



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA

INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL

Tesis para obtener el grado de Doctora en Ciencias Médicas

MECANISMOS DE ACTIVACION DE LA BIOSINTESIS DE SEROTONINA
CEREBRAL EN RATAS CON DIABETES MELLITUS. CINETICA DE LA
TRIPTOFANO-5-HIDROXILASA.

Maestrante: J. Rocío Herrera Márquez

Tutor:

Dr. Gabriel Manjarrez Gutiérrez

0352048



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

**ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA**

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Rocío
de la Cruz
maizues

FECHA: 5/15/08

FIRMA: 

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.

ESTE TRABAJO FUE REALIZADO GRACIAS AL APOYO FINANCIERO DADO POR LA COORDINACION DE INVESTIGACION EN SALUD DEL INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL Y POR LA BECA RECIBIDA POR CONACYT.

Al Doctor

Gabriel Manjarrez Gutiérrez.

Gracias por su amistad, apoyo y toda la enseñanza que me ha brindado a lo largo de mi formación académica.

A los Doctores:

**Alfredo Ulloa Aguirre
Israel Grijalva Otero**

Por sus comentarios durante la realización del trabajo de investigación gracias.

A los Doctores:

**Juan Cuauhtémoc Díaz Zagoya
José Dante Amato Martínez
Gabriel Manjarrez Gutiérrez
Edgar Zenteno Galina
Sergio Cuevas
García Carranca
Carlos Alberto Aguilar Salinas.**

Por sus valiosos comentarios y correcciones a esta tesis.

A mi familia padres, hermanos, a mi hija y mis sobrinos por su apoyo y comprensión por todo el tiempo que no hemos compartido por realizar este trabajo, pero especialmente a mi sobrino SERGIO, quien nos dejó hace un mes, su ausencia nos impulsara a seguir con sus enseñanzas de vivir la vida con intensidad, de salir adelante a pesar de todos los obstáculos que se nos presenten y de perdonar a todas las personas que por ignorancia quieren hacernos caer y dañar en nuestro intento de superarnos. Gracias querido SERGIO.

DICE MI HERMANO FIDE, QUE EN SU PRIMER NUEVO DÍA SERGIO, NOS VIÓ A TODOS TAN DESPESERADOS, ABATIDOS Y TRISTES, QUE VIÑO CON ÉL Y LE DICTÓ ESTAS PALABRAS.....

Y ASÍ FUE

El Señor le dijo a sus Ángeles, Hoy estoy muy contento; y sus Ángeles preguntaron ¿Porqué señor? Porque hoy es uno de esos contados días, que no mando a nadie para traer al cielo.

-Hoy iré yo Mismo, por un Hijo muy Querido y Especial. Los Ángeles sabían que eso ocurría, una vez cada cien años.

El Señor bajo y le dijo ¡Hola Sergio! Y Sergio sonrió al ver a Dios, el cuarto se iluminó y los Ángeles cantaron.

El Señor le dijo, Sergio he venido por Ti para que goces en el cielo, te los has ganado. En sólo 20 años superaste pruebas que otros se tardan cientos. Amaste, te Amaron, Perdonaste, Luchaste sin descanso y sin protestas, Mostraste el camino a seguir sin hablar. Eres un héroe.

Y Sergio dijo, como de costumbre, Dios Gracias Señor, pero mis padres y mi hermano sufrirán mucho. Y el Señor le dijo.

Al principio, en lo que se dan cuenta que tu Espíritu es más grande que tu cuerpo y que como fuiste mi elegido estarás con ellos para siempre, platicarás con ellos y velarás por ellos, los seguirás amando y ellos a ti, y te verán con otros ojos, los ojos del corazón. Y entenderán que sigues con ellos y que algún día se unirán en Espíritu contigo.

Y en ese momento mientras dormía cómodamente y sin dolor, Sergio se sintió Libre y pudo volar y ver la Luz,

Y los Ángeles lo acompañaron al cielo de la Mano del Señor,

Y ASÍ FUE

07 Septiembre de 2005

YO CREO QUE ASÍ ES PORQUE EN VERDAD MI HERMANO, QUE ES INGENIERO, SIEMPRE HA SIDO MUY MALO PARA ESCRIBIR.

INDICE

RESUMEN	3
ABSTRACT	4
INTRODUCCION	5
SISTEMA SEROTONINERGICO CEREBRAL	7
TRIPTOFANO-5-HIDROXILASA	10
DIABETES MELLITUS Y SISTEMA SEROTONINÉRGICO	15
JUSTIFICACION	18
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	19
HIPOTESIS	19
OBJETIVO GENERAL	19
OBJETIVOS ESPECIFICOS	19
PROGRAMA DE TRABAJO	
MATERIAL Y METODOS	20
ENSAYOS BIOQUIMICOS	22
METODOS ESTADISTICOS	22
RESULTADOS	23
DISCUSIÓN	32
ANEXOS	
ACTIVIDAD DE LA TRIPTOFANO-5-HIDROXILASA	47
CUANTIFICACION DE PROTEINAS TISULARES	48
BIBLIOGRAFIA	50
ABREVIATURAS	68

1. RESUMEN

Objetivo. Investigar si los cambios en la síntesis de serotonina cerebral producidos por diabetes mellitus experimental son secundarios a una inhibición de la biosíntesis y cambios en la cinética de la triptofano-5-hidroxilasa (TrpOH) cerebral.

Material y métodos. Se usaron ratas diabéticas por la administración de estreptozotocina. A los 7 y 21 días del inicio de la enfermedad se obtuvo el tallo y corteza cerebral en donde se evaluó la cinética y la actividad de la TrpOH mediante activación con ATP, MgCl₂ y CaCl₂

Resultados. Los animales diabéticos mostraron un aumento significativo de la K_m y una disminución de la V_{max} (p < 0.001) de la TrpOH. Además, la capacidad de respuesta de la enzima a las condiciones de fosforilación fue notablemente disminuida en estos animales diabéticos en relación a los controles (p < 0.001).

Discusión. La disminución de la actividad de la TrpOH observada en los animales diabéticos no puede ser explicada únicamente por la disminución del L-triptofano, sino también a un posible cambio conformacional de la enzima, reflejado en una disminución de la afinidad de la enzima por su sustrato y una disminución de la respuesta a las condiciones de fosforilación. Los presentes resultados sugieren que la diabetes mellitus experimental induce un cambio conformacional en la TrpOH, como mecanismo no genómico que explica la inhibición de la actividad enzimática durante la evolución de la enfermedad.

ABSTRACT

The objective of the present study was to examine the possible mechanism of inhibition of tryptophan-5-hydroxylase activity induced by insulin-dependent diabetes mellitus. Kinetic experiments were done with different L-tryptophan concentrations in the rat brain at different days of evolution of the disease. Additionally, different activation conditions of the enzyme were evaluated, to gain information on the mechanism of the activity changes. Diabetes was induced in normal male rats, by the administration of 75 mg/Kg body weight of streptozotocin. The results showed an increase of the K_m value and a decrease in the V_{max} in the diabetic's brain as compared to controls. Interestingly, in the diabetic group, the response capacity to phosphorylation was significantly reduced. These shifts in the activity of tryptophan-5-hydroxylase developed during insulin-dependent diabetes mellitus may not be explained only by a decrease of L-tryptophan, but also by a possible change in the enzyme itself, reflected in a diminished affinity for the substrate and a decreased response to phosphorylating conditions.

2. INTRODUCCION

La diabetes mellitus (DM) se considera un estado patológico en el que el organismo pierde la capacidad de utilizar los carbohidratos como fuente de energía, debido a la carencia relativa o absoluta de insulina. La hiperglucemia crónica resultante se asocia a daño a largo plazo, con disfunción y falla de diferentes órganos como el riñón, ojos, nervios, endotelio vascular y corazón, entre otros (1).

Se espera que para el año 2025 existan alrededor de 300 millones de diabéticos en el mundo según diferentes estudios epidemiológicos (2). En México, la DM ocupa una de las principales causas de morbilidad de la población general. La DM tipo 2 se presenta con mayor frecuencia en la edad adulta, con base en datos de la encuesta nacional de salud (ENSA) 2000, 10.9% de la población mexicana mayor de 20 años tiene DM y cerca del 23% de los individuos enfermos desconoce que la tiene, esto significa que existen más de cinco millones de personas con DM y poco más de un millón no han sido diagnosticadas (3,4). Interesantemente la prevalencia de la DM tipo 2 en la edad pediátrica ha aumentado en los últimos años, antes de 1990 era poco común, reportándose menos del 4% en los niños diabéticos, sin embargo, informes recientes sugieren que la DM tipo 2 representa el 45% de todos los casos de DM en niños (5-11). En la infancia y en la adolescencia, la DM tipo 1 A y 1 B son las que predominan. La incidencia anual de la DM tipo 1 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 (12-14). 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 (15).

La DM produce una amplia gama de alteraciones a nivel celular por la ausencia parcial o total y/o la resistencia a la insulina, lo cual no es de extrañarse ya que se afecta el flujo de glucosa al interior de la célula y a todas las vías metabólicas en las que participa (1, 16). Actualmente existe un gran número de evidencias que tratan de explicar los mecanismos moleculares que llevan al desarrollo de las complicaciones crónicas de la enfermedad, entre las que se encuentran las alteraciones cardiovasculares, renales, oculares, la polineuropatía motora y sensorial así como la neuropatía autonómica. De esta manera, en los últimos años también se ha investigado exhaustivamente los efectos que produce en el sistema nervioso central (SNC), se conoce que la hiperglucemia potencia el daño neurológico por isquemia, así contribuye al daño cerebrovascular; altera la barrera hematoencefálica (BHE) y favorece el edema cerebral (17). Por otra parte, existe una estrecha correlación positiva entre la función cognoscitiva y el control metabólico en los pacientes diabéticos. Al mejorar el control metabólico existe una mejoría en la esfera cognoscitiva de estos paciente diabético (16,18,19). La búsqueda de alteraciones sobre grupos de neuronas con función específica es necesaria para interpretar mejor sus repercusiones funcionales en el SNC. Uno de estos cambios es el que se ha demostrado para el sistema serotoninérgico cerebral de la rata diabética (20-28).

2.1. SISTEMA SEROTONINERGICO CEREBRAL

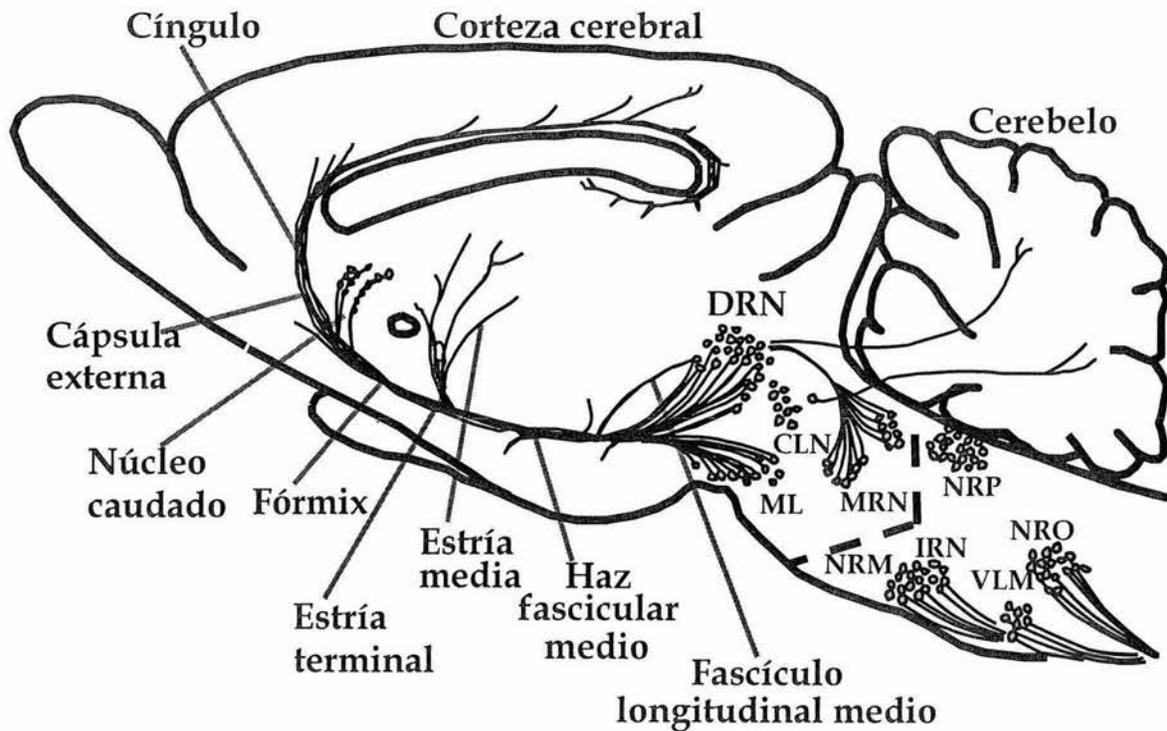


Figura 1. Sistema serotoninérgico en el cerebro de la rata

El sistema serotoninérgico se localiza en el tallo cerebral cerca de la línea media. Está formado por dos conjuntos de neuronas que han sido divididas de acuerdo a su origen embrionario: el grupo superior, procede del mesencéfalo, está constituido por cuatro subgrupos: el núcleo caudal lineal (NCL); el núcleo del rapé medio (NRM); el núcleo del rapé dorsal (NRD) y el núcleo del lemnisco medial (NLM). El grupo inferior, tiene su origen en el mielencéfalo, consta de cinco subgrupos: el núcleo del rapé obscurus (NRO); el núcleo del rapé palidus (NRP); el

núcleo del rafé magnus (NRM); el núcleo ventro lateral medular (NVLM) y el núcleo del área postrema (NAP). Además, existe un grupo de neuronas serotoninérgicas localizado en los núcleos dorsomedial del hipotálamo (29). Estas neuronas han sido demostradas por técnicas de inmunocitoquímica, mediante anticuerpos específicos para serotonina (5-hidroxitriptamina, 5-HT) en humanos (30,31), ratas (32,33), monos (34) y gatos (35).

Este sistema de neuronas inician su función durante la vida fetal, su actividad la ejerce a través de un neurotransmisor específico, la 5-HT (36,37), la cual reúne todos los requisitos para ser considerada un neurotransmisor (38). 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 (39,40). La 5-HT durante la embriogénesis participa en los procesos de diferenciación del SNC como son: axogénesis y sinaptogénesis (41,42); la diferenciación de neuronas blanco (43,44); control del número final de receptores específicos a la 5-HT (39,40) y en la modulación de su propia síntesis (44,45).

Además la serotonina está involucrada en la regulación de los ciclos de sueño y vigilia (46); de los impulsos nociceptivos (47); de la termorregulación (48); del comportamiento sexual y temporal (49,50); de la regulación y liberación de hormonas hipofisarias (51,52); de la conducta afectiva, emocional y alimentaría (53-56) y a nivel celular regula la actividad de la $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ATPasa en los astrocitos cerebrales, para mantener el equilibrio catiónico en las neuronas (57,58).

El L-triptofano (L-Trp) es el precursor metabólico de la síntesis de 5-HT (59-61). El L-Trp es un aminoácido indispensable 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) (62,63). La relación que guardan estas dos fracciones en el plasma es la que determina la disponibilidad de la FL 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 (62). Además la FL del L-Trp ingresa al cerebro a través de un sistema de transporte activo dependiente de energía en donde estimula la síntesis de 5-HT (64,65). 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 ácidos grasos (AGL), juegan un papel importante en la disponibilidad de la FL para su transporte al cerebro para la síntesis de 5-HT (62,66,67).

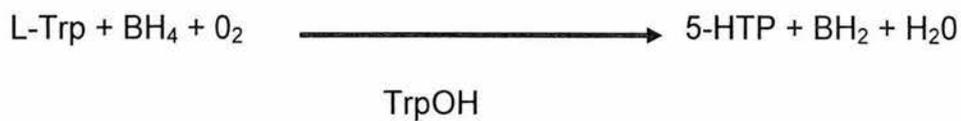
También se ha observado en ratas que la FL del L-Trp compite por su transportador de membrana a nivel de los capilares de la barrera hematoencefálica (BHE), con otros aminoácidos aromáticos relativamente no polares (aminoácidos neutros, AAN), de tal forma que una disminución de la concentración de estos AAN en el plasma permitirá un mayor paso de la FL de L-Trp al cerebro y un aumento en la síntesis de serotonina (68-70), y al contrario, si existe un aumento de la concentración de estos AAN en la sangre se producirá una disminución del ingreso de la FL del L-Trp al cerebro y consecuentemente una disminución en la síntesis de este importante neurotransmisor, serotonina.

Una vez que la FL de L-Trp ingresa al cerebro, de inmediato es captado por las neuronas serotoninérgicas, en donde es hidroxilado en su posición cinco por la triptofano-5-hidroxilasa (TrpOH) (71-74), el 5-hidroxitriptofano formado es descarboxilado por la descarboxilasa de los aminoácidos aromáticos (DAA) para producir serotonina (29,50,71). La 5-HT 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 (38).

