



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLAS DE HIDALGO
FACULTAD DE QUIMICO FARMACOBIOLOGIA

LABORATORIO DE NEUROBIOLOGIA

**“EFECTO DE LA SEROTONINA SOBRE LA ACTIVIDAD DE
LA BOMBA DE SODIO Y POTASIO EN CORTEZA
CEREBRAL DE RATAS CON DM1”**

TESIS

**Para obtener el título profesional de:
Licenciado de Químico Farmacobiología**

Presenta:

Claudia Susana Bautista García

Asesor:

D.C. Rosalio Mercado Camargo

Tesis parcialmente apoyada por CIC 26.2 COECYT-CB07021309

Morelia, Michoacán

Noviembre 2008



INDICE

CONTENIDO.....1
INDICE DE FIGURAS Y TABLAS.....2
LISTA DE ABREVIATURAS.....6

CAPITULO

1.-RESUMEN.....8
2.-ABSTRACT.....9
3.-INTRODUCCION.....10
3.1.-Generalidades del sistema nervioso.....10
3.2.-Corteza cerebral.....13
3.3.-Neurotransmisores.....17
3.4.-Sistema serotoninérgico cerebral.....18
3.5.-Receptores serotoninérgicos cerebrales.....24
3.6.-Los receptores 5-HT₂.....28
3.7.-Agonismo inverso.....29
3.8.-Antagonistas serotoninérgicos.....31
3.9.-Bomba de sodio y potasio.....31
3.10.- Na⁺/K⁺ ATPasa y Sistema Serotoninérgico.....35
3.11.-Alteración en la Na⁺,K⁺ ATPasa en Diabetes Mellitus.....36
4.-HIPOTESIS.....38
5.-OBJETIVOS.....38
5.1.-Objetivo general.....38
5.2.-Objetivos específicos.....38
6.-MATERIAL Y METODOS.....39
6.1.- Animales.....39
6.2.-Inducción de la Diabetes.....39
6.3.-Preparación de homogeneizado de corteza cerebral.....40
6.4.-Obtención de las membranas enriquecidas gliales y neuronales.....40
6.5.-Determinación de la actividad de la Na⁺,K⁺ ATPasa.....41
7.-ANALISIS ESTADISTICO.....43
8.-RESULTADOS.....44
9.-DISCUSION.....56
10.-CONCLUSION.....57
11.-BIBLIOGRAFIA.....58

INDICE DE FIGURAS Y TABLAS.

Figura 1: Representación esquemática de una neurona.....	10
Figura 2: Representación esquemática de una neurona y las estructuras que la conforman.....	11
Figura 3: Mecanismo de liberación de un neurotransmisor.....	13
Figura 4: Corteza cerebral humana.....	14
Figura 5: Lóbulos de corteza cerebral.....	15
Figura 6: Areas sensitivas de la corteza cerebral.....	17
Figura 7: Representación esquemática de neurotransmisores.....	18
Figura 8: Esquema de un corte sagital del cerebro de rata que muestra la distribución del sistema serotoninérgico y su inervación	19
Figura 9: Transporte de L-Trp a través de la barrera hematoencefálica.....	20
Figura 10: Mecanismos catalíticos en la síntesis de catabolismo de la 5-HT.....	21
Figura 11: Neurotransmisión serotoninérgica.....	28
Figura 12: Representación esquemática de la Bomba de sodio y potasio ATPasa.....	32
Figura 13: Modelo esquemático del mecanismo de acción de la Bomba de sodio y potasio ATPasa.....	34
Figura 14: Anaqueles del bioterio de la Facultad de Químico Farmacobiología.....	39
Figura 15: Inducción de la DM en ratas macho adulta.....	39
Figura 16: Perfusión del cerebro de rata con solución isotónica.....	40

Figura 17: Corteza cerebral disecada de rata	40
Figura 18: Corteza de rata en Ficoll y solución amortiguadora	41
Figura 19: Corteza de rata en Ficoll y Sacarosa.....	41
Figura 20: Ultracentrífuga.....	41
Figura 21: Bandas de fracciones membranales gliales y neuronales	41
Figura 22: Fracciones membranales gliales y neuronales aisladas.....	41
Figura 23: Baño metabólico Dubnoff.....	42
Figura 24: Placa de hielo.....	42
Figura 25: Centrífuga.....	43
Figura 26: Tubos al final de la reacción	43
Figura 27: Espectrofotómetro.....	43
Figura 28: Actividad Específica de la bomba de Na ⁺ y K ⁺ en homogeneizado de corteza cerebral de ratas macho adultas grupo control y diabético.....	44
Figura 29: Actividad Específica de la bomba de Na ⁺ y K ⁺ en membranas gliales de corteza cerebral de ratas macho adultas grupo control y diabético.....	45
Figura 30: Actividad Especifica de la bomba de Na ⁺ y K ⁺ en membranas neuronales de corteza cerebral de ratas macho adultas grupo control y diabético.....	45
Figura 31: Efecto de la Serotonina sobre la actividad de la bomba de sodio y potasio en homogeneizado de corteza cerebral de ratas grupo control y diabético.....	46
Figura 32: Estimulación de la actividad de la Na ⁺ /K ⁺ ATPasa en homogeneizado de corteza cerebral de ratas macho adultas.....	46

Figura 33: Efecto de la Serotonina sobre la actividad de la bomba de Na^+ y K^+ -ATPasa en membranas gliales de corteza cerebral de ratas grupo control y diabético.....47

Figura 34: Estimulación de la actividad de la Na^+/K^+ -ATPasa en fracciones membranales gliales de corteza cerebral de ratas macho adultas.....47

Figura 35: Efecto de la Serotonina sobre la actividad de la Na^+/K^+ ATPasa en membranas neuronales de corteza cerebral de ratas grupo control y diabético.....48

Figura 36: Porcentaje de inhibición de la Serotonina en la actividad de la Na^+/K^+ ATPasa en membranas neuronales de corteza cerebral de ratas macho adultas.....48

Figura 37: Efecto de la Ciproheptadina sobre la actividad de la bomba de Na^+ y K^+ en homogenizado de corteza cerebral de ratas grupo control y diabético.....49

Figura 38: Porcentaje de Inhibición de la Bomba de Na^+ y K^+ en homogeneizado de corteza cerebral con Ciproheptadina de ratas grupo control y diabético.....49

Figura 39: Efecto de la Ciproheptadina sobre la actividad de la Na^+/K^+ ATPasa en membranas gliales de corteza cerebral de ratas grupo control y diabético.....50

Figura 40: Porcentaje de inhibición de la actividad de la Na^+/K^+ ATPasa con Ciproheptadina en membranas gliales de corteza cerebral de ratas macho adultas.....50

Figura 41: Efecto de la Ciproheptadina sobre la actividad de la Na^+/K^+ ATPasa en membranas neuronales de corteza cerebral ratas grupo control y diabético.....51

Figura 42: Porcentaje de inhibición de la actividad de la Na^+/K^+ ATPasa con Ciproheptadina en membranas neuronales de corteza cerebral.....51

Figura 43: Efecto de la Ritanserina sobre la actividad de la bomba de Na^+ y K^+ en homogenizado de corteza cerebral de ratas grupo control y diabético.....52

Figura 44: Porcentaje de Inhibición de la Bomba de Na^+ y K^+ en homogeneizado de corteza cerebral con Ritanserina de ratas grupo control y diabético.....52

“Efecto de la serotonina sobre la actividad de la bomba de sodio y potasio en corteza cerebral de ratas con DM1”

Figura 45: Efecto de la Ritanserina sobre la actividad de la Na^+/K^+ ATPasa en membranas gliales de corteza cerebral de ratas grupo control y diabético.....53

Figura 46: Porcentaje de inhibición de la actividad de la Na^+/K^+ ATPasa con Ritanserina en membranas gliales de corteza cerebral de ratas grupo control y diabético.....53

Figura 47: Efecto de la Ritanserina sobre la actividad de la Na^+/K^+ ATPasa en membranas neuronales de corteza cerebral de ratas grupo control y diabética.....54

Figura 48: Porcentaje de inhibición de la actividad de la Na^+/K^+ ATPasa con Ritanserina en membranas neuronales de corteza cerebral de ratas grupo control y diabético.....54

Tabla 1: Receptores serotoninérgicos.....26

Tabla 2. DE_{50} de agonista y antagonistas 5-HT_2 sobre la actividad de la Bomba de sodio y potasio ATPasa.....55

LISTA DE ABREVIATURAS

• 5-HIAA	Acido 5-Hidroxi-indolacético
• 5-HT	5-hidroxi-triptamina
• 5-HTTP	5-hidroxi-triptófano
• 5-HTT	Transportador de serotonina.
• AADC	Descarboxilasa de los aminoácidos aromáticos
• a.a.	Aminoácidos
• aan	Aminoácidos neutros
• ADA	American Diabetes Association
• AMP	Adenosin monofosfato
• ATP	Adenosin trifosfato
• BHE	Barrera hematoencefálica
• DAG	Diacilglicerol
• dl	Decilitro.
• D.E.	Desviación Estandar
• DM	Diabetes mellitus
• DM1	Diabetes mellitus 1
• DM2	Diabetes mellitus 2
• E ₁	Enzima 1
• E ₂	Enzima 2
• FL Trp	Fracción libre del L-Trp
• g	Gramos
• hr	Hora
• IIDM	Diabetes mellitus insulino-dependiente
• INIDDM	Diabetes mellitus no insulino-dependiente
• IP ₃	Inositol 1,4,5 trifosfato
• K ⁺	Potasio
• KCl	Cloruro de potasio
• KDa	Kilodaltones
• K _m	Constante de Michaelis
• L-Trp	L-Triptófano
• M	Molar
• MAO	Monoaminoxidasa
• mg	Miligramos

- Mg^{++} Magnesio
- $MgCl_2$ Cloruro de magnesio
- ml Mililitros
- mm Milímetros
- mM Milimolar
- Na^+ Sodio
- NaCl Cloruro de sodio
- NE Norepinefrina.
- °C Grados centígrados
- OMS Organización Mundial de la Salud
- pH Potencial hidrógeno
- Pi Fosfato inorgánico
- PIP_2 Fosfatidil inositol-4,5-difosfato
- rpm Revoluciones por minuto
- SERT Transportadores de serotonina.
- SNC Sistema Nervioso Central
- SNP Sistema Nervioso Periférico
- STZ Estreptozotocina

RESUMEN

La ATPasa es un enzima que se encuentra involucrada en el transporte activo de iones y solutos a través de las membranas y epitelios; juega por tanto un papel fisiológico importante en la osmorregulación, regulación del volumen celular, excreción de iones tóxicos, excitabilidad celular, etc. Esta enzima responde a un claro ejemplo de transporte activo del tipo cotransporte antiporte, en el cual por cada ATP hidrolizado transporta 3 iones Na^+ hacia el medio extracelular y 2 iones K^+ al medio intracelular.

La diabetes mellitus (DM), es un enfermedad crónico-degenerativa que se caracteriza por un aumento en las concentraciones de glucosa en sangre, por un déficit absoluto o relativo de insulina, y por alteraciones en los metabolismos de los carbohidratos, proteínas y lípidos. Las altas concentraciones de glucosa en la sangre en forma crónica pueden dañar los vasos sanguíneos que llevan oxígeno a algunos nervios. La neuropatía diabética es el término médico para referirse a los daños en el sistema nervioso causados por la diabetes. La hiperglucemia es la causa inicial del daño a tejidos, así como las determinantes genéticas a la susceptibilidad individual de dichos daños. El deterioro de los tejidos por hiperglicemia se presenta en subgrupos de tipos específicos de células como: células endoteliales de la retina, células mesangiales del glomérulo renal, neuronas de nervios periféricos. La neuropatía ha sido caracterizada en ratas diabéticas inducidas con estreptozotocina (STZ). Este modelo experimental de DM1 presenta en general la misma patología, alteraciones funcionales y bioquímicas presentes en humanos diabéticos. Con relación a la actividad de la Na^+/K^+ -ATPasa se ha reportado disminución gradual en la actividad de la enzima, una reducción en la velocidad de conducción de los nervios periféricos debido a degeneración axonal y a la desmielinización paranodal. Recientes estudios sugieren que la inhibición de la actividad de la Na^+/K^+ ATPasa, en la membrana plasmática es un sello distintivo de la neuropatía diabética.

Los estudios de nuestro laboratorio han mostrado activación de la bomba de sodio y potasio por la serotonina (5-HT), así como el fenómeno de agonismo inverso en la interacción entre la Na^+/K^+ -ATPasa con antagonistas serotoninérgicos. No es claro si a nivel central existe disminución de la actividad de la enzima y si esta se modificaría por la serotonina. Por lo que en el presente trabajo se estudió el efecto de la DM1 sobre la actividad de la Na^+/K^+ -ATPasa en homogeneizado, fracciones membranales gliales y/o neuronales de corteza cerebral de ratas macho adultas con DM1. Los resultados muestran disminución en la actividad de la enzima en todas las preparaciones estudiadas. Por otra parte la 5-HT incrementó la actividad de la bomba sodio y potasio y se observó el efecto de agonismo inverso por la ciproheptadina y ritanserina (antagonista del receptor 5-HT_2). Estos resultados sugieren que a nivel central se reduce la actividad de la bomba de sodio y potasio en la DM1 y la serotonina no revierte el efecto.

ABSTRACT

The ATPase is an enzyme that is involved in active transport of solutes and ions through the membranes and epithelial cells, playing an important physiological role in the osmoregulation, cell volume regulation, excretion of toxic ions, cell excitability and so on. This enzyme responds to a clear example of the type of transportation asset antiporte cotransporter, in which for every ATP hydrolyzed transport 3 Na⁺ ions into the extracellular and 2 ions K⁺ to intracellular environment. Diabetes mellitus (DM) is a chronic degenerative disease that is characterized by an increase in the concentrations of glucose in the blood, by an absolute or relative deficiency of insulin, and by alterations in the metabolism of carbohydrates, proteins and lipids. High concentrations of glucose in the blood over many years can damage blood vessels that carry oxygen to nerve's tissue. Diabetic neuropathy is the medical term used to refer to damage the nervous system caused by diabetes. Hyperglycemia is the initial cause of damage to tissues, as well as the genetic determinants of individual susceptibility to such damage. The deterioration of the tissues by hyperglycemia is presented in subgroups of specific types of cells such as endothelial cells, retinal cells, mesangial cells of renal glomerulus, in neurons and in peripheral nerves. Neuropathy has been characterized in diabetic rats induced with streptozotocin (STZ). This experimental model of DM presents the same pathology in general such as functional and biochemical abnormalities that are present in human diabetics. With regard to the activity of the Na⁺/K⁺-ATPase has been reported gradual decrease in the activity of the enzyme, a reduction in speed driving in peripheral nerves due to axonal degeneration and demyelination paranodal. Recent studies suggest that inhibition of the activity of the Na⁺/K⁺ ATPase in the plasma membrane is a hallmark of diabetic neuropathy. Studies from our laboratory has been shown activation of the sodium and potassium pump by serotonin (5-HT), as well as the phenomenon of inverse agonism in the interaction between the Na⁺/K⁺-ATPase with serotonergic antagonists. It is not clear whether at the central level if there is a decreased activity of the enzyme and whether if this would be modified by the serotonin. So, in this work we study the effect of DM on the activity of the Na⁺/K⁺-ATPase in cerebral cortex homogenate and in membranal glial fractions and / or membranal neuronal fractions isolated from cerebral cortex of the brain of adult male rats with experimental DM1. The results show a decrease in the activity of the enzyme in all the preparations studied. On the other hand the 5-HT increases the activity of the sodium and potassium pump and we observed the effect of inverse agonism by cyproheptadine and ritanserin (antagonist of 5-HT₂). These results suggest that at the central level is reduced the activity of the sodium and potassium pump and serotonin not reversed the effect.

3.-INTRODUCCIÓN

3.1 GENERALIDADES DEL SISTEMA NERVIOSO

El sistema nervioso se divide en Sistema Nervioso Central (SNC) y Sistema Nervioso Periférico (SNP). Tanto en el SNC como en el SNP, se ha desarrollado un conjunto de especializaciones que posibilitan actividades como síntesis, almacenamiento, liberación o descarga, metabolismo y reconocimiento de neurotransmisores. EL SNC está constituido por el encéfalo y la médula. El SNP está constituido por los nervios situados en la región externa del sistema nervioso y éstos pueden ser craneales o raquídeos. El SNP se divide en sistema nervioso somático y sistema nervioso autónomo.

EL sistema nervioso somático consiste de fibras nerviosas que envían información al SNC. El sistema nervioso autónomo se divide en sistema nervioso simpático y sistema nervioso parasimpático. El sistema nervioso autónomo controla el músculo liso de las vísceras y glándulas.

El sistema nervioso tiene dos clases de células: células gliales que son células de sostén y las neuronas que son las unidades principales de señalización del sistema nervioso.

Las neuronas forman redes específicas de señalización que median conductas específicas. La señalización se organiza de la misma forma en todas las neuronas: El componente de entrada produce señales locales graduadas, el componente desencadenante toma la decisión de generar un potencial de acción, el componente de conducción propaga un potencial de acción y el componente de salida libera neurotransmisores. La neurona es la unidad básica del cerebro, es relativamente simple en cuanto a su morfología, aunque el cerebro humano contiene 10^{11} neuronas, que pueden clasificarse en muchos tipos diferentes. Las neuronas son las células responsables de la conducción de los impulsos nerviosos, están constituidas por un soma o cuerpo celular que posee extensiones filamentosas denominadas dendritas y axones. La porción terminal neuronal es el botón presináptico (Fig. 1). El tamaño del cuerpo celular puede ser desde 5 hasta 135 μm , las prolongaciones y dendritas pueden extenderse a una distancia de más de un metro.

