



5-HIDROXITRIPTOFANO HIDROXILASA

UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLAS DE HIDALGO



INSTITUTO DE INVESTIGACIONES QUIMICO BIOLÓGICAS

Maestría en Biología Experimental

“INFLUENCIA DE LA RESTRICCIÓN ALIMENTICIA DURANTE
EL DESARROLLO PERINATAL SOBRE EL SISTEMA
SEROTONINÉRGICO CEREBRAL.”

Presentado por:

LUCIA SANTIBAÑEZ MONDRAGON

ASESORES:

M. EN C. HECTOR URQUIZA MARIN
DR. ROSALIO MERCADO CAMARGO

Morelia Mich., Septiembre del 2006



INDICE

LISTA DE ABREVIATURAS	2
RESUMEN	3
ABSTRACT	4
I. INTRODUCCION	5
I.1. Desnutrición	5
I.2 Sistema serotoninérgico	14
I.3. Triptofano Hidroxilasa	18
I.4. Funciones de la serotonina	24
I.5. Receptores serotoninérgicos	26
I.6. Sistema serotoninérgico y desnutrición	27
II. HIPÓTESIS	31
III. OBJETIVO GENERAL	32
IV. OBJETIVOS PARTICULARES	32
V. MATERIAL Y METODOS	33
V.1. Material Biológico	33
V.2. Desnutrición proteico-calórica pre y perinatal	33
V.3. Desnutrición proteica perinatal	34
V.4. Obtención de tejidos	35
V.5. Extracción de RNA	35
V.6. Purificación del RNA	36
V.7. Transcripción reversa	36
V.8. Selección y Validación de los primers	37
V.9. Validación de los controles endógenos	39
V.10 PCR cuantitativa en tiempo real.	39
V.11 Análisis de Datos	39
VI. RESULTADOS	41
VII. DISCUSION	47
VIII. CONCLUSIONES	50
IX. BIBLIOGRAFIA	



LISTA DE ABREVIATURAS:

• μ l	Microlitros
• μ M	Micromolar
• 5-HIAA	Ácido 5-hidroxi-indolacético
• 5-HT	5-hidroxitriptamina
• 5-OHTrp	5-hidroxitriptófano
• AADC	Descarboxilasa de los aminoácidos romáticos
• ADN	Acido Desoxirribonucleico
• ARN	Acido Ribonucleico
• ARNm	Acido ribonucleico mensajero
• AMPc	3', 5' -adenosina monofosfato cíclico
• ATP	Adenosin trifosfato
• BH ₂	Dihidrobiopterina
• BH ₄	Tetrahidrobiopterina
• BHE	Barrera hematoencefálica
• DNAc	Acido desoxirribonucleico complementario
• FL	Fracción libre
• g	Gramos
• K _M	Constante de Michaelis
• L-Trp	L-Triptófano
• M	Molar
• MAO	Monoaminoxidasa
• mg	Miligramos
• Mg ⁺⁺	Magnesio
• ml	Mililitro
• mM	Milimolar
• °C	Grados centígrados
• pH	Potencial hidrógeno
• Pi	Fosfato inorgánico
• PIP ₂	Fosfatidil inositol-4,5-difosfato
• rpm	Revoluciones por minuto
• SNC	Sistema Nervioso Central
• TPH	Triptofano Hidroxilasa
• DPC	Desnutrición proteínico calórica



RESUMEN

Está bien establecido en una variedad de especies que las alteraciones producidas por la desnutrición pueden tener efectos permanentes si ésta ocurre en un periodo crítico durante la etapa del desarrollo. Evidencias tanto epidemiológicas como clínicas sugieren que la desnutrición tiene un papel en el origen del síndrome metabólico y sus componentes: hipertensión, insulino-resistencia, obesidad central y dislipidemia, así como también en el desarrollo cardiovascular, limita el crecimiento fetal y además, la desnutrición es uno de los principales factores no genéticos que afectan el desarrollo del cerebro. Existen evidencias experimentales de la alteración de un sistema neuronal específico en el cerebro de ratas desnutridas durante el desarrollo prenatal y postnatal, este sistema es el serotoninérgico que sintetiza al neurotransmisor serotonina (5-HT). Se ha reportado que en ratas con desnutrición proteínico-calórica aumenta la síntesis de serotonina cerebral, así como también aumenta la actividad de la Triptofano-5-hidroxilasa (TPH), enzima limitante de la síntesis de 5-HT. No se conoce si el aumento en la síntesis de 5-HT se debe a un incremento en la expresión de la TPH, por lo cual en el presente trabajo establecimos dos modelos experimentales de desnutrición en ratas uno con desnutrición proteico-calórica pre y perinatal y otro con desnutrición proteica perinatal y mediante la técnica de PCR cuantitativa en tiempo real determinar la expresión de la TPH. Con respecto a los esquemas de desnutrición empleados en el presente trabajo, éstos correlacionaron con resultados previos en los cuales se observó disminución en la talla y peso de los animales desnutridos comparados con el grupo control. En cuanto a la expresión de la TPH en los animales desnutridos esta fue similar a la de los animales controles lo que sugiere que los mecanismos moleculares mediante los cuáles se incrementan los niveles de 5-HT y la actividad de la TPH pueden estar relacionados con cambios conformacionales del complejo enzimático o con el fenómeno de fosforilación de la enzima. Es importante realizar estudios para determinar los mecanismos moleculares mediante los cuales existen cambios derivados de la desnutrición.



I. INTRODUCCION

I.1. DESNUTRICIÓN

Como un fenómeno invisible, la desnutrición abarca grandes poblaciones a nivel mundial, los últimos datos de la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación ⁽¹⁾ muestran que a nivel mundial hay 842 millones de seres humanos desnutridos, la República del Congo (75% de la población desnutrida) seguida de Somalia (71%), Burundi (70%) y Afganistán (70%) son los que tienen mayor población de desnutridos y las perspectivas de reducir de manera relevante esta cifra en el futuro continúan siendo sombrías. ⁽²⁾

La desnutrición por lo general se presenta también como un problema persistente en los países en desarrollo. Si nos enfocamos al territorio mexicano, los estados en donde se presenta con mayor frecuencia son: Chiapas, Oaxaca, Yucatán, Veracruz y el Estado de México. ⁽²⁾ La Organización Mundial de la Salud, ha definido a la desnutrición como un desbalance celular entre la administración de nutrientes y energía y la demanda del cuerpo para su seguro crecimiento y mantenimiento de funciones específicas. Esta condición puede resultar del consumo de una dieta inadecuada o mal balanceada, por trastornos digestivos, problemas de absorción u otras condiciones médicas. ⁽²⁾ Dependiendo del tipo de nutriente faltante la desnutrición puede ser calórica, proteica o mixta. ⁽³⁾ La desnutrición calórica, se caracteriza por un balance calórico negativo de evolución prolongada (semanas a meses), la desnutrición proteica se desarrolla por un balance negativo nitrogenado, también se denomina Kwashiorkor del adulto y la desnutrición mixta se caracteriza por la presencia de



balances negativos tanto calóricos como proteicos en grados variables de intensidad.

La desnutrición en general se presenta y manifiesta en cuatro formas diferentes denominadas *kwashiorkor*, *marasmática*, *Kwasiorkor marasmática mixta* y *sugar baby*. En el primer caso, los niños presentan inflamación; en el segundo, delgadez extrema (piel pegada al hueso); en el tercero, una combinación de las dos anteriores y en el cuarto lucen sanos y "gorditos", pero cuando son sometidos a análisis se revela la insuficiencia de nutrientes, esto se debe a que perdieron grasa y nutrientes, pero acumularon agua y su peso aparentemente está dentro de los parámetros normales. En los cuatro tipos de desnutrición, los niños presentan palidez, caída de cabello y detención del crecimiento.⁽³⁾

Para diagnosticar desnutrición y su grado de avance se realizan exámenes de sangre y orina con los cuales se determina si existe deficiencia de vitaminas, proteínas y minerales. El dato de laboratorio que sirve de apoyo para determinar si un paciente tiene desnutrición o no, es la cuantificación de proteínas en sangre por ejemplo la albúmina, un niño sano debe tener cuatro gramos por cada 100 mililitros del fluido, y un niño con desnutrición tiene hasta 2.5 gramos.⁽³⁾

Como ya se mencionó, la desnutrición se induce por diferentes déficits de nutrientes, sus síntomas no son los mismos en todos los casos y no se presenta en la misma etapa, esto indica que cada ser humano la puede presentar en cualquier etapa de su vida, ya sea en época temprana y/o en época tardía, es decir, la desnutrición se puede presentar durante la etapa prenatal, perinatal y/o



postnatal. Dependiendo de la etapa en que se presente, tendremos la severidad de sus consecuencias, pudiendo ser éstas de naturaleza reversible o irreversible.⁽³⁾

Evidencias tanto epidemiológicas como clínica sugieren que existen factores prenatales que participan en el origen del síndrome metabólico y sus componentes: hipertensión, diabetes, obesidad central y dislipidemia. Barker ⁽⁴⁾ propone la hipótesis del origen fetal en la cual sugiere que la talla desproporcionada en el nacimiento de un individuo debido a un ambiente intrauterino adverso se correlaciona con un incremento en el riesgo de adquirir diabetes del tipo 2, hipertensión y enfermedades cardiovasculares en la etapa adulta. Un ambiente intrauterino pobre a nivel nutricional limita el crecimiento fetal e induce cambios en el desarrollo metabólico y cardiovascular.⁽⁵⁾ En estudios con animales se observó en ratas madre sometidas a una baja nutrición que sus crías desarrollaron hiperinsulinemia, hiperleptinemia, hiperfagia, incremento en la letargia, obesidad central y una masa muscular reducida.⁽⁵⁻⁸⁾ Se han reportado también cambios en los péptidos hipotalámicos reguladores del apetito y una preferencia por el consumo de comida grasosa.⁽⁹⁾ McCance,⁽¹⁰⁾ en estudios en animales, observó que la programación metabólica podría ser inducida por la nutrición temprana. La desnutrición inducida por restricción proteica o por restricción calórica durante la gestación y lactación en ratas hembra, originó crías con modificaciones en la programación metabólica de varios órganos blanco incluyendo los islotes del páncreas, hipotálamo, hígado y músculo, además, presentaron enfermedades en el comienzo de su etapa adulta,^(5, 11-13) el peso corporal, la longitud y la circunferencia craneana fueron significativamente disminuidos en el grupo desnutrido.⁽¹⁴⁾ Estos estudios demuestran que si



aplicamos un estrés nutricional durante periodos críticos del desarrollo se altera la fisiología y el metabolismo del organismo y las consecuencias serán observadas en etapas posteriores aún en ausencia del estrés nutricional que las inició, siendo este fenómeno la programación metabólica.⁽¹⁵⁾

Entre los trastornos nutricionales, los del Sistema Nervioso (SN) ocupan una posición especial por su interés e importancia. Ellos representan un problema de salud de proporciones mundiales serias debido a la alta prevalencia de privación dietética crónica endémica, especialmente en países tropicales subdesarrollados. En países industrializados, la incidencia de estos trastornos se asocia con la alta tasa de alcoholismo, trastornos de mala absorción, trastornos psiquiátricos alimentarios (por ejemplo la anorexia nerviosa) y el uso de drogas que tienen un efecto antagónico a ciertas vitaminas. El inicio de formación del sistema nervioso central (SNC) es en la tercera semana de la gestación en el humano y tanto directivas genéticas como estimulación y enriquecimiento ambiental y la propia nutrición determinan el nivel de maduración del SNC y el desarrollo de la inteligencia. Las enfermedades nutricionales del SN pueden ocurrir en forma pura y, mas frecuentemente, en varias combinaciones que involucran tanto al Sistema Nervioso Central como al Periférico.⁽¹⁶⁾ Es difícil valorar el efecto de la desnutrición en las funciones del SNC por la dificultad de separar las variables nutricionales de los efectos de las infecciones frecuentes, de privación psicosocial, factores genéticos y contaminantes ambientales. Cualquier forma de desnutrición, ya sea por una deficiencia global de nutrientes o por una deficiencia de nutrientes específicos, alterará la formación del SNC. Los daños al sistema nervioso central causados por las formas severas de desnutrición (marasmo y kwashiorkor) se pueden demostrar clínicamente por signos y



síntomas neurológicos como apatía, irritabilidad, debilidad muscular, hipotrofia, ansiedad, fatiga crónica, hipotonía, hipo- e hiperactividad, déficit de atención y bajo rendimiento escolar.⁽¹⁷⁾ La biopsia de nervio sural en niños con desnutrición proteínico-calórica (DPC) severa muestra la persistencia de fibras mielinizadas de bajo calibre, falla en la elongación internodal y desmielinización segmentaria significativa.⁽¹⁷⁾

Asimismo, se han observado múltiples alteraciones neurales a nivel histológico, electrofisiológico, bioquímico y conductual en animales y humanos con deficiencia global de nutrientes en etapas prenatal y perinatal pero que no presentan las formas severas de desnutrición.

Los daños nutricionales durante las etapas críticas prenatales o postnatales resultan en alteraciones en la histogénesis del tejido nervioso.⁽¹⁸⁾ Se han reportado anomalías en la neurogénesis, siendo especialmente vulnerables las células madre, estas anomalías causadas por la DPC en la gliogénesis, migración celular, diferenciación celular y formación de circuitos neuronales en los períodos críticos de desarrollo podrían tener un gran impacto en la plasticidad cerebral de los sujetos desnutridos.⁽¹⁹⁻²⁰⁾ Se han descrito desórdenes en la sinaptogénesis,⁽²¹⁾ lo que aunado a los otros daños podrían resultar en la alteración de la organización de vías y circuitos, lo cual podría tener como consecuencia deficiencias conductuales y del aprendizaje.⁽²²⁻²³⁾ Desde el punto de vista histológico, se ha observado una reducción en el número de neuronas,^(14, 24-26) se han descrito alteraciones en la proporción de neuronas que interactúan y en la proporción de neuronas y sinapsis en el giro dentado.⁽²⁷⁾ El número de sinapsis está disminuido y existen alteraciones en las espinas dendríticas, en la



arborización dendrítica y en el proceso de eliminación de las sinapsis redundantes en diferentes sitios de la corteza y del hipocampo, así como en las propiedades dinámicas de la transmisión sináptica.^(9, 28-34) También se ha reportado disminución en el diámetro del axón de las fibras en ratas desnutridas, especialmente en el tracto corticoespinal,^(13, 35-36) esta reducción podría ser el resultado de una pérdida selectiva de las fibras mas anchas o una disminución en sus diámetros. Estudios de neurofisiología en ratas sugieren que hay mayor pérdida de las fibras con umbrales de disparo menores, es decir, de las fibras mas gruesas.⁽³⁷⁾

Hay regiones del SNC que presentan alteraciones por desnutrición, por ejemplo, se ha observado reducción en la eliminación de sinapsis redundantes en el núcleo rafe dorsal, *locus coeruleus* y corteza visual así como alteraciones en el hipocampo (especialmente en giro dentado) y en los tractos motores y sensitivos,^(10-11, 18, 30-40) estas alteraciones del crecimiento pueden ser mediados en parte por cambios en los factores de crecimiento.