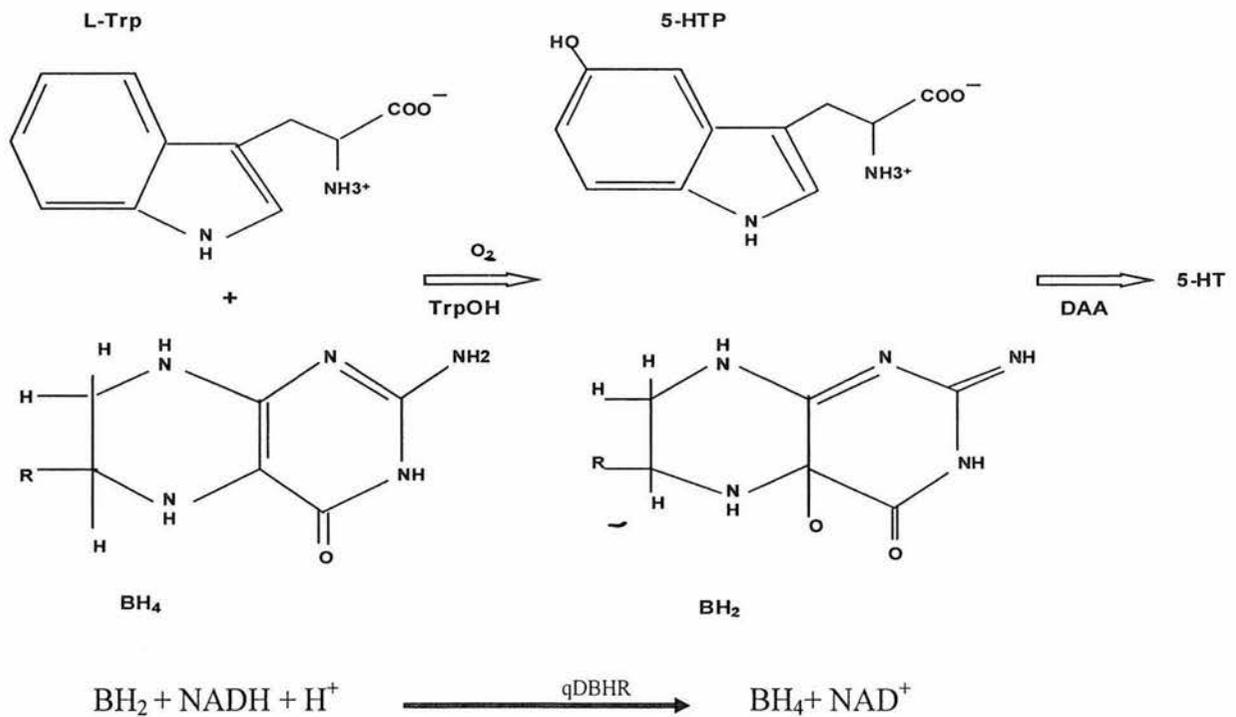
2.2 TRIPTOFANO-5-HIDROXILASA

La TrpOH es la enzima limitante de la biosíntesis de serotonina cerebral (71-73). 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 DAA, 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 (72-76). Además participa también en la biosíntesis de melatonina (77,78). De esta forma, la TrpOH se expresa en las neuronas serotoninérgicas del tallo cerebral, en la glándula pineal, en la retina, en las células cebadas, bazo, queratocitos e hipófisis (79-81). En la glándula pineal, la expresión de la TrpOH está bajo control circadiano con una máxima actividad durante el período de oscuridad (77,78).

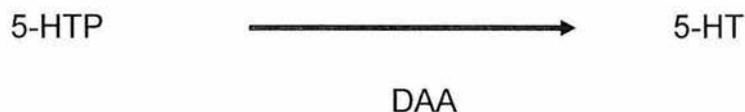
La TrpOH cataliza la inserción de un átomo de oxígeno molecular en el L-Trp, en tanto que el otro átomo de oxígeno es reducido a agua, esta reacción química requiere la participación de un cofactor que es la tetrahidrobiopterina (BH₄), que dona electrones para reducir el oxígeno y formar oxhidrilos (82). Además requiere la participación de los cofactores como el Fe²⁺ y O₂ (71,82-84). La ecuación general de la reacción es (72-74,82-86):



La reducción del quinonoide dihidrobiopterina (qDBH₂), se lleva a cabo a través de la enzima quinonoide dihidrobiopterina reductasa (qDBHR), dependiente de nicotinamida adenín dinucleótido, según la reacción (82,84,85):



Una vez que se ha formado el 5-HTP, de inmediato es descarboxilado por la DAA para producir 5-HT. La ecuación de la reacción es (71,72,82-86):



La TrpOH pertenece a la familia de las hidroxilasas de los aminoácidos aromáticos dependientes de pteridinas, junto con la tirosina hidroxilasa (TH) y la fenilalanina hidroxilasa (FAH) (71,83,86,87). Estas enzimas se caracterizan por tener en su estructura primaria tres regiones funcionales, un dominio regulador, amino terminal, un dominio catalítico y una interfase carboxilo terminal. Las tres enzimas muestran un alto grado de homología en su secuencia de aminoácidos; 55% entre la TrpOH y FAH; 49% entre la TrpOH y la TH y 52% entre la FAH y la TH. La mayor homología se localiza en la región carboxilo terminal, mientras que la región amino terminal, la secuencia es ampliamente diferente y contribuye a la regulación y a la especificidad de las enzimas (83,84,86,87).

Por otro lado, la región carboxilo terminal es la responsable de la estructura tetramérica debido a la presencia de una región alfa hélice (83,87), además este sitio es el responsable de la actividad catalítica de la enzima ya que en esta región se encuentran ubicados los sitios de unión del hierro (Fe^{++}), el cofactor (BH_4) y el sustrato L-Trp (83,87). El dominio regulador ejerce una influencia negativa sobre la actividad catalítica de la enzima, de tal forma que las modificaciones postraduccionales ocurren en este sitio (83,84,87). Por lo tanto, al suprimir la actividad del sitio regulador, se produce una activación de la parte catalítica de la

enzima (87,88), por lo que estas enzimas son activas al perder su dominio regulador (88-90).

Hasta el momento se ha avanzado poco en el conocimiento de los mecanismos de regulación de la TrpOH a través de los sitios alostéricos y de fosforilación por mecanismos dependientes de Ca^{2+} , ya que es un enzima que se expresa en pequeños grupos de neuronas en el SNC y en los tejidos periféricos (29). Además de que la enzima es extremadamente inestable en condiciones *in vitro*. El gen que codifica la TrpOH en la rata, se localiza en el cromosoma 7 y en el humano en el cromosoma 11, contiene 11 exones; en la actualidad se ha reportado que hay 4 diferentes RNAm, con cambios en la región 5'UTR, cuyo significado biológico aún se desconoce (87,91). La TrpOH es un tetrámero de subunidades idénticas, con un peso molecular aproximado de 240 kDa, requiere la presencia de Fe^{++} y oxígeno para activarse (84,86,87). La enzima se localiza en el soma, dendritas proximales, varicosidades axónicas y en las terminales nerviosas (29,30,92-94). Al igual que las otras hidroxilasas (TH y FAH) se puede activar a través de fosforilación, fosfolípidos y proteólisis parcial de la enzima (71,85,86,91,95-98).

Por lo que corresponde a los mecanismos que regulan la actividad de la TrpOH, entre estos se encuentran los cambios en la disponibilidad de sustrato L-Trp, inhibición de la actividad por su producto final, 5-HT, cambios en la cinética enzimática y aumento en la concentración de moléculas de la enzima. Los primeros cambios se presentan de forma inmediata y el último se presenta después de 24 horas del estímulo de activación (94,98-100). Por ello, los cambios

rápidos y reversibles del impulso nervioso en el interior de las neuronas serotoninérgicas activan mecanismos de fosforilación, en donde intervienen la proteína cinasa II Ca^{2+} /calmodulina dependiente, la proteína cinasa A dependiente de AMPc y la proteína cinasa C dependiente de calcio/fosfatidilserina (71,83,101-106).

Recientemente, se ha identificado uno de los tres sitios de fosforilación de la TrpOH, se ubica en la serina 58 del dominio regulador, modula la actividad de la enzima cuando es fosforilada por la proteína cinasa A dependiente de AMPc (107-110). Además, existen otros dos sitios de fosforilación, ubicados en los residuos de serina 260 y 443 de la región catalítica, se fosforilan a través de la proteína cinasa II Ca^{2+} /calmodulina dependiente y de la proteína cinasa C (92,106,111-113). Por otra parte, se ha observado que durante la activación de la TrpOH se requiere de la participación de la proteína 14-3-3 (114-117). Actualmente se ha demostrado que la proteína 14-3-3 modula únicamente la actividad de la proteína cinasa C y no las otras proteínas cinasas II y A. Se requiere de un mol de proteína 14-3-3 por cada 10 moles de la TrpOH para manifestar su efecto activador (113-115). Además se ha observado que durante la fosforilación de la TrpOH por la proteína cinasa II Ca^{2+} /calmodulina dependiente, desencadena mecanismos de degradación de la enzima por proteosomas y se ha especulado que la unión de la proteína 14-3-3 a la molécula de la enzima evita su degradación. (118).

Mecanismos de fosforilación de la triptofano-5-hidroxilasa

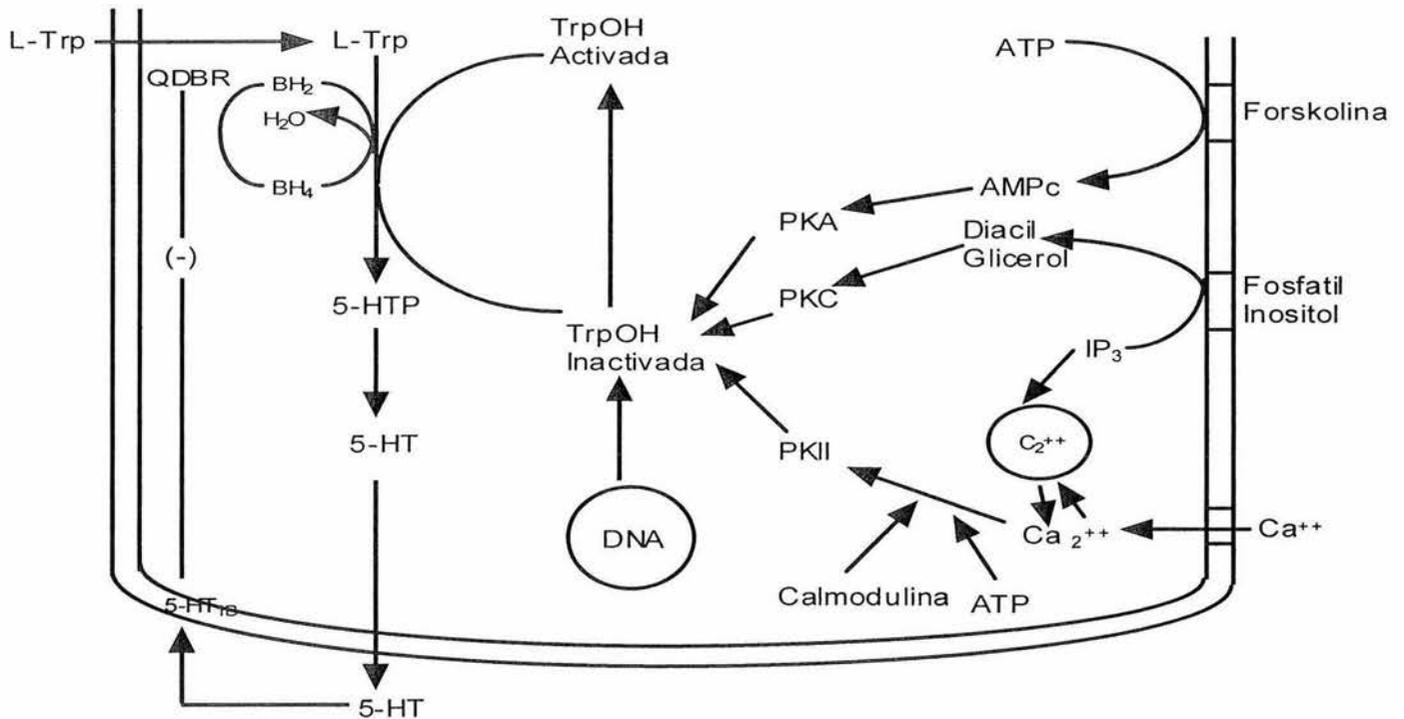


Figura 2

2.3 DIABETES MELLITUS Y SISTEMA SEROTONINÉRGICO

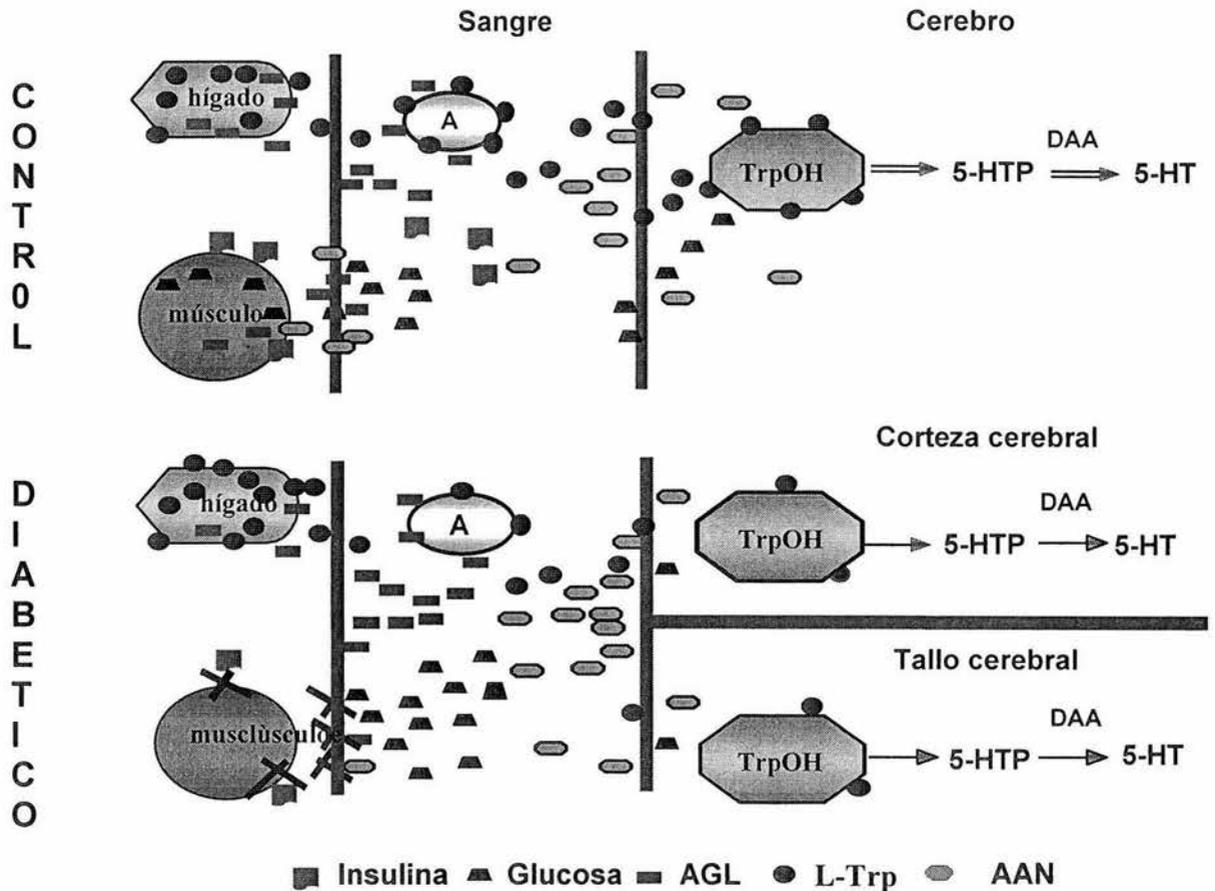
Diversos estudios en animales en los que se ha inducido experimentalmente DM, han permitido evaluar las diferentes alteraciones fisiológicas y bioquímicas que se producen por la pérdida endógena de insulina, que por razones de ética no pueden ser determinadas en los humanos diabéticos. El modelo experimental de DM por la administración de estreptozotocina (STZ) en la rata es el más utilizado, ayuda a aislar y manipular variables individuales y relacionarlas entre ellas. Además tiene la ventaja de que a dosis apropiadas del

tóxico, permite la vida del animal sin la presencia de insulina. Por lo tanto, las consecuencias de la hiperglucemia crónica y el reemplazo de la insulina pueden ser evaluados de forma independiente.

La DM es una enfermedad que produce cambios importantes en el metabolismo intermedio del organismo. La búsqueda de alteraciones sobre sistemas cerebrales específicos es necesaria para interpretar mejor sus repercusiones funcionales en el SNC. Uno de estos cambios es el que se ha observado para el sistema serotoninérgico cerebral de la rata diabética (RD).

Resultados de este y de otros laboratorios muestran que en la corteza cerebral de la RD existe una disminución de la concentración del L-Trp, de la serotonina y una menor actividad de la TrpOH (21-28). Lo contrario se observó en el tallo cerebral, donde un aumento de la actividad de la enzima, TrpOH, se acompañó de una elevación en la síntesis de 5-HT, independientemente de la menor concentración del L-Trp en esta región cerebral (26,27). La disminución del L-Trp disponible para la TrpOH puede explicar la disminución de la actividad de la vía serotoninérgica cerebral observada en la RD a partir del séptimo día de la administración de estreptozotocina (STZ) (26-28). Sin embargo, a pesar de la baja disponibilidad del sustrato plasmático y cerebral en estas ratas durante la evolución de la enfermedad, la actividad del sistema serotoninérgico persistió alterado (26-28). (Ver figura 3

Figura. 3 METABOLISMO DE L-TRIPTOFANO



Por otra parte, se observó en la RD tratada con insulina una completa recuperación del peso corporal y un retorno a lo normal de la composición bioquímica y de la concentración plasmática y cerebral del precursor de la síntesis del neurotransmisor, el L-Trp. Sin embargo, a pesar de esta recuperación metabólica, la actividad del sistema serotoninérgico cerebral persistió alterada (28). Todos estos hallazgos en conjunto sugieren fuertemente que en la RD tratada con insulina, los cambios en la biosíntesis de 5-HT cerebral parecen no

estar determinados por la disponibilidad del L-Trp (28). Por lo tanto, nos permite plantear que el probable mecanismo que mantiene activada la vía biosintética de este importante neurotransmisor en el cerebro diabético podría ser explicado por un cambio en la cinética y en los mecanismos de fosforilación de la TrpOH ocasionado por un probable cambio conformacional de la enzima.

