

Expresión de la triptófano hidroxilasa en tallo cerebral de ratas con restricción alimenticia.

Lucia Santibáñez M.,^{1,2} Rafael Ortiz, A.,^{1,3} Omar Guzmán Q.,¹ Madeline Hernández Rebollar,² Héctor Urquiza M.,² Francisco Bolaños J.,³ y Rosalio Mercado, C.*¹

¹ Facultad de Químico Farmacobiología, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo

² Instituto de Investigaciones Químico Biológicas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo

³ UMR Physiologie des Adaptations Nutritionnelles CHU-Hôtel Dieu. HNBI. Nantes, Francia.

*ros421@hotmail.com

RESUMEN

Existen evidencias experimentales de la alteración de un sistema neuronal específico en el cerebro de ratas desnutridas durante el desarrollo prenatal y postnatal, este sistema es el serotoninérgico que sintetiza al neurotransmisor serotonina (5-HT). En ratas con desnutrición temprana, se ha reportado un incremento de la fracción de L-Triptófano plasmático libre por disminución de la concentración de albúmina en sangre así como también un aumento en la actividad de la triptófano-5-hidroxilasa (TPH), enzima limitante en la síntesis de 5-HT y un aumento en la concentración de serotonina cerebral. El mecanismo mediante el cual se activa la vía biosintética de la 5-HT no se conoce ya que en ratas con recuperación nutricional, los niveles de L-Trp plasmático libre disminuyen y la actividad de la TPH permanece elevada. En el presente estudio se exploró la posibilidad de que el aumento en la síntesis de 5-HT estuviera relacionado con un aumento en la síntesis del ARNm de la TPH, para lo cual en dos modelos de restricción alimenticia uno proteínico-calórico en la etapa perinatal y otro de restricción proteica en la etapa de lactación se determinó la expresión del gen que codifica para la TPH mediante la técnica de RT-PCR en tiempo real. Los resultados indican que existe un aumento en el ARNm en los dos esquemas de desnutrición utilizados aunque no fue estadísticamente significativo con respecto al control. Esto sugiere que en el aumento de la síntesis de 5-HT en los animales con restricción alimenticia intervienen otros factores quizás de tipo transduccional, lo cual debe ser explorado en estudios posteriores.

Palabras Clave: Serotonina, Desnutrición, triptófano hidroxilasa.

ABSTRAC

In previous works has been shown that undernutrition produces alterations in some pattern of neurotransmitters development, one of them is the serotoninergic system in which the serotonin (5-HT) synthesis was increased by activation of the key enzyme in the biosynthesis of brain 5-HT, the tryptophan-5-hydroxylase (TPH), possible by an increase of de RNAm of this enzyme. In the present work we measured in male rats the expression of RNAm for TPH by real quantitative RT-PCR in two model of undernutrition, one by restriction of 50% of food and other by restriction in the protein content, giving only 8% of protein of the normal diet. Results showed that in both experimental groups, there was an increase of the RNAm, although not statistically significant as compared with the control group. It is necessary to conduct other assays in order to know the molecular mechanism involved in the activation of TPH by early malnutrition.

Key Words: Serotonin, undernutrition, tryptophan-5-hydroxylase.

INTRODUCCIÓN

La desnutrición afecta a grandes poblaciones a nivel mundial, los últimos datos de la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación muestran que a nivel mundial hay 842 millones de seres humanos desnutridos, la República del Congo (75% de la población desnutrida) seguida de Somalia (71%), Burundi (70%) y Afganistán (70%) son los que tienen mayor población de desnutridos y las perspectivas de reducir de manera relevante esta cifra en el futuro continúan siendo sombrías (Miller and Korenman 1994). En la República Mexicana, los estados en donde se presenta con mayor frecuencia son: Chiapas, Oaxaca, Yucatán, Veracruz y el Estado de México (SGNU 1999).

La Organización Mundial de la Salud, ha definido a la desnutrición como un desbalance celular entre la administración de nutrientes y energía y la demanda del cuerpo para su seguro crecimiento y mantenimiento de funciones específicas. Esta condición puede resultar del consumo de una dieta inadecuada o mal balanceada, por trastornos digestivos, problemas de absorción u otras condiciones médicas (SGNU 1999). Dependiendo del tipo de nutriente faltante la desnutrición puede ser calórica, proteica o mixta (McClave *et al*, 1992).

