridine reductase activity in the brainstem of intrauterine growth-restricted rats. *Int J Devl Neuroscience* 2010; 28:621-624.
20. Lovenberg W, Weisbach H, Udenfriend S. Aromatic L-amino acid decarboxylase. *J Biol Chem* 1962;273:89-93.
21. Fitzpatrick PF. The aromatic amino acid hydroxylase. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* 2000; 74:235-294.
22. Manjarrez GG, Contreras JL, Chagoya GG, et al. Free tryptophan as an indicator of brain serotonin synthesis in infants. *Pediatric Neurol* 1998; 18:57-62.
23. Manjarrez G, Hernandez E, Robles A, et al. N1/P2 component of auditory evoked potential reflect changes of the brain serotonin biosynthesis in rats. *Nutr Neuros* 2005; 8:213-218.
24. Patel PD, Pontrello C, Burke S. Robust and tissue-specific expression of TPH2 versus TPH1 in rat raphe and pineal gland. *Biol Psychiatr* 2004; 5:428-433.
25. Veenstra VWJ, Cook EH Jr. Knockout mouse points to second form of tryptophan hydroxylase. *Mol Interv* 2003; 3:72-75.
26. Walther DJ. Synthesis of serotonin by second tryptophan hydroxylase isoform. *Science* 2003; 299:76.

27. Walther DJ, Bader M. A unique central tryptophan hydroxylase isoform. *Biochem Pharmacol* 2003; 66:1673–1680.
28. Hufton SE, Jennings IG, Cotton RGH. Structure and function of the aromatic aminoacids hydroxylase. *Biochem J* 1995; 311:353-366.
29. Moran GR, Daubner SC, Fitzpatrick PF. Expression and characterization of the catalytic core of tryptophan hydroxylase. *J Biol Chem* 1998; 273:12259-12266.
30. Hernández RJ. Developmental pattern of the serotonin synthesizing enzyme in the brain of postnatally malnourished rats. *Experientia* 1973; 29:1478-1488.
31. Manjarrez GG, Hernández RJ, Chagoya GG. Perinatal brain serotonin metabolism in rats malnourished in utero. *Biol Neonate* 1988; 54:232-240.
32. 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.
33. Hernandez RJ, Manjarrez GG. Macronutrients and neurotransmitter formation during brain development. *Nutr Rev* 2001; 59:S49-S59.
34. Manjarrez GG, Martinez RK, Boyzo MOA, et al. Increased expression of tryptophan-5-hydroxylase 1, but not 2, in brainstem as a result of intrauterine malnutrition. *Int J Devl Neurosci* 2012; 30:445-450.
35. Manjarrez GG, Chagoya GG, Hernández RJ. Early nutritional changes modify the kinetics and phosphorylation capacity of tryptophan-5-hydroxylase. *Int J Devl Neurosci* 1994; 12:695-702.

36. Hixson EJ, Lehrmann GV, Maickel RP. Contractile response to tryptamine analogues in isolated smooth muscle. *Arch Int Pharma-codyn Ther* 1977; 229:4-14.
37. Nakamura K, Sugawara Y, Sawabe K, et al. Late developmental stage-specific role of tryptophan hydroxylase 1 in brain serotonin levels. *J Neurosci* 2006; 26:530-534.
38. Morgane PJ, Mokler DJ, Galler JR. Effect of prenatal protein malnutrition on the hippocampal formation. *Neurosci Biobehav Rev* 2002; 26:471-483.
39. Almeida SS, Tonkiss J, Galler JR. Malnutrition and reactivity to drugs acting in the central nervous system. *Neurosci Biobehav Rev* 1996; 20:389-402.
40. Diaz MA, Chagoya GG, Hernandez RJ. Modificación por desnutrición ontogénica de la neurotransmision serotoninergica cerebral y de la conducta relacionada. *Bol Med Hosp Infant Mex* 1993; 60:17-26.
41. Lopes de Souza S, Orozco-Solis R, Grit I, et al. Perinatal protein restriction reduces the inhibitory action of serotonin on food intake. *Eur J Neurosci* 2008; 27:1400-1408.
42. Hale CN, Barker DJ. The thrifty phenotype hypothesis. *Br Med Bull* 2001; 60:5-20.
43. Gluckman PD, Hanson MA Living with the past: evolution, development and patterns of disease. *Science* 2004; 305:1733-1736.
44. Manjarrez G, Cisneros I, Herrera R, et al. Prenatal impairment of brain serotonergic transmisión in infants. *J Pediatr* 2005; 147:592-596.