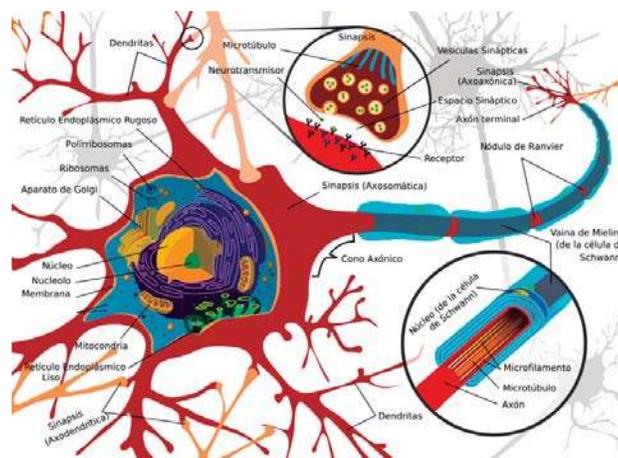


Fig. 1 Representación esquemática de una neurona (Tomada de: www.divulcat.com/.../Mayo, 2008)

El axón es la unidad principal conductora en la neurona, las señales eléctricas propagadas a lo largo del axón constituyen el potencial de acción; la porción terminal del axón se divide en finas ramas que tienen contacto con otras neuronas, el punto de contacto se le denomina sinapsis (Kandel et al., 1997). La dendrita constituye la parte de la neurona que recibe los estímulos y el axón es la parte especializada en distribuir estos estímulos desde la zona dendrítica (Villie, 1997).

Las prolongaciones neuronales que se encargan de conducir las señales están recubiertas por mielina. La mielina actúa como aislante electroquímico, permitiendo el transporte saltatorio del impulso nervioso. Las zonas no mielinizadas de la neurona, reciben el nombre de Nodos de Ranvier y es a través de ellos que el potencial de acción se desplaza en forma saltatoria. En el sistema nervioso periférico la mielina es producida por las células de Schwann, mientras que los oligodendrocitos la producen en el sistema nervioso central (Kandel et al., 1997). La estructura de la vaina de mielina consiste en capas concéntricas que rodean al axón, compuestas cada una de ellas por dos capas biomoleculares de lípidos separadas por otras proteínas, que son 70% lípidos y 30% proteínas. El cuerpo celular (soma) es el centro metabólico, contiene al núcleo y del cuerpo celular nacen el axón y las dendritas.

Los cuerpos neuronales están rodeados por las células gliales. En el sistema nervioso central de los vertebrados hay entre 10 y 50 veces más de células gliales que neuronas. Las células gliales no forman sinapsis y la teoría inicial de que eran simples células de sostén de las neuronas se ha modificado tras la identificación de subtipos celulares, sus características moleculares y su participación en los procesos de degeneración y regeneración nerviosa, predominan tres tipos de células gliales: oligodendrocitos, células de Schwann y los astrocitos (Fig. 2, Kandel et al., 1997).

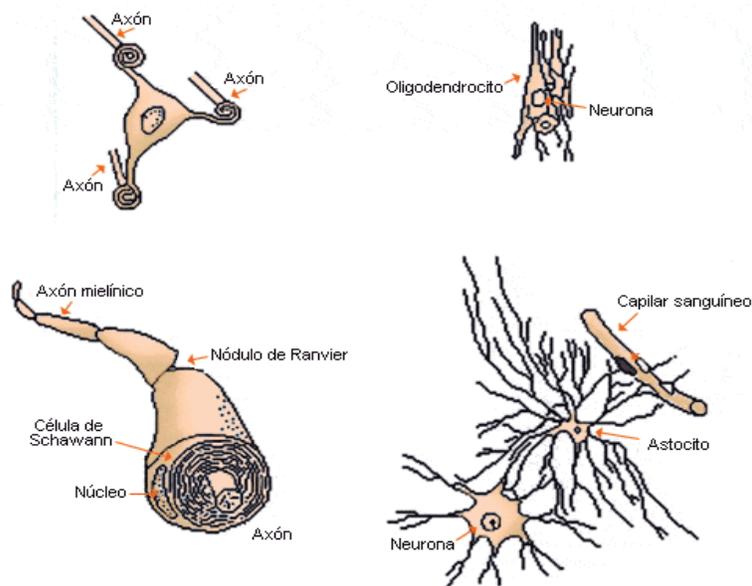


Fig. 2. Representación de una neurona y las diferentes estructuras que la conforman (Tomada de: http://www.uc.cl/sw_educ/neurociencias/esquemas/095.gif)

Se les atribuyen las siguientes funciones a las células gliales

- ∞ Dan soporte, estructura y consistencia al cerebro, además, aíslan ciertos grupos neuronales y recolectan los restos celulares originados por la lesión o muerte de una neurona.
- ∞ Durante el desarrollo cerebral algunos tipos de células gliales guían la migración de neuronas y dirigen el crecimiento de los axones.
- ∞ Mantienen la concentración de iones K^+ del líquido extracelular; algunas células gliales captan y retiran los neurotransmisores liberados en la sinapsis, durante la transmisión del impulso nervioso.
- ∞ Algunas células gliales ayudan a formar un revestimiento impermeable en los capilares y vénulas del encéfalo generando la barrera hematoencefálica evitando así que penetren ciertas sustancias tóxicas al cerebro.

La neurotransmisión química en la sinapsis presenta cuatro etapas:

- 1) Síntesis de sustancias transmisora
- 2) Almacenamiento y liberación del transmisor
- 3) Interacción del transmisor con el receptor en la membrana postsináptica
- 4) Eliminación del transmisor de la hendidura sináptica. Existen dos tipos de sinapsis, eléctricas y químicas (Mathews et al., 2003).

La sinapsis eléctrica es donde la transmisión es directa entre las neuronas a través de canales iónicos (Baer et al., 2001). La sinapsis química es donde las membranas presinápticas y postsinápticas se encuentran separadas por una hendidura sináptica que mide de 20 a 50 nm de diámetro. El botón presináptico es un axón terminal en el cual se encuentran contenidas las vesículas sinápticas donde se almacena el neurotransmisor, mientras que la célula postsináptica contiene los receptores, que convierte la señal química intercelular en una intracelular en la células postsináptica, (Fig. 3).

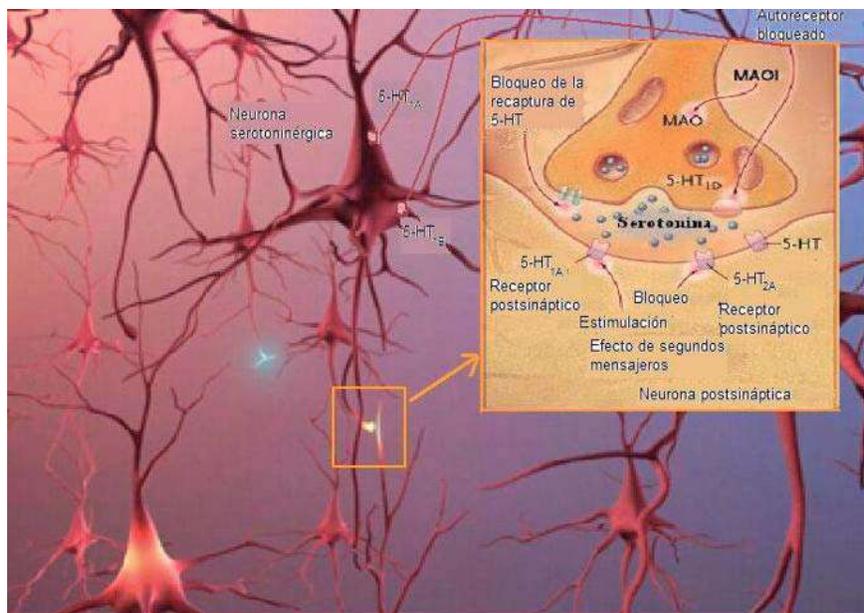


Fig. 3 Mecanismo de liberación de un neurotransmisor (Tomada de: www.alz.org/brain_Spanish/06.asp y www.pepyc.com/img/lectura3/11f.jp)

La neurotransmisión se inicia con la acumulación del neurotransmisor en las vesículas sinápticas. Después de la señal específica, el trasmisor es secretado hacia el espacio sináptico donde interactúa con su receptor. Una vez que el neurotransmisor ha interactuado con el receptor específico en la membrana postsináptica, su acción termina con la remoción del neurotransmisor del espacio sináptico. Son removidos por sistemas específicos de captura dependientes de Na^+ , localizados en la membrana plasmática de neurona y células gliales. La energía necesaria para esos sistemas de captura es proporcionada por las ATPasas (Nelson and Lill, 1994).

3.2.-CORTEZA CEREBRAL

La corteza cerebral es una lámina gris, formada por cuerpos de neuronas, que cubre los hemisferios cerebrales y cuyo grosor varía de 1.25 mm en el lóbulo occipital a 4 mm en el lóbulo anterior.

Se calcula que en la corteza del cerebro humano hay unos siete millones de neuronas. Aproximadamente la mitad de la corteza forma las paredes de los surcos de los hemisferios y no está expuesta en la superficie cerebral.

Las neuronas de la corteza están dispuestas en capas bastante diferenciadas. Las fibras nerviosas que nacen de ellas establecen múltiples conexiones entre las distintas capas y zonas, lo que permite que una señal llegada a la corteza se extienda y persista. Así mismo, los impulsos

eferentes que nacen de un área pueden llegar por las conexiones a otras, o a zonas cercanas a la primera haciendo que continúe la actividad.

Las neuronas de asociación hacen que los impulsos que llegan a la corteza duren un tiempo considerable y se extiendan a gran número de neuronas. Así un pequeño ruido percibido por la corteza puede suscitar una actividad prolongada de las neuronas del área correspondiente y provocar una respuesta externa.

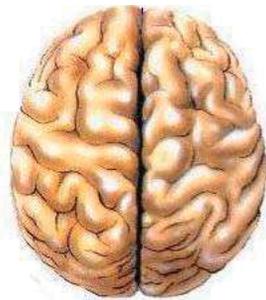


Fig. 4 Corteza cerebral (Tomada de <http://www.img53.imageshack.us/img53/7086/cerebro1my8.jpg>)

Filogenéticamente la corteza es de aparición relativamente reciente si se compara con las otras áreas del sistema nervioso central. Con todo, aún dentro de la corteza, se pueden distinguir áreas más modernas y con capacidad de procesar la información en forma más eficaz: las de la neocorteza, asiento o soporte principal del registro de lo simbólico.

- El **lóbulo temporal** contiene neuronas que captan cualidades sonoras en la corteza auditiva primaria. También contiene neuronas relacionadas con la comprensión del lenguaje, memoria y aprendizaje.
- El **lóbulo frontal** contiene principalmente la corteza motora primaria, en la cual se encuentran las neuronas que controlan los músculos del cuerpo. Está organizada en función de las partes del cuerpo.
- El **lóbulo parietal** aloja a la corteza somatosensorial primaria, compuesta por neuronas relacionadas con el tacto, también se organiza en función de las partes del cuerpo.
- El **lóbulo occipital** contiene la corteza visual primaria, localizada en la parte posterior, procesa la información visual que llega de la retina

- **Lóbulo de la ínsula** Queda una zona de corteza cerebral enterrada en el valle Silvano y tapada por los lóbulos frontal y temporal, su función es desconocida, aunque se relaciona con el gusto y audición.

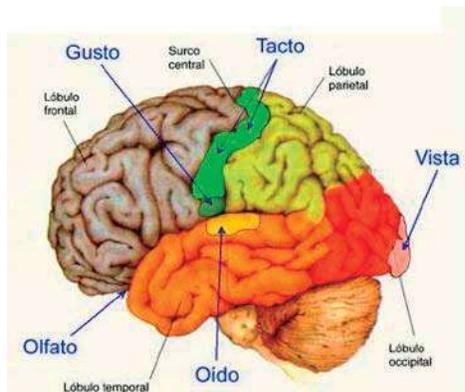


Fig. 5 Lóbulos de la corteza cerebral (Tomada de: <http://www.blog.educastur.es/numerouno/files/2007/10/dibujo-de-corteza-cerebral.jpg>)

Desde el punto de vista funcional la corteza cerebral se divide en:

Áreas corticales

La corteza cerebral también llamada "córtex", presenta diferencias que han hecho que se la divida en áreas con características propias, en cuanto a su composición de las capas celulares, al espesor, por el número de fibras aferentes y eferentes y por las funciones que cumplen.

Teniendo en cuenta el aspecto funcional, se encuentran en la corteza:

Áreas motrices

La principal área motora, 4 de Brodmann, está situada delante del surco central o cisura de Rolando. Posee células gigantes de las que nacen las vías corticoespinales y corticobulbares con axones para los músculos estriados del organismo. En la parte más alta de esta área se localiza la zona para los movimientos de los miembros más distantes: pies, rodillas, cadera; y en las partes más bajas los músculos para la masticación, deglución, cabeza, cuello y las zonas más próximas de las extremidades.

Además de esta área, existe otra situada por delante de ella, que se considera promotora y cuya lesión produce pérdida temporal de las destrezas adquiridas. Estas áreas envían los impulsos para la acción voluntaria, participando en la misma otros centros, ya que el sistema nervioso funciona en forma integral.

Como las vías aferentes y eferentes cruzan a nivel de la médula o del bulbo, el hemisferio cerebral

derecho rige los movimientos del lado corporal izquierdo, y el hemisferio izquierdo los del lado derecho.

Áreas sensoriales

Son las áreas en las que terminan las fibras sensitivas que transmiten impulsos visuales, auditivos, olfativos y sensaciones desde la superficie del cuerpo y tejidos profundos. Están distribuidas de la siguiente forma:

Área somestésica:

Recibe, a través del tálamo, los impulsos que rigen la sensibilidad corporal general procedentes de la piel, los tejidos, músculos, articulaciones y tendones del lado opuesto del cuerpo. Se localiza en la circunvolución central posterior, detrás de la Cisura de Rolando y frente a la representación motora.

Funciones del Área Somestésica:

- Apreciación de las diferencias de peso.
- Discriminación espacial.
- Localización táctil.
- Apreciación de tamaño y forma.
- Semejanzas o diferencias de temperatura.
- Todos los aspectos de la sensación que requieren comparación y juicio.

Área visual:

Esta situada en el lóbulo occipital. En ella se aprecian zonas específicas para la visión de la mácula o central; para la periferia de la retina y para las mitades superior e inferior de la retina.

Área auditiva:

Se halla situada en los lóbulos temporales, por debajo de la cisura lateral o de Silvio.

Parece ser que cada oído tiene representación bilateral en la corteza por lo que al extirpar un lóbulo temporal no se sufre mayor disminución de la audición.

Área olfativa:

Se sitúa en la circunvolución del hipocampo, próxima a la auditiva. Las investigaciones han revelado poco sobre esta área.

Área gustativa:

Los pocos datos que hay sobre ella indican que se halla en el extremo inferior de la circunvolución central posterior.

Áreas de asociación

Son áreas que no reciben directamente impulsos sensitivos sino que correlacionan los impulsos recibidos de otros centros.

En los últimos años cada vez se utiliza menos esta expresión porque se conocen mejor las conexiones tálamo-corticales y las funciones de las distintas áreas.

(<http://www.monografias.com/trabajos11/sisne/sisne.shtml>)

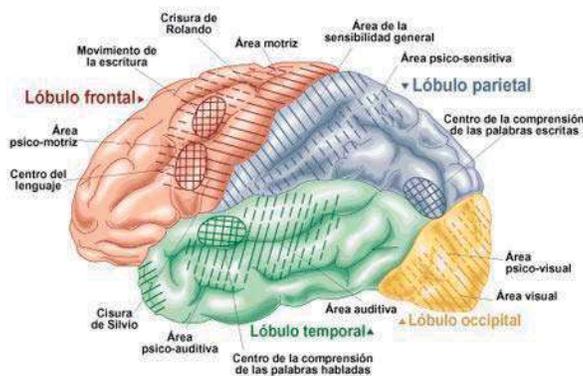


Fig. 6 Áreas sensitivas de la corteza cerebral (Tomada de: <http://www.apiepa.galeon.com/max-centrosx.gif>)

3.3.-NEUROTRANSMISORES.

Los neurotransmisores son compuestos químicos cuya liberación, a partir de vesículas existentes en la neurona presináptica, hacia la brecha sináptica, produce un cambio en el potencial de acción de la neurona postsináptica. Son capaces de inhibir o estimular rápida o lentamente, pueden liberarse hacia el torrente sanguíneo y así poder ejercer su acción sobre diversas células y a distancia del sitio de liberación (hormona). Pueden activar reacciones en el interior celular (segundos mensajeros), y en una misma neurona puede tener distintos efectos sobre las estructuras postsinápticas dependiendo de la naturaleza del receptor activado.

Una vez que se han activado los receptores postsinápticos se induce la apertura de los canales de Ca^{++} sensibles al voltaje, al elevarse la concentración de Ca^{++} intracelular se activa la exocitosis de vesículas sinápticas que liberan al neurotransmisión en la hendidura sináptica.

La unión del neurotransmisor con su receptor induce en la membrana postsináptica la apertura de los canales para cationes activados por ligandos produciendo cambios en la permeabilidad de la membrana que pueden: inducir la despolarización de la membrana postsináptica (sinapsis excitatorias) o hiperpolarizar la membrana postsináptica (sinapsis inhibitorias).