3. JUSTIFICACION

La DM experimental produce cambios en la biosíntesis de serotonina cerebral, desde etapas tempranas de la enfermedad existe una menor síntesis de 5-HT, precedida de una disminución de la concentración de L-Trp y de la actividad de la TrpOH. Además, durante la evolución de la enfermedad se ha observado un cambio en la actividad de la TrpOH en el tallo cerebral acompañada de un aumento de la síntesis de serotonina cerebral, independientemente de la disminución de la concentración de L-Trp tisular. Por otro lado las ratas diabéticas tratadas con insulina mostraron una recuperación física completa y un retorno a lo normal de la concentración plasmática y cerebral del L-Trp, pero a pesar de este hecho la actividad de la TrpOH permaneció alterada. Todos estos hallazgos en conjunto nos permiten plantear que la DM produce cambios en la cinética y capacidad de fosforilación de la TrpOH como mecanismos que expliquen las alteraciones observadas en la vía serotoninérgica cerebral en la RD.

4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

¿Los cambios en la cinética de la TrpOH y el aumento en la actividad de la enzima por fosforilación son los mecanismos que mantienen la síntesis de serotonina cerebral en la rata diabética?

5. HIPOTESIS

5.1 El cambio en la síntesis de serotonina cerebral en la rata diabética es debido a una modificación de la cinética de la triptofano-5-hidroxilasa.

5.2 Las alteraciones en la síntesis de la serotonina cerebral en la rata diabética son debidas a un cambio en la actividad de la triptofano-5-hidroxilasa por mecanismos de fosforilación.

6. OBJETIVO GENERAL

Analizar los cambios que produce la DM en la cinética de la TrpOH y en la actividad de la enzima por mecanismos de fosforilación.

6.1 OBJETIVOS ESPECIFICOS

6.1.1 Determinar las constantes cinéticas V_{max} y K_m de la TrpOH en tallo y corteza cerebral de ratas diabéticas y controles.

6.1.2 Medir la actividad de la TrpOH en tallo y corteza cerebral en presencia de adenosina trifosfato (ATP), cloruro de magnesio (Mg_2Cl) y cloruro de calcio (Ca_2Cl) en ratas diabéticas y controles.

7. PROGRAMA DE TRABAJO

7.1 MATERIAL Y METODOS

El presente trabajo fue realizado en el laboratorio de Neuroquímica del Desarrollo de la Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Neurológicas del Hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional, Siglo XXI, del Instituto Mexicano del Seguro Social. Se realizó un estudio experimental en un modelo de diabetes mellitus secundario a la administración de estreptozotocina. Se usaron 84 ratas macho de la cepa Wistar, con peso corporal promedio de 250 ± 10 g, fueron adaptadas durante dos semanas a condiciones ambientales estándar (temperatura de $22 \pm 2^\circ\text{C}$; período de luz y oscuridad de 12 h; la manipulación y el ruido fueron mínimos; la humedad relativa entre 50 a 60%. Durante este período las ratas se alimentaron con un régimen de comida y agua a libre demanda.

Después del período de adaptación las ratas se dividieron en dos grupos: el primero estuvo formado por 56 ratas diabéticas (D), secundario a la administración de estreptozotocina (STZ), 75 mg/Kg de peso corporal por vía intraperitoneal (ip) y el segundo lo constituyó el grupo control (C), que consistió en 28 ratas normales. Todos los animales recibieron comida y agua *ad libitum*. Además se les determinó el peso corporal y la cantidad de alimento ingerido en 24 h. El tamaño de la muestra se calculó mediante el método de promedios de variables cuantitativas, con un nivel alfa de 0.05 y beta de 0.20. Por este método fueron incluidas 7 ratas por cada uno de los experimentos en cada grupo experimental.

A los 7 y 21 días después de la aplicación de STZ, ratas de cada uno de los grupos fueron sacrificadas por luxación cervical, se obtuvo el encéfalo, se disecó la corteza y el tallo cerebral, los cuales fueron colocados en una solución amortiguadora de tris-HCl 50 mM, pH 7.40, más 1 mM de dithiothreitol (DTT) y 1 mM de ethylene glycol-bis (β -aminoethyl ether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid (EGTA). Después se homogeneizaron y se centrifugaron a 29,000 g durante 15 minutos a 4 °C; el sobrenadante se usó como fuente de la actividad de la TrpOH. En estas muestras se realizaron curvas de actividad y cinética de la TrpOH con diferentes concentraciones de L-Trp (0.02 a 0.4 mM), sin modificar los otros elementos del sistema enzimático.

Otro grupo de muestras de tejido nervioso obtenidas en forma similar, fueron colocadas en una solución amortiguadora de tris-HCl, 50 mM, pH 7.40, más 1 mM de DTT y 1 mM de EGTA. Se homogeneizaron y se centrifugaron a 29 000 g durante 15 minutos a 4°C, el sobrenadante fue utilizado para los experimentos de activación mediante; adenosin trifosfato (ATP) 0.5 mM, -cloruro de magnesio (Mg_2Cl) 8 mM y 0.1 mM de cloruro de calcio (Ca_2Cl). En cada uno de los experimentos fueron incubados controles de tejido de las mismas regiones cerebrales sin el sistema de activación.

Para disminuir las variaciones circadianas, la obtención y disección del tejido nervioso siempre se efectuó entre las 09:00 y 11:00 h a 4°C. El manejo de los animales de experimentación se realizó en el bioterio del Centro Médico

Nacional Siglo XXI del Instituto Mexicano del Seguro Social, en donde se siguieron las normas sanitarias y de ética vigentes.

7.2 ENSAYOS BIOQUIMICOS

1. La actividad de la enzima se determinó por cromatografía de líquidos de alta resolución (84,108,109). (Anexo 1)

2. Las proteínas totales fueron cuantificadas mediante el método espectrofotométrico de Lowry y Cols (119). (Anexo 2)

3. Determinación de glucosa por el método de la glucosa oxidasa (120) (Anexo 3)

8. METODOS ESTADISTICOS

El cálculo de las constantes cinéticas K_m y V_{max} de la actividad de la TrpGH, fue mediante el Software GraphPad 3. Para comparar la K_m y V_{max} , así como la actividad de la enzima en condiciones de activación entre grupos y a los diferentes días de la aplicación de STZ se utilizó ANOVA de dos vías aceptando un nivel de significación de $p < 0.05$.

9. RESULTADOS

A partir del séptimo día de la aplicación de STZ, la glucemia se incrementó significativamente en el grupo D ($p < 0.05$) y como era de esperarse el aumento fue más importante conforme progresó la DM ($p < 0.001$). Tabla 1

Tabla 1. Concentración de glucosa en el plasma de rata control (C) y diabética (D)

Días post aplicación de STZ	C	D
1	5.78 ± 0.15	5.60 ± 0.13
7	5.70 ± 0.11	18.50 ± 0.43 ^δ
21	5.50 ± 0.36	35.44 ± 1.74 ^δ

Valores promedio (mmol/L) ± desviación estandar de 16 experimentos por duplicado. F= 196.1, DFn = 6, DFd = 36. ^δp < 0.001. ANOVA y t de Student.

En relación a la ingesta calórica diaria ésta fue mayor en el grupo D comparado con el grupo C ($p < 0.001$), además fue evidente que la ingesta de alimento fue significativamente mayor a los 21 días de la aplicación de STZ en los animales diabéticos ($p < 0.001$). Tabla 2

Tabla 2. Ingesta de comida en 24 h en rata control (C) y diabética (D).

Días post aplicación de STZ	C	D
1	25.16 ± 0.44	25.50 ± 0.86
7	24.66 ± 0.88	44.00 ± 1.00 *
21	26.50 ± 0.28	47.92 ± 1.42 *

Valores promedio (gramos) ± desviación estandar de 32 animales. F = 141.2, DF_n = 6, DF_d = 24, * $p < 0.001$. ANOVA y t de Student.

El peso corporal fue significativamente menor en el grupo diabético a partir del séptimo día de la aplicación de STZ ($p < 0.001$), el déficit fue de 16% y 56% respectivamente en comparación al grupo control ($p < 0.001$). Tabla 3

Tabla 3. Peso corporal de rata control (C) y diabética (D)

Días post aplicación de STZ	C	D
1	255.0 \pm 2.50	252.0 \pm 2.50
7	277.3 \pm 4.80	232.1 \pm 4.10 *
21	333.8 \pm 3.59	151.6 \pm 4.20 δ

Valores promedio (gramos) \pm desviación estandar de 32 animales. $F = 15.82$, $DFn = 6$, $DFd = 36$. * $p < 0.05$, $\delta < 0.001$. ANOVA y prueba t de Student.

La actividad de la TrpOH, paso limitante en la biosíntesis de serotonina cerebral, expresada en nmoles de 5-hidroxitriptofano/mg de proteína/h, mostró en el grupo C una mayor actividad en el tallo cerebral en relación a la de la corteza cerebral ($p < 0.001$). El mismo patrón se observó en el grupo diabético ($p < 0.001$). Sin embargo, es interesante mencionar que la actividad de la TrpOH en ambas regiones cerebrales siempre estuvo significativamente menor en el grupo D comparado con el grupo C ($p < 0.001$). Tabla 4

Tabla 4. Actividad de la Triptofano-5-hidroxilasa en rata control (C) y diabética (D)

Días Post-administración de STZ	Tallo		Corteza cerebral	
	C	DM	C	DM
7	2.410 ± 0.186	1.262 ± 0.139 *	1.200 ± 0.222	0.675 ± 0.027 *
21	2.670 ± 0.172	1.170 ± 0.164 *	1.178 ± 0.380	0.620 ± 0.154 *

Cada punto representa el valor promedio ± desviación estándar (nmol 5-HTP/mg proteína/h) de siete animales. Todas las determinaciones fueron efectuadas por duplicado. * $p < 0.001$. *t* Student

Las figuras 4 y 5 muestran las características morfológicas que presentaron las curvas de saturación de la actividad de la TrpOH en ambos grupos D (●) y C (○) a los 7 y 21 días después de la administración de STZ. Son curvas clásicas de saturación del tipo de Michaelis-Menten. También en las mismas figuras se pueden ver los recíprocos de ambos miembros de la ecuación, tal representación corresponde a la de Lineweaver-Burk. De estas curvas se calcularon las constantes cinéticas K_m y V_{max} de la TrpOH que se muestran en las tablas 5 y 6.

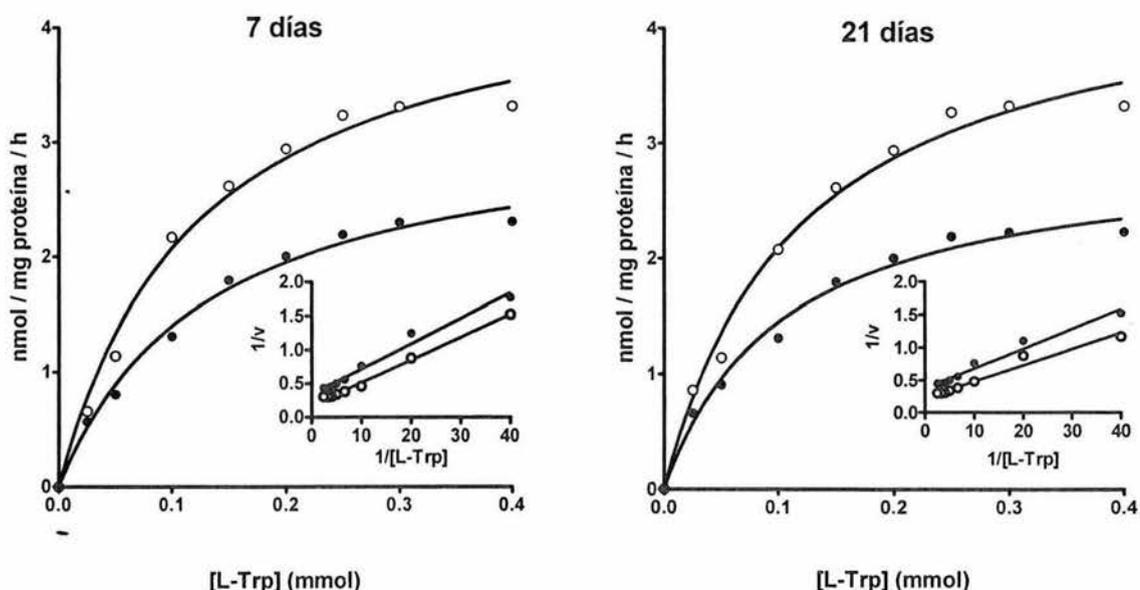


Figura 4. Curvas de cinética y gráficas de Lineweaver-Burk de la Triptofano-5-hidroxilasa en el tallo cerebral a los 7 y 21 días después de la administración de STZ (75 mg/Kg de peso corporal). ○, grupo control; ●, grupo diabético. Cada punto representa el valor promedio de cinco animales. Todas las determinaciones fueron efectuadas por duplicado.

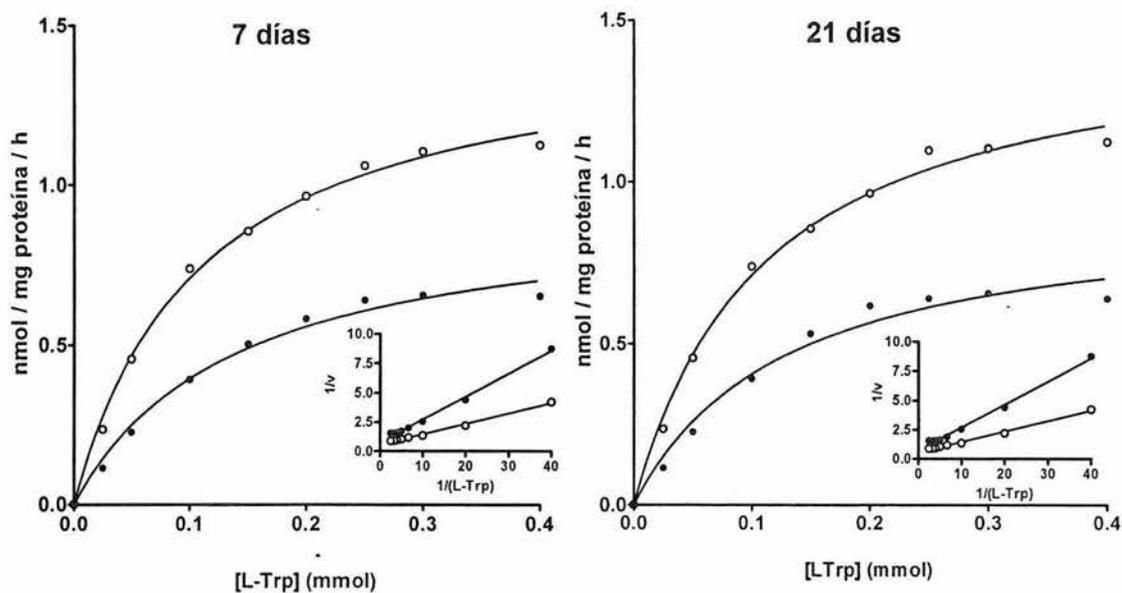


Figura 5. Curvas de cinética y gráficas de Lineweaver-Burk de la Triptofano-5-hidroxilasa en el corteza cerebral a los 7 y 21 días después de la administración de STZ (75 mg/Kg de peso corporal). ○, grupo control; ●, grupo diabético. Cada punto representa el valor promedio de cinco animales. Todas las determinaciones fueron efectuadas por duplicado.

Las constantes cinéticas K_m y V_{max} en el tallo y corteza cerebral en ambos grupos C y D se muestran en las tablas 4 y 5. El valor de K_m en el grupo C fue significativamente mayor en el tallo cerebral en comparación a la de la corteza cerebral ($p < 0.001$). El mismo patrón se observó en el grupo D ($p < 0.001$). Sin embargo, es importante hacer notar que la constante de afinidad tanto en el tallo como en la corteza cerebral fue siempre significativamente mayor en el grupo diabético al compararla con la del grupo C ($p < 0.001$). Las mismas tablas ilustran la V_{max} de la TrpOH en ambos grupos C y D. En el grupo C, el patrón de la V_{max} fue significativamente más elevada en el tallo que en la corteza cerebral ($p < 0.001$). El mismo patrón de la V_{max} se observó en el grupo D en ambas regiones estudiadas ($p < 0.001$) y de la misma forma que se observó para el valor de K_m de la TrpOH, se apreció una disminución significativa de la V_{max} tanto en tallo como en la corteza cerebral de las ratas diabéticas a partir del séptimo día de la aplicación de STZ en relación al grupo C ($p < 0.001$) tablas 5 y 6

TABLA 5. Constantes cinéticas de la Triptofano-5-hidroxilasa en tallo cerebral de rata control (C) y diabética (D)

Días Post-administración de STZ	V_{max}^a		K_m^b	
	C	DM	C	DM
7	4.691 ± 0.006	3.604 ± 0.024 *	127.21 ± 9.00	177.60 ± 4.00 *
21	4.778 ± 0.033	3.415 ± 0.024 *	134.40 ± 3.00	159.80 ± 2.00 *

Cada punto representa el valor promedio ± desviación estándar (^anmol 5-HTP/mg proteína/h y ^bμmol) de cinco animales. Todas las determinaciones fueron efectuadas por duplicado. * p < 0.001. *t*-Student

TABLA 6. Constantes cinéticas de la Triptofano-5-hidroxilasa en corteza cerebral de rata control (C) y diabética (D).

Días Post-administración De STZ	^a V_{max}		^b K_m	
	C	DM	C	DM
7	1.498 ± 0.002	0.928 ± 0.013 *	107.00 ± 2.00	127.80 ± 3.00 *
21	1.515 ± 0.020	0.932 ± 0.010 *	111.00 ± 1.05	132.00 ± 1.00 *

Cada punto representa el valor promedio ± desviación estándar (^anmol 5-HTP/mg proteína/h y ^bμmol) de cinco animales. Todas las determinaciones fueron efectuadas por duplicado. * p < 0.001. *t* Student

La activación de la TrpOH por ATP y $MgCl_2$ y $CaCl_2$ en los grupos C y D en tallo y corteza cerebral se ilustra en la figura 6. Ambos grupos mostraron un aumento significativo de la actividad enzimática a los 7 y 21 días después de la administración de STZ ($p < 0.001$) y es importante hacer notar que la enzima con el sistema de activación en los animales diabéticos presentó una significativa menor activación, aunque ésta alcanzó el valor del grupo C. (Ver figura 6).