El desarrollo de varias funciones neurológicas sufre retraso y alteraciones cualitativas en ratas y humanos desnutridos. El desarrollo locomotor por ejemplo, en ratas desnutridas en las etapas pre- y postnatales adquieren una marcha adulta después de los 15 días de vida postnatal, a diferencia de los controles que la tienen a los 13 días, además, la marcha se mantiene torpe y ligeramente anormal hasta el día 30.⁽⁴¹⁾ Otros estudios con ratas desnutridas revelaron retraso en el desarrollo de reflejos motores.⁽⁴¹⁻⁴³⁾ Es interesante correlacionar estas observaciones con las realizadas en niños pequeños para su edad gestacional, los cuales han cursado con desnutrición prenatal, estos niños presentan una



postura en miembros superiores de flexión más acentuada que los niños con pesos adecuados para su edad.⁽⁴⁴⁾ Además, la desnutrición postnatal resulta en retrasos significativos en el condicionamiento Pavloviano a estímulos visuales en ratas.⁽⁴⁵⁾

Bioquímicamente, la desnutrición puede causar déficit en la cantidad de ADN, fosfolípidos, esfingomielina, proteínas nucleares y otros componentes del sistema nervioso de ratas en los cuales existe evidencia de alteraciones en su síntesis,^(1, 10, 46-50) además de las alteraciones ya mencionadas en la mielina y las células gliales.⁽⁵¹⁾ El colesterol, fosfolípidos, ARN y ADN están disminuidos en los cerebros de niños que murieron por marasmo.^(17, 52) Además, se han reportado alteraciones en los niveles de algunos neurotransmisores, como son glutamato, serotonina, acetilcolina, opiáceos, GABA y norepinefrina.^(12, 53-56) También se han observado reducciones en la formación de 5 alfa reductasa y dihidrotestosterona, sustancias que se encuentran en altas concentraciones en la mielina del cuerpo caloso y tracto piramidal.⁽⁴⁸⁾

Se observó que la desnutrición proteínico-calórica causa también depresión inmune con aumento en la frecuencia y severidad de las infecciones. Se ha reportado que la hipereactividad central noradrenérgica secundaria a desnutrición podría ser responsable de la depresión inmune, especialmente en la respuesta célula.⁽⁵⁷⁾

Electrofisiológicamente, se han detectado varias anormalidades en sujetos desnutridos, en ratas se han observado alteraciones en la velocidad de conducción motora y reducción en la excitabilidad de las fibras.⁽³⁷⁾ Otros estudios



demonstraron conducción disminuida en los sistemas somato-sensoriales, auditivos y visuales de ratas desnutridas por DPC o con deficiencias vitamínicas específicas.^(15, 58-59) Se ha reportado una disminución en los disparos espontáneos de las células de las capas III, IV y V de la corteza y menores valores de cronaxia en la corteza parietal y corteza frontal.^(16, 60-62) Además, se han descubierto alteraciones en la ontogenia de la potenciación a largo plazo (LTP).⁽⁶³⁾ También se han descrito desórdenes en la actividad eléctrica cortical y su ontogenia, especialmente en la actividad theta,⁽⁶⁴⁻⁶⁸⁾ lo cual se ha traducido en una mayor susceptibilidad a crisis convulsivas en animales.^(21, 68-70) El sueño MOR también podría ser alterado por la desnutrición.⁽⁶²⁾ Por otro lado, en niños desnutridos, se han reportado cambios en los electroencefalogramas,⁽⁷¹⁾ los electromiogramas y en la velocidad de conducción periférica,⁽⁷¹⁻⁷³⁾ en la conducción a través de la vía auditiva,⁽⁷⁴⁻⁷⁵⁾ y una conducción motora prolongada.⁽⁷⁶⁾ Otros estudios, han reportado una conducción somato-sensorial central normal en niños con desnutrición crónica,⁽⁷⁷⁾ y se ha propuesto que la diferencia en la afectación de los diferentes tractos nerviosos se debe principalmente a los períodos críticos de desarrollo para cada tracto. Yakovlev y Lecours,⁽⁷⁸⁾ describieron los ciclos mielo-genéticos relacionados con la velocidad de mielinización (algunos tractos tienen ciclos de mielinización rápida y temprana en el período prenatal y otros tractos tienen ciclos prolongados y lentos durante etapas pre- y postnatales), por lo tanto es posible considerar que los tractos corticoespinales, de ciclos mielo-genéticos prolongados, así como otros tractos de mielinización similar, tienen mayor riesgo de alteración por la desnutrición que los tractos sensitivos, de mielinización prenatal rápida.



Se han reportado alteraciones en la capacidad adaptativa y de respuesta en el tiempo de escape a agentes nocivos en animales desnutridos, así como en la prolongación en el tiempo de aprendizaje de conductas condicionadas aún después de la rehabilitación nutricional,⁽⁷⁹⁾ los cuales podrían conducir a conductas sociales y de socialización alteradas. Se ha reportado déficits del aprendizaje y memoria, los cuales se han correlacionado con cambios anatómicos en la formación hipocampal después de desnutrición pre- y postnatal en animales.⁽³⁹⁻⁴⁰⁾ Alteraciones conductuales en ratas relacionadas con la disminución de serotonina por desnutrición incluyen déficit en el aprendizaje espacial y en la capacidad de reaprender tareas.⁽⁸⁰⁾

Estudios realizados en América Latina, África y Estados Unidos han demostrado que niños desnutridos tienen un menor coeficiente intelectual (C.I.) que niños nutridos normalmente del mismo nivel socioeconómico.⁽⁸¹⁾ El tiempo de reacción visomotor en niños desnutridos se ha reportado aumentado en varios estudios.⁽⁸²⁾ Además, existe evidencia de déficit en la atención, trastornos del aprendizaje y de la memoria.^(39-40, 83-84) Los niños desnutridos no exploran adecuadamente su ambiente en situaciones novedosas, demostrando inhibición o actividades sin objetivos.⁽⁸⁵⁾ Un estudio con niños desnutridos en Filipinas mostró puntajes inferiores a niños controles en tareas motoras y preceptuales.⁽⁸⁶⁾ En la India, un estudio utilizando tareas de desarrollo cognitivo controlando variables socioeconómicas mostró un rendimiento mas bajo en niños desnutridos que controles.⁽⁸⁷⁾ Esto sugirió que la desnutrición podría resultar en alteraciones visuales, las cuales podrían ser las responsables de las alteraciones neurointegrativas y de percepción observadas.⁽⁸⁸⁾ La desnutrición global no es la única que afecta las funciones cognoscitivas, por ejemplo los déficit aislados de



yodo, hierro y ácidos grasos también pueden afectar las funciones cerebrales superiores.⁽⁸⁹⁾

I.2. SISTEMA SEROTONINÉRGICO

El sistema serotoninérgico se localiza en la parte media del tallo cerebral, agrupándose en nueve núcleos que han sido clasificados de acuerdo a su origen embrionario, conocidos como complejo nuclear del Rafé. (Fig. 1).⁽⁴⁰⁾

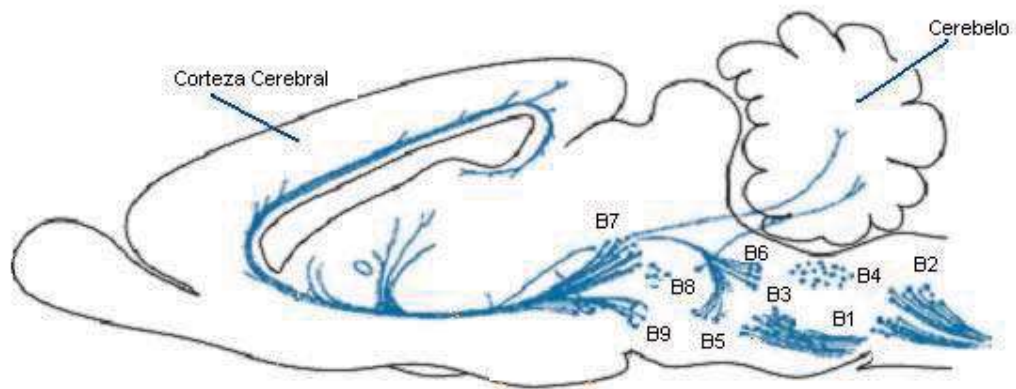


Fig. 1. Esquema de un corte sagital del cerebro de rata que muestra la distribución del sistema serotoninérgico y su innervación.

Los 9 núcleos serotoninérgicos presentes en el rafé son el palidus (B₁), obscuro (B₂), paragigantus celularis (B₃), magnus (B₄), pontis (B₅), dorsalis (B₆, B₇), centralis superior (B₈), tegmental reticular del puente (B₉). Algunos de ellos (magnus, palidus y obscurus) proyectan sus axones hacia la médula espinal en donde inervan neuronas motoras y sensoriales.



Las neuronas de núcleos del cerebro medio y de la parte alta del puente, inervan a la corteza cerebral, al cuerpo estriado, a estructuras del sistema límbico, al tubérculo olfatorio, al hipocampo y al diencéfalo. Los efectos de los terminales serotoninérgicos pueden ser excitadores (sobre neuronas motoras de la médula) o inhibidores (de las fibras nociceptivas que entran a la médula).⁽⁸⁵⁾ El neurotransmisor del sistema serotoninérgico es la serotonina (5-HT, 5-OH-Triptamina). El triptofano (L-Trp) es el aminoácido esencial precursor de la síntesis de 5-HT. El L-Trp una vez absorbido del tracto gastrointestinal se distribuye a los tejidos de todo el organismo. El L-triptofano proveniente de la dieta,^(26, 89-92) al entrar al torrente sanguíneo se encuentra en dos formas, una fracción en la que se encuentra unida a la albúmina en un 80-90% y otra fracción que circula en forma libre (FL),⁽⁹³⁾ que es la que compite con otros aminoácidos neutros: (tirosina, fenilalanina, leucina, isoleucina y valina) para poder atravesar la barrera hematoencefálica (BHE) la cual es una monocapa de células epiteliales que desempeña una función esencial en el mantenimiento de la homeostasis cerebral. La BHE tiene permeabilidad selectiva a los medicamentos y otras sustancias extrañas al organismo, se comporta como barrera de naturaleza lipóide y tiene un mecanismo de transporte específico.⁽⁹⁴⁾ El ingreso del L-Trp al SNC depende de un mecanismo de transporte saturable localizado en la BHE,^(93, 95) como se muestra en la fig. 2.

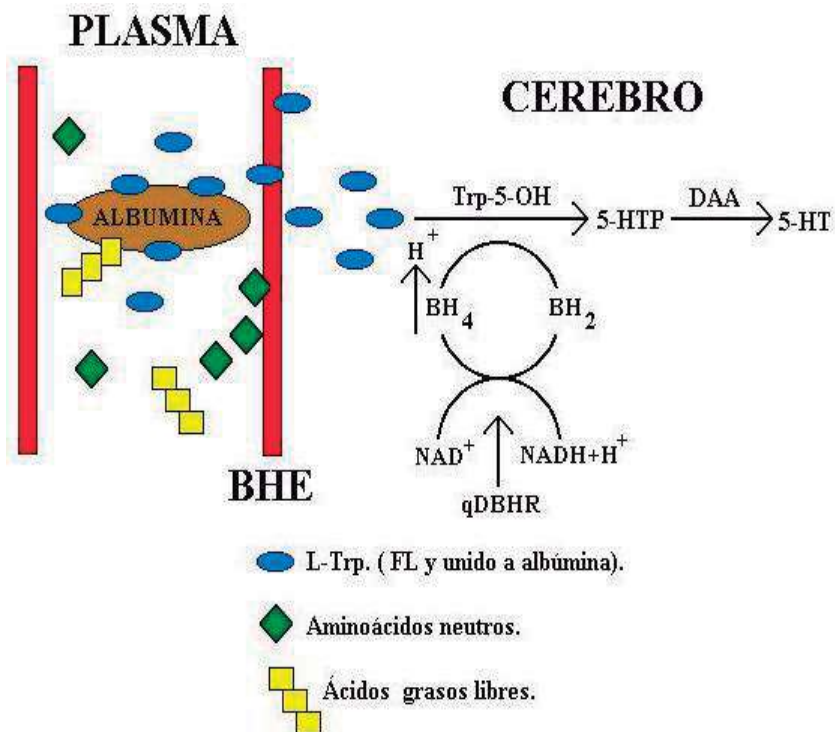


Fig. 2 . Transporte de L-Trp a través de la barrera hematoencefálica

Existen varios factores en el organismo que participan en la regulación de la concentración de la FL del L-Trp en el plasma, entre ellos se encuentran la constante de afinidad que tiene el aminoácido para unirse a la albúmina; la concentración de albúmina y de ácidos grasos libres, estos últimos desplazan al L-Trp de su unión con la albúmina, de esta forma aumenta la disponibilidad del aminoácido para su transporte al cerebro y con ello se aumenta la síntesis de 5-HT. La concentración de la FL del L-Trp depende también de la concentración de los aminoácidos ya que compiten por su transportador en la BHE, de tal forma que una disminución en la concentración de estos aminoácidos neutros en el plasma permitirán un mayor paso del L-Trp al cerebro y un aumento en la síntesis de 5-HT. ^(26,96)



El L-Trp una vez que entra en las terminales serotoninérgicas es hidroxilado por la triptofano 5- hidroxilasa (TPH, EC.1.14.16.4) la cual es la enzima limitante de la síntesis de 5-HT. Esta enzima utiliza Fe^{2+} como cofactor, oxígeno molecular y el complejo tetrahydropteridina (BH4) un co-substrato para hidroxilar al triptofano y generar 5-hidroxitriptofano. Este metabolito es descarboxilado por la DAC (descarboxilasa de a.a. aromáticos para formar la 5-HT^(34, 97) (Fig. 3).

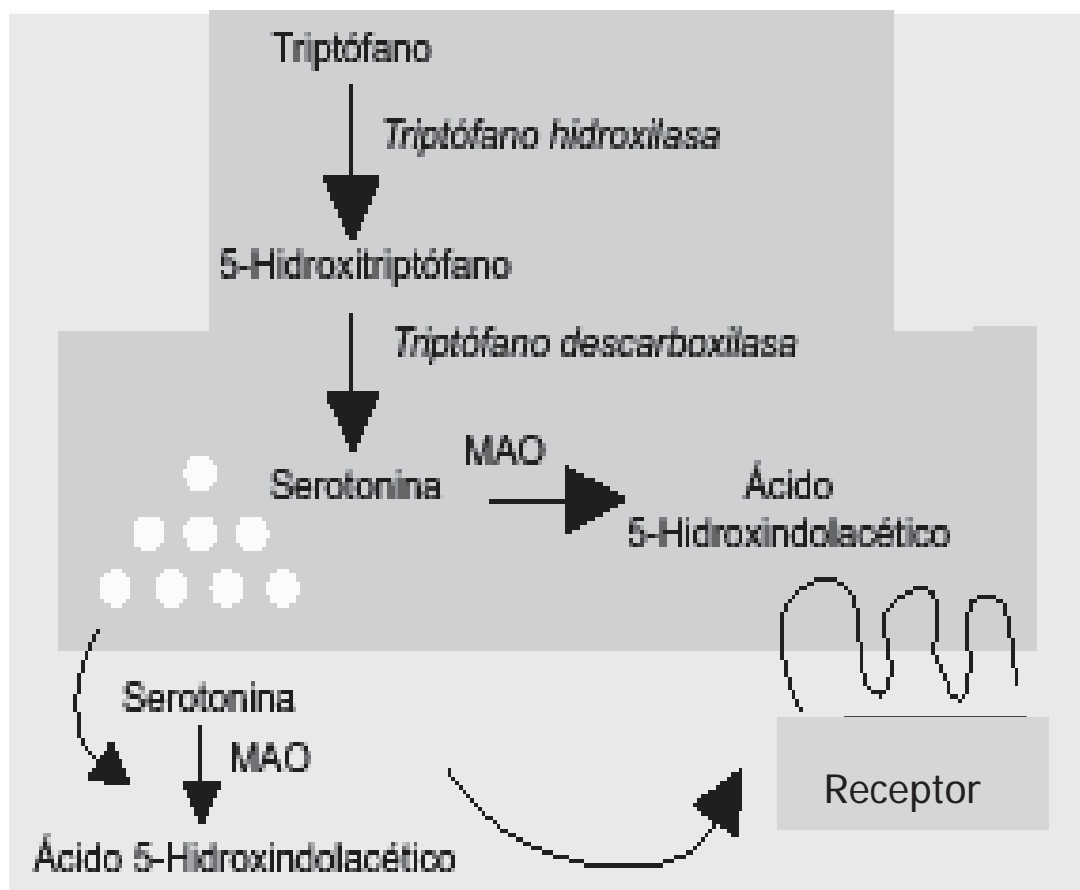


Fig. 3. Mecanismo catalítico en la síntesis y catabolismo de la serotonina. La TPH es la enzima limitante en la síntesis serotoninérgica y cataliza la hidroxilación del L-Trp usando como cofactor al Fe^{2+} y como co- substrato la BH4.