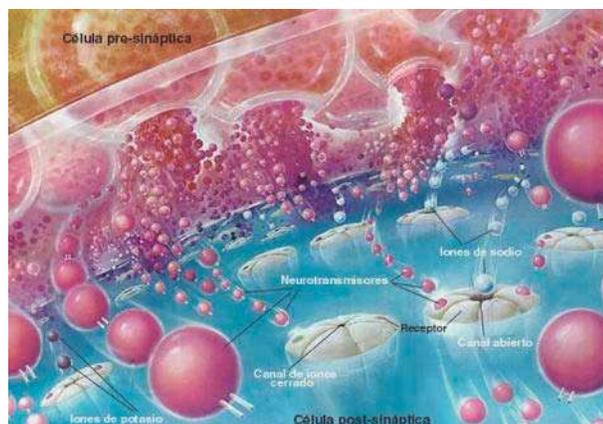


Fig. 7 Representación esquemática de Neurotransmisores (Tomada de: www.yelop.galeon.com/sinapsisx.jpg)

Existen criterios para considerar a un compuesto como neurotransmisor:

- ⌘ La maquinaria biosintética de neurotransmisor debe estar presente en la célula presináptica.
- ⌘ Deben existir mecanismos de transporte hacia la terminal presináptica y mecanismo específicos de su liberación al espacio sináptico.
- ⌘ En las neuronas blanco deberán estar presentes los receptores membranales que reconozcan al neurotransmisor.
- ⌘ Este compuesto administrado exógenamente (agonista), será capaz de reproducir el efecto *in vitro* y la acción del neurotransmisor debe ser bloqueada por antagonistas.
- ⌘ Debe estar presente un sistema enzimático que lo catabolice.

De acuerdo a lo anterior la serotonina, cumple con todos los criterios y por lo tanto es considerada como un neurotransmisor (Peña, et al., 1999).

3.4.-SISTEMA SEROTONINERGICO CEREBRAL

A mediados del siglo XIX se había observado que un compuesto presente en el suero de humano inducía un aumento en la frecuencia cardíaca y respiratoria así como un aumento en la presión sanguínea. Otros efectos consistían en un incremento en la peristalsis del intestino delgado. Cuando se inició la caracterización de la molécula vasoconstrictora encontrada en el suero, se le llamó serotonina, y enteramina la que provoca la contracción en el intestino (Rapport et al., 1948). Posteriormente se aisló el principio activo de ambas fuentes tisulares y sus características coincidieron con la 5-hidroxitriptamina o 5-HT. Twarog y Page (1953), demostraron la presencia de

5-HT en el sistema nervioso central. Amin y col. (1954) encontraron concentraciones importantes en el hipotálamo (Siegel et al. 1989).

El efecto general de la serotonina a nivel celular, es la disminución en la excitabilidad neuronal. En las neuronas del hipocampo, la 5-HT disminuye la velocidad de disparo a través de un aumento en la conductancia al K^+ (Segal, 1981). Pero también tiene efectos opuestos es decir, facilitadores sobre la acción excitadora producida por la estimulación eléctrica, cerrando los canales de K^+ y también se le considera un neuromodulador (Siegelbaum, 1982). De hecho se dice que la serotonina tiene un mecanismo de acción metabotrópico induciendo cambios tróficos, lo que implica una serie de procesos químicos en las células blanco (McGeer, 1987).

Existe serotonina en todo el cuerpo pero esta no atraviesa la BHE por lo cual el cerebro sintetiza su propia 5-HT (del 1 al 2% de la 5-HT total). En el SNC la serotonina es sintetizada exclusivamente por neuronas especializadas llamadas neuronas serotoninérgicas, lo cual ha sido demostrado por métodos de inmunohistoquímica de fluorescencia. Las células serotoninérgicas se concentran 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 Rafe (Steinbush et al., 1978). Dahlstrom y Fluxe describieron nueve grupos de cuerpos celulares que contienen serotonina, a los que ellos designaron desde B1 hasta B9 (Fig.8).

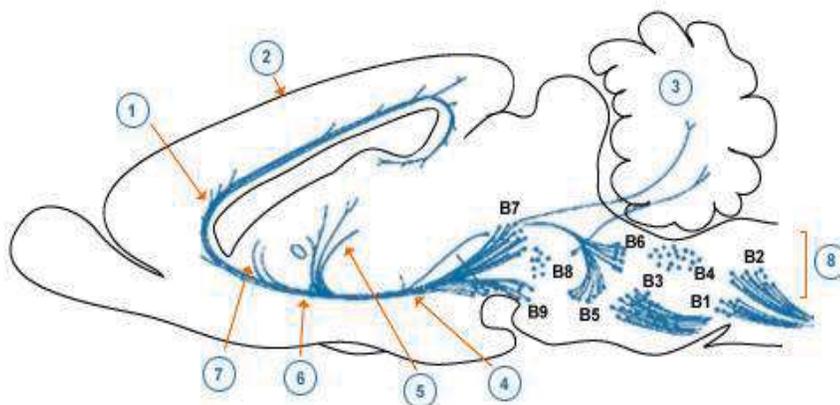


Fig. 8 Esquema de un corte sagital del cerebro de ratona que muestra la distribución del sistema serotoninérgico y su innervación (Tomada de: <http://www.iqb.es/neurologia/atlas/lewy/lewy09.htm>)

Existen ciertos factores en el organismo que participan en la regulación de la concentración de la FL del L-Trp en el plasma, entre ellos se encuentra la constante de afinidad que tiene el aminoácido para unirse a la albúmina; la concentración de albúmina y ácidos grasos libres, estos últimos desplazan al L-Trp de su unión con la albúmina, de tal manera aumenta la disponibilidad del aminoácido para su transporte al cerebro y conlleva a un aumento en la síntesis de 5-HT. La concentración de la FL del L-Trp depende también de la concentración de los aa ya que compiten por su transportador en la BHE, así una disminución en la concentración de estos aa en el plasma permitirán un mayor paso del L-Trp al cerebro y un aumento en la síntesis de 5-HT (McMenamy and Oncley, 1975; Potiou and Boulu, 1977).

La síntesis de serotonina se lleva a cabo en dos etapas:

- ∞ Una vez que el L-Trp llega a las terminales nerviosas serotoninérgicas es hidroxilado a 5-hidroxitriptófano por la triptófano 5- hidroxilasa (TPH) de la cual se han descrito dos isoformas TPH1 y TPH2 (Walter et al. 2003) la cual es la enzima limitante de la síntesis de 5-HT.
- ∞ La enzima que convierte al 5-hidroxitriptófano en 5-HT es la descarboxilasa de aa aromáticos (AADC), está ampliamente distribuida y tiene alta especificidad por el sustrato, este es un paso rápido ya que en el encéfalo no se encuentra 5-hidroxitriptófano (5-HTTP) (Fig. 5, Grahmen-Smith 1964; Lovenberg et al., 1967; Jequier et al., 1969).

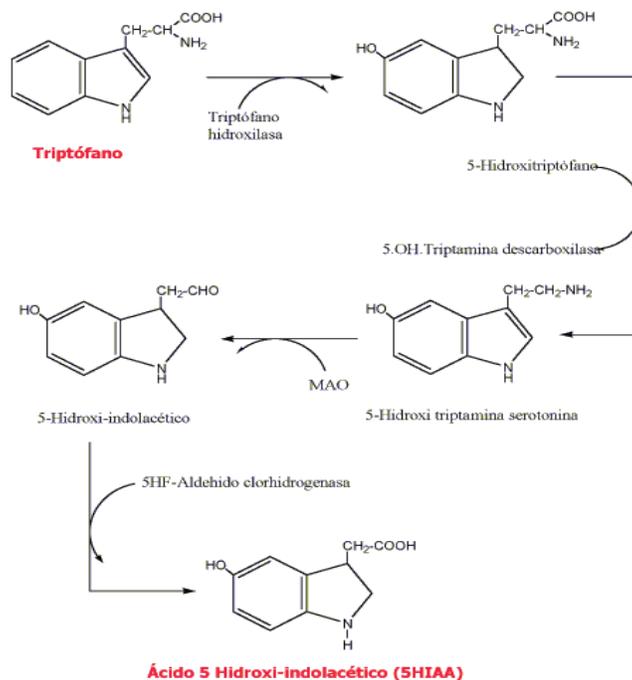


Fig. 10 Mecanismo catalítico en la síntesis y catabolismo de la serotonina. (Tomada de: www.biopsicologia.net/fichas/fig-01-0010.gif)

La serotonina recién formada se acumula en las vesículas sinápticas, ingresa por medio de transporte activo y es liberada por exocitosis, dentro de las vesículas es protegida de la enzima monoaminoxidasa (MAO) la cual convierte a la 5-HT en 5-hidroxi-indolacetaldehído, el cual es oxidado por un acetaldehído deshidrogenasa dependiente de NAD^+ para formar como producto final ácido 5-hidroxi-indolacético (5-HIAA). Existen dos isoenzimas de MAO, denominadas como tipo A y tipo B, estas isoenzimas son flavoproteínas de membranas mitocondriales externas en neuronas, glía y otras células. Existen inhibidores selectivos de cada forma de la MAO, ej., clorgilina o maoibemida para el tipo A y deprenil para el tipo B. El cerebro humano contiene mayor cantidad del tipo B que del tipo A, los cuerpos celulares de las neuronas serotoninérgicas contienen predominantemente MAO tipo B, que no metaboliza preferentemente 5-HT. Esto a llevado a la hipótesis de que la MAO tipo B en las neuronas serotoninérgicas, impide a la célula la acumulación de varios substratos naturales por ej., dopamina, que puede interferir con el almacenamiento, liberación y recaptura de 5-HT (Cases et al., 1995; Shih 1991). La serotonina es degradada preferentemente por la MAO-A (Pacheco et al., 2003).

La interacción serotonina-receptor debe ser transitoria, por tal motivo existen varios mecanismos de inactivación de la 5-HT lo que permite mantener una concentración baja en el espacio sináptico, uno de ellos es la desaminación oxidativa por la ya mencionada MAO. Otro mecanismo de control es la recaptura de 5-HT del espacio sináptico a través del transportador de serotonina (SERT o 5-HTT) situado en las neuronas presinápticas, por medio de este mecanismo la serotonina puede seguir dos caminos uno la degradación por la MAO A y un segundo camino el ser reciclada en vesículas y posteriormente ser liberada nuevamente.

La serotonina además de estar presente en el SNC, también se encuentra en:

- a) Tubo digestivo: se encuentran en las células enterocromafines que a partir del L-Trp sintetizan, almacenan, y liberan 5-HT que tiene la función de regular la motilidad intestinal por medio de la red mientérica de neuronas entre las capas del músculo liso (Gershon, 1991).
- b) Las plaquetas: estas expresan mecanismos para la captación, almacenamiento y la descarga endocítica de 5-HT. La función principal de las plaquetas es obturar orificios en los endotelios lesionados, cuando las plaquetas establecen contacto con el endotelio lesionado, liberando sustancias que promueven la adherencia plaquetaria y la liberación de 5-HT con inclusión de ADP, trombina y tromboxano A_2 , la 5-HT se une a los receptores 5-HT_{2A} y desencadena la agregación. La descarga del factor de relajación derivado del

endotelio (óxido nítrico y quizá otros componentes) antagoniza la acción vasoconstrictora del tromboxano y de la 5-HT (Furchgott and Vanhoutte, 1989).

- C) Aparato cardiovascular: la serotonina induce varias funciones del corazón que resultan de la activación de subtipos de receptores 5-HT, estimulación y/o inhibición de la actividad autónoma o predominio de las reacciones reflejas de la 5-HT (Sexena and Villalón, 1990).

Las vías serotoninérgicas inervan un gran número de estructuras del SNC y en consecuencia han sido implicados en la modulación de los circuitos en casi todos los comportamientos y procesos fisiológicos (Richerson, 2004; Barnes and Sharp, 1999; Vinay et al., 2002). Se ha observado su participación en la regulación de diversas funciones orgánicas como el control de la temperatura corporal, la secreción endocrina, la conducta sexual, el dolor, la presión sanguínea y los ciclos de sueño y vigilia (Siegel et al., 1989).

A continuación se describen algunas de las funciones de la 5-HT.

Timia:

El papel de la 5-HT en la regulación de la timia ha sido desarrollado a partir de las hipótesis de Van Praag (Van Praag, 1981; Van Praag et al., 1986; Van Praag et al., 1988). Avala esta teoría el hecho de que una dieta libre de triptófano a las cinco horas de la ingesta y coincidiendo con el pico plasmático más bajo de este aminoácido, produce un estado depresivo moderado en voluntarios sanos.

Sueño:

La 5-HT es el mediador responsable de las fases III y IV de sueño lento. El ritmo sueño-vigilia está regulado por el balance adrenérgico-serotoninérgico, siendo la noradrenalina la responsable del despertar y mantener la vigilia (Lenhkuniec and López, 1988; 1992).

Conducta Sexual.

La 5-HT presenta un efecto inhibitorio sobre la liberación hipotalámica de gonadotrofinas con la consecuente disminución de la respuesta sexual normal. La disminución farmacológica de la 5-HT facilita la conducta sexual (Tejero et al., 1985).

Regulación termoneuroceptiva

La 5-HT produce un efecto dual sobre la termia según el receptor estimulado por ejemplo si se estimula el 5-HT₁ se produce hipotermia y si es el 5-HT₂ hipertermia (Clinke and Digovic, 1992).

Conducta alimentaria

La 5-HT es el principal mediador inhibitorio del núcleo hipotalámico ventro-medial que regula la ingesta y saciedad. La hiperserotoninergia produce anorexia (Blundell, 1984) y la hiposerotoninergia produce ganancia de peso. Esto puede ser causa de la anorexia en la depresión (Janowsky, 1987; Boullosa and López, 1991; Donetti et al. 1994).

Factor Tráfico:

La serotonina como factor tráfico se ha detectado durante la división del cigoto, gastrulación y la neurulación de embriones de pollo, erizo de mar y *Drosophila* (Colas et al., 1999). La presencia de 5-HT y sus receptores en la embriogénesis temprana y la habilidad de ciertos agentes farmacológico (Lauder et al., 1981) específicos para la 5-HT interfieren con el desarrollo embrionario sugiere que los embriones utilizan la 5-HT antes del inicio de la neurogénesis para regular la proliferación celular y/o movimientos morfogénicos (Lauder, 1988; Colas et al., 1999).

Mercado y col. (1998) demostraron la presencia de receptores serotoninérgicos en los conos de crecimiento axonal, así como los elementos moleculares necesarios para la unión, captura y liberación de la serotonina, estos datos refuerzan las observaciones de Sickich y col. en la cual indica que la 5-HT reduce el crecimiento de los axones y la formación de sinapsis de las neuronas de la corteza cerebral en cultivo (Sickich et al., 1990).

3.5-RECEPTORES SERONONINÉRGICOS CEREBRALES.

Los neurotransmisores al igual que las hormonas actúan sobre los receptores membranales específicos siendo estos últimos glucoproteínas que están presentes en las membranas postsinápticas en concentraciones menores de las de los neurotransmisores presinápticos que actúan sobre ellos. Estos receptores se sintetizan en el citoplasma y se transportan a sitios específicos en la bicapa lipídica de la membrana plasmática (Alberts, 1994).

Cada neurona tiene una variedad de receptores sobre su membrana y del repertorio que contenga, dependerá su versatilidad sobre la capacidad de respuesta. Algunos compuestos son agonistas, es decir, imitan la actividad en este caso del neurotransmisor con una cinética muy parecida y otros, son antagonistas lo que significa que su afinidad es alta pero bloquean la activación del receptor y la cascada de señalización intracelular. Debe existir al menos un tipo de receptor para cada neurotransmisor. En 1957 Gaddum y Picarelli propusieron que el efecto de la serotonina estaba mediado por dos tipos de receptores diferentes, pero no fue sino hasta la década de los 80 que la caracterización de diferentes receptores se realizó de manera sistemática (Sanders-Busch, 1988). En especial existen diversos estudios de la unión de compuestos agonistas y antagonistas,

“Efecto de la serotonina sobre la actividad de la bomba de sodio y potasio en corteza cerebral de ratas con DM1”

que apoyan la existencia de subtipos de receptores serotoninérgicos. Aunque al principio, se hablaba de receptores M (sensibles a la morfina) y receptores D (sensibles a dibenzilina) posteriormente se designaron como S₁ y S₂, 5-HT₁, 5-HT₂, etc. Se hizo evidente la necesidad de definir una etimología para nombrar a los subtipos de receptores serotoninérgicos y se decidió por el término de 5-HT₁ hasta 5-HT₇. Los receptores 5-HT₁ están involucrados en la dilatación arterial, en la inhibición de la transmisión de señales en el simpático y la autoinhibición en el cerebro. Los 5-HT₂ participan en la agregación plaquetaria. Los receptores 5-HT₃ median el reflejo Bezold-Jarish que consiste en la repuesta a la serotonina como consecuencia de una bradicardia súbita y transitoria, también participa en la liberación de catecolaminas en el músculo cardíaco. Los 5-HT₄ están involucrados en la taquicardia inducida por 5-HT y que no es bloqueada por drogas que se unen a los receptores 5-HT₁, 5-HT₂ o 5-HT₃ (Dumuis, 1988). En cuanto a los receptores 5-HT₅, tienen una gran homología a los receptores de la familia 5-HT₁ y se sabe que se expresan en la corteza cerebral en el hipocampo, en el bulbo olfatorio y en la capa granular del cerebelo pero aun no se conocen todas las funciones en las que participan (Peroutka, 1994). Se clonó el gen que codifica para un receptor no descrito, que difiere en cuanto a las características fisiológicas y la distribución en el SNC con respecto a otros y se designó 5-HT₇ (Jakeman, 1994). La clasificación actual así como las funciones en las que participan los receptores serotoninérgicos en el SNC, se resume en la tabla I:

Tabla I. Receptores serotoninérgicos

RECEPTOR	AGONISTA	ANTAGONISTA	MECANISMO	LOCALIZACIÓN
5-HT _{1A}	8-OH-DPAT, Buspirona, Ipsapirona, 5-CT, Dopamina, 5-MDMT	NAN-190, Spiroxatrina, Propranolol, Spiperona, Ketanserina, Metionteptina	↓AMPc, Canales de K ⁺	Septum, Núcleos de Rafe, amígdala, corteza cerebral e hipocampo.
5-HT _{1B}	Piperazina, 5-CT	Spiperona, Cianopindolol	↓AMPc	Sustancia Nigra, globus pallidus y subicullum
5-HT _{1Da,b}	Sumatripam, 5-HT, 5-CT, Piperazina, Metergolina	Metergolina, Metiotepina	↓AMPc	Sustancia Nigra, globus pallidus, subicullum y corteza frontal
5-HT _{1E}	5-HT, 8-OH-DPAT, TFMPP, 5-CAT, 5- CT	Ketanserina, Metiotepina, GTP- gamma	↓AMPc	Corteza cerebral, Putamen
5-HT _{1F}	5-HT, Sumatripan, 5- CT	Metiotepina	↓AMPc	Hipocampo y corteza cerebral
5-HT _{2A}	1-DOI, H-DOB, CH ₃ - 5HT	Metergolina, Ketanserina, Ritanserina, Spiperona, Mesulergin a, Metisergida	↑IP3	Corteza cerebral, núcleo caudado, complejo amigdalóide, tálamo e hipotálamo, plaquetas, músculo liso
5-HT _{2B}	CH ₃ -5HT	Desconocido	↑IP3	Estómago (fondo), amígdala, caudado e hipotálamo
5-HT _{2C o 1C}	CH ₃ -5HT	Mesulergina	↑IP3	Plexo coroideo, ganglios basales, hipotálamo, sustancia nigra
5-HT ₃	CH ₃ -5HT, 5-HTQ, Fenilguanidil, 1,3- Clorofenilbiguanidin a	Zacoprida, Ondasetron, Tropisetron, Motoclopramida	Canal iónico Na ⁺ , K ⁺	Area postrema, nervios sensitivos y enérgicos
5-HT ₄	Rezanprida, Aacoprida, Cizaprida, 5-HT	Tropisetron	↓AMPc	Hipocampo, estriado, sustancia nigra, tubérculo olfatorio, amígdala, neuronas mientéricas y músculo liso
5-HT _{5A,B}	LSD, Ergotamina	Desconocido	Desconocido	Cerebro
5-HT ₆	5-CT, LSD	Metiotepina, Amoxipina, Clozapina	↓AMPc	Estriado, tubérculo olfatorio, corteza cerebral, hipocampo y amígdala
5-HT ₇	Desconocido	Desconocido	↓AMPc	Tálamo, hipocampo, sistema límbico, amígdala.