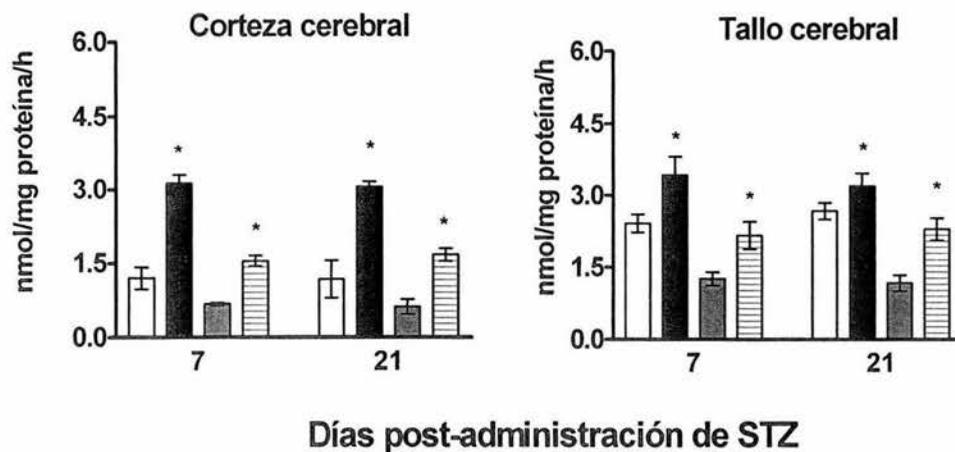


Figura 6. Activación de la Triptofano-5-hidroxilasa por ATP, Mg^{2+} and Ca^{2+} . □, grupo control; ■, grupo control fosforilado; ■, grupo diabético; ▨, grupo diabético fosforilado. Cada barra representa el valor promedio \pm desviación estándar de siete animales. Todas las determinaciones fueron efectuadas por duplicado. Tratamiento: Df = 7, SS = 65.56, MS = 9.365, F = 140.6. * $p < 0.001$. Tiempo: Df = 9, SS = 0.1710, MS, F = 0.341. No significativa. ANOVA

10. DISCUSION

Los presentes resultados confirman que la STZ produce una elevación de glucosa sanguínea, debido a la disminución o ausencia de insulina circulante, que a su vez es el resultado del efecto tóxico que tiene sobre las células β de los islotes de páncreas (121,123). Se ha reportado que su efecto tóxico es a través de su unión a receptores específicos localizados en la membrana celular en las células β del páncreas. La presencia de glucosa aumenta la captación de STZ por las células β y de este modo eleva su capacidad de destrucción celular de esta. Una vez que la STZ ingresa a las células β produce una disminución de la síntesis y un aumento de la degradación de nicotinamida adenina dinucleotido (NAD^+). La baja concentración del NAD^+ en las células β , produce mayor susceptibilidad al tóxico, por lo tanto, se produce muerte celular (123). Al existir más del 80% de necrosis de las células β , la síntesis y liberación de insulina es mínima o nula de tal forma que se produce DM (121,123), lo cual se demostró en los animales en este trabajo.

La DM produce una serie de cambios en el metabolismo del organismo, que pueden ser englobados en generales y específicos. En cuanto a los cambios generales se encuentran las alteraciones en el metabolismo de carbohidratos, lípidos y proteínas (124,125). Además existen otras modificaciones hormonales características de la enfermedad, entre estas se encuentran la elevación plasmática del cortisol, aumento de la epinefrina, norepinefrina dopamina- β -hidroxilasa, elevación de la excreción urinaria de norepinefrina, disminución de la

concentración de las hormonas: luteinizante, del crecimiento y estimulante de la tiroides (126-129).

En cuanto a los cambios bioquímicos en el metabolismo de los carbohidratos en los diabéticos, se ha observado que tienen por lo general hiperglucemia, debido a la no supresión de la producción de glucosa a nivel hepático, el bloqueo de la utilización de glucosa en las células de los tejidos y el aumento por la ingesta de los alimentos (124,125,130,131). En el presente trabajo observamos que los animales diabéticos tuvieron hiperglucemia y que consumieron más alimentos en 24 h durante el período estudiado. Además interesantemente este aumento de la ingesta de comida fue mayor a medida que la enfermedad progresó.

Otro hallazgo interesante que se observó en los animales diabéticos durante la evolución de la enfermedad fue el desarrollo de desnutrición, 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, se produce hiperglucemia, debido a la falta de oxidación de glucosa por los tejidos y al aumento en la producción de glucosa hepática y una elevada ingesta de alimento por estos animales diabéticos (124,125,131,132). Por otro lado, se ha demostrado que si la concentración de glucosa en la sangre sobrepasa el umbral renal, se excreta por la orina lo que da como resultado poliuria y polidipsia, que pueden producir una pérdida importante de calorías al día por la glucosuria. Por lo tanto, al reducirse los depósitos de grasa y de proteínas debido al aumento en la lipólisis y proteólisis sobreviene la pérdida de peso (133,134).

Nuestros resultados del peso corporal en los animales diabéticos, confirman una vez más que la DM desencadena desnutrición a pesar de que los animales diabéticos comieron más alimento.

La deficiencia de insulina se acompaña de elevación de los AGL en el plasma (135,136), se ha reportado que estos compiten con el L-Trp para unirse a la albúmina (63), aumentando la fracción libre del aminoácido, aunque nuestro grupo ha reportado que esta competencia entre los AGL y el L-Trp para unirse a la albúmina es más bien parcial (67). De hecho, las ratas diabéticas tienen una disminución de la fracción libre, unida a albúmina y total del L-Trp a pesar del aumento de los AGL, probablemente debido al desvío del L-Trp a vías metabólicas alternas, como la del ácido cinurénico y nicotínico (137,138) y por lo tanto se puede enmascarar el aumento esperado del L-Trp. Sin embargo, el efecto final a nivel de la BHE es la disminución de la fracción libre del L-Trp lo que contribuye a una baja de su paso al cerebro y de la síntesis del neurotransmisor correspondiente.

Además de los cambios generales en el metabolismo intermedio, la DM produce modificaciones metabólicas más específicas. Uno de estos cambios es el que se ha demostrado para el sistema serotoninérgico en el cerebro de la rata diabética, donde existe una disminución de la disponibilidad de la FL del L-Trp plasmático para su ingreso al cerebro a través de la BHE. Resultados de este y otros laboratorios muestran que en la corteza y tallo cerebral existe una disminución del contenido de L-Trp y de 5-HT, así como una disminución de la actividad de la TrpOH (22,23,26-28). La disminución de la actividad de la TrpOH

observada en estos animales diabéticos y su persistencia durante la evolución de la enfermedad sugiere fuertemente una modificación funcional de la enzima y de los mecanismos que la mantienen activa. Se ha demostrado que en la activación de la TrpOH intervienen sistemas de fosforilación de la proteína enzimática con la participación de la proteína cinasa II dependiente de Ca^{++} /calmodulina, la proteína cinasa A dependiente de AMPc y la proteína cinasa C dependiente de Ca^{++} /fosfatidilserina (101-110).

La hipótesis del presente trabajo fue demostrar que la disminución de la biosíntesis de 5-HT cerebral en la rata diabética es debida a una modificación del comportamiento cinético de la TrpOH y un cambio en el mecanismo de activación de la enzima en condiciones de fosforilación durante la evolución de la enfermedad. Los presentes resultados confirman una vez más la disminución de la actividad de la vía biosintética de la 5-HT cerebral, nuevamente observándose una menor actividad de la TrpOH (26,28). La disminución en la disponibilidad del sustrato L-Trp en estos animales diabéticos, puede explicar la menor actividad de esta vía metabólica. Es bien conocido que cualquier cambio en su actividad podría alterar la síntesis de 5-HT, ya que la TrpOH normalmente se encuentra insaturada con respecto a su sustrato. La actividad de la enzima puede disminuirse por una menor concentración del L-Trp (59,61,62,64,70). Sin embargo, la menor actividad de la enzima observada en este trabajo, sugiere que otros factores reguladores intrínsecos están involucrados. Boadle-Biber (71), ha puntualizado que además de las alteraciones en la disponibilidad de L-Trp, los cambios en las propiedades cinéticas de la TrpOH pueden participar en la regulación de la síntesis del

neurotransmisor. Interesantemente los resultados del análisis de las curvas de saturación de la enzima con L-Trp mostraron en los animales normales una mayor afinidad por su sustrato en la corteza cerebral, en relación con la del tallo cerebral. Una diferencia similar fue observada en el tallo y corteza cerebral de los animales diabéticos. Sin embargo, cuando se comparó la K_m de los animales diabéticos con la del grupo control, el grupo diabético mostró una menor afinidad por el L-Trp y una menor V_{max} en ambas regiones estudiadas. Estos hallazgos sugieren la posibilidad de que diferentes isoformas de la TrpOH se expresan en el cerebro de las ratas normales y diabéticas. Independientemente, de que hasta el momento se ha reportado que sólo la isoforma 2 de la TrpOH se expresa en el tejido nervioso (139-141).

La disminución de la afinidad de la TrpOH observada en los animales diabéticos, plantea la pregunta de si la enzima durante la evolución de la DM pierde su papel de enzima limitante de la síntesis del neurotransmisor. Resultados previos de nuestro laboratorio (26-28), han demostrado una disminución de la concentración cerebral del L-Trp en estos animales, esta disminución es menor a la constante de afinidad observada en los diabéticos de este trabajo. Por tal razón podemos afirmar que la TrpOH durante la evolución de la DM, mantiene su papel de enzima limitante, tal como se ha demostrado en el cerebro de rata normal (72,76,99).

El cambio de la afinidad de la TrpOH puede explicarse de diferentes maneras: entre estas se encuentran el efecto de una sustancia química, que se conoce como efector alósterico, que al unirse con la molécula de la enzima, en un

sitio diferente al sitio activo produce aumento o disminución de la actividad de la enzima, como el caso de las coenzimas o metales que son indispensables para el inicio de la actividad de algunas enzimas. Estos compuestos desempeñan su función en el sitio catalítico, permaneciendo inalterados al final del proceso bioquímico. Algunos de ellos pueden encontrarse íntimamente ligados a la enzima, en cuyo caso se denominan grupos prostéticos (142-145).

Existe evidencia experimental que la TrpOH tiene algunas características de regulación de la actividad enzimática mediante cambios alostéricos. Los cuales fueron observados cuando la enzima fue incubada con la proteína 14-3-3, que activa a la enzima, requiere la presencia de la proteína cinasa II dependiente de Ca^{++} /calmodulina (113-116,146,147). La proteína 14-3-3 se une a la TrpOH, produce un cambio conformacional que es el inicio de la reacción de fosforilación de la proteína enzimática y el resultado es un aumento de la actividad (113-116,146,147). En este trabajo nosotros observamos un aumento de la actividad de la enzima en las preparaciones procedentes de tallo y corteza cerebral de ratas normales y diabéticas bajo nuestras condiciones experimentales de activación con ATP, Mg^{2+} y Ca^{2+} , la enzima se fosforila, en esta reacción participa la proteína cinasa II Ca^{++} /calmodulina dependiente. Además, demostramos que las preparaciones del tejido nervioso procedente de ratas diabéticas desarrollaron una menor respuesta, pero suficiente para alcanzar el valor de los animales controles.

La disminución de la afinidad de la TrpOH por su sustrato en los animales diabéticos explica en forma parcial la disminución de la actividad de la vía biosintética de la 5-HT cerebral. El término K_m se emplea para designar

únicamente la concentración de sustrato con la que se obtiene la mitad de la velocidad máxima; este valor no se puede emplear para calcular la velocidad inicial de una enzima alostérica. En nuestros resultados nos llamó la atención que la morfología de las curvas de cinética de la TrpOH son del tipo que requiere la hipótesis de Michaelis-Menten y no el tipo descrito para las enzimas alostéricas y aunque el comportamiento cinético de las enzimas alostéricas debe ser valorado por otros métodos matemáticos como el método de Hill (148,149), en nuestro caso se empleó el clásico de Michaelis-Menten. Esto podría explicarse porque la capacidad de una enzima alostérica, para ser activada o inhibida por sus moduladores específicos, a veces, puede ser abolida sin que se lesione su actividad catalítica, por exposición con un agente químico que produzca una modificación del centro modulador. Se dice entonces, que la enzima se ha desensibilizado. Una enzima desensibilizada no solo pierde su actividad frente a los moduladores, sino que puede incluso mostrar una cinética normal del tipo de Michaelis-Menten, como se observó en la morfología de las curvas de saturación de la TrpOH con L-Trp en los diabéticos y controles. Estos resultados no descartan que la enzima, como lo mencionó Yamauchi (146), e Ichimura y cols (147), sea una enzima que puede tener un comportamiento alostérico.

Una posibilidad más para explicar la modificación de la afinidad observada en nuestros resultados es la modificación covalente reversible de la actividad catalítica de la enzima por la unión de un grupo fosfato. Las enzimas que experimentan esta modificación covalente por fosforilación con modulación concomitante de su actividad, se denominan enzimas interconvertibles (144,145).

Las enzimas interconvertibles, existen en dos condiciones de actividad unas de eficacia catalítica elevada y otras de baja eficacia. Dependiendo de la enzima de que se trate, el catalizador más activo puede ser la fosfoenzima o la que no posee grupo fosfato. Se conoce que la fosforilación de la proteína enzimática generalmente se lleva a cabo en residuos de serina, formando el residuo O-fosfoseril. O en algunas enzimas un residuo de tirosil es fosforilado a la forma O-fosfotirosil. Aunque una enzima interconvertible puede contener muchos residuos de serina o tirosina, sin embargo, la fosforilación es sumamente selectiva y ocurre sólo en un pequeño número de sitios posibles; probablemente algunos de estos sitios formen parte del sitio catalítico, cuando menos en lo que se refiere a la estructura primaria y de este modo constituyen otro ejemplo de un sitio alostérico (143,146, 150,151).

Los sitios de fosforilación de la TrpOH han sido ampliamente estudiados, se localizan en los residuos de serina 58, 260 y 443 de la cadena proteica (107-111). Se ha observado que cuando el sitio de la serina 58 se fosforila, entonces se produce un aumento de la V_{max} de la enzima, en esta reacción química interviene la asociación de dos proteínas, la proteína cinasa A dependiente de AMPc y la proteína auxiliar 14-3-3 (102-105,107-110,112-114); además la enzima puede ser fosforilada por la proteína cinasa II Ca^{++} /Calmodulina dependiente (106,107,146,147). Asimismo, la fosforilación de los residuos de serina 260 y 443, también producen un aumento de la actividad de la TrpOH, en esta reacción interviene la proteína cinasa II Ca^{++} /calmodulina dependiente (106,146,147).

La modificación covalente de la TrpOH por fosforilación ha sido observada en varias condiciones experimentales que son: incubación de homogeneizados de tallo cerebral con ATP, Mg^{++} y Ca^{++} (76). Estimulación eléctrica de las neuronas serotoninérgicas de los núcleos del rafe en el tallo cerebral (152-156). Incubación de rebanadas de tejido nervioso en un medio extracelular rico en potasio o en un medio libre de sodio (157-159). Estos métodos tienen la peculiaridad de producir una elevación intracelular de la concentración de Ca^{++} libre en las neuronas serotoninérgicas y concomitantemente el inicio de los mecanismos de fosforilación de la proteína enzimática y un aumento de su actividad. Esta fosforilación ha sido demostrada mediante el uso de técnicas con anticuerpos antiTrpOH y análisis de inmunoblot en papel de nitrocelulosa (92,93,101). Estos métodos bioquímicos, han permitido conocer el peso molecular de la enzima, que es de aproximadamente 260 KDa, cuya estructura polipeptídica está formada por un tetrámero, cada monómero de la proteína tiene un dominio regulador amino terminal (aminoácidos 2 al 106), un dominio catalítico carboxilo terminal (aminoácidos 107 a 423) y un dominio de tetramerización (aminoácidos 424 al 444). Además han dado la pauta para conocer la capacidad que tiene la enzima para incorporar los grupos fosfato en su molécula, se ha demostrado que la TrpOH incorpora un grupo fosfato por cada ocho subunidades de la enzima o sea 2 moles de la enzima nativa (101). La unión del grupo fosfato produce un aumento de dos veces de la actividad de la enzima. Así mismo se confirmó que en esta reacción de fosforilación participa la proteína cinasa II Ca^{++} /calmodulina dependiente (101,102,106,107).

Los resultados de este trabajo confirman la modificación covalente de la TrpOH, mediante fosforilación de la proteína enzimática, ya que al incubar homogeneizados de tallo y corteza cerebral de ratas controles y diabéticas con ATP, Mg^{++} y Ca^{++} , observamos un aumento de la actividad de la enzima en ambos grupos C y D, es factible que bajo nuestras condiciones experimentales, la fosforilación de la enzima se lleve a cabo por la participación de la proteínas cinasa A dependiente de AMPc y la proteína cinasa II dependiente de Ca^{++} /calmodulina, como ha sido demostrado por otros autores en condiciones normales (101-110,160), interesantemente observamos en los animales diabéticos que la TrpOH activada por el sistema ATP, Mg^{2+} y Ca^{2+} tiene una respuesta significativamente menor que los controles. El hecho de que la enzima con este sistema de activación sea significativamente menos activa en el cerebro de la rata diabética, plantea la posibilidad de que la DM produce una inhibición de la actividad de la TrpOH a través de varios mecanismos patológicos que frecuentemente se producen por la hiperglicemia crónica con que cursan los pacientes diabéticos, entre estos mecanismos se encuentran el de la aldosa reductasa (161,162), los trastornos de la actividad de las proteínas cinasas A, C, II calcio/calmodulina dependiente (19,163), la glicación de proteínas (164-166) y el estrés oxidativo (167-169).

