

11262
10
2ej

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA

INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL

L-TRIPTOFANO PLASMATICO LIBRE COMO
INDICADOR DE LA SINTESIS DE
SEROTONINA CEREBRAL EN RATAS CON
DIABETES MELLITUS EXPERIMENTAL.

TESIS

PARA LA OBTENCION DEL GRADO DE

MAESTRIA EN CIENCIAS MEDICAS

PRESENTA

JULIA ROCIO HERRERA MARQUEZ

MEXICO D.F.

FEBRERO 1999

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

271311



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

ESTE TRABAJO DE INVESTIGACION SE REALIZO EN EL LABORATORIO DE NEUROQUIMICA DEL DESARROLLO BAJO LA DIRECCION DEL DR. GABRIEL MANJARREZ GUTIERREZ DE LA UNIDAD DE INVESTIGACION MEDICA EN ENFERMEDADES NEUROLOGICAS DEL HOSPITAL DE ESPECIALIDADES DEL CENTRO MEDICO NACIONAL SIGLO XXI DEL INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL Y EN COLABORACIÓN CON EL LABORATORIO DE NEURONTOGENIA DEL DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA, BIOFISICA Y NEUROCIENCIAS DEL CENTRO DE INVESTIGACION Y DE ESTUDIOS AVANZADOS DEL I.P.N. A CARGO DEL DR. JORGE HERNANDEZ RODRIGUEZ.

INDICE

1.	Introducción	3
1.1.	Fisiopatogénia	4
1.2.	Sistema serotoninérgico cerebral	8
1.3.	Diabetes mellitus y sistema serotoninérgico	14
2.	Planteamiento del problema, objetivos e hipótesis	15
3.	Material y métodos	16
3.1.	Métodos estadísticos	17
3.2.	Ensayos bioquímicos	18
3.2.1.	Determinación de L-triptofano	18
3.2.2.	Determinación de 5-hidroxitriptamina cerebral	19
3.2.3.	Actividad de la triptofano-5-hidroxilasa	22
3.2.4.	Determinación de glucosa en el plasma	23
3.2.5.	Determinación de albúmina en el plasma	24
3.2.6.	Determinación de ácidos grasos libres en el plasma	24
4.	Resultados	25
5.	Discusión	28
6.	Resumen	40
7.	Bibliografía	42
8.	Tablas y graficas	54
9.	Abreviaturas	64

1. INTRODUCCION

La diabetes mellitus (DM) actualmente se considera como un estado patológico en el que el organismo pierde la capacidad de utilizar los carbohidratos como fuente de energía, secundario a la carencia relativa o absoluta de insulina (1). La DM ha sido clasificada de acuerdo a su etiología en cuatro grupos (ver tabla 1) (2).

En México, la DM ocupa una de las principales causas de morbimortalidad de la población general; el tipo 2 se presenta con mayor frecuencia en la edad adulta, tiene una prevalencia de 5.6 a 7.8% (3). En la infancia y en la adolescencia el tipo I A y I B son los que predominan. La incidencia anual de la DM tipo I se estima en 12 a 14 casos/100,000 personas menores de 20 años y una prevalencia de 1 caso/500 jóvenes de menos de 16 años de edad (2, 4-6). Es uno de los padecimientos infantiles más comunes, tres a cuatro veces más frecuente que la fibrosis quística, la artritis reumatoide juvenil o la leucemia y casi diez veces más frecuente que el síndrome nefrótico o la distrofia muscular (7).

El riesgo estadístico de padecer DM tipo I en los miembros de una familia de una persona que presenta la enfermedad, es significativamente mayor en comparación a la población general. El riesgo está relacionado con las semejanzas genéticas de los miembros de la familia. Por ejemplo, cuando un gemelo idéntico desarrolla DM, el riesgo del otro gemelo es del 25 a 50%. Esto contrasta con el 0.4% del riesgo de la población general, el 15% de riesgo en hermanos con HLA idéntico y el 1% en hermanos HLA no idénticos (2, 5-7).

1.1. FISIOPATOGENIA

Hasta el momento existe consenso general que en el desarrollo de la DM tipo I A y I B, participan factores genéticos y ambientales, que desencadenan una serie de procesos inmunológicos en donde intervienen los mecanismos de autoinmunidad del organismo (6-10). En cuanto a los factores genéticos, se sabe que existe una estrecha asociación entre la DM tipo I A y los genes del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH), entre ellos los productos de las clases I y II; el factor de necrosis tumoral α y β ; los componentes dos y cuatro del complemento. Los productos de las clases I y II del CMH, que son reconocidos por los linfocitos, además participan en la selección de las células del timo y determinan los epítopes que serán presentados a la célula T durante el proceso inmunológico (6, 11).

También se ha reportado que el 95% de los pacientes diabéticos expresan el DR3 sólo o junto con el DR4 del HLA, en comparación con el 40% que se ha observado en la población general (11). Además, se ha descrito que los pacientes diabéticos tipo I A, tiene el haplotipo HLA B8/DR3; un aumento de la relación CD4/CD8 y una disminución de la producción de interleucina 2. Interesantemente, los pacientes diabéticos también presentan algunas anormalidades de los linfocitos T; una fuerte asociación entre el locus del complemento C4A y C4B y el complejo HLA; una deficiencia de C4 del complemento y una severa disminución de la inmunidad humoral (11-13).

Aún cuando el proceso inmunológico de la DM se localiza en el páncreas, existen otras alteraciones del sistema inmune del organismo. Por ejemplo, se ha descrito una serie de anormalidades en los linfocitos, que frecuentemente se han observado en otras enfermedades autoinmunes como la enfermedad de Graves y Hashimoto. Por lo tanto, todos estos hallazgos en conjunto permiten plantear que la DM es el producto de la interacción de factores genéticos, ambientales e inmunológicos (6, 8, 11).

Por otro lado se sabe que en condiciones normales, las células β de los islotes del páncreas regulan el metabolismo de los carbohidratos, lípidos y proteínas, a través de una síntesis y secreción adecuada de insulina (14). Se ha observado que después de una comida la concentración de glucosa en la sangre aumenta, este hecho estimula la secreción de insulina por las células β la hiperglicemia junto con la hiperinsulinemia, promueven el ingreso de glucosa al hígado y a los tejidos periféricos, además suprime la producción de glucosa por los hepatocitos, disminuye la lipólisis y la proteólisis del organismo (7, 14). Todas estas vías metabólicas en conjunto proporcionan la cantidad suficiente de glucosa para el metabolismo normal del sistema nervioso central (SNC) (7, 14).

Por lo tanto, al no existir insulina en el organismo se produce DM tipo I, que es el producto de la interacción de factores genéticos y ambientales que desencadenan un proceso de autoinmunidad que destruye progresivamente las células β de los islotes del páncreas. Si la destrucción de la población celular sobrepasa el 80 a 90%, la capacidad de secreción de insulina del páncreas se

torna insuficiente para regular la producción hepática de glucosa. Por lo que al inicio de la enfermedad sólo se presenta hiperglicemia posprandial, refleja una falla de la supresión en la producción de glucosa por el hígado, así como cierta disminución de la utilización periférica de glucosa por los tejidos. Pero si el deterioro de las células β progresa, ocurre una hiperglicemia en ayunas, como resultado del aumento de la producción de glucosa hepática y la disminución de la captación de glucosa por las células. La hiperglicemia *per se*, compromete aún más la utilización de glucosa, reduciendo el número y/o la actividad de los transportadores de glucosa disponibles en los tejidos dependientes de insulina como en los no dependientes de la hormona (1, 7, 14, 15).

Por otro lado, si la concentración de glucosa en la sangre sobrepasa el umbral renal de 10.1 mM, se produce glucosuria, que da como resultado los síntomas clásicos de poliuria y polidipsia característicos de la DM, también existe pérdida de peso, secundario a la exagerada lipólisis y protéolisis durante la evolución de la enfermedad (7, 16, 17). Además, existe una gluconeogénesis elevada, producto de la acción de las hormonas contrarreguladoras de la insulina, adrenalina, glucágon, cortisol y hormona del crecimiento (7, 14, 16).

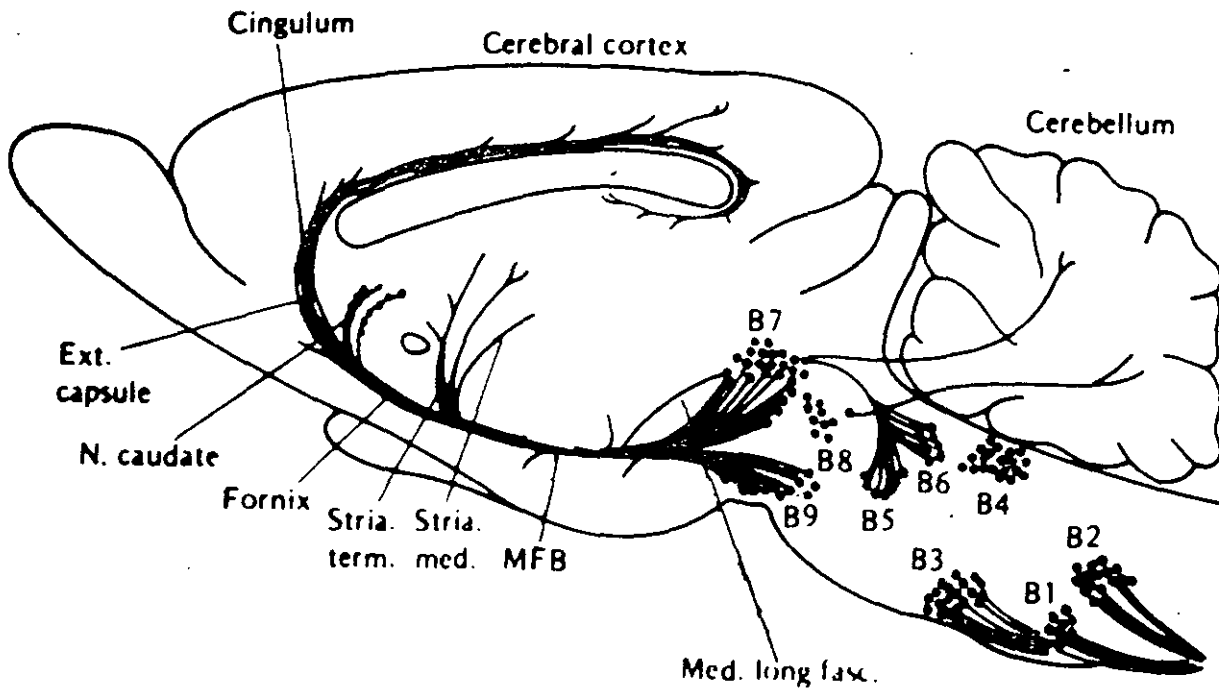
Así mismo se ha observado que la DM produce una movilización de la grasa del tejido adiposo, aumenta los lípidos totales, el colesterol y los ácidos grasos libres en el plasma (AGL) (18). Los AGL son oxidados en el hígado, producen acetil CoA que ingresa al ciclo de krebs, generan energía que es utilizada en el metabolismo del paciente diabético. Además se ha demostrado que

existe una disminución de la concentración de oxaloacetato en las mitocondrias, una oxidación incompleta de la acetil CoA y una elevada producción de los cuerpos cetónicos, acetoacetato y beta hidroxibutirato (17, 18). Los cuerpos cetónicos producen iones hidrógeno, que contribuyen a la acidosis metabólica, complicación frecuentemente observada durante la evolución de la DM (17, 19).

Por lo que corresponde al metabolismo de las proteínas, la insulina es la principal hormona que controla el ingreso y la utilización de los aminoácidos en las células. Al no existir insulina, se produce una elevación de algunos aminoácidos en la sangre. En particular los aminoácidos neutros (AAN): valina, leucina, isoleucina, tirosina y fenilalanina que compiten con el L-triptofano (L-Trp) a nivel de la barrera hemato-encefálica (BHE) para su ingreso al cerebro y estimular o disminuir la síntesis de 5-hidroxitriptamina (serotonina, 5-HT) (20-22).

Por lo tanto, todos estos cambios metabólicos observados en los individuos diabéticos son de orden general y no se sabe si tienen alguna repercusión en el metabolismo y función del SNC, es probable que la DM afecte sistemas de neurotransmisión y grupos neuronales específicos, como es el caso del sistema serotoninérgico cerebral.

1.2. SISTEMA SEROTONINERGICO CEREBRAL.



En la rata, el sistema serotoninérgico se localiza en el tallo cerebral cerca de la línea media. Esta formado por dos conjuntos de neuronas que han sido divididas de acuerdo a su origen embrionario: el grupo superior, procede del mesencéfalo, esta constituido de cuatro subgrupos: el núcleo caudal lineal (CLN); el núcleo del rafé medio (MRN); el núcleo del rafé dorsal (DRN) y el núcleo del lemnisco medial (ML). El grupo inferior, tiene su origen en el mielencéfalo, consta de cinco subgrupos: el núcleo del rafé obscurus (NRO); el núcleo del rafé palidus

(NRP); el núcleo del rafé magnus (NRM); el núcleo ventro lateral medular (VLM) y el núcleo del área postrema (IRN). Además, existe un grupo de neuronas serotoninérgicas localizado en los núcleos dorsomedial del hipotálamo (23). Estas neuronas han sido demostradas por técnicas de inmunocitoquímica, mediante anticuerpos específicos para serotonina. En humanos (24, 25), ratas (26-28), monos (29) y gatos (30).

Los núcleos serotoninérgicos inferiores, NRO, NRM, NRPa y MVL, inervan la médula espinal. En los monos se han descrito dos vías descendentes, una ventromedial que va a al cuerno ventral y otra lateral que inerva la sustancia gris central de la médula espinal. Las proyecciones serotoninérgicas de la columna lateral intermedia, probablemente emergen de la extensión caudal de los subnúcleos extrarafé de NRO que alcanzan el segmento cervical espinal en la capa X. Eferencias de los núcleos NRPa y LPGN inervan la columna intermedia de la médula espinal (23, 29).

Las fibras eferentes del NRO se dirigen a las motoneuronas de la región caudal y ventral del cuerno ventral de la médula espinal, a través del fascículo lateromedial descendente (MLF), estas fibras alcanzan su posición inferior a nivel de la decusación del tracto piramidal. La inervación de las motoneuronas del cuerno ventral, se acompaña de otras proyecciones a partir del NRO a las motoneuronas de los núcleos del tallo cerebral en donde emergen los pares craneales X y XII (23, 24).

Las células serotoninérgicas del NRM inervan la sustancia gelatinosa de la médula espinal. Interesantemente, la sustancia gelatinosa puede tener fibras

serotoninérgicas descendentes que inervan la parte inferior de la médula espinal. Además existen terminales serotoninérgicas localizadas en el área de los núcleos interpeduncular, núcleo motor facial, sustancia gelatinosa y el haz ventral de la médula espinal (23).

