



# UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO



FACULTAD DE QUÍMICO FARMACOBIOLOGÍA

**“PARTICIPACIÓN DEL RECEPTOR 5-HT<sub>1A</sub> EN LA ACTIVACIÓN DE  
LA Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPasa EN CORTEZA CEREBRAL DE RATAS CON  
DIABETES MELLITUS EXPERIMENTAL”**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE QUÍMICO  
FARMACOBIOLOGO**

**PRESENTA:**

**P.Q.F.B. ROBERTO ESQUIVEL GARCÍA**

**ASESOR:**

**D.C. ROSALIO MERCADO CAMARGO**

**TESIS PARCIALMENTE APOYADA POR  
CIC 26.2 (2011), BECANET-Superior-20100001184**

**MORELIA, MICHOACÁN**

**NOVIEMBRE, 2011**

**El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Neurobiología de la Facultad de Químico Farmacobiología de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.**

**Tesis parcialmente apoyada por CIC-UMSNH-26.2 (2011), BECANET-Superior-20100001184**

## DEDICATORIA.

*Para mi familia, porque hay estrellas que guían mis pasos iluminando mí camino y hacen que esta vida me parezca maravillosa y perfecta.*

## **AGRADECIMIENTOS.**

Agradezco a Dios por la vida y sabiduría que me ha dado, los sueños que me ha brindado y por la experiencia adquirida.

Gracias a mi familia, por su cariño, comprensión y apoyo; por encomendarme siempre a Dios para que salga adelante. A mi padre Roberto<sup>†</sup>, por guiarme sobre el camino de la educación y el trabajo. A Martha mi madre, quien me brinda amor y que me permite sentir poder lograr lo que me proponga con su gran ejemplo. A Claudia y Martha, por ser unas excelentes hermanas mayores ayudándome con mis tareas y obligaciones para facilitar el cumplimiento de mis metas; a mis hermanas Ana, Beatriz y Mercedes, quienes me motivan a esforzarme más cuando superan mis anteriores logros. ¡Los amo!

A mi esposa Elena, gracias por escucharme, por tus consejos y paciencia, por darme lo mejor de ti, sin dobleces ni egoísmos, con alegría y dulzura; manifestándolo en nuestra hija Vanessa, quien al nacer, nos trae el mensaje de que Dios todavía no ha perdido la esperanza en los hombres y que mantengamos la determinación e ímpetu de alcanzar nuestros sueños. Mi orgullo por ustedes aumenta sin cesar. ¡Las quiero mucho!

Gracias a todos mis amigos que estuvieron conmigo compartiendo tantas experiencias y triunfos. En especial a mi amiga Judith, quien me enseñó a valorar mi tiempo libre para no desperdiciarlo, aprovechándolo para bien y convertirlo en una de las piedras más brillantes de una vida útil.

Gracias a Angélica, Blanca, Lourdes, Sacnité, Susana, César, Gustavo, Jaime, Luis y Omar, mis grandes amigos y compañeros de laboratorio, no voy a olvidar sus enseñanzas y ayuda, tampoco el tiempo agradable que hemos convivido.

Agradezco a mi asesor el D.C. Rosalio Mercado, por confiar en mí y permitirme ser parte de un grupo de trabajo tan competente, por su paciencia y consejos, los cuales hacen que me sienta satisfecho de mi participación dentro de un laboratorio de investigación.

Gracias a cada uno de los maestros que formaron parte de mi desarrollo profesional, puesto que sin su ayuda y conocimientos no estaría en donde me encuentro ahora. Agradezco a mis revisores de tesis, M.F.B. Blanca Nateras, E.H.D.L. Judith E. Prieto y a la Q.F.B. Armida Sánchez, por dedicar atención y paciencia al valorar mi trabajo, al igual por recordarme que el estudiante es alguien que nunca deja de aprender y también deja que le enseñen.

A la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, por alojarme en sus recintos y permitirme ser parte de una excelente generación.

¡Gracias!

## I. CONTENIDO.

<b>DEDICATORIA.</b> .....	<b>ii</b>
<b>AGRADECIMIENTOS.</b> .....	<b>iii</b>
<b>I. CONTENIDO.</b> .....	<b>1</b>
<b>I.1. Índice de figuras.</b> .....	<b>2</b>
<b>I.2. Índice de tablas.</b> .....	<b>3</b>
<b>II. LISTA DE ABREVIATURAS.</b> .....	<b>4</b>
<b>III. RESUMEN.</b> .....	<b>6</b>
<b>IV. ABSTRACT.</b> .....	<b>7</b>
<b>V. INTRODUCCIÓN.</b> .....	<b>8</b>
<b>V.1. El sistema nervioso.</b> .....	<b>8</b>
V.1.1. Sistema nervioso central. ....	9
V.1.2. Las sinapsis del sistema nervioso central. ....	12
V.1.3. Anatomía fisiológica de la sinapsis. ....	13
V.1.4. Neurotransmisores. ....	15
<b>V.2. Sistema serotoninérgico.</b> .....	<b>16</b>
V.2.1. Receptores serotoninérgicos. ....	19
V.2.2. Receptores 5-HT <sub>1</sub> . ....	22
<b>V.3. Transporte a través de membranas.</b> .....	<b>24</b>
V.3.1. Transporte iónico. ....	26
V.3.1. La Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> -ATPasa de las membranas plasmáticas. ....	29
<b>V.4. Diabetes mellitus.</b> .....	<b>34</b>
V.4.1. Neuropatía diabética .....	37
V.4.2. Diabetes mellitus experimental. ....	39
<b>VI. JUSTIFICACIÓN.</b> .....	<b>41</b>
<b>VII. HIPÓTESIS.</b> .....	<b>42</b>
<b>VIII. OBJETIVOS.</b> .....	<b>43</b>
<b>VIII.1. Objetivo general.</b> .....	<b>43</b>
<b>VIII.2. Objetivos específicos.</b> .....	<b>43</b>
<b>IX. MATERIAL Y MÉTODOS.</b> .....	<b>44</b>

<b>IX.1. Material biológico.....</b>	<b>44</b>
<b>IX.2. Inducción de DME. ....</b>	<b>44</b>
<b>IX.3. Preparación de los homogeneizados de corteza cerebral.....</b>	<b>44</b>
<b>IX.4. Medición de la actividad específica de la Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPasa.....</b>	<b>45</b>
<b>IX.5. Análisis estadísticos.....</b>	<b>46</b>
<b>X. RESULTADOS. ....</b>	<b>47</b>
<b>XI. DISCUSIÓN. ....</b>	<b>52</b>
<b>XII. CONCLUSIÓN.....</b>	<b>56</b>
<b>XIII. PERSPECTIVAS. ....</b>	<b>56</b>
<b>XIV. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>57</b>

## **I.1. Índice de figuras.**

Figura 1. Esquema de los procesos asociados con la neurotransmisión serotoninérgica.....	18
Figura 2. Autorreceptores de la 5-HT, con localizaciones diferenciales .....	23
Figura 3. Esquema cinético para el transporte activo de Na <sup>+</sup> y de K <sup>+</sup> mediante la Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> -ATPasa.....	30
Figura 4. El mecanismo de estreptozotocina induce eventos tóxicos en las células B del páncreas de rata .....	40
Figura 5. Niveles de glucosa en sangre en ratas de los grupos control y DME ....	47
Figura 6. Peso corporal de ratas control y DME.....	47
Figura 7. Actividad basal de la Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> -ATPasa en homogenizado de corteza cerebral de ratas .....	48
Figura 8. Curvas dosis-respuesta del 8-OH-DPAT sobre actividad de la Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> -ATPasa en homogenizado de corteza cerebral.....	49
Figura 9. Curvas dosis-respuesta de espiperona sobre la actividad de la Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> -ATPasa en homogenizado de corteza cerebral a diferentes tiempos posteriores a la inducción de DME.. ..	50
Figura 10. Activación e Inhibición de la Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> -ATPasa .....	51

## I.2. Índice de tablas.

Tabla 1. Resumen de las diferentes familias y subtipos de receptores de 5-HT en base a su mecanismo de señalización.....	20
Tabla 2. Efectos electrofisiológicos de los receptores de 5-HT.....	22
Tabla 3. DE <sub>50</sub> de agonista y antagonista del receptor 5-HT <sub>1A</sub> sobre la actividad de la Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> -ATPasa en homogenizado de corteza cerebral de rata.....	50

## II. LISTA DE ABREVIATURAS.

5-HIAA	–	Ácido 5-hidroxi-indolacético
5-HT	–	Serotonina, 5-Hidroxitriptamina
5-HTP	–	5-hidroxitriptófano
8-OH-DPAT	–	8-Hidroxi-2-di-n-propilamino-tetralina
AMPc	–	Monofosfato cíclico de adenosina
ATP	–	Trifosfato de adenosina
BHE	–	Barrera hematoencefálica
Ca <sup>2+</sup>	–	Ion calcio
Cl <sup>-</sup>	–	Ion cloruro
D. E.	–	Desviación estándar
DLAA	–	Descarboxilasa de los L-aminoácidos aromáticos
DME	–	Diabetes mellitus experimental
DME	–	Diabetes mellitus experimental
<i>g</i>	–	Unidad de fuerza de aceleración centrífuga
GABA	–	Ácido gamma-aminobutírico
GMPc	–	Monofosfato cíclico de guanosina
H <sub>2</sub> O	–	Agua
K <sup>+</sup>	–	Ion potasio
KCl	–	Cloruro de potasio

Participación del receptor 5-HT<sub>1A</sub> en la activación de la Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPasa en corteza cerebral de ratas con diabetes mellitus experimental

---

---

L-Trp	–	L-triptófano
MAO	–	Monoamino oxidasa
MgCl <sub>2</sub>	–	Cloruro de magnesio
mM	–	Milimolar
N	–	Normalidad
Na <sup>+</sup>	–	Ion sodio
Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> -ATPasa	–	Bomba de sodio y potasio
NaCl	–	Cloruro de Sodio
SNC	–	Sistema nerviosos central
SNP	–	Sistema nervioso periférico
STZ	–	Estreptozotocina
TPH	–	Triptófano hidroxilasa
Tris-HCl	–	Buffer de base trisma con ácido clorhídrico
w/v	–	Relación peso/volumen
μL	–	Microlitro
$\bar{X}$	–	Media aritmética

### III. RESUMEN.

La diabetes mellitus (DM) es una enfermedad metabólica con complicaciones crónicas como nefropatías, retinopatías, neuropatías y problemas cardiovasculares. Además, la DM tiene repercusión sobre la función del SNC, afectando sistemas de neurotransmisión y grupos neuronales específicos, como es el caso del sistema serotoninérgico. Este sistema ejerce su actividad con la 5-HT, neurotransmisor que modula diversas funciones cerebrales a través de su interacción con diversos receptores serotoninérgicos, de los cuales su presencia se ha descrito en las diferentes regiones del cerebro, como lo es el receptor 5-HT<sub>1A</sub> en la corteza cerebral. En la membrana celular de astrocitos, la 5-HT regula la actividad de la Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPasa, enzima responsable de mantener el gradiente iónico necesario para la excitabilidad neural y regulación del volumen celular. Reportes señalan que la actividad de la Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPasa a nivel periférico esta disminuida en pacientes con DM, y estudios recientes indican que también existe una disminución a nivel central en ratas con DME. Por ello el objetivo del presente trabajo fue determinar la actividad de la Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPasa en ratas con DM experimental (DME) aguda y crónica así como el efecto de activar e inhibir el receptor 5HT<sub>1A</sub> sobre la actividad de la enzima. Los resultados muestran disminución de la actividad de la Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPasa en la fase aguda y crónica de la DME y la activación del receptor 5HT<sub>1A</sub> no incrementa la actividad de la enzima. Estos resultados sugieren que la DM produce perturbaciones en la regulación por 5-HT de la actividad de la Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPasa de la corteza cerebral de rata, lo cual puede alterar la homeostasis y contribuir al deterioro funcional a largo plazo del SNC.

Palabras clave: Bomba de sodio y potasio, serotonina, agonismo inverso.

#### **IV. ABSTRACT.**

Diabetes mellitus (DM) is a chronic metabolic disease with complications such as nephropathy, retinopathy, neuropathy and cardiovascular problems. In addition, DM has an impact on CNS function, affecting neurotransmitter systems and specific neuronal groups, such as the serotonergic system. This system exerts its activity by 5-HT, a neurotransmitter that modulates various brain functions through its interaction with various serotonergic receptors, of which its presence has been described in different brain regions, such as the 5-HT<sub>1A</sub> receptor in the cerebral cortex. In the cell membrane of astrocytes, 5-HT regulates the function of the Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase, an enzyme responsible for maintaining the ionic gradient necessary for neural excitability and regulation of cell volume. Reports indicate that the activity of the Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase at the peripheral level is decreased in patients with DM, recent studies indicate that there is also a central level decreased activity of the enzyme in rats with experimental DM (EDM). The aim of the present study was to evaluate the activity of the Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase in rat cerebral cortex with acute and chronic EDM and to assess the effect of the activation or inhibition of the 5HT<sub>1A</sub> receptor on the enzyme activity. The results show that there was a progressive decrease in the activity of the Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase in both acute and chronic EDM. In addition, the activation of 5HT<sub>1A</sub> receptor has an inductive effect on sodium pump activation although without reached basal levels of the enzyme activity. These results suggest that EDM distorts the regulation of 5-HT on the activity of the Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase of rat cerebral cortex, which may alter the homeostasis and contribute to long-term functional impairment of the CNS.

Keywords: Sodium and potassium pump, serotonin, inverse agonism.

## V. INTRODUCCIÓN.

### V.1. El sistema nervioso.

El sistema nervioso (SN) está formado por un conjunto de estructuras centrales y periféricas interconectadas que constituyen una unidad indivisible; a través de los nervios periféricos se extiende por todo el organismo e influye de manera directa sobre los otros sistemas. Sus estructuras más dístales, los receptores, responden a estímulos externos e internos y los convierten en señales eléctricas que a través de los nervios periféricos son conducidas a estructuras centrales, donde adquieren el carácter de sensaciones (Guyton and Hall, 2001).

Las células del tejido nervioso pertenecen a dos clases principales: las neuronas, que son las unidades morfo funcionales del tejido nervioso, éstas reciben, transmiten y almacenan información; las células gliales, quienes guardan una estrecha relación con las neuronas, sirviendo como soporte de estas últimas, producen mielina, y se localizan en todos los sectores del tejido, siendo las más abundantes (Kandel, 2001). Las fibras en el SN corresponden a extensiones de las células gliales y de las neuronas, forman complejas interrelaciones entre ellas, recorren grandes extensiones, regulan sus actividades propias y de otros sistemas en una forma compleja y dinámica, en gran medida gracias a la neurotransmisión química intercelular (Bloom, 2005).

Una clasificación general del SN lo define como sistema nervioso central (SNC), que incluye los nervios que se encuentran en el encéfalo y la médula espinal, y sistema nervioso periférico (SNP), que contiene los nervios y ganglios neuronales situados fuera del SNC. El SNP a su vez se divide en somático, que contiene la inervación sensitiva y motora de la piel, músculos y articulaciones; y autónomo, el cual inerva a el músculo liso y las glándulas junto con algunas estructuras especializadas para el control del medio interno (Guyton and Hall, 2001).

### **V.1.1. Sistema nervioso central.**

El SNC es excepcional por la gran complejidad de los procesos mentales y las acciones de control que puede realizar, está formado por más de cien mil millones de neuronas. Las señales aferentes llegan a la neurona a través de la sinapsis que establecen, sobre todo, las dendritas, aunque también el cuerpo celular. Por el contrario, la señal eferente se transmite por el único axón de la neurona, pero dicho axón tiene muchas ramas separadas destinadas a otras partes del SNC o a la periferia del cuerpo.

El SNC posee siete áreas anatómicas partes importancia: la medula espinal, el bulbo raquídeo, la protuberancia, el cerebelo, el mesencéfalo, el diencefalo y los hemisferios cerebrales (Kandel, 2001). Existen tres niveles principales del SNC con atributos funcionales concretos:

- El nivel medular, constituido por circuitos neuronales que pueden originar: los movimientos de la marcha; los reflejos de retirada ante estímulos dolorosos; los reflejos de contracción para sostener el cuerpo, los reflejos que regulan los vasos sanguíneos locales, los movimientos gastrointestinales y los reflejos que controlan la excreción urinaria.
- El nivel encefálico inferior o subcortical. Constituido por las áreas inferiores del encéfalo como son: el bulbo raquídeo, la protuberancia, el mesencéfalo, el diencefalo, el cerebelo y los ganglios basales. Lleva a cabo funciones como el control de la presión arterial y de la respiración; el mantenimiento del equilibrio; los reflejos de la alimentación; además, parte de la conducta emocional, como la ira, la agitación, las respuestas sexuales, la reacción al dolor o el placer.
- El nivel cortical o encefálico superior. Integrado por la corteza cerebral es un almacén de la memoria de enormes dimensiones, nunca funciona sola, sino siempre es asociación con el nivel inferior y sistemas neuronales, que interrelacionados regulan sus actividades propias y de otros sistemas en

una forma compleja y dinámica, por medio de la neurotransmisión química intercelular, sin ella las funciones de los centros cerebrales son imprecisas (Kandel, 2001; Bloom, 2005).