El catabolismo de la serotonina se inicia con la desaminación oxidativa a 5-hidroxiindolacetato catalizada por la monoaminoxidasa (MAO). La N - metilación de la serotonina, seguida de la O-metilación en la glándula pineal, forma melatonina. También se presenta la metilación directa de la serotonina y del 5-metoxiindolacetato.

Todos los tejidos, incluso el encéfalo, capturan la melatonina circulante, pero ésta es metabolizada con rapidez. Los principales catabólicos urinarios normales del triptofano son 5 – hidroxindolacetato e indol – 3 – acetato. ⁽⁹⁸⁾

I.3. TRIPTOFANO HIDROXILASA

La 5-triptofano hidroxilasa (TPH) es la enzima limitante en la síntesis de la serotonina. Puede ser fosforilada por una proteína cinasa dependiente de calcio y calmodulina.

En lo que respecta a la regulación de la expresión de los genes de la TPH, la mayoría de las regulaciones de este tipo son en la transcripción. Hay pocos casos en que la regulación actúa sobre la traducción.

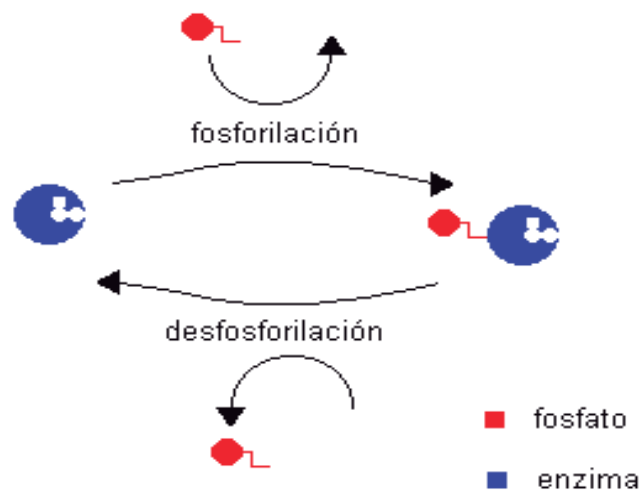


Fig. 5. Mecanismo de regulación por fosforilación de la TPH.



La TPH es sintetizada en los cuerpos celulares serotoninérgicos de los núcleos de rafé y se encuentra únicamente en las células que sintetizan serotonina, su distribución en el cerebro es similar a la de la serotonina.

La triptofano hidroxilasa contiene 444 aminoácidos, y tiene un peso molecular de 51 000.⁽⁷⁶⁾ Es parte de una familia de enzimas conocidas como aminoácido aromático hidroxilasas. Los otros miembros de la familia son la tirosina hidroxilasa (TH) y la fenilalanina hidroxilasa (PAH).⁽¹⁰²⁻¹⁰³⁾ La TrpOH es similar a la PAH en un 52% de aminoácidos y en un 70% de propiedades similares.⁽¹⁰⁴⁾ Su gran homología reside en las regiones de carbono central y terminal de estas enzimas, haciendo que estas áreas contengan el sitio catalítico; pero la especificidad por el sustrato se cree que podría residir en los aminoácidos cercanos al N-terminal.⁽⁷⁶⁾

Mientras que tirosina y fenilalanina hidroxilasa han sido estudiadas en gran medida en lo que respecta a su estructura, características y regulación,⁽¹⁰⁵⁾ la TPH ha sido poco estudiada debido a su extremadamente baja abundancia de mRNA para TPH en el SNC y las dificultades que presenta para la purificación de la proteína⁽¹⁰⁶⁾ así como la falta de líneas celulares neuronales productoras de serotonina adecuadas para sus estudios *in vitro*. Funcionalmente, estas enzimas dependientes de biopterina, exhiben rasgos catalíticos similares, convirtiendo su sustrato aminoacídico aromático a un producto hidroxilado en la presencia de oxígeno molecular y del ión ferroso.⁽¹⁰⁷⁾



Durante muchos años se creyó que solamente un gen era el responsable de la síntesis de serotonina en vertebrados. Walter reportó la existencia de dos genes TPH distintos en múltiples especies. En los seres humanos estos genes están localizados en los cromosomas 11 y 12 respectivamente, y codifican dos enzimas homólogas diferentes TPH1 y TPH2 con un porcentaje total de identidad del 71% ^(101, 106) comparada con un 52% de identidad en la secuencia de TPH1 humana y fenilalanina hidroxilasa ⁽¹⁰⁴⁾. Todos los residuos que han sido detectados como importantes para la estructura y funcionamiento de la TPH1 están conservadas en TPH2. Por lo tanto la mayoría de las características de la TPH1 deberían también estar presentes en TPH2. Se ha demostrado que la TPH2 puede ser fosforilada por una cinasa II dependiente de calmodulina/Ca²⁺ (CaMKII) y proteína cinasa A (PKA), ⁽¹⁰⁷⁾ los sitios de fosforilación para CaMKII han sido encontrados en serina 59 y 260 y para PKA en serina 58 en TPH1 recombinante, ⁽¹⁰⁹⁻¹¹²⁾ y ambos están conservados en TPH2. Después de la fosforilación, una proteína 14-3-3 se une probablemente al residuo 58 de fosfoserina en TPH1, incrementa la actividad de la enzima, e inhibe su defosforilación. ⁽¹⁰⁹⁻¹¹⁵⁾ Esto podría tener una importancia funcional desde la activación de ambas cinasas que han sido implicadas en la regulación de la síntesis de serotonina y la liberación de serotonina en el cerebro. Por otro lado, recientemente se ha demostrado que la fosforilación de TPH1 por CaMKII su degradación es por el proteosoma, ⁽¹¹⁶⁾ podría especularse que la unión de una proteína 14-3-3 a TPH compite con la degradación del proteosoma y ocurre solamente en algunos tejidos o solamente con una de las dos formas in vivo explicando que diferentes estabilidades describen para TPH de diferentes fuentes. ⁽¹¹⁶⁻¹¹⁸⁾



Tryptophan hydroxylase (TPH) is the rate-limiting enzyme in the synthesis of the neurotransmitter serotonin. Once thought to be a single-gene product, TPH is now known to exist in two isoforms- TPH1 is found in the pineal and gut, and TPH2 is selectively expressed in brain. Heretofore, probes used for localization of TPH protein or mRNA could not distinguish between the TPH isoforms because of extensive homology shared by them at the nucleotide and amino acid level. We have produced monospecific polyclonal antibodies against TPH1 and TPH2 using peptide antigens from nonoverlapping sequences in the respective proteins. These antibodies allow the differentiation of TPH1 and TPH2 upon immunoblotting, immunoprecipitation, and immunocytochemical staining of tissue sections from brain and gut. TPH1 and TPH2 antibodies do not cross-react with either tyrosine hydroxylase or phenylalanine hydroxylase. Analysis of mouse tissues confirms that TPH1 is the predominant form expressed in pineal gland and in P815 mastocytoma cells with a molecular weight of 51 kDa. TPH2 is the predominant enzyme form expressed in brain extracts from mesencephalic tegmentum, striatum, and hippocampus with a molecular weight of 56 kDa. Antibody specificity against TPH1 and TPH2 is retained across mouse, rat, rabbit, primate, and human tissues. Antibodies that distinguish between the isoforms of TPH will allow studies of the differential regulation of their expression in brain and periphery.

Recientemente, la comparación con rayos X de las estructuras de PAH y TH y el primer análisis estructural con rayos X de la TPH1 ha definido varios aminoácidos participantes en la unión de triptófano, hierro y el cofactor BH4. ⁽¹¹⁹⁻¹²²⁾ Todos estos residuos son idénticos en TPH2 y por lo tanto podría tener las mismas funciones que TPH1. Las secuencias responsables de la tetramerización de la proteína TPH1 ⁽¹²³⁻¹²⁶⁾ también están conservados en TPH2 indicando que también tiene un complejo multimérico.

Sin embargo, también existe diferencia a nivel molecular entre estas dos formas de la TPH las cuales podrían ser las responsables para describir las diferencias bioquímicas y funcionales entre las preparaciones de TPH purificada



de corteza cerebral y de la periferia. En particular, el N-terminal de la proteína, el cual contiene dominios reguladores que son bastante opuestos, probablemente como una consecuencia, los valores de Km. para triptófano de las enzimas purificadas y recombinantes son diferentes. ⁽¹²⁴⁾

La TPH1 está expresada en la periferia y en la glándula pineal, en tanto que la TPH2 está expresada en el tronco cerebral, sugiriendo que TPH2 es la responsable de la síntesis de serotonina en el cerebro. ⁽¹²⁷⁾ En estudios post-mortem, se demostró que la TPH2 también está expresada en el cerebro humano, pero no en los tejidos periféricos, ⁽¹²⁸⁾ mientras que los niveles de la TPH en la glándula pineal y el tronco cerebral son similares, ⁽¹²⁹⁾ el mRNA de la TPH1 es mucho más abundante en la glándula pineal que en el tronco cerebral, en tanto que se encontró, que el mRNA de la isoforma de la triptofano hidroxilasa (TPH2) se expresó 150 veces más en el cerebro que el mRNA de la TPH1, pero no fue detectada en tejidos periféricos (duodeno, pulmones). ⁽¹³⁰⁾ La concentración de serotonina en la glándula pineal es muy alta y muestra un modelo diurno dramático con niveles mucho más altos en la noche. ⁽¹³¹⁾

Los cDNA que codifican a la triptofano hidroxilasa tanto del cerebro como de la glándula pineal han sido clonados y secuenciados, se encontraron algunas diferencias bioquímicas entre las enzimas obtenidas del cerebro y de la glándula pineal, tales como el peso molecular, la especificidad por el sustrato y el punto isoeléctrico. Sin embargo los cDNA aislados de ambos tejidos parecen tener idénticas las secuencias de nucleótidos, dando a entender que las diferencias específicas en las propiedades de esta enzima en tejidos diferentes resulta del procedimiento de diferenciación post-transduccional. ⁽²⁸⁾



Varios laboratorios han reportado diferencias cinéticas entre las formas periféricas y del cerebro de la PTH, pero los datos aun son inconsistentes e inconclusos. Debiéndose esto probablemente al uso de diferentes especies, tejidos, procesos de purificación, y diferentes condiciones para llevar a cabo estos estudios. ⁽¹³²⁾ La TPH2 sometida a transcripción in Vitro y al sistema de traducción presentó inhibición por sustrato por exceso de Trp y BH4. ⁽¹³²⁾

El valor de Vmax de TPH1 fue más alto que para TPH2, ambas en presencia o en ausencia de parejas de fusión. Las diferencias en los valores de Vmax podrían ser el resultado de diferencias inherentes en la eficiencia catalítica o en la estabilidad enzimática. Respecto a los valores de Km para el cofactor tetrahydroxibiopteridina parecieron ser más bajos para TPH2 que para TPH1, mientras que los valores de Km para Trp fueron consistentemente más altos para TPH2 que para TPH1, si la enzima fue estudiada antes y después de remover la pareja de fusión. En promedio, el Km para Trp fue cerca de cuatro veces más para TPH2 que para TPH1 debido esto a la fusión de proteínas; pero solamente dos veces más en el caso de las proteínas purificadas. ⁽¹³²⁻¹³⁴⁾

I.4. FUNCIONES DE LA SEROTONINA

La 5-HT fue inicialmente identificada por el interés de sus efectos cardiovasculares. Existen estudios en los que se atribuye al sistema serotoninérgico cerebral una participación en la regulación de diversas funciones orgánicas, a continuación se describen algunas de las funciones de la 5-HT.

- Timia:



El papel de la 5-HT en la regulación de la timia ha sido desarrollado a partir de las hipótesis de Van Praag.⁽¹³⁵⁻¹³⁷⁾ que avala esta teoría el hecho de que una dieta libre de triptofano a las cinco horas de la ingesta y coincidiendo con el pico plasmático mas bajo de este aminoácido, produce un estado depresivo moderado en voluntarios sanos.⁽¹³⁸⁾

- Sueño:

La 5-HT es el mediador responsable de las fases III y IV del sueño lento. El ritmo sueño-vigilia está regulado por el balance adrenérgico-serotoninérgico, siendo la noradrenalina la responsable del despertar y mantener la vigilia.⁽¹³⁸⁻¹³⁹⁾

- Factor Trófico:

Se ha propuesto que la serotonina tiene un mecanismo de acción metabotrópico induciendo cambios tróficos, lo que implica una serie de procesos químicos en las células blanco,⁽¹⁴⁰⁾ Mercado ⁽¹⁴¹⁾ y Manjarréz y col., ⁽¹⁴²⁾ han demostrado que la serotonina tiene una función como factor promotor en la diferenciación neuronal en el cerebro fetal teniendo una influencia trófica durante el desarrollo cerebral.

- Conducta Sexual.