Se han considerado tres criterios para caracterizar a un receptor y definir el tipo y subtipo del mismo:

- a) Un criterio operacional que se refiere a la acción de las drogas agonistas o antagonistas.
- b) Un criterio estructural que se corresponde a la secuencia de aminoácidos
- c) Un criterio transduccional que establece el mecanismo de señales intracelulares a las que está acoplado.

Cada neurotransmisor ejerce sus efectos postsinápticos uniéndose a receptores específicos, en general, dos neurotransmisores no pueden unirse al mismo receptor; sin embargo, un neurotransmisor puede unirse a diversos receptores, que son los subtipos.

Los receptores pueden dividirse en dos grupos: un grupo de receptores que activan directamente los canales iónicos llamados ionotrópicos. Un segundo grupo llamado metabotrópico, donde el receptor está acoplado a moléculas efectoras y proteínas G (Kandel et al., 1997).

El papel ambiguo y aun a veces contradictorio de la 5-HT en las diversas funciones fisiológicas y patológicas fue lo que llevó a suponer la existencia de diversos receptores que ante el mismo estímulo serían capaces de ejercer distintas respuestas. En la actualidad se encuentran descritos siete tipos de receptores serotoninérgicos con subtipos específicos (Boullosa and López, 1997).

Los subtipos de receptores de la 5-HT se expresan en patrones distintos, pero a menudo superpuestos y se encuentran acoplados a diferentes mecanismos transmembrana de señalización. En la actualidad se reconocen cuatro familias de receptores de 5-HT con funciones conocidas que son 5-HT₁ al 5-HT₄. Las familias de receptores 5-HT₁, 5-HT₂ y 5-HT₄₋₇ son miembros de la superfamilia de receptores acoplados a proteínas G, el receptor 5-HT₃, por otra parte, es un canal de iones de compuerta de ligando que da paso a Na⁺ y K⁺ y tiene una topología esperada de membrana compatible con la del receptor colinérgico nicotínico (Hoyer et al., 1994).

Además, estos receptores difieren por su localización en el SNC (Bockaert et al., 1994).

Los receptores serotoninérgicos una vez activados, pueden seguir dos vías alternativas de acuerdo con la proteína G sobre la que actúen: una regulada por un canal iónico, que implica la apertura de canales iónicos que no forman parte del receptor y otra dependiente de múltiples sistemas enzimáticos, que es la utilizada por la mayor parte de los receptores.

Esta vía se puede producir la estimulación del sistema de la adenilato ciclasa responsable de la formación del AMPc la inhibición o la estimulación de la fosfolipasa C responsable de la conversión del Fosfatidil inositol-4,5-difosfato (PIP₂) en inositol 1,4,5 trifosfato (IP₃) y diacilglicerol (DAG) (Bockaert et al., 1994; Boulosa et al., 1999; Kaumann et al., 1994).

Estos mecanismos de segundos mensajeros estimulan a proteínas cinasas, cuyo resultado final es la fosforilación de proteínas que se consideran segundos mensajeros y efectores finales del mensaje a la segunda neurona (Fig. 11).

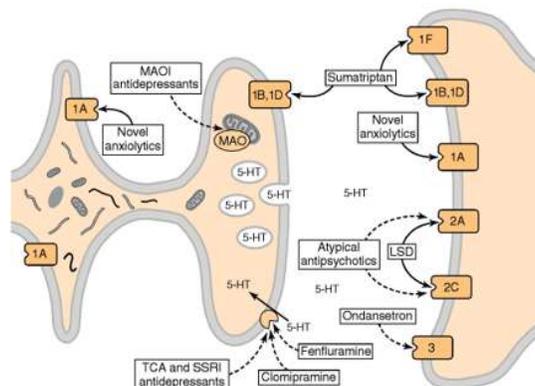


Fig 11. Neurotransmisión serotoninérgica. (Tomada de: Tesis de Licenciatura. Facultad de Químico Farmacobiología. U.M.S.N.H., Morelia Michoacán, México, Celis, N. K., (2005) Los antagonistas de los receptores 5-HT₂ tienen efecto de agonismo inverso sobre la actividad de la bomba de sodio y potasio. Pag. 28).

3.6.-Los receptores 5-HT₂.

De esta subfamilia de receptores se ha identificado tres subtipos que han sido denominados como 5-HT_{2A}, 5-HT_{2B} y 5-HT_{2C} están acoplados a proteínas G estimulando la fosfolipasa C. Los receptores 5-HT_{2A} están ampliamente distribuidos por el SNC, primordialmente en la áreas o zonas de las terminaciones serotoninérgicas.

El receptor 5-HT_{2A} se ha caracterizado bien en la corteza cerebral, el receptor 5-HT_{2C} se ha estudiado en el plexo coroides, el receptor 5-HT_{2B} fue clonado recientemente, su activación da lugar a la contracción del músculo liso del fundus (Cox and Cohen, 1996), se ha localizado en cerebelo, corteza cerebral, amígdala, tálamo, hipotálamo y retina (Money et al., 1994; Burnss et al., 1997).

Es clara la gran diversidad de receptores serotoninérgicos y más que una excepción, es un fenómeno común de sistemas biológicos aún para otros receptores, enzimas y transportadores,

etc., lo que refleja que en el transcurso de la evolución, cuando surge una variante con propiedades funcionales idóneas para determinado microambiente, se observa el proporcionar ventajas adaptativas a los individuos que lo poseen.

3.7.-AGONISMO INVERSO

El concepto de agonista y antagonista se entendía solamente como un mecanismo relativamente simple en el cual el agonista se unía al receptor modificándolo y activando procesos en la membrana y el antagonista solo actuaba interfiriendo con la unión del agonista al receptor, compitiendo por afinidad al receptor y evitando su activación (antagonismo competitivo).

La teoría tradicional del sistema de receptor postulaba que se encontraba en un estado simple, estático en donde los agonistas al unirse podían inducir cambios conformacionales en el receptor que lo activaban y lo llevaban a un estado funcional. Este punto de vista, postulado hacia los años 50'S (Del castillo y Katz, et. al., 1957) y se mantuvo como el fundamento principal de la farmacología del receptor durante años.

El concepto de agonismo inverso surgió de observaciones experimentales de que algunas drogas son capaces de reducir la actividad del sistema del receptor que eran activados en ausencia de sus agonistas. Dado que los agonistas incrementan la actividad del sistema del receptor esta actividad opuesta o negativa se le conoce como agonismo inverso (Strange et al., 2002).

La actividad de un agonista o de un antagonista dependía solamente de la afinidad (fuerza de unión) que se tuviera con el receptor. Sin embargo, Church y cols. (2002) encontraron que por lo menos los receptores acoplados a proteínas G (GPCRs) no funcionan en esta forma tan simple de "apagado" y "encendido". Ahora se ha demostrado que la unión del agonista con el receptor estabiliza al GPCR en su forma activa y en cambio la unión del ahora llamado agonista inverso con el mismo receptor lo estabiliza en su forma inactiva evitando así el efecto biológico. Se ha encontrado también que los receptores tienden a permanecer parcialmente en su forma activa (actividad constitutiva) y el agonista los estabiliza para mantener este efecto en forma más intensa y prolongada. En este nuevo escenario ahora el agonista inverso, puede tener un efecto aún sin la presencia del agonista.

El agonismo inverso fue originalmente descrito para receptores ionotrópicos como el receptor de GABA, posteriormente fue descrito para receptores acoplados a proteínas G (Kenakin et al., 2001, Milligan et al., 1997, Daeffler et al., 2000, De Ligt et al., 2000, Leurs et al., 1998).

Braestrup et al., (1982) reportaron el descubrimiento de un agente, el DMCM (metil 6,7-dimetoxi-4-etil- α -carboxilina-e-carboxilato), que en contraste con las benzodiazepinas, no solo era un potente convulsante *in vivo*, sino que también parecía favorecer su unión a receptores de benzodiazepinas. Se propuso que los receptores GABA-benzodiazepinas pudieran existir en dos conformaciones que están en equilibrio, un canal para cloro abierto (conformación activada) y otra cerrada (conformación inactivada) en la cual el DMCM puede tener una alta afinidad y una tendencia a estabilizar, por medio de eso, disminuir la unión GABA a la conformación activada. El concepto anterior de conformaciones activas o inactivas, introducido inicialmente para receptores acoplados a canales iónicos, pronto encontró soporte para estudiar el efecto en los GPCRs.

Costa & Hertz , (1989) demostraron que algunos antagonistas del receptor α opioide poseía una “actividad intrínseca negativa” *in vitro* en contraste con otros que carecían de actividad intrínseca. El concepto de “actividad intrínseca negativa” implica un equilibrio en dos estados del receptor, estos dos estados se pueden definir, como limitado por la proteína G o un estado libre del receptor, el primero activo y el segundo inactivo. Los resultados de Costa & Hertz proporcionaron soporte al modelo del receptor propuesto por Wregget & De Lean (1984) postularon que ciertos antagonistas pueden ser activos obstaculizando la capacidad de receptores para asociarse con las proteínas G membranales.

Si bien hace algunos años se pensó que algunas drogas que activaban a los GPCRs podían ser divididas en dos clases, agonistas y antagonistas, ahora sabemos que para la mayoría de los GPCRs los compuestos que activan estos receptores exhiben un espectro de eficacia de agonismo inverso. Muchos agonistas inversos han sido descritos para varios sistemas (Wreggett et al., 1984, Chidiac et al., 1994, Rossier et al., 1999, Barr et al., 1997) por ejemplo los α_{1a} - α_b - y α_2 - adrenérgicos y receptores 5-HT_{1A}, de hecho muchos de los compuestos que han sido previamente considerados como antagonistas, son agonistas inversos. Algunos ejemplos de drogas con importantes acciones terapéuticas han demostrado ser agonistas inversos incluyendo la cimetidina (Smith et al., 1996) que actúa sobre receptores H₂, haloperidol (Hall and Strange et al., 1997) que actúa sobre receptores D₂ dopaminérgicos, prazosin (Rossier et al., 1999) que actúa sobre receptores α_1 adrenérgicos, timolol (Chidiac et al., 1994) que actúa sobre α_2 adrenérgicos y clozapina que actúa sobre receptores D₂ y 5-HT_{2C} (Hall and Strange et al., 1997, Westphal and Sanders- Bush et al., 1994). También se ha observado el efecto del agonismo inverso en receptores cannabinoides (CB1 humano) acoplados a proteínas G (GPCRs) y constituyen unos de los receptores más abundantes en el SNC, con niveles diez veces superiores a otros GPCRs.

Estos receptores exhiben una amplia distribución en todo el SNC. Recientemente se ha observado que muchos de estos receptores son capaces de desarrollar actividad constitutiva o intrínseca en

ausencia de agonista en cerebro humano postmortem mediante la técnica de marcaje con [35s]GTPγS (Hernández and Rodríguez et al.,).

3.8.-Antagonistas serotoninérgicos:

Ciproheptadina: Hidrocloruro de ciproheptadina. Antagonista de los receptores 5-HT₂ y 5-HT_{1c} de la serotonina, antagonista de los receptores H₁ de la histamina, se utiliza como antiprurítico.

Fórmula: C₂₇H₂₅NHCl

PM: 323.9 g/mol

Soluble en agua metanol y etanol

Ritanserina: Potente antagonista de los receptores de la serotonina 5-HT_{2A}, es un agonista inverso, puede cruzar la BHE.

Fórmula: C₂₇H₂₅F₂N₃OS

PM: 477.6 g/mol

Insoluble en agua

Soluble en metanol

3.9.-BOMBA DE SODIO Y POTASIO

Al igual que todas las células el organismo humano las neuronas tienen sistemas de transporte molecular en la membrana plasmática, la permeabilidad de la membrana es fundamental para el funcionamiento de la célula viva y para el mantenimiento de condiciones fisiológicas intracelulares adecuadas, la presencia de membrana establece una diferencia neta entre el líquido extracelular y el intracelular en el que está inmersa la célula.

Existen diferentes sistemas de transporte celular, el movimiento neto de una molécula en contra de su gradiente de concentración se llama transporte activo. El transporte activo siempre está mediado por proteínas de transporte presente en la membrana. Estas proteínas que participan en el transporte, son sistemas enzimáticos llamadas bombas. De acuerdo a su fuente de energía libre que se emplea para llevar a cabo el proceso, hay dos tipos de transporte activo, el primario y el secundario.

En el transporte activo primario la fuente de energía puede ser la luz, la hidrólisis de ATP o el transporte de electrones. Así los transportadores que utilizan ATP se conocen como ATPasas debido a que utilizan ATP como fuente de energía, el cual se hidroliza a ADP y fosfato.

El transporte activo secundario es el transporte conocido por gradientes iónicos. El flujo de iones a favor de su gradiente de concentración proporciona una fuente de energía libre que se puede utilizar para introducir a la célula moléculas en contra de su gradiente de concentración (Thomas, 2000).

Uno de los sistemas enzimáticos presentes en la membrana plasmática es la bomba de Na^+ y K^+ (adenosin trifosfohidrolasa estimulada por Na^+ y K^+ dependiente de Mg, E.C.3.6.1.3), es una enzima plasmática ubicua siendo esta la responsable del establecimiento del gradiente electroquímico de los iones Na^+ y K^+ (Fig.6, Feraille and Doucet, 2001).

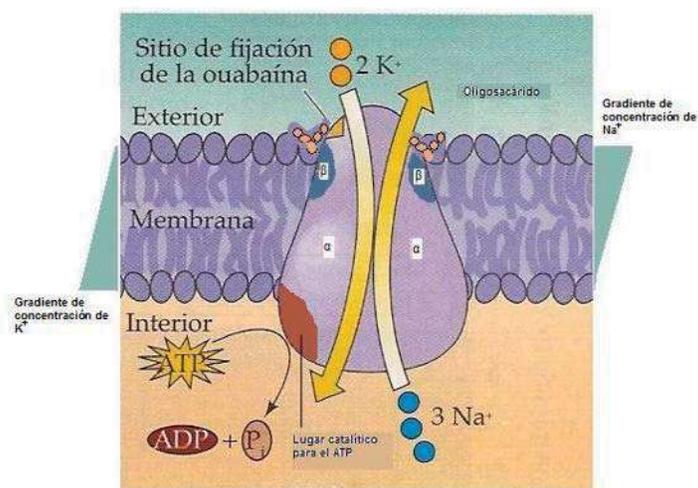


Fig. 12 Representación esquemática de la Bomba de sodio y potasio ATPasa (Tomada de: Invitación a la neurociencia, Purves, Augustine, Fitzpatrick, Katz, LaMantia, McNamara, Ed. Panamericana, pag. 88)

La Na^+ , K^+ -ATPasa esta formada por dos subunidades α con un peso molecular de 110kDa y dos subunidades β de 55kDa cada una. El complejo atraviesa la membrana plasmática con segmentos hidrofílicos que se extienden hacia el espacio extracelular y hacia el citoplasma. La subunidad α es la porción de la enzima que se fosforila mientras que el ATP es hidrolizado. Es la subunidad α la que tiene los centros de unión para el Na^+ y el ATP en la superficie intracelular. Del lado exterior están las uniones para esteroides cardiotónicos, entre ellos la ouabaina, la digitoxina y el potasio.

La Na^+/K^+ - ATPasa con mayor afinidad para la ouabaina contiene la subunidad α_3 , la de afinidad intermedia contiene la subunidad α_2 y la de muy baja afinidad, es la que contiene la subunidad α_1 .

En la actualidad se considera que las neuronas expresan las tres isoformas en varias combinaciones y que la glía expresa principalmente las isoformas α_1 y α_2 .