Por lo que corresponde a la inervación serotoninérgica ascendente de los núcleos superiores, existen seis proyecciones de fibras que se dirigen al cerebro anterior. En fetos humanos, se ha observado que estas fibras ascendentes se localizan cerca del epéndimo del cuarto ventrículo y del acueducto cerebral; entre las fibras del rafé medio y el sistema lateral celular (31). El hipotálamo tiene fibras procedentes del DRN, además, se han demostrado en el hipocampo, la zona compacta de la sustancia nigra, el núcleo mamilar medio, el septum lateral, el núcleo periventricular del tálamo, el núcleo geniculado ventrolateral y el núcleo medial de la amígdala (27, 28, 32).

También se ha visto patrones de inervación cerebral en los núcleos del tálamo asociados con la función límbica. Así mismo existe una distribución laminar de las fibras serotoninérgicas en la corteza cerebral, siendo de mayor densidad en las capas II y IV (33). Este conjunto de neuronas serotoninérgicas inician su función durante la vida fetal, su actividad la ejerce a través de un neurotransmisor específico, la 5-HT (34, 35).

La 5-HT en el tejido nervioso reúne todos los requisitos para ser considerada un neurotransmisor (36, 37). Su maquinaria biosintética y las enzimas catabólicas se localizan en el soma y en las terminales nerviosas de las células serotoninérgicas, además se ha identificado un sistema de receptores específicos

en neuronas blanco de diferentes regiones cerebrales (38, 39). La 5-HT durante la embriogénesis participa en los procesos de diferenciación del SNC como son: axogénesis y sinaptogénesis (40, 41); la diferenciación de neuronas blanco (42, 43); control del número final de receptores específicos a la 5-HT (38, 39) y en la modulación de su propia síntesis (42).

Además la serotonina esta involucrada en la regulación de los ciclos de sueño y vigilia (44); de los impulsos nociceptivos (45); de la termorregulación (46); del comportamiento sexual (47); de la regulación y liberación de hormonas hipofisarias (48); de la conducta afectiva, emocional y alimentaria (49-51) y a nivel celular regula la actividad de la $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{ATPasa}$ de los astrocitos cerebrales, importantes en mantener el equilibrio catiónico en las neuronas (52, 53).

Existe suficiente evidencia científica que sustenta que el precursor metabólico de la síntesis de 5-HT es el L-Trp (54-56). El L-Trp es un aminoácido esencial en el organismo, por lo que se debe de obtener de las proteínas de la dieta, se encuentra en el plasma en dos fracciones, el 90% se une a la albúmina y el 10% restante se encuentra en forma libre (FL) (57). La relación que guarda estas dos fracciones es la que determina la concentración de la FL disponible en el plasma para su ingreso a los tejidos en donde participa en varias vías metabólicas como la vía del ácido nicotínico, del ácido cinurénico, de la coenzima A y en la síntesis de proteínas (58). Además la FL del aminoácido ingresa al cerebro a través de un sistema de transporte activo dependiente de energía en donde estimula la síntesis de 5-HT (59, 60). Existen varios factores metabólicos en el organismo que regulan la concentración de la FL en la sangre. El grado de

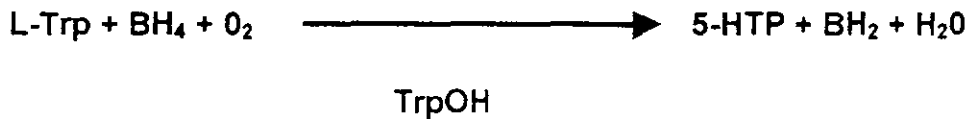
unión que tiene el aminoácido a la albúmina y las concentraciones de albúmina y AGL, juegan un papel importante en la disponibilidad de la FL para su transporte al cerebro para la síntesis de 5-HT (57, 61, 62).

Por otro lado se ha observado en experimentos en ratas que la FL del L-Trp compite por su transportador de membrana a nivel de los capilares de la BHE, con otros AAN, de tal forma que una disminución de la concentración de estos AAN en el plasma, permitirán un mayor paso de la FL del L-Trp al cerebro y un aumento en la síntesis de serotonina (20-22) ó bien lo contrario, es decir si existe un aumento de la concentración de estos ANN en la sangre producirán una disminución del ingreso de la FL del aminoácido al cerebro y consecuentemente una disminución de la síntesis de este importante neurotransmisor, serotonina.

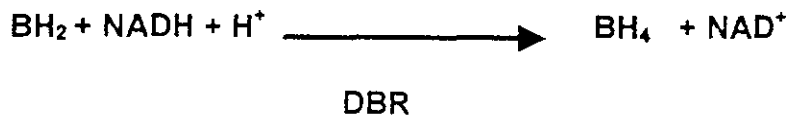
Evidencia científica ha demostrado que existe una estrecha relación entre los cambios nutricionales, la FL del L-Trp y la síntesis de serotonina cerebral. Experimentos en ratas que han sido sometidas a periodos de ayuno agudo ó prolongado, el L-Trp se encontró elevado en favor de la FL y en el cerebro aumentó la concentración de dicho aminoácido y de la 5-HT (55, 63). Por otra parte, en animales normales a los que se les administró cargas de L-Trp a dosis de 50-150 mg/Kg de peso por vía intraperitoneal, se observó una elevación de la FL y a nivel del tejido nervioso un aumento del aminoácido y de la 5-HT cerebral (52, 64). Por último se ha observado que la administración suplementaria del L-Trp a ratas durante la gestación, aumenta en el cerebro de sus crías la concentración de 5-HT y la actividad de la triptofano-5-hidroxilasa (EC 1.14.16.4 ó TrpOH) (65).

Una vez que la FL del L-Trp ingresa al cerebro, de inmediato es captado por las neuronas serotoninérgicas, en donde es hidroxilado en su posición cinco por la TrpOH (66-69), el 5-hidroxitriptofano formado es descarboxilado por la descarboxilasa de los aminoácidos aromáticos para producir serotonina (70-72).

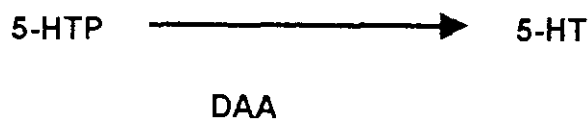
La TrpOH cataliza la inserción de un átomo de oxígeno molecular al sustrato orgánico, en tanto que el otro átomo de oxígeno es reducido a agua, esta reacción química requiere de la participación de un cofactor que es la tetrahidrobiopterina (BH₄), que dona electrones para reducir el oxígeno y formar oxhidrilos. La ecuación general de la reacción es (73, 74):



La reducción del quinonoide dihidrobiopterina (BH₂), se lleva a cabo a través de la enzima dihidrobiopterina reductasa (DBR), dependiente de nicotinamida adenín dinucleótido, según la reacción (75):



Una vez que se ha formado el 5-HTP, de inmediato es descarboxilado por la enzima descarboxilasa de los aminoácidos aromáticos (DAA) para producir 5-HT. La ecuación de la reacción es (71, 72):



La 5-HT cerebral sintetizada se almacena en vesículas sinápticas que se encuentran en las terminales nerviosas serotoninérgicas, estas vesículas varían de tamaño según su localización. Recientemente se ha descrito en varias partes del SNC terminales nerviosas no sinápticas. Este tipo de terminales le confiere también a la 5-HT un papel de neuromodulador (37).

En condiciones normales la actividad de la TrpOH en el cerebro adulto es de 70 a 100 veces menor a la actividad que tiene la enzima descarboxilasa de los aminoácidos aromáticos, además de que su constante de afinidad por el L-Trp es mayor a la concentración del aminoácido en el tejido nervioso, estos aspectos bioquímicos, le confieren a la enzima la característica de una enzima limitante, reguladora de la cadena biosintética de la 5-HT cerebral (68, 69, 76).

1.3. DIABETES MELLITUS Y SISTEMA SEROTONINERGICO

Hasta el momento existe controversia de que como la DM, produce cambios en la actividad de la vía serotoninérgica cerebral. Algunos reportes han señalado que probablemente exista una disminución de la concentración del L-Trp en el plasma y una elevación de los AAN y por consiguiente una disminución de la relación de la FL/AAN (77, 78). Además de una disminución de las concentraciones de L-Trp y de 5-HT en el cerebro (77, 79). Otros autores, han observado un aumento de la síntesis de 5-HT cerebral (80) y también ha sido propuesto que la DM no produce cambio alguno en el metabolismo de la vía serotoninérgica cerebral (81).

En resultados preliminares de nuestro laboratorio (82) hemos observado una disminución de la FL del L-Trp en el plasma y una menor concentración de L-Trp y 5-HT cerebral, sin embargo estas observaciones requieren de ser confirmadas y ampliadas a toda la vía serotoninérgica cerebral.

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA, OBJETIVOS E HIPOTESIS

La DM es una enfermedad que probablemente ocasione una disminución de la síntesis de serotonina cerebral, secundaria a una disminución de la concentración de la FL del L-Trp en el plasma. Por lo tanto, la FL del L-Trp en la sangre podría ser un indicador indirecto que nos permitiera evaluar la cantidad del aminoácido disponible, para su paso al cerebro a través de la BHE para la síntesis de serotonina.

El objetivo general del presente estudio fue conocer los efectos que tiene la DM en la síntesis de serotonina cerebral y los objetivos específicos fueron: 1) medir las concentraciones plasmáticas del L-Trp total y libre en las ratas diabéticas y controles y 2) Cuantificar la actividad de la triptofano-5-hidroxilasa y las concentraciones de serotonina y L-Trp cerebral en ratas diabéticas y controles.

La hipótesis del trabajo fue que las ratas con DM tienen una menor síntesis de serotonina cerebral secundaria a una disminución de la fracción libre del L-Trp plasmático.

En resultados preliminares de nuestro laboratorio (82) hemos observado una disminución de la FL del L-Trp en el plasma y una menor concentración de L-Trp y 5-HT cerebral, sin embargo estas observaciones requieren de ser confirmadas y ampliadas a toda la vía serotoninérgica cerebral.

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA, OBJETIVOS E HIPOTESIS

La DM es una enfermedad que probablemente ocasione una disminución de la síntesis de serotonina cerebral, secundaria a una disminución de la concentración de la FL del L-Trp en el plasma. Por lo tanto, la FL del L-Trp en la sangre podría ser un indicador indirecto que nos permitiera evaluar la cantidad del aminoácido disponible, para su paso al cerebro a través de la BHE para la síntesis de serotonina.

El objetivo general del presente estudio fue conocer los efectos que tiene la DM en la síntesis de serotonina cerebral y los objetivos específicos fueron: 1) medir las concentraciones plasmáticas del L-Trp total y libre en las ratas diabéticas y controles y 2) Cuantificar la actividad de la triptofano-5-hidroxilasa y las concentraciones de serotonina y L-Trp cerebral en ratas diabéticas y controles.

La hipótesis del trabajo fue que las ratas con DM tienen una menor síntesis de serotonina cerebral secundaria a una disminución de la fracción libre del L-Trp plasmático.

3. MATERIAL Y METODOS.

En el presente trabajo se utilizaron 80 ratas machos, cepa Wistar de 200 ± 10 g de peso corporal. Se adaptaron durante dos semanas a las siguientes condiciones de ambiente: temperatura 22 ± 2 °C, períodos de luz y oscuridad de 12 horas, el período de luz de 07:00 a 19:00 y el de oscuridad de 19:00 a 07:00 horas, humedad relativa de 50 a 60%; la manipulación mínima y toma de agua y alimento rodent diet 5001 a libre demanda; cuya composición es de: 23% de proteínas, 4.5% de grasas, 45.5% de carbohidratos, 9% de cenizas, fibra de 6%, humedad de 12%, vitamina B₁₂, riboflavina, levadura seca de cerveza, pantotenato de calcio, colina, ácido fólico, vitamina E, tiamina, niacina, vitamina A, vitamina D, 0.5% de roca fosfórica, 0.5% de sal yodada, 0.75% de citrato de amonio, 0.2% de sulfato de manganeso y trazas de óxido de manganeso, carbonato de cobalto, óxido cúprico, óxido de zinc.

Al término del período de adaptación, las ratas fueron divididas en tres grupos experimentales: el primero lo constituyó animales diabéticos (D), secundario a la administración de estreptozotocina (STZ) por vía intraperitoneal, a razón de 75 mg/kg de peso, diluido en una solución amortiguadora de citrato 0.1 M, pH 4.5; el segundo grupo lo formó el control de estrés (CE), al cual se le administró la solución amortiguadora de citrato y se le hicieron las manipulaciones a las que fueron sometidos los animales del grupo D y el tercer grupo fue el control (C). A los tres grupos se les alimentó con un régimen de comida y agua a libre demanda. Además a cada uno de los animales de cada grupo experimental se les

pesó y se les midió la ingesta de alimento cada 24 horas. El tamaño de la muestra se calculó con la siguiente fórmula: $n = (Z\alpha/2 + Z\beta)^2 \bar{p} (1-p)(r+1) / d^2$, con un valor de 0.05 y un valor β de 0.20, por este método se incluyeron cuatro animales por cada experimento en cada uno de los grupos del estudio.

A los días 7, 14 y 21 después de la administración de la STZ, animales de cada grupo fueron sacrificados por luxación cervical, se obtuvo el encéfalo a 4 °C, se les disecó la corteza cerebral, el tallo cerebral y el hipotálamo, se pesaron y se homogeneizaron en una solución amortiguadora apropiada para cada uno de los ensayos bioquímico: actividad de la TrpOH y las concentraciones del L-Trp y serotonina cerebral. Además se obtuvo 5 ml de sangre en un tubo de borosilicato con un anticoagulante ACD (ácido cítrico, citrato de sodio y dextrosa, amortiguados en una solución de tris base 50 mM, pH 7.40), para determinar las concentraciones de albúmina, AGL y L-Trp (libre y total) y un ml de sangre sin anticoagulante para la determinación de glucosa sérica.

3.1. METODOS ESTADISTICOS

Se realizó una base de datos, se hicieron cuadros de salida de los diferentes resultados de cada medición en los diferentes grupos del estudio. Para comparar los resultados de los datos entre grupos, primero se procedió a obtener el promedio, la desviación estándar y la varianza para cada uno de los grupos experimentales. Después se realizó la prueba estadística de F para conocer la homogeneidad de las varianzas y para la comparación entre ellas se efectuó un

análisis de varianza de dos vías para mediciones repetidas. La comparación entre grupos se efectuó mediante la prueba *t* de Student para promedios independientes con un nivel de significación de $P < 0.05$.