Por lo que respecta al mecanismo de la aldosa reductasa, propuesto desde hace tres décadas (161,170), establece que el exceso de glucosa en los tejidos de los individuos diabéticos sigue la vía de la aldosa reductasa, produciendo sorbitol y fructosa por la vía de los polioles. Ya que la K_m de la enzima es elevada, su

actividad es mínima cuando las concentraciones de glucosa son normales. Se ha observado en varios modelos experimentales de DM un aumento de sorbitol y fructosa, producidos por esta ruta metabólica, alterando el metabolismo energético, la integridad de las membranas y otras funciones celulares. Un aumento de sorbitol en las neuronas produce cambios en el metabolismo de los fosfoinositoles y del diacilglicerol, que junto con las alteraciones en la homeostasis de calcio, afectan la actividad de las proteínas cinasas cerebrales (19,171). Existe evidencia en el cerebro de la rata diabética que la actividad de la proteína cinasa A y C están aumentadas y que la actividad de la proteína cinasa II calcio/calmodulina dependiente está disminuida. La disminución de la actividad de esta proteína cinasa II en el cerebro de la rata diabética, podría explicar en parte la menor respuesta que presentó la TrpOH al ser activada por el sistema de ATP, Mg^{2+} y Ca^{2+} en ambas regiones cerebrales de los animales diabéticos de este estudio.

Otro efecto potencialmente tóxico de los niveles elevados de glucosa en el organismo es un aumento en la formación de productos finales de glicación avanzada (PFGA), se conoce que la glicación de las proteínas, implica una reacción en la cual los azúcares (glucosa en general, pero no exclusivamente) reaccionan no-enzimáticamente con las proteínas (y en menor grado con lípidos y DNA) para formar los productos de glicación, también llamados de Amadori o fructosamina en la jerga de la bioquímica clínica (164-166,172). Este proceso en el hombre fue inicialmente demostrado para la hemoglobina (173). En clínica, la cuantificación de la fracción glicada de la hemoglobina, llamada Hb_{A1c} , ha

revolucionado el monitoreo y el estudio de los pacientes diabéticos, ya que proporciona una estimación promedio de las glucemias en los 2 a 3 meses previos. Por ello, la determinación de las proteínas plasmáticas glicadas (generalmente llamadas "fructosamina") se utiliza como herramienta para supervisar el control glucémico obtenido durante un período de tres semanas. Las reacciones mencionadas se consideran "glicación precoz" y de ninguna manera constituyen el fin de las reacciones bioquímicas. Es así que en una segunda fase de la ruta de la glicación (que es independiente de la glucemia), una serie compleja de reordenamientos intramoleculares y reacciones oxidativas conduce a la formación de compuestos múltiples, muy reactivos, generalmente conocidos como PFGA. Estas reacciones son virtualmente irreversibles y las modificaciones sólo desaparecen con las proteínas. Algunos de los PFGA se conocen en detalle, pero en su mayoría las estructuras no han sido aún determinadas, como es el caso de la TrpOH. Los PFGA se pueden producir por la oxidación del producto de Amadori formando intermediarios dicarbonilo muy reactivos tales como la 3-deoxiglucosa. Los compuestos dicarbonilo pueden también formarse directamente por autooxidación de los azúcares catalizados por metales. Algunos de ellos se transforman en carboximetil-lisina. También los PFGA son capaces de producir agregación de proteínas y se ha demostrado que exhiben diversas actividades biológicas (174). Las proteínas modificadas por los PFGA pueden encontrarse en el plasma, en el compartimento intracelular así como en la matriz extracelular. La acumulación de PFGA se hace de preferencia en proteínas de larga vida; notables ejemplos lo constituyen algunos tipos de colágena y las cristalinas. En una

palabra, la glicación es un fenómeno importante en el desgaste tisular y junto con el estrés oxidativo forman la base de las teorías estocásticas del envejecimiento. Estos procesos están incrementados en los pacientes diabéticos (163,175,176).

La relación cualitativa entre el nivel de glucemia, la acumulación tisular de PFGA y los diferentes matices de la patología diabética han sido objeto de extensos estudios en modelos animales. Una primera investigación, en apariencia paradójica, es que la formación de PFGA aumenta en un grado mucho mayor que el aumento de la glucemia; este hecho sugiere que elevaciones moderadas en la glucemia en los diabéticos resultarían en aumentos sustanciales, no lineares, en la acumulación de PFGA.

El hecho de que la glicación de las proteínas se lleve a cabo en los residuos de serina y treonina, apoya la posibilidad de que la TrpOH puede ser glicada, ya que en sus cadenas polipeptídicas contienen estos aminoácidos. Todos estos resultados en conjunto nos permiten plantear que durante la evolución de la DM se produce una glicación de la parte reguladora de la TrpOH como mecanismo principal que explica la inhibición de la enzima en el cerebro de los animales diabéticos.

Otro efecto tóxico que produce la elevación crónica de la glucemia en los individuos diabéticos es el desequilibrio entre la producción y metabolismo de los productos reactivos de oxígeno. Se conoce que el manejo del oxígeno en el cerebro guarda un estricto control, debido a la elevada tasa metabólica de dicho órgano y su exigencia en el consumo de oxígeno. La sobreproducción de especies reactivas de oxígeno (ERO) se encuentra acoplada a la circulación sanguínea y a

la concentración de oxígeno. Por ello, la privación de este elemento genera alteraciones en la cadena respiratoria mitocondrial y promueve la liberación de radicales libres (superóxido), los cuales inician una reacción en cadena que desemboca en el ataque a las membranas a través de la generación de otros radicales libres ó bien de aniones más estables que al reaccionar con elementos metálicos como el fierro y el cobre son capaces de promover la sobreproducción de nuevas ERO y especies reactivas derivadas de compuestos nitrogenados (ERDN), que modifican los lípidos de las membranas celulares, las proteínas y el DNA (167-169,177-181). Recientemente se ha demostrado que la TrpOH, enzima limitante de la cadena biosíntesis de serotonina cerebral es inhibida por peroxinitritos y óxido nítrico, a través de la oxidación de los grupos sulfhidrilos de la cadena enzimática, que concomitantemente se acompaña de una disminución de la actividad de la enzima, un efecto similar fue observado en el cerebro de las ratas diabéticas en este estudio. Una disminución de la actividad de la óxido nítrico sintasa se ha demostrado en el cerebro de rata diabética por la administración de estreptozotocina, cuyo resultado final es un aumento de los ERO y una notable disminución de la TrpOH, similar a lo observado en este trabajo (182-186).

En conclusión, la DM produce un desacople de varias vías metabólicas, toxicidad y estrés oxidativo que en conjunto desencadenan muerte neuronal. Con base en estos hallazgos planteamos la hipótesis de que durante la evolución de la DM se produce un cambio conformacional de la TrpOH y muerte de las neuronas serotoninérgicas, como mecanismos que expliquen la inhibición de la actividad enzimática con un impacto en la biosíntesis de serotonina cerebral, que puede ser relevante en la patofisiología de las complicaciones neuro-psiquiátricas que frecuentemente presentan los pacientes diabéticos.

ANEXO 1

ACTIVIDAD DE LA TRIPTOFANO-5-HIDROXILASA.

La actividad de la enzima se determinó mediante el método de cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC).

1. Se disecó la corteza y tallo cerebral, se pesaron y se homogeneizaron en una solución amortiguadora de tris-HCl 0.05 M, pH 7.4 más 1 mM de DTT y 1 mM de EGTA en una relación de 1: 4 peso de tejido/volumen (P/V).
2. El homogeneizado se centrifugó a 29,000 g por 15 minutos a 4°C.
3. La pastilla obtenida se descartó, se midió el sobrenadante como fuente de la actividad enzimática.
4. Alícuotas de 300 µg de proteína se adicionaron a tubos que contenían el siguiente medio de incubación: Tris-HCl 0.05 M, pH 7.4, 1.0 mM EGTA, 15 µg de catalasa, 250 µM de L-Trp, 200 µM de 6MPH₄, en un volumen final de 200 µl.
5. La reacción se incubó por 10 minutos en un baño metabólico (Dubnoff), con agitación constante a 37°C.
6. Posteriormente la reacción se detuvo al adicionar 20 µl de HClO₄ 6 M, más 5 mM EDTA y 0.1% de ácido ascórbico.
7. Los tubos con la reacción fueron centrifugados a 10,000 rpm por 10 minutos.
8. El sobrenadante se filtró en membranas de 0.4 µm de tamaño de poro, antes de inyectarse al HPLC, el 5-HTP se valoró mediante un detector fluorométrico Watters 460 a 280 nm de excitación y 340 nm de emisión. La fase móvil fue

acetato de sodio 40 mM, pH 3.5 y acetonitrilo, en una relación 95/5 a razón de un ml por minuto.

9. Los resultados se expresan en μmol de 5-HTP/mg de proteína/hora

ANEXO 2

CUANTIFICACION DE PROTEINAS TISULARES.

Las proteínas totales fueron cuantificadas mediante el método espectrofotométrico descrito por Lowry y Cols, usando albúmina bovina como estándar.

1. El tejido cerebral se diluyó 40 veces, de esta dilución se tomaron alícuotas de 0.05 ml, en ellas se realizó la reacción al agregarles 0.5 ml del reactivo A, este consta de los siguientes componente: 0.5 ml de Cu_2SO_4 en 50 ml de Na_2CO_3 al 2% diluido en NaOH 0.1 N.
2. La mezcla de la reacción se agitó vigorosamente y se dejó en reposo a temperatura ambiente, después de 10 minutos se agregó 0.05 ml del reactivo B: el reactivo B es Folin diluido 1:1 con agua bidestialada volumen/volumen. La muestra se agitó y a los 30 minutos se midió el color en un espectrofotometro a 700 nm.
3. En cada ensayo se incluyó una curva estándar de cantidad conocida de albúmina y las concentraciones de proteína fueron expresadas en mg/ gramo de tejido húmedo.

ANEXO 3

DETERMINACION DE GLUCOSA EN EL PLASMA.

A 10 μ l de suero se les adicionó dos ml del reactivo de glucosa oxidasa (117), el cual esta formado por los siguientes reactivos: 4-aminoantipirina 0.2 mM; 2,4 diclorofenol sal de sodio 0.2 mM; glucosa oxidasa bacteriana 5000UI/L; peroxidasa de rábano 500 UI/L; mutarrotasa 100 UI/L; en una solucion amortiguadora de fosfatos 0.05 M, pH 7.0. 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.

11. BIBLIOGRAFIA

1. Mandrup-Poulsen T. Diabetes. Br Med J 1998; 316:1221-25.
2. Songer TJ, Zimmet P. Epidemiology of type 2 diabetes: an international perspective. Pharmaco Economics 1995;8 (Suppl 1):1-11.
3. Norma Oficial Mexicana SSA-015-1999 para la prevención, tratamiento y control de la diabetes. 32 pp. México 1999.
4. Velázquez MO, Lara EA. Epidemia de la diabetes en México y en el mundo. Cap II. En: Control total de la diabetes. Ed. Robles VC, Díaz SJ, Rodríguez SJ, Lavallo GF. Federación Mexicana de Diabetes. Ed Intersistemas SA, México 2002, pp13-29
5. Pinhas-Hamiel O, Dolan LM, Daniels SR, Stanford D, Khoury PR, Zeitler P. Increased incidence of non-insulin-dependent diabetes mellitus among adolescents. J Pediatr 1996;128:608-615.
6. Dabelea D, Pettitt DJ, Jones KL Arslanian SA. Type 2 diabetes mellitus in minority children and adolescents: an emerging problem. Endocrinol Metab Clin North Am ;28:709-29.
7. Pohl JH, Greer JA, Hasan KS. Type 2 diabetes mellitus in children. Endocrinol Pract 1998;4:413-416.
8. Fagot-Compagna A, Pettit DJ, Engelgau MM. Type 2 diabetes among North American children and adolescents. An epidemiological review and public health prospective. J Pediatr 2000;136:664-672.
9. Glaser NS. Non-insulin dependent diabetes mellitus in child-hood and adolescence. Pediatr Clin North Am 1997;44:307-337.
10. Rosenbloom AL, Joe JR, Young RS, Winter NE. Emerging epidemic of type 2 diabetes in youth. Diabetes Care 1999;22:345-54.
11. Kitagawa T, Owada M, Urakami T, Tajima N. Epidemiology of type 1 (insulin-dependent) and type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus in Japanese children. Diab Res Clin Pract 1994;24 (suppl.):S7-S13.

12. 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* 2000;23:S4-19.
13. Karvonen M, Tuomilehto J, Libman I, LaPorte R, for the World Health Organization DIAMOND project group. A review of the recent epidemiological data on the worldwide incidence of type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus. *Diabetologia* 1993;36:883-92.
14. Rennert OM, Francis GL. Update on the genetics and pathophysiology of type 1 diabetes mellitus. *Pediatr Ann* 1999;28:570-574.
15. American Diabetes Association. Medical management of Insulin-dependent (type 1) diabetes. En ADA Inc eds: 2Th, Alexandria, VA.1994,3-6.
16. Gispen WH, Biessels GJ. Cognition and synaptic plasticity in diabetes mellitus. *Trends Neurosci* 2000;23:542-549.
17. Umpierrez GE, Murphy MB, Kitabchi AE. Diabetic ketoacidosis and hyperglycemic hyperosmolar syndrome . *Diabetes Spectrum* 2002;190-196.
18. Holmes CS, Hayford JT, González JL, Weydert JA. A survey of cognitive functioning at different glucose levels in diabetic persons. *Diabetes Care* 1983;6:180-185.
19. McCall AL. The impact of diabetes on the CNS. *Diabetes* 1992;41:557-570.
20. Salković PM, Augood SJ, Bicknell RJ. Monoamine transporter gene expression in the central nervous system in diabetes mellitus. *J Neurochem* 1997;68:2435-41.
21. Crandall EA, Gillis MA, Fernstrom JD. Reduction in brain serotonin synthesis rate in streptozotocin-diabetic rats. *Endocrinology* 1981;109:310-312.
22. Trulsson ME, Mackenzie RG. Increased tryptophan hydroxylase activity may compensate for decreased brain tryptophan levels in streptozotocin-diabetic rats. *J Pharmacol Exp Ther* 1980;212:269-273.
23. Trulsson ME, Jacoby JH, Mackenzie RG. Streptozotocin-induced diabetes reduces brain serotonin synthesis in rats. *J Neurochem* 1986;46:1068-1072.

24. Atienza G, Andres MD, Rebolledo E, Aldegunde M. Brain tryptophan uptake and sodium-potassium ATPase activity in long-term streptozotocin diabetic rats. *Neurochem Res* 1992;17:289-292.
25. Zdravko Lackovic, Salkovic M. Streptozotocin and alloxan produce alterations in rat brain monoamines independently of pancreatic beta cells destruction. *Life Sci* 1990;46:49-54.
26. Manjarrez GG, Herrera MJR, Molina HA, Bueno SS, González RM, Hernández RJ. Alteraciones de la neurotransmisión serotoninérgica cerebral inducida por diabetes mellitus tipo 1. *Rev Invest Clin* 1999;51:293-302.
27. 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.
28. Manjarrez GG, Herrera MJR, Bueno SS, González RM, Hernández RJ. Cambios en la biosíntesis de serotonina cerebral en ratas con diabetes mellitus inducida por estreptozotocina: efecto del tratamiento con insulina. *Rev Invest Clin* 2000;52:509-516.
29. Jacobs BL, Azmitia EC. Structure and function of the brain serotonin system. *Physiol Rev* 1992;72:165-229.
30. 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.
31. Takahashi H, Nakashima S, Ohama E, Takeda S, Ikuta F. Distribution of serotonin-containing cell bodies in the brainstem of the human fetus determined with immunohistochemistry using antiserotonin serum. *Brain Dev* 1986;8:355-65.
32. Levitt P, Moore RY. Developmental organization of raphe serotonin neuron groups in the rat. *Ant Embryol* 1978;154:241-51.

33. Steinbusch HWM. Distribution of serotonin-immunoreactivity in the central nervous system of the rat-cell bodies and terminals. *Neurosci* 1981;4:557-618.
34. 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.
35. Jacobs BJ, Gannon PJ, Azmitia EC. Atlas of serotonergic cell bodies in the cat brainstem: an immunocytochemical analysis. *Brain Res Bull* 1984;13:1-31.
36. Olson L, Seiger A. Early prenatal ontogeny of central monoamine neurons in the rat: fluorescence histochemical observations. *Z Anat Entwickl Gesh* 1972;137:301-16.
37. 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* 193;139:259-82.
38. Beaudet A, Descarries L. The fine structure of central serotonin neurons. *J Physiol Paris* 1981;77:193-203.
39. Fillion MP, Hernández RJ, Bauguen C, Fillon G. Postnatal development of high affinity neuronal recognition sites for (³H) 5-HT in rat brain. *Dev Neurosci* 1982;5:484-91.
40. Peroutka SJ, Lebovitz RM, Snyder SH. Two distinct central serotonin receptors with different physiological function. *Science* 1982;212:827-9.
41. Haydon PG, McCobb DP, Kater SB. Serotonin selectively inhibits growth cone motility and synaptogenesis of specific identified neurones. *Science* 1984;226:561-4
42. 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;69:133-37.