Sistema serotoninérgico

El sistema serotoninérgico cerebral se localiza en la parte media del tallo cerebral, agrupándose en nueve núcleos que han sido clasificados de acuerdo a su origen embrionario, conocidos como complejo nuclear del Rafé Dahlstrom and Fuxe 1964). El neurotransmisor de este sistema es la serotonina (5-HT, 5-OH-Triptamina) y el triptófano (L-Trp) es el aminoácido esencial precursor de la síntesis de 5-HT. El L-Trp una vez que entra en las terminales serotoninérgicas es hidroxilado por la triptófano 5-hidroxilasa (TPH, EC.1.14.16.4) la cual es la enzima limitante de la síntesis de 5-HT (de Boer *et al*, 2003). La TPH pertenece a la superfamilia de hidroxilasas de aminoácidos aromáticos, Walther *et al*, (2003) determinaron la existencia de un segundo gen TPH en el genoma de humanos,

ratones y ratas, al cual denominaron TPH2. Este gen está predominantemente expresado en el tronco cerebral mientras que el gen TPH clásico, ahora llamado TPH1, se expresa en intestino, glándula pineal y el timo.

Existen estudios en los que se atribuye al sistema serotoninérgico cerebral una participación en la regulación de diversas funciones orgánicas como la timia (Van Praag 1981, Van Praag *et al*, 1986), los ciclos de sueño y vigilia (Van Praag *et al*, 1986, haro and Drucker-Colin 2004) como un factor trófico (Siegelbaum *et al*, 1982, Mercado *et al*, 1998, Manjarrez *et al*, 1988), en la regulación de la conducta sexual Tejero *et al*, 1985), en la regulación termoneuroceptiva (Jahn *et al*, 1999) y en la conducta alimentaría en la cual la 5-HT es el principal mediador inhibitor del núcleo hipotalámico ventromedial que regula la ingesta y saciedad, la hiperserotoninergia produce anorexia (Blundell 1984) y la hiposerotoninergia produce ganancia de peso (Kaye 1997), lo cual puede ser causa de la anorexia en la depresión (Boullosa and López-Mato 1991, Moreno *et al*, 2002, Narita *et al*, 2003).

Sistema serotoninérgico y desnutrición

Cuando la desnutrición se origina por la deficiencia de un solo nutriente, tal como un aminoácido esencial, que debe ser obtenido a través de la dieta, se induce un daño serio en el sistema nervioso central porque algunos de los aminoácidos son precursores de neurotransmisores, y sus niveles dependen directamente de su disponibilidad. Uno de los sistemas mayormente afectados por esta deficiencia de aminoácido es el sistema serotoninérgico, ya que la síntesis de la 5-HT está directamente relacionada a la ingesta de L-triptófano (de Boer *et al*, 2003), al administrar el L-trp se produce un aumento en los niveles de triptófano libre en el cerebro, en la actividad de la TPH y en la síntesis de 5-HT (Kaye 1997, Ahmed *et al*, 1987). Existen reportes de que la dieta restringida en triptófano (González-Burgos *et al*, 1996, 1998, del Angel-Meza *et al*, 1996), así como también la alimentación a base de maíz (del Angel *et al*, 1990) inducen disminución en la síntesis de 5-HT ce-

rebral, además, se modifica la ramificación dendrítica de las neuronas de la corteza cerebral, del hipocampo y se han reportado alteraciones en la organización psiconeural del aprendizaje espacial y la memoria (Díaz *et al*, 1993).

El mecanismo mediante el cual se incrementa la síntesis de 5-HT en animales desnutridos tanto en forma protéico-calórico como por desnutrición intrauterina (Ahmed *et al*, 1987), no se conoce, por lo cual en el presente trabajo exploramos la posibilidad de que el aumento en la síntesis de 5-HT sea a través de un incremento del ARNm de la TPH2 en animales con restricción alimenticia.

MATERIALES Y METODOS

Se utilizaron ratas macho adultas de la cepa Wistar, de 200 g de peso; las cuales se mantuvieron en condiciones ambientales controladas de ciclos de luz-oscuridad de 12h, temperatura ambiental de 20-24°C, y humedad relativa del 80%.