3.2. ENSAYOS BIOQUIMICOS:

3.2.1. Determinación de L-triptofano.

El L-Trp en el plasma se midió en sus formas, libre y total, la diferencia entre estas dos se consideró el L-Trp unido a albúmina. El método empleado consistió en obtener un ultrafiltrado del plasma, el cual se logró al pasar 0.1 ml de plasma a través de membranas Centriflo Amicon CF 50A. Aproximadamente una hora antes de usar las membranas de ultrafiltración, estas fueron colocadas en agua bidestilada y el exceso de agua después de este período se removió al centrifugar los conos a 600 g, durante 5 minutos. El tiempo de centrifugación empleado para obtener la FL del aminoácido fue de 60 segundos a 1800 g, en una centrifuga Sorvall superspeed RC2-B a temperatura ambiental. Los cambio del pH plasmático se evitaron agregando a las muestras de sangre una solución amortiguadora de tris base 0.05 M, pH 7.40, a diferencia de Hijikata y col (83) quienes controlaron los cambios de pH burbujeando por 30 segundos la muestra de sangre con una mezcla de gases compuesto de CO₂/N₂, 0.05 y 0.95% respectivamente. Se tomaron alícuotas de 0.01 ml del ultrafiltrado y del plasma total en donde se midió la FL y total del L-Trp por el método espectrofluorométrico de Denkla y Dewey modificado por Bloxam y Warren (84, 85). A las alícuotas se les agregó 2 ml de ácido tricloroacético (TCA) al 10% p/v (peso/volumen), se

centrifugaron a 12000 g, en una centrífuga Sorvall Superspeed RC2-B, 10 minutos a temperatura del ambiente, se transfirió el sobrenadante a tubos con tapa, se les adicionó 0.2 ml de formaldehído al 2% v/v (volumen/volumen) y la fluorescencia se indujo al agregarles 0.1 ml de FeCl_3 6×10^{-3} M en TCA al 10% p/v. La mezcla se agitó y se calentó una hora a 100 °C. En cada ensayo se incluyó una curva estándar de 0 a 2 nmol de L-Trp. Al enfriarse los tubos de la reacción a temperatura del ambiente, la fluorescencia se midió en un espectrofluorómetro Perkin Elmer LS-3 a 373 nm de excitación y 452 nm de emisión. La concentración tanto de la FL, unida a albúmina y el total del aminoácido fue expresada en $\mu\text{mol/l}$.

Para cuantificar el L-Trp cerebral, el tejido se homogeneizó a 1425 rpm, durante 30 segundos en una solución de TCA al 10% p/v, con un homogeneizador Thomas de émbolo de teflón con 0.15 mm de tolerancia en su diámetro. El homogeneizado permaneció en reposo a 4 °C, aproximadamente 30 minutos después, se tomaron 0.05 ml del sobrenadante y se les agregó 2 ml de TCA al 10% p/v, se centrifugó a 12000 g, 10 minutos en una centrífuga Sorvall Superspeed RC2-B a temperatura ambiental. Se tomó el sobrenadante y se cuantificó el aminoácido por el método espectrofluorométrico ya descrito (84, 85). La concentración del L-Trp cerebral fue expresada en $\mu\text{mol/g}$ de tejido cerebral húmedo.

3.2.2. Determinación de 5-hidroxitriptamina cerebral.

La amina se determinó por el método espectrofluorométrico descrito por Curzon y Green (86). El tejido nervioso se homogeneizó en HClO_4 , 0.4 N, más

pargilina 10^{-4} M y ácido ascórbico al 5%, en un homogeneizador Thomas de émbolo de teflón con 0.15 mm de tolerancia en su diámetro interno a una velocidad de 1425 rpm, durante 30 segundos. El émbolo se lavó con un mililitro de agua bidestilada y un mililitro de HClO_4 , 0.4 N, el cual se adicionó al homogenado.

Aproximadamente 30 minutos después, el homogenado se sometió a centrifugación 3000 g, 15 minutos en una centrifuga Sorvall Superspeed RC2-B a 4 °C. Del Homogeneizado desproteinizado, la pastilla fue descartada y al sobrenadante se le agregó 0.5 mililitro de una solución amortiguadora de fosfato de sodio 0.01 M, pH 6.0; más una gota de indicador universal Merck con rango de pH de 4 a 10, se ajustó el pH del sobrenadante a 6, con K_2CO_3 al 4 N, se aforó a 10 mililitros con agua bidestilada y permaneció en reposo 24 horas.

Después las muestras fueron centrifugadas a 3000 g, 5 minutos en una centrifuga Sorvall Superspeed RC2-B a 4 °C. El sobrenadante se pasó a través de columnas de resina de intercambio catiónico Bio-Rex 70, 200 a 400 de malla en forma de sodio. Las columnas de vidrio de 3.5 mm de diámetro y 9 cm de altura fueron montadas en una gradilla, se les colocó en la punta lana de vidrio; en agitación constante fueron llenadas con resina previamente lavada, a una altura de 1.5 cm, con una dimensión de 252.1 mm^3 , se eliminaron las burbujas de aire de la resina y las columnas fueron equilibradas a pH 6.1 con 3 ml de una solución amortiguadora de fosfato de sodio 0.2 M. La 5-HT se separó al pasar el sobrenadante por las columnas de resina, las cuales fueron lavadas con 4 ml de agua bidestilada. El eluado se obtuvo con 3 ml de ácido acético N; del eluado se tomó un mililitro para cuantificar la 5-HT separada, el eluado fue transferido a

tubos de borosilicato que contenían 0.1 ml de una solución de cisteína al 1%, se les adicionó 1.2 ml de HCl 12 N y la fluorescencia fue inducida al agregarles a los tubos 0.1 ml de ortoftaldialdehído (OPT) en metanol al 0.1%, la mezcla se agitó vigorosamente y se calentó a 95 °C durante 10 minutos. En cada ensayo se incluyó: a) una cantidad conocida de 5-HT como estándar interno, así como a la resina para determinar su rendimiento; b) curva estándar de 5-HT sin pasar por las columnas; c) tubos blancos, los cuales fueron hervidos con todos los componentes de la reacción menos OPT, el cuál se les agregó a los tubos al enfriarse a temperatura ambiente. La fluorescencia se midió en un espectrofotofluorómetro Perkin Elmer LS-3 a 360 nm de excitación y 480 nm de emisión. La 5-HT separada se expresó en nmol/ g de tejido húmedo.

La resina de intercambio catiónico Bio-Rex 70, 200 a 400 de malla en forma de sodio se preparó en la forma siguiente (87), se lavó 70 gramos de resina (peso húmedo) en agitación constante en todos los pasos, cuatro ocasiones con 250 ml de agua bidestilada, 15 minutos en cada lavado; cuatro ocasiones con 250 ml de NaOH N, una hora en cada lavado y 5 veces con 250 ml de agua bidestilada, la resina se dejó toda la noche con la última agua del lavado. Al otro día la resina se lavó una ocasión con 250 ml de agua bidestilada, el pH del sobrenadante fue aproximadamente de 9, después se lavó una ocasión con 170 ml de HCl N en etanol v/v durante 4 horas, se enjuagó 4 veces con 250 ml de agua bidestilada, se dejó la resina con el último enjuague por 24 horas; el pH del sobrenadante fue aproximadamente de 3. Al día siguiente en agitación constante se le agregó NaOH N para alcanzar en el sobrenadante un pH entre 8 y 9, se decantó y se lavó dos

veces con 250 ml de metanol en agua 60% v/v, el primero durante una hora y el segundo toda la noche. Por último la resina se lavó cuatro veces con 250 ml de agua bidestilada y cuatro ocasiones con una solución amortiguadora de fosfato de sodio 0.1 M, pH 6.5. La resina se almacenó a 8 °C.

3.2.3. Actividad de la triptofano-5-hidroxilasa.

La actividad de la TrpOH se determinó por el método espectrofluorométrico de Gál y Col (88). El tejido nervioso se homogeneizó a 1425 rpm, durante un minuto, en una solución amortiguadora de tris base 50 mM, pH 7.6 más 10^{-3} M de mercaptoetanol en una relación 3:1 V/P; mediante un homogeneizador Thomas de émbolo de teflón con 0.15 mm de tolerancia en su diámetro. El homogeneizado se centrifugó en una centrifuga Sorvall RC5C a 30000 g, 20 minutos a 4 °C. La pastilla fue descartada, se midió el volumen del sobrenadante, como fuente de la actividad enzimática.

La reacción se inició al agregar alícuotas del sobrenadante que contenían 1 mg de proteína a tubos de borosilicato que fueron previamente preparados con el siguiente medio de incubación: 2-mercaptoetanol 1 mM, pargilina 0.3 mM, 6-metil 5,6,7,8 tetrahidrobiopterina (6-MPH₄) 0.16 mM, L-Trp 0.088 mM, catalasa 10 µg, tris acetato de sodio 50 mM, pH 7.6, para completar un mililitro de volumen final. En cada ensayo se incluyeron: a) muestras del mismo volumen del sobrenadante, incubado sin sustrato, para corregir por los 5-hidroxiindoles endógenos; b) muestras conocidas de 5-HT (100 ng) para determinar el porcentaje de 5-HT

perdida durante todo el procedimiento bioquímico (estándar interno); c) tubos blanco sin la enzima para medir la fluorescencia inespecífica de los reactivos.

Después de 30 minutos de incubación a 37 °C en un baño metabólico de Dubnoff, en agitación constante, la reacción enzimática se paró por desnaturalización térmica de las proteínas a 100 °C durante 5 minutos, la mezcla fue transferida a tubos de polipropileno, los tubos de la reacción enzimática se lavaron con un mililitro de agua bidestilada, la cual se añadió a la mezcla de incubación. Las proteínas desnaturalizadas se separaron por centrifugación en una centrifuga Sorvall RC-2 a 7000 g, durante 10 minutos a 4 °C. 0.5 ml de éste sobrenadante fue transferido a tubos de borosilicato que contenían 0.1 ml de una solución de cisteína al 1%, se les añadió 1.15 ml de HCl 10 N, se agitó vigorosamente en un agitador Vortex y para obtener la fluorescencia se les agregó 0.5 de ml de ortoftaldialdehído (OPT) al 0.004% p/v en HCl 10 N y se calentaron las muestras a 80 °C durante 15 minutos.

Al enfriarse los tubos de la reacción enzimática a temperatura del ambiente, la fluorescencia se midió en un espectrofluorómetro Perkin Elmer LS-3 a 360 de excitación y 470 de emisión. La actividad de la enzima fue expresada como la cantidad de 5-hidroxiindoles producidos en nanomoles por miligramo de proteína por hora.

3.2.4. Determinación de glucosa en el plasma.

A 10 µl de suero que se les adicionó dos mililitros del reactivo de glucosa oxidasa (89), el cual está formado de los siguientes reactivos: 4-aminoantipirina

0.2 mM; 2,4 diclorofenol sal de sodio 0.2 mM; glucosa oxidasa bacteriana 5000 UI/L; peroxidasa de rábano 500 UI/L; mutarrotasa 100 UI/L, en una solución amortiguadora de fosfatos 0.05 M, pH 7. La reacción fue incubada a temperatura del ambiente durante 20 minutos. Al término de este tiempo la reacción se leyó en un espectrofotómetro DU 650 Beckman a 500 nm. Además en cada ensayo se realizó una curva estándar de glucosa y la concentración de glucosa se expresó en mmol/L.

3.2.5. Determinación de albúmina en el plasma.

La albúmina se cuantificó mediante el método espectrofotométrico de Doumas y col (90). A 25 µl de plasma se les adicionó 5 ml de una solución de trabajo, la cual se formó con de verde de bromocresol 0.60 mM en una solución amortiguadora de ácido succínico 0.10 M, pH 4.2, más triton x 100, 1.5 ml por cada 1000 ml de solución de coloración. Los tubos con la reacción fueron incubados durante 10 minutos a 25 °C en un baño metabólico (Dubnoff). La reacción se leyó en un espectrofotómetro DU 650 Beckman a 628 nm. En cada ensayo se incluyó una curva estándar de albúmina bovina y la concentración de la albúmina se expresó en gramos por decilitro.

3.2.6. Determinación de los ácidos grasos libres.

Los ácidos grasos libres se cuantificaron mediante el método espectrofotométrico de Falholt y col (91). A 50 µl de plasma se les adicionó un ml de una solución amortiguadora de fosfatos 0.05 M, pH 6.4 y 6 ml de una mezcla

de cloroformo-heptano-metanol (CHM), en tubos de polietileno con tapa. Se agitaron vigorosamente durante 90 segundos, se dejaron en reposo aproximadamente 15 minutos. Posteriormente los tubos de la reacción fueron sometidos a centrifugación a 4000 g, durante 20 min a 4 °C. Después la solución amortiguadora fue separada cuidadosamente y 5 ml de la fase CHM se les agregó 2 ml del reactivo $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ -trietanolamina, los tubos fueron agitados durante 5 minutos. Las muestras fueron centrifugadas 4000 g, 5 minutos y 3 ml de la fase superior fue transferida a tubos de borosilicato que contenían 5 ml del reactivo de 1,5-difenilcarbocida en etanol 0.04% p/V. La mezcla se leyó en un espectrofotómetro DU 650 Beckman a 550 nm de excitación. En cada ensayo se incluyó una curva estándar. La concentración de AGL en el plasma fue expresada en mmol/L.

4. RESULTADOS

La concentración de glucosa en el plasma de los grupos experimentales se muestra en la tabla 2. Como se puede ver, el grupo D tuvo un aumento significativo de este parámetro a partir del séptimo día de la aplicación de la STZ en comparación con el grupo C ($P < 0.001$). El mismo aumento se observó en el grupo CE ($P < 0.05$), sin embargo el aumento fue mayor en el grupo diabético en relación con el grupo CE ($P < 0.001$) y se hace notar que el grupo D, mostró un aumento significativo de la concentración de glucosa en relación con el tiempo de evolución de la enfermedad en comparación con el grupo CE y C ($P < 0.001$).

de cloroformo-heptano-metanol (CHM), en tubos de polietileno con tapa. Se agitaron vigorosamente durante 90 segundos, se dejaron en reposo aproximadamente 15 minutos. Posteriormente los tubos de la reacción fueron sometidos a centrifugación a 4000 g, durante 20 min a 4 °C. Después la solución amortiguadora fue separada cuidadosamente y 5 ml de la fase CHM se les agregó 2 ml del reactivo $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ -trietanolamina, los tubos fueron agitados durante 5 minutos. Las muestras fueron centrifugadas 4000 g, 5 minutos y 3 ml de la fase superior fue transferida a tubos de borosilicato que contenían 5 ml del reactivo de 1,5-difenilcarbocida en etanol 0.04% p/V. La mezcla se leyó en un espectrofotómetro DU 650 Beckman a 550 nm de excitación. En cada ensayo se incluyó una curva estándar. La concentración de AGL en el plasma fue expresada en mmol/L.

4. RESULTADOS

La concentración de glucosa en el plasma de los grupos experimentales se muestra en la tabla 2. Como se puede ver, el grupo D tuvo un aumento significativo de este parámetro a partir del séptimo día de la aplicación de la STZ en comparación con el grupo C ($P < 0.001$). El mismo aumento se observó en el grupo CE ($P < 0.05$), sin embargo el aumento fue mayor en el grupo diabético en relación con el grupo CE ($P < 0.001$) y se hace notar que el grupo D, mostró un aumento significativo de la concentración de glucosa en relación con el tiempo de evolución de la enfermedad en comparación con el grupo CE y C ($P < 0.001$).

La tabla 3 muestra la cantidad de alimento que comieron las ratas en 24 horas. Como se puede ver, el grupo C comió 24.10 ± 0.663 g al inicio y 32.25 ± 1.500 g a los 21 días del estudio. Además se observa en la misma tabla la ingesta de alimento que comió el grupo CE, fue similar al grupo C. Interesantemente, el grupo diabético comió más alimento que el grupo C y CE durante todo el período estudiado ($P < 0.001$).