La subunidad β es una glucoproteína y su función es el reparto y una inserción apropiada de la subunidad α en la membrana (McDonough et al., 1990), y puede ser una subunidad reguladora (Geering, 2001).

El peso molecular de la Na^+/K^+ ATPasa solubilizada es de 380 kDa . la proporción de las subunidades α/β es 1:1 y constituyen un tetrámero α_2/β_2 con los lípidos y carbohidratos de la membrana celular unidos a la enzima, el peso molecular de la holoenzima es aproximadamente de 440kDa.

El mecanismo empleado por el sistema enzimático de la bomba de sodio y potasio se muestra en la figura 13: comienza con la unión de 3 iones de Na^+ a la subunidad α (1), seguida por la fosforilación de la subunidad α por el ATP (2) induciendo un cambio conformacional quedando el Na^+ expuesto hacia el espacio extracelular (3). En esta conformación el K^+ se une al sitio extracelular de la enzima (4) por desfosforilación se recupera la conformación original, estado en el cual el K^+ queda expuesto hacia el citoplasma y disminuyendo su afinidad por la bomba de sodio y potasio, lo cual provoca su liberación hacia el interior de la célula reiniciado nuevamente el ciclo.

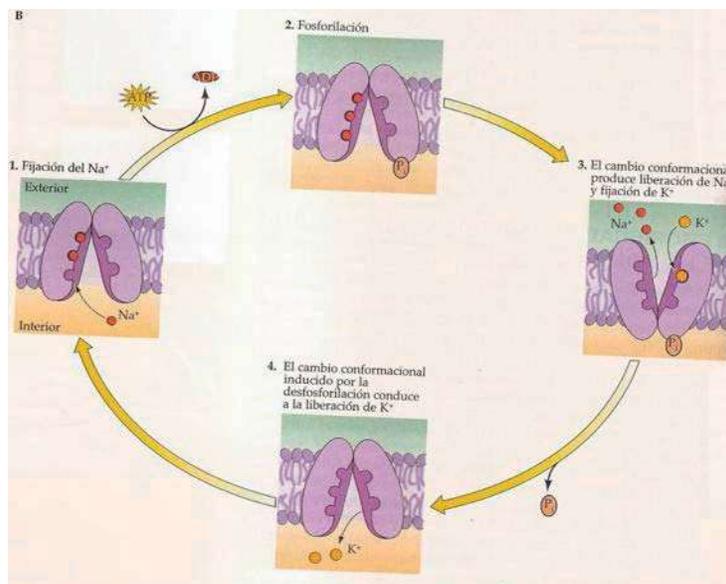
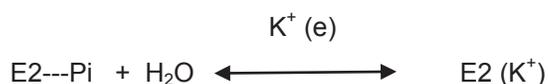


Fig. 13. Modelo esquemático del mecanismo de acción de la bomba de sodio y potasio (Tomada de: Invitación a la neurociencia, Purves, Augustine, Fitzpatrick, Katz, LaMantia, McNamara, Ed. Panamericana, pag. 90)

Las reacciones bioquímicas están involucradas en el transporte de sodio y potasio por la Na⁺ y K⁺ - ATPasa son las siguientes:



La transición al estado abierto al exterior, que permite la liberación de Na⁺ y la captura de K⁺, se produce tras la fosforilación de la subunidad α y la liberación del ADP.

El estado abierto al exterior tiene una afinidad elevada por los cardiotónicos como la digitoxina y la ouabaina. Los cardiotónicos inhiben la bomba cuando está abierta al exterior.

Se ha aislado fracciones membranales gliales y/ o neuronales por el método de Rose, encontrándose que la actividad de la Na^+/K^+ ATPasa es mayor en las células gliales que en las neuronales (Caudillo, 2005; Celis, 2005).

3.10.- Na^+/K^+ ATPasa y SISTEMA SEROTONINERGICO.

Se ha propuesto que la bomba de Na^+/K^+ ATPasa es regulada por factores extrínsecos tales como neurotransmisores, el más estudiado la norepinefrina (NE) y posteriormente la serotonina (5HT).

Experimentos in vivo con la administración de precursores de serotonina (L-Trp y 5HTTP) y agonistas serotoninérgicos se ha observado la estimulación de la actividad de la enzima en diferentes regiones cerebrales (Hernández, 1987). Además se ha visto la respuesta de la Na^+/K^+ ATPasa inducida por agonistas serotoninérgicos esta actividad se neutraliza con la administración de antagonistas serotoninérgicos (Caudillo 2005; Celis 2005) sugiriendo una interacción funcional entre el sistema serotoninérgico y la bomba de sodio y potasio, en donde existe evidencia farmacológica de un sistema de receptores específicos que participan en la activación de la Na^+/K^+ ATPasa por serotonina.

Mercado y Hernández (1992) demostraron que existe una modificación de la cinética de la enzima inducida por la 5-HT con un incremento significativo en la V_{max} en la cinética contra ATP y K^+ en homogeneizados y fracciones membranales de corteza cerebral.

Por otro lado los resultados de Chávez en el 2003 confirman la participación del receptor 5-HT_2 en la estimulación de la Na^+/K^+ -ATPasa con α -metil (agonista específico para el receptor 5-HT_2) y al utilizar antagonistas del receptor 5-HT_2 observó en forma preliminar un efecto inhibitorio sobre la actividad de la enzima.

Hasta ahora es clara la relación entre la Na^+/K^+ -ATPasa y la serotonina en el cerebro adulto, sin embargo el mecanismo de la interacción entre los dos sistemas no se conoce, pero puede ser por alguno de los siguientes:

- ∞ Interacción del neurotransmisor con receptores serotoninérgicos específicos de la membrana de la célula blanco, cambiando la permeabilidad al sodio y al potasio, o bien alterando la conformación de la enzima.

- ∞ Por interacción directa del neurotransmisor con un sitio específico de la molécula de la Na^+/K^+ ATPasa.
- ∞ Por aumentar el número de moléculas de ATPasa disponible, en experimento crónicos.

3.11.-ALTERACION EN LA Na^+,K^+ ATPasa EN DIABETES MELLITUS

La diabetes mellitus (DM), es un enfermedad crónico-degenerativa que se caracteriza por un aumento en las concentraciones de glucosa en sangre, por un déficit absoluto o relativo de insulina, y por alteraciones en los metabolismos de los carbohidratos, proteínas y lípidos. (ADA; 2007).

La American Diabetes Association (ADA) con la Organización Mundial de la Salud (OMS) clasificaron la diabetes en:

- ∞ Tipo I. conocida como diabetes insulino-dependiente (DM1).
- ∞ Tipo II. Conocida como no insulino- dependiente (DM2)

La diabetes mellitus está asociada a complicaciones que llegan a ser un problema de salud pública. Las altas concentraciones de glucosa en la sangre a lo largo de muchos años pueden dañar los vasos sanguíneos que llevan oxígeno a algunos nervios. Los nervios dañados pueden dejar de enviar mensajes, pueden enviar mensajes muy lentamente o cuando no es debido. La neuropatía diabética es el término médico para referirse a los daños en el sistema nervioso causados por la diabetes.

La fisiopatología de la diabetes mellitus es multifactorial se ha observado tanto alteraciones en la estructura, organización y funciones proteicas en membranas de células y tejidos (ej. Retina, glomérulo, eritrocitos, nervios) culminando en complicaciones diabéticas como es retinopatía, nefropatía y neuropatía periférica (Carneiro et al., 2004; Naka et al., 1995).

La hiperglicemia es la causa inicial del daño a tejidos, así como las determinantes genéticas a la susceptibilidad individual de dichos daños. El deterioro de los tejidos por hiperglicemia se presenta en subgrupos de tipos específicos de células como: células endoteliales de retina, células mesangiales del glomérulo renal, en neuronas y nervios periféricos.

La neuropatía ha sido caracterizada en ratas diabéticas inducidas con estreptozotocina (STZ), (DM).Este modelo experimental de DM presenta en general la misma patología, alteraciones

“Efecto de la serotonina sobre la actividad de la bomba de sodio y potasio en corteza cerebral de ratas con DM1”

funcionales y bioquímicas presentes en humanos diabéticos (Dyck et al. 1988; Biessels et al., 1999). Con relación a la actividad de la Na^+/K^+ -ATPasa se ha reportado disminución gradual en la actividad de la enzima, una reducción en la velocidad de conducción de los nervios periféricos debido a degeneración axonal y a la desmielinización paranodal (Sugimoto et al., 2000).

Recientes estudios sugieren que la depresión de la actividad de la Na^+/K^+ ATPasa, en la membrana plasmática es un sello distintivo de la neuropatía diabética (Loenillem et al., 2007).

Das y col. (1976) describieron por primera vez una disminución de esta actividad enzimática en el nervio ciático de ratas diabéticas (Das et al., 1976). Existen diversos mecanismos que se han propuesto para explicar la disminución en la actividad de la Na^+/K^+ -ATPasa: un agotamiento de la concentración del mio-inositol intracelular, un aumento del flujo a través de la vía aldosa reductasa, y una alteración en la actividad de la proteína cinasa C (PKC) (Greene et al., 1987).

Otros cambios metabólicos pueden también disminuir la actividad enzimática, un aumento en el proceso de glicosilación no enzimática, un incremento en el estrés oxidativo. Así mismo, la disminución de la actividad de la bomba de sodio y potasio se asocia con un incremento de la inactivación de los canales de sodio y una acumulación de sodio intra-axonal en el nodo, lo que resulta en una inflamación paranodal (Sima and Sugimoto, 1999).

A nivel periférico está bien documentado que en la DM existe una disminución de la actividad de la bomba de sodio y potasio, a nivel central no es claro si también se presentan cambios en la actividad de este sistema de transporte y si existe un efecto específico celular, es decir, si se presenta en la bomba de sodio y potasio glial, en la neuronal o en ambos tipos celulares. Por otro lado la 5-HT incrementa la actividad de la bomba de sodio y potasio, no se conoce si este efecto se presenta en la actividad de la enzima en ratas con DM1 por lo que proponemos la siguiente:

4.-HIPOTESIS.

EN LA DM1 DISMINUYE LA ACTIVIDAD DE LA BOMBA DE SODIO Y POTASIO A NIVEL DEL SNC.

5.-OBJETIVOS

5.1.-OBJETIVO GENERAL.

Determinar el efecto de la DM1 experimental sobre la actividad de la Na^+/K^+ -ATPasa y su interacción con la serotonina en la corteza cerebral de ratas con DM1.

5.2.-OBJETIVOS ESPECIFICOS

1. Inducir DM1 experimental en ratas macho adultas.
2. Aislar fracciones enriquecidas de membranas gliales y neuronales de corteza cerebral de ratas macho adultas con DM1.
3. Determinar la actividad de la Na^+/K^+ -ATPasa en homogeneizado, membranas gliales y neuronales de corteza cerebral de ratas macho con DM1.
4. Determinar el efecto de la 5-HT sobre la actividad de la Na^+/K^+ -ATPasa en homogeneizado, membranas gliales y neuronales de corteza cerebral de de ratas con DM1.
5. Determinar el efecto de antagonistas serotoninérgicos de los receptores 5-HT_2 sobre la actividad de la Na^+/K^+ -ATPasa.

6.-MATERIAL Y METODOS

6.1 ANIMALES

Se utilizaron ratas macho adultas de la cepa Wistar Porton de $280g \pm 20g$ de peso corporal. Se mantuvieron bajo condiciones ambientales controladas de ciclos de luz-oscuridad de 12 hrs. cada uno, humedad relativa del 80% y temperatura de $20-25^{\circ}C$. Se sometieron a un régimen nutricional *ad libitum* tanto de agua como de alimento purina Chow. En el bioterio local de la Facultad de Químico Farmacobiología.



Fig. 14 Anaqueles del bioterio de la Facultad de Químico Farmacobiología

6.2.-INDUCCION DE DIABETES MELLITUS

Se utilizaron ratas macho adultas de la cepa Wistar de $280 \pm 20g$ de peso corporal, a las cuales se les administraron 55 mg/kg vía intraperitoneal de estreptozotocina (STZ) (Sigma/Aldrich) disuelta en solución buffer de citratos, a otro grupo de ratas se les administro solución buffer de citratos. A los dos días después de la administración de STZ se les determinó la concentración de glucosa mediante toma de muestra de la vena caudal y con el sistema de automedición de glucosa en sangre ONETOUCH Ultra. Las ratas con concentración mayor a 200 mg/dl se tomaron como ratas con DM1, la determinación de glucosa en sangre se realizo cada semana. A las tres semanas las ratas se sacrificaron y se obtuvieron los tejidos. (Juárez, 2008).



Fig. 15 Inducción de DM en ratas macho adultas

6.3.-PREPARACION DE LOS HOMOGENEIZADOS DE CORTEZA:

Los animales fueron sacrificados entre las 9:00 am y las 10:00 am por desnucación cervical, se les practicó incisión media torácica con el objeto de exponer el corazón, en seguida se seccionó la vena cava inferior y se realizó una infusión intracardiaca a nivel del ventrículo izquierdo con 20 ml de solución salina isotónica fría al 0.9% (p/v), para perfundir el cerebro y remover la sangre del mismo (Fig. 16). Las ratas se decapitaron y de inmediato se extrajo el cerebro, se colocó sobre una placa de hielo y se disecó la corteza cerebral (Fig. 17), la cual se homogeneizó en 10 volúmenes de una solución amortiguadora de Tris-HCl 50 Mm a pH = 7.4, con 10 pasos a 700 rpm en un homogeneizador Thomas de émbolo de teflón de 0.25mm de tolerancia en su diámetro.

Posteriormente se realizó la determinación de proteínas por el método de Lowry et al. (1962).



Fig. 16 Perforación del cerebro con solución isotónica.



Fig. 17 Corteza cerebral disecada

6.4.-OBTENCION DE FRACCIONES ENRIQUECIDAS DE MEMBRANAS GLIALES Y NEURONALES.

Se utilizó el método descrito por Rose. Se disecó la corteza cerebral de 6 ratas macho adultas, las cuales al ser finamente cortadas fueron recibidas en una solución que contenía Ficoll al 10% en una solución amortiguadora de fosfatos a pH = 7.4 (Fig. 18). Para después pasarlas a través de una malla de nylon de 110 μ m de poro y después a través de una de 48 μ m. Se homogeneizó el filtrado manualmente 3 veces, la suspensión resultante se colocó en una solución de sacarosa 1.45M y Ficoll al 30% en ese orden de densidad, se colocan 4 mL de cada solución (Fig. 19).

Se centrifugó a 39,000 rpm por 45 minutos a 4°C (Fig. 20). Se obtuvieron cuatro fracciones de las cuales la interface de Ficoll 10-30% correspondió a la fracción glial y la interface Ficoll 30%-sacarosa a la fracción neuronal (Fig. 21).

Se colectaron las bandas y se diluyeron 10 veces en solución en Tris-HCl 50 mM a pH = 7.4. Se centrifugaron a 9000 rpm por 10 minutos a 4°C y luego se suspendieron las membranas celulares con 1 mL de Tris-HCl 50 mM, y finalmente se guardaron las membranas celulares en refrigeración (Fig. 22).



Fig. 18 Corteza en Ficoll y sol. amortiguadora



Fig. 19 Corteza en Ficoll y sacarosa



Fig. 20 Ultracentrífuga



Fig. 21 Bandas de membranas gliales y neuronales



Fig. 22 Membranas gliales y neuronales aisladas

6.5.-DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD ESPECIFICA DE LA Na⁺/K⁺ ATPasa.

La actividad de la Na⁺/K⁺ ATPasa se determinó por el método utilizado por Mercado y Hernández (1992). En alícuotas de 25 µL equivalentes a 50 µg de proteína del homogenizado o de las fracciones enriquecidas con membranas gliales o neuronales se incubaron en un medio que contenía (en mM): Tris-HCl 50 pH = 7.4, Mg₂Cl 6mM, KCl 15mM, NaCl 120mM con agua para medir la actividad total o con ouabaína 0.8mM para medir la actividad específica de la bomba de sodio y potasio.

Se incubó el tejido durante 5 minutos en un baño metabólico Dubnoff (Fig. 23) con agitación constante a 37°C y posteriormente se agregaron: serotonina, ritanserina y ciproheptadina. Se adicionó 50µL ATP (adenosin-trifosfato, sal libre de vanadio), pH de 6.5, 3mM a los 25 minutos y finalmente la reacción se detuvo a los 10 minutos adicionando 20 µL de TCA (ácido tricloacético) frío al 50% colocando las muestras en una placa de hielo (Fig. 24) para después centrifugarlas a 3000 rpm durante 10 minutos (Fig. 25). Se tomaron 100 µL del sobrenadante para determinar el Pi liberado a tubos de ensayo que contenían 500µL de solución de sulfato ferroso al 4%, ácido sulfúrico 1.14 N y molibdato de amonio al 1%, se completo el volumen final con 400 µL de agua, los tubos se agitaron vigorosamente y se midió la absorbencia (Fig. 26).

El Pi se determinó espectrofotométricamente a 800 nm a los 10 minutos de iniciada la reacción (Fig. 27), de acuerdo al método de Fiske y Subbarow (1925).

Las lecturas de absorbencia se extrapolaron en una curva patrón de fosfato de potasio que se corrió en cada experimento. La actividad de la Na⁺,K⁺ ATPasa fue calculada como la diferencia entre la actividad medida en presencia de ouabaína y la actividad total.



Fig. 23 Baño metabólico Dubnoff



Fig. 24 Placa de hielo



Fig. 25 Centrifuga



Fig. 26 Tubos al final de la reacción



Fig. 27 Espectrofotómetro

7.-ANALISIS ESTADISTICOS

Se obtuvo la media aritmética y la desviación estándar de los datos experimentales se empleó la “t” de Student para comparar el grupo control y el grupo de ratas con DM1. Se empleó el programa GradPad Prism 3.0 para hacer las gráficas de los resultados.

