



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Medicina
Maestría en Ciencias Médicas

**CINÉTICA DE UNIÓN DEL L-TRIPTÓFANO A LA ALBÚMINA EN EL
PLASMA DE HUMANOS DESNUTRIDOS IN-ÚTERO Y RECUPERADOS
NUTRICIONALMENTE**

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de
Maestra en Ciencias Médicas

Presenta:

Médico Pediatra Carmen Laura Meneses Hernández

Dirigido por:

Dr. Gabriel Manjarrez Gutiérrez

SINODALES

Dr. Gabriel Manjarrez Gutiérrez

Presidente

Dr. Hebert Luis Hernández Montiel

Secretario

Dr. Adrián Hernández Lomelí

Vocal

M. en C. Minerva Escartín Chávez

Suplente

M. en C. Genaro Vega Malagón

Suplente

Med. Esp. Benjamín R. Moreno Pérez

Director

Dr. Luis G. Hernández Sandoval

Director de Investigación y
Posgrado

Centro Universitario
Querétaro, Qro.
Diciembre, 2007.
México

RESUMEN

La desnutrición *in-útero* (DIU), también conocida como restricción de crecimiento intrauterino (RCIU) produce un rango amplio de cambios no específicos en el cerebro en desarrollo y del adulto; sin embargo, el efecto en el metabolismo serotoninérgico cerebral parece ser más específico. Objetivo. Demostrar que la DIU produce un cambio en la cinética de unión del L-triptófano (L-Trp) a la albúmina y que retorna a lo normal en los niños con DIU nutricionalmente recuperados (NR). Material y Métodos. Se efectuó un estudio de caso-cohorte durante 3 meses en neonatos de término con DIU, DIU nutricionalmente recuperados y controles. A todos los niños se les tomó 2 ml de sangre, para determinar albúmina, ácidos grasos libres (AGL), L-Trp libre y unido y cinética de unión del L-Trp a la albúmina. La B_{max} y K_d fueron determinadas por medio de experimentos de saturación, las curvas de saturación fueron linearizadas por medio de la gráfica de Scatchard mediante un programa de computación Graph Pad Prism 3 y la comparación de los valores se efectuó mediante ANOVA y U de Mann-Whitney, aceptando un nivel de significación de $p < 0.05$. Resultados. Los niños con DIU mostraron una elevación de la fracción libre y una disminución de la unida a albúmina del L-Trp. La concentración de albúmina fue menor en estos pacientes. Interesantemente la B_{max} y K_D del L-Trp a la albúmina fueron significativamente menores en este grupo. Es importante hacer notar que los niños con DIU nutricionalmente recuperados mostraron una recuperación física y un retorno a lo normal del L-Trp en el plasma, sin embargo, la B_{max} y K_D persistieron significativamente disminuidas. Conclusiones. Los resultados presentes confirman que la lactancia materna en los niños con DIU, es el principal factor que participa en la recuperación nutricia. Además, produce un retorno a lo normal del L-Trp en el plasma, pero a pesar de este hecho, los cambios cinéticos de la unión del L-Trp a la albúmina observados en estos niños desnutridos y recuperados nutricionalmente no retornan a lo normal. Estos hallazgos son interesantes y nos permiten plantear que probablemente el mecanismo sea debido a un cambio conformacional de la albúmina, inducido durante el desarrollo y que persiste durante la vida posnatal.

(**Palabras clave:** desnutrición *in-útero*, L-triptófano, albúmina, cinética de unión, recuperación nutricia)

SUMMARY

Introduction. Intrauterine undernourishment (IUU) or intrauterine growth restriction (IUGR) produces a broad range of non-specific changes in the developing and adult brain. However, as we and others have shown, its effect on serotonergic metabolism in the brain appears to be more specific. The objective of present study was obtain information on the kinetics of L-Tryptophan to plasma albumin from normal, intrauterine growth restriction (IUGR) and nutritionally recovered (NR) newborn infants. Study design. A case study cohort was planned in 37 during the first three months of life. At birth two groups were formed. The first group included 20 newborns with IUGR. The control group © integrated by 17 newborns. At 30 days of age, nine infants of the IUGR group showed a return to normal of the anthropometric parameters, these infants formed the NR group. Free, bound and total L-tryptophan were measured. To assess binding kinetics albumin was freed of fatty acids and tested in mole to mole samples from IUGR, NR and control babies. Results. Plasma free L-tryptophan was increased, K_D elevated and B_{max} decreases in IUGR patients up to postnatal day 90. These changes remained even after nutritional recovery. Conclusions. Abnormal kinetics of L-tryptophan binding to albumin explains the increased availability of this precursor amino acid to be transported to the brain. This is in line with previous results in IUGR rats and newborn babies indicating an enhanced serotonergic synthesis and activity in their brains, causing altered sensory cortex responses.

(key word: Intrauterine undernourishment , L-tryptophan, albumin, binding kinetics, nutritionally recovered).

DEDICATORIAS

A mis padres por creer en mí, por su amor incondicional y siempre estar ahí, SIEMPRE.

A mi esposo Rafael y a mis hijos Gabriel y Sergio, por su amor, su apoyo, su comprensión y por todo ese tiempo que les pertenecía y que sirvió para realizar este sueño.

A Arturo, Luly, Pepe, Javi, Ana, Gaby, Claudia, Fernando, Vero y Dora, por sus oraciones y porras, gracias familia.

A Nico, Lety, Susy, Alejandro, Aide y Mary Carmen queridos compañeros y amigos, no hubiera sido posible sin ustedes.

Al grandioso equipo de Educación e Investigación: Luzma, Alejo, Mary Chuy, Jorge, Mally, Rosario, Enrique y Juan Manuel

A mi querido Hospital HGZ no. 3, mi casa.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Gabriel Manjarrez Gutiérrez, a quien debo reconocer no solo una infinita paciencia para mis errores, sino un entusiasmo y una fe determinante en la realización de este proyecto, transmitiendo además de su tutoría, un apoyo incondicional como ser humano. Mil gracias.

Al Dr. Jorge Hernández Rodríguez, por su cooperación e interés en mi formación y el desarrollo de este proyecto.

Al Dr. Alberto F. Mejía D., Dr. Nicolás Camacho Calderón, Dra. Martha Leticia Martínez, Dr. Jorge Osegura R., Dr. Jaime Ortiz Vega, quienes me apoyaron en forma incondicional con el gran interés de mi crecimiento personal y de fomentar la participación del IMSS, principalmente la Delegación Querétaro, en el área de la Investigación. Intrauterine undernourishment (IUU) or intrauterine growth restriction (IUGR)

A todo el personal de Laboratorio Químico, principalmente al Dr. Mario Díaz Morales, Maruri e Isaac R. por su amistad y consejos al reencontrarme con un laboratorio, a Rosalía Castillo, asistente Médica del turno matutino y al personal de enfermería de todos los turnos, por su ayuda inigualable en la realización de este estudio.

A mis profesores por su paciencia, sus enseñanzas y su inmenso apoyo.

A Ivett y Rocío, les agradezco su amistad y sus enseñanzas, no importó la distancia y el tiempo.

ÍNDICE

	Página
Resumen	i
Summary	ii
Dedicatorias	iii
Agradecimientos	iv
Índice	v
Índice de cuadros	vii
Índice de figuras	viii
I. INTRODUCCIÓN	1
II. REVISIÓN DE LA LITERATURA	3
III. METODOLOGÍA	12
III.1 PLANTEAMIENTO DE PROBLEMA	12
III.2 OBJETIVO GENERAL	12
III.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	12
III.4 HIPÓTESIS	13
III.5 PROGRAMA DE TRABAJO	13
III.5.1 PACIENTES Y MÉTODOS	13
III.6 ENSAYOS BIOQUÍMICOS	15

III.6.1 DETERMINACIÓN DE L-TRIPTÓFANO TOTAL Y LIBRE	15
III.6.2 DETERMINACIÓN DE ALBÚMINA PLASMÁTICA	16
III.6.3 CUANTIFICACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS LIBRES	16
III.6.4 PURIFICACIÓN DE ALBÚMINA DE ÁCIDOS GRASOS	17
III.6.5 CURVAS DE CINÉTICA DE UNIÓN DE L-TRIPTÓFANO A LA ALBÚMINA MEDIANTE DIÁLISIS DE EQUILIBRIO	18
III.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	19
IV. RESULTADOS	20
V. DISCUSIÓN	33
BIBLIOGRAFÍA	43
ANEXOS	54

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro	Página
1. Datos Somatométricos	22
2. Datos Somatométricos	23
3. Concentración de Albúmina Plasmática	25
4. Concentración de Ácidos Grasos Libres	26
5. Concentración de L-Triptófano Plasmático	28
6. Constantes de Unión del L-triptófano a la albúmina en niños controles (C), desnutridos <i>in-útero</i> (DIU) y recuperados nutricionalmente (RN)	33

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Página
1. Concentración de L-Triptófano plasmático	29
2. Curvas de cinética y gráficas de Scatchard (inserto) del L-Triptófano unido a albúmina en niños.	31

I. INTRODUCCIÓN

La desnutrición in-útero (DIU), produce un amplio rango de cambios inespecíficos en el cerebro en desarrollo y del adulto (Enesco y Leblond, 1962; Srebnik, 1964; Winick y Noble, 1965; Chase y Mckhann, 1967; Winick, 1970; Loh et al., 1971; Gambetti et al., 1972; Sarma y Roa, 1974; Shrader et al., 1977). Sin embargo, se ha demostrado que sus efectos en el metabolismo de la serotonina en el cerebro parece ser mas específico (Hernández, 1973; 1979 a,b; Manjarrez et al., 1988 a,b; Hernández et al., 1989). Un aminoácido esencial, L-triptófano (L-Trp), un constituyente proteínico de la dieta normal es el precursor nutriente de la síntesis de serotonina cerebral (5 hidroxitriptamina, 5-HT). En condiciones fisiológicas, el L-Trp es el único aminoácido unido no covalente a la albúmina sérica y alrededor del 10% permanece en su forma libre. Solamente el L-isómero del L-Trp se une a la albúmina y el resultado del equilibrio entre la fracción unida y la libre (FL) es rápido (Gessa y Tagliamonte, 1974). Diversos factores que influyen la unión del L-Trp a la albúmina han recibido mucha atención recientemente, ya que aparte del papel que tiene el aminoácido en la síntesis de proteína, se sabe que la disponibilidad de la FL en el plasma, es un factor importante en la toma unidireccional del L-Trp hacia el cerebro para la síntesis de 5-HT (Hernández e Illnerova, 1970; Boadle-Biber, 1993). Por lo tanto, la unión del L-Trp a la albúmina plasmática se ha visto como un mecanismo relevante que indirectamente regula la síntesis de serotonina cerebral.

Resultados reportados recientemente muestran en ratas con DIU, una aceleración en la síntesis de la 5-HT cerebral, que inicia en el período fetal y coincide con una elevación de la concentración de la FL del L-Trp en el plasma, en el cerebro y de la actividad de la triptófano hidroxilasa 2, que se ha visto asociada a una activación del sistema neuronal serotoninérgico. Niños con DIU, también muestran una elevación de la FL en el plasma, que sugiere un incremento en el transporte de este aminoácido hacia el cerebro, con un posible aumento de la síntesis de serotonina y de su actividad en estos niños desnutridos.

(Hernández, 1973, 1979 a,b; Manjarrez et al., 1988 a,b, 1997,1998; Hernández et al., 1989).

En estudios preliminares en ratas con DIU se ha observado una menor capacidad de unión de la albúmina plasmática por el [³H]L-Trp, cuando se compara mol a mol con albúmina de controles, sugiriendo que la cinética de unión del L-Trp a la albúmina puede estar significativamente modificada. Con esta información, se propone la hipótesis de que niños con DIU pueden tener diferentes cinéticas de unión del L-Trp a la albúmina, que podrían ser responsables del aumento de la disponibilidad del L-Trp para ser transportado al cerebro y estimular la síntesis de 5-HT cerebral.

II. REVISION DE LITERATURA

La DIU, también conocida como restricción en el crecimiento intrauterino (RCIU), es un problema de salud pública mundial que impacta en gran medida sobre la mortalidad neonatal e infantil en menores de un año. Cerca del 90% de nacimientos con DIU ocurren en países en vías de desarrollo con una prevalencia global de 19% (Velázquez et al., 2004). En México, se presenta aproximadamente en el 10% de los embarazos y en países desarrollados se ha considerado por debajo de 6%. Junto con la prematuridad, la RCIU es el factor predictivo más fuertemente asociado a mortalidad, por lo que ha quedado demostrada una relación inversamente proporcional entre el peso al nacimiento y la mortalidad neonatal. (Savitz et al., 2000). En México hubo 26,000 recién nacidos vivos durante 1999 y la tasa de mortalidad perinatal fue de 10 a 14/1000 en embarazos pretérminos y de 8/1000 en los de término. Además, la relevancia del problema es mayor aún si se considera que en aquellos pacientes que sobrevivan a un cuadro clínico de RCIU, presentan secuelas en el desarrollo psicomotor, siendo los más documentados los problemas de aprendizaje y comportamiento, con importantes consecuencias humanas, sociales y económicas. (Deodhar y Jarad, 1999; Jyh et al., 2002; Larroque et al., 2001).

Se sabe que para el desarrollo y crecimiento fetal normal del organismo se requiere de la interacción de factores feto-maternos, tales como la integridad de las membranas feto-placentarias, la transferencia de nutrientes, la excreción de catabolitos a través de la placenta, además de los mecanismos de difusión y área placentaria de intercambio e interacción inmunológica y sanguínea del feto y la madre, que permiten una adecuada multiplicación y crecimiento celular (Enesco y Leblond, 1962; Kaplan y Grumbach, 1965; Winick y Noble, 1965; Widdowson, 1970; Winick, 1970; Dunsted, 1973; Cook, 1977).