La 5-HT presenta un efecto inhibitorio sobre la liberación hipotalámica de gonadotropinas con la consecuente disminución de la respuesta sexual normal. La disminución farmacológica de la 5-HT facilita la conducta sexual.⁽¹⁴³⁾

- Regulación termnociceptiva

La 5-HT produce un efecto dual sobre la termia según el receptor estimulado por ejemplo si se estimula el 5-HT₁ se produce hipotermia y si es el 5-HT₂ hipertermia. El sueño de ondas lentas produce el pico mínimo de temperatura



coincidente con la aparición del pico máximo de secreción de la hormona de crecimiento.⁽¹⁴⁴⁾

- Conducta alimentaria

La 5-HT es el principal mediador inhibitor del núcleo hipotalámico ventromedial que regula la ingesta y saciedad. Este efecto es altamente específico para los hidratos de carbono, necesitando de cofactores centrales y periféricos para actuar sobre los otros nutrientes (proteínas y lípidos). La hiperserotoninergia produce anorexia⁽¹⁴⁵⁾ y la hiposerotoninergia produce ganancia de peso,⁽⁹⁵⁾ esto puede ser causa de la anorexia en la depresión.^(33, 57, 68)

Otra función descrita para la 5-HT es su papel regulador de la actividad de la bomba de sodio y potasio.⁽¹⁴⁶⁾

I.5. RECEPTORES SEROTONINÉRGICOS

Hasta la década pasada, la caracterización de diferentes receptores serotoninérgicos se ha realizado de manera sistemática,⁽¹⁴⁷⁾ han identificado quince diferentes receptores, los cuales se dividieron en siete familias: (5-HT₁, 5-HT₂, 5-HT₃, 5-HT₄, 5-HT₅, 5-HT₆ and 5-HT₇); con sus diferentes subtipos. Los receptores de la serotonina median acciones de un gran número de compuestos psicoterapéuticos y psicoactivos incluyendo drogas antipsicóticas, algunos antidepresivos y fármacos antimigrañosos, entre otros.⁽¹⁴⁸⁻¹⁴⁹⁾ Algunos compuestos son agonistas, esto es, imitan la actividad en este caso del neurotransmisor con una cinética muy parecida y otros, son antagonistas lo que significa que su afinidad es alta pero bloquean la actividad del receptor y la



cascada de señalización intracelular. Los receptores 5-HT₁ están involucrados en la dilatación arterial, en la inhibición de la transmisión de señales en el sistema nervioso simpático y la autoinhibición en el cerebro, los receptores 5-HT₂ participan en la agregación de plaquetas, los receptores 5-HT₃ median en el reflejo Bezold-Jarisch que consiste en una respuesta a la serotonina de hipotensión como consecuencia de una bradicardia súbita y transitoria y también participa en la liberación de catecolaminas en el músculo cardíaco. Se comienzan a caracterizar los receptores 5-HT₄, se tiene evidencia de su presencia en cerdos, y participan en la taquicardia inducida por 5-HT y que no es bloqueada por drogas que se unen a los receptores 5-HT₁, 5-HT₂ o 5-HT₃.⁽¹⁵⁰⁾

En cuanto a los receptores 5-HT₅, tienen una gran homología con los receptores de la familia 5-HT₁ y se sabe que se expresan en la corteza cerebral, en el hipocampo, en el bulbo olfatorio y en la capa granular del cerebelo pero aun no se conocen todas las funciones en las que participan⁽¹⁴⁹⁾. Se clonó el gen que codifica para un receptor 5-HT no descrito, que difiere en cuanto a las características fisiológicas y en cuanto a la distribución en el SNC con respecto a otros y se designó 5-HT₇.⁽¹⁵¹⁾

1.6. SISTEMA SEROTONINÉRGICO Y DESNUTRICIÓN

Cuando la desnutrición se origina por la deficiencia de un solo nutriente, tal como un aminoácido esencial, que debe ser obtenido a través de la dieta, se induce un daño serio en el sistema nervioso central porque algunos de los aminoácidos son precursores de neurotransmisores, y sus niveles dependen directamente de su disponibilidad. Uno de los sistemas mayormente afectados



por esta deficiencia de aminoácido es el sistema serotoninérgico, ya que la síntesis de la serotonina está directamente relacionada a la toma del aminoácido esencial: L-triptofano. ⁽⁶⁰⁾

Una vez captado el L-Trp, es hidroxilado por la enzima triptofano-5-hidroxilasa, ⁽⁵¹⁾ la cual es la enzima limitante en la biosíntesis de la serotonina. La TPH está por lo general en forma insaturada con respecto a su sustrato, su actividad pudiera incrementarse por el aumento de la concentración de L-Trp en cerebro hasta que los niveles de saturación son alcanzados. El efecto opuesto se observa cuando la disponibilidad de L-Trp en el cerebro disminuye. ^(17,61,41, 65-66) Debido a que la concentración de L-trp siempre es menor al valor de la constante de Michaelis o Km que es el parámetro cinético que se refiere a la afinidad de una enzima por su sustrato, al administrar este sustrato se produce un aumento en los niveles de triptofano en el cerebro, en la actividad de la triptofano-5-hidroxilasa y en la síntesis de la serotonina. ⁽¹⁷⁾

Existen reportes de que la dieta restringida en triptofano ⁽¹⁵²⁻¹⁵⁴⁾ así como también la alimentación a base de maíz ⁽¹⁵⁵⁾ inducen una disminución en la síntesis de 5-HT del cerebro, además de modificación de la ramificación dendrítica de las neuronas de la corteza cerebral, del hipocampo y alteraciones en la organización psiconeural de facultades tales como el aprendizaje espacial y la memoria. Así como también, se tiene evidencia de que disminuye la densidad del sitio del transportador de la serotonina en ciertas regiones del cerebro de ratas con restricción crónica de alimento. ⁽¹⁵⁶⁾

Manjarréz, et al. ⁽⁷⁷⁾ reportaron que en ratas desnutridas durante la gestación o lactación hay una aceleración en la síntesis de 5-HT cerebral. Así también, observaron que la desnutrición prenatal induce una aceleración de la vía



biosintética de la serotonina durante el desarrollo del cerebro con un incremento de L-triptofano en cerebro, en la actividad de la TPH y en el contenido de serotonina. ⁽²⁴⁾ En sus experimentos de cinética resultó una disminución de los valores de K_m y no se mostraron cambios significativos en la V_{max} de la TPH en los grupos desnutridos comparados con los controles. El valor de la K_m del L-triptofano, la cuál representa la concentración de sustrato que permite que la enzima funcione a la mitad de su máxima capacidad, es para la TPH aproximadamente de 50 μM .⁽⁷⁵⁾ La TPH mostró un incremento en su actividad bajo condiciones de fosforilación, lo que propone que la activación de la TPH en cerebro desnutrido no solamente se encuentra una elevación del L-Triptofano, sino que también hay un cambio en la enzima misma por una alta afinidad por el L-Trp y una mayor respuesta para la fosforilación, hablando de la posibilidad de que la desnutrición temprana crónica induce cambios estructurales en la molécula de dicha enzima. ⁽²⁴⁾

Las mismas condiciones parecen también ocurrir en humanos con desnutrición en etapas tempranas. Datos presentados en seres humanos con desnutrición en etapa temprana, Manjarréz, y et al., sugirieron que la elevación de L-triptofano en su fracción plasmática libre proporciona un aumento en la molécula precursora capaz de traspasar la barrera hematoencefálica y activar la síntesis de serotonina en el cerebro. Esto nos indica que el metabolismo de 5-HT está también alterado en el cerebro de humanos desnutridos.

También podría haber otros factores que pueden favorecer la elevación del L-triptofano plasmático libre en los recién nacidos desnutridos, tal como sería un incremento en la hidrólisis de lípidos con su liberación en el plasma y de esta manera mas ácidos grasos libres podrían competir con el L-triptofano para unirse



a la albúmina. ⁽¹⁵⁷⁻¹⁵⁸⁾ También en un estudio preliminar en humanos, observaron una menor capacidad de la albúmina plasmática a unirse al L-triptofano, comparándola con la albúmina de los grupos control, ⁽¹⁵⁹⁾ sugiriendo que ninguna concentración plasmática de albúmina por si misma determina el nivel de L-triptofano plasmático libre ni la concentración de ácidos grasos libres no unidos a la albúmina. Parece ser que las cinéticas de unión del L-triptofano a la albúmina también tiene un papel importante, que podría estar modificado en los grupos desnutridos.

El resultado final de estos cambios metabólicos es un incremento de la concentración de L-triptofano plasmático libre a pesar del contenido de L-triptofano unido a la albúmina, que podría ser más alto o igual en los grupos desnutridos a los grupos control. Este imbalance de L-trp en el plasma del grupo desnutrido a favor del L-trp plasmático libre también podría estar relacionado a una elevación del transporte de este aminoácido al cerebro con un posible aumento de la síntesis de 5-HT, siendo este el caso de las crías de ratas con desnutrición fetal. ⁽¹⁶⁰⁻¹⁶¹⁾

El aumento en la síntesis de serotonina en ratas desnutridas nos lleva a proponer la siguiente hipótesis.



II. HIPOTESIS

El incremento de la síntesis de serotonina cerebral inducido por la restricción alimenticia resulta de un aumento en los niveles de expresión de la TPH2.



III. OBJETIVO GENERAL

Determinar si hay aumento en la expresión de la TPH2 en ratas con desnutrición prenatal y perinatal.

IV. OBJETIVOS PARTICULARES

Implementar dos modelos de desnutrición perinatal en rata.

Implementar la técnica de PCR en tiempo real.

Determinar si hay un aumento en la expresión de la TPH2 en ratas con desnutrición.



V. MATERIAL Y METODOS

V.1. MATERIAL BIOLÓGICO

Se utilizaron ratas macho adultos de la cepa Sprague Dowley, de 200 g de peso; las cuales se mantuvieron bajo condiciones ambientales controladas de ciclos de luz-oscuridad 12h-12h, temperaturas de 20-24 °C, el grupo control tuvo acceso “*ad libitum*” al alimento.

V.2. DESNUTRICION PROTEICO-CALORICA PRE Y PERINATAL

Antes de someter a las ratas del grupo experimental a desnutrición al 50%, necesitamos conocer la cantidad de alimento que consume una rata control tomando en cuenta las diferentes etapas de su vida y sus diferentes necesidades alimenticias en cada una. Es por esto que se pesó en forma periódica la cantidad de alimento que consumieron las ratas antes, durante y después del embarazo, para poder hacer una reducción exacta del 50% del alimento consumido por las ratas en estas etapas.

A ratas hembra nulíparas de 45 días se les restringió el consumo de alimento al 50% durante 15 días, posteriormente se inicio el periodo de apareamiento que tuvo una duración aproximada de 5 días. Durante este periodo, las ratas no estuvieron sometidas a desnutrición, una vez que quedaron gestantes (aparición del tapón vaginal o frotis vaginal) se separaron del macho y se reinició su esquema de desnutrición al 50% durante todo el periodo de gestación y durante todo el periodo de lactación. Las crías se destetaron a los 21 días postnatales y se les alimentó “*ad libitum*” hasta los 60 días postnatales.

En la fig. 6 se representa el modelo que seguimos para desnutrir las ratas.

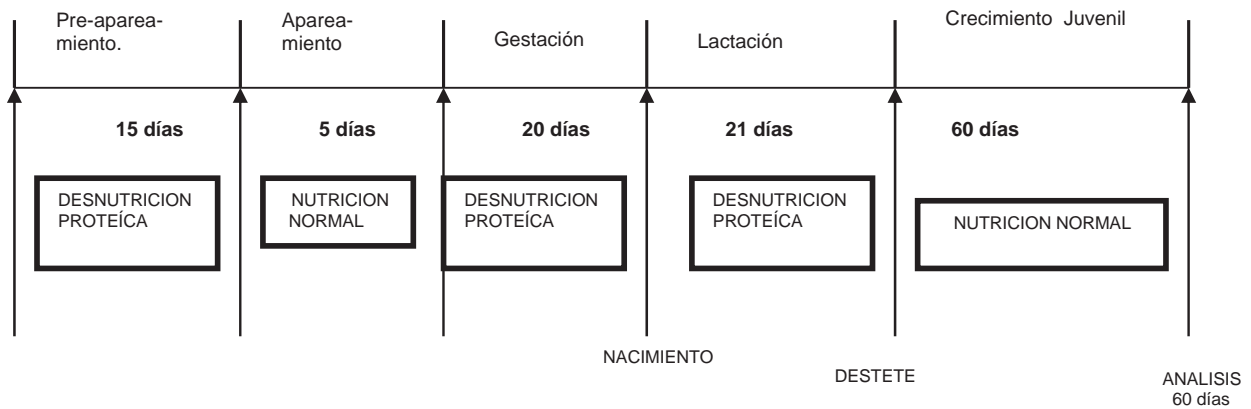


Fig. 6 Esquema del procedimiento para la desnutrición proteico-calórica en la etapa perinatal.

V.3. DESNUTRICION PROTEICO POSNATAL

A otro grupo de ratas se les sometió a desnutrición proteica al 8% únicamente en la etapa perinatal, es decir, durante todo su periodo de lactación, mientras que al grupo control se les alimentó siempre con el 20% de proteína. A ambos grupos al finalizar la lactancia se les alimentó con el 20% de proteína, es decir, se eliminó en ambos grupos el periodo de restricción alimenticia. Una vez terminado el periodo de lactancia (21 días), las crías se separaron de sus madres y se alimentaron sin restricción (proteína al 20%), esperando que cumplieran los machos 60 días para su sacrificio y análisis (fig. 7).

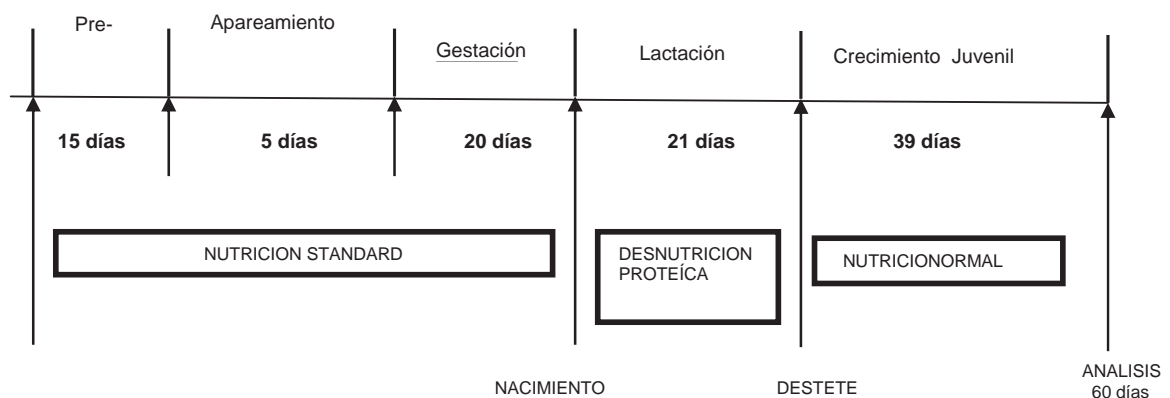




Fig. 7 Esquema del procedimiento para la desnutrición proteica perinatal.

V.4. OBTENCIÓN DE TEJIDOS

Se sacrificaron a los animales entre las 9:00 y las 10:00 AM, se extrajo el cerebro y sobre una superficie fría se disecó el tronco cerebral, el cual se homogeneizó en 500 ul de trizol, se almacenaron las muestras a -80 C hasta su uso.

V.5. EXTRACCIÓN DEL RNA

La extracción de RNA de los tallos cerebrales del cerebro de rata se realizó utilizando reactivo Trizol (Acido Guanidinico Tiocianato-fenol-cloroformo de Gibco-BRL) de INVITROGEN siguiendo el método desarrollado por Chomczynski and Sacchi, N. ⁽⁶⁶⁾ Las muestras se descongelaron a temperatura ambiente y se añadió el Reagente trizol necesario para homogenizar los volúmenes de las muestras. Se agitaron y se dejaron reposar durante 5 minutos a temperatura ambiente. Para disolver los lípidos de membrana, se agregaron 200 microlitros de cloroformo ultrapuro (200 ul/1ml) utilizando puntas de micropipeta con filtro y se agitaron manualmente durante 10 minutos. Se dejaron reposar 3 minutos a temperatura ambiente y se centrifugaron a 11, 300 rpm durante 15 minutos a 4 °C. Se obtuvieron dos fases de las cuales tomamos la fase acuosa y se colocó en tubos eppendorf estériles; se les agregaron 0.5 ml de isopropanol (0.5 ml de isopropanol por cada ml de trizol utilizado) y se incubaron a temperatura ambiente durante 10 minutos. Se centrifugaron a 12, 000 rpm durante 10 minutos a 4 °C. Se retiró el sobrenadante y se adicionó etanol al 75%, se centrifugó a 9, 000 rpm



durante 5 minutos. Se retiró el sobrenadante, la pastilla se dejó a temperatura ambiente para la evaporación del etanol.