Una característica del metabolismo cerebral es que su variabilidad regional está fuertemente determinada por el constante cambio espacial en determinados niveles de la actividad sináptica. Las células nerviosas poseen un metabolismo muy activo dependiente del continuo suministro a través de la circulación de oxígeno y glucosa; por ello hay un alto grado de vascularización del tejido, el cual recibe un 10% de la sangre bombeada por el corazón, los requerimientos de energía del cerebro corresponden a 20% del total del organismo, aunque su masa solo corresponde a 2% del total. Así, uno de los principios fundamentales de la fisiología del cerebro es que la actividad neuronal tiene una estrecha relación con las células gliales, gracias a las cuales se satisfacen las necesidades metabólicas y de flujo sanguíneo (Magistretti, 2006).

En el SNC de los vertebrados hay por lo menos 10 veces más células gliales que neuronas. La glía agrupa a por lo menos tres familias principales de células por sus características fisiológicas y moleculares: los astrocitos, la microglía y la oligodendroglía. Los cuales presentan diversas funciones como: dar soporte y consistencia al cerebro con el aislamiento a ciertos grupos y estructuras neuronales; mantener un balance metabólico, endocrino e inmunológico; y dirigir, durante el desarrollo, la migración neuronal y la inserción de axones a sitios específicos. Las células gliales también captan y retiran los neurotransmisores liberados en la sinapsis durante la transmisión del impulso nervioso, mantienen la concentración iónica del líquido extracelular, y envuelven los axones, mediante la producción de vainas de mielina, para favorecer la conducción de las señales nerviosas (Kandel, 2001; Schwartz and Westbrook, 2001).

La microglía forma parte del sistema de defensa del cerebro, con funciones inmunológicas; mientras que la oligodendroglía interviene en la formación de vainas de mielina. Los astrocitos forman parte de la barrera hematoencefálica

(BHE), los cuales emiten prolongaciones que envuelven los vasos sanguíneos casi por completo. De esta manera, una sustancia que se quiera introducir al sistema nervioso tendrá que atravesar no sólo la barrera capilar sino también la membrana de los astrocitos, siendo un límite importante en la regulación del flujo sanguíneo cerebral a este nivel (Kandel, 2001).

Un análisis de consumo de energía por la corteza cerebral ha indicado que la mayoría de la energía se dedica a la propagación del potencial de acción y la restauración de los gradientes iónicos en las sinapsis excitadoras. Los mecanismos celulares básicos de la unión entre la actividad neuronal y el metabolismo, recientemente han comenzado a esclarecerse, donde se ha identificado un papel clave de los astrocitos en el acoplamiento de la actividad sináptica a la utilización de la glucosa, a través de los mecanismos moleculares que implican la intervención secuencial de los transportadores de glutamato y de la Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPasa, la activación de la glucólisis y su mediación por el intercambio de lactato con las neuronas (Magistretti and Pellerin, 1999; Magistretti *et al.*, 1999). El mecanismo básico de acoplamiento neurometabólico en astrocitos es estimulado por glutamato promoviendo la glucólisis aeróbica, de tal manera que la entrada de Na<sup>+</sup> en la recaptación de glutamato y la activación subsiguiente de la Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPasa provoca la absorción de glucosa y su tratamiento glicolítico, lo que resulta en la liberación del lactato. El lactato puede contribuir al sistema de alimentación dependiente de la actividad neuronal con demandas de energía asociadas con la transmisión sináptica (Magistretti and Pellerin, 1999). Vale la pena señalar que durante la activación, el consumo de oxígeno no aumenta proporcionalmente con la utilización de la glucosa y el flujo sanguíneo, donde más del 80% de utilización de la glucosa se correlacionó linealmente con la neurotransmisión mediada por el glutamato. Dada la estrecha conexión que existe entre la actividad sináptica y el metabolismo energético, es probable que los procesos que subyacen a la plasticidad sináptica también puedan reflejarse en el nivel de metabolismo energético (Magistretti, 2006). Comprender los factores determinantes celulares y moleculares del metabolismo energético del cerebro es

extremadamente relevante, no sólo para desentrañar los mecanismos básicos de la fisiología del cerebro, sino porque también puede contribuir a la comprensión de los mecanismos fisiopatológicos de una variedad de trastornos neurológicos y psiquiátricos.

### **V.1.2. Las sinapsis del sistema nervioso central.**

En el SNC la información se transmite principalmente bajo la forma de potenciales de acción, que pasan por una serie de neuronas en forma de impulsos. Cada potencial puede ser bloqueado, cambiar e integrarse con los impulsos de otras neuronas para dar lugar a modelos muy complejos de comunicación neuronal producidos por las funciones sinápticas de las neuronas.

Existen dos clases fundamentales de sinapsis: la sinapsis química y la sinapsis eléctrica. Casi todas las sinapsis que se utilizan para transmitir señales en el SNC son sinapsis químicas. En ellas, la primera neurona secreta en la sinapsis una sustancia química llamada neurotransmisor; este, a su vez, actúa sobre las proteínas receptoras de membrana de la siguiente neurona para excitarla, inhibirla o modificar su sensibilidad. Las sinapsis eléctricas, en cambio, se caracterizan por ser canales directos que transmiten impulsos eléctricos desde una célula a la siguiente, a través de uniones de comunicación bidireccional, aunque en el SNC solo se han encontrado algunas uniones laxas (Kandel, 2001).

La conducción unidireccional de las sinapsis químicas es un rasgo sumamente importante que las hace idóneas para efectuar la transmisión de las señales en el SN. Por lo que, la neurona que secreta la sustancia transmisora (neurona presináptica) a la neurona sobre la que actúa el transmisor (neurona postsináptica) permite que las señales se dirijan a objetivos específicos de áreas diferenciadas en el SNC y hacia terminales de los nervios periféricos (Guyton and Hall, 2001).

### **V.1.3. Anatomía fisiológica de la sinapsis.**

La neurona está formada de 3 partes principales: el soma, que es el cuerpo principal de la neurona; un solo axón, que parte del soma y se incorpora a un nervio periférico que sale de la medula espinal; y las dendritas, que son numerosas prolongaciones ramificadas del soma que se extienden a las áreas medulares circundantes. La superficie de una neurona motora cuenta con entre 10,000 y 200,000 terminales presinápticas; de ellas el 80 al 95% corresponden a las ubicadas en dendritas y solo un 5 al 20% están en el soma (Guyton and Hall, 2001). Las cualidades en tamaño y número de las partes neuronales, hacen que en distintas partes del SN, las neuronas reaccionen de forma diferente a las señales de entrada y, por tanto, desempeñen funciones diferentes (Schwartz and Westbrook, 2001).

Las terminales presinápticas, están separadas del soma de la neurona postsináptica por una hendidura sináptica cuya anchura oscila entre 20 y 30 nm. La terminal posee dos estructuras importantes relacionadas con las funciones excitadora o inhibitoria de la sinapsis: las vesículas que contienen el neurotransmisor y las mitocondrias que proporcionan el trifosfato de adenosina (ATP), que aporta la energía necesaria para la síntesis de nuevas cantidades de sustancias transmisoras. Cuando un potencial de acción se propaga por una terminal presináptica, la despolarización de la membrana determina el vaciamiento de un pequeño número de vesículas dentro de la hendidura; a su vez, el transmisor liberado induce un cambio inmediato de las propiedades de permeabilidad de la membrana neuronal postsináptica, lo que da lugar a la excitación o inhibición neuronal, dependiendo de las características del receptor de la neurona (Kandel, 2001).

En la sinapsis, la membrana de la neurona postsináptica contiene una gran cantidad de proteínas receptoras. Las moléculas de estos receptores presentan dos componentes importantes: un componente de fijación que sobresale fuera de la membrana y asoma a la hendidura sináptica, y un componente ionóforo que

atraviesa totalmente la membrana hasta el interior de la neurona postsináptica. A su vez, el ionóforo puede ser de dos clases: un canal iónico que deja pasar determinados tipos de iones a través de la membrana; ó, un activador segundo mensajero que no es un canal iónico, sino una molécula que se mete dentro del citoplasma celular y activa una o más sustancias de la neurona postsináptica. Estas sustancias a su vez actúan de segundos mensajeros y modifican determinadas funciones celulares internas (Chua *et al.*, 2010). Algunos de los receptores sinápticos, al activarse, excitan la neurona postsináptica y otros la inhiben. La importancia de poseer receptores de tipo excitador e inhibidor reside en que este hecho confiere una nueva dimensión a la función nerviosa, pues favorece tanto su represión como excitación (Bloom, 2005).

La apertura y el cierre de los canales iónicos suponen un medio de control rápido de la permeabilidad de las neuronas postsinápticas. Muchas funciones del SN, exigen que lo cambios neuronales se prolonguen desde segundos hasta meses después de desaparecer el neurotransmisor inicial. En muchos casos se consigue una acción neuronal prolongada gracias a la activación del sistema químico de segundos mensajeros (Siegelbaum and Koester, 2001).

Existen varias clases de sistemas de segundos mensajeros. Uno de los que predominan en las neuronas utilizan un grupo de proteínas llamadas proteínas G. La proteína G se une a la parte de la proteína receptora que penetra dentro de la célula. La proteína G, a su vez, está formada por tres elementos: un componente alfa ( $\alpha$ ), que es la porción activadora de la proteína G, y los componentes beta ( $\beta$ ) y gamma ( $\gamma$ ) que unen la proteína G al interior de la zona de membrana celular adyacente a la proteína receptora. Tras su activación mediante un impulso nervioso, la porción  $\alpha$  de la proteína G se separa de las fracciones beta y gamma y queda suelta en el citoplasma celular (Guyton and Hall, 2001).

Dentro del citoplasma, el componente alfa que acaba de separarse ejerce una o varias funciones que dependen del carácter específico de cada neurona:

- Apertura de canales iónicos específicos de la membrana de la célula postsináptica. A diferencia de los canales iónicos activados directamente y que se cierran enseguida, estos canales permanecen abiertos mucho más tiempo.
- Activación del monofosfato cíclico de adenosina (AMPc) o del monofosfato cíclico de guanosina (GMPc) de la célula neuronal. El AMPc o el GMPc activan la maquinaria metabólica sumamente específica de la neurona y, por tanto, pueden iniciar cualquiera de los numerosos efectos químicos, incluidos los cambios duraderos de la propia estructura celular, con la modificación consiguiente de la excitabilidad prolongada de la neurona.
- Activación de una o más enzimas intracelulares. La proteína G activa directamente una o más enzimas intracelulares. A su vez, estas enzimas dan lugar a cualquiera de las numerosas funciones químicas específicas de la célula.
- Activación de la transcripción génica. Quizá sea el aspecto más importante de los sistemas de segundo mensajero de la neurona postsináptica. La transcripción de genes da lugar a la síntesis de proteínas nuevas dentro de la neurona y estas pueden alterar los mecanismos metabólicos de la célula o su estructura. Efectivamente, es bien conocido que cuando las neuronas se activan adecuadamente aparecen cambios estructurales, en especial en los procesos a largo plazo (Schwartz and Westbrook, 2001).

#### **V.1.4. Neurotransmisores.**

Hasta la fecha se han descubierto más de 40 sustancias transmisoras, algunas de las más conocidas son: acetilcolina, adrenalina, histamina, ácido gamma-aminobutírico (GABA), glicina, glutamato y serotonina. Los transmisores pequeños de acción rápida son los que originan la mayoría de las respuestas inmediatas del SN, como la transmisión de las señales sensoriales al cerebro y de las señales motoras de este a los músculos, a este conjunto se le denomina

neurotransmisores. Por el contrario, los transmisores de mayor tamaño, en su mayoría neuropéptidos, suelen producir efectos más prolongados, tales como los cambios duraderos del número de receptores neuronales, la apertura o el cierre prolongados de determinados canales iónicos y, posiblemente también, los cambios a largo plazo del número o el tamaño de la sinapsis (Buck, 2000).

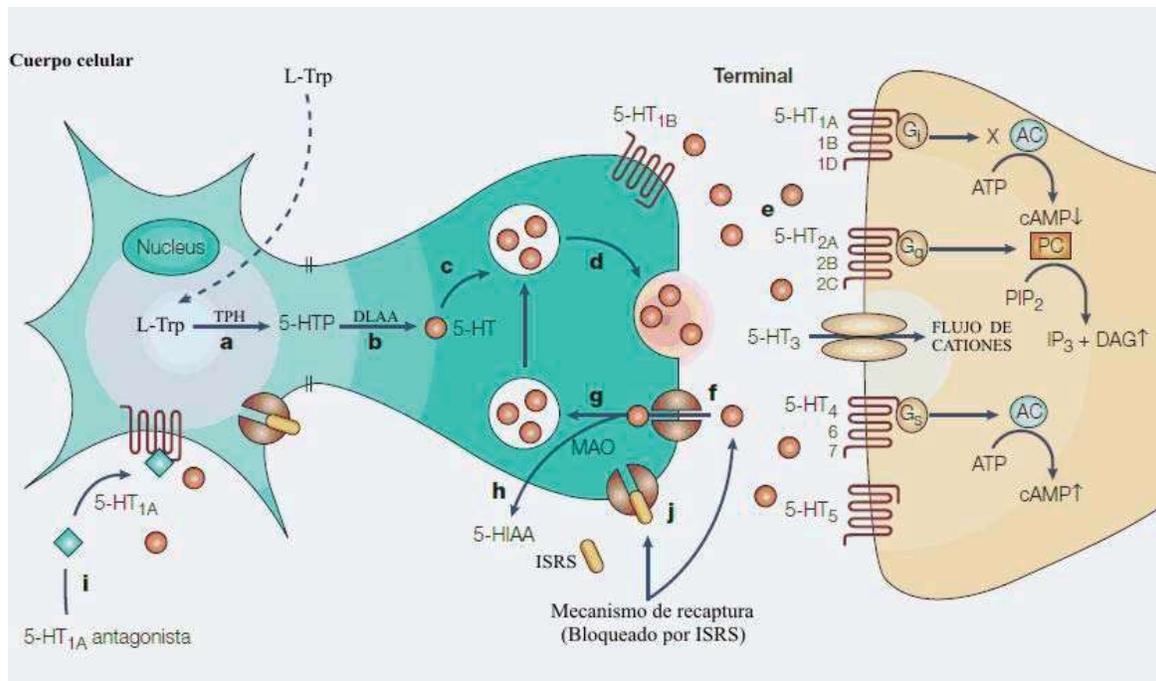
Los neurotransmisores se sintetizan en el citosol de la terminal presináptica y luego se absorben por transporte activo para alojarse dentro de las numerosas vesículas de transmisores que existen en la terminal. A continuación, cada vez que llega un potencial de acción a la terminal presináptica, algunas vesículas liberan de golpe el transmisor en el seno de la hendidura sináptica; esto suele ocurrir en un milisegundo o menos. La acción ulterior del tipo de neurotransmisor sobre los receptores de membrana de la neurona postsináptica también sucede, por lo general, en otro milisegundo o menos aún (Chua *et al.*, 2010). La mayoría de las veces, el efecto consiste en el incremento o la reducción de la conductancia a través de los canales iónicos; o en menor grado, estimulación de enzimas con lo cual se modifica la maquinaria metabólica interna de la célula (Guyton and Hall, 2001).

## V.2. Sistema serotoninérgico.

El neurotransmisor específico del sistema serotoninérgico es la serotonina (5-hidroxitriptamina, 5-HT), una indolamina sintetizada por las células enterocromafines del tracto gastrointestinal y neuronas específicas del SNC (Gershon, 2009). Las neuronas serotoninérgicas tienen sus cuerpos celulares localizados en los núcleos medial y dorsal del rafe en el tallo cerebral, y proyectan sus axones por todo el cerebro y la medula espinal. La 5-HT influye en una gran variedad de funciones cerebrales, entre ellas sueño, función cognitiva, percepción sensitiva, actividad motora, regulación de la temperatura, apetito, estado de ánimo, comportamiento sexual y secreción de hormonas (Berger *et al.*, 2009). En el encéfalo se expresan todos los receptores de 5-HT, es probable que en algunas neuronas se expresen múltiples subtipos de receptores de 5-HT con acciones

semejantes u opuestas, lo cual ocasiona la enorme diversidad de efectos (Sanders-Bush y Mayer, 2005).

La serotonina sintetizada en las células enterocromafines del tracto gastrointestinal no cruza la BHE. Sin embargo, el aminoácido L-triptófano (L-Trp) y sus metabolito el 5-hidroxitriptófano (5-HTP), con los cuales la serotonina es sintetizada, pueden y cruzan la BHE por medio de un transportador de aminoácidos naturales y de cadena ramificada. Como se muestra en la Figura 1, las neuronas serotoninérgicas contienen todas las proteínas necesarias para la síntesis de 5-HT a partir de su precursor L-Trp, en una vía metabólica corta que involucra dos enzimas: triptófano hidroxilasa (TPH) y descarboxilasa de los L-aminoácidos aromáticos (DLAA). La reacción mediada por TPH es una etapa limitante en la vía. La TPH ha sido vista en dos formas existentes en la naturaleza: TPH1 localizada a nivel periférico, y la TPH2, que es una isoforma cerebro-específica (Walther *et al.*, 2003). La TPH2 no se encuentra saturada con sustrato; por tanto, la cantidad de L-Trp existente en el encéfalo influye en la síntesis de 5-HT (Trulson and Mackenzie, 1980). La serotonina recién formada se acumula con rapidez en las vesículas sinápticas, sitios que la protegen de la MAO. La que se descarga por flujo de impulsos nerviosos se reaccumula en la terminación presináptica gracias a la acción de un portador dependiente de Na<sup>+</sup>, el transportador de 5-HT, que se localiza en la membrana exterior de las terminaciones axonianas serotoninérgicas y en la membrana exterior de plaquetas por donde éstas lo captan ya que no cuentan con enzimas requeridas para su síntesis (Mercado and Kilic, 2010). La recaptación presináptica es un mecanismo muy eficaz para suprimir la acción de la 5-HT liberada por el flujo de impulsos nerviosos. La MAO localizada en los elementos postsinápticos y las células circundantes inactiva con rapidez a la 5-HT que se escapa de la recaptación, obteniendo como producto el ácido 5-hidroxi-indolacético (5-HIAA), el cual es excretado en la orina (Wong *et al.*, 2005).