Desnutrición proteico-calórica perinatal y desnutrición proteica:

Se formaron dos grupos de 6 ratas hembra cada uno, un grupo control con alimentación *ad libitum* y otro experimental al cual se les restringió el consumo de alimento al 50% del consumo de alimento de las ratas del grupo control. Las camadas de las ratas desnutridas continuaron su desnutrición hasta el término de la lactación, posteriormente se colocaron en jaulas individuales y recibieron alimentación “*ad libitum*” hasta los 60 días de edad postnatal en la cual fueron sacrificadas.

A otro grupo de 6 ratas se les sometió a desnutrición proteica, proporcionándoles únicamente el 8% de proteína en su dieta (el alimento para roedores contiene 20% de proteína) durante el periodo de lactación, una vez terminado el periodo de lactación las ratas se alimentaron “*ad libitum*” con dieta normal. A los 60 días postnatales fueron sacrificadas.

Obtención de tejidos:

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

Extracción del ARN:

La extracción de ARN del tallo cerebral del cerebro de rata se realizó utilizando reactivo Trizol (Acido Guanidínico Tiocianato-fenol-cloroformo de Gibco-BRL) de INVITROGEN siguiendo el método de Chomczynski and Sacchi (1987). La concentración de ARN se determinó espectrofotométricamente a 260 nm.

Experimentos de RT-PCR:

Se utilizó el kit de PROMEGA para obtener el ADNc, su concentración se determinó espectrofotométricamente a 260 nm y 280 nm.

Se utilizaron los primers para rata (*Rattus norvegicus*) de la triptófano hidroxilasa [TPH2](#) ([AY098915](#)):

sentido, 5'-TGAGAACCCCAA-ATCCTGCA-3';

antisentido, 5'-CCCAGCCAACAGACCTA-ACTGA-3';

Gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenada [GAPDH](#) ([NM_017008](#))

sentido 5'-TGCCCCCATGTTTGTGATG-3'

antisentido 5'-TGGTGGTGCAGGATGCATT-3'

Para verificar la especificidad del oligonucleótido para el gen de la TPH2 se realizó una amplificación por PCR en tiempo real para demostrar que obtenemos un solo producto de TPH2. Para esto se realizó electroforesis en gel de agarosa al 1%.

Validación de los controles endógenos:

Utilizamos el gen de la β -actina y el de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) para determinar cual sería el control endógeno.

RT-PCR cuantitativo en tiempo real:

La reacción de la RT-PCR cuantitativa en tiempo real se llevó a cabo con el sistema de detección para PCR en tiempo real de BIO-RAD iQ5. Todos los ensayos de RT-PCR en tiempo real se realizaron, a 95 °C para activar a la *Taq polimerasa*, seguido por 45 ciclos para la desnaturalización a 95 °C, 30 min; continuando con 45 ciclos para la alineación, 57 °C, 30 min; y 80 ciclos para la extensión, a 95 °C durante 10 min. Finalizados los ciclos, las muestras permanecieron a 15°C.

Para cuantificar los cambios relativos en la expresión genética de la TPH, empleamos el método 2- Δ Ct; para el cual determinamos el ciclo umbral (Ct): Δ Ct = (Ct tejido problema – Ct control interno)

Los datos fueron analizados usando la ecuación para Δ Ct:

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

Análisis estadístico:

Los datos se graficaron utilizando el programa GraphPad Prism 4.0 y se calculó la media y la desviación estándar. Se compararon las diferencias entre los dos tratamientos mediante la prueba de “t” de Student.

RESULTADOS

Respecto a la evolución del peso de las ratas, el grupo control presentó un incremento del 10% del peso corporal mientras que el grupo con restricción del 50% de alimento presentó disminución del 6% de su peso (FIGURA 1A), con respecto al grupo con restricción de proteína durante la etapa de lactación, se observó que el peso de las crías fue estadísticamente menor comparadas con las crías del grupo control hasta los 60 días postnatales en que fueron sacrificadas para su análisis (FIGURA 1B).

Con respecto a la elección y validación de un gen de control interno, la expresión de -actina (FIGURA 2A) y de GAPDH (FIGURA 2B), mostró diferencias en la expresión del gen para GAPDH con respecto al grupo desnutrido, en tanto que el gen de -actina no varió en su expresión en ambos grupos. Al variar la concentración de ADNc, la expresión del gen GAPDH marcó una pendiente mayor de 0.1 en tanto el gen -actina marcó una pendiente menor de 0.1 (FIGURA 3) por lo cual, utilizamos el gen de la -actina como control interno.