V.6. PURIFICACIÓN DEL RNA

Las pastillas se resuspendieron en agua DEPC (Dietilpirocarbonato) y después se agregaron 5 ml de RNA + 10 ml de BUFFER +10ml de la DNAasa RQ1 teniendo un volumen total de 100ml, los cuales se agitaron e incubaron durante 45 minutos a 37 °C. Se agregaron 150 µl de agua estéril para completar un volumen de 250 µl. Se agregaron 250 µl de fenol-citrato, se agitaron en vórtex durante 30 segundos y después se agregaron 125 µl de cloroformo agitando también en vórtex durante 30 segundos. Se centrifugaron durante 10 minutos a 12,000 rpm a 4 °C y se transfirieron los sobrenadantes a los cuales se les adicionaron 30 µl de acetato de sodio (la relación es al 10% del sobrenadante), se agregaron 750 µl de etanol absoluto (2.5 volúmenes del volumen total) con el propósito de deshidratar el RNA para que se precipite mejor. Se incubaron a -20 °C durante 30 min, se centrifugaron durante 30 minutos a 12, 000 rpm a 4 °C para descartar el sobrenadante. Se agregaron 500 µl de etanol al 75% (disuelto en agua esterilizada), se agitaron en vórtex durante 10 minutos para desprender la pastilla y se centrifugaron durante 25 min a 12 000 rpm a 4 °C para descartar de nuevo el sobrenadante, se agregaron 50 µl de agua estéril y se resuspendieron las pastillas.

Las concentraciones de RNA se determinaron espectrofotométricamente a 260 nm, haciendo una dilución 1:100 con agua estéril.



V.7. TRASCRIPTIÓN REVERSA

Utilizamos el kit de PROMEGA CORPORATION, Madison, WI. Después de haber obtenido la concentración de RNA en las muestras, se homogeneizó la concentración en cada muestra a 2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Se agregaron 2 μl de la dilución 1:20 de hexámeros, se agitaron y se colocaron en el termociclador durante 5 minutos a 70^o C. Se colocaron las muestras sobre una placa de hielo mientras que se preparó la mezcla siguiente para cada una de las muestras: PROMEGA AMVR 5x buffer M 515^a (18161125) + QUIAGEN dNTP-mix (Cat. No. 1010355) + RNA sIn (10 $\mu\text{l}/\mu\text{l}$) + MEXSTOCK AMV-RT PROMEGA MSCOF (19001801) + agua esterilizada (libre de RNAsas) , del cual se agrego a cada muestra para tener un volumen total de 22.5 μl . Se agregó la enzima y se agitaron en el vórtex. Se colocaron las muestras en el termociclador durante 60 minutos a una temperatura de 37^o C.

La concentración de DNAc se determino espectrofotométricamente a 260 nm y 280 nm haciendo una dilución de 1:50 con agua estéril.

V.8. SELECCIÓN Y VALIDACIÓN DE LOS PRIMERS

Se utilizaron los primers para rata TPH1 (X53501) y TPH2 (AY098915). Los cuales se diseñaron realizando primero una búsqueda en BLAST de las secuencias de TPH1 y TPH2 para de esta forma, hacer otra búsqueda en LFASTA para comparar estas dos secuencias que corresponden a los genes de las dos formas de la TPH y elegir las secuencias que no se repiten en TPH1 y TPH2 para efectuar la RT-PCR en tiempo real y diferenciar ambas isoformas.



- ❖ Primers para rata TPH1 (X53501) fueron: sentido, 5'-CAA GGA GAA CAA AGA CCA TTC-3' (135-155); antisentido, 5'-ATT CAG CTG TTC TCG GTT GAT G-3' (321-342) para dar un producto de 156 pares de bases.
- ❖ Primers para rata TPH2 (AY098915) fueron: sentido, 5'-TAA ATA CTG GGC CAG GAG AGG-3' (exon 1, 147-167); antisentido, 5'-GAA GTG TCT TTG CCG CTT CTC-3' (exon 2, 258-278) para dar un producto de 132 bp.

```

          70          80          90          100          110          120
/tmp/t CCAAGGCTGCCCTCTGATCCCCCTGCTGCTGAGAAAGAAAATTACATCGGGATCCATG
      : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
TPH2 --- AGG-TGACCCTCTGAACTCCAGTGGCTTTGAG-----

          40          50          60
/tmp/t CAGCCCGCAATGATGATGATTTTTCCAGTAAATACTGGGCCAGGAGAGGGTTGTCCTTGGAT
      : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
TPH2 --GTCCTC-----TTTCCAGT-----GCC-----GGAT

          70          80
/tmp/t TCAGCGGTGCCAGAAGAGCATCAGATACTTGGCGGCTTAACACAAAATAAGGCTACCGCT
      : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
TPH2 CCTGC---CCACTGGGTCATC-----TTCATTAGATTCCACATGATTGAAGACAAC---

          90          100          110          120          130
/tmp/t AGCAAAAGCGAGGACAGAAGTGTCTTTGCCGCTTCTCCGGAGAGCAGCAAGACTG-CGGT
      : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
TPH2 -----AAG-GAGAACAA--AGACC-----ATTCCTCAGAAAGGGGGA-GAGTGACTCT

          140          150          160          170
/tmp/t TGTGTTCTCCCTGAAGAATGAAGTTGGCGGGCTGGTGAGAGCACTGAGACTCTTCCAGGA
      : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
TPH2 CATCTTTTCTTGAAGAATGAAGTTGGAGGACTCATAAAAGCGCTGAAAATCTTCCAGGA

          180          190          200          210          220          230

```

Tabla I : Secuencia del oligonucleótido utilizado en la reacción de cadena de la polimerasa (PCR) de la **TPH2** de rata (*Mus musculus*), en donde la posición de los nucleótidos es a partir de 1324-1714 secuencia NM_173391.

Oligonucleótido	Secuencia
TPH2	5' – TTTGACCCAAAGACGACCTGCTTGCA – 3'
TPH2	5' – TGCATGCTTACTAGCCAACCATGACACA – 3'



Para verificar la especificidad del oligonucleótido para el gen de la TPH2 se realizó una amplificación por PCR en tiempo real para demostrar que obtenemos un solo producto de TPH2. Para esto corrimos una electroforesis en gel de agarosa al 1%. En donde usamos marcador de pesos moleculares, un control positivo (con RT) y un control negativo (sin RT). También determinamos la temperatura de fusión de este oligonucleótido, utilizando un paquete de software para el diseño de oligonucleótidos del mercado.

V.9. VALIDACIÓN DE LOS CONTROLES ENDÓGENOS

Para analizar cambios relativos en la cantidad de transcritos se elige como patrón un transcrito de referencia que no varíe su expresión independientemente del tipo de tratamiento o las diversas condiciones a las que es sometido. Para nuestro trabajo utilizamos las opciones del gen de la β -actina o el de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), analizamos su expresión para determinar cual sería nuestro control endógeno.

V.10. PCR CUANTITATIVO EN TIEMPO REAL

El RT-PCR cuantitativo en tiempo real se llevó a cabo con el sistema termociclador rápido de BIORAD. Se preparó una mezcla de trabajo para PCR, ajustando las concentraciones para un volumen final de 15 microlitros por tubo: 4.5 μ l de las muestras con cDNA, 7.5 μ l de la mezcla, 1.5 μ l del Primer sentido y 1.5 μ l del Primer *antisentido*.

Todos los ensayos de RT-PCR en tiempo real se efectuaron en 14 horas, a 95°C para activar a la *Taq polimerasa*, seguido por 45 ciclos para la desnaturalización a 95°C, 30 min; continuando con 45 ciclos para la alineación,



57°C, 30 min; y 80 ciclos para la extensión, a 95°C durante 10 min. Finalizados los ciclos, las muestras permanecieron a 15°C.

V.11. ANALISIS DE DATOS

Para cuantificar los cambios relativos en la expresión genética de las dos isoformas de la TPH, empleamos el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$; para el cual tuvimos primero que determinar el ciclo umbral (Ct), término exponencial y no lineal, de los tejidos que analizamos por triplicado: glándula pineal de rata control y de rata desnutrida, tallo cerebral de rata control y de rata desnutrida, β -actina en rata control y en rata desnutrida. Los valores de Ct que obtuvimos del PCR en tiempo real fueron fácilmente importados a una hoja de cálculo del programa Microsoft Excel, para su cálculo y manejo.

Se calculó el promedio del Ct de cada tejido que se trabajó por triplicado, con el propósito de aplicar la fórmula para determinar para cada tejido el:

$$\Delta Ct = (Ct \text{ tejido problema} - Ct \text{ control interno})$$

El control interno fue la β -Actina.

Los datos fueron analizados usando la ecuación para $\Delta\Delta Ct$:

$$2^{-\Delta\Delta Ct} = (Ct \text{ tejido problema} - Ct \text{ control interno})_{\text{tiempo } x} - (Ct \text{ tejido problema} - Ct \text{ control interno})_{\text{tiempo } 0}$$

Aplicamos la media, la desviación estándar para las muestras por triplicado antes del cálculo de $2^{-\Delta\Delta Ct}$. En el cálculo final, el error se estimó evaluando el término $2^{-\Delta\Delta Ct}$ usando $\Delta\Delta Ct \pm$ la desviación estándar.



VI. RESULTADOS

Respecto a la evolución del peso de las ratas madre sometidas a desnutrición proteico-calórica antes de iniciar su periodo de gestación bajo régimen de desnutrición, ya se observaba una diferencia con respecto al peso, y esta diferencia permaneció durante el embarazo. Esperábamos un incremento del peso de ambos grupos de ratas, y este incremento sólo se dio en el grupo control (aumento del 10%) en tanto que en el grupo experimental contrariamente se mostró una disminución del 6% del peso al finalizar el periodo de gestación. Este evento nos muestra que efectivamente el grupo experimental sufrió los efectos de la desnutrición con respecto al peso corporal (tabla II).

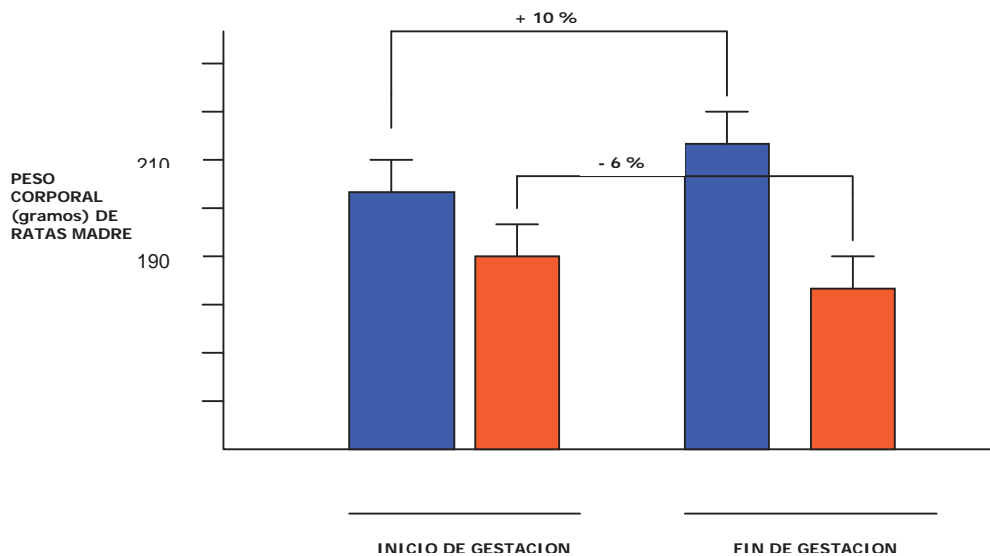


Fig.8. Evolución del peso de las ratas madre sometidas a desnutrición proteico-calórica durante la etapa perinatal.

**TABLA II. PESO CORPORAL DE LOS GRUPOS EXPERIMENTALES**

RATAS MADRE	INICIO DE LA GESTACION	FIN DE LA GESTACION	AUMENTO DEL PESO CORPORAL
CONTROLES	201.5 ± 5	222 ± 4	10.17%
DESNUTRIDAS	191.5 ± 12	180 ± 180	-6%

Respecto a la evolución del peso y la talla de las ratas que descienden de ratas madres desnutridas, la Fig. 9 se muestra la evolución del peso de las ratas con desnutrición proteica perinatal con respecto a las ratas control. Podemos observar que su evolución no es la misma, a partir del día 21 ya existe una diferencia en el peso de las ratas desnutridas únicamente en la etapa de lactación y a partir de este momento se muestra un mayor peso en las ratas del grupo control, permaneciendo a los 60 días la diferencia en el peso. También se observó que efectivamente permaneció el efecto con respecto a la diferencia de tallas de ambos grupos, mostrándose hasta un 40% menor la talla del grupo desnutrido con respecto al grupo control. (Fig. 10).

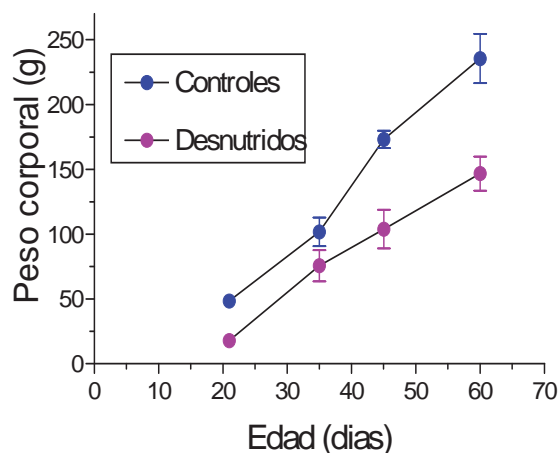


Fig. 9. Evolución del peso de las ratas sometidas a desnutrición proteica perinatal *versus* ratas control.



Figura 10. Talla de dos ratas macho de 45 días: en la parte superior, rata control; en la parte inferior, rata sometida a desnutrición proteica perinatal.

Como resultado de la elección y validación de un gen control internos en donde analizamos la expresión tanto de β -actina (11A) y GAPDH (11B), pudimos observar que ambos controles no mostraron diferencia significativa en su expresión entre el grupo control y el grupo experimental.

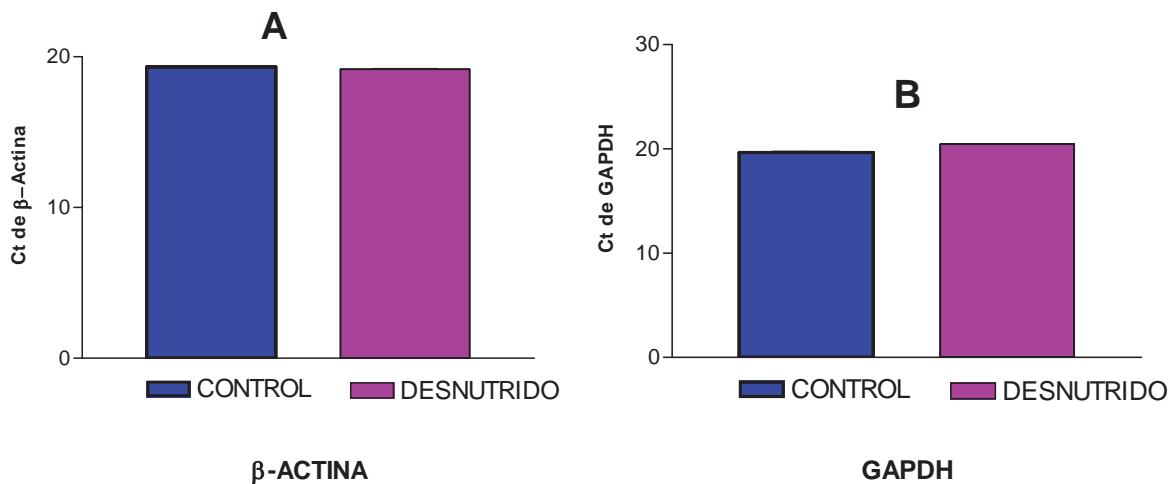




Fig. 11. Nivel de expresión de la β -actina y de GAPDH en ambos grupos experimentales.