**Figura 1. Esquema de los procesos asociados con la neurotransmisión serotoninérgica.** a) La TPH cataliza la conversión de L-Trp a 5-HTP. b) La DLAA cataliza la conversión de 5-HTP en 5-HT. c) La 5-HT se recoge en las vesículas de almacenamiento. d) Las vesículas liberan la 5-HT en el espacio sináptico. e) 5-HT puede activar los diversos subtipos de la familia de receptores serotoninérgicos (1, 2, 3, 4, 5, 6 y 7), que interaccionan con sus respectivos sistemas de transducción de señales dentro de la neurona postsináptica. f) La 5-HT se recoge en las terminales presinápticas de 5-HT por el transportador de 5-HT. g, h) Dentro de las terminales presinápticas la 5-HT sería almacenada por las vesículas o degradada por la MAO. i) La 5-HT activa autorreceptores presinápticos somatodendríticos 5-HT<sub>1A</sub>, los cuales pueden ser bloqueado por antagonistas selectivos. j) Inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina (ISRS) como fluoxetina inhiben el transportador de 5-HT. AC, la adenilato ciclasa, DAG, diacilglicerol, IP<sub>3</sub>, inositol trifosfato; PIP<sub>2</sub>, fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato. (Tomada de: Wong *et al.*, 2005).

El L-Trp, aminoácido esencial en el organismo, se encuentra en el plasma en dos fracciones, el 90% se une a la albúmina y el 10% restante se encuentra en forma libre (FL). La relación que guardan estas dos fracciones es la que determina que la FL ingrese al cerebro a través de la barrera hematoencefálica, para estimular o disminuir la síntesis de 5-HT. Por ejemplo, la administración de precursores metabólicos, L-Trp y 5-HTP, y la desnutrición en ratas, incrementan los niveles de serotonina cerebral así como la actividad de la bomba de sodio y potasio (Hernández, 1979). Se ha reportado que la diabetes mellitus experimental (DME) produce una disminución en la concentración de la FL del L-Trp plasmático

disponible para la síntesis de la 5-HT por las neuronas serotoninérgicas, lo que promueve niveles disminuidos del neurotransmisor en el cerebro (Crandall *et al.*, 1981). Manjarréz *et al.* (1999), observaron que en la corteza cerebral de ratas diabéticas los niveles de 5-HT están disminuidos, a diferencia de lo que observaron en el tallo cerebral, donde existe un incremento en los niveles de 5-HT a pesar de que la concentración de su precursor el L-Trp se encuentra disminuida, proponiendo que la DME induce un cambio cinético en la actividad de la TPH de esta región cerebral. Los animales diabéticos tratados con insulina mostraron normalización en la concentración plasmática de la FL del L-Trp, a excepción de la actividad de la TPH, quien mantuvo los cambios cinéticos, quizás por alguna alteración conformacional por la afección de la enfermedad (Trulson and Mackenzie, 1980; Manjarréz *et al.*, 2000).

### **V.2.1. Receptores serotoninérgicos.**

Los receptores de 5-HT están localizados en la membrana celular de las células nerviosas y de otros tipos celulares, median los efectos de su ligando endógeno la serotonina así como de un amplio rango de drogas farmacéuticas y alucinógenas (Sanders-Bush y Mayer, 2005). Los receptores de 5-HT están clasificados en 7 clases definidas: 5-HT<sub>1</sub> a 5-HT<sub>7</sub> (Tabla 1). Las familias de receptores 5-HT<sub>1</sub>, 5-HT<sub>2</sub> y 5-HT<sub>4-7</sub> son miembros de la superfamilia de receptores de siete dominios transmembranales acoplados con proteína G, que activan una cascada de segundos mensajeros intracelulares, en las que se incluyen al menos 13 subtipos de receptores. Por otra parte, el receptor 5-HT<sub>3</sub> es un conducto iónico controlado por ligando que regula la penetración y la salida del Na<sup>+</sup> y K<sup>+</sup>, y tiene una topología de membrana similar a la del receptor colinérgico nicotínico, presente en dos subtipos, 5-HT<sub>3A</sub> y 5-HT<sub>3B</sub> (Filip and Bader, 2009).

**Tabla 1. Resumen de las diferentes familias y subtipos de receptores de 5-HT en base a su mecanismo de señalización**

FAMILIA	SUBTIPO	MECANISMO DE TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES	SITIOS DE EXPRESIÓN EN EL SNC.
5-HT <sub>1</sub>	5-HT <sub>1A</sub>	G <sub>i/o</sub> AC i	Núcleos de Rafé, Hipocampo, Corteza, Sistema Gustativo
	5-HT <sub>1B</sub>	G <sub>i/o</sub> AC i	Sustancia Nigra, Globo pálido y Ganglios basales,
	5-HT <sub>1D</sub>	G <sub>i/o</sub> AC i	Ganglios basales, hipocampo, corteza.
	5-HT <sub>1E</sub>	G <sub>i/o</sub> AC i	Corteza Cerebral, Putamen
	5-HT <sub>1F</sub>	G <sub>i/o</sub> AC i	Corteza Cerebral, Hipocampo
	5-HT <sub>2</sub>	5-HT <sub>2A</sub>	G <sub>q/11</sub> PLC s
5-HT <sub>2B</sub>		G <sub>q/11</sub> PLC s	Cerebelo, hipotálamo, Estómago (fondo)
5-HT <sub>2C</sub>		G <sub>q/11</sub> PLC s	Plexo toroide, Corteza, Hipocampo y Sustancia Negra
5-HT <sub>3</sub>	5-HT <sub>3A</sub>	Canal iónico	Área Postrema, Nervios sensitivos y entéricos
	5-HT <sub>3B</sub>	Canal iónico	Área Postrema, Nervios sensitivos y entéricos
5-HT <sub>4</sub>	5-HT <sub>4</sub>	G <sub>s</sub> AC s	Ganglios basales, corteza, hipocampo
5-HT <sub>5</sub>	5-HT <sub>5A</sub>	G <sub>i/o</sub> AC i	Corteza cerebral, Hipocampo, Hipotálamo
	5-HT <sub>5B</sub>	?	Núcleos del rafe, hipocampo (en roedores)
5-HT <sub>6</sub>	5-HT <sub>6</sub>	G <sub>s</sub> AC s	Hipocampo, corteza
5-HT <sub>7</sub>	5-HT <sub>7</sub>	G <sub>s</sub> AC s	Corteza, Tálamo, hipocampo

(Modificado de Filip and Bader, 2009).

Las consecuencias fisiológicas de la liberación de 5-HT varían con la región del encéfalo y el elemento neuronal participante, lo mismo que con la población de subtipos de receptores expresados de la 5-HT. La 5-HT tiene acciones excitadoras e inhibitoras directas, que pueden ocurrir en la misma preparación pero con esquemas temporales diferentes. Por ejemplo, en las neuronas del hipocampo, la 5-HT desencadena hiperpolarización mediada por receptores 5-HT<sub>1A</sub>, a lo que sigue una despolarización lenta mediada por receptores 5-HT<sub>4</sub> (Tabla 2).

La activación de los receptores 5-HT<sub>1A</sub> abre la conductancia de K<sup>+</sup> con rectificación interna, que culmina en la hiperpolarización y la inhibición neuronal. La despolarización lenta inducida por la activación de los receptores 5-HT<sub>2A</sub> en zonas como la corteza prefrontal, el núcleo accumbens y el núcleo motor facial incluyen disminución de la conductancia de K<sup>+</sup>. Un segundo mecanismo diferente, que incluye corrientes de membrana activadas por el Ca<sup>2+</sup>, intensifica la excitabilidad neuronal y potencia la reacción a las señales excitadoras, como el glutamato. Al parecer, en regiones donde coexisten receptores 5-HT<sub>1</sub> y 5-HT<sub>2A</sub>, el efecto de la 5-HT manifiesta una combinación de las dos reacciones oponentes, con hiperpolarización relevante mediada por el receptor 5-HT<sub>1</sub>, y despolarización oponente mediada por el receptor 5-HT<sub>2A</sub>. En muchas áreas corticales, los receptores 5-HT<sub>2A</sub> están localizados en interneuronas GABAérgicas y en células piramidales. La activación de interneuronas aumenta la liberación de GABA, que lentifica de manera consecutiva la velocidad de activación de las células piramidales. Así, hay potencial para que el receptor 5-HT<sub>2A</sub> regule de manera diferencial células piramidales corticales, dependiendo de las células blanco específicas (Guyton and Hall, 2001). Se ha demostrado que los receptores 5-HT<sub>2C</sub> deprimen la corriente de K<sup>+</sup> en los oocitos de *Xenopus* que expresan al RNAm del receptor; no se ha identificado de manera definitiva una acción similar en el encéfalo. El receptor 5-HT<sub>4</sub>, acoplado con activación de la adenilato ciclasa, desencadena también una despolarización neuronal lenta mediada por disminución de la conductancia de K<sup>+</sup>. No está claro por qué dos familias de receptores de la 5-HT distintas, enlazadas con vías de señalización diferentes, son hábiles para desencadenar una acción neurofisiológica común (Sanders-Bush y Mayer, 2005).

La despolarización rápida desencadenada por los receptores 5-HT<sub>3</sub> expresa acción de compuerta directa de un canal de iones intrínseco a la propia estructura del receptor. La corriente del interior inducida por el receptor 5-HT<sub>3</sub> posee las características de un canal selectivo de cationes operado por el ligando. La despolarización de la membrana es mediada por incrementos simultáneos de la

conductancia de Na<sup>+</sup> y K<sup>+</sup>. Análisis del receptor 5-HT<sub>3</sub> confirman que funciona como un complejo de canal iónico y receptor equivalente al receptor colinérgico nicotínico. Los receptores 5-HT<sub>3</sub> se han identificado en el SNC y en los ganglios simpáticos, en nervios parasimpáticos y simpáticos aferentes primarios, en neuronas intestinales y en líneas clonales de células derivadas de las neuronas. Las propiedades farmacológicas de los receptores 5-HT<sub>3</sub>, son diferentes de las de otros receptores de la 5-HT (Sanders-Bush y Mayer, 2005).

**Tabla 2. Efectos electrofisiológicos de los receptores de 5-HT.**

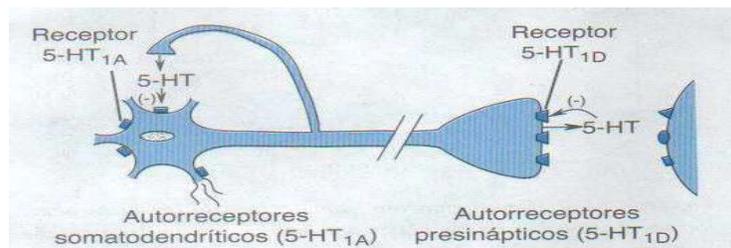
SUBTIPO	REACCIÓN
5-HT <sub>1A,B</sub>	Incremento de la conductancia de K <sup>+</sup> Hiperpolarización
5-HT <sub>2A</sub>	Disminución de la conductancia de K <sup>+</sup> Despolarización lenta
5-HT <sub>3</sub>	Compuerta de Na <sup>+</sup> y K <sup>+</sup> Despolarización rápida
5-HT <sub>4</sub>	Disminución de la conductancia de K <sup>+</sup> Despolarización lenta

(Tomado de Sanders-Bush y Mayer, 2005).

### V.2.2. Receptores 5-HT<sub>1</sub>.

Los cinco miembros de la subfamilia de receptores 5-HT<sub>1</sub> (A, B, D, E y F), están acoplados con las proteínas G (G<sub>i</sub>/G<sub>o</sub>), que inhiben la cascada de señalización de la adenilato ciclasa dando lugar a la disminución de la formación de AMPc y la actividad de la proteína cinasa A (PKA). Por lo menos un subtipo de receptor 5-HT<sub>1</sub>, el 5-HT<sub>1A</sub>, activa también a un canal de K<sup>+</sup>, operado por receptor e inhibe a un canal de Ca<sup>2+</sup>, de compuerta de voltaje, propiedad común a todos los receptores acoplados con la familia de proteínas G<sub>i</sub>/G<sub>o</sub>. El receptor 5-HT<sub>1A</sub> se encuentra en los núcleos del rafe del tallo encefálico, sitio en el que funciona como autorreceptor somatodendrítico de las neuronas serotoninérgicas. Otro subtipo, el receptor 5-HT<sub>1D</sub>, funciona como autorreceptor sobre las terminaciones axonianas e inhibe la liberación de 5-HT. Los receptores 5-HT<sub>1D</sub>, que se expresan de manera abundante en la sustancia nigra y en los ganglios basales, pueden regular la velocidad de activación de las células que contienen dopamina, y la liberación de ésta al nivel de las terminaciones axonianas (Figura 2). No se ha dilucidado el

mecanismo preciso de señalización (transducción de señales) que participa en la inhibición de la liberación de 5-HT por el autorreceptor 5-HT<sub>1D</sub>, aunque la inhibición de los canales de Ca<sup>2+</sup> sensibles a voltaje probablemente contribuye al mecanismo.



**Figura 2. Autorreceptores de la 5-HT, con localizaciones diferenciales.** Los autorreceptores 5-HT<sub>1A</sub> somatodendríticos disminuyen la rapidez de activación (estimulación) de las células del rafe cuando las activa la 5-HT liberada desde las colaterales axonales de la misma neurona, o de las neuronas subyacentes. El subtipo de receptor del autorreceptor presináptico de las terminaciones axonales del encéfalo anterior tiene propiedades farmacológicas distintas y se ha clasificado como 5-HT<sub>1D</sub> (en el ser humano) o 5-HT<sub>1B</sub> (en los roedores). Este receptor regula la liberación de 5-HT. Se identifican también los receptores 5-HT<sub>1</sub> postsinápticos. (Tomada de Sanders-Bush y Mayer, 2005).

### V.2.2.1. Receptores 5-HT<sub>1A</sub>.

Uno de los subtipos más abundante expresado en el cerebro de los mamíferos es el receptor 5-HT<sub>1A</sub>, está presente en las células piramidales y las interneuronas de la corteza cerebral, hipotálamo e hipocampo. Además de ser ampliamente expresado como un receptor postsináptico, el 5-HT<sub>1A</sub> es uno de los principales autorreceptores somatodendríticos en las neuronas serotoninérgicas del rafe, su amplia distribución sugiere que tiene diferentes funciones en el cerebro. El receptor neuronal 5-HT<sub>1A</sub> (pre- y postsináptico) a través de señales de acoplamiento con proteínas Gi/Go inhibe la formación de AMPc, inactiva los canales de Ca<sup>2+</sup>, y activa los canales de K<sup>+</sup>, estos dos efectos iónicos, bloqueados por la toxina de la tos ferina, son independientes del AMPc (Andrade *et al.*, 1986

). El efecto neto de la señalización del 5-HT<sub>1A</sub> es reducir la tasa de disparo neuronal, la liberación de neurotransmisores, y la activación de la PKA. Hay una segunda vía, retroalimentación negativa que implica 5-HT<sub>1A</sub> inducida por la inhibición de las neuronas corticales que envían proyecciones excitatorias

glutamatérgicas para el rafe. El receptor 5-HT<sub>1A</sub> juega un papel inhibitor en las células postsinápticas y con frecuencia se localiza en el cono axónico, el sitio crítico de la iniciación del potencial de acción (Albert and Lemonde, 2004).

La activación de los autorreceptores 5-HT<sub>1A</sub> o el bloqueo de los heteroreceptores 5-HT<sub>1A</sub> reduce los potenciales postsinápticos excitatorios, también se tiene efecto en cambios prolongados en la plasticidad sináptica en diferentes regiones cerebrales. En la zona subgranular del giro dentado, se ha observado que los receptores 5-HT<sub>1A</sub> participan regulando la neurogénesis, dado que la activación de los receptores 5-HT<sub>1A</sub> incrementan el desarrollo de precursores y la proliferación de progenitores neuronales, mostrando también que la neurogenesis disminuye cuando un antagonista interactúa con el receptor. En modelos animales de isquemia y enfermedad de Parkinson, el tratamiento con agonistas del receptor 5-HT<sub>1A</sub> tiene un potencial prometedor en la terapia neuroprotectora, posiblemente por su efecto en la inhibición de receptores NMDA y propiedades neuroprotectoras por su capacidad de hiperpolarización neuronal.