También el papel de las hormonas en la regulación del crecimiento fetal y el desarrollo de los tejidos, han sido identificados a través de diferentes modelos experimentales como son: la extracción de las glándulas endocrinas fetales, la administración de hormonas al feto y a la madre, alteraciones de genes en

animales de experimentación y knockout. Estos estudios han demostrado que las hormonas afectan el crecimiento y la diferenciación de los tejidos *in-útero* y que su deficiencia específica está asociada a un tipo particular de RCIU. También muestran que actúan sobre el crecimiento fetal vía genes o indirectamente a través de cambios en el crecimiento placentario, en el metabolismo fetal y/o la producción de factores de crecimiento y otras hormonas producidas por los tejidos feto-placentarios (Kapoor et al., 2006, Murphy et al., 2006)

Las hormonas fetales presentes en la circulación sanguínea tienen cuatro orígenes. El primero, son aquellas que son secretadas por las glándulas endocrinas del feto, el páncreas, la tiroides, la pituitaria y las glándulas adrenales que son funcionalmente activas en la etapa temprana de la gestación y su respuesta a estímulos es progresivamente mayor al final de la gestación. (Fowden y Hill, 2001). El segundo son las hormonas que derivan de los tejidos útero placentarios. Estos tejidos producen esteroides, péptidos, glicoproteínas y eicosanoides, que son liberados a la circulación sanguínea umbilical y uterina (Challis et al., 2001). El tercer grupo lo representan las hormonas lipofílicas, como los esteroides y las hormonas tiroideas que pueden ser derivadas de la madre por difusión transplacentaria (Sibley et al., 1998). Finalmente, el cuarto grupo son hormonas fetales que pueden ser moléculas precursoras circulantes derivadas de los tejidos fetales o placentarios (Houdik et al., 2000).

Las concentraciones de las hormonas que circulan en la sangre fetal cambian en respuesta a estímulos nutricionales y del ambiente. En otros términos, hay un aumento o disminución en las concentraciones de hormonas específicas, que pueden actuar como señales biológicas para la maduración del feto (Fowden et al., 1995). Los cambios del desarrollo endocrino ocurren independientemente del estado nutricional del feto e inducen cambios permanentes en la morfología y función de los tejidos, para prepararlos para la vida extrauterina. También, ocurren cambios en las concentraciones hormonales en respuesta a variaciones del estado nutricional, especialmente al final de la gestación, cuando todas las glándulas endocrinas fetales son funcionales.

En general, los cambios nutricionales que disminuyen la disposición de nutrimentos fetales, disminuyen las hormonas anabólicas (ej. Insulina, factor de crecimiento de insulina (IGF)-1, tiroxina (T4)) e incrementa las concentraciones de hormonas catabólicas. (ej. Cortisol, catecolaminas, hormona de crecimiento (GH)), o lo contrario ocurre cuando se aumentan los nutrimentos en el feto, se incrementan los niveles de hormonas anabólicas y disminuyen las hormonas catabólicas en la circulación fetal (Fowden y Forhead, 1998). Estos cambios endocrinos dependen de la magnitud, duración y naturaleza del estímulo y de las alteraciones del patrón de desarrollo fetal. Por lo tanto, las hormonas clave involucradas en estos procesos regulatorios son la insulina, las hormonas tiroideas, el IGFs y los glucocorticoides (Cianfarani et al., 2006).

También la oxigenación y el metabolismo del feto han sido investigados por cordocentesis, se ha observado que la paO_2 y el pH tanto en la arteria como en la vena umbilical disminuyen con la edad gestacional, mientras la pCO_2 se incrementa y no cambia la concentración de lactato en dichos vasos sanguíneos (Thaler et al., 1990). Por otro lado, la concentración de glucosa promedio en la vena umbilical es mayor que en la arteria, sugiriendo que la concentración de glucosa materna es mayor que la del feto y los niveles de los dos compartimentos están significativamente correlacionados (Lin y Santolaya-Forgas, 1998). La concentración de insulina en el plasma aumenta exponencialmente con la gestación, reflejando la maduración progresiva del páncreas fetal. El cortisol fetal no cambia, pero la ACTH aumenta con la gestación. Además se ha observado que la concentración de los triglicéridos en el plasma fetal disminuye exponencialmente con la gestación y esto es debido a un aumento en su utilización por el feto para los depósitos en el tejido adiposo. Asimismo, hay una alta correlación entre los niveles fetales y maternos de aminoácidos plasmáticos, siendo la concentración mayor en el feto que en la madre (Economides et al., 1991).

En 1961, se describieron los valores normales de peso, longitud corporal y circunferencia cefálica que sirvieron para definir la desnutrición *in-útero*

(Warkany y Monroe, 1961). El RCIU puede clasificarse como simétrico (tipo I) o asimétrico (tipo II). En el tipo I, todo el cuerpo es proporcionalmente pequeño (Peleg et al., 1998). Ocurre en el 25 % de los casos con RCIU y resulta de una alteración en el crecimiento al inicio de la gestación, durante el periodo de la hiperplasia celular, y puede ser resultado de anomalías genéticas, malnutrición severa o madre fumadora (Gluckman y Hanson, 2004). En 1963, se observó niños con retraso en el crecimiento con perímetro cefálicos normal y peso bajo, este tipo de restricción es definida como asimétrica y ocurre durante el periodo de hipertrofia celular, resulta de una *insuficiencia útero-placentaria* secundaria a otras complicaciones maternas (Gruenwald, 1963). Por esta y otras observaciones se creó el concepto de que el peso al nacer no solo depende de la duración del embarazo, sino también interviene la tasa de crecimiento fetal (Gluckman y Liggins, 1984; Dickey y Gasser, 1993). Lubchenco, et al. (1963), en un intento de obtener normas para estimar el tamaño del feto, fueron los primeros en reportar las primeras comparaciones entre la edad gestacional y el peso corporal al nacer. Así que, el crecimiento fetal en relación a la edad gestacional, permite identificar a los niños con desnutrición *in-útero* (DIU) o RCIU, cuyo peso corporal se ubica por debajo del percentil 10 para su edad gestacional, o dos desviaciones estándar debajo de la media, y a través de otros métodos somatométricos como la relación que tiene el peso corporal con la talla y el índice ponderal (IP) de Rohrer ($\text{peso (g)} \times 100 / \text{talla}^3 \text{ (cm)}$) (Tenovuo et al, 1987; Vázquez y Romero, 2001).

Se conoce que, cuando no se alcanza la interacción feto-materna de los diferentes factores señalados anteriormente se origina DIU o RCIU, cuyo grado de severidad está en relación al inicio de la enfermedad durante la vida intrauterina. Si comienza en la etapa temprana de la gestación, el trastorno es la falta de división celular, si se presenta en la última etapa del desarrollo fetal, el crecimiento celular es el afectado (Enesco y Leblond, 1962; Winick y Noble, 1965; Winick, 1970).

Diversos estudios en animales en los que se ha producido experimentalmente DIU, se ha observado un bajo contenido de ácido desoxirribonucleico (DNA) y del ácido ribonucleico (RNA) en el cerebro, hígado y riñón; disminución de la síntesis de mielina y sinapsis cerebrales (Enesco y Leblond, 1962; Winick y Noble, 1965; Chase y Mckhann, 1967; Guthrie, y Brown, 1968; Winick et al, 1970; Chase et al., 1972; Cragg, 1972; Gambetti et al., 1972; Sarma y Roa, 1974; Vasan y Chase, 1976; Bourre et al., 1981) reducción del peso y alteraciones en la estructura, composición y función intestinal (Loh et al., 1971; Shrader et al., 1977), también se ha observado una disminución de las gónadas y de los órganos accesorios de la reproducción (Srebnik,1964). Además, se ha demostrado que la restricción severa de nutrimentos en los períodos vulnerables del desarrollo del sistema nervioso central (SNC), que para la especie humana van desde la etapa temprana de la gestación hasta el segundo año de vida posnatal, produce un daño irreversible en su estructura y composición bioquímica (Chase y Mckhann, 1967; Guthrie, y Brown, 1968; Winick et al, 1970; Chase et al., 1972; Cragg, 1972; Gambetti et al., 1972; Sarma y Roa, 1974; Vasan y Chase, 1976; Bourre et al., 1981). Sin embargo, es difícil establecer relaciones precisas entre la morfología y la función, más aún en períodos en que el SNC posee gran plasticidad y está sujeto a la influencia de una gran cantidad de variables ambientales estimulantes. Por esta razón, la hipótesis planteada hace algún tiempo acerca de la irreversibilidad del daño producido por la desnutrición debe ser reevaluada.

Por tanto, la DIU es un trastorno de origen multifactorial que hace difícil su relación con alteraciones funcionales sobre todo en el SNC. La búsqueda de estos cambios es el punto de partida para la mejor comprensión de sus efectos sobre la función neuronal. Estos cambios en un sistema neuronal específico pueden ser las bases de trastornos posteriores de la conducta en individuos con antecedentes de desnutrición severa.

Una de estas alteraciones específicas que la DIU produce en el SNC, es el que se ha demostrado para el sistema serotoninérgico en la rata y en el

humano. (Hernández, 1973; 1979 a,b; Manjarrez et al., 1988 a,b; Hernández et al., 1989). Este sistema se localiza en el tallo cerebral, está formado por dos conjuntos de neuronas que han sido divididas de acuerdo a su origen embrionario, el superior proviene del mesencéfalo y el inferior procede del mielencéfalo (Takeuchi et al., 1983; Jacobs y Azmitia, 1992). El sistema serotoninérgico en la rata y en los humanos, consiste en grupos de neuronas, que antiguamente se enumeraron como B1 a B9. Estos complejos de neuronas, nacen entre el día 10.5 y 12 de desarrollo fetal en la rata y en la 5ª semana de gestación en los humanos, provienen del dominio neuroepitelial ventral del cerebro medio. Nacen y se localizan exclusivamente en el romboencéfalo ventral. (Pattyn et al., 2004). Sus prolongaciones axónicas inervan importantes áreas del SNC como son: la médula espinal en el cuerno ventral y la columna lateral simpática, el cerebelo, el área preóptica, la corteza cerebral, el sistema extrapiramidal, el hipocampo y las células endimarias de los ventrículos. Se ha reportado que estas neuronas se diferencian tempranamente e inician su función durante el período fetal como lo demuestran los hallazgos de Olson y Seiger, 1972; Olson et al., 1973, Takeuchi et al., 1983; Takahashi et al., 1986, quienes describieron su existencia y distribución mediante técnicas de inmunocitoquímica con anticuerpos antiserotonina en fetos de ratas (Olson y Seiger, 1972) y humanos desde la quinta semana de edad gestacional (Olson et al., 1973, Takahashi et al., 1986). Este grupo de neuronas se regula a través de un neurotransmisor específico, la 5-hidroxitriptamina (serotonina, 5-HT).

La 5-HT cerebral reúne varios aspectos que le dan gran relevancia, participa en los procesos de diferenciación como: axogénesis y sinaptogénesis (Haydon et al., 1984; Mercado y Hernández, 1992), diferenciación de neuronas blanco (Lauder et al, 1982), control del número final de receptores específicos a 5-HT (Fillion et al. 1982) y modula su propia síntesis (Gromová et al., 1983). Además, participa en la regulación de los ciclos de sueño y vigilia (Jouvet, 1969), del control de la temperatura (Myers, 1981), de los impulsos nociceptivos (Randic y Yu, 1976), de la conducta alimentaria (Shor-Posner et al, 1986), sexual (Gorzalka y Mendelson 1990), afectiva y emocional (Barchas et al., 1978; Van

Praag y De Haan, 1979). Regula también, la liberación de hormonas hipofisarias (Van de Kar y Lorens 1979) y se ha relacionado a diferentes tipos de comportamiento operante (Oscós y Hernández, 1982). A nivel celular, está involucrada en la regulación de la Na^+ , K^+ -ATPasa (Hernández, 1979, 1980, 1987; Hernández y Chagoya, 1986).

Existe evidencia experimental que apoya la relación entre las variaciones de la nutrición, el L-triptofano (L-Trp) y la síntesis de 5-HT cerebral. Experimentos en ratas que han sido sometidas a períodos de ayuno o bajo regímenes de nutrición hipoproteínica-hipoenergética prolongada durante la vida fetal, mostraron una elevación del L-Trp plasmático y en el cerebro se elevó dicho aminoácido y la 5-HT (Pérez-Cruet et al., 1972; Bourgoïn et al., 1974; Stern et al., 1974; Miller et al., 1977; Chagoya y Hernández, 1983; Spear y Scalzo, 1985). Por otro lado, en animales normales a los que se les administró L-Trp a dosis de 50 a 150 mg/kg de peso corporal por vía intraperitoneal, también se observó una elevación del L-Trp plasmático, del L-Trp tisular y de la 5-HT cerebral (Hernández, 1979). Además, cuando a ratas gestantes se les dio un suplemento de L-Trp a razón de 50 mg/kg de peso corporal, aumentó la actividad de la triptófano-5-hidroxilasa (L-triptófano-5-monooxigenasa, EC 1.14.16.4, TrpOH) en el cerebro fetal, así como en la etapa posnatal, lo mismo ocurrió con la concentración del neurotransmisor y del ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA) (Hernández, 1976; Hernández y Chagoya, 1986). Todos estos hallazgos en conjuntos sugieren una activación de esta vía metabólica cerebral similar a lo observado en el animal con DIU. En estos animales desnutridos se ha demostrado que la síntesis de serotonina cerebral se encuentra elevada y que depende de un aumento de su precursor metabólico, el L-Trp plasmático (Hernández, 1973, 1979; Tagliamonte et al., 1973; Stern et al., 1974; Miller et al., 1977; Poitou y Boulu, 1977; Manjarrez et al., 1988 a,b; Hernández et al., 1989; Gutiérrez –Ospina et al., 2002.)

El L-Trp fue el primer aminoácido reconocido como esencial para el organismo, su requerimiento es alrededor de 12 a 40 mg/kg de peso corporal por día en los infantes (Peters, 1991). Se obtiene de las proteínas de la dieta, viaja en

el plasma en dos fracciones, el 90% se une a la albúmina y el 10% restante se encuentra en forma libre (FL) (Gessa y Tagliamonte, 1974). La FL participa en varias vías metabólicas, como la del ácido nicotínico, del ácido cinurénico, de la acetil coenzima A y en la síntesis de proteínas (Miller et al., 1977), además tiene la función especial de servir de precursor de la síntesis de 5-HT (Jequier et al., 1969; Curzon y Knott, 1970; Sourkes 1977; Yuwiler et al., 1977). La relación que guardan estas dos fracciones en el plasma, es la que determina que la FL pase en mayor o menor concentración la barrera hematoencefálica (BHE) y sea captado por el tejido nervioso para la síntesis del neurotransmisor (Hernández e Illnerova, 1970; Boadle-Biber, 1993). Una vez que el aminoácido se encuentra en el SNC, de inmediato es captado por las neuronas serotoninérgicas, en donde es hidroxilado en su posición 5 por la TrpOH (Manjarrez et al., 1994; 1996). La TrpOH es la enzima limitante de la biosíntesis de 5-HT, requiere de la participación de un cofactor que es la tetrahidrobiopterina (BH₄) que dona electrones para la hidroxilación del aminoácido. El 5-hidroxitriptófano formado es descarboxilado por la descarboxilasa de los aminoácidos aromáticos para producir serotonina (Manjarrez et al., 1993).