Otro requisito para seleccionar al control interno es que el gen no modifique su expresión con diferentes concentraciones del cDNA, por lo cual se realizó este experimento, observando en la figura 12 los resultados. La expresión del gen GAPDH si vario al incrementar la concentración de su cDNA, en tanto que la expresión de la β -actina fue similar en las diferentes concentraciones de su cDNA, teniendo una pendiente de cero y por lo tanto utilizamos este como control interno en los experimentos de RT-PCR en tiempo real.

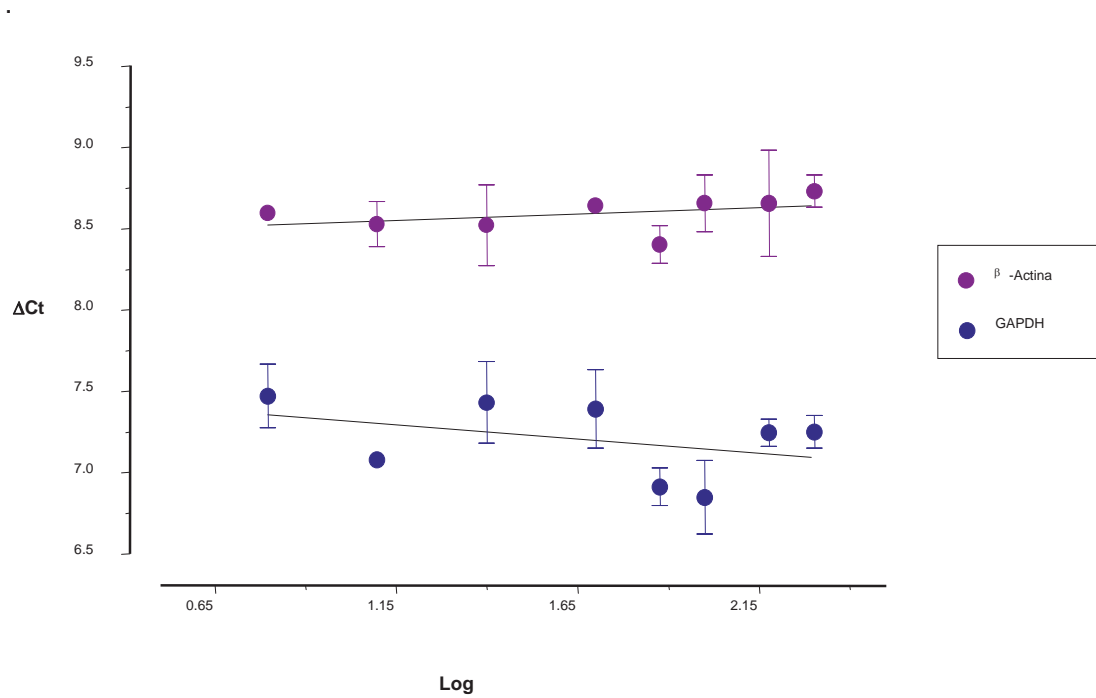


Fig.12. Expresión de los genes de β -actina y de GAPDH con diferentes concentraciones de su cDNA..



Respecto a los resultados obtenidos para la validación de los oligonucleótidos de la TPH2 (fig.13), observamos una banda que nos indica 132 pb, de lado derecho se observa la curva de fusión la cual indica que se trata efectivamente de la amplificación de un solo producto correspondiente al gen de la TPH2.

Amplificación por PCR en tiempo real de un solo producto de Tph.

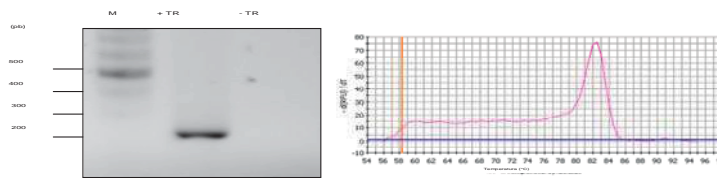


Fig.13. Validación de los oligonucleótidos de la TPH2.

La figura 14 muestra la expresión del gen de la TPH2 en animales controles y en animales sometidos a desnutrición proteíco calórica en las etapas pre y perinatal. Se puede observar que existe aparentemente una pequeña diferencia pero ésta a nivel estadístico no es significativa con respecto al grupo control ($p < 0.05$).

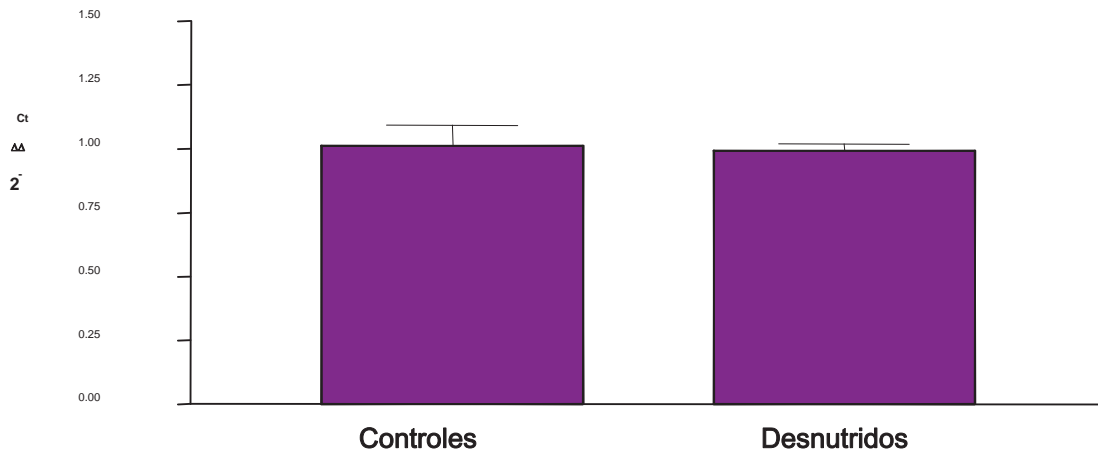


Fig.14. Niveles de expresión de la TPH2 en animales con desnutrición proteico-calórica en etapa pre y pos natal con respecto a animales control.

La expresión del gen de la TPH2 en animales controles y en animales sometidos a desnutrición proteica perinatal no mostró una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) (fig. 15).

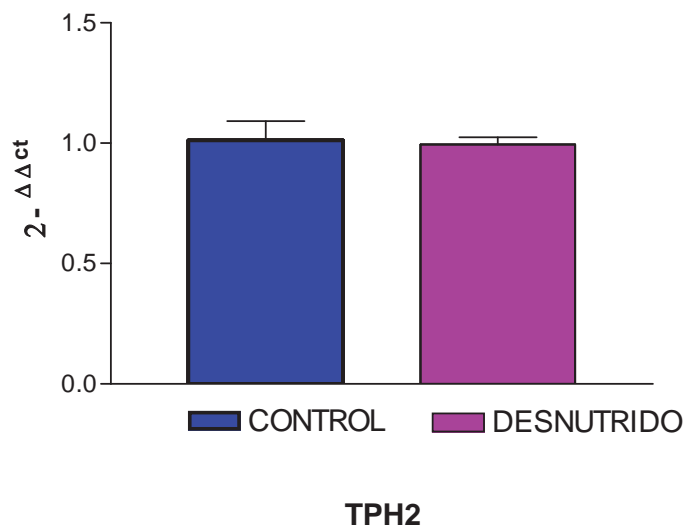


Fig.15. Niveles de expresión de la TPH2 en animales con desnutrición proteica perinatal y controles.



VII.- DISCUSION

Fue en la década de los setentas cuando Hernández y col.⁽¹⁶³⁾ obtuvieron evidencias experimentales de la alteración del sistema serotoninérgico en el cerebro de ratas desnutridas durante etapas tempranas. Por otro lado, Miller, Morgane, y Resnick,⁽⁹³⁾ reportaron también que la concentración de serotonina en ratas con desnutrición temprana, se encuentra aumentada a nivel cerebral durante el desarrollo postnatal y continúa en la edad adulta. Recordando que el L-triptófano es el aminoácido esencial precursor de la síntesis de serotonina y que éste se puede encontrar en la sangre en dos fracciones diferentes: fracción de L-triptófano plasmático libre y fracción de L-triptófano plasmático unido a la albúmina; Tagliamonte,⁽⁹⁵⁾ Gessa, y col.,⁽⁶²⁾ reportaron que el aumento en la síntesis de 5-HT está probablemente ocasionado por una elevación en la fracción del L-triptófano plasmático libre; Manjarréz y col.⁽²⁵⁾ demostraron que este aumento se debe a una mayor actividad de la enzima limitante en la síntesis de



serotonina: la triptófano-5-hidroxilasa (TPH) en el cerebro de ratas desnutridas en etapas tempranas y probablemente la isoforma TPH2 que es la responsable de la síntesis de 5-HT cerebral, en tanto que la otra isoforma, TPH1 se encuentra distribuida a nivel periférico.⁽¹²⁹⁾ Con éstas evidencias por lo tanto no fue necesario medir la concentración de 5-HT ni la actividad de la TPH en nuestro estudio.

Por otro lado los resultados con respecto a la talla y al peso de las ratas sometidas a los dos esquemas de desnutrición correspondieron a los observados por Manjarréz y col.⁽¹⁸⁾ y Por Del Angel y col.⁽¹⁵⁶⁾ dando validez a los esquemas de desnutrición que aplicamos en nuestro estudio.

En cuanto a la técnica de PCR en tiempo real para determinar la expresión de la TPH2, Zill ⁽¹⁶²⁾ utilizó una técnica similar en cerebro humano, por lo tanto el método aplicado en nuestro estudio fue estandarizado correctamente.

La expresión de la TPH2 tanto en animales control como en los dos grupos experimentales fue muy similar lo que sugiere que el aumento en la actividad de la TPH observado en ratas desnutridas no se debe a un aumento en la expresión de la misma por un lado y por otro lado sugiere también que el tipo de desnutrición no produce cambios en la expresión de la enzima. Una posibilidad para explicar el mecanismo de activación de la TPH por la desnutrición es un posible cambio en la conformación de la enzima, para lo cual es preciso realizar experimentos de Western blot.⁽¹⁶³⁾



VIII. CONCLUSIONES

- Se implementaron dos modelos de desnutrición perinatal.
- Los niveles de expresión del ARN que codifica el gen de la TPH2 en el tallo cerebral son idénticos en las ratas con restricción alimenticia y en los animales control.



IX. BIBLIOGRAFIA

1. Miller, J.E., and Korenman, S. (1994) Poverty and children's nutrition status in the United States. *Am. J. Epidemiol.* 140:233–243.
2. Secretario General de las Naciones Unidas. (1999) *Actividades Operacionales de las Naciones Unidas para la cooperación internacional para el desarrollo. Período de sesiones sustantivo de 1999. Ginebra, 5 a 30 de julio de 1999.*
3. McClave, S.A., Mituraj, T.E., Thielmeier, K.A., Greenburg, R.A. (1992) Differentiating subtypes (hypoalbuminemic vs marasmic) of protein caloric malnutrition, incidence and clinical significance in a university hospital setting. *J.P.E.N.* 16: 337-342.
4. Barker, D.J.P. (1995) Fetal origins of coronary heart disease. *Br. Med. J.* 311: 171–174.
5. Ozanne, S.E., and Hales, C.N. (1999) The long-term consequences of intra-uterine protein malnutrition for glucose metabolism. *Proc. Nutr. Soc.* 58: 615-619.
6. Vickers, M.H., Breier, B.H., Cutfield, W.S., Hofman, P.L., and Gluckman, P.D. (2000) Fetal origins of hyperphagia, obesity, and hypertension and postnatal amplification by hypercaloric nutrition. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 279: E83-E87.
7. Vickers, M.H., Breier, B.H., Cutfield, W.S., Hofman, P.L., and Gluckman, P.D. (2000) Fetal origins of hyperphagia, obesity and hypertension and its postnatal amplification by hypercaloric nutrition. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 279: 3–87.
8. Vickers, M.H., Breier, B.H., McCarthy, D., and Gluckman P.D. (2003) Sedentary behavior during postnatal life is determined by the prenatal environment and exacerbated by postnatal hypercaloric nutrition. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 285: R271-R273.
9. Bellinger, L., Lilley, C., and Langley-Evans, S. C. (2004) Prenatal exposure to a maternal low-protein diet programmes: A preference for high-fat foods in the young adult rat. *British Journal of Nutrition.* 92: 513-520.
10. McCance, R.A. (1962) Food growth and time. *Lancet.* 2:271–272.
11. Berney, D.M., Desai, M., Palmer, D.J., Greenwald, S., Brown, A., Hales, C.N., and Berry, C.L. (1997) The effects of maternal protein deprivation on the fetal rat pancreas: major structural changes and their recuperation. *J. Pathol.* 183:109-115.
12. Latorraca, M.Q., Reis, M.A.B., Carneiro, E.M., Mello, M.A., Velloso, L.A., Saad, M.J.A., and Boschero, A.C., (1998) Protein deficiency and nutritional recovery



- modulate insulin secretion and the early steps of insulin action in rats. *J. Nutr.* 129: 1643-1649.
13. Bennis-Taleb, N., Remacle, C., Hoet, J., and Reusens, B. (1999) A low-protein isocaloric diet during gestation affects brain development and alters permanently cerebral cortex blood vessels in rat offspring. *J. Nutr.* 129: 1613-1619.
 14. Manjarrez, G., Contreras, J. L., Chagoya, G., and Hernández-R, J. (1998) Free Tryptophan as an Indicator of Brain Serotonin Synthesis in Infants. *Pediatr. Neurol.* 18: 57-62.
 15. Lucas, A. (1991) Programming by early nutrition in man. In: Bock GR, Whelan J, eds. *The childhood environment and adult disease*. Chichester: Wiley. 1:38-55.
 16. Hesse, H., Rivera, M.F., Díaz, I., and Quirk, G.J. (1998) Central somatosensory conduction time in severely growth-stunted children. *American Journal of Clinical Nutrition*, 67:93-96.
 17. Manjarréz, G., Chagoya, G., and Hernández, R.J. (1988) Perinatal brain serotonin metabolism in rats malnourished in utero. *Biol. Neonate.* 54: 232-240.
 18. Bernochi, G., and Scherini, E. (1980) Cytochemical data on DNA and protein nuclear content during the prenatal cerebellar histogenesis in the rat: Effects of maternal protein malnutrition. *Cell Mol. Biol.* 26: 405-413.
 19. Davies, C.A., and Katz, H.B. (1983) The comparative effects of early-life undernutrition and subsequent differential environments on the dendritic branching of pyramidal cells in rat visual cortex. *J. Comp. Neurol.* 218:345-350.
 20. Morgane, P.J., Austin-LaFrance, R., Bronzino, J., et al. (1992) Malnutrition and the developing nervous system. In: Isaacson, R., Jensen, K. Eds. *The vulnerable brain and environmental risks, vol. I Malnutrition and hazard assesment*. New York: Plenum Press. 3-44.
 21. Ahmed, M.G., Bedi, K.S, Warren, M.A. et al. (1987) Effects of the lengthy period of undernutrition from birth and subsequent nutritional rehabilitation on the synapse:granule cell neuron ratio in the rat dentate gyrus. *J. Comp. Neurol* 263:146-158.
 22. Altman, J. (1986) An animal model of minimal brain dysfunction. In: Lewis, M. Ed. *Learning disabilities and prenatal risk*. Chicago: University of Illinois Press. 261-304.
 23. Altman, J. (1987) Morphological and behavioral markers of environmentally induced retardation of brain development: an animal model. *Environ. Health. Perspect.* 74:153-68.