La regulación del potencial de membrana en las neuronas por parte del receptor 5-HT<sub>1A</sub> de igual manera se ha visto asociada con su activación en la membrana de astrocitos en la corteza cerebral, donde se ha propuesto que la interacción de la 5-HT con este receptor presenta una función regulatoria en la actividad de la Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPasa en el cerebro de ratas adultas (Hernández, 1992; Mercado and Hernández, 1992); donde el empleo del agonista serotoninérgico 8-OH-DPAT y antagonista espiperona, específicos para el receptor 5-HT<sub>1A</sub>, evidencian la capacidad de regulación sobre la enzima (Peña *et al.*, 1999).

### **V.3. Transporte a través de membranas.**

La membrana citoplasmática o membrana celular, consiste en una bicapa de fosfolípidos que rodea a la célula y permite la diferenciación entre el medio extracelular e intracelular. Las células requieren nutrientes del exterior, deben eliminar sustancias de desecho procedentes del metabolismo y mantener su

medio interno estable. Para posibilitar este intercambio, la membrana celular presenta una permeabilidad selectiva y mecanismos que permiten a las sustancias cruzar las membranas plasmáticas siendo esenciales para la vida y la comunicación de las células; estos mecanismos los podemos dividir en dos grupos: los que permiten el paso de micropartículas, como son la difusión simple, difusión facilitada, transporte activo, filtración y osmosis, y los que permiten el paso de macropartículas, como la exocitosis y la endocitosis (Guyton and Hall, 2001). La glucosa y los aminoácidos cruzan la membrana celular por transporte facilitado; mediante el incremento del número de transportadores en la membrana, la insulina es capaz de aumentar en más de 10 veces el ingreso de la glucosa a las células (Giovanni *et al.*, 2003).

Las bicapas lipídicas son muy impermeables a la mayoría de moléculas polares; para transportar pequeñas moléculas solubles en agua hacia el interior o hacia el exterior de las células o de los compartimientos intracelulares delimitados por éstas, las membranas celulares contienen varias proteínas de transporte, cada una responsable de transferir un determinado soluto o una clase de solutos a través de la membrana. Hay dos clases de proteínas de transporte a través de membrana, transportadoras y canales. Ambas forman vías continuas de transporte a través de la bicapa lipídica. Mientras que el transporte mediado por proteínas transportadoras, las cuales sufren cambios de conformación de sus moléculas, puede ser activo o pasivo; el mediado por canales es siempre pasivo ya que poseen espacios acuosos a todo lo largo de su estructura molecular y permiten el libre movimiento de ciertos iones y moléculas (Voet *et al.*, 2008).

Las proteínas transportadoras se unen específicamente a solutos y los transfieren a través de la membrana celular mediante cambios conformacionales que exponen el centro de unión al soluto, secuencialmente a un lado de la membrana y al otro. Algunos transportadores sencillamente transportan un soluto a favor de su gradiente, mientras que otros actúan como bombas que transportan un soluto en contra de su gradiente electroquímico, utilizando la energía suministrada por la

hidrólisis del ATP, por el gradiente favorable de otro soluto (como Na<sup>+</sup> o H<sup>+</sup>) o por la luz, para impulsar la serie de cambios conformacionales necesarios de una manera ordenada. Los transportadores pertenecen a un número reducido de familias (Voet *et al.*, 2008). Cada familia comprende proteínas de secuencias de aminoácidos similares, que parece que han evolucionado a partir de una proteína ancestral común, y que actúan mediante un mecanismo semejante. La familia de las ATPasas de transporte de tipo P, que incluye la ubica bomba de sodio y potasio, es un ejemplo importante de ello; cada una de estas ATPasas se autofosforila y desfosforila secuencialmente durante el ciclo de bombeo (Figura 3).

### V.3.1. Transporte iónico.

Los canales iónicos forman poros acuosos a través de la membrana lipídica y permiten que los iones inorgánicos de tamaño y carga adecuados crucen la membrana a favor de sus gradientes electroquímicos a velocidades unas 1000 veces superiores que las que se consiguen mediante un transportador. Los canales están regulados y generalmente se abren transitoriamente en respuesta a una perturbación específica de la membrana, como un cambio en el potencial de membrana (canales regulados por voltaje) o la unión de un neurotransmisor (canales regulados por receptor). Los canales iónicos actúan coordinadamente de formas complejas, controlando el comportamiento de las células excitables eléctricamente principalmente en la membrana del cono axónico (Guyton and Hall, 2001; Siegelbaum and Koester, 2001).

Los canales iónicos situados en la membrana postsináptica suelen ser de dos clases: canales catiónicos que, cuando se abren, permiten el paso, casi siempre, de los iones Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> o Ca<sup>2+</sup>; y canales aniónicos que facilitan el paso de los iones Cl<sup>-</sup>, pero también de diminutas cantidades de otros aniones (Siegelbaum and Koester, 2001). Los canales catiónicos regulados por voltaje son responsables de la generación de potenciales de acción autoamplificados en células como neuronas y fibras musculares. Los canales iónicos regulados por receptor convierten las señales químicas en señales eléctricas en las sinapsis químicas.

Los ionóforos, pequeñas moléculas hidrofóbicas, se emplean en estudios de la célula o orgánulos por las singulares propiedades que poseen para incrementar la permeabilidad de las membranas a determinados iones inorgánicos, produciendo efectos profundos en la función celular y el metabolismo, por ejemplo, hay ionóforos de cationes monovalentes como K<sup>+</sup> que funcionan como antibióticos o de cationes bivalentes que promueven la liberación de serotonina por entrada de Ca<sup>2+</sup> (Woerner *et al.*, 1975).

La bomba de sodio y potasio (Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPasa) junto con los canales de fuga selectivos de K<sup>+</sup> desempeñan un papel importante en el establecimiento del potencial de membrana en reposo de las células. Esta enzima mantiene los gradientes de concentración de Na<sup>+</sup> y K<sup>+</sup>, los cuales en condiciones de reposo presentan una concentración para el Na<sup>+</sup> en el líquido extracelular elevada (142 mEq/L), pero baja dentro de la neurona (14 mEq/L). Una concentración elevada de K<sup>+</sup> dentro del soma neuronal (120 mEq/L), pero reducida en el líquido extracelular (4.5 mEq/L) (Siegelbaum and Koester, 2001).

Todo potencial eléctrico a través de la membrana se opone al paso de los iones, a pesar de las diferencias de concentración entre el interior y el exterior de la membrana, siempre que dicho potencial tenga la polaridad y la magnitud adecuadas. Al potencial que se opone exactamente al desplazamiento de cada clase de iones se le designa como potencial de Nernst para ese ion. Los potenciales de Nernst son fundamentales para comprender la dirección en que cada uno de los iones difunde a través de la membrana, y son esenciales para comprender tanto la excitación como la inhibición de la neurona mediante la activación sináptica de los canales iónicos regulados por receptor. El interior del soma neuronal contiene una solución electrolítica de gran conductividad, el líquido intracelular de la neurona. Además, el diámetro del soma neuronal es grande (de 10 a 80  $\mu\text{m}$ ), lo que descarta casi por completo la resistencia a la conducción de la corriente eléctrica de una parte a otra del soma neuronal. Por tanto, todo cambio de potencial en cualquier parte del líquido intracelular provoca casi exactamente el

mismo cambio de potencial en los demás puntos del soma. Este hecho tiene una importancia fundamental porque desempeña un papel esencial en la integración de las señales que entran en la neurona procedentes de numerosas fuentes (Koester and Siegelbaum, 2001).

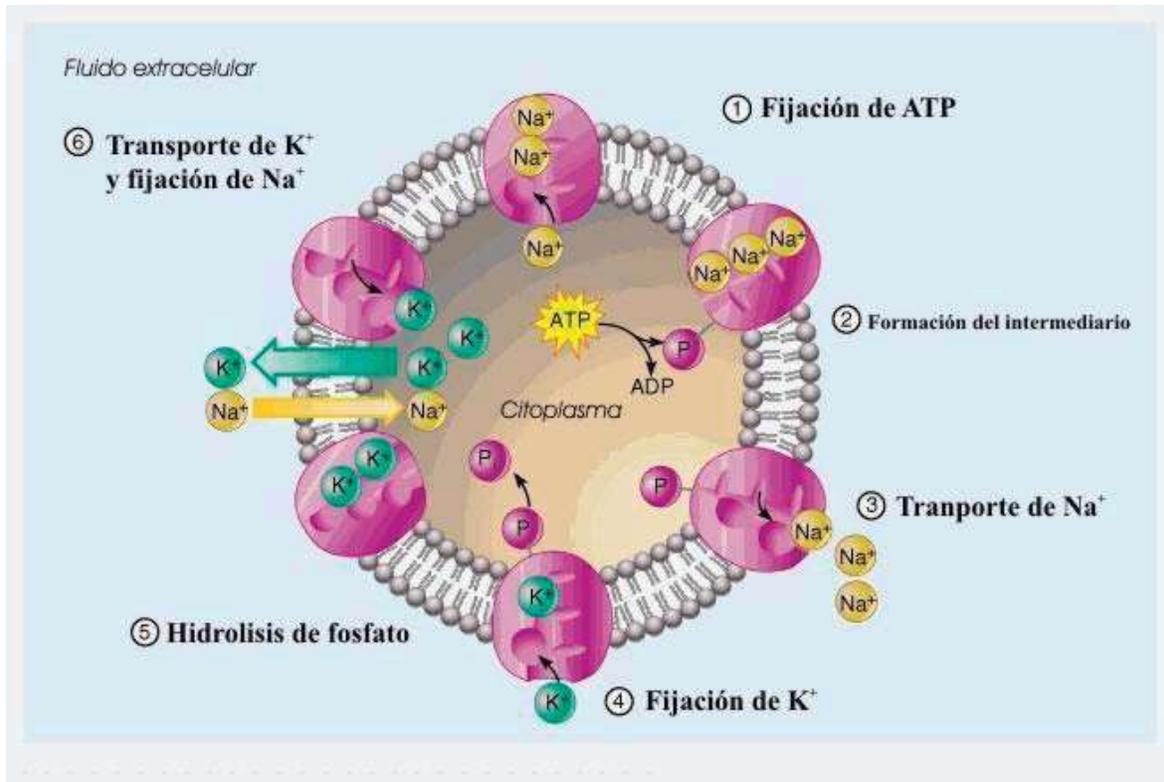
El potencial de membrana en reposo de cualquier punto del soma es de -65 milivoltios. En la terminal sináptica, una vez que ha secretado un neurotransmisor en la hendidura situada entre dicha terminal y la membrana del soma neuronal. Si el transmisor actúa sobre un receptor de membrana excitador, aumentaría la permeabilidad al Na<sup>+</sup>. Debido al elevado gradiente de concentración del Na<sup>+</sup> y la intensa negatividad eléctrica del interior de la neurona, los iones sodio pasan rápidamente al interior de la membrana. La entrada rápida al interior del soma neutraliza parte de la negatividad del potencial de membrana en reposo. Así, el potencial de membrana en reposo ha aumentado, por ejemplo desde -65 a -45 milivoltios, produciéndose un potencial postsináptico excitador despolarizando la membrana. En cuanto aparece el potencial de acción, este avanza hacia la periferia a lo largo del axón y, generalmente, también retrocede hasta el soma (Koester and Siegelbaum, 2001).

Las sinapsis inhibitoras abren sobre todo los canales de Cl<sup>-</sup> y favorecen el paso de estos iones. El potencial de Nernst para los iones cloruro es de -70 milivoltios. Este potencial es más negativo que los -65 milivoltios normales del interior de la membrana neuronal en reposo. Por tanto, al abrirse los canales de Cl<sup>-</sup>, los iones con carga negativa entran desde el líquido extracelular y reducen aun más el potencial interior de la membrana. Por el contrario, si se abren los canales de K<sup>+</sup>, los iones con carga positiva se desplazan al exterior, con lo cual el potencial interior de la membrana se hace asimismo más negativo de lo habitual. En resumen, tanto la entrada de Cl<sup>-</sup>, como la salida de K<sup>+</sup> incrementan la negatividad intracelular, proceso denominado hiperpolarización. La neurona queda inhibida porque el potencial de membrana de -75 milivoltios dista ahora más que nunca del umbral de excitación de -45 milivoltios. Por tanto el aumento de la negatividad más

allá del nivel del potencial de membrana en reposo normal se denomina potencial postsináptico inhibitor (Koester and Siegelbaum, 2001).

### **V.3.1. La Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPasa de las membranas plasmáticas.**

Uno de los sistemas de transporte activo ampliamente estudiados es la Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPasa (sodio-potasio adenosin trifosfatasa, EC 3.6.1.37) de las membranas celulares. Esta proteína se aisló por primera vez en 1957 por Jens Skou, desde entonces la investigación ha determinado muchos de los aspectos estructurales y funcionales de la enzima (Skou, 1992). Es un tetrámero de péptidos ensamblados en pares, una subunidad catalítica principal, designada subunidad  $\alpha$  de una masa molecular de cerca de 110 kDa, que contiene la actividad catalítica de la enzima, pues cuenta con el sitio de unión del ATP y los sitios de fijación de cationes; una glicoproteína auxiliar, conocida como subunidad  $\beta$ , con una masa molecular de 55 kDa que tiene la función de estabilizar la subunidad  $\alpha$ , facilitar su encaminamiento y la inserción en la membrana celular; en algunos tejidos está asociada una subunidad hidrofóbica de peso molecular cercano a los 12 kDa, llamada subunidad  $\gamma$ , de cual se sabe muy poco sobre su función (McDonough *et al.*, 1990). Las secuencias de las subunidades  $\alpha$ , sugieren que esta subunidad tiene 10 segmentos  $\alpha$ -helicoidales transmembrana y dos grandes dominios citoplasmáticos; de modo similar, la subunidad  $\beta$  posee una única hélice transmembranal y un gran dominio extracelular (Jorgensen *et al.*, 2003). La Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPasa tiene 3 isoformas de la subunidad  $\beta$  y 4 isoformas de la subunidad  $\alpha$  que presentan una distribución tejido específica, la existencia de múltiples subunidades catalíticas, cada una expresada en tejidos específicos, sugieren una función particularmente especializada de la enzima (Hsu and Guidotti, 1989).



**Figura 3. Esquema cinético para el transporte activo de Na<sup>+</sup> y de K<sup>+</sup> mediante la Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPasa.** 1.- E<sub>1</sub>\*3Na<sup>+</sup>, que adquiere su Na<sup>+</sup> dentro de la célula, se une al ATP para rendir el complejo ternario E<sub>1</sub>\*ATP\*3Na<sup>+</sup>. 2.- El complejo ternario formado reacciona para dar el intermediario aspartil fosfato de “alta energía” E<sub>1</sub>~P\*3Na<sup>+</sup>. 3.- Este intermedio de “alta energía” se relaja a su conformación de “baja energía”, E<sub>2</sub> – P\*3Na<sup>+</sup>, y libera su Na<sup>+</sup> unido al exterior de la célula, es decir, el Na<sup>+</sup> se transporta a través de la membrana. 4.- El E<sub>2</sub> – P se une a 2K<sup>+</sup> del exterior de la célula para formar E<sub>2</sub> – P\*2K<sup>+</sup>. 5.- El Grupo fosfato se hidroliza rindiendo E<sub>2</sub>\*2K<sup>+</sup>. 6.- El E<sub>2</sub>\*2K<sup>+</sup> cambia su conformación, libera sus 2K<sup>+</sup> en el interior de la célula, y los reemplaza con 3Na<sup>+</sup>, para completar así el ciclo de transporte. (Modificado de Voet *et al.*, 2008)

La enzima se denomina a menudo bomba de sodio y potasio, porque bombea Na<sup>+</sup> hacia el exterior y K<sup>+</sup> hacia el interior de la célula en una relación estequiométrica de 3:2 respectivamente. El ATP intracelular es el sustrato primario, el cual es hidrolizado y convertido a ADP y un grupo fosfato, liberando la energía necesaria para la actividad enzimática. En este caso, la energía liberada induce un cambio en la conformación por la fosforilación de la proteína, con lo cual, una vez unidos los tres cationes de Na<sup>+</sup> a sus lugares de unión intracelular, conlleva su expulsión al exterior de la célula. Esto hace posible la unión de dos iones de K<sup>+</sup> en la cara extracelular que provoca la desfosforilación de la ATPasa, y la posterior

traslocación para recuperar su estado inicial liberando los dos iones de K<sup>+</sup> en el medio intracelular (Voet *et al.*, 2008). La estequiometría global de la reacción de la Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPasa es:



La bomba de sodio y potasio es imprescindible para que exista la vida, por ello se encuentra en todas las membranas celulares, en mayor medida en células excitables, como las células nerviosas y células musculares (Skou, 1992); donde la enzima puede llegar a acaparar dos tercios del total de la energía en forma de ATP de la célula para realizar su función, con lo que restablece el potencial eléctrico de membrana, mantiene los gradientes de Na<sup>+</sup> y K<sup>+</sup> a través de bicapa lipídica, controla el pH y el volumen celular (Magistretti, 2006), además proporciona la fuerza impulsora para el transporte de otros solutos con ayuda de Na<sup>+</sup>, en particular, aminoácidos y glucosa (Giovanni *et al.*, 2003).