43. Lauder JM, Wallace JA, Krebs H, Petrusz P. Serotonin as a timing mechanism in neuroembryogenesis. In Progress in Psychoneuroendocrinology. North Holland: Elsevier Biomedical Press 1980:539-55.
44. 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.
45. Azmitia ECh. Serotonin neurons, neuroplasticity and homeostasis of neural tissue. *Neuropsychopharmacology* 1999;21:33-45S.
46. Jouvet M. Sleep and serotonin: an unfinished story. *Neuropsychopharmacology* 1999;21:24-27S.
47. Messing RB, Lytle LD. Serotonin containing neurons: Their possible role in pain and analgesia. *Pain* 1977;4:1-21.
48. Gorgnia K. Effects of repeated 5-hydroxytryptamine injection on temperature regulating the functional activity of brain 5-hydroxytryptamine. *Nature* 1976;260:487-91.
49. Shillito EE. The effects of p-chlorophenylalanine on social interaction of male rats. *Br J Pharmacol* 1970;36:193.
50. Oscós A, Hernández RJ. Gestational malnutrition and drugs affecting brain serotonin: effects on temporal control behavior. *Behav Neural Biol* 1982;34:358-71.
51. Morley JE, Levine AS. Corticotrophin releasing factor, grooming and ingestive behavior. *Life Sci* 1982;31:1459-64.
52. Barotsky AL, Taylor J, Massari VJ. Dorsal raphe-hypothalamic projections provide the stimulatory serotonergic input to suckling-induced prolactin release. *Endocrinology* 1983;18:94-03.
53. 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.

54. Mann JJ. Role of the serotonergic system in the pathogenesis of major depression and suicidal behavior. *Neuropsychopharmacology* 1999;21:99-105S.
55. Van Praag HM, De Haan S. Central serotonin metabolism and frequency of depression. *Psychiatry Res* 1979;1:219-224.
56. Blier P, Montigny C. Serotonin and drug-induced therapeutic responses in major depression, obsessive-compulsive and panic disorders. *Neuropsychopharmacol* 1999;21:91-8S.
57. Hernandez RJ. Brain Na⁺K⁺ ATPase activity possibly regulated by a specific serotonin receptor. *Brain Res* 1987;408:399-02.
58. Hernandez 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.
59. Tagliamonte A, Biggio G, Vargin L, Gessa GL. Free tryptophan in serum controls brain tryptophan levels and serotonin synthesis. *Life Sci* 1973;12:277-87.
60. Fernstrom JD. Role of precursor availability in control of monoamine biosynthesis in brain. *Physiol Rev* 1983;63:484-546.
61. Tagliamonte A, Biggio G, Gessa L. Possible role of "free" plasma tryptophan in controlling brain tryptophan concentrations. *Riv Farmacologia e Terapia* 1971;11:251-5.
62. Potiou P, Boulu R. Psychopharmacologie du tryptophan. *Path Biol* 1977;25:656-71.
63. McNemany RH, Oncley JL. The specific binding of L-tryptophan to serum albumin. *J Biol Chem* 1975; 233:1436-47.
64. 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.
65. Sorukes T. Kinetics of tryptophan transport into the brain. *J Neural Transm Suppl* 1977;15:107-14

66. 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.
67. 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 Ciencias de los Alimentos. Universidad Iberoamericana. México D.F. 1995.
68. Boado RJ, Li JY, Nagaya M, Zhang C, Pardridge MW. Selective expression of the large neutral amino acid transporter at the blood-brain barrier. *Proc Natl Acad Sci* 1999;96:12079-12084.
69. Fernstrom JD, Wurtman RJ. Brain serotonin contents: Physiological regulation by plasma neutral amino acids. *Science* 1972; 178:414-16.
70. Fernstrom JD, Faller DV. Neutral amino acid in the brain changes in response to food ingestion. *J Neurochem* 1978;30:1531-8.
71. Boadle-Biber MC. Regulation of serotonin synthesis. *Prog Biophys Mol Biol* 1993;60:1-15.
72. Jequier E, Robinson DS, Lovenberg W, Sjoerdsma A. Further studies on tryptophan hydroxylase in rat brainstem and beef pineal. *Biochem Pharmacol* 1969;18:1071-81.
73. Lovenberg W, Weisbach H, Udenfriend S. Aromatic L-amino acid decarboxylase. *J Biol Chem* 1962;273:343-8.
74. Lovenberg W, Jequier E, Sjoerdsma A. Tryptophan hydroxylase: measurement in pineal gland, brainstem and carcinoid tumor. *Science* 1967;155:217-219.
75. Neckers LM, Biggio G, Moja E, Meek JL, Modulation of brain tryptophan hydroxylase activity by brain tryptophan content. *J Pharmacol Exp Ther* 1971;177:475-480.

76. Hamon M, Glowinski J. Regulation of serotonin synthesis. *Life Sci* 1974 ;15 :1533-1548.
77. Dawson D, Encel N. Melatonin and sleep in humans. *J Pineal Res* 1993;15:1-12.
78. Brown GM. Light, melatonin and the sleep-wake cycle. *J Psychiatry Neurosci* 1994;19:345-353.
79. Florez JC, Takahashi JS. Regulation of tryptophan hydroxylase by cyclic AMP, calcium, norepinephrine and light in cultured chick pineal cells. *J Neurochem* 1996;67:242-250.
80. Jequier E, Robinson DS, Lovenberg W, Sjoerdsma A. Further studies on tryptophan hydroxylase in rat brainstem and beef pineal. *Biochem Pharmacol* 1969;18:1071-1081.
81. Lovenberg W, Jequier E, Sjoerdsma A. Tryptophan hydroxylase: measurement in pineal gland, brainstem and carcinoid tumor. *Science* 1967;155:217-219.
82. Fitzpatrick PF. Tetrahydropterin-dependent amino acid hydroxylases. *Annu Rev Biochem* 1999;68:355-381.
83. Kaufman S. Aromatic amino acid hydroxylases. *Biochem Soc Trans* 1985;13:433-7.
84. Moran GR, Daubner SC, Fitzpatrick PF. Expression and characterization of the catalytic core of tryptophan hydroxylase. *J Biol Chem* 1998;273:12259-6.
85. Manjarrez GG. Activación de la vía serotoninérgica cerebral por desnutrición gestacional. Cinética de la enzima limitante. Tesis de Doctorado en Ciencias Médicas. Universidad Nacional Autónoma de México. México D.F. 1992.
86. Fitzpatrick PF. The aromatic amino acid hydroxylase. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* 2000;74:235-294.
87. Hufton SE, Jennings IG, Cotton RGH. Structure and function of the aromatic amino acid hydroxylases. *Biochem J* 1995;311:353-366.

88. Kaufman S. Regulatory properties of phenylalanine, tyrosine and tryptophan hydroxylases. *Biochem Soc Trans* 1985;13:433-437.
89. D'Sa CM, Arthur Jr RE, Kuhn DM. Expression and deletion mutagenesis of tryptophan hydroxylase fusion proteins: delineation of the enzyme catalytic core. *J Neurochem* 1996;67:917-926.
90. D'Sa CM, Arthur Jr RE, States JCh, Kuhn DM. Tryptophan hydroxylase: cloning and expression of the rat brain enzyme in mammalian cells. *J Neurochem* 1996;67:900-906.
91. Grenett H, Ledley F, Reed L, Woo S. Full-length cDNA for rabbit tryptophan hydroxylase: Functional domains and evolution of aromatic amino acid hydroxylases. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987;84:5530-534.
92. Martínez A, Knappskog PM, Haavik J. A structural approach into human tryptophan hydroxylase and its implications for the regulation of serotonin biosynthesis. *Current Med Chem* 2001;8:1077-1091.
93. Joh TH, Shikini T, Pickel VM, Reis DJ. Brain tryptophan hydroxylase: purification of production of antibodies to, and cellular and ultrastructural localization in serotonergic neurons of rat midbrain. *Proc Natl Acad Sci USA* 1975;72:3575-3579.
94. Weissmann D, Belin MF, Aguera M, Meunier C, Maitre M, Cash CD, Ehret M, Mandel P, Pujol JF. Immunohistochemistry of tryptophan hydroxylase in the rat brain. *Neurosci* 1987;23:291-304.
95. Weissman D, Chamba G, Debure L, Rousset C, Richard F, Maitre M, Pujol JF. Variation of tryptophan-5-hydroxylase concentration in the rat raphe dorsalis nucleus after p-chloropenylalanine administration. II. Anatomical distribution of the tryptophan-5-hydroxylase protein and regional variation of its turnover rate. *Bain Res* 1990;536:46-55.
96. Hamon M, Bourgoin S. Characterization of the Ca²⁺-induced proteolytic activation of the tryptophan hydroxylase from the rat brainstem. *J Neurochem* 1979;32:1837-1844.

97. Hamon M, Bourgoïn S, Hery F, Simonnet G. Phospholipid-induced activation of tryptophan hydroxylase from rat brainstem. *Biochem Pharmacol* 1978;27:915-922.
98. Imai Y, Yamauchi T, Fujisawa H. Modulation of tryptophan hydroxylase activity by phospholipids: stimulation followed by inactivation. *J Neurochem* 1989;53:1293-1299.
99. Neckers LM, Biggio G, Moja E, Meek JL. Modulation of brain tryptophan hydroxylase activity by brain tryptophan content. *J Pharmacol Exp Ther* 1971;177:475-450.
100. Hamon M, Bourgoïn S, Artaud F, El Mestikawy S. The respective roles of tryptophan uptake and tryptophan hydroxylase in the regulation of serotonin synthesis in the central nervous system. *J Physiol* 1981^a; 77:269-280.
101. Richard F, Sanne JL, Bourde O, Weissmann D, Ehret M, Cash C, Maitre M, Pujol JF. Variation of tryptophan-5-hydroxylase concentration in the rat raphe dorsalis nucleus after p-chlorophenylalanine administration. I. A model to study the turnover of the enzymatic protein. *Brain Res* 1990;536:41-45.
102. Ehret M, Cash ChD, Hamon M, Maitre M. Formal demonstration of the phosphorylation of rat brain tryptophan hydroxylase by Ca²/Calmodulin-dependent protein kinase. *J Neurochem* 1989;52:1886-1891.
103. Ehret M, Pevet P, Maitre M. Tryptophan hydroxylase synthesis is induced by 3'5'-cyclic adenosine monophosphate during circadian rhythm in the rat pineal gland. *J Neurochem* 1991;57:1516-1521.
104. 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.
105. Hamon M, Bourgoïn S, Hery F, Simonnet G. Activation of tryptophan hydroxylase by adenosine triphosphate, magnesium and calcium. *Mol Pharmacol* 1977;14,99-110.

**ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA**

106. Kuhn DM, Vogel EL, Lovenberg W. Calcium-dependent activation of tryptophan hydroxylase by ATP and magnesium. *Biochem Biophys Res Comm* 1978;82:759-766.
107. Johansen PA, Jennings I, Cotton RGH, Kuhn DM. Tryptophan hydroxylase is phosphorylated by protein kinase A. *J Neurochem* 1995;65:882-7.
108. Johansen PA, Jennings I, Cotton RGH, Kuhn DM. Phosphorylation and activation of tryptophan hydroxylase by exogenous protein kinase A. *J Neurochem* 1996;66:817-3.
109. Kumer SC, Mockus SM, Rucker PJ, Vrana KN. Amino-terminal analysis of tryptophan hydroxylase: protein kinase phosphorylation occurs at serine-58. *J Neurochem* 1997;69:1738-1745.
110. Kuhn DM, Arthur R Jr, Status JCh. Phosphorylation and activation of brain tryptophan hydroxylase: identification of serine-58 as a substrate site for protein kinase A. *J Neurochem* 1997;68:2220-2223.
111. Kuhn DM, Lovenberg W. Role of calmodulin in the activation of tryptophan hydroxylase. *Fed Proc* 1982;41:2258-2264.
112. Fujisawa H, Yamauchi T, Okumo S, Nakata H. regulation of monoamine biosynthesis by calmodulin-dependent protein kinase in the nervous system. *Adv Cyclic Nucleotide Prot Phos Res* 1984;17:503-510.
113. Darmon MC, Guibert B, Leviel V, Ehret M, Maitre M, Mallat J. Sequence of two mRNA encoding active rat tryptophan hydroxylase. *J Neurochem* 1988;51:312-316.
114. Ichimura T, Isobe T, Okuyama T, Takahashi N, Kuwano R, Takahashi Y. Molecular cloning of cDNA coding for brain-specific 14-3-3 protein, a protein kinase-dependent activator of tyrosine and tryptophan hydroxylase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988;85:7084-7088.
115. Furukawa Y, Ikuta N, Omata S, Yamauchi T, Isobe T, Ichimura T. Demonstration of the phosphorylation-dependent interaction of tryptophan hydroxylase with the 14-3-3 protein. *Biochem Biophys Res Com* 1993;194:144-9.

116. Ichimura T, Uchiyama J, Kunihiro O, Ito M, Horigome T, Omata S, Shinkai F, Kaji H, Isobe T. Identification of the site of interaction of the 14-3-3 protein with phosphorylated tryptophan hydroxylase. *J Biol Chem* 1995;270:28515-2858.
117. Banik U, Wang GA, Wagner PD, Kaufman S. Interaction of phosphorylated tryptophan hydroxylase with 14-3-3 proteins. *J Biol Chem* 1997;272:26219-26225
118. Lida Y, Sawabe K, Kojima M, Oguro K, Nakanashi N, Hasegawa H. Preteasome-driven turnover of tryptophan hydroxylase is triggered by phosphorylation in RBL2H3 cells, a serotonin producing mast cell line. *Eur J Biochem* 2002;269:4780-4788.
119. Lowry BOH, Resebrough JA, Farr, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951;193:265-5.
120. Saifer A, Gerstenfeld S. The photometric microdetermination of blood glucose with glucose oxidase. *J Lab Clin Med* 1958 ;51 :448-460.
121. Junoud A, Lambert AE, Stauffacher W, Renold AE. Diabetogenic action of streptozotocin: relationship of dose to metabolic response. *J Clin Invest* 1968;48 :2129-2139.
122. Mordes JP, Rossini AA. Animal models of diabetes. *Am J Med* 1981;70:353-360.
123. Junoud A, Lambert AE, Orci L, Pictet R, Gonet AE, Renold AE. Studies of the diabetogenic action of streptozotocin. *PSEBM* 1967;126:201-205.
124. American Diabetes Association. Medical management of Insulin-dependent (type 1) diabetes. In ADA Inc eds: 2Th, Alexandria, VA.1994,7-12.
125. Unger RH, Foster DW. Diabetes mellitus. In Willson JD, Foster DW, eds. *Williams textbook of Endocrinology* 8Th Pennsylvania : Saunders Company 1995 ;1255.1233.
126. Berkowitz BA, Head R, Joh T, Hemptstead J. Experimental diabetes : Alteration in circulating dopamine- β -hidroxylase and norepinephrine. *J Pharmacol Exp Ther* 1980; 213:18-23.

127. Oster MH, Castonguay TW, Keen CL, Stern JS. Circadian rhythm of corticosterone in diabetic rats. *Life Sci* 1988;43:1643-1645.
128. Wilber JF, Banerji A, Prasad C, Mori M. Alterations in hypothalamic-pituitary-thyroid regulation produced by diabetes mellitus. *Life Sci* 1981;28:1757-1763.
129. Unger RH. High growth hormone levels in diabetic ketoacidosis. A possible cause of insulin resistance. *JAMA* 1965;191:945-947.
130. DeFronzo RA. Pathogenesis of type 2 diabetes: metabolic and molecular implications for identifying diabetes genes. *Diabetes Rev* 1997;5:177-269.
131. Ake L. Etiology, pathogenesis and natural history DMID. In DeGroot LJ, ed: *Endocrinology*. Pennsylvania: Saunders Company 1995;2:1423-1435.
132. Wahren J, Felig P, Cerasi E. Splanchnic and peripheral glucose and amino acid metabolism in diabetes mellitus. *J Clin Invest* 1972;51:1870-1878.
133. Herber SM, Dunsmore IR. Does control affect growth in diabetes mellitus ?. *Acta Paediatr Scand* 1988;77:303-306.
134. Clarke WL, Vance ML, Rogol AD. Growth and the child with diabetes mellitus. *Diabetes Care* 1993;Suppl 3 :101-106.
135. Zhou YP, Ling ZC, 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;45:981-986.
136. Lewis B, Mancini M, Mattock M, Chait A, Fraser TR. Plasma triglyceride and fatty acid metabolism in diabetes mellitus. *Eur J Clin Invest* 1972;2:445-453.
137. Smith SA, Pogson CHI. The metabolism of L-Tryptophan by liver cells prepared from adrenalectomized and streptozotocin-diabetic rats. *Biochem J* 1981;200:605-609.
138. Badawy AAB. The functions and regulation of tryptophan pyrrolase. *Life Sci* 1977;21:755-768.

139. Patel PD, Pontrello C, Burke S. Robust and tissue-specific expression of TPH2 versus TPH1 in rat raphe and pineal gland. *Biol Psychiatr* 2004;55:428-433.
140. Veenstra VWJ, Cook EH Jr. Knockout mouse points to second form of tryptophan hydroxylase. *Mol Interv* 2003;3:72-75.
141. Walther DJ. Synthesis of serotonin by second tryptophan hydroxylase isoform. *Science* 2003;299:76.
142. Voet D, Voet JG. Introduction to enzymes. In *Biochemistry*. Wiley & Sons, Inc. ed. New York USA. 1995 ;332-344.
143. Koshland DE Jr. In: Boyer PD. *The molecular basis for enzyme regulation*. Academic, New York 1970 :341-396
144. Wimmer MJ, Rose IA. Mechanisms of enzyme-catalyzed group transfer reactions. *Annu Rev Biochem* 1978;47:1031,
145. Neet EK. Cooperativity in enzyme function : Equilibrium and kinetic aspects. In: *Methods in enzymology Vol 64*. Ed. Purich LD. Academic Press 1980:139-192.
146. Yamauchi T, Nakata H, Fujisawa H. A new activator protein that activates tryptophan-5-monoxygenase and tyrosine-3-monooxygenase in the presence of Ca²⁺-Calmodulin dependent protein kinase. *J Biol Chem* 1981;256:5404-5409.
147. Ichimura T, Isobe T, Okuyama T, Yamauchi T, Fujisawa H. Brain 14-3-3 is an activator protein that activates tryptophan-5-monoxygenase and tyrosine 3-monooxygenase in the presence of Ca²⁺-calmodulin dependent protein kinase II. *FEBS Lett* 1987;219:79-82.
148. Voet D, Voet JG. Hemoglobin: protein function in microcosm. In *Biochemistry*. Wiley & Sons, Inc. ed. New York USA. 1995;215-250.
149. Hill MC, Waight DR, Bardsley GW. Does an enzyme follow the Michaelis-Menten equation ?. *Mol Cell Biochem* 1977 ;15 :173-177.
150. Lehninger AL. *Enzimas: mecanismo, estructura y regulación*. En *Bioquímica*. Omega SA, Barcelona 1984;223-254.