8.-RESULTADOS

La fig. 28 muestra la actividad específica de la Na⁺/K⁺-ATPasa en preparaciones de homogeneizado de corteza cerebral en el grupo de ratas control y diabético. Se observa una disminución estadísticamente significativa ($p < 0.0001$) en el grupo de ratas diabéticas comparadas con el grupo control, esta disminución corresponde al 23% en la actividad de la Na⁺/K⁺-ATPasa del grupo control.

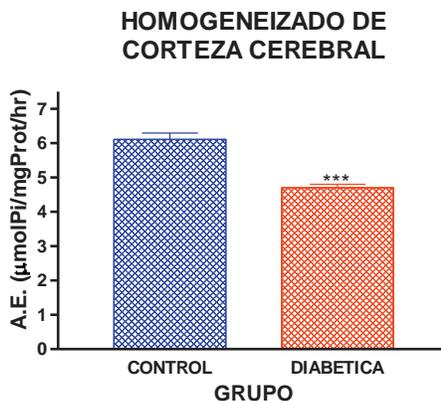


Fig. 28 Actividad Especifica de la bomba de Na⁺ y K⁺ en homogeneizado de corteza cerebral de ratas macho adultas. $X \pm D.E.$ 6 experimentos realizados por triplicado. *** $p < 0.0001$.

Con respecto a la concentración de glucosa en la sangre, las ratas del grupo control presentaron 100 ± 10 mg/dl mientras que las ratas que recibieron STZ presentaron 500 ± 50 mg/dl lo que indica la presencia de hiperglicemia.

La Fig. 29 y 30 muestran la actividad específica de la Na⁺/K⁺ ATPasa en fracciones membranales gliales (fig.29) y/o neuronales (fig.30) de corteza cerebral de ratas control y diabéticas. Se observa una disminución estadísticamente significativa ($p < 0.0002$) de la actividad específica de la Na⁺/K⁺ ATPasa en fracciones membranales gliales (13%) y en las fracciones membranales neuronales (11%).

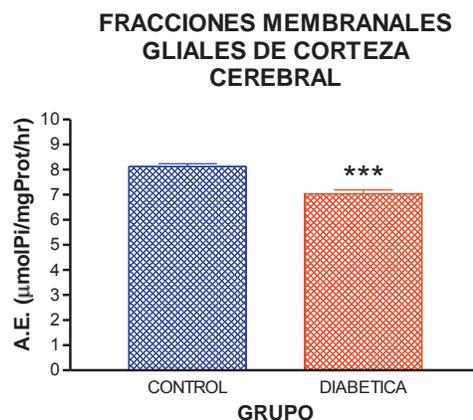


Fig. 29 Actividad Especifica de la bomba de Na⁺ y K⁺ en fracciones membranales gliales aisladas de corteza cerebral de ratas macho adultas. X ± D.E. 6 experimentos realizados por triplicado ***p < 0.0002.

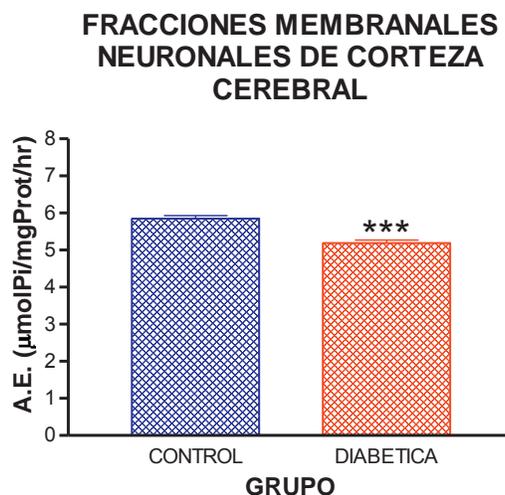


Fig. 30 Actividad Especifica de la bomba de Na⁺ y K⁺ en fracciones membranales neuronales aisladas de corteza cerebral de ratas macho adultas. X ± D.E. 6 experimentos realizados por triplicado *** p < 0.0005.

La Fig. 31 muestra el efecto de la Serotonina sobre la actividad de la Na^+/K^+ -ATPasa en homogeneizado de corteza cerebral de ratas macho adultas controles y diabéticas.

La DE_{50} calculada fue de $7.5820 \cdot 10^{-9}$ M en el grupo control y de $8.8100 \cdot 10^{-9}$ en las ratas diabéticas.

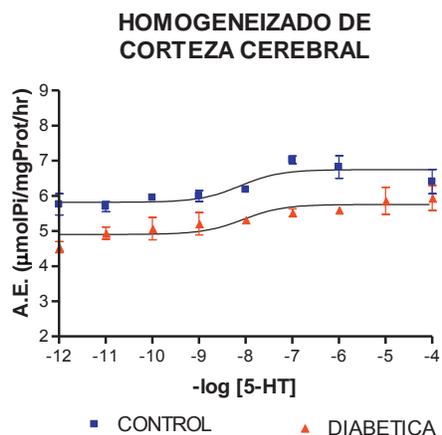


Fig. 31 Curva dosis – respuesta de la 5-HT sobre la actividad de la bomba de sodio y potasio en homogeneizado de cerebelo de ratas. $X \pm \text{D.E}$ de 6 experimentos realizados por triplicado.

La Fig. 32 muestra el porcentaje de estimulación de la Na^+/K^+ -ATPasa por serotonina en homogeneizado de corteza cerebral de ratas. En el grupo control el porcentaje de estimulación máximo fue de 22% mientras que en el grupo de ratas diabéticas el porcentaje de estimulación fue de 31%.

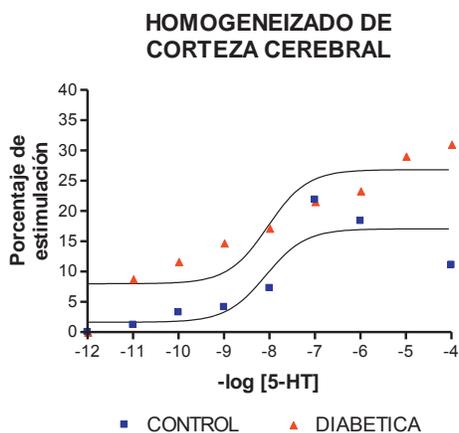


Fig. 32 Porcentaje de estimulación de la Na^+/K^+ ATPasa por serotonina en homogeneizado de corteza cerebral de ratas. $X \pm \text{D.E}$ de 6 experimentos realizados por triplicado.

La Fig. 33 muestra el efecto de la Serotonina sobre la actividad de la Na^+/K^+ -ATPasa en membranas gliales de corteza cerebral de rata. La DE_{50} fue de $1.5670 \cdot 10^{-11}\text{M}$ en el grupo control y de $2.4990 \cdot 10^{-10}\text{M}$ en el grupo diabético.

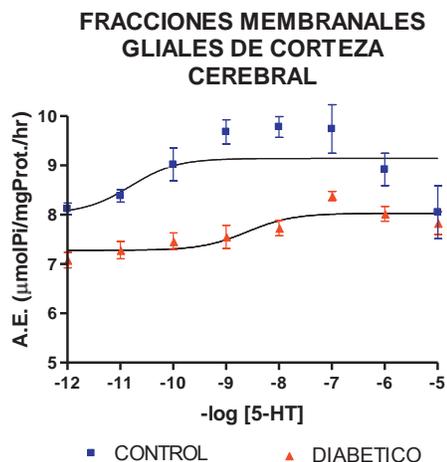


Fig. 33 Efecto de la Serotonina sobre la actividad de la bomba de Na^+ y K^+ -ATPasa en membranas gliales aisladas de cerebelo de rata. $X \pm \text{D.E.}$ de 6 experimentos realizados por triplicado.

La Fig. 34 muestra el porcentaje de estimulación de la actividad de la Na^+/K^+ -ATPasa por 5-HT en membranas gliales de corteza cerebral de rata. El porcentaje máximo de estimulación en grupo control fue de 20% y de 18 % en el grupo diabético.

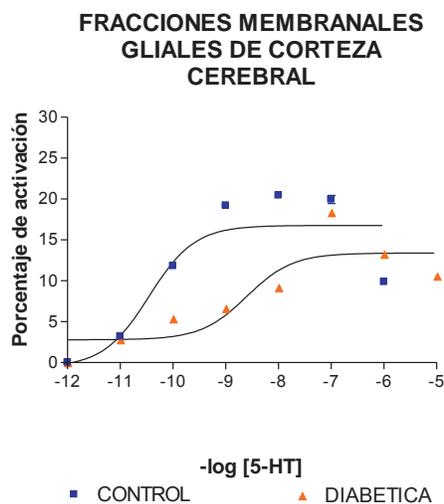


Fig. 34 porcentaje de estimulación de la Na^+/K^+ -ATPasa por 5-HT en fracciones membranales gliales de corteza cerebral de ratas. $X \pm \text{D.E.}$ de 6 experimentos realizados por triplicado.

La Fig. 35 muestra el efecto de la Serotonina sobre la actividad de la Na^+/K^+ ATPasa en membranas neuronales de corteza cerebral de rata macho adulta, donde se puede apreciar que la Serotonina no estimulo la actividad de la enzima en ambos grupos (control y diabética).

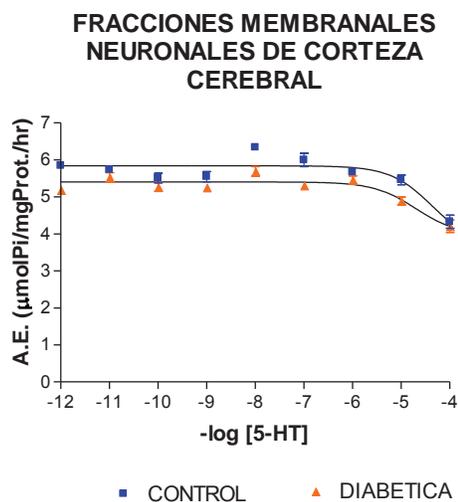


Fig. 35 Efecto de la Serotonina sobre la actividad de la Na^+/K^+ ATPasa en membranas neuronales aisladas de corteza cerebral de rata macho adulta. $X \pm$ de 6 experimentos realizados por triplicado.

La Fig. 36 muestra el porcentaje de inhibición de la actividad de la Na^+/K^+ ATPasa por 5-HT en membranas neuronales de corteza cerebral de rata.

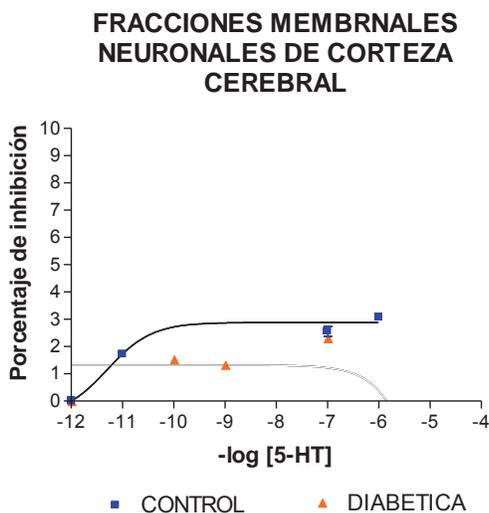


Fig. 36 porcentaje de inhibición de la Na^+/K^+ -ATPasa por 5-HT en fracciones membranales neuronales de corteza cerebral de ratas. $X \pm$ D.E de 6 experimentos realizados por triplicado.

La Fig. 37 muestra el efecto de la Ciproheptadina sobre la actividad de la bomba de sodio y potasio en homogeneizado de corteza cerebral de ratas macho adultas controles y diabéticas. En donde se observa en ambos grupos una disminución en la actividad de la enzima, la Ciproheptadina tuvo un efecto inhibitorio a una concentración de 10^{-10} M en el grupo control y una concentración de 10^{-6} M en el grupo diabético

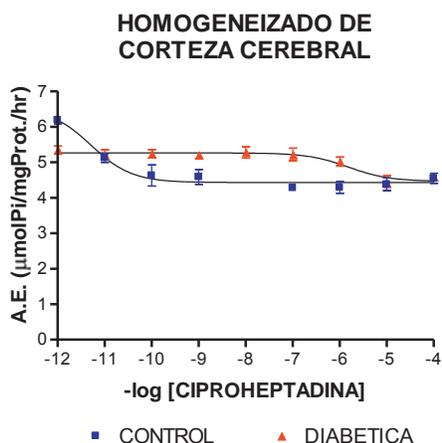


Fig. 37 efecto de la Ciproheptadina sobre la actividad de la Na^+/K^+ ATPasa en corteza cerebral de ratas macho adultas control y diabético. $X \pm D.E.$ de 6 experimentos realizados por triplicado.

La fig. 38 muestra la gráfica con los resultados del porcentaje de inhibición en homogeneizado de corteza cerebral. La DE_{50} $5.1860 \cdot 10^{-12}$ para el grupo control y una DE_{50} $1.5460 \cdot 10^{-6}$ corresponden al grupo diabético.

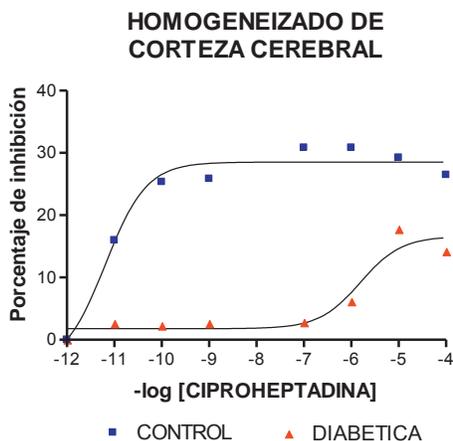


Fig 38 porcentaje de inhibición de la Ciproheptadina sobre la actividad de la bomba de Na^+ y K^+ en homogeneizado de corteza cerebral de ratas macho adultas. $X \pm D.E.$ de 6 experimentos realizados por triplicado.

La Fig. 39 muestra el efecto de la Ciproheptadina sobre la actividad de la bomba de sodio y potasio en membranas gliales de corteza cerebral de ratas macho adultas controles y diabéticas. En donde se observa en ambos grupos una disminución en la actividad de la enzima, la Ciproheptadina tuvo un efecto inhibitorio a una concentración de 10^{-7} M en el grupo diabético y en el grupo control no hubo inhibición.

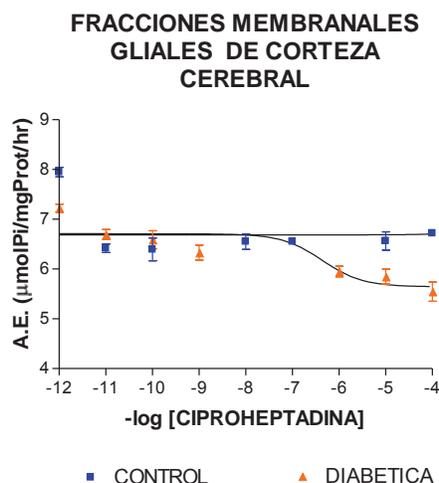


Fig. 39 efecto de la Ciproheptadina sobre la actividad de la Na^+/K^+ ATPasa en membranas gliales de corteza cerebral de ratas macho adultas control y diabético. $X \pm D.E.$ de 6 experimentos realizados por triplicado.

La fig. 40 muestra la gráfica con los resultados del porcentaje de inhibición en membranas gliales de corteza cerebral. La DE_{50} 5.4^{-9} corresponde al grupo diabético, mientras que no hubo en el grupo control, porque no hubo inhibición.

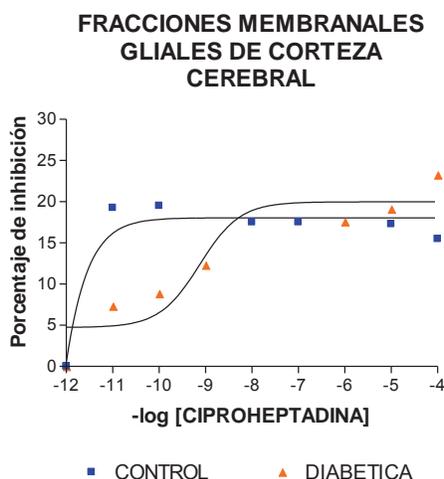


Fig 40 porcentaje de inhibición de la Ciproheptadina sobre la actividad de la bomba de Na^+ y K^+ en membranas gliales de corteza cerebral de ratas macho adultas. $X \pm D.E.$ de 6 experimentos realizados por triplicado.

La Fig. 41 muestra el efecto de la Ciproheptadina sobre la actividad de la bomba de sodio y potasio en membranas neuronales de corteza cerebral de ratas macho adultas controles y diabéticas. En donde se observa en ambos grupos una disminución en la actividad de la enzima, la Ciproheptadina tuvo un efecto inhibitorio a una concentración de 10^{-9} M en el grupo control y de 10^{-5} en el grupo diabético.

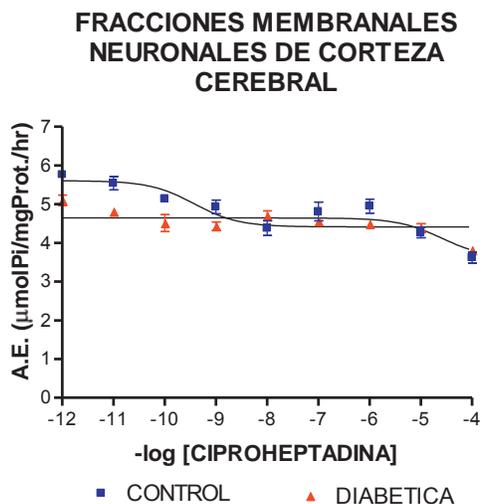


Fig. 41 efecto de la Ciproheptadina sobre la actividad de la Na^+/K^+ ATPasa en membranas neuronales de corteza cerebral de ratas macho adultas control y diabético. $X \pm D.E.$ de 6 experimentos realizados por triplicado.