La actividad de la Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPasa está disminuida en la membrana celular de muchos tejidos obtenidos de animales diabéticos a nivel periférico entre los que se incluyen riñón, corazón, intestino y nervios periféricos; lugares donde este defecto tiene un papel importante en el desarrollo de las complicaciones de la DM (Ng *et al.*, 1993; Vague *et al.*, 2004). En la DME, los niveles de las isoenzimas  $\alpha$  de la Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPasa varían según la ubicación y la isoforma, pero no hubo cambios significativos en la expresión de las subunidades  $\beta$  (Barada *et al.*, 1994; Egleton *et al.*, 2003). Los componentes de las membranas celulares, los cuales se alteran durante la diabetes, se ha demostrado que juegan un papel importante en la expresión de isoenzimas ( $\alpha$ 1,  $\alpha$ 2,  $\alpha$ 3) al igual que cambios en su afinidad a la ouabaína, lo que influye en la estructura de membrana y la función en el sistema nervioso (Murphy, 1990). La actividad de la Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPasa en el SNC, disminuye tanto en células neuronales como en la glia de cerebelo y corteza cerebral de ratas diabéticas, donde en las células gliales se observó una mayor afección por la diabetes (Lara, 2008; Bautista, 2008).

### V.3.1.1. Modulación de la Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPasa.

La regulación de la Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPasa es compleja, ya que su actividad puede ser regulada por diferentes factores intrínsecos y extrínsecos. Los factores de regulación intrínsecos de la Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPasa son ATP, ouabaina, concentraciones de Na<sup>+</sup> y Mg<sup>2+</sup> intracelulares y K<sup>+</sup> extracelular (Polvani and Blostein, 1989). La bomba de sodio y potasio encontrada en la células del corazón, donde la enzima actúa como un regulador indirecto de la contracción, es una diana importante para glucósidos cardiacos durante la terapia para la insuficiencia cardiaca, donde la ouabaina es un inhibidor específico de la Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPasa (Langer, 1981); de las  $\alpha$ -isoformas,  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$  y  $\alpha_3$  se han descrito en el tejido cardíaco, en el que tienen múltiples funciones y una localización diferente en los diferentes tipos de células o incluso dentro de una sola. Las isoformas presentan sensibilidad variable a la inhibición por los glucósidos cardiacos, la isoforma  $\alpha_1$ , por ejemplo, es menos sensible a ouabaína que las isoformas  $\alpha_2$  y  $\alpha_3$  (Schwinger *et al.*, 2003). Se ha reportado un incremento en la producción por parte de la glándula adrenal de ouabaina endógena en pacientes con falla congestiva del corazón, lo que sugiere que este aumento en la secreción es respuesta compensatoria del organismo (Blaustein *et al.*, 2003).

La regulación extrínseca de la Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPasa en diversos tejidos está bajo el control de una serie de hormonas circulantes y neurotransmisores que participan en el control a corto y largo plazo sobre su actividad (Ewart and Klip, 1995; Peña *et al.*, 1999). La regulación a corto plazo involucra generalmente efectos directos en el comportamiento cinético de la enzima o la translocación de las bombas de sodio entre los depósitos intracelulares y la membrana plasmática. La regulación a largo plazo induce la síntesis de la Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPasa o su degradación. Sustancias como la hormona de la tiroides y aldosterona incrementan la expresión de la bomba de sodio, mientras que las catecolaminas tienen diferentes efectos sobre la actividad de la bomba mediadas por la fosforilación reversible de la subunidad  $\alpha$ , se observa un efecto inhibitorio por dopamina y un efecto estimulante por noradrenalina,

epinefrina y glucagon (Ihlenfeldt, 1981; Ewart and Klip, 1995). La insulina presenta una rápida acción, posiblemente estimula la actividad de la Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPasa al incrementar la distribución subcelular de las bombas, el contenido de Na<sup>+</sup> citoplasmático y también la aparente afinidad de la enzima al sodio (Clausen and Flatman, 1987).

En modelos experimentales de depresión en animales se ha reportado una reducción de la actividad de la Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPasa en el hipocampo, en los cuales después de ser sometidos a un tratamiento de fluoxetina, un inhibidor de la recaptura de serotonina, se ha observado incremento en la actividad de la enzima (Gamero *et al.* 2003). Se observó un aumento en la actividad de la Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPasa, comparando con ratas controles normales, al administrar L-Trp y 5-HTP, o al someter a animales aun esquema de desnutrición, con lo que se induce un aumento en la concentración de 5-HT cerebral, obteniéndose como primera conclusión que la serotonina, directa o indirectamente, está implicada en la activación de la enzima (Hernández, 1979). Cambios en la cinética de la enzima han sido estudiados, los cuales se incrementan en áreas donde existe una alta densidad de terminales serotoninérgicas como la corteza cerebral, y muy baja activación de la Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPasa donde los somas de las neuronas serotoninérgicas están contenidos, demostrando que el sistema de receptores involucrado esta localizado en neuronas destino, células gliales o ambas, sin embargo, el mecanismo preciso de la regulación no se conoce (Hernández, 1992). Poco después, se demostró que uno de los posibles papeles de la 5-HT en la regulación de la Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPasa, puede ser por modificación en la cinética de la enzima por incremento en la velocidad de reacción, donde el efecto de la 5-HT fue selectivo para la Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPasa glial, tanto en fracciones aisladas de cerebro como en cultivo celular, observando dos condiciones distintas para la modulación por 5-HT de la enzima, ya que en membranas neuronales la 5-HT mostró inhibición enzimática (Mercado and Hernández, 1992). Mercado y Hernández (1994), observaron en los conos de crecimiento axonal del cerebro de fetos de rata que la 5-HT no modifico la cinética de la enzima a diferencia de lo que ocurre

en el cerebro adulto, sugiriendo que la regulación de la Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPasa por 5-HT, puede no estar presente en estas tempranas estructuras, pero si observaron un cambio importante en la afinidad al Na<sup>+</sup> por parte de la enzima y en la sensibilidad por ouabaina, mostrando que en complejo enzimático en etapas tempranas del desarrollo se encuentra en un periodo de transición comparado con la configuración adulta. Mediante datos de ensayos bioquímicos y farmacológicos al administrar agonistas de la 5-HT, se demostró que el incremento en la actividad de la enzima es dosis-dependiente, y que la administración de antagonistas serotoninérgicos revertían dicho efecto, sugiriendo que la actividad de la Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPasa en el cerebro de rata es regulada por 5-HT a través de la mediación de receptores específicos; por ejemplo, el agonista serotoninérgico 8-OH-DPAT, específico para el receptor 5-HT<sub>1A</sub>, aumenta la actividad de la bomba de sodio y potasio en la membrana de células gliales de la corteza cerebral, donde el efecto agonista puede ser bloqueado por el antagonista serotoninérgico espiperona (Peña *et al.*, 1999). En un modelo de DME en ratas, se observó en la fracciones de membranas gliales de cerebelo y corteza cerebral que la regulación serotoninérgica en la actividad de la Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPasa está alterada al comparar con animales control (Lara, 2008; Bautista, 2008).

#### **V.4. Diabetes mellitus.**

La diabetes mellitus (DM) es una enfermedad altamente prevalente y con múltiples implicaciones, factores de riesgo y complicaciones, de mal pronóstico tanto en su presentación aislada como con otras patologías. En México se estima que 3.5 millones de personas sufren de DM (10% población adulta), cifra que se ha duplicado en las últimas dos décadas y continuará con esta tendencia de incremento por el envejecimiento de la población, la creciente prevalencia de obesidad, sedentarismo y cambios en la dieta (SSA, 2008). En el 2010, se estimó que alrededor de 220 millones de personas eran diabéticos en el mundo y que llegarán a 370 millones en 2030 (OMS, 2010).

Desde el punto de vista individual, familiar y comunitario, la DM es un estado patológico relevante, ya que produce diversos grados de incapacidad e induce cambios en la dinámica social del individuo, motivados por las incomodidades de un tratamiento y control de por vida. Desde el punto de vista epidemiológico su frecuencia, prevalencia y mortalidad señalan con claridad que se trata de un problema de salud pública de primera magnitud en México. Tan sólo en 2010, el número preliminar de defunciones por DM fue del 14.7% del total de las muertes del país, ocupando con ello el primer lugar como causa de muerte (SSA, 2011).

La DM es una enfermedad metabólica, caracterizada por complicaciones crónicas entre las que destaca la hiperglucemia, manifestación debida a que las células no absorben ni utilizan la glucosa de modo eficiente, por una inadecuada secreción de insulina por las células  $\beta$  del páncreas ó la resistencia de las células a la acción de esta hormona en los diversos tejidos del organismo. Los síntomas de la hiperglucemia marcada incluyen poliuria, polidipsia, pérdida de peso, a veces polifagia, visión borrosa, y la susceptibilidad a ciertas infecciones (ADA, 2011).

Este padecimiento causa diversas alteraciones en el metabolismo de grasas, proteínas y carbohidratos; sus complicaciones agudas como hipoglucemia, cetoacidosis y coma hiperosmolar no cetósico, son consecuencia de un control inadecuado de la enfermedad, mientras que, las complicaciones crónicas como lo son problemas cardiovasculares, nefropatías, retinopatías, neuropatías y daños microvasculares, son consecuencia del progreso de la enfermedad.

Uno de los elementos principales para la investigación tanto epidemiológica como clínica de la DM, y una guía que permita conducir el diagnostico y terapéutica de la enfermedad, es una correcta clasificación. Mediante datos obtenidos en investigaciones realizadas a lo largo de varios años, el comité de expertos de la Asociación Americana de Diabetes (ADA, por sus siglas en ingles), propuso la clasificación de los diferentes tipos de DM en 4 grupos:

1. **DM tipo 1 (DM1)**, destrucción de células beta y posterior deficiencia absoluta de insulina.

La forma de DM autoinmune representa el 5% al 10% de los casos diabéticos y es la resultante de la destrucción autoinmune de las células  $\beta$  pancreáticas; Las principales funciones de las células  $\beta$  son la producción, el almacenamiento y la secreción regulada de insulina. La velocidad de destrucción de las células  $\beta$  pancreáticas es variable, al igual que los periodos de hiperglucemia, los cuales en presencia de causas desencadenantes son capaces de cambiar rápidamente a hiperglucemia grave o a cetoacidosis. La destrucción autoinmune de las células beta tiene múltiples factores de predisposición genética y también se relaciona con factores ambientales poco definidos. Algunos pacientes presentan DM1 idiopática y cursan su enfermedad con insulinopenia y propensión a la cetoacidosis.

2. **DM tipo 2 (DM2)**, desde resistencia a la insulina predominante con deficiencia relativa hasta un defecto secretor de la insulina con resistencia.

Esta forma de DM representa el 90% al 95% de la población diabética y abarca a los sujetos que presentan resistencia a la insulina acompañada por deficiencia relativa. Los pacientes no requieren de insulina en las primeras etapas de la enfermedad y no se observan lesiones autoinmunes en el páncreas. La mayoría de los casos presentan disposición adiposa central u obesidad, y la obesidad en sí misma provoca cierto grado de resistencia a la insulina. La cetoacidosis raramente aparece de forma espontánea; su presencia se asocia con el estrés o con otra enfermedad. Debido a que esta forma de DM cursa sin diagnóstico por varios años, los individuos están en riesgo de presentar complicaciones tanto macrovasculares como microvasculares. La secreción de insulina es defectuosa y no alcanza a compensar la resistencia a la insulina. El riesgo de presentar este tipo de DM aumenta con el envejecimiento, la obesidad y

el sedentarismo. Comúnmente se asocia con una predisposición genética fuerte, aunque esto último no está del todo definido.

### 3. **DM gestacional (DMG).**

Se define como cualquier grado de intolerancia a la glucosa con inicio o primer reconocimiento durante el embarazo. El deterioro de la tolerancia a la glucosa se produce normalmente durante el embarazo, especialmente en el tercer trimestre, la hiperglucemia aumenta el riesgo de resultados perinatales adversos. DMG representa casi el 90% de los embarazos complicados por la diabetes, con incremento de trastornos en la madre (hipertensión, infecciones vaginales y en vías urinarias, parto prematuro y cesárea) y daños graves al bebé (muerte fetal o macrosomía, lo que puede generarle lesiones al momento de pasar por el canal de parto).

### 4. **Otros tipos específicos de DM.**

Varios tipos de diabetes que se manifiestan generalmente a una temprana edad y en alrededor de 2% de los casos diabéticos, comprenden un grupo heterogéneo que abarca los casos de diabetes en los cuales su etiología y la patogénesis no están definidas o se conocen parcialmente. Dichas causas incluyen mutaciones genéticas conocidas; alteraciones en la acción de la insulina por endocrinopatías, actividad de fármacos y agentes químicos; múltiples trastornos en el funcionamiento pancreático debidos a enfermedades, infecciones e intoxicaciones, por las que la proliferación y funcionalidad de las células se afecta; y otras situaciones en que la frecuencia de la diabetes se eleva en grado considerable (ADA, 2011).

#### **V.4.1. Neuropatía diabética**

La polineuropatía diabética es una de las más comunes complicaciones a largo plazo de la DM que afectan a aproximadamente el 50% de todas las personas diabéticas. Las neuropatías que se desarrollan en pacientes con

diabetes son conocidas por su variedad de síntomas, el patrón de afectación neurológica, variables de riesgo, las alteraciones patológicas, y los mecanismos subyacentes (Tesfaye *et al.*, 2010).

La neuropatía periférica diabética (NPD) es una enfermedad crónica, simétrica, dependiente de la longitud de la polineuropatía sensitiva y motora, es la variedad más común. Su desarrollo se asocia con largos periodos de hiperglucemia y trastornos metabólicos asociados (mayor flujo de poliol, la acumulación de productos avanzados de glicación, el estrés oxidativo y alteraciones de los lípidos, entre otras anomalías metabólicas) y factores de riesgo cardiovascular (Dyck *et al.*, 2006). La disfunción autonómica y el dolor neuropático se pueden desarrollar con el tiempo. Alteraciones de la microcirculación, parecen estar asociadas con las alteraciones patológicas de los nervios (Giannini and Dyck, 1994). Esta polineuropatía se ha demostrado que está asociada con la retinopatía y la nefropatía, y se ha propuesto que es estabilizada por el control glucémico riguroso (Dyck *et al.*, 1993).

La neuropatía autonómica diabética es un trastorno del sistema nervioso autónomo presente por los trastornos metabólicos de la DM y que se agrava con la presencia de NPD. La neuropatía autonómica puede afectar a los sistemas: cardiovascular, por cambios de la presión arterial, la obesidad y niveles de colesterol y triglicéridos (Valensi *et al.*, 2003); gastrointestinal, ya que la hiperglucemia aguda demora el vaciado gástrico; el urogenital, la duración de la diabetes se asocia con incontinencia urinaria severa, la neuropatía es una de las principales causas de la disfunción eréctil, así como la glucosilación de las fibras elásticas y disfunción endotelial, factores psicológicos, los medicamentos y cambios hormonales (Várkonyi and Kempler, 2009); y la función de las glándulas sudoríparas, que están inervadas por sudomotoras amielínicas simpáticas, donde la disfunción sudomotoras puede dar lugar a sequedad de la piel y se ha asociado con la ulceración del pie (Tentolouris *et al.*, 2009). Se ha documentado que el control glucémico en DM1 tiene un efecto protector para la neuropatía diabética y

también se recomienda una estrategia multifactorial dirigida a cambiar el estilo de vida con la corrección farmacológica de la hiperglucemia, la hipertensión, la dislipemia y la microalbuminuria (Gaede *et al.*, 1999).

Se sabe que la actividad de la Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPasa esta disminuida en la membrana celular de muchos tejidos obtenidos de animales diabéticos y este defecto tiene un papel importante en el desarrollo de las complicaciones de la DM (Vague *et al.*, 2004). La neuropatía diabética está asociada con reducción en la velocidad de conducción nerviosa y una disminución en la actividad de la Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPasa (Racchah *et al.*, 1994). Este descenso de la actividad de la Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPasa puede estar implicado en las complicaciones de patogénesis y anomalías electrofisiológicas características de la neuropatía en diferentes modelos animales y en humanos (Scarpini *et al.*, 1993).

#### **V.4.2. Diabetes mellitus experimental.**

El estudio de los diversos tipos de diabetes, ha servido para crear modelos de DM experimental (DME) que permiten realizar trabajos de investigación cuyos resultados conducen al desarrollo de técnicas para el diagnóstico, tratamiento y seguimiento de las complicaciones del síndrome, las cuales ayudan a comprender la interacción de los factores hereditarios y ambientales que desencadenan esta enfermedad para lograr un control más oportuno (Juárez, 2008).

La inducción de la DME se ha logrado por medio de diversas técnicas experimentales entre las que destacan: pancreatectomía parcial y total, administración de hormonas e inducción química. El uso de agentes químicos para producir diabetes, permite realizar estudios detallados de los eventos bioquímicos y morfológicos que ocurren durante y después de la inducción del estado diabético. Existen varias clases de agentes químicos. Los primeros son sustancias con citotoxicidad específica que destruyen a las células  $\beta$  del páncreas y causan un estado de deficiencia primaria de insulina. El segundo grupo lo constituyen agentes que actúan sobre las células  $\beta$  pero no las destruyen. Una tercera clase

incrementa los requerimientos endógenos de insulina, debilitan al páncreas y como consecuencias se produce la DME (Rees and Alcolado, 2005).