Se ha demostrado que este neurotransmisor se encuentra elevado en el cerebro de ratas con desnutrición adquirida durante la vida intrauterina, en la lactancia y en la edad adulta (Curzon et al., 1973; Hernández, 1973, 1979; Manjarrez et al., 1988 a,b, 1997,1998; Hernández et al., 1989). Esta elevación es ocasionada por un aumento en la FL del L-Trp plasmático. Así mismo, este cambio parece también cumplirse en los humanos recién nacidos desnutridos *in-útero*, pretérmino, de término y en la lactancia temprana, los que tienen una elevación de la FL y una disminución de la fracción unida a albúmina del aminoácido (Hernández et al., 1989, Manjarrez et al., 1998, Hernández y Manjarrez, 2001, Manjarrez et al., 2005), lo que sugiere un mayor paso del aminoácido al cerebro y una activación de las neuronas serotoninérgicas, similar a lo observado en el cerebro de la rata desnutrida (Curzon et al., 1973; Hernández, 1973, 1979 a,b; Manjarrez et al., 1988 a,b, 1997,1998; Hernández et al., 1989).

Existen otros factores metabólicos en las ratas desnutridas y en los humanos que favorecen la elevación de la FL del L-Trp en el plasma, tal es el caso de la lipólisis que ocasiona un aumento de los ácidos grasos libres (AGL) que compiten con el aminoácido por su unión con la albúmina (Gessa y Tagliamonte, 1974; Kramer et al., 1990). En experimentos preliminares se ha observado una menor capacidad de unión del L-Trp a la albúmina en estos desnutridos (Garber, 1993). El resultado final de este cambio es un aumento en la concentración de la FL y una disminución de la fracción unida del aminoácido a la albúmina y consecuentemente mayor disponibilidad del mismo para su paso al cerebro con activación de la biosíntesis del neurotransmisor. Un efecto similar lo podría tener la disminución de albúmina plasmática, aunque para afirmarlo es necesario conocer la cinética de unión del L-Trp a la albúmina en condiciones equimolares con albúmina libre de ácidos grasos. Ya que la variación en la concentración de albúmina con la edad, no explican totalmente el aumento de la FL del L-Trp, lo que esta en línea con la probable participación de otro mecanismo biológico que regula la disponibilidad de aminoácido para la síntesis del neurotransmisor.

III. METODOLOGÍA

III.1 PLANTEAMIENTO DE PROBLEMA

¿La desnutrición *in-útero* en humanos produce un cambio de la cinética de unión del L-Trp a la albúmina?

¿La recuperación nutricia temprana en el período neonatal inmediato en humanos, produce un retorno a lo normal de la cinética de unión del L-Trp a la albúmina?

III.2 OBJETIVO GENERAL

Demostrar que la desnutrición *in-útero* produce un cambio de la cinética de unión del L-Trp a la albúmina y que retorna a lo normal en los humanos nutricionalmente recuperados.

III.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

III.3.1 Medir la concentración del L-Trp libre y total en humanos controles, desnutridos *in-útero* y recuperados nutricionalmente.

III.3.2 Determinar la concentración de albúmina plasmática en humanos controles, desnutridos *in-útero* y recuperados nutricionalmente.

III.3.3 Cuantificar la concentración de ácidos grasos libres en humanos controles, desnutridos *in-útero* y recuperados nutricionalmente.

III.3.4 Determinar la cinética de unión de L-Trp a la albúmina mediante diálisis de equilibrio en humanos controles, desnutridos *in-útero* y recuperados nutricionalmente.

III.4 HIPÓTESIS

III.4.1 La desnutrición *in-útero* en humanos produce un cambio en la cinética de unión del L-Trp a la albúmina.

III.4.2 La recuperación nutricia temprana en el período neonatal inmediato en humanos, produce un retorno a lo normal de la cinética de unión del L-Trp a la albúmina.

III.5 PROGRAMA DE TRABAJO

El presente trabajo se realizó en el laboratorio de Patología Molecular de la Unidad de Investigación Biomolecular, del Hospital de Cardiología del Centro Médico Nacional, Siglo XXI y el Hospital General de Zona No 3 de San Juan del Río, Qro., del Instituto Mexicano del Seguro Social.

III.5.1 PACIENTES Y MÉTODOS

El presente estudio fue aprobado por el Comité de Investigación del Hospital de Cardiología del CMN, del IMSS. Todos los padres de los pacientes firmaron una carta de consentimiento después de informarles detalladamente el objetivo y los procedimientos que se les efectuarían a los pacientes. Se realizó un estudio híbrido de caso-cohorte en 37 recién nacidos seleccionados en el Servicio de Alojamiento Conjunto del Hospital General de Zona No. 3 de San Juan del Río, Qro., del IMSS. México, durante los primeros 3 meses de edad. Al nacimiento se

formaron dos grupos. En el primer grupo se incluyeron 20 recién nacidos de ambos sexos con DIU, con un peso corporal por abajo del percentil 10 de las curvas de crecimiento intrauterino, una relación del crecimiento fetal debajo de 0.90, índice ponderal de 2.10 ± 0.29 y un índice de masa corporal de 9.90 ± 1.10 . El grupo control fue integrado por 17 recién nacidos con peso corporal entre los percentiles 10 y 90 de las mismas curvas, relación del crecimiento fetal arriba de 0.90, índice ponderal de 2.38 ± 0.26 y una masa corporal de 12.5 ± 1.13 . A los 30 días de edad, nueve niños con DIU mostraron un retorno a lo normal de los parámetros somatométricos, estos niños formaron el grupo recuperado nutricionalmente (RN). Ningún signo clínico de otras patologías fue observado en cualquiera de los grupos desde el nacimiento al final del período estudiado.

Fueron excluidos del estudio aquellos recién nacidos que presentaron malformaciones congénitas, infección intrauterina, asfixia perinatal, hemorragia peri e intraventricular, alteraciones hidroelectrolíticas y metabólicas. También los recién nacidos de madres que presentaron otro tipo de patología durante el embarazo como son: colagenopatías, cardiopatías, enfermedades renales, hematológicas, neurológicas y psiquiátricas. Se eliminaron a los pacientes que presentaron cualquier patología infecciosa ó alteraciones en el equilibrio hidroelectrolítico y trastornos metabólicos y los que se alimentaron con lactancia mixta (leche materna más fórmula láctea ó bien otro alimento no lácteo).

Los pacientes de ambos grupos fueron alimentados exclusivamente con leche materna a libre demanda, alimento idóneo para el recién nacido, la cantidad de proteínas que contiene es mayor durante las primeras semanas, y va decreciendo desde 15.8 hasta 8-9 g/L, contiene 36 g/L de grasas totales y 72 g/L de carbohidratos, proporciona 65 kcal/dL, (Haisma et al., 2003; Díaz y Ramírez, 2006). Los pacientes se citaron a la consulta externa del servicio de Pediatría del Hospital General de Zona No 3 de San Juan del Río, Qro., del IMSS, en donde se les tomaron dos mililitros de sangre por punción de vena periférica, a los días 1, 30 y 90 de edad. La muestra de sangre se colocó en un tubo de borosilicato con 300 μ L de una solución anticoagulante ACD (citrato de sodio 3.6 mg, ácido cítrico

9.9 mg y dextrosa 11 mg, amortiguados con solución tris acetato de sodio 50 mM, pH 7.4 para evitar los cambios del pH plasmático. Inmediatamente después de su obtención, los tubos con las muestras de sangre fueron colocados a temperatura ambiente y se protegieron de la luz, se les tapó con parafina laminada (parafilm) y con una jeringa se le extrajo el aire con el propósito de disminuir la cantidad de CO₂. Una hora después los tubos con las muestras de sangre se centrifugaron a 600g durante 3 minutos para obtener el plasma total. La toma de la muestra de sangre siempre fue entre 07:00 y 08:00 h y cuatro horas después de la última ingesta de leche.

Aproximadamente una hora después, las muestras de sangre se centrifugaron a 600g durante 3 minutos. Del plasma separado se tomaron alícuotas de 100 µL para determinar el L-Trp libre; 50 µL para el total; 25 µL para albúmina; 50 µL para AGL y un mililitro para la purificación de albúmina.

III.6 ENSAYOS BIOQUÍMICOS

III.6.1 Determinación de L-Trp total y libre

El L-Trp plasmático se determinó en sus formas libre y total, la diferencia entre estos dos se consideró el L-Trp unido a albúmina. El método consistió en colocar 300 µL del plasma total en un cono de ultracentrifugación Nanosep 30 K, para obtener un ultrafiltrado del plasma, el tiempo de centrifugación empleado fue de 5 minutos a 3,000g. Se tomaron 100 µL de la parte superior del cono de centrifugación, para obtener el L-Trp unido a albúmina, los que fueron desproteinizados con HClO₄, 0.1 M, más metabisulfito de sodio 4 mM y se centrifugaron a 10,000 rpm por 5 minutos, se tomaron 20 µL de ambas fracciones para determinar el L-Trp libre y el unido a albúmina, mediante el método de cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC, Waters SP) de Peat y Gibb (1983). Se utilizó una columna de simetría C₁₈ de fase reversa, 3.9 X 150 mm de longitud y 5 µm de tamaño de la partícula, con una fase binaria de un mililitro por minuto de un solución amortiguadora de fosfato monopotásico 0.02 M, más 1g/L

de ácido heptanosulfónico sal de sodio, pH 3.3 y metanol/agua. La reacción se midió en un detector fluorométrico (Waters SP 474) a 290 nm de excitación y 330 nm de emisión. La respuesta se cuantificó por un sistema análogo Millenium 32. En cada ensayo se incluyó una curva estándar de 0.025 a 10 ng/ μ L de L-Trp. La concentración de la forma libre, unida y total del L-Trp se expresó en μ mol/L.

III.6.2 Determinación de albúmina

La concentración de albúmina plasmática se determinó por el método espectrofluorométrico de Doumas et al., (1971) usando albúmina humana como estándar. A 25 μ L de plasma total se les agregó 5 ml de una solución de verde de bromocresol 0.6 mM en una solución amortiguadora de ácido succínico 0.10 M, pH 4.20. Los tubos con la reacción se agitaron constantemente en un baño metabólico (Dubnoff) por 10 minutos a 25°C. El desarrollo de la reacción se midió en un espectrofotómetro Varian DM a 628 nm de excitación. En cada ensayo se incluyó una curva estándar de albúmina humana y las concentraciones se expresaron en gramos por decilitro.

III.6.3 Cuantificación de ácidos grasos libres

Los ácidos grasos libres se determinaron por el método de Falholt et al., (1973). Para esta determinación es necesario que la separación de las células del plasma se realice lo antes posible por centrifugación y que los AGL sean determinados en ese momento, ó almacenados a -20°C. A 50 μ l del plasma se le adicionó 1.0 ml de una solución amortiguadora de fostafo 50 mM, pH 7.4 y 6.0 ml de una solución cloroformo-heptano-metanol (CHM), en tubos de polietileno. Se agitaron vigorosamente los tubos de la reacción durante 90 segundos y se dejaron en reposo durante 15 minutos. Posteriormente se centrifugaron a 4,000 rpm, durante 10 minutos a 4°C, al término de la centrifugación, la solución amortiguadora se separó cuidadosamente por succión con una pipeta Pasteur y 5.0 ml de la fase CHM se agitaron con 2 ml del reactivo ($\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ -trietolamina)

durante 5 minutos. Después las muestras se centrifugaron a 4,000 rpm durante 5 minutos y al terminar 3.0 ml de la fase superior se transfirieron a tubos de ensayo que contenían 5.0 ml de reactivo de coloración (1,5-difenilcarbácida al 0.4% en etanol). Se mezclaron cuidadosamente y se dejaron en reposo durante 10 minutos. La reacción se midió en un espectrofotómetro a 550 nm de excitación. En cada ensayo se incluyó una curva estándar de ácido palmítico. Las concentraciones de ácidos grasos libres se expresaron en mmol/mL.

III.6.4 Purificación de albúmina de ácidos grasos

La purificación de albúmina para eliminar ácidos grasos libres (AGL) se realizó mediante el método descrito por Chen (1967).

Al plasma se le agregó lentamente un volumen igual de una solución saturada de sulfato de amonio gota a gota, en agitación continua a 4°C. Una vez saturadas las muestras del plasma, se agitaron durante una hora a 4°C después se centrifugaron a 5,000 rpm, durante 15 minutos a 4°C, se les verificó el pH a las muestras y se colocaron en bolsas de diálisis de iones de poro pequeño, 50 000 daltons, previamente lavadas con agua bidestilada en varias ocasiones. Las bolsas de diálisis con las muestras del plasma, se colocaron en una solución amortiguadora de fosfatos 50 mM, pH 7.4 en agitación constante durante una hora a 4°C, al término de este tiempo, se cambiaron las bolsas de diálisis a otro vaso de precipitado que contenía 2 litros de la misma solución amortiguadora en agitación constante durante 17 horas a 4°C. Posteriormente se retiró el plasma de la bolsa de diálisis, manteniéndolo a 4°C, se midió el volumen y el pH de las muestras y se les determinó la concentración de albúmina. De acuerdo a la concentración de albúmina se les adicionó carbón activado a razón de 1 mg/mg de proteína, en agitación lenta y constante, posteriormente las muestras se llevaron a pH 3.0 con HCl 1 N y se agitaron durante 90 minutos a 4°C. Después se centrifugaron a 5,000 rpm por 15 minutos a 4°C, se filtró el sobrenadante en membranas polietileno de 450 nM de tamaño del poro, se midió el volumen y se

llevó a pH 7.4 lentamente, con NaOH 1 N. Se midió la concentración de albúmina y de AGL, antes de los ensayos de cinética de unión del L-Trp a la albúmina.