La FIGURA 4 muestra los resultados de la validación de los oligonucleótidos de la TPH2, se observa una banda de 132 pb, que indica la amplificación de un solo producto correspondiente al gen de la TPH2.

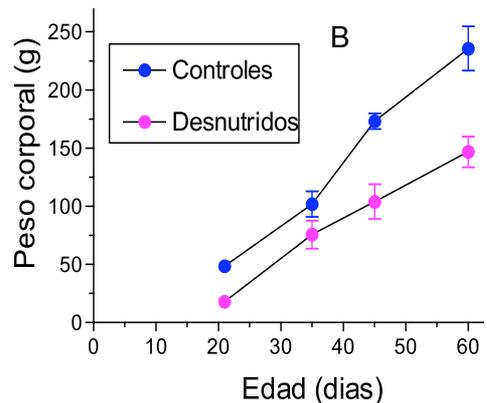
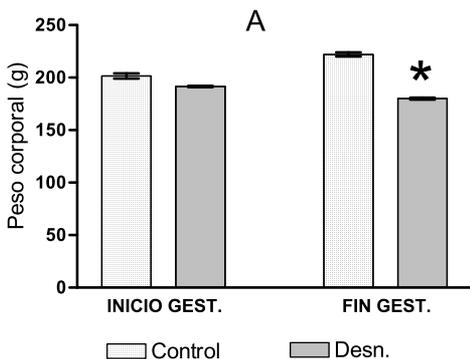


FIGURA 1. Peso corporal de las ratas durante la gestación (1A) y a partir del destete a los 21 días postnatales (1B). X ± D.E. de 6 ratas en cada grupo experimental. P <0.05

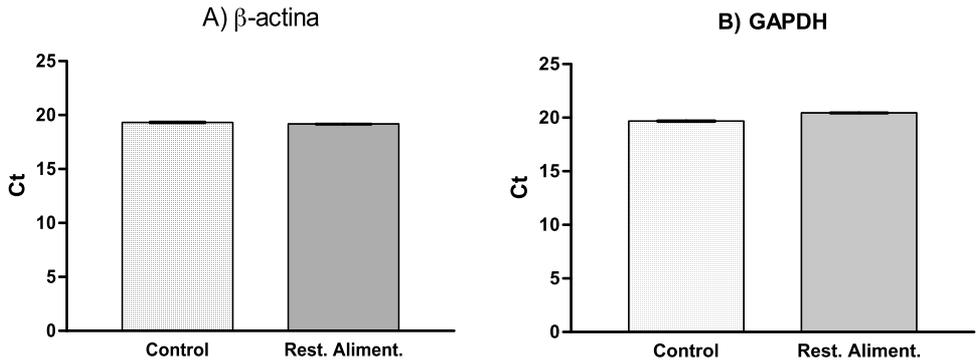


FIGURA 2. Expresión del gen de la β -actina y de la GAPDH en el grupo control y en el grupo con restricción alimenticia. $X \pm D.E$ de tres experimentos realizados por triplicado.

La FIGURA 5 muestra la expresión del gen de la TPH2 en animales controles y en animales sometidos a desnutrición proteico calórica y a desnutrición proteica en animales destetados. Se observa que existe un incremento en la expresión del gen de la TPH2 en ambos grupos con restricción alimenticia comparados con sus respectivos controles, pero esta diferencia no fue estadísticamente significativa ($p > 0.05$).

DISCUSIÓN

Hernández *et al.*, (1976) obtuvieron evidencias experimentales de la alteración del sistema serotoninérgico en el cerebro de ratas desnutri-

das durante etapas tempranas del desarrollo neuronal de las ratas desnutridas, observándose un incremento en la síntesis de 5-HT en las ratas desnutridas, por otro lado, Miller *et al.*, (1977) reportaron también que la concentración de 5-HT en ratas con desnutrición temprana, se encuentra aumentada a nivel cerebral durante el desarrollo postnatal y continúa en la edad adulta. Tagliamonte *et al.*, (1973) y Gessa *et al.*, (1974) reportaron que el aumento en la síntesis de 5-HT está probablemente ocasionado por una elevación en la fracción del L-triptófano plasmático