24. Manjarrez, G.G., Chagoya, G.G., and Hernández, J. (1994) Early nutritional changes modify the kinetics and phosphorylation capacity of tryptophan-5-hydroxylase. *Int. J. Dev. Neurosci.* 12: 695-702.
25. McGeer, L.P., Eccles, J.S. and McGeer, E.G. (1987) *Molecular Neurobiology of the Mammalian Brain.* Plenum. Press. New York and London. 1-174.
26. McMenamy, R.H., and Oncley, J.L. (1975) The specific binding of L-Tryptophan to serum albumin. *J. Biol. Chem.* 233:1436-1447.
27. Schonheit, B., and Haensel, P. (1988) Neurohistologic studies of cortical pyramidal neurons in the rat following rehabilitation of early postnatal malnutrition. *J. Hirnforsch.* 29:599-615.
28. Hernández, A., Ruíz, S., Pérez, H. et al. (1985) Effect of early undernutrition on dynamic properties of axodendritic synapses in the rat prefrontal cortex. *J. Neurobiol.* 16:389-393.
29. Medvedev, D.I., Babichenko, I.I., Eremina, I.Z. et al. (1983) Ultrastructural changes in the neuropile of the sensorimotor cortex during long term protein calorie deficiency. *Biull. Eksp. Biol. Med.* 95:108-111.
30. Díaz-Cintra, S, Cintra, L, Kemper, T. et al. (1984) The effects of protein deprivation on the nucleus locus coeruleus: a morphometric golgi study in rats of three age groups. *Brain. Res.* 304:243-253.
31. Cintra, L., Díaz-Cintra, S., Galvin, A., et al. (1990) Effects of protein undernutrition on the dentate gyrus in rats of three age groups. *Brain Res.* 532: 271-277.
32. Claus, D., Neundorfer, B., and Warecka, K. (1984) The influence of vitamin B₆ deficiency on somatosensory stimulus conduction in the rat. *Eur. Arch. Psychiatry Neurol. Sci.* 234: 102-105.
33. Hoyer, D., Clarke, D.E., Fozard, J.R., Hartig, P.R., Martin, G.R., Mylecharane, E.J., Saxena, P.R., and Humphrey, P.P.A. (1994) International union of pharmacology classification of receptors for 5-hydroxytryptamine (serotonin). *Pharmacol. Rev.* 46: 157-203.
34. Jequier, E., Robinson, D.S., Lovenberg, W., and Sjoerdsma, A. (1969) Further studies on tryptophan hydroxylase in rat brainstem and beef pineal. *Biochem. Pharmacol.* 18: 1071-1081.
35. Katz, H.B., and Davies, C.A. (1983) The separate and combined effects of early undernutrition and environmental complexity at different ages on cerebral measures in rats. *Dev. Psychobiol.* 16:47-58.



36. Kawai, S., Nakamura, H., and Matsuo, T. (1989) Effects of early postnatal malnutrition on brainstem auditory evoked potentials in weanling rats. *Biol. Neonate* 55: 268-274.
37. Biggio, G., Fadda, F., Fanni, P., Tagliamonte, A., Gessa, G.L. (1974) Rapid depletion of serum tryptophan, brain tryptophan, serotonin and 5-hydroxyindoleacetic acid by a tryptophan-free diet. *Life. Sci.* 14:1321-1329.
38. Blundell, J.E. (1984) Serotonin and appetite. *Neuropharmacology.* 23:1537-1551.
39. Cordero, M.E., Trejo, M., Garcia, E. et al. (1985) Dendritic development in the neocortex of adult rats subjected to postnatal malnutrition. *Early Hum. Dev.* 12: 309-321.
40. Dahlstroem, A., and Fuxe, K. (1964) An evidence for the existence of monoamine-containing neurons in the central nervous system. *Acta Physiol. Scand.* 62: 232-255
41. Chopra, J.S., and Sharma, A. (1992) Protein energy malnutrition and the nervous system *J. Neurol. Sci.* 110: 8-20.
42. Hesse, H., Rivera, M.F., Ochoa, M, et al. (1998) Efecto de la desnutrición crónica en el tiempo de reacción visomotor de niños escolares. *Memoria de la X Semana Científica de la Universidad Nacional Autónoma de Honduras:*25.
43. Hesse, H., Rivera, M.F., Díaz, I., and Quirk, G.J. (1998) Central somatosensory conduction time in severely growth-stunted children. *American Journal of Clinical Nutrition.* 67:93-96.
44. Kretchmer, N., Beard, J.L., and Carlson, S. (1996) The role of nutrition in the development of normal cognition. *American Journal of Clinical Nutrition.* 63: 997S-1001S.
45. van Kranen-Mastenbroek, V.H., Folmer, K.B., Kingma, H, et al. (1993) Postural behavior of term SGA and AGA newborn infants. *Dev. Med. Child. Neurol.* 35: 516-524.
46. Gundappa, G., and Desiraju, T. (1988) Deviations in brain development of F2 generation on caloric undernutrition and scope of their prevention by rehabilitation: alterations in dendritic spine production and pruning of pyramidal neurons of lower laminae of motor cortex and visual cortex. *Brain Res.* 456: 205-223.
47. Chamas, F., and Sabban, E. L. (2002) Role of the 5' untranslated region (UTR) in the tissue-specific regulation of rat tryptophan hydroxylase gene expression by stress. *J. Neurochem.* 82: 645–654.



48. Díaz-Cintra, S., Cintra, L., Kemper, T. et al. (1981) The effects of protein deprivation on the nucleus raphe dorsalis: a morphometric golgi study in rats of three age groups. *Brain Res.* 221: 243-255.
49. Adams, R.D., Victor, M., and Ropper, A.H. (1997) Diseases of the nervous system due to nutritional deficiency. *Principles of Neurology VI Edition McGraw Hill.* 1138-1165.
50. Fuller, G.N., Johnston, D.A., and Wiggins, R.C. (1984) The relationship between nutritional adequacy and brain myelin accumulation: a comparison of varying degrees of well fed and undernourished rats. *Brain Res.* 290: 195 -198.
51. Grahme-Smith, D.G. (1964) Tryptophan hydroxylation in brain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 16:586-92.
52. Díaz-Cintra, S, Cintra, L, Kemper, T. et al. (1984) The effects of protein deprivation on the nucleus locus coeruleus: a morphometric golgi study in rats of three age groups. *Brain Res.* 304: 243-253.
53. McEntee, W.J., and Crook, T.H. (1991) Serotonin, memory, and the aging brain. *Psychopharmacology.* 103:143-149.
54. Altman, J. (1986) An animal model of minimal brain dysfunction. In: Lewis, M. Ed. *Learning disabilities and prenatal risk.* Chicago: University of Illinois Press, 4:261-304.
55. Gessa, G. L., Biggio, G., Fadda, F., Corsini, G. U., and Tagliamonte, A. (1974) Effect of the oral administration of tryptophan-free amino acid mixtures on serum tryptophan, brain tryptophan and serotonin metabolism. *J. Neurochem.* 22: 869-870.
56. Goncalves, C.A., Salbego, C., Wofchuk, S. et al. (1990) Effects of undernutrition during suckling on phosphoryl serine levels in nuclear and synaptosomal proteins from cerebral cortex of rats. *J. Nutr.* 120:594-597.
57. Krigman, M.R., and Hogan, E.L. (1976) Undernutrition in the developing rat: effect upon myelination. *Brain. Res.* 107: 239-255.
58. Janowsky, D. (1987) Role of acetylcholine mechanisms in the affective disorders in: *Psychopharmacology.* Meltzer, H. Raven Press. 8:527-534.
59. Azmitia, E.C., and Conrad, L.C. (1976) Temporal effects of formix transection on brain tryptophan hydroxylase activity and plasma corticosterone levels. *Neuroendocrinology.* 21:338-349.
60. de Boer, A.G., van der Sandt, I.C, and Gaillard, P.J. (2003) The role of drug transporters at the blood-brain barrier. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 43:629-56.



61. Tagliamonte, A. Biggio, G, Vargin, L., and Gessa, G.L. (1973) Free Tryptophan in serum controls brain tryptophan level and serotonin synthesis, *Life. Sci.* 12:277-328.
62. Lehkuniec, E., and López-Mato, A. (1988) Transtornos del sueño y la vigilia. En *Psiquiatría Biológica. Fundamentos y aplicación clínica.* J. Ciprian-Olliver. Científica interamericana. 21:149-159.
63. Quirk, G.J., Mejía, W.R., Hesse, H., and Su, H. (1995) Early malnutrition followed by nutritional restoration lowers the conduction velocity and excitability of the corticospinal tract. *Brain. Res.* 670:227-282.
64. Agarwal, D.K., Upadhyay, S.K., and Agarwal, K.N. (1989) Influence of malnutrition on cognitive development assessed by Piagetan tasks. *Acta. Paediatr. Scand.* 78:115-22.
65. Ahmed, M.G., Bedi, K.S., Warren, M.A. et al. (1987) Effects of the lengthy period of undernutrition from birth and subsequent nutritional rehabilitation on the synapse:granule cell neuron ratio in the rat dentate gyrus. *J. Comp. Neurol.* 263: 146-158.
66. Chen, J.C., Tonkiss, J., Galler, J.R., et al. (1992) Prenatal malnutrition enhances serotonin release from the hippocampus. *J. Nutr.* 122: 2138-2143.
67. Chomczynski, P., and Sacchi, N. (1987) Single-Step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Biochemistry.* 162:156-159.
68. Evrard, P., and Minkowski, A. (1989) *Developmental Neurobiology.* Nestlé nutrition Workshop Series Volume 12. New York: Raven Press, 8 : 315-319.
69. Boullosa, O., and López – Mato, A. (1991) Anorexia nerviosa. Differential Diagnosis with other psychiatric. *Biol. Pysch.* 29: 115- 490.
70. Bronzino, J.D., Austin La France, R.J., Morgane, P.J., et al. (1996) Diet induced alterations in the ontogeny of long-term potentiation. *Hippocampus,* 6:109-117.
71. Brown, J.L., and Pollitt, E., (1996) Malnutrition, poverty and intellectual development. *Scientific American,* 274: 38-43.
72. Fitzpatrick, P. F. (1999) Tetrahydropterin-dependent amino acid hydroxylases. *Annu. Rev. Biochem.* 68: 355–381.
73. Hernández, A., Ruíz, S., Pérez, H. et al. (1985) Effect of early undernutrition on dynamic properties of axodendritic synapses in the rat prefrontal cortex. *J. Neurobiol.* 16: 389-393.



74. Kenneth, J.L., and Schmittgen, D.T. (2001) Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- delta cT Method. *METHODS*, 25: 402-408.
75. Manjarréz, G., Chagoya, G., and Hernández, R.J. (1988). Perinatal brain serotonin metabolism in rats malnourished in utero. *Biol. Neonate*, 54: 232-240.
76. Peroutka, S. (1994) Hidroxytryptamine receptors. In *Handbook of Receptors and Channels. G Protein-coupled receptors*. Ed. Stephen J. Peroutka. CRC. Press, London. 335-339.
77. Tamer, S.K., Misra, S., and Jaiswal, S. (1997) Central motor conduction time in malnourished children. *Arch. Dis. Child*. 77:323-325.
78. Hesse, H., Rivera, M.F., Díaz, I., Quirk, G.J. (1998) Central somatosensory conduction time in severely growth-stunted children. *Amer. J. Clin. Nutr.* 67:93-96.
79. Martinez, M. (1982) Myelin lipids in the developing cerebrum, cerebellum and brain stem of normal and undernourished children. *J. Neurochem.* 39:1684-1692.
80. Díaz-Cintra, S, Cintra, L, Ortega, A. et al (1990) Effects of protein deprivation on pyramidal cells of the visual cortex in rats of three age groups. *J. Comp. Neurol.* 292: 117-126.
81. Colombo, M., and López, A. (1992) Intellectual and physical outcome of children undernourished in early life is influenced by later environment conditions. *Dev. Med. Child. Neurosci.* 7:611-622.
82. Brown, J.L., and Pollit, E. (1996) Malnutrition, poverty and intellectual development. *Scientific American*, 2: 26-31.
83. Hesse, H., Rivera, MF, Ochoa, M, et al. (1998) Efecto de la desnutrición crónica en el tiempo de reacción visomotor de niños escolares. *Memoria de la X Semana Científica de la Universidad Nacional Autónoma de Honduras.* 25-26.
84. Jordan, T.C., Cane, S.E., Howells, K.F., et al. (1981) Deficits in spatial memory performance induced by early malnutrition. *Dev. Psychobiol.* 14:317-325.
85. Jordan, T.C, Howells, K.F., McNaughton, H. et al. (1982) Effects of early undernutrition on hippocampal development and function. *Res. Exp. Med.* 180:201-207.
86. McGeer, L.P., Eccles, J.S. and Mc Geer, E.G. (1987) *Molecular Neurobiology of the Mammalian Brain*. Plenum Press, New York and London 774 p.
87. Gramsbergen, A. (1974) A neuroontology of sleep in the rat. *Basic Sleep Mechanisms*. Petre-Ouadens, O., Schlag, JH. Eds. New York: Academic Press 339-353.



88. Gillespie, S. R., Mason, J.B. and Martorell, R. (1996) How nutrition improve. ACC/SCN Nutrition Policy Discussion Paper No. 15. Ginebra: ACC/SCN.
89. Larocca, J.N., Sato, C., Berti Mattera, L.N., et al. (1985) Incorporation of (3H)thymidine into DNA and of (35S)sulfate into sulfatides of oligodendroglial cells during development: effect of malnutrition. *Neurochem. Res.* 10 : 89-98.
90. Kretchmer, N., Beard, J.L., and Carlson, S. (1996) The role of nutrition in the development of normal cognition. *Amer. J. Clin. Nutr.* 63:997S-1001S.
91. Fernstrom, J.D., and Wurtman, R.J. (1972) Brain serotonin content: physiological regulation by plasma neutral amino acids. *Life Science*, 179:414-416.
92. Miller, M., Leathy, I.P., McConville, F., Morgane, O.J., and Resnick, O. (1977) Effects of developmental protein malnutrition on tryptophan utilization in brain and ppheripheral tissues. *Brain Res.* 2:347-349.
93. Zeisel, H.S., Mauron, C.H., Watkins, C.J., and Wurtman, R.J. (1981) Developmental changes in brain indoles, serum tryptophan and other serum amino acids in the rat. *Dev. Brain Res.* 1: 551-564.
94. Tagliamonte, A., Biggio, G., Vargin, L. and Gessa, Gl.L. (1973) Free Tryptophan in serum controls brain tryptophan level and serotonin synthesis. *Life Science*, 12:227-287.
95. Valdecasas, F.G., Laporte, J. Salvá, J.A. , Cuenca, E., et al. (1984) Bases farmacológicas de la terapéutica medicamentosa. Salvat Editores. Cap. 4: 44-45.
96. De Boer, A.G., Van der Sandt, I.C., and Gaillard. P.J. (2003) The role of drug Transporters at the Blood-Brain Barrier. *Sociedad Iberoamericana de Información científica. (SIIC). Annual Review of Pharmacology and Toxicology.* 43:629-632.nual Review of Pharmacology and Toxicology, 03(43)
97. Potiou, P., and Boulu, R. (1977) Phychopharmacologie du tryptophane. *Path Biol.* 25:565.
98. Lovenberg, W., Jequier, E., and Sjoerdsma, A. (1967) Tryptophan hydroxylation: measurement in pineal gland, brainstem, and carcinoid tumor. *Science*, 155:217-219.
99. Murray, R.K., Mayes, P.A., Granner, D.K. and Rodwell, V.W. (2001) *Bioquímica de Harper. Manual Moderno, México.* 405-408.
100. Bencherif, M.K., Fowler, R.J., and Lukas, P.M. (1995) Lippiello. Mechanisms of upregulation of neuronal nicotinic acetylcholine receptors in clonal cell lines and primary cultures of fetal rat brain. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 275:987-994.