La fig. 42 muestra la gráfica con los resultados del porcentaje de inhibición en membranas gliales de corteza cerebral. La DE_{50} $3.7980 \cdot 10^{-10}$ para el grupo control y $2.5870 \cdot 10^{-5}$ para el grupo diabético.

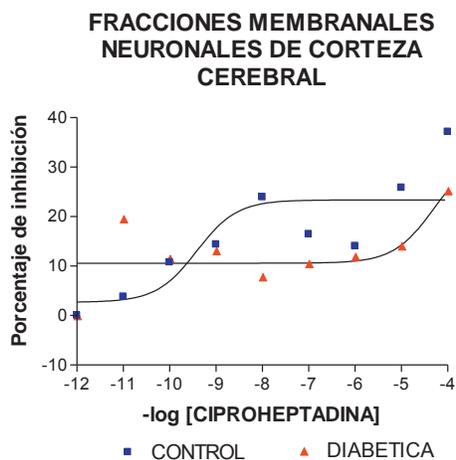


Fig 42 porcentaje de inhibición de la Ciproheptadina sobre la actividad de la bomba de Na^+ y K^+ en membranas neuronales de corteza cerebral de ratas macho adultas. $X \pm D.E.$ de 6 experimentos realizados por triplicado.

La Fig. 43 muestra el efecto de la Ritanserina sobre la actividad de la bomba de sodio y potasio en homogeneizado de corteza cerebral de ratas macho adultas controles y diabéticas. En donde se observa en ambos grupos una disminución en la actividad de la enzima, la Ritanserina tuvo un efecto inhibitorio a una concentración de 10^{-6} M en el grupo control y una concentración de 10^{-10} M en el grupo diabético

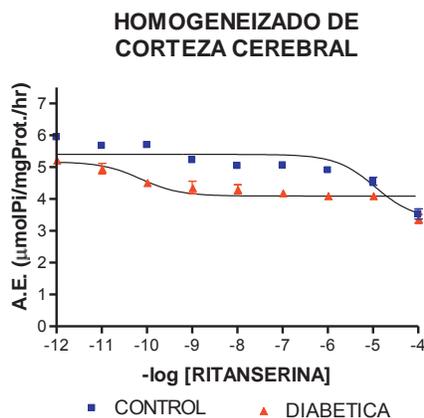


Fig. 43 efecto de la Ritanserina sobre la actividad de la Na^+/K^+ ATPasa en corteza cerebral de ratas macho adultas control y diabético. $X \pm D.E.$ de 6 experimentos realizados por triplicado.

La fig. 44 muestra la gráfica con los resultados del porcentaje de inhibición en homogeneizado de corteza cerebral. La DE_{50} $1.1140 \cdot 10^{-5}$ para el grupo control y una DE_{50} $7.3010 \cdot 10^{-11}$ corresponden al grupo diabético.

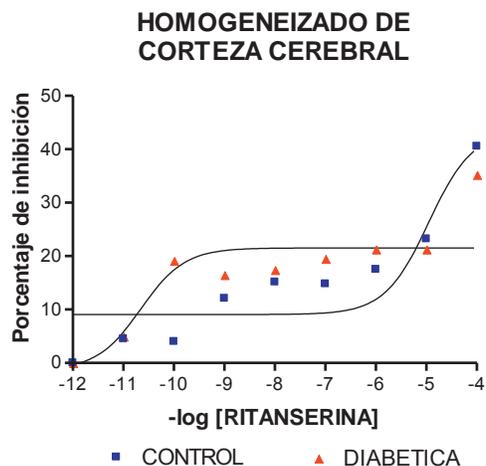


Fig 44 porcentaje de inhibición de la Ritanserina sobre la actividad de la bomba de Na^+ y K^+ en homogeneizado de corteza cerebral de ratas macho adultas. $X \pm D.E.$ de 6 experimentos realizados por triplicado

La Fig. 45 muestra el efecto de la Ritanserina sobre la actividad de la bomba de sodio y potasio en membranas gliales de corteza cerebral de ratas macho adultas controles y diabéticas. En donde se observa en ambos grupos una disminución en la actividad de la enzima, la Ritanserina tuvo un efecto inhibitorio a una concentración de 10^{-6} M en el grupo control y una concentración de 10^{-6} M en el grupo diabético.

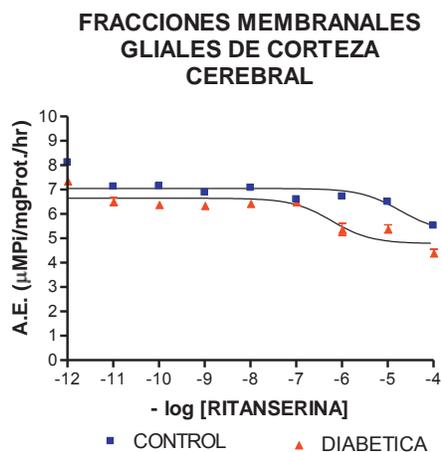


Fig. 45 efecto de la Ritanserina sobre la actividad de la Na^+/K^+ ATPasa en membranas gliales de corteza cerebral de ratas macho adultas control y diabético. $X \pm D.E.$ de 6 experimentos realizados por triplicado.

La fig. 46 muestra la gráfica con los resultados del porcentaje de inhibición en membranas gliales de corteza cerebral. La DE_{50} 1.8490^{-5} para el grupo control y una DE_{50} 5.9990^{-7} corresponden al grupo diabético.

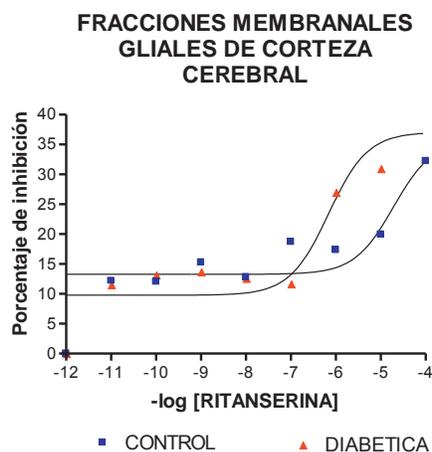


Fig 46 porcentaje de inhibición de la Ritanserina sobre la actividad de la bomba de Na^+ y K^+ en membranas gliales de corteza cerebral de ratas macho adultas. $X \pm D.E.$ de 6 experimentos realizados por triplicado.

La Fig. 47 muestra el efecto de la Ritanserina sobre la actividad de la bomba de sodio y potasio en membranas neuronales de corteza cerebral de ratas macho adultas controles y diabéticas. En donde se observa en ambos grupos una disminución en la actividad de la enzima, la Ritanserina tuvo un efecto inhibitorio a una concentración de 10^{-10} M en el grupo control y una concentración de 10^{-9} M en el grupo diabético.

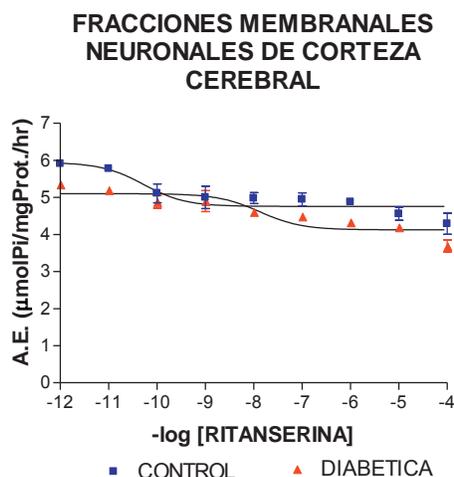


Fig. 47 efecto de la Ritanserina sobre la actividad de la Na^+/K^+ ATPasa en membranas neuronales de corteza cerebral de ratas macho adultas control y diabético. $\bar{X} \pm \text{D.E.}$ de 6 experimentos realizados por triplicado.

La fig. 48 muestra la gráfica con los resultados del porcentaje de inhibición en membranas gliales de corteza cerebral. La DE_{50} 5.2780^{-11} para el grupo control y una DE_{50} 1.3280^{-8} corresponden al grupo diabético.

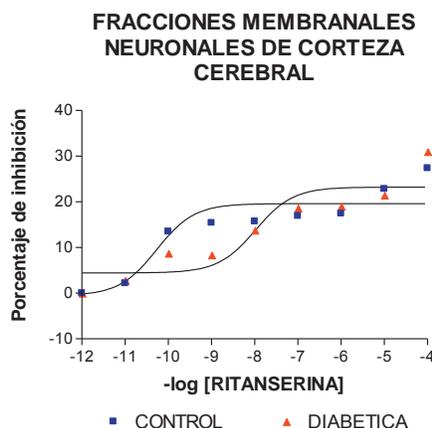


Fig 48 porcentaje de inhibición de la Ritanserina sobre la actividad de la bomba de Na^+ y K^+ en membranas neuronales de corteza cerebral de ratas macho adultas. $\bar{X} \pm \text{D.E.}$ de 6 experimentos realizados por triplicado.

Tabla II. DE₅₀ de agonista y antagonistas 5-HT₂ sobre la actividad de la Bomba de sodio y potasio.

FARMACO	GRUPO					
	CONTROL			DIABÉTICO		
	CORTEZA	GLIA	NEURONA	CORTEZA	GLIA	NEURONA
SEROTONINA	7.5820e-009	1.5670e-011	4.3780e-005	8.8100e-009	2.4990e-010	2.0090e-005
CIPROHEPTADINA	5.1860e-012	Recta	3.7980e-010	1.5460e-006	5.4e-009	2.5870e-005
RITANSERINA	1.1140e-005	1.8490e-005	5.2780e-011	7.3010e-011	5.9990e-007	1.3280e-008

9.-DISCUSIÓN

La presencia de hiperglicemia en ratas administradas con STZ indica que existe una alteración en el metabolismo de la glucosa similar a la observada en pacientes con diabetes, (Alain et al., 1969, Juárez 2008) lo que indica que es un buen método para inducir la DM1.

La actividad basal de la Na^+/K^+ ATPasa en homogeneizado, glía y neurona de corteza cerebral correspondió a las actividades reportadas por Celis (2005), lo que indica que la técnica para determinar la actividad de la enzima fue estandarizada adecuadamente

La actividad de la Na^+/K^+ ATPasa en ratas con DM1 está disminuida en comparación con las ratas control (Das et al., 1976), por lo que existe una alteración de la actividad de la enzima (Sima y Simoto et al., 1999). Se han sugerido varios mecanismos para explicar esta disminución de la actividad de la enzima a nivel periférico: aumento en la vía del poliol, un decremento en la concentración del mionositol, una alteración en la actividad de la proteína cinasa C (PKC) (Green et al., 1987). También se ha propuesto que ésta disminución se relaciona con un incremento en el estrés oxidativo y aumento en la glicosilación no enzimática (GNE). Probablemente la disminución de la enzima Na^+/K^+ ATPasa a nivel central en ratas con DM ocurra por alteraciones del metabolismo de células gliales y/o neuronales como ocurre a nivel periférico.

Como se ha descrito previamente, la 5-HT regula la actividad de la Na^+/K^+ -ATPasa en corteza y cerebelo (Mercado y Hernández et al., 1992, Caudillo, 2005, Celis, 2005), nuestros resultados muestran la estimulación de la Na^+/K^+ ATPasa por serotonina en homogeneizado, fracciones gliales y neuronales de corteza cerebral y cerebelo en grupo control y diabético, una explicación de esto puede ser la interacción de receptores de membrana para la 5-HT, lo cuales están en estrecha asociación con la Na^+/K^+ ATPasa modificando su actividad específica (Hernández et al., 1987). En relación con la activación de la Na^+/K^+ ATPasa por 5-HT es a través de la estimulación de receptores serotoninérgicos.

La actividad de la Na^+/K^+ ATPasa estimulada por 5-HT en ratas con DM1 nunca alcanzó los valores basales de las ratas control, probablemente por las alteraciones en el metabolismo celular de las ratas con DM1 no permite que la Na^+/K^+ ATPasa funcione de manera adecuada. La DM1 presenta una alteración en la síntesis de la 5-HT a nivel central. En datos de estudios recientes se ha reportado que en la DM existe una disminución de la biosíntesis de la 5-HT debido a una alteración de la fracción libre de L-Trp en el plasma y el cerebro con una inhibición de la enzima limitante la Triptofano hidroxilasa 2 (TPH2) (Manjarréz et al., 2000, Herrera et al., 2005, Manjarréz et al., 2006), esto podría explicar la disminución de la Na^+/K^+ ATPasa basal en ratas con DM1.

Se ha reportado también que la hiperglicemia activa mecanismos no dependientes de la insulina para contrarrestar el estrés a la célula, sin embargo, estos cambios intracelulares alteran las concentraciones del NAD, NADPH, del mioinositol, el valor del pH intracelular, el aumento de radicales libres, entre otros, lo cual puede modificar los requerimientos esenciales para que la Na^+/K^+ ATPasa lleve a cabo su función normal.

En nuestros resultados reportamos que en la fracción membranal neuronal no se mostró efecto significativo de la 5-HT, por lo que sugerimos que la Na^+/K^+ ATPasa glial es la que responde a la estimulación por 5-HT en el caso de homogeneizado en el grupo control y diabético.

El efecto del agonista inverso surgió de las observaciones experimentales de que algunas drogas son capaces de reducir la actividad del sistema del receptor que eran activados en ausencia de sus agonistas, ya que los agonistas incrementan la actividad del receptor a esta actividad opuesta o negativa se le conoce como agonismo inverso (Strage et al., 2002). El efecto de la Ciproheptadina antagonista de los receptores 5-HT_2 y 5-HT_{1C} y la Ritanserina antagonista de los receptores 5-HT_{2A} y 5-HT_{2C} sobre la actividad de la Na^+/K^+ ATPasa mostró una inhibición de la enzima. Estos resultados confirman la participación del receptor 5-HT_2 y 5-HT_{1C} en la modulación de la enzima por serotonina en el fenómeno de agonismo inverso.

10.-CONCLUSIONES

- La Bomba de sodio y potasio a nivel de la corteza cerebral disminuye su actividad en la DM1 y la serotonina no revierte la inhibición.
- En la DM1 se presenta el fenómeno de agonismo inverso en la relación serotonina-actividad de la Bomba de sodio y potasio

11.-BIBLIOGRAFIA

Alain S. (1969) Hipertensión, Diabetes mellitus and smoking. 56:111–128. Paris, France.

Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff W., Roberts., K. and Watson J. (1994). Molecular Biology of the cell. Third edition. Garland Publishing Inc. New York & London.

Barnes, N. M. & Sharp, T. (1999) A review of central 5-HT receptors and their function. Neuropharmacology 38:1083-1152

Barr, A.J., and Manning, D.R. (1997) Agonist independent activation of Gz by the 5-H_{1A} receptor co-expressed in Spodoptera frugiperda cells. J.Biol.Chem. 272: 32979-32987.

Bear, M.F., Connors, B.W. and Paradiso, M.A. (2001) Neuroscience: Exploring the Brain. Editorial Lippincott Williams & Wilkins. Capítulo 5:100-102.

Biessels GJ, Cristino NA, Rutten GJ, Hamers FP, Erkelens DW, Gispen WH. (1999). Neurophysiological changes in the central nerves system of streptozotocin-diabetic rats. Brain 122: 757-768.

Blundell, J.E. (1984) Neuropharmacology. 23: 1537-1551.

Bockaert, J., Ansanay, H. , Sebben, M., Waeber, C., Dumius, A., and Fagni, L. (1994) 5-HT₄ Receptors: brain distribution and long-term blockade of K⁺ channels in cultured neurons in: Book of Abstracts of the 5-HT Third Iuphar Meeting on serotonin. Chicago.

Boullosa, O. and López – Mato, A. (1991) Anorexia nerviosa. Differential Diagnosis with other psychiatric. Biol. Pysch. 29: 115- 490.

Boullosa, O. and López-Mato, A.M. (1997) Actualización sobre neurotransmisión serotoninérgica. Rev. Alcmeon. 5:4.

Boullosa, O., López-Mato, A., and Cetkovich-Bakmas, M.(1993) Recientes avances en la configuración de la neurotransmisión serotoninérgica en: Actualización en psiquiatría Biológica. Addendum. Y. Ciprian-Ollivier, J. Compilador. Editorial Toquito. Asociación Argentina de Psiquiatría Biológica. Argentina. 10-30.

Braestrup, C., Schmiechen, R., Neef, G., Nielsen, M. and Petersen, E.N. (1982) Interaction of convulsive ligands with benzodiazepine receptors. *Science*. Cap. 216: 1241-1243.

Burns, C. M., Chu, H., Ruter, S. M., Hutchinson, L.K., Canton, H., Sanders-Bush, E., and Emerson, R.B. (1997) Regulation of serotonin-2C receptor G-protein coupling by RNA editing. *Nature*, 387:303-308.

Carneiro AV: (2004) Coronary Heart disease in diabetes mellitus: risk factors and epidemiology. *Rev Port Cardiol*. 23:1359-1366.

Cases, O., Seif, I., Grimsby, J., et al. (1995). Aggressive behavior and altered amounts of brain serotonin and norepinephrine in mice lacking MAO A. *Science*, 268:1736-1766.

Caudillo, N. Me., (2005) Efecto de antagonistas 5-HT₂ sobre la actividad de la bomba de sodio y potasio en cerebelo de ratas macho. Tesis de Licenciatura. Facultad de Químico Farmacobiología. U.M.S.N.H., Morelia Michoacán, México.

Celis, N. K., (2005) Los antagonistas de los receptores 5-HT₂ tienen efecto de agonismo inverso sobre la actividad de la bomba de sodio y potasio. Tesis de Licenciatura. Facultad de Químico Farmacobiología. U.M.S.N.H., Morelia Michoacán, México

Chávez, B.J.(2003) Efecto del α -metil y sus antagonistas en la actividad de la bomba de sodio y potasio en la corteza cerebral de la rata: caracterización farmacológica. Tesis de licenciatura. Escuela de Químico Farmacobiología. U.M.S.N.H. Morelia, México.