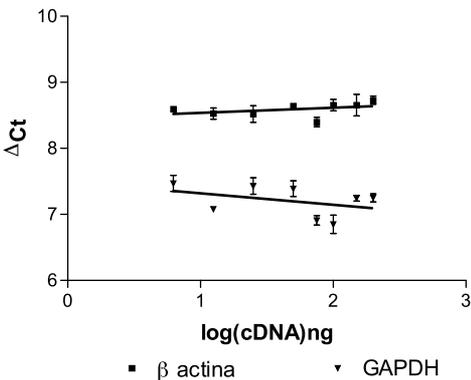


FIGURA 3. Curva de variación del ΔCt vs la concentración de ADNc de la β -actina y de la GAPDH. $X \pm D.E$ de tres experimentos realizados por triplicado.

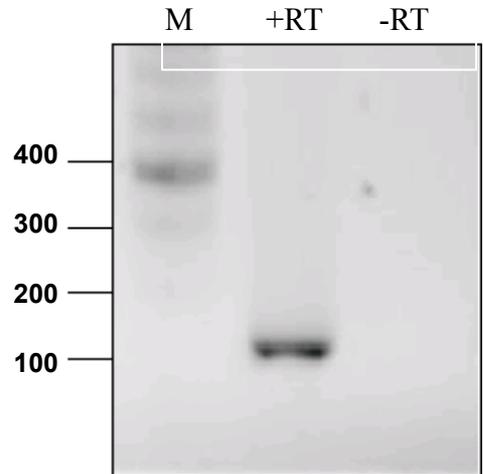


FIGURA 4. Gel de agarosa que muestra el producto de la amplificación del ADNc del gen de la TPH2.

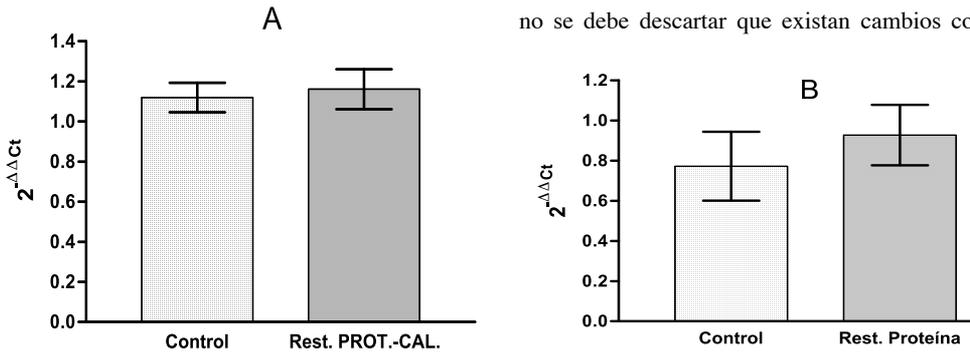


FIGURA 5. Expresión del gen de la TPH2 en animales con restricción proteico calórica (5A) y con restricción de proteína (5B). $X \pm$ D.E de tres experimentos realizados por triplicado.

libre; Manjarréz *et al.*, (1988) demostraron que este aumento se debe a una mayor actividad de la enzima limitante en la síntesis de serotonina: la triptófano-5-hidroxilasa (TPH) en el cerebro de ratas desnutridas en etapas tempranas y probablemente la isoforma TPH2 que es la responsable de la síntesis de 5-HT cerebral, en tanto que la otra isoforma, TPH1 se encuentra distribuida a nivel periférico (Sugden, 2003). Con estas evidencias por lo tanto no fue necesario medir la concentración de 5-HT ni la actividad de la TPH en nuestro estudio. Por otro lado los resultados con respecto a la talla y al peso de las ratas sometidas a los dos esquemas de desnutrición correspondieron a los observados por Manjarréz *et al.*, (1988) y por Del Angel *et al.*, (1990) indicando con esto que el modelo de desnutrición fue implementado adecuadamente.

En cuanto a la técnica de PCR en tiempo real para determinar la expresión de la TPH2, Zill *et al.*, (2003) utilizó esta técnica en tejido cerebral de humanos, observando la presencia de la TPH2 con una talla de 133 pb, correspondiendo a la observada en nuestros resultados.