101. Martinez, A., Knappskog, P. M., and Haavik, J. (2001) A structural approach into human tryptophan hydroxylase and its implication for the regulation of serotonin biosynthesis. *Curr. Med. Chem.* 8:1077-1091.
102. Walter, D. J. and Bader, M. (2003) A unique central tryptophan hydroxylase isoform. *Biochem. Pharmacol.* 66: 1673-1680.
103. Huftonm, S.E., Jennings, I.G., and Cotton, R.G. (1995) Structure and function of the aromatic amino acid hydroxylases. *Biochem. J.* 311:353-66.
104. Fitzpatrick, P.F. (1999) Tetrahydropterin-dependent amino acid hydroxylases. *Annu. Rev. Biochem.* 68:355-81.
105. Kappock, T.J., and Caradonna, J.P. (1996) Pterin-dependent amino acid hydroxylases. *Chem. Rev.* 96: 2659-2756.
106. Boadle-Biber, M.C. (1980) Activation of tryptophan hydroxylase from slices of rat brain ítem incubates with N6, 02'-dibutyryl adenosine-3':5'-cyclic monophosphate. *Biochem. Pharmacol.* 29:669-72.
107. Ehret, M., Cash, C.D., Hamon, M, and Maitre, M. (1989) Formal demonstration of the phosphorylation of rat brain tryptophan hydroxylase by Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase. *J. Neurochem.* 52:1886-1891.
108. Tsatmali, M., Walcott, E.C., and Crossin, K.L. (2005) Newborn neurons acquire high levels of reactive oxygen species and increased mitochondrial proteins upon differentiation from progenitors. *Brain Res.* 1040:137-140.
109. Walther, D.J., Peter, J.U., Bashammakh, S., Hortnagl, H., Voits, M., Fink, H., and Bader, M. (2003) Synthesis of serotonin by a second tryptophan hydroxylase isoform. *Science*, 299: 76-80.
110. Kuhn, D.M., Arthur, Jr. R., and States, J.C. (1997) Phosphorylation and activation of brain tryptophan hydroxylase: protein kinase phosphorylation occurs at serine-58. *J Neurochem.* 69:1738-1745.
111. Yamauchi, T., Nakata, H., and Fujisawa, H. (1981) A new activator protein that activates tryptophan 5-monooxygenase and tyrosine 3-monooxygenase in the presence of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase. Purification and characterization. *J. Biol. Chem.* 256:5404-5409.
112. Ichimura, T., Isobe, T., Okuyama ,T., Takahaschi, N., Araki, K., Kuwano, R., and Takahashi, Y. (1988) Molecular cloning of Cdna coding for brain-specific 14-3-3 protein, a protein kinase-dependent activator of tyrosine and tryptophan hydroxylases. *Proc Natl. Acad. Sci.* 85:7084-7088.



113. Makita, Y., Okuno, S., and Fujisawa, H. (1990) Involvement of activator protein in the activation of tryptophan hydroxylase by cAMP-dependent protein kinase. *FEBS Lett.* 268:185-188.
114. Furukawa, Y., Ikuta, N., Omata, S., Yamauchi, T., Isobe, T., and Ichimura, T. (1993) Demonstration of the phosphorylation-dependent interaction of tryptophan hydroxylase with the 14-3-3 protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 194:144-149.
115. Banik, U., Wang, G.A., Wagner, P.D., and Kaufman, S. (1997) Interaction of phosphorylated tryptophan hydroxylase with 14-3-3 proteins. *J. Biol. Chem.* 272:26219-26225.
116. Kowlessur, D., and Kaufman, S. (1999) Cloning and expression of recombinant human pineal tryptophan hydroxylase in *Escherichia coli*: purification and characterization of the cloned enzyme. *Biochim. Biophys. Acta*, 1434:317-330.
117. Lida, Y., Sawabe, K., Kojima, M., Oguro, K., Nakanishi, N., and Hasegawa, H. (2000) Proteasome-driven turnover of tryptophan hydroxylase is triggered by phosphorylation in RBL2H3 cells, a serotonin producing mast cell line. *Eur. J. Biochem.* 269:4780-4788.
118. Meek, J.L., and Neff, N.H. (1972) Tryptophan 5-hydroxylase: approximation of half-life and rate of axonal transport. *J. Neurochem.* 19:1519-1525.
119. Sitaram, B.R., and Lees, G.J. (1978) Diurnal rhythm and turnover of tryptophan hydroxylase in the pineal gland of the rat. *J. Neurochemn.* 31:1021-1026.
120. Jiang, G.C., Yohrling, G.J., Schmitt, J.D., and Vrana, K.E. (2000) Identification of substrate orienting and phosphorylation sites within tryptophan hydroxylase using homology-based molecular modeling. *J. Mol. Biol.* 302:1005-1017.
121. Mckinney, J., Teigen, k., Froystein, N.A., Salaun, C., Knappskog, P.M., Haavik, J., and Martinez, A. (2001) Conformation of the substrate and pterin cofactor bound to human tryptophan hydroxylase. Important role of Phe313 in substrate specificity. *Biochemistry*, 40:15591-1601.
122. Martinez, A., Knappskog, P.M., and Haavik, J. (2001) A structural approach into human tryptophan hydroxylase and its implications for the regulation of serotonin biosynthesis. *Curr. Med. Chem.* 8:1077-1091.



123. Wang, L., Erlandsen, H., Haavik, J., Knappskog, P.M., and Stevens, R.C. (2002) Three-dimensional structure of human tryptophan hydroxylase and its implications for the biosynthesis of the neurotransmitters serotonin and melatonin. *Biochemistry*, 41:12569-12574.
124. Yohrling, G.J., Jiang, G.C., Mochus, S.M., and Vrana, K.E. (2000) Intersubunit binding domains within tyrosine hydroxylase and tryptophan hydroxylase. *J. Neurosci. Res.* 61:313-320.
125. Mockus, S.M., Kumer, S.C., and Vrana, K.E. (1997) Carboxy Terminal deletion analysis of tryptophan hydroxylase. *Biochim. Biophys. Acta*, 1342:132-140.
126. Yohrling, G.J., Mockus, S.M., and Vrana, K.E. (1999) Identification of amino-terminal sequences contributing to tryptophan hydroxylase tetramer formation. *J. Mol. Neurosci.* 12:23-34.
127. Moran, G.R., Daubner, S.C., and Fitzpatrick, P.F. (1998) Expresión and characterization of the catalytic core of tryptophan hydroxylase. *J. Biol. Chem.* 273:12259-12266.
128. Sugden, D. (2003) Comparison of circadian expression of tryptophan hydroxylase isoform mRNAs in the rat pineal gland using real-time PCR. *J. Neurochem.* 86: 1308-1311.
129. Kuhn, D.M., Arthur, R. Jr., and States, J.C. (1997) Phosphorylation and activation of brain tryptophan hydroxylase: identification of serine-58 as a substrate site for protein kinase A. *J. Neurochem.* 68:2220-2223.
130. Bevilaqua, L. R., Graham, M. E., Dunkley, P. R., von Nagy-Felsobuki, E. I. and Dickson, P. W. (2001). Phosphorylation of Ser(19) alters the conformation of tyrosine hydroxylase to increase the rate of phosphorylation of Ser(40). *J. Biol. Chem.* 276 : 40411-40416.
131. Clark, M.S., and Russo, A.F. (1997) Tissue-specific glucocorticoid regulation of tryptophan hydroxylase mRNA levels. *Brain. Res. Mol. Brain Res.* 48: 346-354.
132. Walther, D. J., Peter J.-U., Bashammakh, S., Hortnagl, H., Volts, M., Fink, H. and Bader, M. (2003) Synthesis of serotonin by a second tryptophan hydroxylase isoform. *Science*, 299:76-77.
133. Snyder, S. H., Axelrod, J. and Zweig, M. (1967) Circadian rhythm in the serotonin content of the rat pineal gland: regulating factors. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 158: 206–213.



134. McKinney, J., Knappskog, P.M., and Haavik, Jan. (2005) Different properties of the central and peripheral forms of human tryptophan hydroxylase. *J. Neurochem.* 92:311-320.
135. Van Praag, H.M. (1981) Central monoamines and the pathogenesis of depression. *Handbook of biological psychiatry. Affect. Disord.* 4: 275-290.
136. Van Praag, H.M., Plutchik, R., and Conte, H. (1986) The serotonin hypothesis of (Auto) Aggression: critical appraisal of the evidence. *Psychobiology of suicidal Behavior.* 487:150-167.
137. Van Praag, H.M., Khan, R.S., Asnis, G.M., et al. (1987) Denosologization of biological psychiatry or the specificity of 5-HT disturbances in psychiatric disorders. *J. Affect. Disord.* 13: 1-8.
138. Lorenzo, J.L., and Barbanoj, M.J. (2000) Monoaminergic selectivity of the antidepressive drugs and sleep: neurophysiological implications of depression. *Rev. Neurol.* 30:191-194.
139. Haro, R., and Drucker-Colin, R. (2004) Effects of long-term administration of nicotine and fluoxetine on sleep in depressed patients. *Arch. Med. Res.* 6:499-506.
140. Siegelbaum, S.A., Camardo, J.S., and Kandel, E.R. (1982) Serotonin and cyclic AMP close K^+ channels in *Aplysia* sensory neurons. *Nature*, 299: 413-417.
141. Mercado, C.R., Floran, B., and Hernández, R.J. (1998) Regulated release of serotonin from axonal growth cones isolated from fetal rat brain. *Neurochem. Int.* 103-106.
142. Manjarréz, G., Chagoya, G., and Hernández, R.J. (1988) Perinatal brain serotonin metabolism in rats malnourished in utero. *Biol. Neonate.* 54: 232-240.
143. Tejero, A., Aguilar, E., and Schiafini, O. (1985) Procesos de maduración sexual en Neuroendocrinología. Aspectos básicos y clínicos. Ed. O. Schiafini. Salvat. 279-295.
144. Jahn, G.A., Kalia, V., Hole, D., Wilson, C.A., and Deis, R.P. (1999) Receptors and neurotransmitters involved in the dual modulation of prolactin release by the serotonergic system in pregnant and lactating rats. *J. Reprod. Fertil.* 2:261-8.
145. Blundell, J.E. (1984) Serotonin and appetite. *Neuropharmacology*, 23: 1537-1551.
146. Mercado, C.R., and Hernández, R.J., (1992) Regulatory role of a neurotransmitter (5-HT) on glial Na^+/K^+ -ATPase in rat brain. *Neurochem. Int.* 21: 119-127.



147. Roth, B.L. (1994) Multiple serotonin receptors: clinical and experimental aspects. *Ann. Clin. Psychiatr.* 6:67–78.
148. Roth, B.L., Lopez, E., Patel, S., and Kroeze, W. (2000) Multiplicity of serotonin receptors: useless diverse molecules or an embarrassment of riches? *Neuroscientist*, 6:252–262.
149. Roth, B.L., Sheffler, D.J., and Potkin, S. (2003) Atypical antipsychotic drugs: unitary or multiple mechanisms for “atypicality”. *Clin. Neurosci. Res.* 3:108–117.
150. Peroutka, J.S. (1994) 5-Hydroxytryptamine receptors. In *Handbook of Receptros and Channels. G Protein-coupled receptors.* Ed. Stephen J. Peroutka.. CRC. Press. London. 8:335-336.
151. Jakeman, L., Bonhaus, D., Ramsey, Y., Wong, E., Chan, H., Bach, C., Eglen, R. and Tsou, A. (1993) Characterization and localization of mRNA for a novel serotonin (5-HT) receptor positively coupled to adenylyl cyclase in guinea pig brain. *Soc. Neurosci. Abstr.* 19: 1164-1168.
152. Gonzalez-Burgos, I., del Angel-Meza, A.R., Barajas-Lopez, G., and Feria-Velasco, A. (1996) Tryptophan restriction causes long-term plastic changes in corticofrontal pyramidal neurons. *Int. J. Dev. Neurosci.* 14:673-679.
153. Gonzalez-Burgos, I., Perez-Vega, M.I., Del Angel-Meza, A.R., and Feria-Velasco, A. (1998) Effect of tryptophan restriction on short-term memory. *Physiol. Behav.* 63:165-169.
154. del Angel-Meza, A.R., Gonzalez-Burgos, I., Olvera-Cortes, E., and Feria-Velasco, A. (1996) Chronic tryptophan restriction disrupts grooming chain completion in the rat. *Physiol. Behav.* 59:1099-1102.
155. del Angel, A.R., Quirarte, G., and Feria-Velasco, A., (1990) Effects of protein restriction using diets based on corn or corn and beans on body and head growth in rats. *Arch. Invest. Med. (Mex).* 21:325-330.
156. Díaz M., Chagoya G., and Hernández R.J. (1993). Modificación por desnutrición ontogénica de la neurotransmisión serotoninérgica cerebral y de una conducta relacionada. *Bol. Med. Hosp. Infant. Mex.* 50:17-26.
157. Miller, M., Leahy, J.P., McConville, F., Morgane, P.J., and ResnicK, O. (1977) Effects of developmental protein malnutrition on tryptophan utilization in brain and peripheral tissues. *Brain. Res. Bull.* 2:347-353.
158. Curzon, G., Friedel, J., and Knott, P.J. (1973) The effect of fatty acids on the binding of tryptophan-to-plasma protein. *Nature.* 242:198-200.



159. Garber, Z.M. (1993) Las características de interacción y de unión del triptofano con la albúmina plasmática en ratas normales y con desnutrición ontogénica. Tesis de licenciatura en nutrición y ciencias en los alimentos. Mexico City:Universidad Iberoamericana. 65-81.
160. Hernández, R.J., Manjarrez, G.G., and Chagoya, G.G. (1989) Newborn humans and rats malnourished in utero: Free plasma L-tryptophan, neutral amino acids and brain serotonin synthesis. *Brain. Res.* 488:1-13.
161. Neckers, L.M., Biggio, G., Moja, E., and Meek, J. (1977) Modulation of brain tryptophan hydroxylase activity by brain tryptophan content. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 201:110-116.
162. Zill, P., Buttner, A., Eisenmenger, W., Bondy, B., and Ackenheil, M. (2003) Regional mRNA expression of a second tryptophan hydroxylase isoform in postmortem tissue samples of two human brains. *Sciencedirect*, 14:282-284.
163. Xie, T., Tong, Liquiong., McLane M.W., Hatzidimitriou G., Yuan, J., McCann, Una., and Ricaurte, G. (2006) Loss of Serotonin Transporter Protein after MDMA and other Ring-Substituted Amphetamines. *Neuropsychopharmacology*. 21: 1-13.