45. Dumas BT, Watson WA, Biggs HG. Albumin standards the measurement of serum albumin with bromocresol green. *Clin Chim Acta* 1971; 31: 87-96.
46. Leshner AI, Litwin VA. A simple method for carcass analysis. *Physiol Behav* 1972; 9:281-282.
47. Grigor MR, Warren SM. Dietary regulation of mammary lipogenesis in lactating rats. *Biochem J* 1980; 188:61-65.
48. Kunhn NJ. The lactose and neuraminlactose content of rat milk and mammary tissue. *Biochem J* 1972; 130:177-180.
49. Lowry OH, Rosenbrough JN, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193:265-275.
50. Peat M, Gibb J. High-Performance Liquid Chromatographic Determination of Indoleamines, Dopamine, and Norepinephrine in Rat Brain with Fluorometric Detection. *Anal Biochem* 1983; 128: 275-80.
51. Johansen PA, Jennings I, Cotton RGH, et al. Tryptophan hydroxylase is phosphorylated by protein kinase A. *J Neurochem* 1995;65:882-888.
52. Johansen PA, Jennings I, Cotton RGH, et al. Phosphorylation and activation of tryptophan hydroxylase by exogenous protein kinase A. *J Neurochem* 1996;66:817-823.
53. Schadereit D, Klein M, Rehfeldt Ch, Kreienbring F, Krawielitzki K. Influence of nutrient restriction and realimentation on protein and energy metabolism, organ weights, and muscle structure in growing rats. *J Anim Physiol Anima Nut (Berl)* 1995; 74:253-268.
54. Boersma B; MarartenWit J. Catch-up growth. *Endocrine Rev* 1997; 18:646-

661.

- 55.** Metges CC. Early nutrition and later obesity: animal models provide insights into mechanisms, *Adv Exp Med Biol* 2009; 646:105-112.
- 56.** Blundell PE. Possible roles for serotonin in the control of feeding. Role of monoamine systems in the control of food intake and nutrient selection. En: Morley JE, editor. *Nutrition modulation of neural function*. San Diego California. Academic Press Inc; 1988. P. 95-123.
- 57.** Manjarrez GG, Hernández ZE, Robles OA, González RM, Hernández RJ. Developmental impairment of auditory evoked N1/P2 component in rats undernourished in utero: its relation to brain serotonin activity. *Dev Brain Res* 2001; 127:149.155.

## **12 ANEXOS.**

### **12.1 Anexo 1**

#### **Consideraciones éticas para el manejo de los animales de experimentación Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-199**

##### **Instalaciones y equipo de alojamiento de los animales**

Para este estudio se emplearon ratas hembras, las cuales se producen en el bioterio del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN, donde fueron alojadas los animales de experimentación; este bioterio sigue los lineamientos de la norma oficial mexicana 062-ZOO-1999 publicada el 22 de agosto del 2001, en el diario oficial donde se describen las especificaciones técnicas en relación al uso y manejo de roedores para experimentación.