La expresión de la TPH2 tanto en animales control como en los dos grupos experimentales fue muy similar lo que sugiere que el aumento en la actividad de la TPH observado en ratas desnutridas no se debe a un aumento en la expresión de la misma por un lado y por otro lado sugiere también que el tipo de desnutrición no produce cambios en la expresión de la enzima,

no se debe descartar que existan cambios con-

formacionales de la TPH2 o cambios en la fosforilación de la enzima que originen el incremento en la síntesis de 5-HT en los animales desnutridos. El conocimiento de los mecanismos moleculares que participan en la activación de la vía serotoninérgica en condiciones de desnutrición ampliará las perspectivas de tratamientos en individuos con alteraciones como ciclos de sueño y memoria, depresión, hipertensión, etc, en los cuáles participa la serotonina.

Agradecimientos: Programa ECOS Nord-Cocacyt-ANUIES-MO2-A03B. COECyT-2008, CIC-U.M.N.S.H. 26.2

REFERENCIAS

- Ahmed, M.G., Bedi, K.S, Warren, M.A. et al. 1987. Effects of the lengthy period of undernutrition from birth and subsequent nutritional rehabilitation on the synapse:granule cell neuron ratio in the rat dentate gyrus. *J. Comp. Neurol.* 263:146-158.
- Blundell, J.E. 1984. Serotonin and appetite. *Neuropharmacology* 23: 1537-1551.
- Boullousa, O., and López – Mato, A. 1991. Anorexia nerviosa. Differential Diagnosis with other psychiatric. *Biol. Pysch.* 29: 115- 490.
- Chomczynski, P., and Sacchi, N. 1987. Single-Step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Biochemistry* 162:156-159.

- Dahlstroem, A., and Fuxe, K. 1964. An evidence for the existence of monoamine-containing neurons in the central nervous system. *Acta Physiol. Scand.* 62: 232-255.
- De Boer, A.G., van der Sandt, I.C, and Gaillard, P.J. 2003. The role of drug transporters at the blood-brain barrier. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 43:629-56.
- Del Angel, A.R., Quirarte, G., and Feria-Velasco, A.. 1990. Effects of protein restriction using diets based on corn or corn and beans on body and head growth in rats. *Arch. Invest. Med.* 21:325-330.
- Del Angel, A.R., Quirarte, G., and Feria-Velasco, A. 1990. Effects of protein restriction using diets based on corn or corn and beans on body and head growth in rats. *Arch. Invest. Med.* 21:325-330.
- Del Angel-Meza, A.R., Gonzalez-Burgos, I., Olvera-Cortes, E., and Feria-Velasco, A. 1996. Chronic tryptophan restriction disrupts grooming chain completion in the rat. *Physiol. Behav.* 59:1099-1102.
- Díaz M., Chagoya G., and Hernández R.J. 1993. Modificación por desnutrición ontogénica de la neurotransmisión serotoninérgica cerebral y de una conducta relacionada. *Bol. Med. Hosp. Infant. Mex.* 50:17-26.
- Gessa, G. L., Biggio, G., Fadda, F., Corsini, G. U., and Tagliamonte, A. 1974. Effect of the oral administration of tryptophan-free amino acid mixtures on serum tryptophan, brain tryptophan and serotonin metabolism. *J. Neurochem.* 22: 869-870.
- Gonzalez-Burgos, I., del Angel-Meza, A.R., Barajas-Lopez, G., and Feria-Velasco, A. 1996. Tryptophan restriction causes long-term plastic changes in corticofrontal pyramidal neurons. *Int. J. Dev. Neurosci.* 14:673-679.
- Gonzalez-Burgos, I., Perez-Vega, M.I., Del Angel-Meza, A.R., and Feria-Velasco, A. 1998. Effect of tryptophan restriction on short-term memory. *Physiol. Behav.* 63:165-169.
- Haro, R., and Drucker-Colin, R. 2004. Effects of long-term administration of nicotine and fluoxetine on sleep in depressed patients. *Arch. Med. Res.* 6:499-506.
- Hernández, R.J. 1976. Effects of malnutrition and 6-hidroxydopamine on the early postnatal development of noradrenaline and serotonin content in the rat brain. *Biol. Neonate*, 30:181-186.
- Jahn, G.A., Kalia, V., Hole, D., Wilson, C.A., and Deis, R.P. 1999. Receptors and neurotransmitters involved in the dual modulation of prolactin release by the serotonergic system in pregnant and lactating rats. *J. Reprod. Fertil.* 2:261-8.
- Kaye, H.W. 1997. Anorexia nervosa obsessive behavior and serotonin. *Psychopharmacol. Bull.* 33: 345-344.
- Manjarréz, G., Chagoya, G., and Hernández, R.J. 1988. Perinatal brain serotonin metabolism in rats malnourished in utero. *Biol. Neonate.* 54: 232-240.
- McClave, S.A., Mituraj, T.E., Thielmeier, K.A., Greenburg, R.A. 1992. Differentiating subtypes (hypoalbuminemic vs marasmic) of protein-caloric malnutrition, incidence and clinical significance in a university hospital setting. *J.P.E.N.* 16: 337-342.
- Mercado, C.R., Floran, B., and Hernández, R.J. 1998. Regulated release of serotonin from axonal growth cones isolated from fetal rat brain. *Neurochem. Int.* 103-106.
- Miller, J.E., and Korenman, S. 1994. Poverty and children's nutrition status in the United States. *Am. J. Epidemiol.* 140:233-243.
- Miller, M., Leathy, I.P., McConville, F., Morgane, O.J., and Resnick, O. 1977. Effects of developmental protein malnutrition on tryptophan utilization in brain and peripheral tissues. *Brain Res.* 2:347-349.
- Moreno, F.A., Rowe, D.C., Kaiser, B., Chase, D., Michaelis, T., Gelenter, J., Delgado, P.L. 2002. Association between a serotonin transporter promoter region polymorphism and mood response during tryptophan depletion. *Mol. Psychiatry*, 7:213-216.
- Narita, M., Nishigami, N., Narita, M., Yamaguti, K., Okado, N., Watanabe, Y., Kuratsune, H. 2003. Association between serotonin transporter gene polymorphism and chronic fa-