La tabla 4 muestra el peso corporal que fue significativamente menor en el grupo diabético desde el día séptimo de la aplicación del tóxico ($P < 0.05$), el déficit fue de 16, 37 y 56% a los 7, 14 y 21 días respectivamente en comparación a los grupos CE y C ($P < 0.001$).

La albúmina en el plasma se muestra en la tabla 5. Existió una disminución significativa de esta proteína en el grupo D en comparación a los grupos CE y C durante todo el estudio ($P < 0.05$), de la misma manera que el peso corporal, la concentración de albúmina mostró un descenso significativo en relación con el tiempo de evolución de la aplicación de STZ en comparación a los grupos CE y C ($P < 0.001$).

La concentración de AGL en el plasma se ilustra en la tabla 6. Como se puede apreciar el grupo D mostró una elevación significativa a partir del día séptimo en comparación con los grupos CE y C ($P < 0.05$). Además estos animales diabéticos mostraron un incremento significativo de este parámetro en relación con el tiempo de la evolución de la DM ($P < 0.001$).

Uno de los parámetros bioquímicos más importantes que se midió en el presente trabajo fue la concentración del L-Trp en el plasma. En lo que respecta a

la fracción libre y unida a albúmina del aminoácido, el grupo diabético mostró un descenso significativo a partir del día séptimo de la aplicación de STZ en comparación a los grupos CE y C ($P < 0.05$) (Figura 1). Además, interesantemente estos animales diabéticos, también tuvieron una disminución significativa de la concentración del L-Trp total en relación con los grupos CE y C durante todo el estudio ($P < 0.001$).

La concentración del L-Trp en el cerebro se ilustra en la Figura 2. Como se puede observar el grupo D mostró un descenso significativo en el tallo cerebral, hipotálamo y en la corteza cerebral a partir del séptimo día de la aplicación de STZ en comparación con los grupos CE y C ($P < 0.05$) y se hace notar que la disminución del aminoácido fue mayor al día 21 de la evolución de la enfermedad de estos animales diabéticos ($P < 0.001$).

La actividad específica de la TrpOH, paso limitante de la biosíntesis de serotonina cerebral, expresada en nmoles de 5-hidroxiindoles/mg de proteína/h, se muestra en la Figura 3. El grupo D, mostró un descenso significativo de la actividad de la enzima en la corteza cerebral a partir del séptimo día en comparación a los grupos CE y C ($P < 0.05$). La misma disminución fue observada en el tallo cerebral al séptimo día en estos animales diabéticos ($P < 0.05$). Además, en la misma figura se puede observar que los grupos D y CE tuvieron un aumento significativo de la actividad de la TrpOH en el tallo cerebral a partir del día 14 de la aplicación del tóxico ($P < 0.05$). Interesantemente, la actividad de la enzima en el grupo diabético siempre estuvo significativamente más alta en comparación con los grupos CE en los días 14 y 21 del estudio ($P < 0.001$).

La Figura 4 muestra los niveles del neurotransmisor, 5-HT en el cerebro. Como se puede ver el grupo D, tuvo un descenso significativo de la síntesis de serotonina en el hipotálamo y en la corteza cerebral en relación con los grupos CE y C ($P < 0.05$). La misma disminución se observó al séptimo día de la aplicación de la STZ en el tallo cerebral de los diabéticos ($P < 0.05$) y de la misma forma que la actividad de la TrpOH, se apreció un aumento significativo de la concentración de 5-HT en el tallo cerebral de los grupos D y CE a partir del día 14 de la aplicación del tóxico en comparación al grupo C ($P < 0.001$). Sin embargo, es importante hacer notar que el aumento del neurotransmisor observado en el tallo cerebral de los diabéticos siempre fue mayor que la del grupo CE a los 14 y 21 días de la evolución de la DM ($P < 0.001$).

5. DISCUSION.

Los presentes resultados confirman que la STZ produce una elevación de la concentración de glucosa en la sangre, probablemente debido a la ausencia de insulina circulante, que a su vez es el resultado del efecto tóxico que tiene sobre las células β de los islotes del páncreas, como ha sido demostrado por otros autores (92, 93). Se ha reportado que el efecto tóxico es a través de su unión a receptores específicos localizados en la membrana celular; la presencia de una molécula de glucosa en la estructura química de la STZ aumenta su captación por la célula β y de este modo eleva su capacidad de destrucción celular. Una vez que la STZ ingresa a las células β , produce una disminución de la síntesis y un aumento de la degradación de NAD. La baja de la concentración de NAD en las

La Figura 4 muestra los niveles del neurotransmisor, 5-HT en el cerebro. Como se puede ver el grupo D, tuvo un descenso significativo de la síntesis de serotonina en el hipotálamo y en la corteza cerebral en relación con los grupos CE y C ($P < 0.05$). La misma disminución se observó al séptimo día de la aplicación de la STZ en el tallo cerebral de los diabéticos ($P < 0.05$) y de la misma forma que la actividad de la TrpOH, se apreció un aumento significativo de la concentración de 5-HT en el tallo cerebral de los grupos D y CE a partir del día 14 de la aplicación del tóxico en comparación al grupo C ($P < 0.001$). Sin embargo, es importante hacer notar que el aumento del neurotransmisor observado en el tallo cerebral de los diabéticos siempre fue mayor que la del grupo CE a los 14 y 21 días de la evolución de la DM ($P < 0.001$).

5. DISCUSION.

Los presentes resultados confirman que la STZ produce una elevación de la concentración de glucosa en la sangre, probablemente debido a la ausencia de insulina circulante, que a su vez es el resultado del efecto tóxico que tiene sobre las células β de los islotes del páncreas, como ha sido demostrado por otros autores (92, 93). Se ha reportado que el efecto tóxico es a través de su unión a receptores específicos localizados en la membrana celular; la presencia de una molécula de glucosa en la estructura química de la STZ aumenta su captación por la célula β y de este modo eleva su capacidad de destrucción celular. Una vez que la STZ ingresa a las células β , produce una disminución de la síntesis y un aumento de la degradación de NAD. La baja de la concentración de NAD en las

células, produce un aumento de la susceptibilidad al tóxico, por lo tanto, se produce muerte celular (94). De tal modo que al existir más del 80 a 90% de necrosis de las células β , la síntesis y liberación de insulina es mínima o nula y por lo tanto se produce DM (92-94).

La insulina es la principal hormona que suprime la producción hepática de glucosa, la lipólisis y la proteólisis. Mantiene en rangos normales la concentración de glucosa sanguínea de 4.4 a 5.3 mM, mediante una regulación de la liberación de glucosa hepática a un ritmo de 1.9 a 2.1 mg/min; también permite la utilización periférica de glucosa por los tejidos. Después de una comida se ha observado que el 85% de la glucosa procedente de la ingesta de los alimentos, ingresa a la circulación sistémica, tiene una importancia crucial, pues proporciona la cantidad suficiente de glucosa al cerebro, que aproximadamente es el 50% de glucosa en estas condiciones basales (7, 14). Además se ha demostrado que si la concentración de glucosa arterial aumenta, se produce una elevación de la secreción de insulina a la vena porta. Aproximadamente el 50% de ésta insulina es utilizada en el hígado; la insulina no metabolizada en el tejido hepático ingresa a la circulación sistémica y estimula la captación de glucosa por los tejidos (1, 7, 14, 15, 95).

Por otro lado, si la entrada de glucosa a la circulación sistémica es continua, permite un cambio de la producción endógena de glucosa a la exógena. Sin embargo, al existir una disminución de la entrada de glucosa a la sangre se produce un aumento de la producción de glucosa hepática, tanto por la

disminución de la concentración de insulina plasmática como por el aumento de la concentración de otras hormonas contrarreguladoras que mantiene la homeostasis de la glucosa en el organismo (7, 14, 15, 95).

Por lo tanto, al no existir insulina se produce DM. Se ha demostrado que la DM produce una serie de cambios en el metabolismo basal, que pueden ser englobados en generales y específicos. En cuanto a los cambios generales se encuentran las alteraciones del metabolismo de los carbohidratos, lípidos y proteínas (1, 7, 14). Además, existen otras modificaciones hormonales características de la enfermedad, entre estas se encuentra la elevación plasmática del cortisol durante la fase inactiva circadiana, el aumento de epinefrina, norepinefrina, dopamina- β -hidroxilasa, la elevación de la excreción urinaria de norepinefrina, disminución de la concentración de hormona del crecimiento, luteinizante y hormona estimulante del tiroides (96-101).

Por lo que corresponde a los cambios bioquímicos en el metabolismo de los carbohidratos en los diabéticos, se ha observado que tienen por lo general una hiperglicemia, debido a la falta de supresión de la producción de glucosa a nivel del tejido hepático, un bloqueo de la utilización de glucosa en las células de los tejidos y un aumento por la ingesta de los alimentos (1, 7, 15, 16). En nuestro estudio observamos, que los animales diabéticos tuvieron una hiperglicemia y que comieron más alimento cada 24 h durante el período estudiado. Además, interesantemente este aumento fue mayor a medida que la enfermedad progresa.

Por lo que se confirma que la hiperglucemia y la polifagia son eventos frecuentemente observados en los diabéticos.

En cuanto al metabolismo de los lípidos, se sabe que la falta de insulina en los diabéticos origina una movilización de la grasa del tejido adiposo, aumenta la concentración plasmática de los AGL, lípidos totales y colesterol. - La mayor disponibilidad de los AGL en el organismo producen un aumento de la beta oxidación y una elevación de la concentración de Acetil CoA, una inhibición de la piruvato deshidrogenasa y una elevación del ciclo de Krebs. Además se elevan los cuerpos cetónicos, betahidroxibutirato y acetoacetato. Los cuerpos cetónicos son moléculas bioquímicas que son utilizadas como fuente de energía, tanto por las células del tejido nervioso como por las células musculares, el inconveniente que tienen es que son sustancias relativamente ácidas, capaces de cambiar el medio interno del organismo hacia la acidosis (15, 17, 18, 95, 102, 103).

Al mismo tiempo, los individuos diabéticos tienen un balance entre la glucemia y la cetonemia, a valores muy elevados de glucemia le corresponde a menudo una cetonemia elevada y viceversa. Además, existe una estrecha relación entre la concentración de los cuerpos cetónicos. betahidroxibutirato y acetoacetato con la degradación del tejido adiposo (15, 17, 18, 95, 102, 103). Los animales diabéticos de nuestro estudio mostraron una elevación de la concentración de los AGL en el plasma, como resultado de la falta de insulina, este hallazgo bioquímico corrobora que la insulina es la principal hormona que mantiene el metabolismo de los lípidos en el organismo.

Otro cambio interesante que se desarrolla durante la evolución de la DM tipo I es la desnutrición crónica, proteínico energética, probablemente secundaria a la falta de utilización de los nutrimentos por las células del organismo. Al no existir insulina, la entrada de glucosa a las células se bloquea, produce hiperglicemia sanguínea, debido a la disminución de la oxidación de glucosa por los tejidos, un aumento en la producción de glucosa hepática y una elevación de la ingesta de alimentos por estos individuos. Pero a pesar de este hecho, se desencadena una gluconeogénesis elevada a partir del catabolismo de las proteínas, principalmente del tejido muscular (15, 16, 104). Por otro lado se ha observado que si la concentración de glucosa en la sangre sobrepasa el umbral renal, se excreta por la orina, que da como resultado poliuria y polidipsia, que en un individuo diabético puede perder más de 1,500 calorías al día por la glucosuria. Por lo tanto, al reducirse los depósitos de grasas y proteínas debido al aumento en la lipólisis y proteólisis, sobreviene la pérdida de peso (95, 105, 106). Nuestros resultados de peso corporal y la concentración de albúmina en el plasma observados en los animales diabéticos, confirman una vez más que la DM desencadena una desnutrición crónica, proteínico energética, independientemente, de que los animales diabéticos comieron más alimento.

La hipótesis del presente trabajo fue que la DM en las ratas produce una disminución de la síntesis de serotonina cerebral a través de la disminución de la concentración, de la FL, del L-Trp en el plasma. Los resultados de las determinaciones bioquímicas efectuadas en los animales diabéticos, confirman dicha hipótesis. Existe pues en estos animales diabéticos una disminución

significativa de la FL en la sangre. El grado de unión que tiene la FL del L-Trp a la albúmina es la condición bioquímica que hace que aumente o disminuya su nivel plasmático. Además, existen otros factores metabólicos que contribuyen a modificar la disponibilidad de la FL del L-Trp plasmático, entre ellos se encuentra la concentración de albúmina y la cantidad de AGL en la sangre (57, 58, 61, 62, 107, 108). Por lo tanto, estos mecanismos pueden regular la cantidad de la FL del L-Trp plasmático disponible para su paso a través de la BHE, por un mecanismo de transporte activo que está mediado por un sistema de transporte membranar al tejido nervioso en donde es captado por las neuronas serotoninérgicas. De este modo estimula o disminuye la síntesis del neurotransmisor, serotonina (61-63, 107, 108).

Interesantemente en nuestro estudio, observamos que los animales diabéticos, mostraron una menor concentración del L-Trp en la sangre, tanto la FL como la unida a albúmina y el total; independientemente de que tuvieron una elevación de la concentración de los AGL, que se sabe compiten con el L-Trp para unirse a la albúmina, de esta forma aumenta la concentración de la FL del L-Trp, además de que los animales diabéticos comieron más alimento que los controles en 24 horas, en teoría se esperaría que los animales diabéticos tuvieran una mayor concentración de aminoácidos en la sangre, incluyendo los ANN y el L-Trp, sin embargo observamos una disminución del L-Trp en el plasma. Estos hallazgos en conjunto nos permite plantear, que la concentración del L-Trp en la vena porta de los animales diabéticos es mayor a la que se observa en los vasos sanguíneos, probablemente refleja una mayor actividad del tejido hepático, como mecanismo

compensador que se desencadena durante la evolución crónica de la enfermedad. Por otro lado se ha observado que bajo ciertas circunstancias de estrés o durante la evolución de la DM existe un aumento de la actividad de la triptofano pirrolasa hepática (Trp P) (109-113).

La TrpP hepática es una enzima que participa activamente en la regulación de la gluconeogénesis; en la síntesis de NAD; en el metabolismo del grupo hem y puede influir en la relación de la FL y unida a albúmina del L-Trp en el plasma. Así mismo existe evidencia experimental que apoya que la enzima es activada a través del L-Trp o bien por el cortisol (109, 110). Por otro lado se ha señalado que durante la evolución de la DM, existe una mayor actividad de la enzima, acompañada de una activación de las vías bioquímicas del ácido cinurénico y nicotínico en el hígado (113). Los resultados observados en este estudio sugieren que los animales diabéticos tienen un aumento de la actividad de la TrpP, como mecanismo compensador que puede explicar la disminución del L-Trp en la sangre, tiende a desviar el aminoácido a otras vías metabólicas como ha sido señalado anteriormente (ácido nicotínico y cinurénico), de esta manera participa en la disminución de la disponibilidad de la FL del L-Trp en la sangre y su ingreso al cerebro a través de la BHE para la síntesis del neurotransmisor, serotonina.