151. Voet D, Voet JG. Enzymatic catalysis. In Biochemistry. Wiley & Sons, Inc. ed. New York USA. 1995 ;371-410.
152. Shields JP, Eccleston D. Effects of electrical stimulation of rat midbrain on 5-hydroxytryptamine synthesis as determined by a sensitive radioisotope method. *J Neurochem* 1972;19:265-272.
153. Herr EB, Gallager WD, Roth HR. Tryptophan hydroxylase: activation in vivo following stimulation of central serotonergic neurons. *Biochem Pharmacol* 1975 ;24 :2019-2023.
154. Bourgoin S, Oliveras LJ, Bruxelle J, Hamon M, Besson MJ. Electrical stimulation of the nucleus raphe magnus in the rat. Effects on 5-HT metabolism in the spinal cord. *Brain Res* 1980;194:377-389.
155. Boadle-Biber CM, Johannessen NJ, Narasimhachari N, Phan TH. Activation of tryptophan hydroxylase by stimulation of central serotonergic neurons. *Biochem Pharmacol* 1983;32:185-188.
156. Boadle-Biber CM, Johannessen NJ, Narasimhachari N, Phan TH. Tryptophan hydroxylase: increase in activity by electrical stimulation of serotonergic neurons. *Neurochem Int* 1986;8:83-92.
157. Hamon M, Bourgoin S, Artaud F, Glowinski J. The role of intraneuronal 5-HT and of tryptophan hydroxylase activation in the control of 5-HT synthesis in rat brain slices incubated in K^+ enriched medium. *J Neurochem* 1979;33:1031-1042.
158. Boadle-Biber M. Activation of tryptophan hydroxylase from central serotonergic neurons by calcium and depolarization. *Biochem Pharmacol* 1977;27:1069-1079.
159. Boadle-Biber M. Activation of tryptophan hydroxylase from slices of rat brainstem incubated with agents which promote calcium uptake or intraneuronal release. *Biochem Pharmacol* 1979;28:2129-2138.
160. Stenfors C, Ross SB. Evidence for involvement of protein kinases in the regulation of serotonin synthesis and turnover in the mouse brain in vivo. *J Neural Transm* 2002;109:1353-1363.

161. Hernández JS, Gómez PFJ. Neuropatía diabética. En Diabetes Actualidades terapéuticas. Primera ed. Eds. Gómez Pérez FJ y Aguilar Salinas CA. Medicina y Mercadotecnia SA de CV, México 2004.pg299-311.
162. Gómez PFJ, García RG, García AH, Rull JA. Neuropatía diabética. En Tratado de Diabetología. Primera Ed. Eds.Gómez Pérez FJ, Rull Rodrigo JA. Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubirán. México 1997. pg 763-782.
163. Kowluru RA, Heidorn DB, Edmondson SP, Bitensky MW, Kowluru A, Downer NW, Whaley TW, Trehella J. Glycation of calmodulin: chemistry and structural and functional consequences. *Biochem* 1989;28:2220-8.
164. Kikuchi S, Shinpo K, Takeuchi M, Yamagishi S, Makita Z, Sasaki N, Tashiro K. Glycation a sweet tempter for neuronal death. *Brain Res Rev* 2003;41:306-323.
165. Gugliucci A. Glicación de proteínas: rol protagónico de la hiperglicemia en las complicaciones crónicas de la diabetes mellitus. *Rev Med Uruguay* 2000;16:58-75.
166. Traverso N, Menini S, Cottalasso D, Odetti P, Marinari UM, Pronzato MA. Mutual interaction between glycation and oxidation during non-enzymatic protein modification. *Biochem Biophys Acta* 1997;1336:409-18.
167. Alderton WK, Cooper ChE, Knowles RG. Nitric oxide synthesis: structure, function and inhibition. *Biochem J* 2001;357:593-615.
168. Yu WJ, Juang ShW, Chin WT, Chi TCh, Wu TJ, Cheng JT. Decrease of nitric oxide synthase in the cerebrocortex of streptozotocin-induced diabetic rats. *Neurosci Lett* 1999;272:99-102.
169. Yu WJ, Juang SW, Chin WT, Chi TCh, Chang ChJ, Cheng JT. Insulin restores neuronal nitric oxide synthase expression in streptozotocin-induced diabetic rats. *Life Sci* 2000;68:625-634.

170. Malika RA. The pathology of human diabetic neuropathy. *Diabetes* 1997;46 (suppl 2):550-553.
171. Bhardwaj SK, Kaur SS, Sharma P, Kaur G. Impact of diabetes on CNS: role of signal transduction cascade. *Brain Res Bull* 1999; : 155-62.
172. Gómez PFJ, Aguilar SCA, Rull JA. Relación entre glucosilación de las proteínas y las complicaciones tardías de la diabetes mellitus. En *Tratado de Diabetología*. Primera Ed. Eds. Gómez Pérez FJ, Rull Rodrigo JA. Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubirán. México 1997. pg 661-674.
173. Abraham EC. Determination of the glycosylated hemoglobin (HbA1) with a new micro-column procedure. *Diabetes* 1978;27:931.
174. Van Holde KE, Mathews Ch. Metabolismo de los hidratos de carbono II: Biosíntesis. En *Bioquímica*. Segunda Ed. McGraw-Hill Interamericana. España 2000. pg 613-649.
175. Ayra RM, Díaz HO. Productos de la glucosilación avanzada y diabetes mellitus. *Rev Cubana End* 1999;10: 57-64.
176. Sheetz MJ. Molecular understanding of hyperglycemia adverse effects for diabetic complications. *JAMA* 2002;288:2579-2588.
177. Hussain AM, Mitra AK. Effect of reactive oxygen species on the metabolism of tryptophan in rat brain: influence of age. *Mol Cell Biochem* 2004;258:145-153.
178. Jaffrey SR, Snyder SH. Nitric oxide: a neural messenger. *Ann Rev Cell Dev Biol* 1996;11:417-440
179. Abu-Soud HM, Wang J, Rousseau DL, Fukuto JM, Ignarro LJ, Steuhr DJ. Neural nitric oxide synthase self-inactivates by forming a ferrous-nitrosyl complex during aerobic catalysis. *J Biol Chem* 1995;270:22997-22306.
180. Lipton SA, Choi YB, Pan ZH, Lei SZ, Chen HSV, Sucher NJ, Loscalzo J, Singel DJ, Stamler JS. A redox-based mechanism for the neuroprotective and neurodestructive effects of nitric oxide and related nitroso-compounds. *Nature* 1993;264:626-632.

181. Hunt JV, Wolff SP. Oxidative glycation and free radical production: a causal mechanism of diabetic complications. *Free Radical Res Commun* 1991;12-13 pt 1:115-123.
182. Hussain AM, Mitra AK. Effect of reactive oxygen species on the metabolism of tryptophan in rat brain: influence of age. *Mol Cell Biochem* 2004;258:145-153.
183. Kuhn DM, Geddes TJ. Peroxynitrite inactivates tryptophan hydroxylase via sulfhydryl oxidation. *J Biol Chem* 1999;274:29726-29732.
184. Kuhn DM, Arthur RE. Inactivation of brain tryptophan hydroxylase by nitric oxide. *Journal of Neurochemistry* 1996;67,1072-1077
185. Kuhn DM, Arthur RE. Inactivation of brain tryptophan hydroxylase by nitric oxide: enhancement by tetrahydrobiopterin. *Journal of Neurochemistry* 1997;68,1495-1502.
186. Kuhn DM, Arthur RE Jr. Molecular mechanism of the inactivation of tryptophan hydroxylase by nitric oxide: attack on critical sulfhydryls that spare the enzyme iron center. *J Neurosci* 1997;17:7245-7251.

ABREVIATURAS

Diabetes mellitus	DM
Encuesta Nacional de Salud	ENSA
Sistema Nervioso Central	SNC
Barrera hematoencefálica	BHE
Nucleo caudal lineal	NCL
Núcleo del rafé medio	NRM
Núcleo del rafé dorsal	NRD
Núcleo del leminisco medial	NLM
Nucleo del rafé obscurus	NRO
Núcleo del rafe magnus	NRM
Núcleo ventro lateral medular	NVLM
Núcleo del área postrema	NAP
Serotonina	5-HT, 5-hidroxitriptamina
L-Triptofano	L-Trp
L-triptofano libre	FL
Acidos grasos libres	AGL
Aminoácidos neutros	AAN
Triptofano-5-hidroxilasa	TrpOH
Tetrahidrobiopterina	BH ₄
Ión ferroso	Fe ²⁺
Oxígeno	O ₂
Quinonoide dihidrobiopterina	BH ₂
Quinonoide dihidrobiopterina reductasa	DBR
Nicotinamida adenin dinucleotido	NAD
5-hidroxitriptofano	5-HTP
Descarboxilasa de los aminoácidos aromáticos	DAA
Tirosina hidroxilasa	TH

Fenilalanina hidroxilasa	PAH	
Calcio	Ca ²⁺	
Adenosin monofosfato cíclico	AMP _C	
Estreptozotocina	STZ	
Rata diabética	RD	
Velocidad máxima de la reacción	V _{max}	
Constante de Michaelis-Menten	K _m	
Cloruro de magnesio	Mg ₂ Cl	
Cloruro de calcio	Ca ₂ Cl	
Adenosin trifosfato	ATP	
Rata diabética	D	
Rata control	C	
Dithiothreitol	DTT	
Ethylene glycol-bis (β-aminoethyl ether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid		EGTA
Grados centígrados	°C	
milimolar	mM	
Tris ácido clorhídrico	Tris HCl	

Inhibition and kinetic changes of brain tryptophan-5-hydroxylase during insulin-dependent diabetes mellitus in the rat

ROCIO HERRERA¹, GABRIEL MANJARREZ¹ & JORGE HERNANDEZ²

¹Laboratory of Developmental Neurochemistry, Specialties Hospital, XXI Century, National Medical Center (CMN-SXXI), Mexican Institute of Social Security (IMSS), Av. Cuauhtémoc 330, Col. Doctores, CP 06720, Mexico City, Mexico, and

²Laboratory of Neurotogeny, Department of Physiology, Biophysics and Neurosciences, Center of Research and Advanced Studies (CINVESTAV) IPN, Av. Instituto Politécnico Nacional 2508, Col. San Pedro Zacatenco, CP 07300, Mexico City, Mexico

(Received 24 May 2004; revised 24 August 2004; accepted 2 December 2004)

Abstract

In the present study we report results on the possible mechanism of inhibition of tryptophan-5-hydroxylase activity induced by insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM). Kinetic experiments were done with different L-tryptophan (L-Trp) concentrations in the rat brain at different days of evolution of the disease. Additionally, different activation conditions of the enzyme were evaluated, to gain information on the mechanism of the activity changes. Diabetes state was induced in normal male rats, by the administration of 75 mg/kg body weight of streptozotocin (STZ). The results showed an increase of the K_m value and a decrease in the V_{max} in the diabetic's brain as compared to controls. Interestingly, in the diabetic group, the response capacity to phosphorylation is significantly reduced. These shifts in the activity of tryptophan-5-hydroxylase developed during IDDM may not be explained only by a decrease of L-Trp, but also by a possible change in the enzyme itself, reflected in a diminished affinity for the substrate and a decreased response to phosphorylating conditions.

Keywords: Brain, diabetes mellitus, insulin, serotonin, tryptophan-5-hydroxylase

Introduction

Several studies concerning insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM) and brain serotonin (5-hydroxytryptamine, 5-HT) have been published (Trulsson et al. 1980, Crandall et al. 1981, Trulsson et al. 1986, Lackovic and Salkovic 1990, Yang and Lin 1995, Molina 1996, Manjarrez et al. 1999, 2000, Herrera et al. 2003). The results of these studies point to a decreased serotonergic activity, coincident with a diminution of both the concentration of brain L-tryptophan (L-Trp) and the activity of tryptophan-5-hydroxylase (EC 1.14.16.4, TrpOH), which support a lesser activity of the serotonergic system (Trulsson et al. 1980, 1986, Crandall et al. 1981,

Molina 1996, Manjarrez et al. 1999, 2000). Additionally, it is interesting that at a given point of the IDDM evolution the enzyme activity increased (Trulsson et al. 1980, Manjarrez et al. 1999, 2000). Therefore, there is still controversy on the subject.

TrpOH is a member of the aromatic amino acid hydroxylases superfamily (Jequier et al. 1969, Hufton et al. 1995, Martínez et al. 2000). It catalyses an oxidation reaction, that consumes a reduced biopterin cofactor and molecular oxygen for the hydroxylation of L-Trp to 5-hydroxytryptophan (Grahame-Smith 1964, Jequier et al. 1969, Neckers et al. 1971). A decarboxylation leads to the synthesis of serotonin (Loverberg et al. 1962). TrpOH is rate limiting in the formation of 5-HT from L-Trp, and consequently

Correspondence: G. Manjarrez, Laboratory of Developmental Neurochemistry, Specialties Hospital, XXI Century, National Medical Center (CMN-SXXI), Mexican Institute of Social Security (IMSS), Av. Cuauhtémoc 330, Col. Doctores, CP 06720 Mexico City, Mexico. Tel: +52 55 55780240. Fax: +52 55 57610952. E-mail: willisga@df1.telmex.net.mx

determines the overall rate of 5-HT synthesis within serotonergic neurons. Any change in its level of activity will alter the ongoing rate of 5-HT synthesis and may, in turn, lead to a change in the level of endogenous 5-HT. Since TrpOH is normally unsaturated with respect to its substrate, its activity may be increased by raising brain L-Trp concentration until saturating levels are achieved. The opposite effect is observed when L-Trp availability in the brain decreases (Neckers et al. 1977, Hamon et al. 1981, Boadle-Biber 1993).

The present study was aimed to obtain further information on the mechanism implicated in the modification of TrpOH activity in the brain of diabetic rats, by assessing its kinetics. It is known that TrpOH is activated by phosphorylation through a calcium/calmodulin-dependent protein kinase (Hamon et al. 1977, Kunn et al. 1980, Ehret et al. 1989, 1991, Manjarrez et al. 1994, Ichimura et al. 1995, Johansen et al. 1995, 1996, Kumer et al. 1997). Therefore, we also evaluated the enzyme activity during the course of IDDM, under different phosphorylation conditions, in order to gain more insight in the pathophysiological mechanism involved, which may importantly affect the brain serotonergic function.

Material and methods

Forty-four male Wistar rats, with an average body weight of 250 ± 10 g were used. They were kept for two weeks under the following environmental conditions: Temperature $22 \pm 2^\circ\text{C}$; light and darkness cycles of 12 h; minimal noise and handling. During this period, the animals were fed rodent diet lab pellets (Nutritional International, Brent Wood, MO, USA), and water *ad libitum*. After this adaptation period the rats were divided in the following groups: A diabetic group (D) of 22 rats developed by the administration of 75 mg/kg weight i.p. of streptozotocin (STZ), (Sigma Chemical Co. St Louis, USA), diluted in citrate buffer 0.1 M, pH 4.5; and a control group (C) of 22 rats that received only the vehicle solution. All groups were fed the same nutritional diet and given water *ad libitum*.

At days 7 and 21 after the treatment with STZ or vehicle all the animals were sacrificed, their brains were dissected into cerebral cortex and brainstem on an ice-cold plate, weighed and homogenized in Tris-HCl buffer 50 mM, pH 7.40, plus 1.0 mM EGTA and 1 mM 1,4-dithioerythritol. In these tissue samples the kinetic analysis of TrpOH activity was performed, using a 29,000g supernatant (see biochemical assays). In order to decrease any possible variations due to circadian rhythmicity, collection of tissues was always carried out between 09:00 and 11:00 h. In addition, food intake and body weights were recorded in all groups.

Biochemical assays

TrpOH activity was determined by measuring 5-hydroxytryptophan production using high-performance liquid chromatography (HPLC) with fluorometric detection as described previously (Johansen et al. 1991). Briefly, a supernatant solution of brain homogenate (300 μg protein) was incubated in the presence of 0.05 M Tris buffer, pH 7.40, 1.0 mM EGTA, 15 μg catalase, 200 μM 2-amine-4-hydroxy-1-methyl tetrahydropterine (6MPH₄). Activated TrpOH activity was assessed in the presence of 0.5 mM ATP, 5 mM MgCl₂ and 0.1 mM CaCl₂. The results of experiments under phosphorylating conditions were referred as phosphorylated diabetic group. The kinetics of the enzyme were measured using L-Trp concentration ranging from 0.025 to 0.4 mM. Reactions were performed at 37°C for 10 min and stopped by the addition of 10 μl of 6 M HClO₄ containing 5 mM EDTA and 0.1% (wt/vol) ascorbic acid. Twenty microliter of the reaction mixture were injected into the HPLC (Waters and Waters model 474 scanning fluorescence detector). A symmetry C₁₈ column (5 μm particle size), 3.9 \times 150 mm (Waters) was used. The mobile phase was prepared with sodium acetate 40 mM, pH 3.30 and acetonitrile, in a relation 95:5, respectively, at 1 ml/min. Proteins were determined by the method of Lowry et al. 1951, using bovine serum albumin as standard.

Statistical methods

The kinetic analysis of TrpOH was determined using a computer program Graph Pad Prism 3. Differences between mean value sets were analyzed for significance by ANOVA and Student's *t*-test with a level of significance of $p < 0.05$.

Results

The specific activity of TrpOH, a rate limiting step in brain serotonin biosynthesis, significantly diminished in the cerebral cortex and brainstem of group D, after the seventh day of STZ administration, when compared to the control group ($p < 0.001$) (Table I).