- tigue syndrome. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 311: 264-266.
- Secretario General de las Naciones Unidas. 1999. *Actividades Operacionales de las Naciones Unidas para la cooperación internacional para el desarrollo. Período de sesiones sustantivo de 1999. Ginebra, 5 a 30 de julio de 1999.*
- Siegelbaum, S.A., Camardo, J.S., and Kandel, E.R. 1982. Serotonin and cyclic AMP close K^+ channels in *Aplysia* sensory neurons. *Nature*, 299: 413-417.
- Sugden, D. 2003. Comparison of circadian expression of tryptophan hydroxylase isoform mRNAs in the rat pineal gland using real-time PCR. *J. Neurochem.* 86: 1308-1311.
- Tagliamonte, A., Biggio, G., Vargin, L. and Gessa, G.L. 1973. Free Tryptophan in serum controls, brain tryptophan level and serotonin synthesis. *Life Sci.* 12:227-287.
- Tejero, A., Aguilar, E., and Schiafini, O. 1985. *Procesos de maduración sexual en Neuroendocrinología. Aspectos básicos y clínicos.* Ed. O. Schiafini. Salvat. 279-295.
- Van Praag, H.M. 1981. Central monoamines and the pathogenesis of depression. *Handbook of biological psychiatry. Affect. Disord.* 4: 275-290.
- Van Praag, H.M., Khan, R.S., Asnis, G.M., et al. 1987. Denosologization of biological psychiatry or the specificity of 5-HT disturbances in psychiatric disorders. *J. Affect. Disord.* 13: 1-8.
- Van Praag, H.M., Plutchic, R., and Conte, H. 1986. The serotonin hypothesis of (Auto) Aggression critical appraisal of the evidence. *Psychobiology of suicidal Behavior.* 487:150-167.
- Walther, D. J., Peter J.-U., Bashammakh, S., Hortnagl, H., Volts, M., Fink, H. and Bader, M. 2003. Synthesis of serotonin by a second tryptophan hydroxylase isoform. *Science*, 299:76-77.
- Zill, P., Buttner, A., Eisenmenger, W., Bondy, B., and Ackenheil, M. 2003. Regional mRNA expression of a second tryptophan hydroxylase isoform in postmortem tissue samples of two human brains. *Science*, 14:282-284.