Otro cambio metabólico importante que se produce durante la evolución de la DM es el aumento del catabolismo de las proteínas (95, 104), los aminoácidos producto de la degradación, por un lado son usados como fuente de energía al ingresar al ciclo de krebs a través de la gluconeogénesis y por el otro aumentan la concentración de aminoácidos en la sangre (7, 15, 95, 114, 115). En especial un

grupo importante de AAN (115, 116), que compiten con la FL del L-Trp por el mismo transportador en los capilares de la BHE (20-22, 117), Femstrom y col (20-22) han postulado que para que haya un mayor paso del L-Trp al cerebro, el grupo de AAN debería de estar disminuido en la sangre o viceversa, es decir, ha mayor concentración de AAN en el plasma menor paso del L-Trp al SNC. En nuestro estudio no se midió la concentración de AAN en la sangre de los diabéticos, sin embargo se ha señalado que los animales diabéticos mostraron una menor concentración de la FL del L-Trp, lo que hace plantear que la relación de la FL del L-Trp/AAN, en este caso parece ser un factor importante que regula el ingreso del L-Trp al cerebro. Aspecto que se está estudiando en nuestro laboratorio.

Además de los cambios generales del metabolismo, la DM también es capaz de producir modificaciones metabólicas más específicas en el SNC. Una de estas alteraciones es el que se ha planteado para el sistema serotoninérgico en el cerebro de rata diabética, se ha sugerido que probablemente exista una menor concentración de serotonina, secundaria a una disminución de la concentración de la FL del L-Trp plasmático (77-79, 82). este aminoácido esencial es el precursor de la síntesis de la 5-HT cerebral. La concentración de L-Trp libre en el plasma, es la condición bioquímica que hace que aumente o disminuya su paso al cerebro a través de la BHE al tejido nervioso en donde es captado por las neuronas serotoninérgicas para la síntesis del neurotransmisor (61, 62). En este estudio observamos que los animales diabéticos mostraron una menor concentración de la FL del L-Trp plasmático, que correlacionó negativamente con la concentración de glucosa en la sangre y reflejó el estado de severidad de la enfermedad, así como

una disminución de la concentración del L-Trp en el SNC. Lo que se confirmó en el cerebro de estos animales diabéticos, además mostraron una menor actividad de la enzima limitante, TrpOH y una disminución de la síntesis de 5-HT, en varias regiones discretas del cerebro (corteza cerebral, tallo cerebral e hipotálamo).

La secuencia de estos resultados confirma que los diferentes componentes bioquímicos de la vía metabólica serotoninérgica, el L-Trp cerebral, la actividad de la enzima limitante de la cadena, TrpOH y el neurotransmisor, serotonina, se encuentran disminuidos y que existe una alteración de la regulación de la actividad metabólica de esta vía bioquímica, ocasionada probablemente por una disminución de la FL del L-Trp en el plasma.

Sin embargo, interesantemente observamos que los animales diabéticos tuvieron un aumento de la actividad de la TrpOH en el tallo cerebral durante la evolución de la DM. independientemente de que la concentración del L-Trp fue menor en esta región cerebral, acompañada de un aumento de la síntesis de serotonina. Estos hallazgos en conjunto nos permiten plantear que probablemente los mecanismos bioquímicos que regulan la actividad de la TrpOH, parece no depender de la concentración del sustrato, el L-Trp. Podría tratarse de un cambio de la actividad de la enzima, similar a lo observado en los animales tratados con una dieta deficiente en L-Trp o mediante la administración de cargas de cloroimipramina y de AAN (69, 118, 119). En estos animales se ha reportado un cambio cinético de la TrpOH, que mantiene la concentración de 5-HT en el tejido nervioso, cuyo mecanismo bioquímico hasta el momento se desconoce. Es

probable que sea debido a dos mecanismos: uno sería el aumento de la síntesis de la proteína enzimática y el otro un cambio cinético de la TrpOH (119).

En cuanto a los mecanismos que están involucrados en la regulación de la síntesis de 5-HT en el SNC. Arbitrariamente se han englobado en tres grupos: El primero corresponde a los cambios de la disponibilidad del sustrato, tanto a nivel de la sangre como en el transporte a través de la BHE y su compartimentalización en el tejido nervioso. Por ello, cambios en la disponibilidad del L-Trp, rápidamente aumenta o disminuye la síntesis del neurotransmisor (57, 61, 120).

El segundo grupo lo constituye los mecanismos que regulan la actividad de la TrpOH para hidroxilar el L-Trp, entre estos factores se encuentra la disponibilidad del oxígeno, la concentración del cofactor BH₄, el medio iónico del tejido, así como la concentración de la proteína y los diferentes mecanismos que intervienen en su regulación que son: inhibición por producto final, 5-HT, cambios en la cinética y aumento de la concentración de moléculas de la enzima. Los primeros cambios se observan en forma inmediata y el último se presenta después de 24 horas del estímulo de activación (121, 122).

El tercer grupo de factores que intervienen en la regulación de la TrpOH son los mecanismos de autorregulación de la propia neurona serotoninérgica mediante autoreceptores específicos para la 5-HT. Los autoreceptores pertenecen al subgrupo 5-HT₁, los cuales han sido identificados mediante técnicas de autorradiografía con ligandos específicos. Estos métodos bioquímicos han permitido conocer su distribución a nivel del soma y dendritas de las células serotoninérgicas (123-125). Así mismo han demostrado que entre las neuronas de

los núcleos serotoninérgicos del ráfe existen contactos sinápticos dendo-dendritas y con axones terminales. Además, que en estos contactos sinápticos se encuentran todos los elementos de la maquinaria biosintética de la 5-HT cerebral (37).

Además se ha demostrado que cambios rápidos y reversibles del impulso nervioso en el interior de la célula serotoninérgica, activan mecanismos de fosforilación de la TrpOH; esta fosforilación fue observada cuando homogeneizados de tallo cerebral de rata adulta fueron incubados en un medio compuesto de adenosin trifosfato, magnesio y calcio; con esta maniobra experimental se demostró un aumento de la actividad de la enzima. Este hallazgo recientemente fue confirmado, se demostró que en este mecanismo de fosforilación interviene una proteína cinasa II Ca^{++} /calmodulina dependiente. Así mismo el adenosin monofosfato cíclico y la proteína cinasa C, dependiente de Ca^{++} /fosfatidilserina y la proteína cinasa dependiente de guanosin monofosfato cíclico, también tienen la capacidad de fosforilar a la TrpOH (126-128).

En relación con estos mecanismos de regulación de la TrpOH, nosotros recientemente hemos reportado que la desnutrición *in utero* produce un aumento de la afinidad de la TrpOH por el L-Trp y una mayor capacidad de fosforilación por segundos mensajeros (128). Además, interesantemente estos animales desnutridos *in utero* y que son recuperados nutricionalmente durante el período de amamantamiento, tuvieron una recuperación física completa y un retorno a lo normal del L-Trp en el plasma y en el tejido cerebral. Pero a pesar de este hecho la actividad de la TrpOH permaneció elevada y persistió un aumento del

neurotrasmisor en el cerebro (129, 130). Estos hallazgos nos permiten plantear que probablemente también la DM puede inducir un cambio cinético de la TrpOH, como mecanismo que explique la elevación del neurotrasmisor en el tallo cerebral durante la evolución crónica de la enfermedad. Lo que sugiere que también en este caso, el estudio de la cinética de la TrpOH es importante, aspecto que se está estudiando en nuestro laboratorio. Así mismo estamos estudiando el efecto del tratamiento de insulina en estos animales diabéticos, resultados preliminares indican que la hormona revierte los cambios bioquímicos producidos por la DM, excepto que parece persistir un aumento del nivel del neurotrasmisor en el cerebro, lo que sugiere que en este caso, la disfunción cerebral asociada a la neurotrasmisión serotoninérgica modificada por la DM permanece a pesar del tratamiento específico.

En conclusión tenemos que la DM induce importantes cambios en la biosíntesis de un neurotrasmisor clave en el funcionamiento cerebral que es la serotonina. Este estudio abre la posibilidad de determinar las fracciones plasmáticas del L-Trp en humanos diabéticos en particular la fracción libre del aminoácido, como indicador clínico del metabolismo de la serotonina cerebral, tal como lo hemos hecho en humanos recién nacidos y lactantes con desnutrición intrauterina (131, 132).

6. RESUMEN

Introducción: Existe controversia de cómo la diabetes mellitus (DM) produce cambios en la síntesis de serotonina cerebral (5-hidroxitriptamina, 5-HT). Se ha observado una disminución de la fracción libre del L-triptofano (L-Trp) en el plasma y una disminución del aminoácido en el cerebro y probablemente una disminución de la síntesis de 5-HT.

Objetivo. Determinar si las ratas con DM tienen una menor síntesis de serotonina cerebral a través de la disminución de la FL del L-Trp en el plasma

Material y métodos. Ratas macho, cepa Wistar de 250 g de peso, adaptadas durante 2 semanas a condiciones ambientales estándar. Al término de este período las ratas fueron divididas en tres grupos. El primero lo formó ratas diabéticas (D), por la administración de estreptozotocina. El segundo lo constituyó el control de estrés (CE) y el tercero fue el grupo control (C). A los 7, 14 y 21 días después de la administración del tóxico, se les determinó las concentraciones séricas de glucosa, albúmina y L-Trp total y libre. A nivel del cerebro se les cuantificó la actividad de la triptofano-5-hidroxilasa (TrpOH) y las concentraciones de L-Trp y 5-HT. Además se efectuaron mediciones de peso corporal.

Resultados. Los animales diabéticos mostraron una disminución del peso corporal. En el plasma tuvieron una elevación de la glucosa y de los AGL, una disminución de las concentraciones de albúmina y de las fracciones libre, unida y total del L-Trp en comparación a los controles ($P < 0.001$). A nivel del cerebro tuvieron una disminución del L-Trp en la corteza cerebral, tallo cerebral e hipotálamo ($P < 0.05$) y en cuanto a la actividad de la TrpOH se observó una

disminución de la actividad en la corteza cerebral y una disminución de la 5-HT durante todo el periodo estudiado. Interesantemente la actividad de la enzima fue más alta en el tallo cerebral a partir del día 14 de evolución de la enfermedad ($P < 0.001$), acompañada de un aumento de la síntesis del neurotransmisor ($P < 0.05$).

Discusión. Los presentes resultados confirman que la DM produce una desnutrición crónica y una disminución de la FL del L-Trp en el plasma. La baja del aminoácido sugiere que su paso al cerebro está disminuido y que hay una disminución de la síntesis de 5-HT, tal como se confirmó en el cerebro de estos animales diabéticos. Por lo tanto, proponemos que la fracción libre del L-Trp puede ser un indicador de la síntesis de 5-HT cerebral en estos animales diabéticos.

7. BIBLIOGRAFIA

1. Unger RH, Foster DW. Diabetes Mellitus. En Wilson JD, Foster DW, eds: Williams textbook of Endocrinology 8th ed. Pennsylvania: Saunders Company, 1995: 1255-333.
2. The expert committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus. Report of the expert committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus. Diabetes Care 1997; 20: 1183-97.
3. Secretaria de Salud. Encuesta Nacional de Enfermedades Crónicas. México D.F. 1993: 10-5.
4. Serrano RM, Gutiérrez LMD. Epidemiología de la diabetes insulino dependiente. Conceptos nuevos e ideas antiguas. En Rull, Zorrilla, Jadzinsky, Santiago, eds: Diabetes Mellitus Complicaciones Crónicas. 1^a ed. México: McGraw-Hill, 1992: 17-29.
5. Sperling MA. Predicting and preventing diabetes mellitus. En: Serono Symposia, USA, eds: A current review of pediatric endocrinology. USA. Serono, 1995: 225-35.
6. Winter WE, Chihara T, Schatz D. The genetics of autoimmune diabetes. AJDC 1993; 147: 1282-90.
7. American Association Diabetes. Medical Management of Insulin-Dependent (type 1) Diabetes. En ADA Inc eds: 2th, Alexandria, VA 22314. 1994, 3-12.
8. Eisenbarth GS. Type I diabetes mellitus. A chronic autoimmune disease. N Engl J Med 1986; 31: 1360-8.
9. Botazzo GF, Bosi E, Bonifacio E, Mirakian R, Todd I, Pujol-Borrell R. Pathogenesis of type I (insulin-dependent) diabetes: Possible mechanisms of autoimmune damage. Br Med Bull 1989; 45: 37-57.
10. Leslie RDG, Lazarus NR, Vergani D. A etiology of insulin-dependent diabetes. Br Med Bull 1989; 45: 58-72.

11. Moutschen MP, Scheen AJ, Lefebvre PJ. Impaired immune responses in diabetes mellitus: analysis of the factors and mechanisms involved. Relevance to the increased susceptibility of diabetic patients to specific infections. *Diabetes Metab* 1992; 18: 187-201.
12. Hashimoto S, Michalski JP, Berman MA, McCombs CC. Mechanism of a lymphocyte abnormality associated with HLA-B8/DR3: role of interleukin-1. *Clin Exp Immunol* 1990; 79: 227-32.
13. Ruben FL, Fireman P, Laporte RE, Drash AL, Uhrin M, Vergona R. Immune response to killed influenza vaccine in patients with type I diabetes: altered responses associated with HLA-DR3 and DR4. *J Lab Clin Med* 1988; 112: 595-602.
14. Cryer PE. Glucose homeostasis and hypoglycemia. En Wilson JD, Foster DW, eds: *Williams textbook of Endocrinology*. 8th ed. Pennsylvania: Saunders Company, 1995, 1223-53.
15. DeFronzo RA. Pathogenesis of type 2 diabetes: metabolic and molecular implications for identifying diabetes genes. *Diabetes Rev* 1997; 5: 177-269.
16. Ake L. Etiology, pathogenesis and natural history DMID. En DeGroot LJ, ed: *Endocrinology*. Pennsylvania: Saunders Company, 1995: 2: 1423-35.
17. Sperling MA. Diabetic ketoacidosis. *Pediatr Clin North Am* 1984; 31: 591-610.
18. Yki-Jarvinen H, Taskinen MR. Interrelationships among insulin's antilipolytic and glucoregulatory effects and plasma triglycerides in nondiabetic and diabetic patients with endogenous hypertriglyceridemia. *Diabetes* 1991; 37: 1271-8.
19. Bratton SL, Krane EJ. Diabetic ketoacidosis; pathophysiology, management and complications. *Intensive Care Med* 1992; 7: 199-211.
20. Fernstrom JD, Wurtman RJ. Brain serotonin content: Physiological regulation by plasma neutral amino acids. *Science* 1972; 178: 414-6.
21. Fernstrom JD, Faller DV. Neutral amino acid in the brain changes in response to food ingestion. *J Neurochem* 1978; 30: 1531-8.