Figures 1 and 2 illustrate representative kinetic curves of TrpOH from D and C groups in the brainstem and cerebral cortex at 7 and 21 days after of the STZ administration, with their respective double reciprocal plots.

The K_m values of TrpOH in the cerebral cortex and in the brainstem from diabetic rats were significantly increased when compared to those from control rats ($p < 0.001$), (Tables II and III). In the same tables it can be noted that V_{max} values of the enzyme in both brain regions of the diabetic group were significantly decreased in comparison to those of the control group ($p < 0.001$).

Table I. Activity of tryptophan-5-hydroxylase in rat with diabetes mellitus (DM) and controls (C).

Days post-administration of STZ	Brainstem		Cerebral cortex	
	C	DM	C	DM
7	2.410 ± 0.186	1.262 ± 0.139*	1.200 ± 0.222	0.675 ± 0.027*
21	2.670 ± 0.172	1.170 ± 0.164*	1.178 ± 0.380	0.620 ± 0.154*

Each value represents the mean ± SD (nmol 5-HTP/mg protein/h) from seven animals. All determinations were performed in duplicate samples. * $p < 0.001$. Student's *t*-test.

The enzyme activity in the cerebral cortex and in the brainstem under phosphorylating conditions (ATP, Mg^{2+} and Ca^{2+}) is shown in Figure 3. Both groups showed a significant increase in the enzyme's activity ($p < 0.001$). It is important to note that the phosphorylated enzyme of the diabetic group showed a decreased response although it reached control values at 7 and 21 days ($p < 0.001$).

Discussion

Reported experimental evidence from our own and other laboratories have shown that IDDM cause a decrease in the brain 5-HT biosynthesis with low concentrations of L-Trp and low activity of the rate-limiting enzyme TrpOH (Crandall et al. 1981, Trulson et al. 1980, 1986, Molina 1996, Manjarrez et al. 1999, 2000). A decrease in available substrate, L-Trp, could explain the diminished brain activity of this metabolic pathway observed in diabetic animals. It is well known that any change in its activity will alter the ongoing rate of 5-HT synthesis. Since TrpOH is normally unsaturated with respect to its substrate, its activity may be diminished by decreased brain L-Trp concentration (Neckers et al. 1977, Boadle-Biber 1993). However, a sustained inhibition in the enzyme activity, gives support to the hypothesis that other

intrinsic regulatory factors of the TrpOH are involved. Boadle-Biber (1993) pointed out that besides alterations in L-Trp availability, changes in the kinetic properties of the TrpOH can account for the regulation of neurotransmitter synthesis. Interestingly, our present results show that in normal animals there is an increased affinity of the enzyme for L-Trp in the cerebral cortex, when compared to the brainstem. A similar regional difference was observed in the diabetic brain. However, when compared to the control group, the diabetic group showed a significant decreased affinity for L-Trp and a lower rate of enzyme activity in both regions studied. Together, these findings suggest the possibility of a different isoform being expressed in the diabetic brain.

The activation of TrpOH by ATP, Mg^{2+} and Ca^{2+} in soluble preparations from the rat brain, is a well established phenomenon (Hamon et al. 1977, Kuhn et al. 1980, Manjarrez et al. 1994, Ichimura et al. 1995, Johansen et al. 1995, 1996, Florez and Takahashi, 1996, Martínez et al. 2000). In this study we also confirmed that such an activation appeared in the normal and in the diabetic brain, but it is important to note that the phosphorylated diabetic group showed a decreased response although enough to reach control values. This activation indicates that TrpOH is a substrate for

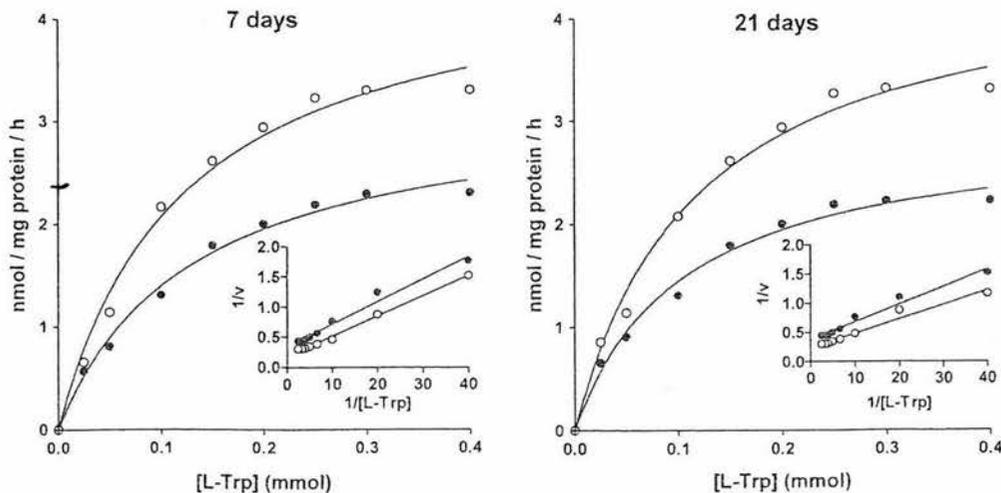


Figure 1. Kinetic curves and double reciprocal plots of TrpOH in the brainstem at days 7 and 21 after the administration of STZ (75 mg/kg body weight). O, C group; •, D group. Each point represents the mean value from five animals. All determinations were performed in duplicate samples.

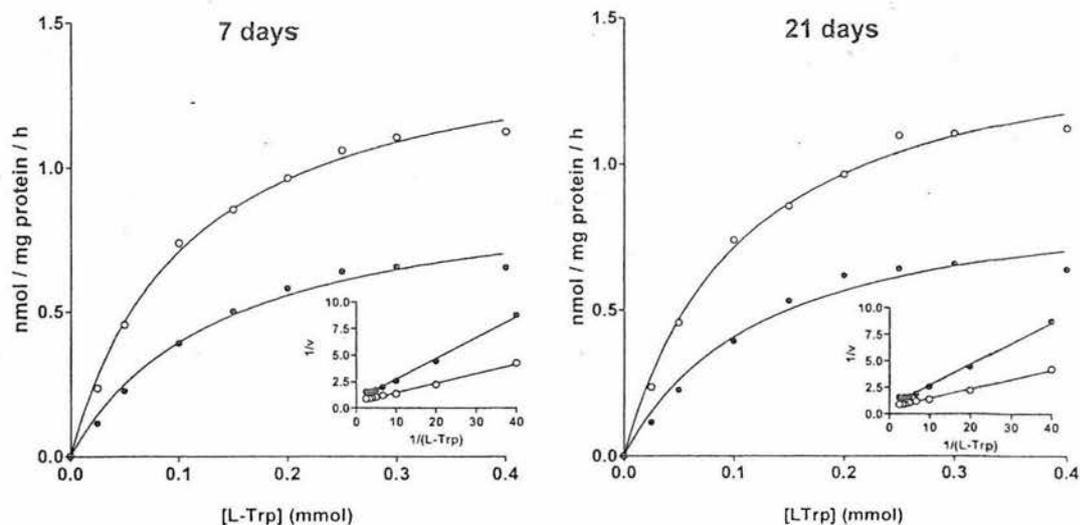


Figure 2. Kinetic curves and double reciprocal plots of TrpOH in the cerebral cortex at days 7 and 21 after the administration of STZ (75 mg/kg body weight). O, C group; •, D group. Each point represents the mean value from five animals. All determinations were performed in duplicate samples.

phosphorylation catalyzed by Ca^{2+} -calmodulin-dependent protein kinase (Hamon et al. 1977, Ehret et al. 1989, Kuhn et al. 1980, Manjarrez et al. 1994, Ichimura et al. 1995, Johansen et al. 1995, 1996, Florez and Takahashi 1996, Martínez et al. 2000). Furthermore, our results also show an activating effect of ATP and Mg^{2+} over TrpOH (Garber and Makman 1987) (results not shown). Both systems activate TrpOH as they do with tyrosine hydroxylase (Vulliet et al. 1980, Johansen et al. 1995, 1996, Florez and Takahashi 1996, Martínez et al. 2000). These results confirm that second messengers such as cAMP, IP_3 and diacylglycerol could also be involved in the

activation of this enzyme and besides, suggest that IDDM modifies these phosphorylation mechanisms of TrpOH. Phosphorylating conditions stimulate the enzyme from the normal brain, but there is a limitation in the response capacity in the diabetic brain.

Altogether these results represent an interesting example of the induction of an epigenetic modification on a functional protein system, TrpOH, by IDDM. Possibly the changes of the enzyme kinetics and its phosphorylating capacity are secondary to a conformational change of the TrpOH molecular complex during the evolution of the disease, with an impact on the biosynthesis of an important brain

Table II. Kinetic constants of the tryptophan-5-hydroxylase in brainstem of rat with diabetes mellitus (DM) and controls (C).

Days post-administration of STZ	V_{\max} (nmol 5-HTP/mg protein/h)		K_m (μmol)	
	C	DM	C	DM
7	4.691 \pm 0.006	3.604 \pm 0.024*	127.21 \pm 9.00	177.60 \pm 4.00*
21	4.778 \pm 0.033	3.415 \pm 0.024*	134.40 \pm 3.00	159.80 \pm 2.00*

Each value represents the mean \pm SD from five animals. All determinations were performed in duplicate samples. * $p < 0.001$. Student's *t*-test.

Table III. Kinetic constants of the tryptophan-5-hydroxylase in cerebral cortex of rat with diabetes mellitus (DM) and controls (C).

Days post-administration of STZ	V_{\max} (nmol 5-HTP/mg protein/h)		K_m (μmol)	
	C	DM	C	DM
7	1.498 \pm 0.002	0.928 \pm 0.013*	107.00 \pm 2.00	127.80 \pm 3.00*
21	1.515 \pm 0.020	0.932 \pm 0.010*	111.00 \pm 1.05	132.00 \pm 1.00*

Each value represents the mean \pm SD from five animals. All determinations were performed in duplicate samples. * $p < 0.001$. Student's *t*-test.

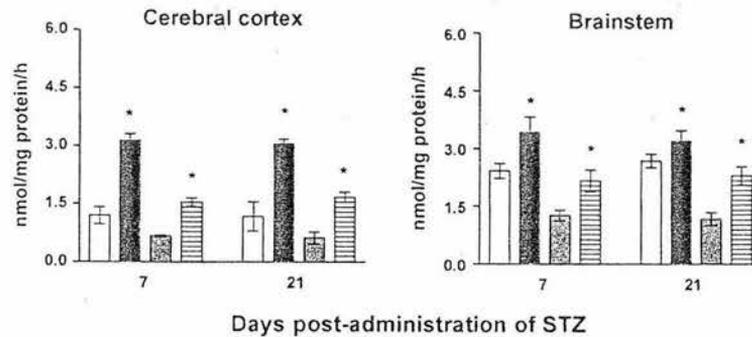


Figure 3. Activation of TrpOH by ATP, Mg^{2+} and Ca^{2+} . □, control group; ■, phosphorylated control group; ▒, diabetic group; ▨, phosphorylated diabetic group. Each bar represents the mean \pm SD from seven animals. All determinations were performed in duplicate samples. Treatment: Df = 7, SS = 65.56, MS = 9.365, F = 140.6. * $p < 0.001$. Time: Df = 9, SS = 0.1710, MS, F = 0.341. Not significant, ANOVA.

neurotransmitter that may be of relevance in the pathophysiology of the psychoneurologic complications in diabetic patients.

Acknowledgements

Authors are grateful to Ignacio Vargas and Alfonso Boyzo for technical assistance. This research was supported by grants from Mexican Institute of Social security (IMSS) and CONACYT de México.

References

- Boadle-Biber MC. 1993. Regulation of serotonin synthesis. *Prog Biophys Mol Biol* 60:1–15.
- Crandall EA, Gillis MA, Fernstrom JD. 1981. Reduction in brain serotonin synthesis rate in streptozotocin-diabetic rats. *Endocrinology* 109:310–312.
- Ehret M, Cash ChD, Hamon M, Maitre M. 1989. Formal demonstration of the phosphorylation of rat brain tryptophan hydroxylase by Ca^{2+} /Calmodulin-dependent protein kinase. *J Neurochem* 52:1886–1891.
- Ehret M, Pevet P, Maitre M. 1991. Tryptophan hydroxylase synthesis is induced by 3′/5′-cyclic adenosine monophosphate during circadian rhythm in the rat pineal gland. *J Neurochem* 57:1516–1521.
- Florez JC, Takahashi JS. 1996. Regulation of tryptophan hydroxylase by cyclic AMP, calcium, norepinephrine and light in cultured chick pineal Cells. *J Neurochem* 67:242–250.
- Garber SL, Makman MH. 1987. Regulation of tryptophan hydroxylase activity by a cyclic AMP-dependent mechanism in rat striatum. *Mol Brain Res* 3:1–10.
- Grahame-Smith DG. 1964. Tryptophan hydroxylase in brain. *Biochem Biophys Res Commun* 16:586–592.
- Hamon M, Bourgoin S, Henry F, Simonnet G. 1977. Activation of tryptophan hydroxylase by adenosine triphosphate, magnesium and calcium. *Mol Pharmacol* 14:99–110.
- Hamon M, Bourgoin S, Artaud F, El Mestikawy S. 1981a. The respective roles of tryptophan uptake and tryptophan hydroxylase in the regulation of serotonin synthesis in the central nervous system. *J Physiol Paris* 77:269–280.
- Herrera MR, Manjarrez GG, Nishimura ME, Hernandez-RJ. 2003. Serotonin-related tryptophan in children with insulin-dependent diabetes. *Pediatr Neurol* 28:20–23.
- Huften SE, Jennings IG, Cotton RGH. 1995. Structure and function of the aromatic amino acid hydroxylases. *Biochem J* 311:353–366.
- Ichimura T, Uchiyama J, Kunihiro O, Ito M, Horigome T, Omata S, Shinkai F, Kaji H, Isobe T. 1995. Identification of the site of interaction of the 14-3-3 protein with phosphorylated tryptophan hydroxylase. *J Biol Chem* 270:28515–28518.
- Jequier E, Robinson DS, Lovenberg W, Sjoerdsma A. 1969. Further studies on tryptophan hydroxylase in rat brainstem and beef pineal. *Biochem Pharmacol* 18:1071–1081.
- Johansen PA, Wolf WA, Kuhn DM. 1991. Inhibition of tryptophan hydroxylase by benserazide and other catechols. *Biochem Pharmacol* 41:625–628.
- Johansen PA, Jennings I, Cotton RGH, Kuhn DM. 1995. Tryptophan hydroxylase is phosphorylated by protein kinase A. *J Neurochem* 65:882–888.
- Johansen PA, Jennings I, Cotton RGH, Kuhn DM. 1996. Phosphorylation and activation of tryptophan hydroxylase by exogenous protein kinase A. *J Neurochem* 66:817–823.
- Kuhn DM, O'Callaghan JP, Juskevich J, Lovenberg W. 1980. Activation of brain tryptophan hydroxylase by ATP, Mg^{2+} dependence on calmodulin. *Proc Natl Acad Sci USA* 77:4688–4691.
- Kumer SC, Mockus SM, Rucker PJ, Vrana KEJ. 1997. Amino-terminal analysis of tryptophan hydroxylase: protein kinase phosphorylation occurs at serine-58. *J Neurochem* 69:1738–1745.
- Lackovic Z, Salkovic M. 1990. Streptozotocin and alloxan produce alterations in rat brain monoamines independently of pancreatic beta cells destruction. *Life Sci* 46:49–54.
- Loverberg W, Weisbach H, Udenfried S. 1962. Aromatic L-amino acid decarboxylase. *J Biol Chem* 237:89–93.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265–275.
- Manjarrez GG, Chagoya GG, Hernández RJ. 1994. Early nutritional changes modify the kinetics and phosphorylation capacity of tryptophan-5-hydroxylase. *Int J Dev Neurosci* 12:695–702.
- Manjarrez GG, Herrera MJR, Molina HA, Bueno SS, González RM, Hernández RJ. 1999. Alteraciones de la neurotransmisión serotoninérgica cerebral inducida por diabetes mellitus tipo 1. *Rev Invest Clin* 51:293–302.
- Manjarrez GG, Herrera MJR, Bueno SS, González RM, Hernández RJ. 2000. Cambios en la biosíntesis de serotonina cerebral en ratas con diabetes mellitus inducida por estreptozotocina: Efecto del tratamiento con insulina. *Rev Invest Clin* 52:509–516.
- Martínez A, Knappskog PM, Haavik J. 2001. A structural approach into human tryptophan hydroxylase and its implications for the regulation of serotonin biosynthesis. *Curr Med Chem* 8:1077–1091.
- Molina HA. 1996. Efecto de la diabetes tipo 1 sobre el metabolismo de la serotonina en ratas. Tesis de Licenciatura

- en Nutrición y Ciencia en los Alimentos. México, D.F. Univ Ibero Am :29-31.
- Neckers LM, Biggio G, Moja E, Meek J. 1977. Modulation of brain tryptophan hydroxylase activity by brain tryptophan content. *J Pharmacol Exp Ther* 201:110-116.
- Trulson ME, Mackenzie RG. 1980. Increased tryptophan hydroxylase activity may compensate for decreased brain tryptophan levels in streptozotocin-diabetic rats. *J Pharmacol Exp Ther* 212:269-273.
- Trulson ME, Jacoby JH, Mackenzie RG. 1986. Streptozotocin-induced diabetes reduces brain serotonin synthesis in rats. *J Neurochem* 46:1068-1072.
- Vulliet PR, Langan TA, Weiner N. 1980. Tyrosine hydroxylase: a substrate of cyclic AMP-dependent protein kinase. *Proc Natl Acad Sci USA* 77:92-96.
- Yang YF, Lin MT. 1995. Brain serotonin depletion attenuates diabetogenic effects of streptozotocin. *Am J Physiol* 268:E839-E844.