III.6.5 Curvas de cinética de unión de L-Trp a la albúmina mediante diálisis de equilibrio

La cinética de unión del L-Trp a la albúmina se realizó mediante una diálisis de equilibrio, tomando como base el método de Bourgoin et al., (1974) modificado en el laboratorio. (Manjarrez, et al; datos sin publicar). Se colocaron 780 µg de albúmina purificada libre de ácidos grasos en membranas de diálisis con un tamaño de poro de 30,000 Da. Previamente las membranas de diálisis fueron lavadas con agua bidestilada con cambios frecuentes durante 3 días. Después se colocó L-Trp a razón de 0 a 120 nM dentro de las membranas de diálisis, posteriormente las bolsas fueron colocadas en tubos que contenían 4 ml de una solución amortiguadora de fosfatos pH 7.40, 50 mM. La reacción se incubó en agitación constante a 37°C durante 3.5 h, al término de la incubación, la reacción se paró en frío a 4°C, se tomaron 400 µL del sobrenadante el cual se filtró en membranas de Nanosep de 30,000 K de tamaño de poro a 5,000 rpm durante 2 minutos a temperatura de ambiente. A continuación se tomaron 100 µL de la parte superior de la membrana de filtración y 100 µL del ultrafiltrado, a la primera se le agregó 100 µL de HClO₄, 0.1 M, más metabisulfito de sodio 4 mM. Se centrifugó a 10,000 rpm, 10 minutos. 20 µL de cada una de las fases (superior, inferior y fuera de la bolsa de diálisis) fueron inyectadas al HPLC. Utilizando una columna de simetría C₁₈ de fase reversa, 3.9 X 150 mm de longitud y 5 µm de tamaño de la partícula. Se usó una fase binaria de un mililitro por minuto de un solución amortiguadora de fosfato monopotásico 0.02 M, más 1g/L de ácido heptanosulfónico sal de sodio, pH 3.3 y metanol/agua, la reacción se midió en un detector fluorométrico a 290 nm de excitación y 330 nm de emisión. La respuesta se cuantificó por un sistema análogo Millenium 2020.

III.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se realizó una base de datos electrónica, con cuadros de salida de los resultados en los que se registraron los días de cada una de las mediciones en los diferentes grupos del estudio. El cálculo de las constantes cinéticas (B_{\max} y K_D) de la unión del L-Trp a la albúmina se efectuó mediante el programa de computación Graph Pad Prism 3 (regresión no lineal), el cual ponderó estadísticamente cada uno de los puntos de la curva de saturación y la valoración de Scatchard. Para comparar los resultados entre grupos de la misma edad, primero se obtuvo el promedio, la desviación estándar y la variancia para cada uno de los grupos, después se realizó la prueba estadística de F para conocer homogeneidad o heterogeneidad de las variancias y para la comparación entre ellas se efectuó un análisis de variancia, U de Mann-Whitney y la comparación múltiple de Tukey's, con un nivel de significación de $p < 0.05$.

IV. RESULTADOS

De 37 recién nacidos de término que ingresaron al presente estudio, 17 neonatos constituyeron el grupo control y 20 pacientes formaron el grupo con DIU. En el grupo control, 40% fueron masculinos y 60% femeninos; 65% se obtuvieron por parto normal y el 35% por operación cesárea. En el grupo desnutrido *in-útero*, 41% de los pacientes fueron femeninos y 59% masculinos; 47% se obtuvieron por parto normal y el 53% por cesárea.

En los cuadros 1 y 2 se pueden observar los datos clínicos y somatométricos de los recién nacidos al nacer y su evolución durante los tres primeros meses de edad posnatal. La edad gestacional fue similar en ambos grupos. El índice ponderal y la relación de crecimiento fetal fueron significativamente menores en los recién nacidos con DIU en relación a los niños controles ($p < 0.01$). Debido a que las curvas de crecimiento físico no muestran diferencias por el sexo durante los primeros meses de vida, la comparación estadística se efectuó agrupando los datos obtenidos en ambos sexos. En relación a los patrones de crecimiento del peso corporal, longitud corporal y el perímetro cefálico en los niños controles mostraron un aumento significativo con la edad ($p < 0.001$). El mismo patrón se observó en los niños con DIU, sin embargo, siempre existió un déficit significativo al compararlos con los niños normales en todas las edades estudiadas. Además en los mismos cuadros se puede ver el patrón de desarrollo que presentó el grupo de niños desnutridos *in-útero* recuperados nutricionalmente (grupo RN), se observó que los pacientes alcanzaron los valores normales del peso corporal, longitud corporal, perímetro cefálico e índice de masa corporal a los 30 días de vida.

Cuadro 1. Datos somatométricos

	Controles n = 17	Desnutrición <i>in útero</i> n = 20	Recuperados nutricionalmente n = 9
Edad Gestacional (semanas)	39.5 ± 0.7	39.1 ± 1.20	
Índice Ponderal	2.38 ± 0.26	2.10 ± 0.29 [‡]	
Relación del Crecimiento Fetal	98 ± 0.09	68 ± 0.05 [€]	
Peso Corporal (g) (días)			
1	3165 ± 326.9	2125 ± 234.5 [€]	
30	4093 ± 322.3	3316 ± 332.3 [€]	3839 ± 193.9 [€]
90	5703 ± 438.2	4671 ± 387.1 [‡]	5571 ± 333.9 [€]
Longitud (cm) (días)			
1	51.06 ± 1.0	46.63 ± 1.6 [€]	
30	56.33 ± 2.9	51.06 ± 1.5 [€]	54.00 ± 2.9 [€]
90	62.60 ± 2.4	58.38 ± 1.0 [€]	61.86 ± 2.1 [€]

Cada punto representa el valor medio ± desviación estándar. Peso corporal (Tratamiento: SC = 11340, gl = 7, MC = 1610. Residual SC = 7320, gl = 76, MC = 96320). Longitud (Tratamiento: SC = 2226, gl = 7, MC = 317.9. Residual SC = 286.7, gl = 70, MC = 4.096). Las diferencias fueron determinadas por U de Mann-Whitney, ANOVA y prueba de Tukey para comparaciones múltiples.* p < 0.05, [‡]p < 0.01, [€]< 0.001,

Cuadro 2. Datos somatométricos

	Controles n = 17	Desnutrición <i>in útero</i> n = 20	Recuperados Nutricionalmente n = 9
Índice de masa corporal (días)			
1	12.15 ± 1.13	9.90 ± 1.10 [€]	
30	14.23 ± 1.23	12.46 ± 0.84 [€]	13.89 ± 1.02 [‡]
90	15.07 ± 1.31	12.74 ± 1.30 [‡]	15.28 ± 1.28 [‡]
Perímetro cefálico (cm) (días)			
1	35.29 ± 0.77	33.74 ± 1.94 [€]	
30	37.87 ± 1.22	35.97 ± 0.10 [€]	37.33 ± 0.81 [*]
90	40.36 ± 1.02	39.00 ± 1.11 [€]	39.50 ± 1.17

Cada punto representa el valor promedio ± desviación estándar. Índice de masa corporal (Tratamiento: SC = 292.5, gl = 7, MC = 4178. Residual SC = 101.6, gl = 79, MC = 1.286). Perímetro Cefálico (Tratamiento: SC = 432.5, gl = 7, MC = 61.78. Residual SC = 134.2, gl = 81, MC = 1.656. Las diferencias fueron determinadas por U de Mann-Whitney, ANOVA y prueba de Tukey para comparaciones múltiples. *p < 0.05, ‡ < 0.01 y € < 0.001

La concentración de la albúmina plasmática en los niños se muestra en el cuadro 3. Como se puede apreciar, existió aumento en la concentración de la proteína con la edad posnatal en los niños controles; la misma tendencia se observó en los niños desnutridos; sin embargo, su concentración fue más baja que la del grupo control durante todo el período estudiado ($p < 0.05$). Además en el mismo cuadro se ve el patrón que mostró el grupo RN, de la misma manera que se observó para las diferentes medidas somatométricas, la concentración de albúmina plasmática presentó una franca recuperación a partir del día 30 de vida y a los 90 días alcanzó el valor de los niños controles.

Cuadro 3. Concentración de Albúmina Plasmática

Edad (Días)	Controles n = 17	Desnutrición <i>in útero</i> n = 20	Recuperados Nutricionalmente n = 9
1	4.53 ± 0.80	3.53 ± 1.20 *	
30	5.22 ± 1.18	3.91 ± 1.10 *	4.30 ± 0.67
90	5.82 ± 0.60	4.13 ± 1.20 ‡	5.81 ± 0.60 €

Cada punto representa el valor promedio ± desviación estándar (g/dL). Todas las determinaciones fueron realizadas por duplicado. (Tratamiento: SC = 54.71, gl= 7, MC = 7815; Residual SC= 75.93, gl = 75, MC = 1.012). Las diferencias fueron determinadas por U de Mann-Whitney, ANOVA y prueba de Tukey para comparaciones múltiples. *p< 0.05, ‡ < 0.01 y € < 0.001

Por lo que corresponde a la concentración plasmática de los ácidos grasos libres, no hubo diferencias significativas en todos los grupos a todas las edades estudiadas (cuadro 4).

Cuadro 4. Concentración de ácidos grasos libres

Edad (Días)	Controles n = 17	Desnutrición <i>in útero</i> n = 20	Recuperados Nutricionalmente n = 9
1	0.26 ± 0.03	0.24 ± 0.02	
30	0.18 ± 0.05	0.13 ± 0.04	0.15 ± 0.05
90	0.20 ± 0.07	0.19 ± 0.04	0.17 ± 0.09

Cada punto representa el valor promedio ± desviación estándar (mmol/ml). Todas las determinaciones fueron realizadas por duplicado. (Tratamiento: SC = 54.71, gl= 7, MC = 7815; Residual SC= 75.93, gl = 75, MC = 1.012). Las diferencias fueron determinadas por U de Mann-Whitney, ANOVA y prueba de Tukey para comparaciones múltiples. *p< 0.05, † < 0.01 y € < 0.001

Uno de los parámetros más importantes que se determinó en el presente estudio fue la concentración del L-Trp plasmático, en su fracción libre y unida a albúmina, la suma de estos dos se consideró el L-Trp total. En lo que respecta a la fracción libre, se observó en los niños controles un leve incremento de su concentración a partir del primer día, de 8.42 ± 0.67 hasta 8.97 ± 0.93 $\mu\text{mol/L}$ a los tres meses de vida posnatal. En los niños desnutridos, al nacer tenían una concentración de L-Trp libre de 14.22 ± 0.67 $\mu\text{mol/L}$, es decir significativamente más elevada que la de los niños controles de la misma edad ($p < 0.001$) y mayor que la concentración alcanzada por los controles a los 90 días de edad ($p < 0.001$) (Cuadro 5 y figura 1). Interesantemente, los niños desnutridos *in-útero* nutricionalmente recuperados alcanzaron el valor de los niños controles a los 30 días de edad posnatal. Además en el cuadro 5 y figura 1 se puede apreciar la concentración de la fracción unida a albúmina del L-Trp, como se puede ver, la concentración fue siempre significativamente menor en los niños desnutridos ($p < 0.001$) comparada con sus controles en todas las edades estudiadas. Así mismo se muestra la razón del L-Trp libre/L-Trp total, esta razón se encontró aumentada en los desnutridos a las diferentes edades estudiadas ($p < 0.001$), y de la misma manera que se observó para la concentración plasmática de la fracción libre del L-Trp, la fracción unida a albúmina del aminoácido en los niños del grupo RN mostró un regreso al valor normal a los 30 días en relación a los niños normales. En cuanto al L-Trp total no se observaron diferencias significativas entre los grupos del estudio a las diferentes edades (Cuadro 5, figura 1).

Cuadro 5. Concentración de L-Triptófano Plasmático

Edad (días)	C				DIU				RN			
	Libre (L)	Unido	Total (T)	L/T	Libre (L)	Unido	Total (T)	L/T	Libre (L)	Unido	Total (T)	L/T %
1	8.42	34.28	43.91	0.191	14.22	29.83	43.9	0.323				
	± 0.67	± 2.52	± 2.49		± 0.67 ^a	± 0.56 ^{c,d}	± 1		± 0.80			
30	8.08	35.28	43.69	0.184	14.9	29.56	43.5	0.342	9.92	34.01	43.1	0.23
	± 0.72	± 2.51	± 2.17		0	± 0.47 ^c	± 2		± 1.13 _b	± 2	± 2.25	
					± 0.36 _a	± 0.44				± 2.15		
90	8.17	36.22	44.26	0.184	15.0	29.01	43.2	0.348	9.62	36.71	44.8	0.214
	± 0.93	± 2.48	± 1.57		8	± 1.69 ^c	± 4		± 0.16 _b	± 9	± 2.22	
					± 0.10 _a	± 0.52				± 2.19		

Cada punto representa el valor promedio ± desviación estándar de 17 niños controles; 20 con DIU y 9 RN. Todas las determinaciones fueron realizadas en muestra por duplicado. La diferencia fue determinada por U de Mann-Whitney, ANOVA y prueba múltiple de comparación de Tukey. Fracción libre (Tratamiento : SS = 740.3, Df = 7, MS = 105.8; Residual SS = 26.53, Df = 74, MS = 0.35); Unido a albúmina (tratamiento: SS = 761.1, Df = 7, MS = 109.6, Residual SS = 259.5, Df = 77, MS = 3.37); Total (tratamiento SS = 116.3, Df = 7, MS= 16.62; Residual SS = 212.2, Df = 74, MS= 258). a) p< 0.00 LC vs LD; b) p< 0.00 LD vs LRN; c) p < 0.00 unido C vs unido D; d) p < 0.00 unido RN vs unido D.