Los agentes más utilizados son el aloxano y la estreptozotocina (Figura 4). Estos compuestos en dosis diabetogénicas actúan específicamente sobre las células β. La estreptozotocina es sintetizada por *Streptomyces achromogenes*, presenta actividad como antibiótico de amplio espectro y anti-neoplásico, estructuralmente es análoga de la glucosa, cualidad que le ayuda a que el transportador de glucosa GLUT2 le permita el paso a la célula beta de los islotes pancreáticos. Después de su absorción en las células beta, la estreptozotocina se divide en glucosa y una fracción metilnitrosoarea. La molécula metilnitrosoarea tiene propiedades alquilantes, éste modifica macromoléculas biológicas, los fragmentos del ácido desoxirribonucleico (ADN) y destruye las células beta, causando un tipo de DM insulino-dependiente. (Lenzen, 2008; Szkudelski, 2001).

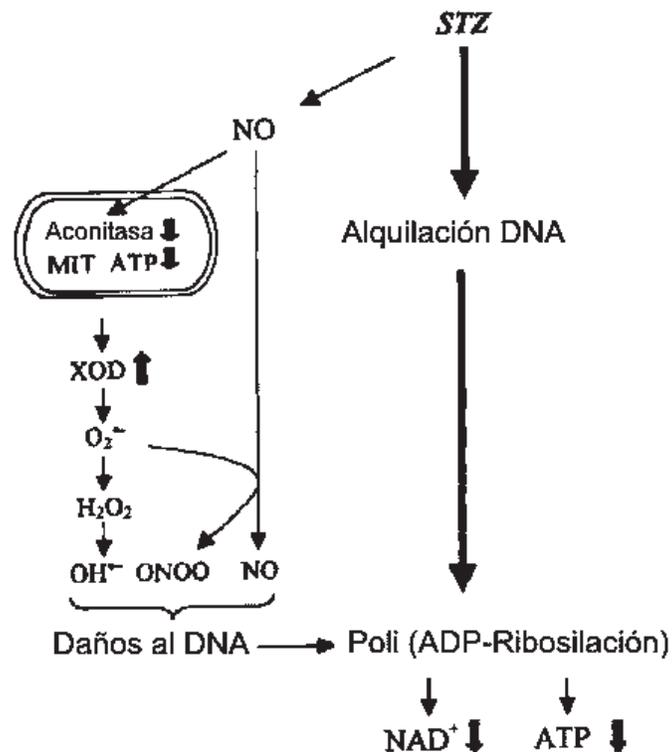


Figura 4. El mecanismo de estreptozotocina induce eventos tóxicos en las células B del páncreas de rata. MIT - mitocondrias; XOD - xantina oxidasa (Tomada de: Szkudelski, 2001)

## VI. JUSTIFICACIÓN.

La DM es un estado patológico que produce diversos grados de incapacidad e induce cambios en la dinámica social del individuo que la padece. Su epidemiología señala con claridad que se trata de un problema de primera magnitud a nivel mundial, del que se predice tiende a incrementarse por el envejecimiento de la población, la creciente prevalencia de obesidad, sedentarismo y cambios en la dieta. La falta de un control adecuado de la DM, principalmente de la glucemia, acelera las complicaciones crónicas de la enfermedad, manifestándose en múltiples fisiopatologías, como la neuropatía diabética. La búsqueda de alteraciones tanto biológicas como químicas en diversas estructuras cerebrales ha sido la pauta para interpretar las repercusiones funcionales que la DM tiene en el SNC, donde se ha observado que afecta a sistemas de neurotransmisión y grupos neuronales específicos; como es el caso del sistema serotoninérgico cerebral, del cual se ha apreciado depresión en la vía biosintética de sus cuerpos neuronales y niveles disminuidos de su neurotransmisor en la corteza cerebral de roedores con DME. La 5-HT participa en procesos de diferenciación del tejido nervioso y en múltiples funciones cerebrales como la regulación de los ciclos de sueño y vigilia, de la termorregulación, del comportamiento psicoemocional y sexual, conducta alimentaria, y en la membrana celular de astrocitos regula la función de la Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPasa, lo que es importante en el equilibrio catiónico y la regulación del potencial de membrana en las neuronas. Todo esto gracias a su interacción con receptores serotoninérgicos, como el receptor 5-HT<sub>1A</sub>, el cual muestra una elevada densidad en la corteza cerebral y al que se le conocen propiedades neuroprotectoras por su capacidad de hiperpolarización neuronal. Se sabe que la actividad de la Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPasa a nivel periférico disminuye en la DM, no se conoce si existen diferencias en la actividad de la enzima en la etapa aguda y en la etapa crónica de la DME, por otro lado no se conoce si la serotonina estimule la actividad de la enzima en ratas con DME por lo cual planteamos la siguiente:

## **VII. HIPÓTESIS.**

En la DME disminuye la actividad de la bomba de sodio y potasio y la serotonina revierte el efecto.

## **VIII. OBJETIVOS.**

### **VIII.1. Objetivo general.**

Determinar si existen cambios en la actividad de la bomba de sodio y potasio en un modelo de DME en las etapas aguda y crónica y su respuesta a la serotonina.

### **VIII.2. Objetivos específicos.**

- Inducir DME en ratas macho adultas.
- Determinar la actividad de la Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPasa en homogeneizado de corteza cerebral de ratas macho con DME.
- Determinar el efecto de agonistas y antagonistas serotoninérgicos de los receptores 5-HT<sub>1A</sub> sobre la actividad de la Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPasa en ratas con DME.

## **IX. MATERIAL Y MÉTODOS.**

### **IX.1. Material biológico.**

Los animales para el presente trabajo fueron ratas macho adultas de la cepa Wistar de 8 semanas de edad con un peso de 200±20 g, las cuales fueron mantenidas en el bioterio del Laboratorio de Neurobiología de la Facultad de Químico Farmacobiología de la U.M.S.N.H., siguiendo los protocolos vigentes para el uso de animales de investigación (SAGARPA, 2001), con alimento y agua *ad libitum*, ciclos de luz y oscuridad de 12 H (7-19 H), temperatura de 24.0±2 °C y humedad relativa de 60.0±5%.

### **IX.2. Inducción de DME.**

Para implementar el modelo de DME, al grupo experimental se le administró estreptozotocina [STZ, N-Methylnitrosocarbamoyl-D-Glucosamine, Sigma] vía intraperitoneal (IP), en dosis única de 55 mg/Kg de peso, disuelta en solución amortiguadora de citratos pH 4.5; al grupo control se le administró un volumen equivalente del vehículo. Para efectuar la medición de la concentración de glucosa en sangre de los animales que conformaron cada grupo, de la vena caudal se obtuvo muestra sanguínea, la cual fue colocada en una tira reactiva para glucómetro (One Touch Ultra) y se registro la lectura de glucemia; los valores normales para glucosa en sangre con este método son de 75-110 mg/dL. Los tiempos de lectura fueron: pre-inducción, 48 horas post-inducción, y cada semana posterior a la administración de la STZ hasta llegar a la octava semana. Se considera etapa aguda de DME hasta la cuarta semana de inducción y crónica a partir de la 4ta semana de inducción de la DME.

### **IX.3. Preparación de los homogeneizados de corteza cerebral.**

Los animales se sacrificaron entre las 9:00 y 12:00 horas por fractura cervical, realizando una incisión media torácica, inmediatamente se perfundió el

cerebro in situ con 20 ml de solución salina isotónica fría que se inyectó en el ventrículo izquierdo del corazón drenando a través de la vena cava inferior.

Los animales fueron decapitados, rápidamente se extrajo el cerebro y se disecó la corteza, la cual se homogeneizó en 10 volúmenes de solución amortiguadora Tris-HCl 50 mM a pH 7.4, con 10 pasos a 700 rpm en un homogeneizador Thomas con vástago de teflón de 0.25 mm de luz. La obtención de corteza cerebral se realizó en ratas con DME de la primera semana, sexta y octava semana de post-inducción, con sus respectivos controles. Se realizó determinación del contenido proteico del tejido de corteza cerebral por el método de Lowry *et al.* (1951) para tener concentraciones finales de 2 µg de proteína/µl. A estos homogeneizados se les midió la actividad específica de la Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPasa como se describe a continuación.

#### **IX.4. Medición de la actividad específica de la Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPasa.**

La actividad de la Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPasa se midió con el método usado por Peña *et al.* (1999), por triplicado de alícuotas de 25 µl del homogeneizado de corteza cerebral equivalentes a 50 µg de proteína. Se preincubó el tejido durante 10 minutos a 37 °C en agitación constante de 150 ciclos por minuto en un incubador metabólico Dubnoff con el amortiguador Tris-HCl 50 mM pH 7.4, MgCl<sub>2</sub> 6 mM, KCl 20 mM, NaCl 120 mM; con H<sub>2</sub>O tridestilada para medir la actividad total o con ouabaina 0.1 mM para medir la actividad indirecta, en un volumen final de 150 µl. Transcurrido el periodo de preincubación se adicionaron 10 µl de agonista, antagonista o ninguno de estos, transcurridos 20 minutos, se adicionó ATP 3mM (adenosin-trifosfato, sal libre de vanadio); finalmente la reacción se detuvo a los 10 minutos adicionando 20 µl de TCA (ácido tricloacético) frío al 50% (w/v) colocando las muestras en una placa de hielo para después centrifugarlas a 600 g durante 10 minutos. Se tomaron 100 µl del sobrenadante para determinar el fosfato inorgánico (Pi) liberado de acuerdo al método de Fiske y SubbaRow (1925), se colocaron en tubos de ensayo que contenían 500 µl de solución de sulfato ferroso al 4%, ácido sulfúrico 1.14 N y molibdato de amonio al 1%, se completo el volumen final con

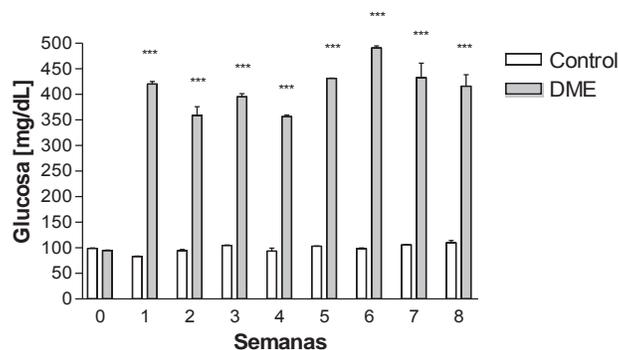
400 µL de agua. El Pi se determinó espectrofotométricamente a 800 nm a los 10 minutos de iniciada la reacción, Las lecturas de absorbencia se extrapolaron en una curva patrón de fosfato de potasio que se corrió en cada experimento. La actividad específica de la Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPasa fue calculada como la diferencia entre la actividad total y la medida en presencia de ouabaína (indirecta).

### **IX.5. Análisis estadísticos.**

Se empleó el programa GradPad Prism 3.0 en la evaluación estadística de los resultados experimentales, así como para realizar su representación gráfica. Las curvas patrón de proteína y de fosfatos se sometieron a regresión lineal, mientras tanto, para las curvas dosis-respuesta se empleo el modelo sigmoidal. Los datos fueron analizados por la prueba de Kolmogorov-Smirnov para verificar la distribución de Gaussiana, y a partir de estos, se calcularon la media aritmética ( $\bar{X}$ ) y la desviación estándar (D.E.). Las comparación de los grupos control y DME fueron evaluadas por la prueba “t” de Student (Motulsky, 2003).

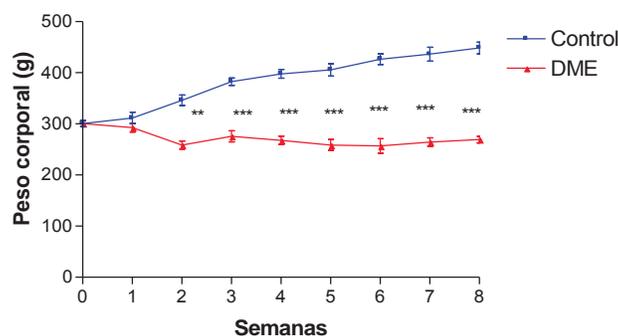
## X. RESULTADOS.

Nuestros resultados muestran que las ratas a las que se implemento el modelo de DME tuvieron aumento significativo de la glucosa sanguínea a partir de las 48 horas posteriores a la aplicación de la STZ en comparación con el grupo control ( $p < 0.001$ ). Se hace notar que el grupo DME, mantuvo un aumento significativo de la concentración de la glucosa en relación con el tiempo de evolución de la enfermedad (Figura 5).



**Figura 5. Niveles de glucosa en sangre en ratas de los grupos control y DME.**  $\bar{X} \pm$  D.E. de 18 ratas de cada grupo. \*\*\* $p < 0.001$

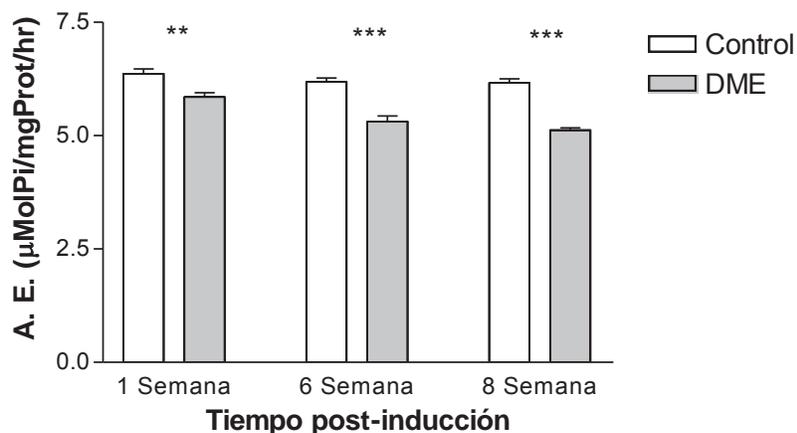
El peso corporal fue significativamente menor en el grupo DME desde la primera semana de la aplicación de la STZ ( $p < 0.05$ ); el déficit fue de 6.0, 39.7 y 39.7% a la 1<sup>a</sup>, 6<sup>a</sup> y 8<sup>a</sup> semana, respectivamente al comparar con el grupo control (Figura 6).



**Figura 6. Peso corporal de ratas control y DME.**  $\bar{X} \pm$  D.E. de 18 ratas de cada grupo \*  $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$

La curva de calibración empleada en la determinación de la concentración de proteína en el homogeneizado de corteza cerebral fue lineal en el rango de concentraciones comprendido entre 10 y 30 µg/µL. La ecuación de la recta se expresó según  $y = 0.0147x + 0.0336$ , su coeficiente de correlación lineal (R) fue de 0.9966. En la determinación del Pi liberado para valorar la actividad de la Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPasa, la curva patrón de fosfatos presentó una ecuación de la recta que se expresó según  $y = 0.0037x + 0.0423$ , con un R = 0.9997 en un rango de concentraciones de 25 a 100 µmol/µl.

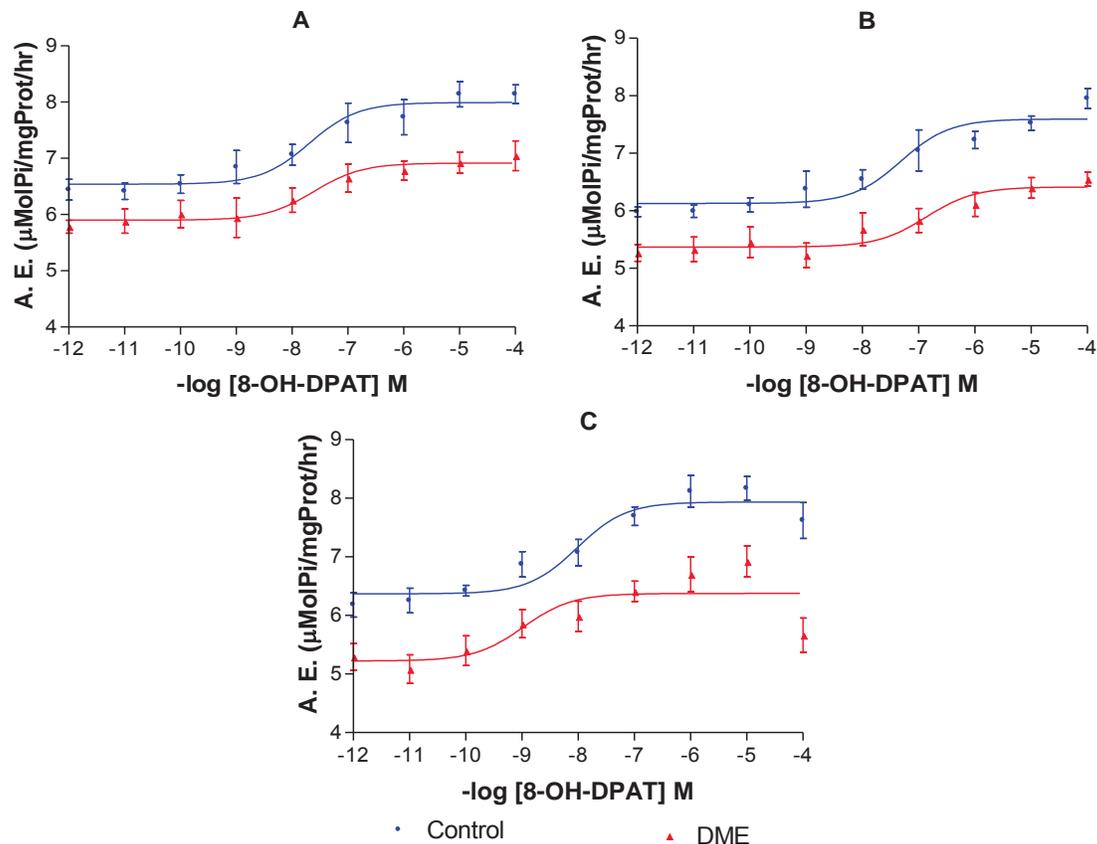
Uno de los parámetros bioquímicos más importantes que se midió en el presente trabajo fue la actividad de la Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPasa en la corteza cerebral de la rata. El grupo DME mostró un descenso significativo en la actividad enzimática a partir de la primera semana de la aplicación de la STZ en comparación con el grupo control ( $p < 0.001$ ); la disminución que se produjo en la actividad de la bomba de sodio y potasio en la corteza cerebral fue progresiva, en un 7.9%, 14.2% y 17.0% a las 1<sup>a</sup>, 6<sup>a</sup> y 8<sup>a</sup>, respectivamente (Figura 7).