22. Fernstrom JD, Faller DV, Shabshelowitz H. 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* 1975; 36: 113-21.
23. Jacobs BL, Azmitia EC. Structure and function of the brain serotonin system. *Physiol Rev* 1992; 72: 165-229.
24. Dahlstrom A, Fuxe K. Evidence for the existence of monoamine containing neurons in the central nervous system. *Acta Physiol Scand* 1964; 62: suppl 232, 1-55.
25. Takahashi H, Nakashima S, Ohama E, Takeda S, Ikuta F. Distribution of serotonin-containing cell bodies in the brainstem of the human fetus determined with immunohistochemistry using antiserotonn serum. *Brain Dev* 1986; 8: 355-65.
26. Levitt P, Moore RY. Developmental organization of raphé serotonin neuron groups in the rat. *Ant Embryol* 1978; 154: 241-51.
27. Steinbusch HWM. Distribution of serotonin-immunoreactivity in the central nervous system of the rat-cell bodies and terminals. *Neurosci* 1981; 4: 557-618.
28. Lidov HG, Molliver ME. Immunohistochemical study of the development of serotonergic neurons in the rat CNS. *Brain Res Bull* 1982; 9: 559-604.
29. Bowker RM, Westlund KN, Coulter JD. Origins of serotonergic projections to the lumbar spinal cord in the monkey using a combined retrograde transport and immunocytochemical technique. *Brain Res Bull* 1982; 9:271-8.
30. Jacobs BL, Gannon PJ, Azmitia EC. Atlas of serotonergic cell bodies in the cat brainstem: an immunocytochemical analysis. *Brain Res Bull* 1984; 13: 1-31.
31. Nobin A, Bjorklund A. Topography of the monoamine neuron systems in the human brain as revealed in fetuses. *Acta Physiol Scand Suppl* 1973; 388: 1-40.
32. McCormick DA. Neurotransmitter actions in the thalamus and cerebral cortex and their role in neuromodulation of thalamocortical activity. *Prog Neurobiol* 1992; 39: 337-88.

33. Dori I, Dinopoulos A, Blue ME, Parnavelas JG. Regional differences in the ontogeny of the serotonergic projection to the cerebral cortex. *Exp Neurol* 1996; 138: 1-14.
34. Olson L, Seiger A. Early prenatal ontogeny of central monoamine neurons in the rat: fluorescence histochemical observations. *Z Ant Entwickl Gesh* 1972; 137: 301-16.
35. Olson L, Boréus LO, Seigar A. Histochemical demonstration and mapping of 5-hydroxytryptamine and catecholamine containing neuron systems in the human fetal brain. *Z Anat Entwickl Gesh* 1973; 139: 259-82.
36. Amin AH, Crawford TBB, Gaddum JH. The distribution of substance P and 5-hydroxytryptamine in the central nervous system of the dog. *J Physiol (Lond)* 1954; 126: 595-618
37. Beaudet A, Descarries L. The fine structure of central serotonin neurons. *J Physiol Paris* 1981; 77: 193-203.
38. Fillion MP, Hernández RJ, Bauguen C, Fillion G. Postnatal development of high affinity neuronal recognition sites for (³H) 5-HT in rat brain. *Dev Neurosci* 1982; 5: 484-91.
39. Peroutka SJ, Lebovitz RM, Snyder SH. Two distinct central serotonin receptors with different physiological function. *Science* 1982; 212: 827-9.
40. Haydon PG, McCobb DP, Kater SB. Serotonin selectively inhibits growth cone motility and synaptogenesis of specific identified neurones. *Science* 1984; 226: 561-4.
41. Mercado R, Hernández RJ. A molecular recognizing system of serotonin in rat fetal axonal growth cones: uptake and high affinity binding. *Dev Brain Res* 1992; 69: 133-7.
42. Gromová HA, Chubakov AR, Chumasov EI, Konovalov HV. Serotonin as a stimulator of hippocampal cell differentiation in tissue culture. *Int J Devl Neurosci* 1983; 1: 339-49.

43. Lauder JM, Wallace JA, Krebs H, Petrusz P. Serotonin as a timing mechanism in neuroembryogenesis. *En Progress in Psychoneuroendocrinology*. North Holland: Elsevier Biomedical Press, 1980: 539-55.
44. Jouvet M. Biogenic amines and the states of sleep. *Science* 1969; 163: 32-41.
45. Messing RB, Lytle LD. Serotonin containing neurons: Their possible role in pain and analgesia. *Pain* 1977; 4: 1-21.
46. Gorgnia K. Effects of repeated 5-hydroxytryptamine injection on temperature regulating the functional activity of brain 5-hydroxytryptamine. *Nature* 1976; 260: 487-91.
47. Shillito EE. The effects of p-chlorophenylalanine on social interaction of male rats. *Br J Pharmac* 1970; 36: 193.
48. Morley JE, Levine AS. Corticotrophin releasing factor, grooming and ingestive behavior. *Life Sci* 1982; 31: 1459-64.
49. Schildkraut JJ, Kety SS. Biogenic amines and emotion. *Science* 1967; 156: 21-30.
50. Shor-Posner G, Grinker AJ, Marinescu C, Brown O, Leibowitz FS. Hypothalamic serotonin in the control of meal patterns and macronutrient selection. *Brain Res Bull* 1986; 17: 663-71.
51. Van Praag HM, De Haan S. Central serotonin metabolism and frequency of depression. *Psychiatry Res* 1979; 1: 219-24.
52. Hernández RJ, Chagoya GG. Brain serotonin synthesis and Na⁺-K⁺ATPase activity are increased postnatally after prenatal administration of L-tryptophan. *Dev Brain Res* 1986; 25: 221-6.
53. Hernández RJ. Brain Na⁺-K⁺ ATPase activity possibly regulated by a specific serotonin receptor. *Brain Res* 1987; 408: 399-402.
54. Miller M, Leahy PJ, Stern CW, Morgane JP, Resnick O. Tryptophan availability: Relation to elevated brain serotonin in developmentally protein-malnourished rats. *Expl Neurol* 1977; 57: 142-57.

55. Perez-Cruet J, Tagliamonte A, Tagliamonte P, Gessa GL. Changes in brain serotonin metabolism associated with fasting and satiation in rats. *Life Sci* 1972; 11: 31-9.
56. Zeisel HS, Mauron C, Watkins CJ, Wurtman RJ. Developmental changes in brain indoles, serum tryptophan and other serum neutral amino acids in the rat. *Devel Brain Res* 1981; 1: 551-64.
57. McMenamy RH, Oncley JL. The specific binding of L-tryptophan to serum albumin. *J Biol Chem* 1975; 233: 1436-47.
58. Potiou P, Boulu R. Psychopharmacologie du tryptophane. *Path Biol* 1977; 25: 565-71.
59. Yuwiler A, Oldendorf WH, Geller E, Braun L. Effects of albumin and amino acid competition on tryptophan uptake into brain. *J Neurochem* 1977; 28: 1015-23.
60. Sorukes TL. Kinetics of tryptophan transport into the brain. *J Neural Transm. Suppl* 1977; 15: 107-14.
61. Tagliamonte A, Biggio G, Vargin L, Gessa GL. Free tryptophan in serum controls brain tryptophan level and serotonin synthesis. *Life Sci* 1973; 12: 277-87.
62. Fernstrom JD. Role of precursor availability in control of monoamine biosynthesis in brain. *Physiol Rev* 1983; 63: 484-546.
63. Spear LP, Scalzo FM. Ontogenetic alterations in the effects of food and/or maternal deprivation on 5-HT, 5-HIAA and 5-HIAA/5-HT ratios. *Dev Brain Res* 1985; 18: 143-7
64. Hernández RJ. Na⁺-K⁺ATPase activity in the brain cortex of rats ontogenetically malnourished and treated with serotonin precursors. *Brain Res* 1979; 163: 348-52.
65. Chagoya G, Hernández J. L-Tryptophan during gestation induces an increase in brain Tryptophan-5-hydroxylase activity and serotonin synthesis. *Proc West Pharmacol* 1983; 26: 369-72.
66. Grahame-Smith DG. Tryptophan hydroxylation in brain. *Biochem Biophys Res Commun* 1964; 16: 586-692.

67. Jequier E, Lovenberg W, Sjoerdsma A. Tryptophan hydroxylase inhibition the mechanism by which p-chlorophenylalanine depletes rat brain serotonin. *Mol Pharmacol* 1967; 3: 274-8.
68. Boadle-Biber MC. Regulation of serotonin synthesis. *Prog Biophys Molec Biol* 1993; 60: 1-15.
69. Neckers LM, Biggio G, Moja E, Meek JL. Modulation of brain tryptophan hydroxylase activity by brain tryptophan content. *J Pharmacol Exp Ther* 1971; 177; 475-80.
70. Hernández RJ, Illnerova H. Activity of 5-hydroxytryptophan decarboxylase during the first twenty days of postnatal life in the rat pineal gland. Effect of light. *Neuroendocrinology* 1970; 6: 343-8.
71. Lovenberg W, Weissbach H, Udenfriends S. Aromatic L-amino acid decarboxylase. *J Biol Chem* 1962; 237: 89-93.
72. Sims KL, Davis GA, Bloom FE. Activities of 3,4-dihydroxy-L-phenylalanine and 5-hydroxy-L-tryptophan decarboxylases in rat brain. Assay characteristics and distribution. *J Neurochem* 1973; 20: 449-64.
73. Turner AJ. The roles of folates and pteridin derivatives in neurotransmitter metabolism. *Biochem Pharmacol* 1977; 26: 1009-14.
74. Sourkes TL. Nutrients and the cofactors requieres for monoamine synthesis in nervous tissue. En Wurtman RJ, Wurtman JJ, eds: *Nutrition and the brain*. New York: Raven Press, 1979; 3: 265-99.
75. Hamon M, Bourgoin S, Artaud F, El Mestikaway S. The respective roles of tryptophan uptake and tryptophan hydroxylase in the regulation of serotonin syntesis in the central nervous system. *J Physiol Paris* 1981; 71: 269-79.
76. Hamon M, Glowinski J. Regulation of serotonin synthesis. *Life Sci* 1974; 15: 1533-48.
77. Crandall EA, Gillis MA, Fernstrom JD. Reduction in brain serotonin synthesis rate in streptozotocin-diabetic rats. *Endocrinology* 1981; 109: 310-2.

78. Crandall EA, Fernstrom JD. Acute changes in brain tryptophan and serotonin after carbohydrate or protein ingestion by diabetic rats. *Diabetes* 1980; 29: 460-6.
79. Trulsson ME, Jacoby JH, Mackenzie RG. Streptozotocin-induced diabetes reduces brain serotonin synthesis in rats. *J Neurochem* 1986; 46: 1068-72.
80. Sandrini M, Vitale G, Vergoni AV, Ottani A, Bertolini A. Streptozotocin-induced diabetes provokes changes in serotonin concentration and on 5-HT_{1A} y 5-HT₂ receptors in the rat brain. *Life Sci* 1997; 60: 1393-7.
81. Fernstrom MH, Fernstrom JD. Large changes in serum free tryptophan levels do not alter brain tryptophan levels: studies in streptozotocin-diabetic rats. *Life Sci* 1993; 52: 907-16.
82. Molina HA. Efecto de la diabetes tipo I sobre el metabolismo de la serotonina en ratas. Tesis de licenciatura en nutrición y ciencias en los alimentos. Universidad Iberoamericana. México D. F. 1995.
83. Hijikata BY, Hara K, Shiozaki Y, Murata K, Sameshima Y. Determination of free tryptophan in plasma and its clinical applications. *J Clin Chem Biochem* 1984; 22: 291-9.
84. Denkla WD, Dewey HH. The determination of tryptophan in plasma, liver, and urine. *J Lab Clin* 1967; 69: 160-9.
85. Bloxam DL, Warren WH. Error in determination of tryptophan by the method of Denkla and Dewey. A revised procedure. *Anal Biochem* 1974; 60: 621-5.
86. Curzon G, Green AR. Rapid method for the determination of 5-HT and 5-HIAA in small regions of rat brain. *Br J Pharmacol* 1970; 39: 653-5.
87. Barchas J, Erdelyi E, Angwin P. Simultaneous determination of indole and catecholamines in tissues using a weak cation exchange resin. *Anal Biochem* 1972; 50: 1-17.
88. Gál EM, Patterson K. Rapid no isotopic assay of tryptophan-5-hydroxylase activity in tissues. *Anal Biochem* 1973; 52: 625-9.
89. Saifer A, Gerstenfeld S. The photometric microdetermination of blood glucose with glucose oxidase. *J Lab Clin Med* 1958; 51:448-60.

90. Dumas BT, Watson WA, Biggs HG. Albumin standards the measurement of serum albumin with bromocresol green. *Clin Chim Acta* 1971; 31: 87-96.
91. Falholt KB, Falholt W. An easy colorimetric micromethod for routine determination of free fatty acids in plasma. *Clin Chim Acta* 1973; 46: 105-11.
92. Junod A, Lambert AE, Stauffacher W, Renold AE. Diabetogenic action of streptozotocin; relationship of dose to metabolic response. *J Clin Invest* 1968; 48: 2129-39.
93. Mordes JP, Rossini AA. Animal models of diabetes. *Am J Med* 1981;70: 353-60
94. Junoud A, Lambert AE, Orci L, Pictet R, Gonet AE, Renold AE. Studies of the diabetogenic action of streptozotocin. *PSEBM* 1967; 126: 201-5.
95. Hung W, August GP, Glasgow AM. Páncreas-diabetes mellitus e hipoglucemia. En A Garrido, eds: *Endocrinología Pediátrica*. Barcelona: ESPAXS S.A, 1980: 379-430.
96. Berkowitz BA, Head R, Joh T, Hempstead J. Experimental diabetes: Alterations in circulating dopamine-B-hydroxylase and norepinephrine. *J Pharmacol Exp Ther* 1980; 213: 18-23.
97. Oster MH, Castonguay TW, Keen CL, Stern JS. Circadian rhythm of corticosterone in diabetic rats. *Life Sci* 1988; 43: 1643-5.
98. Trulson ME, Himmel CD. Effects of insulin and streptozotocin-induced diabetes on brain norepinephrine metabolism in rats. *J Neurochem* 1985; 44: 1873-6.
99. Bellush LL, Henley WN. Altered responses to environmental stress in streptozotocin-diabetic rats. *Physiol Behav* 1990; 47: 231-8.
100. Wilber JF, Banerji A, Prasad C, Mori M. Alterations in hypothalamic-pituitary-thyroid regulation produced by diabetes mellitus. *Life Sci* 1981; 28: 1757-63.
101. Unger RH. High growth hormone levels in diabetic ketoacidosis. A possible cause of insulin resistance. *JAMA* 1965; 191: 945-7.
102. Greenfield M, Kolterman O, Olefsky J. Mechanism of hypertriglyceridemia in diabetic patients with fasting hyperglycemia. *Diabetologia* 1980; 18: 441-6.