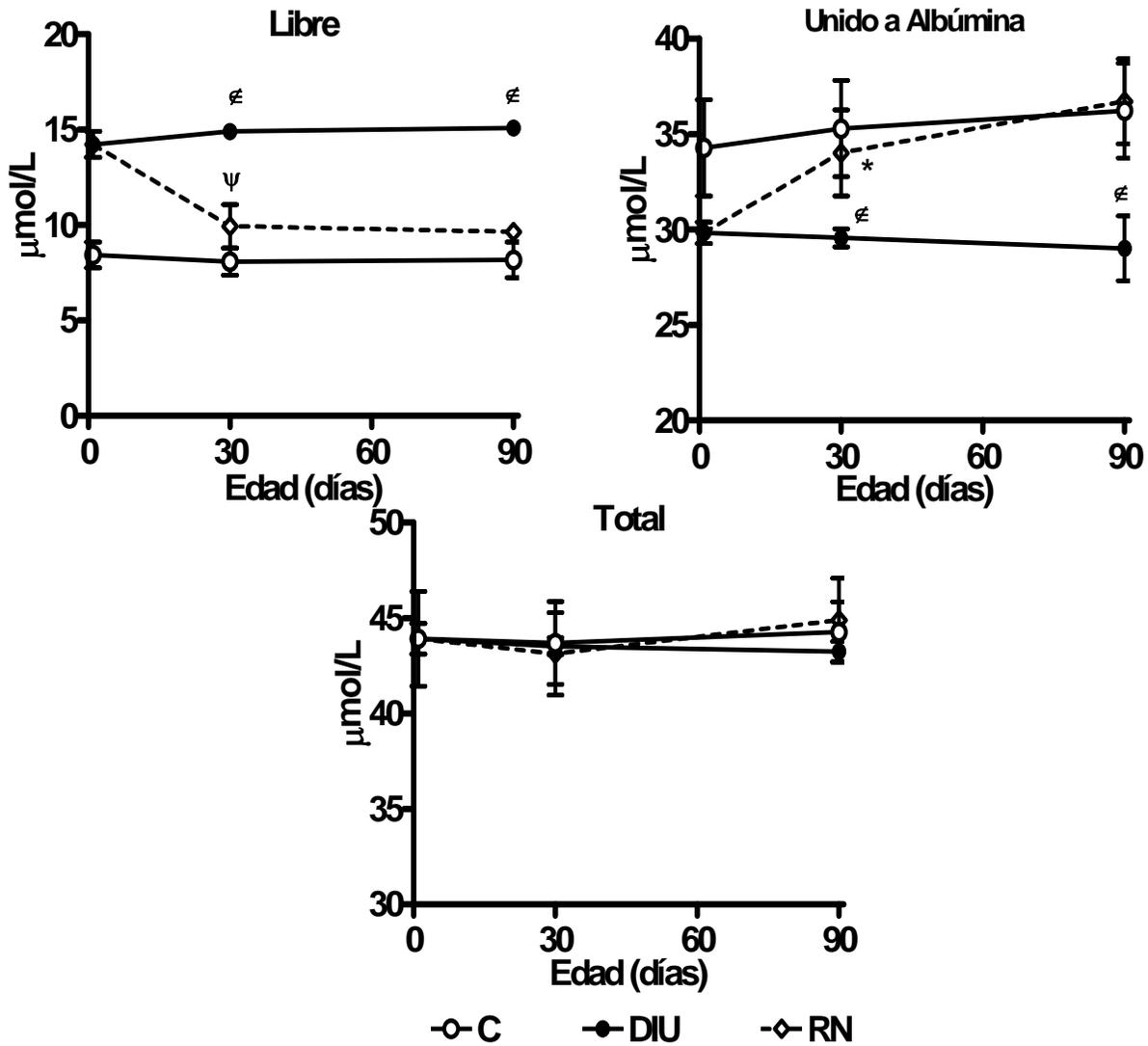


Figura 1. Concentración de L-triptófano plasmático. Cada punto representa el valor promedio \pm desviación estándar de 17 niños controles (C); 20 con desnutrición in útero (DIU) y 9 recuperados nutricionalmente (RN). Todas las determinaciones fueron realizadas por duplicado. Libre (Tratamiento: SC = 740.3, gl = 7, MC = 105.8; Residual SC 26.53, gl = 74, MC = 0.35); Unido a albúmina (Tratamiento: SC = 767.1, gl = 7, MC = 109.6; Residual SC = 259.5, gl = 77, MC = 3.37); Total (Tratamiento: SC = 116.3, gl = 7, MC 16.62; Residual SC = 212.2, gl 74, MC 2.86). Las diferencias fueron determinadas por U de Mann-Whitney, ANOVA y prueba de Tukey para comparaciones múltiples. * $p < 0.05$, † < 0.01 y ‡ < 0.001 .

La figura 2 muestra las características morfológicas que presentaron las curvas de saturación de la unión del L-Trp a la albúmina purificada de ácidos grasos en los niños con DIU (●), controles (o) y desnutridos nutricionalmente recuperados (◇), al primero, 30 y 90 días de vida posnatal. Se trata de curvas clásicas de saturación del tipo de Michaelis-Menten. También en las mismas figuras se pueden ver las gráficas de Scatchard. De estas curvas se calcularon las constantes de unión K_D y B_{max} del L-Trp a la albúmina que se muestran en el cuadro 6.

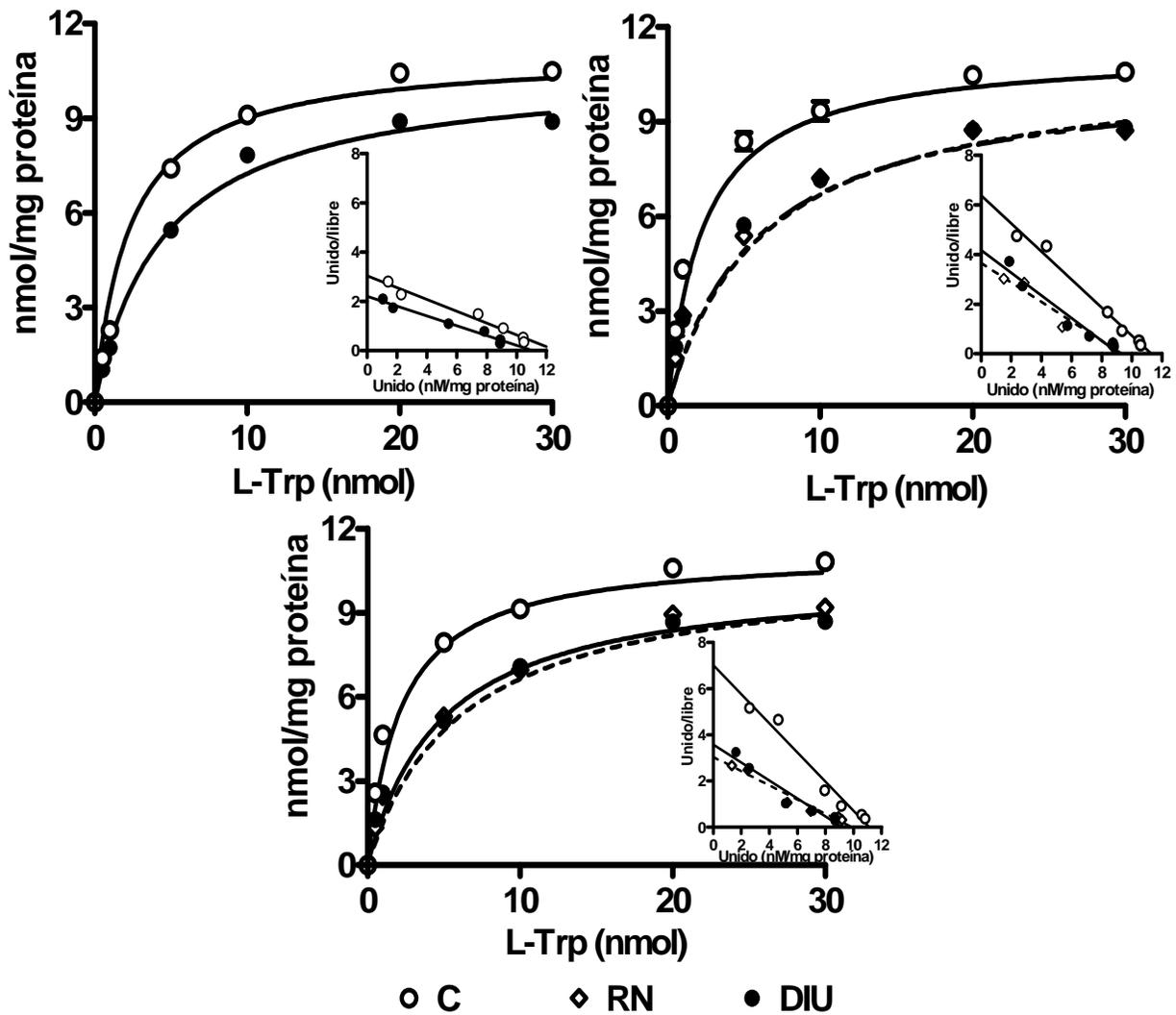


Figura 2. Curvas de cinética y gráficas de Scatchard (inserto) de L-triptófano unido a albúmina en niños. O, controles; ♦, desnutrición in útero y ◊ recuperados nutricionalmente. Cada punto representa el valor promedio \pm desviación estándar de tres experimentos realizados por duplicado.

El patrón de desarrollo de la K_D en el grupo C no mostró cambios significativos con la edad posnatal. Nótese, que el patrón que se observó en el grupo DIU fue con una tendencia a aumentar con la edad de 4.611 ± 0.334 nM al nacimiento a 5.835 ± 0.690 nM a los 90 días de vida ($p < 0.01$). Es importante hacer notar, que la constante de disociación de la unión del L-Trp a la albúmina en estos niños desnutridos fue siempre significativamente mayor al compararla con la de los niños controles ($p < 0.001$). Por otro lado, el valor de la K_D en el grupo RN no retornó al valor normal a pesar de la recuperación física y metabólica que mostraron los niños desnutridos con la recuperación nutricia temprana ($p < 0.001$) (Cuadro 6).

El cuadro 6 también ilustra la B_{max} de la unión del L-Trp a la albúmina purificada de ácidos grasos en los niños de los grupos C, DIU y RN, se apreció una disminución significativa de la B_{max} en los niños con DIU en relación a los niños normales C ($p < 0.001$). Es notable que la B_{max} en los niños desnutridos nutricionalmente recuperados no retornó al valor normal de los niños controles ($p < 0.001$).

Cuadro 6. Constantes de unión del L-triptofano a la albúmina en niños. controles (C), con desnutrición in útero (DIU) y recuperados nutricionalmente (RN)

Edad (días)	^A K _D			^B B _{max}		
	C	DIU	RN	C	DIU	RN
1	2.297 ± 0.144	4.611 ± 0.334 [‡]		11.06 ± 0.181	10.60 ± 0.165 [*]	
30	2.326 ± 0.211	4.906 ± 0.490 [€]	6.304 ± 0.912 [€]	11.27 ± 0.072	10.42 ± 0.234 [*]	10.58 [*] ± 0.415
90	2.217 ± 0.327	5.835 ± 0.690 [€]	6.168 ± 0.346 [€]	11.21 ± 0.147	10.64 ± 0.297 [*]	10.73 [*] ± 0.372

Cada valor representa el promedio ± desviación estándar (^A nM and ^B nM L-Trp/mg proteína) de tres niños. Todas las determinaciones fueron realizadas por duplicado. K_D (Tratamiento: SC = 67.69, GL = 7, MS = 9.67. Residual SC = 3.82, GL = 14, MS = 0.27). B_{MAX} (Tratamiento: SC = 2.64, GL = 7, MS = 0.37. Residual SC = 0.04, GL = 2, MS = 0.02). Las diferencias fueron determinadas por U de Mann-Whitney, ANOVA y prueba de Tukey para comparaciones múltiples. * p < 0.05; [‡] < 0.01 y [€] < 0.001.

V. DISCUSIÓN

Se sabe que la DIU produce una serie de alteraciones a nivel corporal, que son englobadas en estructurales, metabólicas y bioquímicas. Estos cambios han sido extensamente evaluados por diferentes autores y existe consenso general que los trastornos del crecimiento y desarrollo son los más marcados durante la evolución de la enfermedad, cuya gravedad está ligada al tiempo de duración de la restricción nutricional. Los resultados de las diferentes medidas somatométricas realizadas en los niños de este estudio, confirman una vez más, que la DIU produce un retardo del crecimiento físico. Se demostró que el peso corporal se altera con más facilidad que la longitud corporal, lo que constituye un hallazgo universalmente observado, que en parte justifica la conocida clasificación de desnutrición durante la etapa intrauterina, basada exclusivamente en el déficit ponderal al nacer de acuerdo a la edad gestacional (Lubchenco, et al., 1963). En casos extremos de desnutrición, se observa una verdadera detención del crecimiento, que cuando es intensa y prolongada, el retraso del desarrollo físico se convierte en regresión de algunas medidas somatométricas, lo que implica una disarmonía de los diversos mecanismos homeostáticos que regulan el crecimiento físico durante la desnutrición y que ellos no permiten grandes cambios en el crecimiento físico (Aguilar, 1944; Down, 1964; Fitzhardinge y Steven, 1972; Fancourt et al., 1976).

Otra forma de obtener una somera y rápida información sobre el estado nutricional al nacer es mediante la relación peso en función de la talla e índice de Miller (Miller y Hassanein, 1973). Se observó en este estudio que los niños desnutridos durante la gestación conservan esta armonía corporal, lo que sugiere que existen mecanismos metabólicos prioritarios en el organismo que protegen hasta cierto límite al cerebro, lo que traduce en un menor déficit del crecimiento cerebral en relación al crecimiento del resto del organismo.

Por otro lado, el uso de medidas somatométricas gruesas que evalúan la estructura cerebral son necesarias en la mayoría de los estudios en humanos

vivos, porque el deterioro del tejido postmortem sobreviene rápidamente e impide una adecuada valoración del peso y tamaño cerebral. La medición del perímetro cefálico en los recién nacidos, es considerado un índice aproximado del tamaño del cerebro (Brown, 1966; 1969; Winick y Rosso, 1969). En nuestro estudio, los niños desnutridos tuvieron menor perímetro cefálico que los niños normales, por lo tanto, se confirma que la masa cerebral disminuye cuando la desnutrición es grave y prolongada. Diversos estudios postmortem indican que tales medidas están alteradas y que los diferentes componentes cerebrales se modifican como son: disminución del peso del cerebro y cerebelo, menor cantidad de células nerviosas determinadas por la cuantificación de DNA, la cantidad de mielina está reducida, menor cantidad de mucopolisacáridos, degeneración de neuronas y proliferación glial (Enesco y Leblond, 1962; Winick y Noble, 1965; Chase y Mckhann, 1967; Guthrie, y Brown, 1968; Winick et al., 1970; Chase et al., 1972; Cragg, 1972; Gambetti et al., 1972; Sarma y Roa, 1974; Vasan y Chase, 1976; Bourre et al., 1981).

También se observó en este estudio que los niños desnutridos en la gestación sometidos a un esquema normal de nutrición a base de leche materna desde el nacimiento presentaron aumentos somatométricos (peso corporal, longitud corporal y perímetro cefálico) suficientes que les permitió alcanzar el crecimiento físico de los controles. Estas observaciones en conjunto sugieren que cuando la restricción del alimento es eliminada durante el período neonatal temprano, el proceso de crecimiento en las células puede continuar con su desarrollo genéticamente programado, si el medio nutricional y endocrino son normales, permitiendo una completa recuperación nutricional (Prader, 1978).