**Figura 7. Actividad basal de la Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPasa en homogeneizado de corteza cerebral de ratas.**  $\bar{X} \pm D.E.$  de 12 experimentos realizados por triplicado. \*\* $P < 0.01$  \*\*\* $P < 0.001$ .

Las curvas dosis-respuesta en homogeneizados de corteza cerebral con el agonista del receptor serotoninérgico 5-HT<sub>1A</sub>, el 8-OH-DPAT, (Figura 8), muestran

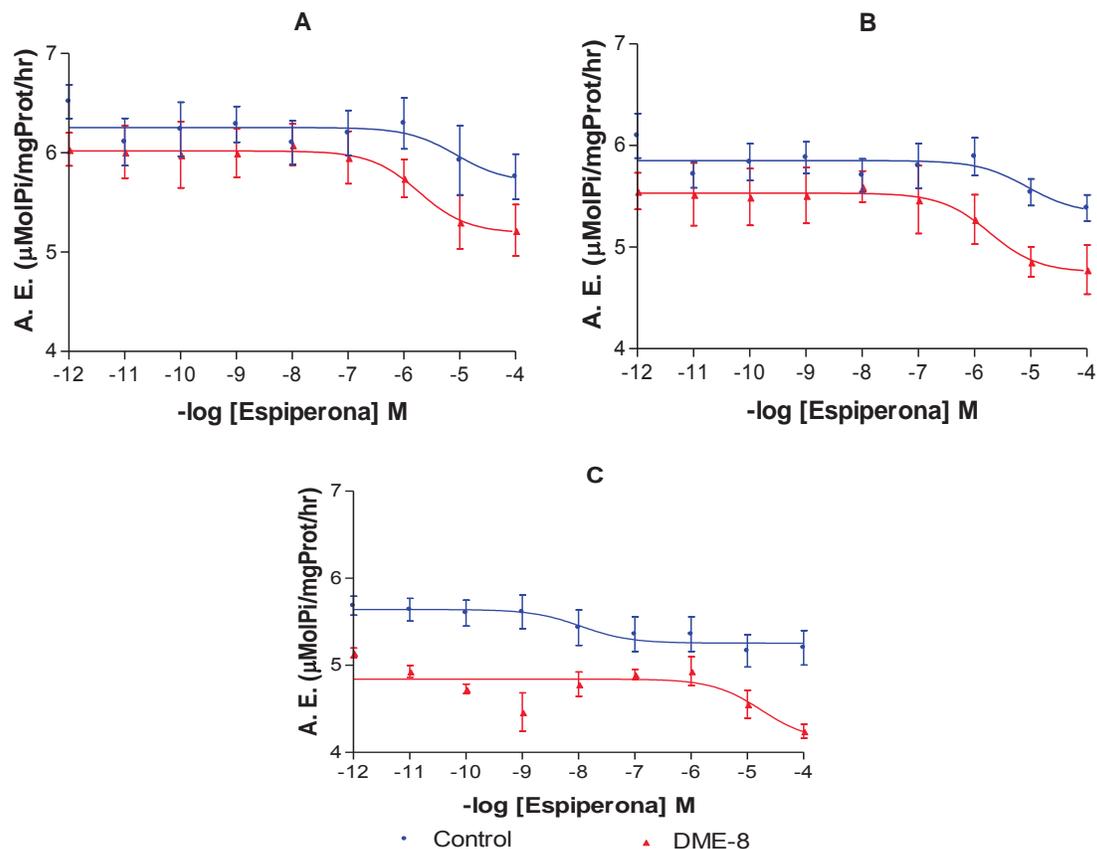
un comportamiento similar en las 3 etapas estudiadas de inducción de la DME. El análisis de las curvas tanto del grupo control como del grupo DME se realizó con un modelo sigmoideal en donde se obtuvo un valor de  $R = 0.9900 \pm 0.010$  ( $p < 0.05$ ), se obtuvieron las dosis efectivas cuando el estímulo alcanza un 50% (DE<sub>50</sub>), las cuales se muestran en la Tabla 3.



**Figura 8. Curvas dosis-respuesta del 8-OH-DPAT sobre actividad de la Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPasa en homogenizado de corteza cerebral. A) 1<sup>a</sup> semana posterior a la administración de STZ, B) 6<sup>a</sup> semana post-inducción de la DME, C) 8<sup>a</sup> semana post-inducción de la DME.  $\bar{X} \pm D.E.$  de 6 experimentos realizados por triplicado.**

La relación dosis-efecto de la espiperona, el antagonista del receptor 5-HT<sub>1A</sub>, con relación a la actividad de la Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPasa de homogeneizado de corteza cerebral, mostró un comportamiento de agonista inverso en las dosis que tenían una mayor concentración del fármaco (Figura 9), por lo cual fue necesario emplear un modelo sigmoideo en el análisis de los datos. El valor de  $R = 0.9829 \pm 0.015$

(p<0.05) sugiere buena aproximación al modelo, en la Tabla 3 se detallan las DE<sub>50</sub> para la espiperona; en la Figura 11-B se observan los porcentajes de inhibición que se presentaron en el grupo DME a la acción del antagonista.



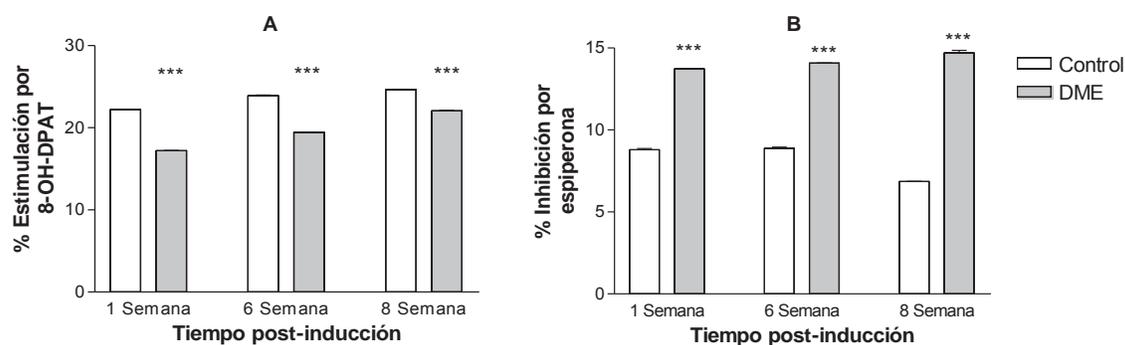
**Figura 9. Curvas dosis-respuesta de espiperona sobre la actividad de la Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPasa en homogenizado de corteza cerebral a diferentes tiempos posteriores a la inducción de DME. A) 1ª semana posterior a la administración de STZ, B) 6ª semana post-inducción de la DME, C) 8ª semana post-inducción de la DME.  $\bar{X} \pm$  D.E. de 6 experimentos realizados por triplicado.**

**Tabla 3. DE<sub>50</sub> de agonista y antagonista del receptor 5-HT<sub>1A</sub> sobre la actividad de la Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPasa en homogenizado de corteza cerebral de rata.**

Fármaco	Tiempo pos-inducción					
	1ª Semana		6ª Semana		8ª Semana	
	Control	DME	Control	DME	Control	DME
8-OH-DPAT	2.03E-08	2.44E-08	4.82E-08	1.37E-07	9.59E-09	1.06E-09
Espiperona	8.71E-06	1.87E-06	8.76E-06	1.87E-06	1.11E-08	1.77E-05

La actividad de la Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPasa en homogeneizados de corteza cerebral incubados con 8-OH-DPAT, agonista selectivo del receptor serotoninérgico 5-HT<sub>1A</sub>, presentó un incremento significativo en los grupos control y DME (p<0.05) cuando se comparo con su respectivo control basal (sin agonista) (Figura 10).

La estimulación de la enzima entre los grupos control y DME con respecto a cada una de las etapas estudiadas fue significativamente diferente (p<0.001).



**Figura 10. Activación e Inhibición de la Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPasa.** A) Estimulación de la enzima por 8-OH-DPAT, B) Inhibición de la bomba de sodio y potasio por espiiperona.  $\bar{X} \pm D.E.$  de 6 experimentos realizados por triplicado. \*\*\*P < 0.0001

El efecto inhibitorio de la espiiperona, respecto a cada etapa estudiada, en la actividad de la Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPasa mostró diferencias significativas entre los grupos control y DME (p<0.001).

## XI. DISCUSIÓN.

La DM es una enfermedad crónica caracterizada por hiperglucemia y complicaciones patológicas como la polineuropatía, su epidemiología señala con claridad que se trata de un problema de salud pública a nivel mundial; en México, se ha clasificado como primer lugar de causa de muerte (Tesfaye *et al.*, 2010; ADA, 2011, SSA, 2011). En el presente estudio, mediante la aplicación de una dosis única de STZ de 55mg/kg vía IP, se implemento un modelo de DME en ratas, obteniendo resultados que mantuvieron relación con el tiempo que duro el experimento como la presencia de hiperglucemia y la pérdida de peso (Figuras 6 y 7), al igual se observaron signos como la polifagia, poliuria y polidipsia; los datos concuerdan con los obtenidos anteriormente en nuestro laboratorio y por otros autores, confirmando la correcta implementación del modelo (Juárez, 2008; Lenzen, 2008).

Desequilibrio en la concentración de iones en el interior y exterior celular, y cambios tanto en la expresión o la actividad de transportadores iónicos son eventos reportados en la DM (Egleton *et al.*, 2003), apreciándose reducción en la velocidad de conducción nerviosa y alteración en la función de la Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPasa, los cuales están implicados en las complicaciones y anormalidades electrofisiológicas características de la neuropatía diabética en diferentes modelos animales de DM y en humanos (Scarpini *et al.*, 1993; Raccah *et al.*, 1994). La actividad de la Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPasa esta disminuida en la membrana celular de muchos tejidos obtenidos de animales diabéticos a nivel periférico entre los que se incluyen riñón, corazón, intestino y nervios periféricos; lugares donde este defecto tiene un papel importante en el desarrollo de las complicaciones de la DM (Ng *et al.*, 1993; Barada *et al.*, 1994; Vague *et al.*, 2004). Se ha querido establecer si los cambios inducidos por la DME sobre la actividad de la enzima observados a nivel periférico pueden ocurrir en el SNC; teniéndose avances donde se ha observado que los componentes de las membranas celulares, los cuales se alteran durante la diabetes, juegan un papel importante en la expresión de las subunidades de la

enzima y en su afinidad a la ouabaína, lo que influye en la estructura de membrana y la función en el sistema nervioso (Murphy, 1990; Egleton *et al.*, 2003). Estudios realizados anteriormente de nuestro laboratorio, han demostrado que la DME disminuye la actividad de la Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPasa tanto en células neuronales como en células gliales de cerebelo y corteza cerebral de ratas, donde en las membranas gliales se observó una mayor afección por la diabetes (Lara, 2008; Bautista, 2008).

Resultados obtenidos en este estudio, mostrados en la Figura 8, confirman informes anteriores de que en la DME en ratas se asocia con una disminución en la actividad de la Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPasa en las membranas celulares de diversos tejidos (Ng *et al.*, 1993; Raccah *et al.*, 1994; Vague *et al.*, 2004; Lara, 2008; Bautista, 2008); la reducción de la actividad de la enzima en el homogeneizado de corteza cerebral es progresiva conforme la evolución de la enfermedad, alcanzando hasta un 17.0% de inhibición por la afección diabética en la etapa final del estudio, donde los valores de hiperglucemia en las ratas con DME se mantuvieron (Figura 6). La comparación de la actividad de Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPasa en una etapa de diabetes aguda (una semana post-inducción) con respecto a etapas de diabetes crónica (sexta y octava semanas post-inducción), sugiere que las alteraciones en las diversas funciones celulares pueden ocurrir por cambios del balance energético donde se promueven mecanismos de catabolismo anaeróbico, con aumento en la producción de especies reactivas de oxígeno y reducción de antioxidantes, que pueden dañar estructuras fundamentales de la célula, como se ha observado en animales con DME no controlada (Raccah *et al.*, 1998).

Las células gliales tienen una participación primordial, ya que restauran los gradientes iónicos y regulan el balance energético, modulando mecanismos celulares básicos de la actividad neuronal y sus sinapsis, además de mantener aislados los axones por mielina para permitir que las señales viajen a la velocidad adecuada (Magistretti, 2006). Si la Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPasa falla en células que integran la glía, como lo son los astrocitos, se tendrá un retardo en la remoción de

neurotransmisores e iones de la hendidura sináptica, donde la naturaleza propia del tipo de sinapsis determinara que las neuronas permanezcan despolarizadas o hiperpolarizadas por tiempos mayores, trayendo con ello grandes consecuencias así como daños irreversibles.

La regulación de la Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPasa es compleja, su actividad es modulada por diferentes factores intrínsecos y extrínsecos, entre los que se incluyen hormonas y neurotransmisores, como serotonina, los cuales participan tanto en el control a corto y largo plazo sobre su actividad (Hernández, 1992; Ewart and Klip, 1995). La regulación Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPasa por 5-HT se lleva a cabo principalmente a través de su interacción con receptores serotoninérgicos, observándose una modulación diferente en los diversos tipos celulares que integran el SNC (Mercado and Hernández, 1992; Peña *et al.*, 1999); en las células cerebrales se expresan múltiples subtipos de receptores de 5-HT, y además, la distribución de las subunidades catalíticas de la enzima es tejido específica, se puede sugerir con ello, una función particularmente especializada entre estos dos sistemas (Hsu and Guidotti, 1989; Wong *et al.*, 2005). El 8-OH-DPAT y espiperona, agonista y antagonista del receptor 5-HT<sub>1A</sub> respectivamente, han sido utilizados en múltiples investigaciones para identificar y valorar la participación del receptor serotoninérgico en las diversas funciones del SN (Albert and Lemonde, 2004). Se ha observado que la regulación por 5-HT en la actividad de la enzima está presente en etapas adultas, siendo predominante dicha regulación en las células gliales del cerebro de rata, donde la participación del receptor 5-HT<sub>1A</sub> mostró la mayor activación de la enzima en homogeneizado de corteza cerebral (Mercado and Hernández, 1994; Peña *et al.*, 1999). Bautista (2008), demostró que en la fracciones de membranas gliales de la corteza cerebral de ratas diabéticas la regulación serotoninérgica en la actividad de la Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPasa está alterada al comparar con animales control, donde en membranas neuronales la respuesta a la 5-HT por parte de la enzima fue mínima.

La actividad de la Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPasa en el homogeneizado de corteza cerebral de ratas con DME fue restaurada parcialmente a valores basales del modelo control en concentraciones de 8-OH-DPAT que superan por mucho la DE<sub>50</sub> determinada para el fármaco en las distintas etapas estudiadas (Figura 9 y Tabla 3). Este hecho implica, que entre los sistemas de 5-HT y la Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPasa, la afección causada por la DME no se corrige completamente con la activación del receptor 5-HT<sub>1A</sub>, pero si podría contribuir a mejorar la remoción de neurotransmisores e iones de la hendidura sináptica por parte de los astrocitos, así como de favorecer una mejora en el balance energético (Magistretti, 2006). Las anomalías de la Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPasa producidas en la DME han sido relacionadas con las implicadas en la patogénesis de la neuropatía diabética en humanos (Scarpini et al. 1993; Raccah et al., 1996). Es posible que la DME involucre un mecanismo de regulación a la baja de largo plazo por dos vías, donde primeramente la rápida acción de la insulina implicada con cambios en la distribución subcelular de las unidades de la bomba, estará disminuida por la carencia de la hormona (Ewart and Klip, 1995), y segundo, porque se ha señalado que en la corteza cerebral de ratas diabéticas los niveles de 5-HT están disminuidos (Manjarrez *et al.*, 2000). Esta regulación a la baja manifiesta de forma crónica, podría disminuir el número de bombas por disminución de su síntesis o por el incremento en la degradación proteica.