El sitio donde estuvieron las ratas tiene unas dimensiones de 3 x 3 m, el cual cuenta con anaqueles especiales para el alojamiento de los mismos. Existe control del ciclo de luz y oscuridad, de la temperatura, humedad y está equipado con filtros de aire. Cada uno de los animales fue alojado en una jaula de acrílico 20 X 27 X 46.5 cm que le permitió movimientos y adopciones de postura normales de la especie. Los ciclos de luz y oscuridad fueron de 12:12 h, el de luz de 07.00 a 19.00 h y el de oscuridad de 19.00 a 07.00 h, la humedad relativa de 50 a 60%. Las jaulas estuvieron cerradas a prueba de escape y protección de amenazas externas. Además, las jaulas fueron de acrílico transparente que permitió observar a los animales de experimentación.

##### **Alimentación y provisión de agua**

El alimento y el agua fueron proporcionados de acuerdo al diseño experimental comentado previamente en el material y métodos de este proyecto. El alimento fue Formulab Lab Diet 5008, cuya composición de nutrimentos es a base de 26.85% de proteínas, 16.7% de grasas y 56.44% de carbohidratos, 9% de minerales, 8% de cenizas, 6% de fibra y vitaminas A, K, D<sub>3</sub>, E, B<sub>12</sub>, biotina, riboflavina, tiamina, niacina, ácido pantoténico, ácido fólico, piridoxina, ácido ascórbico y los siguientes aminoácidos: arginina, cistina, glicina, histidina, isoleucina, leucina, lisina,

metionina, fenilalanina, tirosina, treonina, triptófano, valina, serina, ácido aspártico, ácido glutámico, alanina, prolina, taurina. Con una densidad calórica de 3.04 kcal/g de alimento y el agua fue obtenida por un sistema de filtración el cual utiliza un filtro de 0.4  $\mu$ M de tamaño de poro.

### **Técnicas experimentales**

1. Los animales fueron manejados siempre con cuidado, con guantes, pero con firmeza, procurando la seguridad de personales que los manipuló. Las técnicas de sujeción, manipulación e inmovilización se efectuarán de acuerdo a los principios humanitarios internacionalmente aceptados y supervisado por un médico Veterinario.
2. Una parte de los animales fueron sacrificado por sobredosis de anestesia, ya que es una técnica adecuada para la eutanasia de roedores; para este fin se utilizó pentobarbital sódico, en una dosis 3 veces mayor a la requerida para la anestesia. Decidimos utilizar este método de sacrificio debido a que es un medio para obtener tejido nervioso íntegro. En este proyecto se requirió un tejido cerebral libre de contaminación química para un adecuado análisis de los parámetros que se evaluaron. Por último, se eliminaron las excretas y los cadáveres por medio de incineración.

## 12.2 Anexo 2. Ensayos bioquímicos.

**1** La concentración de albúmina plasmática se determinó por el método espectrofluorométrico de Doumas y col, (42) usando albúmina humana como estándar. A 25  $\mu$ L de plasma total se les agregó 5 ml de una solución de verde de bromocresol 0.6 mM en una solución amortiguadora de ácido succínico 0.10 M, pH 4.20. Los tubos con la reacción se agitaron constantemente en un baño metabólico (Dubnoff) por 10 minutos a 25°C. El desarrollo de la reacción se midió en un espectrofotómetro Varian DM a 628 nm de excitación. En cada ensayo se incluyó una curva estándar de albúmina humana y las concentraciones se expresaron en gramos por decilitro.

**2** La composición corporal de las crías se determinó por el método Carcass descrito por Leshner y col. (43) Brevemente, los cadáveres fueron afeitados y eviscerados, secados y pulverizados. El contenido de grasa total se determinó por un método de extracción con éter desarrollado por Squibb y col. (44) La cantidad de proteínas fue evaluada por el método de Lowry y cols. (45)

**3** A la leche materna se le determinó las concentraciones de lípidos totales por el método descrito de Grigor & Warre, 1980. (46) La cantidad de lactosa mediante un método enzimático de Kuhn NJ, 1972, (47) y las proteínas totales por el método de Lowry y cols (45).