Hay suficiente evidencia científica que apoya que el incremento en el crecimiento físico durante la recuperación nutricional es debido al consumo de grandes cantidades de comida y a una gran eficiencia en la utilización de la energía por las células (Cleary, 1986; Friday y Wilson, 1989). En este estudio no se cuantificó la cantidad de leche que consumieron los niños desnutridos nutricionalmente recuperados, sin embargo, por el aumento de peso corporal que

mostraron estos pacientes, se infiere que consumieron más alimento que los controles, lo que les permitió alcanzar una recuperación física completa. Estas observaciones confirman que la cantidad de comida ingerida es el principal factor que participa en la recuperación nutricional y representan diferentes conductas de alimentación que posiblemente lleven a obesidad, si ellos las continuaran hasta la edad adulta. El consumo de grandes cantidades de comida y el desarrollo de obesidad son primariamente determinadas por factores genéticos y diferencias en el gasto de energía, pero también ellos pueden ser la consecuencia de factores epigenéticos que interactúan durante las etapas tempranas de la vida, determinando el estado metabólico y la composición corporal en la edad adulta (Cleary, 1986; Eriksson, 1996; Phillips, 1996).

Por otro lado, gran parte de los mecanismos biológicos que regulan la ingesta de alimento normal ó durante la recuperación nutricia, residen en el cerebro. Recientemente, se ha propuesto que la serotonina cerebral participa en la regulación de la conducta alimentaria; tiene un papel inhibitorio de la saciedad; contribuye al control de la saciedad durante el día y la noche; regula el peso corporal junto con otros sistemas neuronales; interactúa con el sistema dopaminérgico para el control del comportamiento de la selección de nutrimentos; regula la cantidad de ingesta de proteínas y controla la ingesta relativa de proteínas y carbohidratos (Shor-Posner y Grinker, 1986; Blundell, 1988). Estos aspectos experimentales son interesantes, pues plantean la posibilidad de que la elevación crónica de la serotonina cerebral observada en los animales desnutridos altera su neurotransmisión serotoninérgica, lo que produciría un patrón anormal de la conducta alimentaria durante la vida adulta. En resultados de nuestro laboratorio en animales con desnutrición *in-útero*, se ha observado una modificación en la conducta alimentaria, que consiste en una mayor ingesta de proteína y grasa y una menor toma de carbohidratos y hasta el momento se desconoce cual sería el patrón de conducta alimentaria en los animales desnutridos y recuperados nutricionalmente y sobretodo en los niños desnutridos que lograron la recuperación física completa a base de leche materna a libre demanda, aspecto que se esta estudiando en nuestro laboratorio.

También estos resultados confirman que los niños desnutridos *in-útero* tienen concentraciones menores de albúmina en el plasma con respecto a los niños normales. Así mismo, se corrobora que existe un incremento en la concentración de albúmina plasmática conforme aumenta la edad, siendo menor en el plasma de los niños desnutridos *in-útero*. La albúmina, es una proteína que constituye cerca del 50% de las proteínas plasmáticas. Sus funciones más importantes en la sangre es la de transportar diversos ligandos endógenos a sus órganos blancos, así como mantener el pH y la presión osmótica del plasma. Tiene un peso molecular de 66,200 Da, consta de una sola cadena polipeptídica, plegada por 17 puentes de disulfuro. Tiene una forma elíptica, es altamente soluble, con fuerte carga negativa y tiene una baja viscosidad intrínseca. No tiene moléculas de carbohidratos en su cadena polipeptídica y es una proteína muy estable. Tiene 3 dominios homólogos, debido a su expresión genética. También se ha demostrado que tiene varias regiones de unión en la molécula. La región 1, es específica para unir uno o posiblemente tres iones de ácidos grasos. La región 2, es menos específica, incluye sitios de unión para el L-Trp, tirosina, benzoatos y posiblemente también cloruros. La región 3, une bilirrubinas, fenol y bromofenol. La región 4, es un sitio especial para la unión de metales como el Cu^{++} y Ni^{++} . Además, se ha determinado que una molécula de albúmina puede unir hasta diez moléculas de ácidos grasos, aunque normalmente solo une 0.5 a 2 moles de ácidos grasos en dos o tres sitios de unión en la proteína (Kragh-Hansen, 1990; Margaron y Soni, 1998).

La hipoalbuminemia observada en los pacientes de este estudio, se podría explicar por la desnutrición, la cual también causa un aumento en la concentración de ácidos grasos libres en los niños, ya que desencadena lipólisis como fuente principal de energía, pues el aporte nutricional no es suficiente para cubrir sus requerimientos de proteínas, hidratos de carbono y lípidos. Interesantemente, el grupo RN presentó un aumento en la concentración de albúmina en el plasma que le permitió alcanzar el valor de los niños controles, lo que sugiere que en este caso también actúan diferentes mecanismos metabólicos de compensación que corrigen la síntesis de albúmina plasmática.

Además de los cambios generales, la DIU también es capaz de producir cambios metabólicos más específicos. Uno de estos cambios es el que se ha demostrado para un grupo de neuronas con función específica durante el desarrollo del cerebro en la rata y en los humanos, se trata del sistema serotoninérgico. Se ha visto que la serotonina cerebral se encuentra elevada, este aumento está ocasionado por una elevación de la fracción libre del L-Trp plasmático, este aminoácido esencial es el precursor de la síntesis de este neurotransmisor (Hernández, 1973; 1979 a,b; Manjarrez et al., 1988 a,b; Hernández et al., 1989). En efecto, se demostró en este estudio que la fracción libre del L-Trp en el plasma se encuentra elevado en los recién nacidos con DIU en relación a controles de la misma edad. El grado de unión del L-Trp libre a la albúmina es la condición bioquímica que hace que aumente o disminuya su nivel plasmático. Por lo tanto, este mecanismo puede regular la cantidad de la fracción libre del L-Trp plasmático disponible para ser transportado a través de la BHE (Hernández e Illnerova, 1970; Boadle-Biber, 1993), al tejido nervioso en donde es captado por las neuronas serotoninérgicas y en esta forma estimular la síntesis del neurotransmisor.

Miller et al., (1977) observaron que ratas con desnutrición proteínica, tienen cambios desde el nacimiento de la relación L-Trp plasmático libre/L-Trp unido a albúmina, a favor del primero, este cambio es debido a una baja concentración de albúmina plasmática. Nótese que en los resultados obtenidos en el plasma de recién nacidos con DIU, también presentaron este cambio, un aumento de la relación L-Trp libre/L-Trp unido a la albúmina, a favor de la fracción libre del L-Trp plasmático. Se ha demostrado en trabajos previos reportados por nuestro laboratorio que el resto de los aminoácidos en el plasma en los niños desnutridos no muestran los mismos cambios (Hernández et al., 1989). Por lo tanto, los presentes resultados confirman la alteración metabólica del sistema serotoninérgico hasta los tres primeros meses de edad posnatal. Al igual que en los experimentos en animales, en humanos se observa que es el neurotransmisor cerebral el afectado por los cambios en la fracción plasmática libre del aminoácido, precursor de la síntesis de serotonina cerebral.

Otros factores metabólicos que contribuyen al aumento de la fracción libre del L-Trp plasmático en los niños desnutridos son: disminución de la concentración de albúmina circulante, así como el aumento de la concentración de ácidos grasos libres plasmáticos (Gessa y Tagliamonte, 1974; Kramer et al., 1990). Estos eventos no ocurren en los niños normales, cuando por alguna circunstancia, la concentración de los ácidos grasos libres aumenta en el plasma, éstos tienen concentraciones de albúmina circulante normales que proporcionan cantidades suficientes de sitios de unión para los ácidos grasos libres y el L-Trp plasmático, así evitan que la fracción libre del L-Trp aumente en el plasma (Kragh-Hansen, 1990; Margaron y Soni, 1998).

En los niños desnutridos, los ácidos grasos libres pueden competir con el L-Trp para unirse a la albúmina, aumentando así la fracción libre del aminoácido. En este estudio no se observó un aumento significativo de la concentración de los ácidos grasos libres, lo que sugiere que hay otros factores metabólicos involucrados que determinan la disponibilidad de la fracción libre del L-Trp en estos niños desnutridos *in-útero*.

Otro factor a considerar sería el aumento del catabolismo proteico en los niños desnutridos, en este caso, los aminoácidos productos de la degradación de las proteínas, por un lado son usados como fuente de energía y por el otro, aumentan la concentración de aminoácidos libres plasmáticos. El grupo de aminoácidos neutros (fenilalanina, valina, isoleucina, leucina y tirosina) compiten con la fracción libre del L-Trp plasmático por un mismo transportador a nivel de la BHE para pasar al cerebro. Fernstrom y Wurtam (1971) han postulado que para que hubiera un mayor paso del L-Trp libre a través de la BHE, el grupo de aminoácidos neutros que compiten por el mismo acarreador membranal deberían de estar disminuidos. En este estudio no se determinó la concentración de aminoácidos en el plasma de estos niños, sin embargo, resultados reportados anteriormente por nuestro laboratorio no confirman la hipótesis propuesta por estos autores, ya que el grupo de aminoácidos neutros en los niños desnutridos presentaron una correlación negativa con la fracción libre del L-Trp y no

disminuyó, solo mostraron modificaciones aisladas de algunos de ellos. Este hecho plantea la posibilidad, de que en los niños, el transporte del L-Trp a través de la BHE sea por un sistema de acarreador membranal específico, diferente al de los aminoácidos neutros (Fernstrom y Wurtman, 1972; Fernstrom et al., 1975; Yuwiler et al., 1977). Los otros aminoácidos determinados en los niños desnutridos en los anteriores trabajos, tampoco mostraron una correlación con la fracción libre del L-Trp. Estos resultados sugieren que el cambio observado en la fracción libre del L-Trp, es un cambio específico para este aminoácido y favorece la hipótesis de que el desequilibrio del balance entre la fracción libre y la fracción unida a albúmina, regula la disponibilidad del L-Trp para pasar en mayor o menor concentración al cerebro en los recién nacidos humanos.

Las hipótesis del presente trabajo fueron que la desnutrición *in-útero* en los niños produce un cambio en la cinética de unión del L-Trp a la albúmina y que la recuperación nutricia temprana en estos niños desnutridos, produce un retorno a lo normal de la cinética de unión del L-Trp a la albúmina. Los resultados obtenidos del análisis de las curvas de unión del L-Trp a la albúmina plasmática, permiten confirmar la hipótesis de que la desnutrición *in-útero* es capaz de producir cambios en la cinética de unión del L-Trp a la albúmina, ya que se demostró una disminución de la afinidad y capacidad de unión de la albúmina por el L-Trp (mayor K_D y menor B_{max}).

La K_D es una constante que generalmente se expresa en unidades de moles por litro (M) y es uno de los parámetros más utilizados para determinar la afinidad de un receptor. Para cuantificar la interacción del ligando con su receptor se recurre generalmente a estudios de saturación. La preparación que contiene al receptor, en este estudio fue la albúmina plasmática purificada de ácidos grasos, que se incubó con concentraciones crecientes de L-Trp, a 37 °C durante 10 minutos en una diálisis de equilibrio. La representación matemática de este tipo de estudio *in vitro* permite analizar los parámetros de la reacción del equilibrio entre el sitio de unión de la albúmina y su ligado, el L-Trp. Aunque de una gráfica de saturación es posible inferir los valores de K_D y el número de sitio de unión, B_{max} .

Sin embargo es preferible analizar los datos por el método de Scatchard, como se muestra en la figura 2 de este trabajo. Nótese que al graficar en las ordenadas la relación entre la fracción unida (específica) y la libre, y en la abscisa la fracción unida, en la gráfica de Scatchard se traza la curva del análisis por saturación. La pendiente de esta línea recta representa la K_a de la unión y su recíproca da el valor de K_D . En esta representación gráfica, el número de sitios de unión (capacidad del receptor) se determina directamente por medio de la intercepción de la recta con la abscisa.

En este estudio se observó que los niños desnutridos tuvieron una disminución de la afinidad de la albúmina por el L-Trp, que puede ser debido a un efecto inhibitorio de una sustancia química, que al unirse a la proteína produce un cambio en su estructura molecular, alterado de esta manera la unión del L-Trp a la albúmina, como es el caso de los ácidos grasos libres que son transportados por la albúmina en la sangre. En este trabajo no se observó ningún cambio significativo de la concentración de ácidos grasos libres en el plasma de estos niños tanto normales como desnutridos, por lo tanto, este hallazgo demuestra que el papel que tiene los ácidos grasos libres como inhibidores competitivos de la unión del L-Trp a la albúmina no es tan importante, pues utilizando concentraciones equimolares de albúmina libre de ácidos grasos, la K_D fue mayor y la B_{max} de unión del L-Trp a la albúmina fue menor en estos niños desnutridos. Estos resultados en conjunto nos permiten plantear la hipótesis de que la desnutrición *in-útero* en los niños, produce un cambio conformacional de la albúmina plasmática como mecanismo principal que explique los cambios en la capacidad de unión del L-Trp a la albúmina (mayor K_D y menor B_{max}).

Otro mecanismo que también podría explicar la disminución de la capacidad de unión del L-Trp a la albúmina desnutrida (mayor K_D y menor B_{max}), es la exposición de la proteína a condiciones de oxidación, que frecuentemente se observa en el curso de la DIU, esto es debido al cambio metabólico que se desencadena por la restricción de los nutrientes. Recientemente, se ha demostrado que la albúmina juega un papel importante como antioxidante en el

plasma. La identificación de la albúmina como un blanco de las especies reactivas de oxígeno es de gran interés actualmente por su amplia participación en las funciones biológicas normales y en la fisiopatología de muchas enfermedades, incluyendo la Diabetes Mellitus y la Arteriosclerosis entre otras patologías. Por lo tanto, la DIU podría también ocasionar un cambio conformacional en la albúmina a través de fenómenos oxidativos, aspecto que se está estudiando en el laboratorio.