103. Zhou Y-P, Ling Z-C, Grill VE. Inhibitory effects of fatty acids on glucose regulated beta cell function: association with increased islet triglyceride stores and altered effect of fatty acid oxidation on glucose metabolism. *Metabolism* 1996; 45: 981-6.
104. Wahren J, Felig P, Cerasi E. Splanchnic and peripheral glucose and amino acid metabolism in diabetes mellitus. *J Clin Invest* 1972; 51: 1870-8.
105. Herber SM, Dunsmore IR. Does control affect growth in diabetes mellitus?. *Acta Paediatr Scand* 1988; 77: 303-6.
106. Clarke WL, Vance ML, Rogol AD. Growth and the child with diabetes mellitus. *Diabetes Care* 1993; Suppl 3: 101-6.
107. Salter M, Knowles RG, Pogson CI. How does displacement of albumin-bound tryptophan cause sustained increases in the free tryptophan concentration in plasma and 5-hydroxytryptamine synthesis in brain?. *Biochem J* 1989; 262: 365-8.
108. Flores MII. Estudio de la cinética de unión del triptofano a la albúmina del plasma a través de curvas de saturación y su desplazamiento por ácidos grasos en ratas normales y desnutridas. Tesis de Licenciatura en Nutrición y Ciencia en los alimentos. Universidad Iberoamericana. México D.F. 1995.
109. Badawy AAB, Morgan CJ. Tryptophan and tryptophan pyrrolase in haem regulation. *Biochem J* 1982; 206: 451-60.
110. Abdulla A, Badawy B. The functions and regulation of tryptophan pyrrolase. *Life Sci* 1977; 21: 755-68.
111. Sadler E, Weiner M, Buterbaugh GG. Effect of streptozotocin-induced diabetes on tryptophan oxygenase activity and brain tryptophan levels in rats. *Chem Pathol Pharm* 1983; 42:37-50.
112. Smith SA, Pogson CHI. The metabolism of L-tryptophan by liver cells prepared from adrenalectomized and streptozotocin diabetic rats. *Biochem J* 1981; 200: 605-9.
113. Smith SD, Carr FPA, Pogson CT. The metabolism of L-Tryptophan by isolated rat liver cells. *Biochem J* 1980; 192: 673-86.

114. Brosnan JT, Man K, Hall DE, Coulbourne SA, Brosnan ME. Interorgan metabolism of amino acids in streptozotocin-diabetic ketoacidotic rat. *Am J Physiol* 1983; 244: E151-58.
115. Glanville NT, Anderson GH. The effect of insulin deficiency, dietary protein intake and plasma amino acid concentrations on brain amino acid levels in rats. *Can J Physiol Pharmacol* 1985; 63: 487-94.
116. Crandall EA, Fernstrom JD. Effect of experimental diabetes on the levels of aromatic and branched-chain amino acids in rat blood and brain. *Diabetes* 1983; 32: 222-30.
117. Curzon G, Fernando JC. Drugs altering insulin secretion: effects on plasma and brain concentrations of aromatic amino acids and on brain 5-hydroxytryptamine turnover. *Br J Pharmacol* 1977; 60: 401-8.
118. Gal EM, Drewes PA. Studies on the metabolism of 5-hydroxytryptamine (serotonin) II. Effect of tryptophan deficiency in rats. *Proc Soc Exp Biol Med* 1962; 110: 368-71.
119. Trulsson ME, Mackenzie RG. Increased tryptophan hydroxylase activity may compensate for decreased brain tryptophan levels in streptozotocin-diabetic rats. *J Pharmacol Exp Ther* 1980; 212: 269-73.
120. Gessa GL, Tagliamonte A. En Wolstenholme GEW, Fitzsimons DW, eds: Aromatic amino acids in the brain. Serum free tryptophan: control of brain concentrations of tryptophan and of synthesis of 5-hydroxytryptamine. Amsterdam: Elsevier, 1974: 207-16.
121. Costa E, Guidotti A, Zivkovic B. Short and long term regulation of tyrosine hydroxylase. En Usdin E ed. *Neuropsychopharmacology of Monoamines and Their Regulatory Enzymes*. New York: Raven Press 1974; 161-75.
122. Mandell AJ, Knapp S. Regulation of function of tryptophan hydroxylase. En Usdin E ed. *Neuropsychopharmacology of Monoamine and Their Regulatory Enzymes*. New York: Raven Press 1974; 177-88.
123. Robinson DS. Serotonin receptor subtypes and affective disorders. *Clin Neuropharmacol* 1993; 16: S1-5.

124. Bonate PL. Serotonin receptor subtypes: functional, physiological, and clinical correlates. *Clin Neuropharmacol* 1991; 14: 1-16.
125. Becquet D, Faudon M, Hery F. The role of serotonin release and autoreceptors in the dorsalis raphe nucleus in the control of serotonin release in the cat caudate nucleus. *Neurosci* 1990; 39: 639-47.
126. Garber SL, Makman MH. Regulation of tryptophan hydroxylase activity by a cyclic AMP-dependent mechanism in rat striatum. *Mol Brain Res* 1987; 3: 1-10.
127. Ehret M, Cash ChD, Hamon M, Maitre M. Formal demonstration of the phosphorylation of rat brain tryptophan hydroxylase by Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase. *J Neurochem* 1989; 52: 1886-91.
128. Manjarrez GG, Chagoya GG, Hernández RJ. Early nutritional changes modify the kinetics and phosphorylation capacity of tryptophan-5-hydroxylase. *Int J Devel Neuroscience* 1994; 12: 695-702.
129. Manjarrez GG, Magdaleno VM, Chagoya G, Hernández RJ. Nutritional recovery does not reverse the activation of brain serotonin synthesis in the ontogenetically malnourished rat. *Int J Devel Neuroscience* 1996; 14: 641-8.
130. Hernández RJ, Manjarrez GG, Chagoya G. Newborn humans and rats malnourished in utero: free plasma L-tryptophan, neutral amino acids and brain serotonin synthesis. *Brain Res* 1989; 488: 1-13.
131. Manjarrez GG, Contreras JL, Magdaleno VM, Chagoya G, Hernández RJ. Elevación de la fracción libre del L-triptofano plasmático en lactantes desnutridos in utero hasta el tercer mes de edad postnatal. *Bol Med Hosp Infant Mex* 1997; 54: 12-9.
132. Manjarrez GG, Contreras JL, Magdaleno VM, Chagoya G, Hernández RJ. Free tryptophan as an indicator of brain serotonin synthesis in infants. *Pediatr Neurol* 1998; 18: 57-62.

Tabla 1. Clasificación de la Diabetes Mellitus.

I. Tipo 1 (destrucción de las células β , deficiencia absoluta de insulina)

- a) inmune
- b) Idiópatica

II. Tipo 2 (predominantemente resistencia a la insulina con relativa deficiencia de insulina ó bién defecto secretor predominante con resistencia a la insulina)

III Otros tipos específicos

- a) Defecto genético de la función de la célula B: Cromosoma 20 HNF-4 MODY
Cromosoma 7 glucoquinasa MODY 2; Cromosoma 12 HNF-1 a MODY 3;
DNA mitocondrial
- b) Defecto genético en la acción de la insulina: Resistencia a la insulina tipo A;
Leprechaunismo; Síndrome de Rabson-Mendenhall; Diabetes lipoátrófica;
- c) Enfermedades del páncreas exocrino: Pancreatitis; Pancreatectomía
postraumática; Neoplasias; Fibrosis quística; Hemocromatosis;
Pancreatopatía fibrocalculosa
- d) Endocrinopatías: Acromegalia; Síndrome de Cushing; Glucagonoma;
Feocromositoma; Hipertiroidismo; Somatostatina
- e) Inducida por drogas o químicos: Glucocorticoides; Tiazidas; Diazóxido;
Agonistas B-adrenergicos; A-interferon; Pentamidina
- f) Infecciones: Rubéola congénita; Citomegalovirus
- g) Formas raras mediadas por respuesta inmune: Síndrome de Suff-man;
Anticuerpos antireceptor de insulina
- h) Otros síndromes genéticos: Síndrome de Down; Síndrome de Klinefelter;
Síndrome de Turner; Síndrome de Wolfram; Ataxia de Friedreich; Corea de
Huntington; Síndrome de Lawrence Moon Beidel; Síndrome de Prader Willi;
Distrofia miotónica

IV Diabetes Mellitus Gestacional

Tabla 2. Concentración de glucosa en el plasma de ratas con diabetes mellitus tipo 1 (D), control de estrés (CE) y controles (C).

	C	CE	D
Días Posaplicación de estreptozotocina			
1	5.78 ± 0.15	5.56 ± 0.15	5.60 ± 0.13
7	5.70 ± 0.11	6.94 ± 0.22 *	18.50 ± 0.43 ^δ
14	5.76 ± 0.47	6.50 ± 0.20 *	35.00 ± 0.62 ^δ
21	5.50 ± 0.36	6.70 ± 0.10 *	35.44 ± 1.74 ^δ

Valores promedio (mmol/l) ± desviación estándar de 16 experimentos por duplicado. * $p < 0.05$; ^δ < 0.001 ; C vs CE, C vs D; $F = 196.1$, $DFn = 6$, $DFd = 36$. Anova de dos vías y *t* Student.

Tabla 3. Ingesta de alimento en 24 horas de ratas con diabetes mellitus tipo 1 (D), control de estrés (CE) y controles (C).

Días Posaplicación de estreptozotocina	C	CE	D
1	24.10 ± 0.663	24.55 ± 0.954	24.22 ± 1.391
7	24.60 ± 2.471	25.52 ± 2.090	31.00 ± 2.944 *
14	29.35 ± 1.962	29.80 ± 1.412	40.95 ± 0.759 ^δ
21	32.25 ± 1.500	32.07 ± 1.900	47.92 ± 1.424 ^δ

Valores promedio (gramos) ± desviación estándar de 32 animales.

*** p < 0.05, ^δ < 0.001; C vs D; F = 20.58, DFn = 6, DFd = 36, ANOVA de dos vías y t Student.**

Tabla 4. Peso corporal de ratas con diabetes mellitus tipo 1 (D), control de estrés (CE) y controles (C).

Días Posaplicación de estreptozotocina	C	CE	D
1	255.0 ± 2.50	255.0 ± 2.50	252.0 ± 2.50
7	277.3 ± 4.80	277.8 ± 4.35	232.1 ± 4.10 *
14	302.5 ± 2.40	300.8 ± 3.93	190.0 ± 3.80 ^δ
21	346.8 ± 3.59	342.5 ± 5.80	151.6 ± 2.20 ^δ

Valores promedio (gramos) ± desviación estándar de 32 animales.

* $p < 0.05$, ^δ < 0.001 ; C vs D; $F = 15.82$, $DFn = 6$, $DFd = 36$, ANOVA de dos vías y t Student.

Tabla 5. Concentración de albúmina en el plasma de ratas con diabetes mellitus tipo 1 (D), control de estrés (CE) y Controles (C).

Días Postaplicación de estreptozotocina	C	CE	D
1	4.55 ± 0.12	4.50 ± 0.12	4.45 ± 0.20
7	4.50 ± 0.10	4.49 ± 0.11	4.15 ± 0.13 *
14	4.64 ± 0.28	4.60 ± 0.20	3.93 ± 0.15 ^δ
21	4.60 ± 0.23	4.57 ± 0.13	3.16 ± 0.16 ^δ

Valores promedio (g/dl) ± desviación estándar de 16 experimentos por duplicado. * $p < 0.05$, ^δ < 0.001 ; C vs D; $F = 58.23$, $DFn = 6$, $DFd = 36$, ANOVA de dos vías y *t* Student.

Tabla 6. Concentración de ácidos graso libres en el plasma de ratas con diabetes mellitus tipo 1 (D), control de estrés (CE) y controles (C).

Días Posaplicación de estreptozotocina	C	CE	D
1	0.319 ± 0.013	0.309 ± 0.011	0.315 ± 0.012
7	0.329 ± 0.019	0.326 ± 0.010	0.410 ± 0.040*
14	0.349 ± 0.011	0.333 ± 0.013	0.528 ± 0.048 ^δ
21	0.320 ± 0.016	0.323 ± 0.014	1.283 ± 0.061 ^δ

Valores promedio (mmol/l) ± desviación estándar de 16 experimentos por duplicado. * $p < 0.05$, ^δ < 0.001 ; C vs D; $F = 141.2$, $DFn = 6$, $DFd = 24$, ANOVA y t Student.

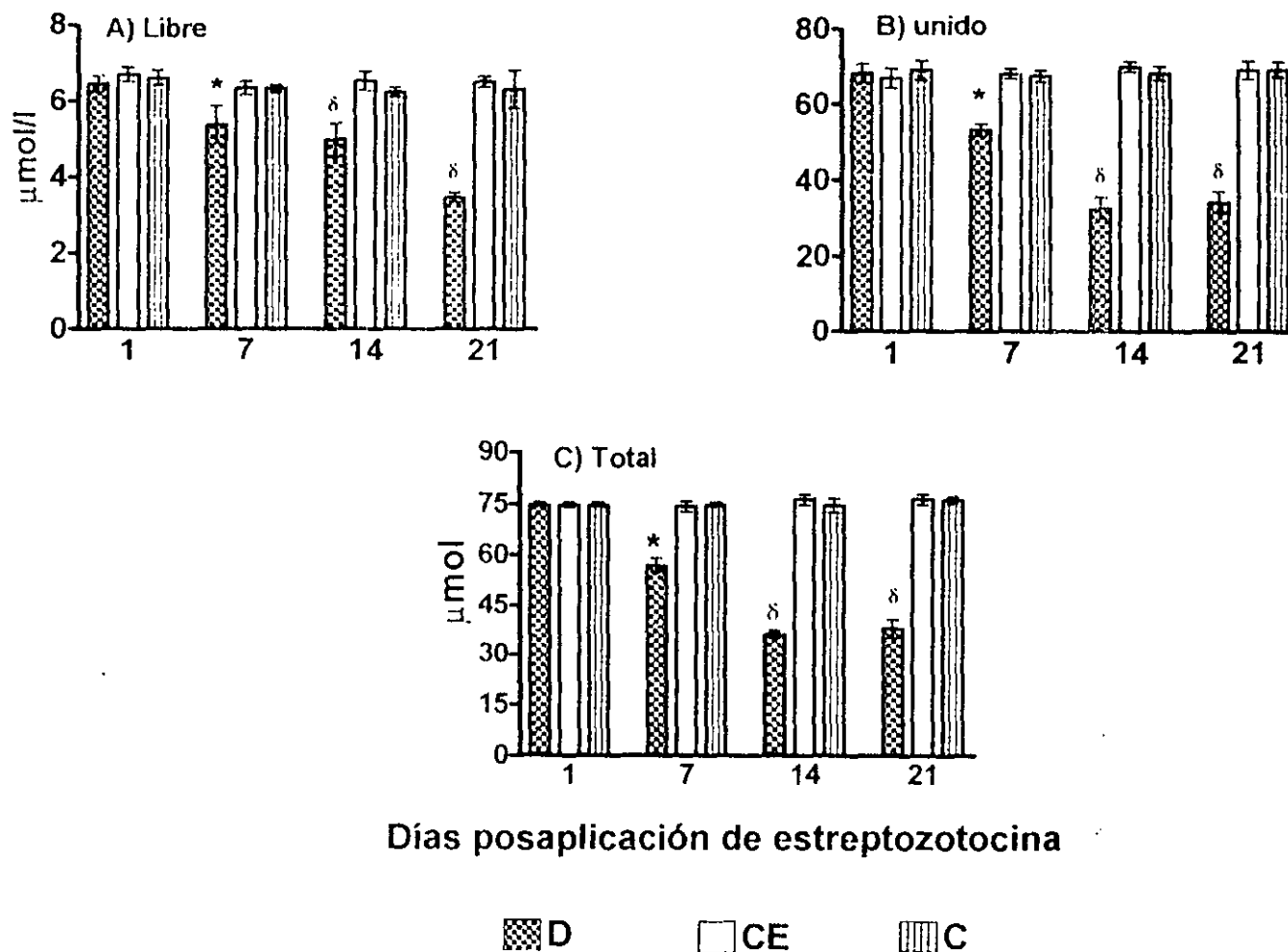


Figura 1. L-triptofano en el plasma de rata con diabetes mellitus tipo I D, control de estrés CE y controles C. Valores promedio \pm desviación estándar de 16 experimentos por duplicado. A: $F = 9.63$, $DFn = 6$, $DFd = 36$; B: $F = 52.09$, $DFn = 6$, $DFd = 36$; C: $F = 44.62$, $DFn = 6$, $DFd = 33$. * $P < 0.05$, $\delta < 0.001$. ANOVA de dos vías; t Student