Chidiac, P. et al. (1994) Inverse agonist activity of α -adrenergic agonist. *Mol. Pharmacol*. 45: 490-499.

Church, M. K. (2004) Histamine receptors, inverse agonism and allergy. *Rev. Allergy Clin Immunol Int*. 16:1126.

Clinke, G., and Digovic, C. (1992) Pharmacological modulation of the serotonergic system: and overview of the effects on normal and pathological. International Symposium on serotonin. *Giovani Lorenzini Medical Foundation*. Houston.

Colas, J.F., Launary, J.M. Vonesch, J.L., Hickel, P. And Maroteaux, L. (1999) Serotonin synchronise convergent extension of ectoderm with morphogenetic gastrulation movements in *Drosophila*. *Mech. Dev* 87:77-91.

Costa, T. and Herz, A. (1989) Antagonist with negative intrinsic activity at delta opioid receptors coupled tom GTP-binding proteins. *Proc.Natl.Acad.Sci. E.U.A.* 86: 7321-7325.

Cox, D.A., Cohen, M.L. (1996) 5-HT_{2B} receptor signaling in the rat stomach fundus: Dependence on calcuim influx, calcium release and protein kinase C. *Behav. Brain Res* 73:289-292.

Daeffler, L., and Landry, Y. (2000) Inverse agonism at heptahelical receptors: concept, experimental approach and therapeutic potential. *Fudam. Clin. Pharmacol. Cap.* 14: 73-87.

Das, P. K., Bray, G.M., Aguayo, A. J., and Rasminsky, M. (1976) Dismished ouabain-sensitive, sodium-potassium ATPase activity nerves sciatic of rats with streptocin-induced diabetes. *Exp. Neurol.*, 53: 285-288.

Das, P.K., Bray, G.M., Aguayo, A.J., and Rasminsky, M. (1976). Disminished ouabain-sensitive, sodium-potassium ATPase activityin nerves sciatic of ratas with streptozotocin-induced diabetes. *Exp. Neurol.*, 53:285-288

De Boer, A.G., Van der Sandt, I.C, and Gaillard, P.J. (2003). The role of Drug Transporters at the Blood- Brain Barrier. *Sociedad Iberoamerican de Información Científica*.

De Ligt, R.A.F. et al (2000) Inverse agonism at G protein coupled receptors: (patho)physiological relevance and implications for drug discovery. *Br. J. Pharmacol.* 130: 1-12.

Del Castillo, J., and Katz, B. (1957) Interaction at end-plate receptors between differennr choline derivatives. *Proc.Roy.Soc.Lond.B.* 146:369-381.

Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. American Diabetes Association. *Diabetes Care*, Vol. 30, Supplement 1, January 2007

Donetti, A. et al (1994) Binding of (³H) – GR 113808 to 5-HT₄ receptors in human frontal cortex. In: *Book of abstracts of the 5-HT third luphar meetinhg on serotonin.* 84. Chicago.

Dumuis A., Bouhelal R., Sebben M., and Bockaert J. (1988). A 5-HT receptor in the central nervous system positively coupled with adenylyl cyclase, is antagonized by IC S 205-930. *Eur. J. Pharmacol.* 146: 187-195.

Dyck PJ, Zimmerman BR, VilenTH, Minnerath SR, Karnes JL, Yao JK, Poduslo JF. (1988). Nerve glucosa, fructose, sorbitol, myo-inositol, and fiber degeneration and regeneration in diabetic neuropathy. *N Engl J Med* 319:542-548.

Feraille, E. & Doucet, A. (2001) Hormonal control of Na⁺/K⁺-ATPase dependent sodium transport in the kidney. *Physiol. Rev.* 81:395-418.

Fiske, C. and Subbarow, Y. (1925) The colorimetric determination of phosphorus. *J. Biol. Chem.* 66: 375-400.

Furchgott, R.F., and Vanhoutte, P.M., (1989). Endothelium-derived relaxing and contracting factors. *FSDEBJ*: 3:2007-2018

Geering, K. (2001) the functional role of beta subunits in oligomeric P-type ATPase. *J. Bioenerg. Biomembr.* 33:425-438.

Gershon, M.D., (1991) serotonin, its role and receptor in enteric neurotransmission. *Ad. Exper. Med. Biol.*, 294: 221-230.

Grahme-Smith, D.G. (1964) Tryptophan hydroxylation in brain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* Cap.16:586-92.

Greene, D. A., Lattimer, S. A., and Sima, A. A. (1987). Sorbitol, Phosphoinositides, and sodium-potassium-ATPase in the pathogenesis of diabetic complications. *N. Engl. J. Med.* 316: 599-606.

Hall, D.A., and Strange, P.C. (1997) Evidence that antipsychotic drugs are inverse agonist at D2 dopamine receptors. *Br. J. Pharmacol.* 121: 731-736.

Hernández, R.J. (1987) Na⁺/K⁺ ATPase activity possibly regulated by specific serotonin receptor. *Brain Res.* 408:309-402

Hernández-García, L., Meana, J.J., and Rodríguez-Puertas, R. Inhibición de la fihación basal de [35s] GTPγS ejercida por el agonista inverso del receptor cannabinoide cb1 sr141716a en cerebro humano postmortem. Dpto. Farmacología, Fac. Medicina y odontología, Universidad País Vasco.

Herrera R, Manjarrez G, Hernández J: Inhibition and kinetic changes of brain tryptophan-5-hydroxylase during insulin-dependent diabetes mellitus in the rat. *Nutr. Neurosci* 2005; 8: 57–62

Hoyer, D., Clarke, D.E, and Fozard, J.R. et al (1994) International Union of Pharmacology Classification of receptors for 5-HT (serotonin). *Rev Pharmacol. Cap.* 46:157-203.

Hoyer, D., Clarke, D.E., Forzad, J.R., et al (1994) International union of pharmacology classification of receptors for 5-hydroxytryptamine (serotonin). *Pharmacol. Rev.* 46:157-203.

<http://www.monografias.com/trabajos11/sisne/sisne.shtml>

Jakeman, L., Bonhaus, D., Ramsey, Y., Wong, E., Chan, H., Bach, C., Eglen, R., and Tsou, A. (1993). Characterization and localization of mRNA for a novel serotonin (5-HT) receptor positively coupled to adenylyl cyclase in guinea pig brain. *Soc. Neurosci. Abstr.* 19: 1164-1168

Janowsky, D. (1987) Role of acetylcholine mechanisms in the affective disorders in: *Psychopharmacology*. Meltzer, H. Raven Press .527-534.

Jequier, E., Robinson, D.S., Lovenberg, W., and Sjoerdsma, A. (1969) Further studies on tryptophan hydroxylase in rat brainstem and beef pineal. *Biochem. Pharmacol.* 18: 1071-81.

Juárez, M. B.(2008). Implementación de um modelo experimental de diabetes mellitus tipo 1. Tesis de licenciatura. Escuela de Químico Farmacobiología. U.M.S.N.H. Morelia, México.

Kandel, E. R. Jessell, T.M. and Schwart, J.H. (1997) *Neurociencia y Conducta*. Editorial Prentice Hall. Capítulo 2:28.

Kandel, E. R. , Jessell, T.M. and Schwart, J.H. (1997) *Neurociencia y Conducta*. Editorial. Prentice Hall. Capítulo 2: 23-25.

Kandel, E. R., Jessell, T.M. and Schwart, J.H. (1997) *Neurociencia y Conducta*. Editorial Prentice Hall. Capítulo 2: 51-53.

Kaumann, A., Lynham, J., and Sanders, L. (1994) Peripheral 5-HT receptors posively coupled to adenylyl cyclasa in: *Book of Abstracts of the 5-HT. Third Meeting on serotonin*. Chicago

“Efecto de la serotonina sobre la actividad de la bomba de sodio y potasio en corteza cerebral de ratas con DM1”

Kenakin, T. (2001) Inverse, protean and ligand-selective agonism: matters of receptor conformation. *FASEB J.* 15: 598-611.

Lauder, J.M. Wallace, J.A. and Krebs, H. (1981) Poles of serotonin in neuroembryogenesis. *Aav. Exp. Med.Biol* 133: 477-506.

Lehkuneic, E., and López-Mato, A. (1992) Uso de recaptadores serotoninérgicos en el tratamiento del insomnio. Laboratorio de Neurofisiología. Hospital universitario José de San Martín. Universidad de Buenos Aires. 110-120.

Lehkuniec, E., and López-Mato, A. (1988) Transtornos del sueño y la vigilia. En *Psiquiatría Biológica. Fundamentos y aplicación clínica.* J. Ciprian-Olliver. Científica interamericana. 149-159.

Leonelli E, Bianchi R, Cavaletti G, Caruso D, Crippa D, Garcia-Segura LM, Lauria G, Magnaghi V, Roglio I, Melcagi RC. (2007). Pregesterone and its derivatives are neuroprotective agents in experimental diabetic neuropathy; A multimodal analysis. *Neuroscience* 144:1293-1304.

Leurs, R. et al (1998) Agonist independent regulation of constitutively active G protein coupled receptors. *TRENDS Biochem. Sci.* 23: 418- 422.

Lovenberg, W., Jequier, E., and Sjoerdsma, A. (1967) Tryptophan hydroxylation: measurement in pineal gland, brainstem, and carcinoid tumor. *Science.* 155:217-9.

Lowry, O., Rosebrough, N, Farr, A. and Randall, R. (1951) Protein measured with the Folin phenol of reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.

Manjarrez G, Herrera R, Leon M, Hernández J: A low brain serotonergic neurotransmission in children with type 1 diabetes detected through the intensity dependence of auditory evoked potentials. *Diabetes Care* 2006; 29: 73–77

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 Clín* 2000; 52: 509–516.

Mathews, C.K., Van Holde, K.E. and Ahren, K.G. (2003) *Bioquímica.* Capítulo 12: 875-877.

McDonough, A.A., Greering, K., and Farley, R.A.(1990) The sodium pump needs its beta subunit. *FASEB J.*, 4:1598-1605.

“Efecto de la serotonina sobre la actividad de la bomba de sodio y potasio en corteza cerebral de ratas con DM1”

McGeer, L. P., Eccles, J. S. and McGeer, E. G. (1987). Molecular Neurobiology of the Mammalian brain. Plenum Press. New York and London 774 p.

McMenamy, R.H., and Oncley, J.L. (1975) The specific binding of L-Tryptophan to serum albumin. J. Biol. Chem. 233:1436-1447.

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.

Mercado, R. and Hernández, R. (1992) Regulatory role of a neurotransmitter (5-HT) on glial Na⁺/K⁺ ATPase in the rat brain. Neurochem. Int. Vol.21. No. 1 119-127

Mercado, R. and Hernández, R. (1992) Regulatory role of a neurotransmitter (5-HT) on glial Na⁺/K⁺ ATPase in the rat brain. Neurochem. Int. Vol.21. No. 1 119-127.

Milligan, G., and Bond, R.A. (1997) Inverse agonism and the regulation of receptor number. TRENDS Pharmacol.Sci. 18: 468-474.

Molliver, M. E. (1987) Serotonergic neuronal systems: What their anatomic organization tells us about function. J. clin. Psychopharmacol 7:3s-23s.

Naka k, Sasaki H, Kishi Y, Furuta M, Sanke T, Nanjo K, Mucoyama M (1995) Effects of cilostazol on development of experimental diabetic neuropathy: functional and structural studies, and Na⁺-K⁺-ATPase activity in peripheral nerve in rats with streptozotocin-induced diabetes. Diabetes Res Clin Pract.30:153-162.

Nelson, N. and Lill, H. (1994) Porters and neurotransmitter transporters. J. Exp. Biol. 196: 213-228

Pacheco, M.A., Pastor, T.E., and Wecker, L. (2003) Phosphorylation of the α_4 -subunit of human α_4 - α_2

Nicotinic receptors: role of the cAMP-dependent protein kinase A (PKA) and protein kinase C (PKC). Mol. Brain. Res. 114:65-72.

Pauwels, P.J. et al (200) Facilitation of constitutive α_{2A} adrenoceptor activity by both single amino acid mutations (Thr³⁷³Lys) and G protein. J.Pharmacol.Exp.Ther. Cap. 292: 654-663.

Peña, R.M.T. (1999) Caracterización del receptor que participa en la regulación por serotonina de la Na⁺ / K⁺ ATPasa cerebral. Tesis de maestría en ciencias. Neurobiología. U.N.A.M. México

Peroutka, S (1994). 5-Hydroxytryptamine receptors. In Handbook of Receptors and Channels. G Protein-coupled receptors. Ed. Stephen J. Peroutka. CRC Press London. 335 p.

Potiou, P., and Boulu, R. (1977) Phychofarmacologie du tryptophane. Path Biol. 25:565.

Rapport, M.M., Green, A.A., and Page, I.H.(1948) Serum vasoconstrictor (serotonin). IV . Isolation and characterization. J. Biol.Chem., 176:1246-1251.

Richerson, G. B. (2004) Serotonergic neurons as carbon dioxide sensors that maintain pH homeostasis. Nat. Rev. Neurosci. 5:449-461.

Rose, S. (1967) Preparation of enriched fraction from cerebral cortex containing isolated, metabolically active neuronal and glial cells. Biochem. J. 102: 33-43.

Rossier, O. et al (1999) Inverse agonism and neutral antagonism at α_{1b} and α_{1b} adrenergic receptor subtypes. Mol.Pharmacol. 56: 858-866.

Sanders-Bush, E. (1988). The Serotonin receptors. The Human Press Clifton, New Jersey. 338 p.

Segal, M. (1981) The action of serotonin in the rat hippocampus. Adv. Exptl. Med. Biol. 133: 375-390.

Sexena, P. R., and Villalón, C.M: (1990) cardiovascular effects of serotonin agonists and antagonists. J. Cardiovasc. Pharmacol. 15:S17-S34.

Shih, J., C. (1991) Molecular Basis of human MAO A and B. Neuropsychopharmacology, 4:1-3.

Sickich, L. Hickok, J.M. and Todd, R.D. (1990) 5-HT1 Amreceptors control neurite branching during development. Brain Res.56:269-274.

Siegel G., Agranoff B., Albers R. and Molinoff P. (1989). Basic Neurochemistry. Fourth ed. Raven Press New York N. Y. 984 p.

Siegelbaum, S.A., Camardo, J.S., and Kandel, E.R., (1982). Serotonin and cyclic AMP close single K⁺ channels in Aplysia sensory neurones. *Nature* 299: 413-417.

Sima, A. A., and Sigimoto, K. (1999) Experimental diabetic neuropathy: An update. *Diabetologia*, 42:773-3788.

Smith, M.J. et al (1996) Inverse agonism of histamine, H2 antagonist accounts for up-regulation of spontaneously active histamine H2 receptors. *Proc.Natl.Acad.SciCap.* 93: 6802-6807.

Steinbush, H.W., Verhofstad, A.A., and Joosten, H.W. (1978). Localization of serotonin in the central nervous system by immunohistochemistry: description of a specific and sensitive technique and some applications. *Neurosc.* 3:811-819.

Strange, P.G. (2002) Mechanism of inverse agonism at G-Protein-coupled receptors. *TRENDS in pharmacological Sciences.* Elsevier Science. Vol.23 No.2.

Sugimoto K, Murakaw Y, Sima AA. (2000). Diabetic neuropath: a continuing enigma. *Diabetes Metab.* 16: 408-433.

Taglimonte, A., Biggio, G., Varigin, L., and Gessa, GL. (1973). Free tryptophan in serum controls brain tryptophan level and serotonin synthesis. *Life Sci.* 12(6): 277-87.

Tejero, A., Aguilar, E. and Schiafini, O et al (1985) Procesos de maduración sexual en Neuroendocrinología. Aspectos básicos y clínicos. Ed. O. Schiafini. Salvat. 279-295.

Thomas M. Devlin. (2000) *Bioquímica.* Editorial Reverté, S.A. tercera edición. 5:206-208, 22:923-927.

Tork, I. (1990). Anatomy of the serotonergic system. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 600:9-34.

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. and Asnis, G.M., et al. (1987) *Journal Affect Disord.* 13: 1-8.

Van Praag, H.M., Plutchik, R., and Conte, H. (1986) The serotonin hypothesis of (Auto) Aggression critical appraisal of the evidence. *Psychobiology of suicidal Behavior.* 150-167.

Villie, C.A. (1997) *Biología.* Editorial Interamericana. Séptima Edición. Capítulo 23: 418

Vinay, L., Brocard, F., Clarac, F., Norreel, J. C., Pearlstein, E. & Pflieger, J. F. (2002) Development of posture and locomotion: an interplay of endogenously generated activities and neurotrophic actions by descending pathways Brain Res. Brain Res. Rev. **40**:118-129.

Walther, D.J., Peter, J.U., Bashammakh, S., Hortnagl, H., Voits, M., Fink, H. And Bader, M. (2003) Synthesis of serotonin by a second tryptophan hydroxylase isoform. Science 20: 398-399.

Westphal, R.S., and Sanders-Bush. E. (1994) Reciprocal binding properties of 5-HT_{2C} receptor agonists and antagonist. Mol.Pharmacol. Cap. 46: 937-942.

Wreggett, K.A., and De Lean, A. (1984) The ternary complex model. Its properties and application to ligand interactions with the D₂-dopamine of the anterior pituitary gland. Mol.Pharmacol. 26:214-227.

www.monografias.com/trabajos11/sisne/sisne.shtml

Zeisel, H.S Mauron, C.H, Watkins, C.J., and Wurtman, R.J (1981). Developmental changes in brain indoles, serum tryptophan and other serum amino acids in the rat. Dev. Brain Res. 1:551-564.