Por otro lado, los hallazgos observados en los niños desnutridos en la vida gestacional que al nacimiento fueron sometidos a un régimen de rehabilitación nutricional temprana, mostraron una recuperación completa del crecimiento físico, de la composición bioquímica y de la concentración del precursor de la síntesis de serotonina cerebral, el L-Trp plasmático. Pero a pesar de la recuperación física y bioquímica, la capacidad de unión de la albúmina plasmática por el L-Trp, permaneció disminuida, este hallazgo es interesante ya que el mecanismo que explica estos cambios cinéticos en el niño desnutrido nutricionalmente rehabilitado parece no deberse a los cambios en el metabolismo que lo originaron en el niño desnutrido. El hallazgo de que la concentración de albúmina plasmática retorna al valor normal en el niño rehabilitado nutricionalmente, deja de ser el factor predominante que interviene en estos cambios cinéticos, aunque estas alteraciones permanezcan, lo que estaría a favor de que la albúmina procedente de estos niños desnutridos nutricionalmente recuperados presente una modificación conformacional en su molécula que explique la disminución de la capacidad de unión de la proteína por el L-Trp en los niños nutricionalmente recuperados. Por lo tanto, parece ser que el mecanismo que mantiene aumentada la K_D y disminuida la B_{max} en el niño desnutrido rehabilitado nutricionalmente podría ser explicado por un cambio conformacional de la albúmina, esto apoyado, como ya se mencionó en los cambios de la cinética de unión de la albúmina por el L-Trp.

En conclusión, los presentes resultados sugieren que en el niño desnutrido y nutricionalmente recuperado, el mecanismo que explica los cambios cinéticos, menor valor de B_{max} y mayor valor de K_D de la albúmina por el L-Trp,

puede no ser debido únicamente al cambio metabólico relacionado a la desnutrición. Existe la posibilidad de que la última consecuencia de todos los cambios metabólicos involucrados durante el estado desnutrido sea una alteración conformacional en la estructura de la albúmina, con un impacto en la función de esta importante molécula en este tipo de pacientes y que persiste a pesar de la recuperación nutricia temprana.

VI . BIBLIOGRAFÍA

- Aguilar PR.1944. Estudio sobre la avitaminosis y las perturbaciones del crecimiento en los niños hipoalimentados. Gac. Med. Mex.; 75: 26
- Ballard J, Kasmaier K, Driver MA. 1979. A simplified score for assessment of fetal maturation of newly born infants. J. Pediatr. 95: 769-74.
- Barchas JD, Akil H, Elliott GR, Holman RB, Watson SJ. 1978. Behavioral neurochemistry; neuroregulators and behavioral states. Science. 200: 964-73.
- Blundell, JE. 1988. Possible roles for serotonin in the control of feeding. In Role of monoamine systems in the control of food intake and nutrient selection. En Morley, JE (Ed), Nutrition Modulation of Neural Function (San Diego: Cal.: Academic Press Inc.) pp. 95-123.
- Boadle-Biber MC. 1993. Regulation of serotonin synthesis. Prog. Biophys. Mol. Biol. 60:1-15.
- Bourgoin S, Faivre-Bauman A, Benda P, Glowinski J, Hamon M. 1974. Plasma tryptophan and 5-HT metabolism in the CNS of the newborn rat. J. Neurochem. 23: 319-27.
- Bourre JM, Morand O, Chañez C, Dumont O, Flexor MA. 1981. Influence of intrauterine malnutrition on brain development alteracion of myelination. Biol. Neonate. 39: 96-99.
- Brown RE. 1966. Organ weight in malnutrition with special reference to brain weight. Dev. Med. Child. Neurol. 8: 512-522
- Chagoya GG, Hernández RJ. 1983. L-Tryptophan during gestation induced an increase in brain tryptophan-5-hydroxylase activity and serotonin synthesis. Proc. West Pharmacol. Soc. 26: 369-72.

- Challis j, Slodoba D, Matthews S, Freser M. 2001. Fetal hypothalamic-pituitary adrenal development as a determinant of postnatal disease. *Endocrine Res.*26:489-504.
- Chase HP Welch NN, Dabiere CS, Vasan NS, Butterfield LJ. 1972. Alterations in human brain biochemistry following intrauterine growth retardation. *Pediatrics.* 50: 403.
- Chase HP, Mckhann GM. 1967. The effects of malnutrition on the synthesis of myelin lipid. *Pediatrics.* 40: 551-559.
- Chen RF. 1967. Removal of fatty acids from serum albumin by charcoal treatment *J. Biol. Chem.* 242:173-181.
- Cianfarani S, Ladaki C, Geremia C. 2006. Hormonal regulation of postnatal growth in children born small for gestational age. *Horm. Res.*85: 70-74.
- Cleary MP. 1986. Consequences of restricted feeding/refeeding cycles in lean and obese female Zucker rats. *J. of Nutrition.* 86: 116-190.
- Cook LN. 1977. Reconocimiento intra y extrauterino y tratamiento del crecimiento fetal desviado. *Pediatr. Clin. North Am.:* 429-453.
- Cragg GB. 1972. The development of cortical synapses during starvation in the rat. *Brain Res.* 95: 143-150
- Cunningham VJ, Hay L, Stoner HB. 1975. The binding of L-tryptophan to serum albumin in the presence of non-esterified fatty acids. *Biochem. J.* 146:653-658.
- Curzon G, Knott PJ. 1970. Drugs influencing plasma and brain tryptophan. *Br. J. Pharmacol.* 39: 653-655.
- Deodhar J, Jarad R. 1999. Study of the prevalence of and high risk factors for fetal malnutrition in term newborns. *Ann. Trop. Paediatr.* 19: 273-277.
- Díaz V, Ramírez A. 2006. Lactancia materna: evaluación nutricional en el recién nacido. *Rev. Cubana Pediatr.* 77: 25-35.

- Dickey RP, Gasser RF. 1993. Ultrasound evidence of variability in the size and development of normal human embryos before the tenth post-insemination week after assisted reproductive technologies. *Hum. Reprod.* 8:331.
- Doumas BT, Watson WA, Biggs HG. 1971. Albumin standards the measurement of serum albumin with bromocresol green. *Clin. Chim. Acta.* 31: 87-96.
- Down EF. 1964 Nutritional dwarfism. A syndrome of early protein calorie malnutrition. *Amer.J. Clin. Nutr.* 15:275.
- Dunsted M, Dunsted C. 1973. *On the fetal growth rate.* London, Heinemann. 72
- Economides DL, Nicolaidis KH, Campbell S. 1991. Metabolic and endocrine findings in appropriate and small for gestational age fetuses. *J. Perinat. Med.* 19 (1-2): 97-105.
- Enesco M. Leblond Cp.1962. Increase in cell number as a factor in the growth of the organs and tissues of the young male rat. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 10: 530.
- Eriksson UJ. 1996. Lifelong consequences of metabolic adaptations in utero?. *Diabetologia* .39: 1123-1125.
- Falholt K, Lund B, Falholt W. 1973. An assay colorimetric micro method for routine determination of free fatty acids in plasma. *Clin. Chim. Acta.* 46:105-111.
- Fancourt R, Campbell S, Harvey D, Norman AP. 1976. Follow up study of small for dates babies. *Br. Med. J.* 1:1435.
- Fernstrom JD, Wurtman RJ. 1971. Brain serotonin content: physiological dependence on plasma tryptophan levels. *Science.* 173: 149-152.
- Fernstrom JD, Wurtman RJ. 1972 Brain serotonin content: physiological regulation by plasma neutral amino acids. *Science.* 178: 414- 446.
- Fernstrom JD, Faller Dv, Shabshelowitz H. 1975. Acute reduction of brain serotonin and 5-HIAA following food consumption: correlation with the ratio of serum tryptophan to the sum of competing amino acids. *J. Neural Transm.* 36: 113-121.

- Fillion MP, Hernández RJ, Bauguen C, Fillion G. 1982. Postnatal development of high affinity neuronal recognition sites for (³H) 5-HT in rat brain. *Dev. Neurosci.* 5: 484-91.
- Fitzhardinge PM, Steven EM. 1972. The small for dates infant. I. later growth patterns. *Pediatrics*; 49:671.
- Fowden AL. 1995. Endocrine regulation of fetal growth. *Reprod. Fertil Dev.* 7; 351-6.
- Fowden AL, Forhead AJ. 1998. Glucocorticoids and the preparation for life after birth: Are there long-term consequences of the life insurance?. *Proc. Nutr. Soc.* 57: 113-122.
- Fowden AL, Hill DJ. 2001. Intra-uterine programming of the endocrine pancreas. *Br. Med. Bull.* 60; 123-42.
- Friday OIA, Wilson GP. 1989. Growth of whole body and organs of growing rats during feed restriction and subsequent realimentation. *Growth Development and Aging.* 53: 167-174.
- Gambetti P, Gambetti AL, Gonatas KN, Shafer B, Stieber A. 1972. Synapses and malnutrition morphological and biochemical study of synaptosomal fractions from rat cerebral cortex. *Brain Res.* 47: 477-484.
- Garber ZM. 1993. Las características de interacción y de unión con la albúmina en ratas normales y con desnutrición ontogénica. Tesis de licenciatura en nutrición y ciencias en los alimentos. México DF. Universidad Iberoamericana
- Gessa GL, Tagliamonte A. 1974. Serum free tryptophan: control of brain concentrations of tryptophan and of synthesis of 5-hydroxytryptamine. Wolstenholme GWE, Fitzsimons DW. *Aromatic amino acids in the brain.* Elsevier, Amsterdam. 207.
- Gluckman PD, Liggins GC. 1984. Regulation of fetal growth. *Fetal Physiology and Medicin.* 6:511.
- Gluckman PD, Hanson MA. 2004. Maternal constraint of fetal growth and its consequences. *Semin. Fetal Neonatal Med.* 9:419-425.

- Gorzalka GM, Mendelson SD. 1990. Serotonin receptor subtypes and sexual behavior. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 600: 435-45.
- Gromová HA, Chubakov AR, Chumasov EI, Konovalov HV. 1983. Serotonin as a stimulator of hippocampal cell differentiation in tissue culture. *Int. J. Dev. Neurosci.* 1: 339-49.
- Gruenwald P. 1963. Chronic fetal distress and placental insufficiency. *Biol. Neonate.* 5: 215.
- Guthrie HA, Brown ML. 1968. Effects of severe undernutrition in early life on growth brain size and composition in adult rats. *J. Nutr.* 94: 419-426.
- Gutierrez-Ospina G, Manjarrez GG, González C, López S, Herrera R, Medina AI, Hernández RJ. 2002. Neither increased nor decreased availability of cortical serotonin (5HT) disturbs barrel field formation in isocaloric undernourished rat pups. *Int. J. Dev. Neuroscience.* 20; 497-501.
- Haisma H, Coward WA, Albernaz E, Visser GH, Wells J, Wright A, Victora C. 2003. Breast milk and energy intake in exclusively, predominantly, and partially breast-fed infants. *Eur. J. Clin. Nutr.* 57 (12): 1633-1642.
- Haydon PG, McCobb DP, Kater SB. 1984. Serotonin selectively inhibits growth cone motility and synaptogenesis of specific identified neurons. *Science.* 226: 561-4.
- Hernández RJ, Illnerova H. 1970. Activity of 5-hydroxytryptophan descarboxylase during the first twenty days of postnatal life in the rat pineal gland. Effect of light. *Neuroendocrinology.* 6: 343-8.
- Hernández RJ. 1973. Developmental pattern of the serotonin synthesizing enzyme in the brain of postnatally malnourished rats. *Experientia.* 29: 1478-88.
- Hernández RJ. 1979. Ontogenetic malnutrition and interaction of monoamines and enzymes in the brain. En: Usdin E, Kopin JI, Barchas J. *Catecholamines Basic and Clinical Frontiers.* Pergamon Pres. Oxford. 2: 830-2.

- Hernández RJ. 1979. Na⁺-K⁺ATPase activity in the brain cortex of rats ontogenetically malnourished and treated with serotonin precursors. *Brain Res.*; 162: 348-352.
- Hernández RJ. 1980. Na⁺-K⁺ATPase activity in the brain cortex of rats ontogenetically malnourished and treated with serotonin precursor. *Brain Res.*; 162: 348-52.
- Hernández RJ. 1980. Effects of malnutrition and quipazine on rat cerebral cortex ATPase activity during development. *Dev. Neurosci.*; 3: 277-82.
- Hernández RJ, Chagoya GG. 1986. Brain serotonin synthesis and Na⁺-K⁺ATPase activity are increased postnatally after prenatal administration of L-tryptophan. *Dev. Brain Res.* 25: 221-6.
- Hernández RJ. 1987. Brain Na⁺-K⁺ATPase activity possibly regulated by a specific serotonin receptor. *Brain Res.* 408: 399-402.
- Hernández RJ, Manjarrez GG, Chagoya GG. 1989. Newborn humans and rats malnourished in-uterus: free plasma L-tryptophan neutral amino acids and brain serotonin synthesis. *Brain Res.* 488: 1-13.
- Hernández RJ, Manjarrez GG. 2001. Macronutrients and neurotransmitter formation during brain development. *Nutrition Reviews.* 59: S49.
- Houdijk EC, Engelbregt MJ, Popp-Snijders C, Delewarre VD, Waal HA. 2000. Endocrine regulation and extended follow up of longitudinal growth in intrauterine growth retarded rats. *J. Endocrinol.* 166, 599-608.
- Jacobs BL, Azmitia EC. 1992. Structure and function of the brain serotonin system. *Physiol. Rev.* 72: 165-229
- Jequier E, Robison DS, Lovenberg W, Sjoerdsma A. 1969. Further studies on tryptophan hydroxylase in rat brainstem and beef pineal. *Biochem. Pharmacol.* 18: 1071-81.
- Jouvet M. 1969. Biogenic amines and the states of sleep. *Science.* 163: 32-41.
- Jyh KN, González R, Viviani P, Gómez R. 2002. Restricción del crecimiento intrauterino. *Rev. Chil. Pediatr.* 60: 198-202

- Kaplan SI, Grumbach MM. 1965. Immunoassay for human chorionic growth hormone-prolactin in serum and urine. *Science*. 147:751.
- Kapoor A, Duna E, Kostaki A, Andrews M and Matthews S. 2006. Fetal programming of hypothalamo-pituitary-adrenal function: prenatal stress and glucocorticoids. *J. Physiol*. 572: 31-44
- Kragh-Hansen U. 1990. Structure and ligand binding properties of human serum albumin. *Dan. Med. Bull.* 37 (1); 57-84.
- Kramer MS, Oliver M, McLean FH, Dougherty GE, Willis DM, Usher RH. 1990. Determinantes of fetal growth and body proportionality. *Pediatrics*. 86: 18-26.
- Lauder JM, Wallace JA, Krebs H, Petrusz P, McCarthy K. 1982. *In vivo* and *in vitro* development of serotonergic neurons. *Brain Res. Bull.* 9: 605-25.
- Larroque B, Bertrais S, Czernichow P. 2001. School difficulties in 20 years-olds who were small for gestational age at term in a regional study. *Pediatrics*. 108: 111-5.
- Lin CC, Santolaya-Forgas J. 1998. Current concepts of fetal growth restriction. I. Causes, classification, and pathophysiology. *Obstet. Gynecol.* 92:1044-1055.
- Loh KR, Shrader EE, Zeman FJ. 1971. Effect of maternal protein deprivation on neonatal intestinal absorption in rats. *J. Nutr.* 101: 1663-1671.
- Lubchenco LO, Hansman C, Dressler M, Boyd E. 1963. Intrauterine growth as estimated from live-born birth weight data at 24 to 48 weeks of gestation. *Pediatrics*. 32: 793-800.
- Manjarrez GG, Chagoya GG, Hernández RJ. 1988a. Desnutrición intrauterina. L-triptófano-5-hidroxilasa y serotonina en el cerebro de rata. *Bol. Med. Hosp. Infant. Mex.* 45: 808-16.
- Manjarrez GG, Chagoya GG, Hernandez RJ. 1988b. Perinatal brain serotonin metabolism in rats malnourished *in-uterus*. *Biol. Neonate*. 54: 232-40.