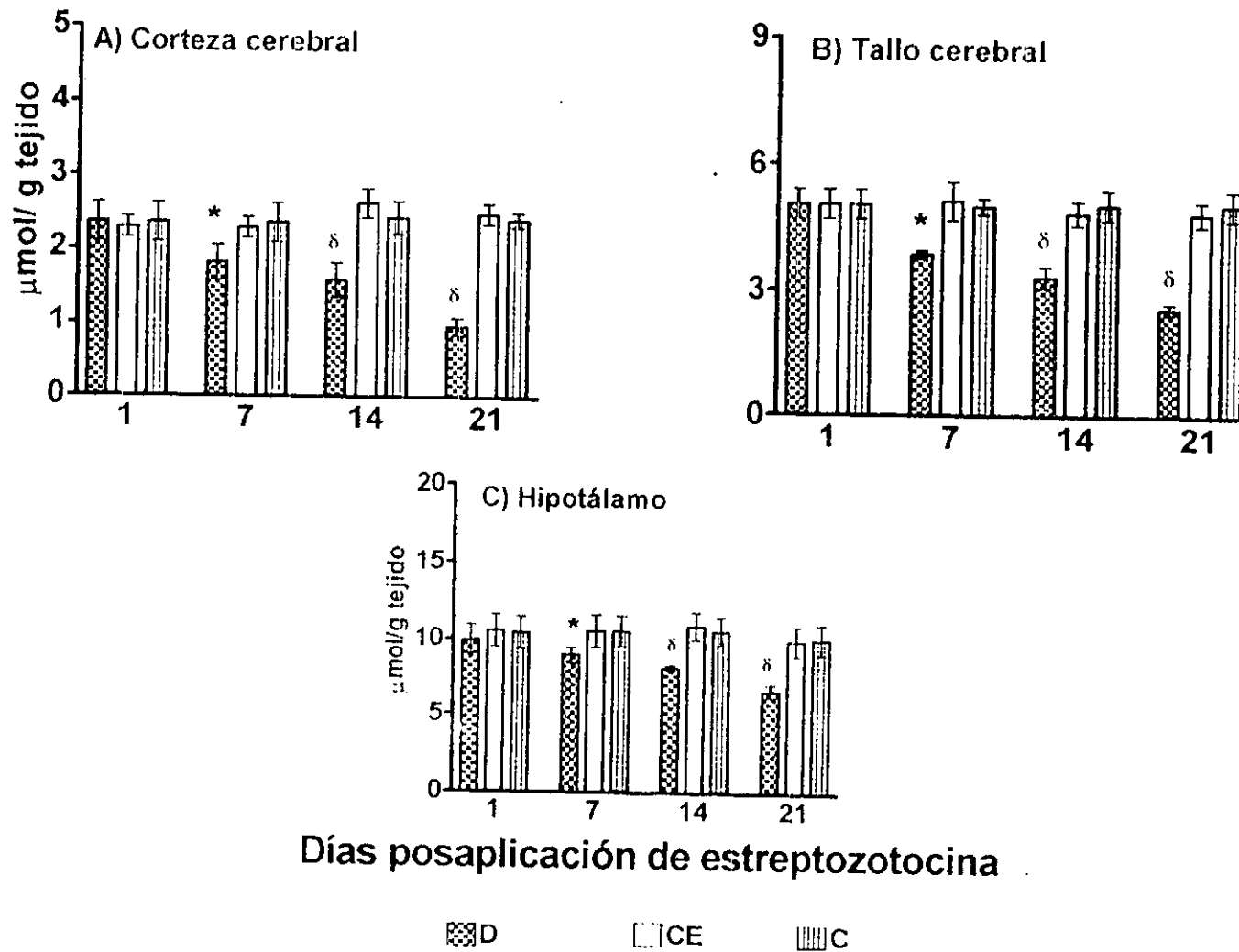


Figura 2. L-triptofano en el cerebro de rata con diabetes mellitus tipo I D, control de estrés CE y controles C. Valores promedio \pm desviación estándar de 4 experimentos por duplicado. A: $F = 2.61$, $DFn = 6$, $DFd = 36$; B: $F = 15.87$, $DFn = 6$, $DFd = 36$; C: $F = 6.82$, $DFn = 6$, $DFd = 36$. * $p < 0.05$, $\delta < 0.001$. Anova de dos vías; t Student.

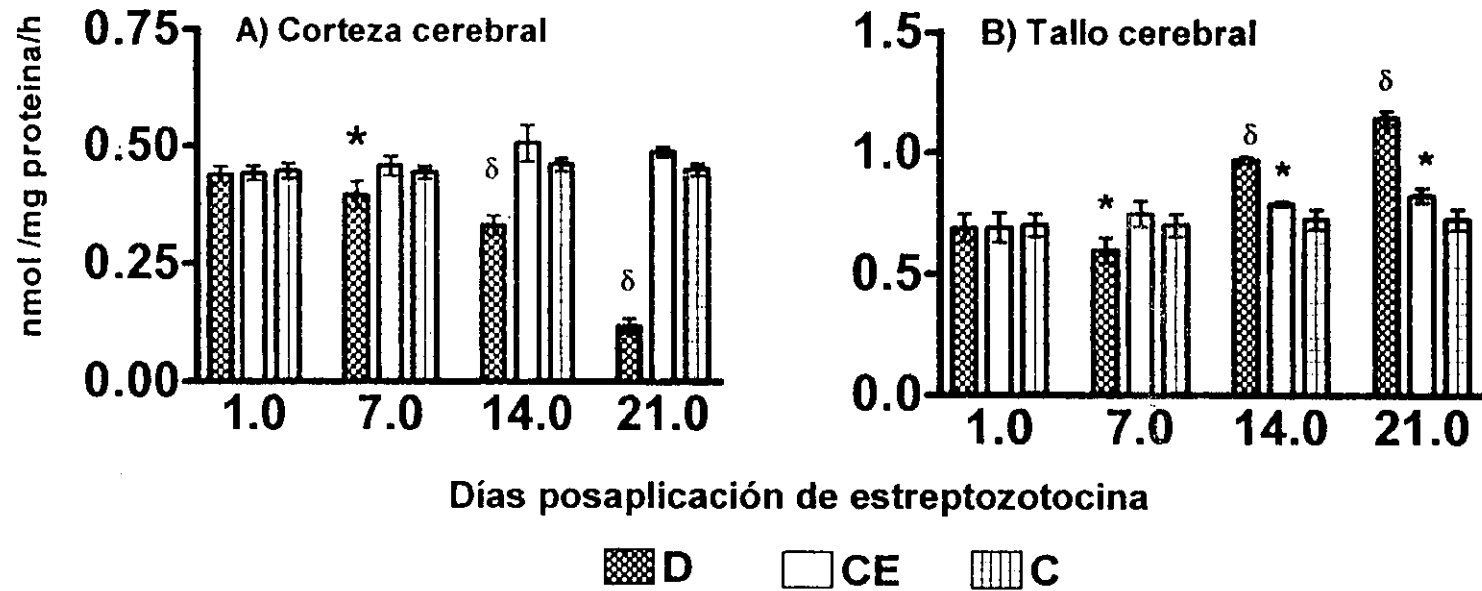


Figura 3. Actividad de la triptofano-5-hidroxilasa en el cerebro de ratas con diabetes mellitus tipo I D, control de estrés CE y controles C. Promedio \pm desviación estándar de 4 experimentos por duplicado. A: $F = 27.21$, $DFn = 6$, $DFd = 42.27$; B: $F = 31.21$, $DFn = 6$, $DFd = 23.57$. * $P < 0.05$, $\delta < 0.001$. Anova de dos vías; t Student

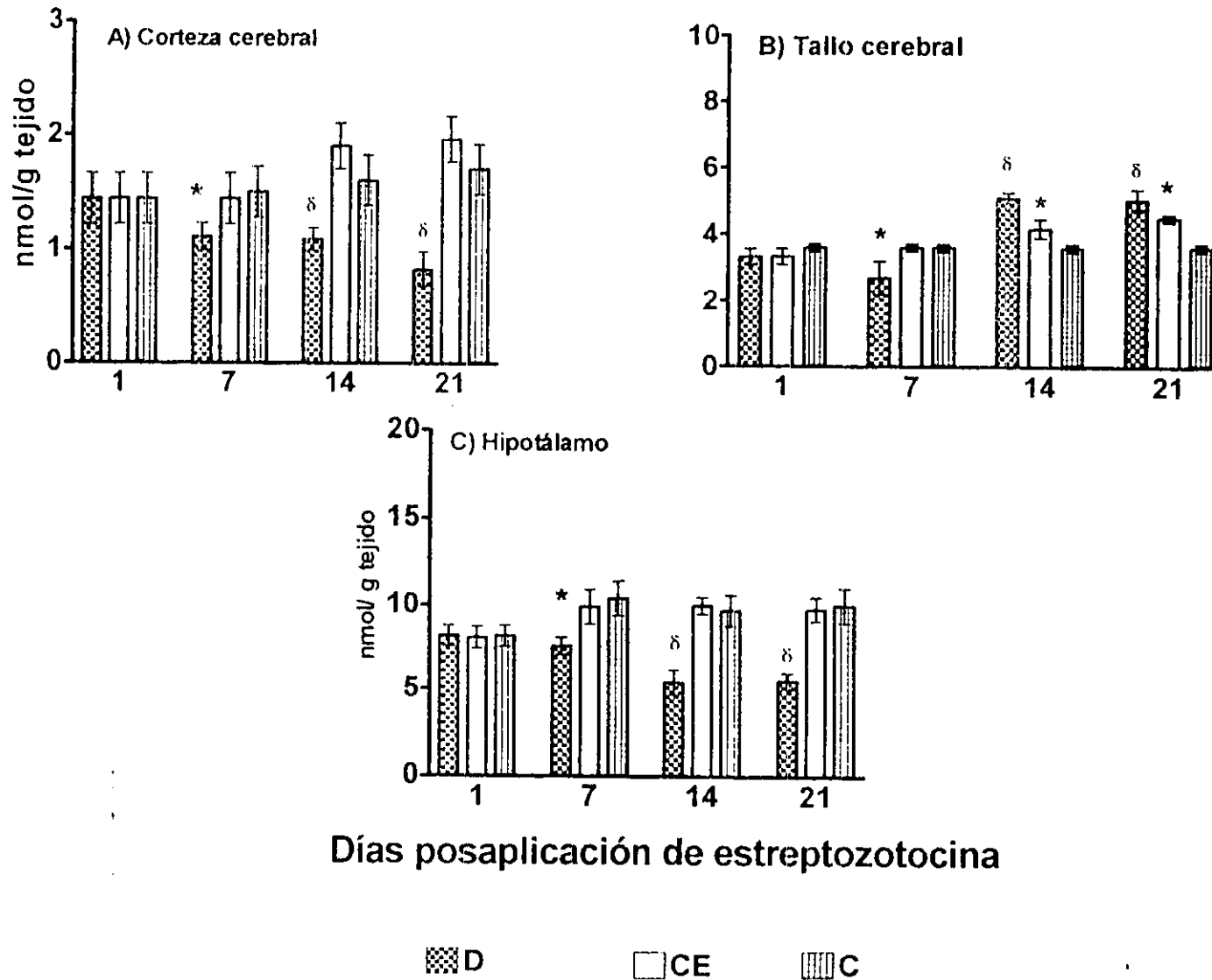


Figura 4. 5-hidroxitriptamina en el cerebro de ratas con diabetes mellitus tipo I D, control de estrés CE y control C. Valores promedio \pm desviación estándar de 4 experimentos por duplicado. A: $F = 2.66$, $DFn = 6$, $DFd = 36$; B: $F = 210.7$, $DFn = 6$, $DFd = 36$, C: $F = 7.45$, $DFn = 6$, $DFd = 36$. * $p < 0.05$, δ 0.001. Anova de dos vías; t Student

ABREVIATURAS:

DM	diabetes mellitus
CMH	complejo mayor de histocompatibilidad
SNC	sistema nervioso central
MM	milimolar
AGL	ácidos grasos libres
AAN	aminoácidos neutros
BHE	barrera hemato-encefálica
5-HT	5-hidroxitriptamina, serotonina
CLN	núcleo caudal lineal
MRN	núcleo del rafé medio
DRN	núcleo del rafé dorsal
MLN	núcleo del lemnisco medial
NRO	núcleo del rafé obscurus
NRP	núcleo del rafé palidus
NRM	núcleo del rafé magnus
VLM	núcleo ventro lateral medular
IRN	núcleo del área postrema
MLF	fascículo lateromedial descendente
L-Trp	L-triptofano
FL	fracción libre del L-triptofano
TrpOH	triptofano-5-hidroxilasa

BH4	tetrahidrobiopterina
DBR	dihidrobiopterina reductasa
DAA	descarboxilasa de los aminoácidos aromáticos
STZ	estreptozotocina
M	molar
ACD	ácido cítrico, citrato de sodio y dextrosa
N	normal
TCA	ácido tricloroacético
p/v	relación peso/volumen
v/v	relación volumen/volumen
%	por ciento
h	horas
°C	grado centígrado
D	grupo diabético
CE	grupo control de estrés
C	grupo control
TrpP	triptofano pirrolasa hepática
$\mu\text{mol/l}$	micromol/litro
$\mu\text{mol/g}$	micromol/gramo
HClO_4	ácido perclórico
ml	mililitro
HCl	ácido clorhídrico

OPT	ortoftaldialdehido
6-MPH4	6-metil 5, 6, 7, 8 tetrahidrobiopterina
ng	nanogramo
μ l	microlitro
CHM	cloroformo-heptano-metanol
NAD	nicotinamida adenina
Ca ⁺⁺	calcio