Por otro lado en relación con la disminución de la actividad de la bomba de sodio y potasio en ratas con DME, los niveles de las isoenzimas  $\alpha$  de la Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPasa varían según la ubicación y la isoforma (Ng *et al.*, 1993; Barada *et al.*, 1994). La disminución de la Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPasa en la corteza cerebral se podría correlacionar con disminución de expresión de la isoforma  $\alpha 2$ . A diferencia de lo observado en el nervio ciático, músculo cardíaco y esquelético donde las isoformas  $\alpha 1$  y  $\alpha 3$  cambian sus niveles de expresión y  $\alpha 2$  no (Ng et al., 1993; Gerbi et al., 1997; Veret al, 1997). Este hallazgo está de acuerdo con estudios que muestran reducción de la actividad de la Na, K-ATPasa del 40% en la DM (Raccah et al, 1994).

## **XII. CONCLUSIÓN.**

En la DME disminuye la actividad de la bomba de sodio y potasio por disminución de los niveles de expresión de la subunidad catalítica.

## **XIII. PERSPECTIVAS.**

Determinar los niveles de expresión de las isoformas de la bomba de sodio y potasio.

## XIV. BIBLIOGRAFÍA.

- Albert PR and Lemonde S. 2004. 5-HT<sub>1A</sub> Receptors, Gene Repression, and Depression: Guilt by Association. *Neuroscientist*, 10: 575-593.
- American Diabetes Association (ADA). 2011. Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care*, 33: 62-69.
- Andrade R., Malenka RC, and Nicoll RA. 1986. A G protein couples serotonin and GABA-B receptors to the same channels in hippocampus. *Science*. 234: 1261-1265.
- Barada K, Okolo C, Field M, Cortas N. 1994. Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase in diabetic rat small intestine. Changes at protein and mRNA levels and role of glucagon. Barada et al., 1994 *J. Clin. Invest.* 93(6): 2725-2731.
- Bautista CS. 2008. Efecto de la serotonina sobre la actividad de la bomba de sodio y potasio en corteza cerebral de ratas con DM1. Tesis de licenciatura. Facultad de Químico Farmacobiología, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Morelia, Mich., México.
- Berger M, Gray JA, Roth BL. 2009. The expanded biology of serotonin. *Annu. Rev. Med.* 60: 355-366.
- Blaustein MP, Robinson SW, Gottlieb SS, Balke CW, Hamlyn JM. 2003. Sex, digitalis, and the sodium pump. *Mol. Interv.* 3(2): 68-72.
- Bloom FE. 2005. Neurotransmisión y sistema nervioso central, en Goodman & Gilman, las bases farmacológicas de la terapéutica. Hardman JG, Limbird LE, and Gilman AG (Eds). 11<sup>a</sup> ed. Edit. McGraw-Hill. Cap 12. pp 317-340
- Buck LB. 2000. Olfato y gusto: los sentidos químicos, en Principios de Neurociencias. Kandel E. R., Schwartz J.H., Jessell T. M (Eds.), Mc Graw Hill. Capítulo 32, pp. 635-645.
- Chua JE, Kindler S, Boyken, J., and Jahn, R. 2010. The architecture of an excitatory synapse. *J. Cell Sci.* 123: 819-823.
- Clark CM, Lee DA. 1995. Prevention and treatment of the complications of diabetes mellitus. *N. Eng. J. Med.* 332(18): 1210-1217.
- Clausen T., and Flatman JA. 1987. Effects of insulin and epinephrine on Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> and glucose transport in soleus muscle. *Am. J. Physiol.* 252(4): 492-499.

- Crandall EA, Gillis MA, and Fernstrom, JD. 1981. Reduction in brain serotonin synthesis rate in streptozotocin-diabetic rats. *Endocrinology*. 109(1): 310-312.
- Dyck PJ, Davies JL, Clark VM, Litchy WJ, Dyck PJ, Klein CJ, Rizza RA, Pach JM, Klein R, Larson TS, Melton LJ 3rd., and O'Brien PC. 2006. Modeling chronic glycemic exposure variables as correlates and predictors of microvascular complications of diabetes. *Diabetes Care*. 29: 2282–2288.
- Dyck PJ, Kratz KM, Karnes JL, Litchy WJ, Klein R, Pach JM, Wilson DM, O'Brien PC, Melton LJ 3rd., Service FJ. 1993. The prevalence by staged severity of various types of diabetic neuropathy, retinopathy, and nephropathy in a population-based cohort: the Rochester Diabetic Neuropathy Study. *Neurology*, 43: 817–824.
- Egleton RD, Campos CC, Huber JD, Brown RC, Davis TP. 2003. Differential effects of diabetes on rat choroid plexus ion transporter expression. *Diabetes*, 52: 1496 –1501.
- Ewart HS. and Klip A (1995). Hormonal regulation of the Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase: mechanisms underlying rapid and sustained changes in pump activity. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 269(2): C295-C311.
- Filip M, Bader M. 2009. Overview on 5-HT receptors and their role in physiology and pathology of the central nervous system. *Pharmacological Reports*. 61: 761-777.
- Fiske CH and SubbaRow, Y. 1925. The Colorimetric Determination of Phosphorus *J. Biol. Chem.* 66: 375–400.
- Gaede P, Vedel P, Parving HH, and Pedersen, O. 1999. Intensified multifactorial intervention in patients with type 2 diabetes mellitus and microalbuminuria: the Steno type 2 randomized study. *Lancet*, 353: 617–622.
- Gamaro GD, Streck EL, Matté C, Prediger ME, Wyse ATS and Dalmaz C. 2003. Reduction of Hippocampal Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase Activity in Rats Subjected to an Experimental Model of Depression. *Neurochemical Research*. 28(9): 1339-1344.
- Gershon MD. 2009. Enteric serotonergic neurones ... finally!. *J. Physiol.* 587(3): 507.
- Giannini C, Dyck PJ. 1994. Ultrastructural morphometric abnormalities of sural nerve endoneural microvessels in diabetes mellitus. *Ann Neurol*. 36:408–415.

- Giovanni E. Mann, David L. Yudilevich, and Luis Sobrevia. 2003. Regulation of Amino Acid and Glucose Transporters in Endothelial and Smooth Muscle Cells. *Physiol Rev.* 83: 183 - 252.
- Guyton AC., and Hall JE. 2001. Tratado de fisiología medica. 10<sup>a</sup> ed. McGraw-Hill Interamericana Editores, S.A. de C.V. México D.F. Capítulos 4, 5, 45, 55: 47-77, 621-638, 765-779.
- Hernández J. 1979. Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase activity in the brain cortex of rats ontogenetically malnourished, and treated with serotonin precursors. *Brain Res.* 62(2): 348-52.
- Hernández J. 1992. Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase regulation by neurotransmitters. *Neurochem Int.* 20(1): 1-10.
- Hernández J., Mercado, R, and Peña, MT. 1998. Regulation of Glial Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPasa by Serotonin: Identification of Participating Receptors. *Neurochemical Research*, 5: 643-649.
- Hsu YM, Guidotti G. 1989. Rat brain has the alpha 3 form of the Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase. *Biochemistry*, 28(2): 569-573.
- Ihlenfeldt MJ. 1981. Stimulation of Rb<sup>+</sup> transport by glucagon in isolated rat hepatocytes. *J. Biol. Chem.* 256(5): 2213-2218.
- Jorgensen PL, Håkansson KO, and Karlsh SJD. 2003. Structure and mechanism of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase: Functional sites and their interactions. *Annual Review of Physiology*, 65: 817-849.
- Juárez BE. 2008. Implementación de un modelo de diabetes mellitus tipo 1. Tesis de licenciatura. Facultad de Químico Farmacobiología, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Morelia, Mich., México.
- Kandel ER. 2001. Cerebro, neuronas y conducta, en Principios de Neurociencia. Kandel ER, Schawartz JH y Jessell TH (Eds). McGraw-Hill, Capítulos 2 y 3, pp. 5-35.
- Koester J, and Siegelbaum SA. 2001. Potencial de membrana, en Principios de Neurociencia. Kandel ER, Schawartz JH y Jessell TH (Eds). McGraw-Hill, Capítulo 7: 125-139.
- Langer GA. (1981). Mechanism of action of the cardiac glycosides on the heart. *Biochem. Pharmacol.* 30(24): 3261-3264.
- Lara L. 2008. Diabetes mellitus experimental: actividad de la bomba de sodio y potasio en cerebelo de ratas macho. Tesis de licenciatura. Facultad de

Químico Farmacobiología, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Morelia, Mich., México.

- Lenzen S. 2008. The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes. *Diabetologia*, 51(2): 216–226.
- Locher CP, Ruben PC, Gut J, Rosenthal PJ. 2003. 5HT<sub>1A</sub> serotonin receptor agonists inhibit Plasmodium falciparum by blocking a membrane channel. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47(12): 3806-3809.
- López VE, Mancilla JM, Rito M, Jiménez AG, and Díaz, D. 2010. Administración del 8-OH-DPAT en el núcleo ventromedial hipotalámico: caracterización de la conducta alimentaria. *Revista Mexicana de Análisis de la Conducta.* 2: 21-37.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Lewis A, and Randall, RJ. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.
- Magistretti PJ. 2006. Neuron–glia metabolic coupling and plasticity. *The Journal of Experimental Biology*, 209: 2304-2311.
- Magistretti, P. J. and Pellerin, L. 1999. Cellular mechanisms of brain energy metabolism and their relevance to functional brain imaging. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 354: 1155-1163.
- Magistretti, P. J., Pellerin, L., Rothman, D. L. and Shulman, R. G. (1999). Energy on demand. *Science*, 283: 496-497.
- Manjarréz G, Herrera JR, Molina A, Bueno S, González M, Hernández J. 2000. Cambios en la biosíntesis de serotonina cerebral en ratas con diabetes mellitus inducida por estreptozotocina: efecto del tratamiento con insulina *Rev. Invest. Clin.* 52(5): 509-516.
- Manjarréz G, Herrera JR, Molina A, Bueno S, González M, Hernández, J. 1999. Alteraciones en la síntesis de serotonina cerebral inducidas por diabetes mellitus insulino-dependiente *Rev. Invest. Clin.* 51(5): 293-302.
- McDonough AA, Geering K, and Farley, RA. (1990). The sodium pump needs its beta subunit. *FASEB J.* 14(6): 1598-605.
- Mercado CP and Kilic, F. 2010. Molecular Mechanisms of SERT in Platelets: Regulation of Plasma Serotonin Levels *Mol. Interv.* 10: 231-241.
- Mercado R, Hernández, J. 1992. Regulatory role of a neurotransmitter (5-HT) on glial Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase in the rat brain. *Neurochem. Int.* 21(1): 119-127.

- Mercado R, Hernández, J. 1994. Biochemical properties of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase in axonal growth cone particles isolated from fetal rat brain. *Int. J. Dev. Neurosci.* 12 (5): 485-489.
- Motulsky HJ. 2003. Prism 4 Statistics Guide –Statistical analyses for laboratory and clinical researches. GraphPad Software Inc.
- Murphy MG. 1990. Dietary fatty acids and membrane protein function. *J. Nutr Biochem.* 1(2): 68-79.
- Ng YC, Tolerico PH, Book CB. 1993. Alterations in levels of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase isoforms in heart, skeletal muscle, and kidney of diabetic rats. *Am. J. Physiol.* 265(2 Pt 1): E243-251.
- Organización Mundial de la Salud (OMS). 2011. Diabetes. Nota descriptiva N°312 [En línea: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs312/es/index.html>].
- Peña MT, Mercado R and Hernández J. 1999. Regulation of Glial Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase by Serotonin: Identification of Participating Receptors. *Neurochemical Research.* 24(5): 643-649.
- Polvani C, Blostein R. (1989). Effects of cytoplasmic sodium concentration on the electrogenicity of the sodium pump. *J Biol Chem.* 264(26): 15182-15185.
- Racchah D, Coste T, Cameron NE, Dufayet D, Vague P, Hohman TC. 1998. Effect of the aldose reductase inhibitor tolrestat on nerve conduction velocity, Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase activity, and polyols in red blood cells, sciatic nerve, kidney cortex, and kidney medulla of diabetic rats. *J Diabetes Complications.* 12(3): 154-162.
- Racchah D, Lamotte-Jannot MF, Issautier T, Vague P. 1994. Effect of experimental diabetes on Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase activity in red blood cells, peripheral nerve and kidney. *Diabete Metab.* 20(3): 271-274.
- Rees DA, Alcolado JC. 2005. Animal models of diabetes mellitus. *Diabet Med.* 22(4): 359-370.
- Sanders-Bush E, Mayer SE. Agonistas y antagonistas de receptores 5-hidroxitriptamina, en Goodman & Gilman, las bases farmacológicas de la terapéutica. Hardman JG, Limbird LE, and Gilman AG (Eds). 11ª ed. Edit. McGraw-Hill. Cap 11. pp 297-315.
- Scarpini E, Bianchi R, Moggio M, Sciacco M, Fiori MG, Scarlato G. 1993. Decrease of nerve Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase activity in the pathogenesis of human diabetic neuropathy. *J Neurol Sci.* 120(2): 159-67.

- Schwartz JH, Westbrook GL. 2001. Citología de las neuronas, en Principios de Neurociencia. Kandel ER, Schawartz JH y Jessell TH (Eds). McGraw-Hill, Capítulo 4: 67-86.
- Schwinger RH, Bundgaard H, Müller-Ehmsen J, Kjeldsen K. (2003) The Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase in the failing human heart. *Cardiovasc Res.* 57(4): 913-20.
- Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA). 2001. NORMA Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. Diario Oficial de la Federación.
- Secretaría de Salud de México (SSA). 2008. Principales causas de mortalidad general, 2008. Dirección General de Información en Salud. [En línea: [http://www.sinais.salud.gob.mx/descargas/xls/m\\_005.xls](http://www.sinais.salud.gob.mx/descargas/xls/m_005.xls)] Correlacionado con la base de datos de población 2010 del INEGI [En línea: <http://www.inegi.org.mx/sistemas/sisep/Default.aspx?t=mdemo86&s=est&c=17498>]
- Secretaria de Salud de México (SSA). 2011. Diabetes mellitus, uno de los grandes retos en materia de Salud. Comunicado de prensa No. 088 [En línea: [http://portal.salud.gob.mx/redirector?tipo=0&n\\_seccion=Boletines&seccion=2011-03-17\\_5105.html](http://portal.salud.gob.mx/redirector?tipo=0&n_seccion=Boletines&seccion=2011-03-17_5105.html)]
- Siegelbaum SA, Koester J. 2001. Canales iónicos, en Principios de Neurociencia. Kandel ER, Schawartz JH y Jessell TH (Eds). McGraw-Hill, Capítulo 7: 125-139. Capítulo 6: 105-123.
- Skou JC. 1992. The Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> Pump. *Physiology.* 7(3): 95-100.
- Szkudelski T. 2001. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. *Physiol Res.* 50(6): 537-46.
- Tentolouris N, Marinou K, Kokotis P, Karanti A, Diakoumopoulou E, Katsilambros N. 2009. Sudomotor dysfunction is associated with foot ulceration in diabetes. *Diabet Med.* 26: 302–305.
- Tesfaye S, Boulton AJM, Dyck PJ, Freeman R, Horowitz M, Kempler P, Lauria G, Malik RA, Spallone V, Vinik A, Bernardi L, Valensi P, and on behalf of the Toronto Diabetic Neuropathy Expert Group. 2010. Diabetic Neuropathies: Update on Definitions, Diagnostic Criteria, Estimation of Severity, and Treatments *Diabetes Care.* 33: 2285-2293.
- Therien AG and Blostein R. 2000. Mechanisms of sodium pump regulation. *Am J Physiol Cell Physiol* 279: 541-566.

- Trulson ME, MacKenzie RG. 1980. Increased tryptophan hydroxylase activity may compensate for decreased brain tryptophan levels in streptozotocin-diabetic rats. *J Pharmacol Exp Ther.* 212(2): 269-73.
- Vague P, Coste TC, Jannot MF, Raccach D, and Tsimaratos M. (2004). C-peptide, Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase, and Diabetes. *Exp Diabetes Res.*; 5(1): 37–50.
- Valensi P, Pariès J, Attali JR. 2003. French Group for Research and Study of Diabetic Neuropathy. Cardiac autonomic neuropathy in diabetic patients: influence of diabetes duration, obesity, and microangiopathic complications—the French multicenter study. *Metabolism.* 52: 815–820.
- Várkonyi T and Kempler P. 2009. Erectile Dysfunction. In *Diabetes in Old Age*. 3rd ed. Sinclair A: Ed. New York, John Wiley & Sons. 149–164.
- Voet D, Voet JG, Pratt C., 2008, *Fundamentos a bioquímica: la vida a nivel molecular*. 2ª Ed. Médica Panamericana. Capítulo 10: Pág. 284-311.
- Walther DJ, Peter JU, Bashammakh S, Hortnagl H, Voits M, Fink H and Bader M (2003). Synthesis of Serotonin by a Second Tryptophan Hydroxylase Isoform. *Science* 299: 5603-5676.
- Woerner P., Brossmer R. 1975. Selective release of serotonin from platelets by diffusion facilitated by the ionophore X537A. *Thrombosis Research*, 7(4): 567-577.
- Wong DT, Perry KW and Bymaster FP. (2005). The Discovery of Fluoxetine Hydrochloride (Prozac). *Nature Reviews Drug Discovery.* 4: 764-774.