- Manjarrez GG, Chagoya GG, Hernández RJ. 1993. Cambios epigenéticos en la expresión de una proteína funcional en el cerebro, inducido por desnutrición gestacional. Bol. Med. Hosp. Infant. Mex. 88-94.
- Manjarrez GG, Chagoya GG, Hernández RJ. 1994. Early nutritional changes modify the kinetics and phosphorylation capacity of tryptophan-5-hydroxylase. Int. J. Dev. Neurosci. 12: 695-702.
- Manjarrez GG, Magdaleno VM, Chagoya GG, Hernández RJ. 1996. Nutritional recovery does not reverse the activation of brain serotonin synthesis in the ontogenetically malnourished rat. Int. J. Dev. Neurosci. 14: 641-8.
- Manjarrez GG, Contreras LJ, Manuel MV, Chagoya GG, Hernández RJ. 1997. Elevación de la fracción libre del L-triptofano plasmático en lactantes desnutridos *in-útero* hasta el tercer mes de edad postnatal. Bol. Med. Hosp. Infant. Mex. 12-19.
- Manjarrez GG, Contreras JL, Chagoya GG and Hernández RJ. 1998. Free tryptophan as an indicator of brain serotonin synthesis in infants. *Pediatr. Neurol.* 18: 57-62.
- Manjarrez GG, Cisneros I, Herrera R, Vázquez F, Robles A, Hernández J. 2005. Prenatal impairment of brain serotonergic transmission in infants. *J. Pediatr.* 147(5): 592-596.
- Margaron MP, Soni N. 1998. Serum albumin: touchstone or totem?. *Anaesthesia.* 53 (8): 789-803.
- Mercado R, Hernández RJ. 1992. A molecular recognizing system of serotonin in rat fetal axonal growth cones: uptake and high affinity binding. *Dev. Brain Res.* 69: 133-7.
- Miller CH, Hassanein K. 1973. Fetal malnutrition in white newborn infants: Maternal Factors. *Pediatrics.* 52: 504-512.
- Miller M, Leahy PJ, Stern CW, Morgane JP, Resnick O. 1977. Tryptophan availability: relation to elevated brain serotonin in developmentally protein-malnourished rats. *Exp. Neurol.* 57: 142-57.

- Miller M, Leahy JP, McConville F, Morgane PJ, Resnick O. 1977. Effects of developmental protein malnutrition on tryptophan utilization in brain and peripheral tissues. *Brain. Res. Bull.* 2: 347-53.
- Murphy EV, Smith R, Giles WB, Clifton VL. 2006. Endocrine Regulation of Human Fetal Growth: The Role of the Mother, Placenta, and Fetus. *Endocrine Reviews.* 27(2): 141-169.
- Myers RD. 1981. Serotonin and thermoregulation: old and new views. *J. Physiol.* 77: 505-13.
- Olson L, Seiger A. 1972. Early ontogeny of central monoamine neurons in the rat: fluorescence histochemical observations. *Z. Ant. Entwickl. Gesch.* 137: 301-16.
- Olson L, Boreus LD, Seiger A. 1973. Histochemical demonstration and mapping of 5-hydroxytryptamine and catecholamine-containing neuron systems in the human fetal brain. *Z. Ant. Entwickl. Gesch.* 139: 259-82.
- Oscós A, Hernández RJ. 1982. Gestational malnutrition and drugs affecting brain serotonin. Effects on temporal control behavior. *Behavioral Neural Biol.* 34: 358-71.
- Prader A. 1978. Catch up growth. In: Barlthrop, D. (Ed.) *Paediatrics and Growth* (London: Fellowship of Postgraduate Medicine) 134-145.
- Pattyn A, Simplicio N, Hikke van Doorninck J, Goridis Ch, Guillemot F. 2004. *Ascl1/Mash1* is required for the development of central serotonergic neurons. *Nat. Neurosci.* 7 (6): 589-595.
- Peat MA, Gibb JW. 1983. High-performance liquid chromatographic determination of indoleamines, dopamine and norepinephrine in rat brain with fluorometric detection. *Annal Biochem.* 128: 275-80.
- Peleg D, Kennedy CM, Hunter SK. 1998. Intrauterine growth restriction: identification and management. *Am. Fam. Physician* 58:453-460:466-467.

- Perez-Cruet J, Tagliamonte A, Tagliamonte P, Gessa GL. 1972. Changes in brain serotonin metabolism associated with fasting and satiation in rats. *Life Sci.* 11: 31-9.
- Peters JC. 1991. Tryptophan nutrition and metabolism: an overview. Kynurenine and serotonin pathways. Edited by R Schwarcz et al., Plenum Press, New York. 345.
- Phillips DIW. 1996. Insulin resistance as a programmed response to fetal undernutrition. *Diabetologia.* 39: 1119-1122.
- Poitou P, Boulu R. 1977. Psychopharmacologie du tryptophane. *Pathol. Biol.* 25: 565-71.
- Randic M, Yu HH. 1976. Effects of 5-hydroxytryptamine and bradykinin in cat dorsal horn neurons activated by noxious stimuli. *Brain Res.* 111: 197-203.
- Sarma MKJ, Roa KS. 1974. Biochemical composition of different regions in brains of small for date infants. *J. Neurochem.* 22: 671.
- Savitz DA, Anath CV, Berkowitz GS, Lapinski R. 2000. Concordance among measures of pregnancy outcome based on fetal size and duration of gestation. *Am. J. Epidemiol.* 15: 627-33.
- Sibley CP, Birdsey TJ, Brownbill P, Clarkson LH. 1998. Mechanisms of maternofetal exchange across the human placenta. *Bioch. Soc. Trans.* 26: 86-91.
- Shor-Posner G, Grinker AJ, Marinescu C, Brown O, Leibowitz FS. 1986. Hypothalamic serotonin in the control of meal patterns and macronutrient selection. *Brain Res. Bull.* 17: 663-71.
- Shrader RE, Ferlatte M, Zeman FJ 1977. Early postnatal development of intestine in progeny of protein deprived rats. *Biol. Neonate* 31: 181-198.
- Sourkes TL. 1977. Kinetics of tryptophan transport into the brain. *J. Neural Transm. Suppl.* 15:107-14.
- Spear LP, Scalzo FM. 1985. Ontogenetic alterations in the effects of food and/or maternal deprivation on 5-HT, 5-HIAA and 5-HIAA/5-HT ratios. *Dev. Brain Res.* 18: 143-57.

- Srebnik HH. 1964. Sex differences in pituitary gonadotrophic function of protein deficient rats. *Endocrinology* 75:716-20.
- Stern WC, Resnick O, Miller M, Forbes WB, Morgane PJ. 1974. Protein malnutrition during development changes in metabolism of biogenic amines in brain. *Fed. Proc.* 33: 661-70.
- Tagliamonte A, Biggio G, Vargiu L, Gessa GL. 1973. Free tryptophan in serum controls brain tryptophan levels and serotonin synthesis. *Life Sci.* 12: 277-87.
- Thaler I, Manor D, Itskovitz J, Rottem S, Levit N, Timor-Tritsch I, Brandes JM .1990. Changes in uterine blood flow during human pregnancy. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 162:121-125.
- Takahashi H, Nakashima S, Ohama E, Takeda S, Ikuta F. 1986. Distribution of serotonin-containing cell bodies in the brainstem of the human fetus determined with immunohistochemistry using antiserotonin serum. *Brain Dev.* 8: 355-65.
- Takeuchi Y, Kimura H, Matsura T. 1983. Distribution of serotonergic neurons in the central nervous system. *J. Histochem. Cytochem.* 31: 181-5.
- Tenovuo A, Kero P, Piekkala P, Korvenranta H, Sillanpää M, Erkkola R. 1987. Growth of 519 small for gestational age infants during the first two years of life. *Acta Paediatr.* 76: 636-646.
- Van de Kar LD, Lorens SA. 1979 Differential serotonergic innervations of individual hypothalamic nuclei and other forebrain regions by dorsal and medial midbrain raphé nuclei. *Brain Res.* 162: 45-54.
- Van Praag HM, De Haan S. 1979. Central serotonin metabolism and frequency of depression. *Psychiatry Res.* 1: 219-24.
- Vasan NS, Chase HP. 1976. Brain Glycosaminoglycans (mucopolysaccharides) following intrauterine growth retardation. *Biol. Neonato.* 28: 196.
- Vázquez GE, Romero VE. 2001. Valoración del estado de nutrición del niño en México. Parte I, *Bol. Med. Hosp. Infant. Mex.* 58(7):476-490.

- Velásquez QN, Yunes ZJ, Avila RG. 2004. Recién nacidos con bajo peso; causas, problemas y perspectivas a futuro. Bol. Med. Hosp. Infant. Mex. 61(1):73-86.
- Warkany JB, Monroe B. 1961. Intrauterine growth retardation. Am. J. Dis. Child. 102:24.
- Widdowson EM. 1970. Harmony of growth. Lancet. 69: 901.
- Winick M, Noble A. 1965. Quantitative changes in DNA and RNA and protein during prenatal and postnatal growth in the rat. Dev. Biol. 12: 451.
- Winick M, Rosso P. 1969. Head circumference and cellular growth of the brain in normal and marasmic children. J. Pediatr. 74: 774.
- Winick M. 1970. Cellular growth in intrauterine malnutrition. Pediatr. Clin. North Am. 17: 69-78.
- Winick M, Rosso P, Waterlow J. 1970. Cellular growth of cerebrum, cerebellum, and brain stem in normal and marasmic children. Exp. Neurol. 26: 393-400.
- Yamada J, Sugimoto Y, Horisaka K. 1983. Simultaneous determination of tryptophan and its metabolites in mouse brain by high-performance liquid chromatography with fluorometric detection. Anal Biochem. 129: 460-3.
- Yuwiler A, Oldendorf WH, Geller E. 1977. Braun L. Effects of albumin binding and amino acid competition on tryptophan uptake into brain. J. Neurochem. 28: 1015-23.

ANEXO 1

**INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL
HOSPITAL GENERAL DE ZONA NO 3 SAN JUAN DEL RÍO, QRO.
LABORATORIO DE PATOLOGÍA MOLECULAR DE LA UNIDAD DE
INVESTIGACIÓN BIOMOLECULAR, HOSPITAL DE CARDIOLOGÍA, CMN
SIGLO XXI.**

PACIENTE No: **GRUPO**

SEXO (M/F): NACIMIENTO (1.PARTO, 2.CESAREA): APGAR:

EDAD GEST. PERCENTIL AL NACIMIENTO:

FUR BALLARD

CRECIMIENTO I.U. (1.AEG, 2.PEG):

NOMBRE DE LA MADRE: _____

NOMBRE (S) APELLIDO PATERNO APELLIDO MATERNO

DOMICILIO _____

CALLE NO. EXTERIOR NO. INTERIOR

COLONIA MUNICIPIO CODIGO POSTAL

TELEFONO _____ DE DONDE ES EL TELEFONO _____

1.CASA. 2.VECINO. 3.FAMILIA. 4.TRAB. DEL PADRE. 5. TRAB. DE LA MADRE

DATOS CLINICOS			
Días	1	28	90
Peso corporal (g)			
Longitud (cm)			
Perímetro cefálico (cm)			
TIPO DE ALIMENTACIÓN			
Lactancia materna			
Otras (ml/Kg peso, dilución)			
ENSAYOS BIOQUÍMICOS			
L-Trp libre			
L-Trp total			
Albúmina			
Acidos grasos libres			
B _{max} /K _D			

ANEXO 2

A quien corresponda:

Yo _____ declaro
libre y voluntariamente que acepto participar en el estudio: CINETICA DE UNION DEL
L-TRIPTOFANO A LA ALBUMINA EN EL PLASMA DE HUMANOS
DESNUTRIDOS *IN-UTERO* Y RECUPERADOS NUTRICIONALMENTE

Que se realizará en el laboratorio de Patología Molecular de la Unidad de Investigación Biomolecular, del Hospital de Cardiología, CMN siglo XXI y el servicio de Pediatría del Hospital General de Zona No 3 de San Juan del Río, Querétaro, ambos del Instituto Mexicano del Seguro Social. Cuyo objetivo consiste en: Determinar que la desnutrición *in-útero* produce un cambio de la cinética de unión del L-Trp a la albúmina y que retorna a lo normal en los humanos nutricionalmente recuperados.

Estoy consciente de los procedimientos y pruebas para lograr el objetivo mencionado, que consiste en la toma a mi hijo de una muestra de sangre de 2 ml al momento de nacer, a los 28 días y a los tres meses de edad.

Es de mi conocimiento que seré libre de retirarme del estudio en el momento que yo así lo desee. También que puedo solicitar información adicional acerca de los riesgos y beneficios de mi participación en el estudio. En caso de que decida retirarme del estudio, la atención que recibo en esta institución como paciente no se verá afectada.

NOMBRE _____

DIRECCION _____

FIRMA _____

TESTIGO _____

DIRECCION _____

FIRMA _____

TESTIGO _____

DIRECCION _____

FIRMA _____

FECHA _____