**4** El L-Trp plasmático se determinó en sus fracciones libre y total, la diferencia entre estas dos se consideró el L-Trp unido a la albúmina. El método empleado consistió en obtener un ultra filtrado del plasma con membranas Nanosep 30 K, Millipore, USA, con las que se recuperó la fracción libre del L-Trp (FLT), después de centrifugar 60 segundos a 1800 g en una centrífuga Avanti J-31, Beckman a 4°C. Los cambios de pH plasmático se evitaron agregando a las muestras de sangre un amortiguador tris-base 50 mM, pH 7.40. Se tomaron 20  $\mu$ l del ultra filtrado, en donde se cuantificó la FLT por el método fluorométrico de HPLC de Peat y col. (48) Con este mismo método se determinó el L-Trp plasmático total.

**5** Las concentraciones de 5-HT y de L-Trp en el tallo cerebral fueron

determinadas por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) de acuerdo al método de Peat y col. (48) Brevemente, todos los tejidos fueron homogeneizados con una solución de  $\text{HClO}_4$  0.1 M, más metabisulfito de sodio 4 mM. El homogeneizado se centrifugó a 15,000 g durante 15 minutos a  $4^\circ\text{C}$ . Posteriormente, 20  $\mu\text{l}$  del sobrenadante fueron inyectados al HPLC (Waters Corporation), utilizando una columna de simetría  $\text{C}_{18}$  de fase reversa de 5  $\mu\text{m}$  de tamaño de partícula, 3.9 x 150 mm de longitud. Se usó un sistema binario de una solución de fosfato de potasio monobásico 2 mM, pH 3.30 más ácido heptanosulfónico 1 g/L de solución y una mezcla de metanol/agua en una relación de 3:2 v/v, a razón de un mililitro por minuto. Las determinaciones de la 5-HT y del L-Trp se realizaron mediante un detector fluorométrico (Waters Modelo 474), con una excitación de 290 nm y 330 nm de emisión. La respuesta fue obtenida mediante un sistema análogo Empower 2 (Waters corporation) y las concentraciones de 5-HT y L-Trp fueron consideradas como la altura máxima de la señal, de acuerdo a una curva estándar de cantidades conocidas de 5-HT y L-Trp. Los resultados fueron expresados, en nmol de serotonina/mg de tejido y  $\mu\text{Mol}$  de L-Trp /mg de tejido.

**6** La actividad de la TPH en el tallo cerebral fue evaluada por la determinación del 5-hidroxitriptófano formado, mediante HPLC, con un detector fluorométrico (Waters model 474) (49,50). Brevemente, este método consiste en incubar 300  $\mu\text{g}$  de la proteína enzimática en presencia de una solución amortiguadora de tris-HCl 50 mM, pH 7.40, EGTA 1.0 mM, 15  $\mu\text{g}$  de catalasa, 200  $\mu\text{M}$  2-amino-4-hidroxi-1-metil tetrahidrobiopterina. La reacción se incubó a  $37^\circ\text{C}$  durante 10 minutos y se detuvo por la adición de  $\text{HClO}_4$  6 M más 5 mM de EDTA y 0.1 % de ácido ascórbico. Veinte  $\mu\text{L}$  del medio de la reacción fueron inyectados al HPLC. Se usó una columna de simetría  $\text{C}_{18}$  (5  $\mu\text{m}$  de tamaño de partícula, 3.9 x 150 mm). La fase móvil se preparó con acetato de sodio 40 mM, pH 3.30 y acetonitrilo, en una relación de 95:5 respectivamente y se corrió a un mililitro por minuto. Las longitudes de excitación y de emisión que se utilizaron para la detección del 5-hidroxitriptófano formado fueron

de 280 nm y 340 nm respectivamente. Los tiempos de retención para 5-hidroxitriptófano fueron de 2.3 minutos y de 5.5 minutos para el L-triptófano.