



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE  
SAN NICOLAS DE HIDALGO**

---

FACULTAD DE QUIMICO FARMACOBIOLOGIA  
PROGRAMA INSTITUCIONAL DE MAESTRIA EN CIENCIAS BIOLOGICAS  
BIOTECNOLOGIA ALIMENTARIA

**“REGULACION DE LA EXPRESION DE LAS ISOFORMAS ALFA DE LA  
BOMBA DE SODIO Y POTASIO POR SEROTONINA EN CEREBELO DE  
RATAS CON ESTRES NUTRICIONAL”**

**PRESENTA:**

Q.F.B. GUSTAVO NAVA GERONIMO

**ASESOR:**

D.C. ROSALIO MERCADO CAMARGO

**COMITE TUTORAL:**

D.C. JOEL E. LOPEZ MEZA

D.C. ALEJANDRA OCHOA ZARZOSA

D.C. HECTOR E. MARTINEZ FLORES

D.C. DANIEL GODINEZ HERNANDEZ

Morelia Michoacán, Abril del 2012

El presente trabajo fue realizado en el laboratorio de Neurobiología de la Facultad de Químico Farmacobiología de la UMSNH, bajo la asesoría del Dr. Rosalío Mercado Camargo. Para su realización se contó con el apoyo de la Coordinación de la Investigación Científica de la UMSNH (CIC 2012) y CONACYT (Beca 239232).

## **AGRADECIMIENTOS**

A todos mis compañeros y amigos del laboratorio de Neurobiología, que me apoyaron durante todo el tiempo que duró la realización de este trabajo, con sus consejos, su trabajo y su compañía: Susana, Jaime, Angélica, Blanca, Gaby y al Dr. Omar Guzmán.

A mi asesor de tesis, al Dr. Rosalío Mercado que confió en mí y me permitió realizar este trabajo, por su constante apoyo, la dedicación del tiempo y los consejos que me dio. A la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo que me dio la oportunidad de estudiar una carrera profesional y un postgrado.

## **DEDICATORIA**

Este trabajo lo dedico a mi familia, la familia Nava Gerónimo, que me ha apoyado en cada etapa de mi vida, que me ha dado la mejor herencia que es mi educación, los mejores consejos y enseñanzas de mi vida.

A mis padres Roberto Nava Nicolás y Patricia Gerónimo Martínez

A mis hermanos Delia, Francisco y Susana

A mi novia Lupita Maldonado, que siempre me dio palabras de aliento en los momentos difíciles, que me apoyo con su tiempo y compañía.

# INDICE

# Página

AGRADECIMIENTOS.....	ii
i. INDICE DE FIGURAS .....	vi
ii. INDICE DE TABLAS .....	vii
iii. INDICE DE ABREVIATURAS.....	viii
iv. RESUMEN.....	xi
v. ABSTRACT .....	xii
I. INTRODUCCION .....	1
I.1 SISTEMA NERVIOSO.....	1
I.2 ANATOMIA Y FISILOGIA DEL CEREBELO.....	1
I.3 CELULAS DEL SISTEMA NERVIOSO.....	4
I.31 GLIA .....	4
I.32 NEURONA .....	9
I.4 NEUROTRANSMISORES .....	11
I.5 SISTEMA SEROTONINERGICO .....	12
I.6 FUNCIONES DE LA SEROTONINA .....	15
I.7 BOMBA DE SODIO Y POTASIO (Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> -ATPasa) .....	17
1.71 SUBUNIDAD α (ALFA) .....	18
I.72 SUBUNIDAD β (BETA) .....	21
I.10 PROTEINAS REGULATORIAS DE LA ATPasa.....	25
I.8 ISOFORMAS Y TEJIDOS DE EXPRESION .....	25
I.9 GENES QUE CODIFICAN PARA LA Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> -ATPasa.....	26
I.10 MECANISMOS Y SITIOS DE REGULACION DE LA ACTIVIDAD Y EXPRESION DE LA Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> -ATPasa .....	27
II. JUSTIFICACION.....	31
III. HIPOTESIS .....	32
IV. OBJETIVOS.....	32
IV.1 OBJETIVO GENERAL.....	32
IV.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS.....	32
V. MATERIAL Y METODOS .....	33
V.1 ANIMALES .....	33

V.2 ADMINISTRACION DE L-TRIPTOFANO .....	33
V.3 RESTRICCION PROTEICO-CALORICA.....	33
V.4 OBTENCION DE TEJIDOS.....	34
V.5 DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD ESPECIFICA DE LA Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> -ATPasa.....	34
V.6 OBTENCION DE ARN TOTAL .....	35
V.7 CUANTIFICACION DE ARN TOTAL.....	36
V.8 REACCION DE TRANSCRIPCION REVERSA (RT) y PCR.....	36
V.9 ANALISIS ESTADISTICO .....	38
VI. RESULTADOS .....	39
VI.1 VALIDACION DEL MODELO DE RESTRICCION PROTEICO-CALORICA (RPC) .....	39
VI.2 EXPRESION DE LAS ISOFORMAS $\alpha$ 1, $\alpha$ 2 Y $\alpha$ 3 DE LA Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> -ATPasa.....	44
VI.3 DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA .....	51
VII. DISCUSION.....	52
VII.1 CONCLUSION.....	59
VIII. BIBLIOGRAFIA.....	60

## **i. INDICE DE FIGURAS**

## **Página**

<i>Figura 1. Corte sagital que muestra la ubicación anatómica del cerebelo dentro del sistema nervioso central.</i>	<i>2</i>
<i>Figura 2. Representación esquemática de las capas celulares que constituyen la corteza cerebelosa.....</i>	<i>3</i>
<i>Figura 3. Se muestran cuatro tipos de células gliales que le proporciona estructura y función al sistema nervioso, .....</i>	<i>5</i>
<i>Figura 4. Célula oligodendroglial, se encuentra formando varios internodos que aíslan a los axones neuronales.....</i>	<i>6</i>
<i>Figura 5. Células de Schwann. ....</i>	<i>7</i>
<i>Figura 6. Modelo estructural de una neurona y las partes que la componen. ....</i>	<i>11</i>
<i>Figura 7. Ubicación anatómica de los núcleos de Rafé en el tronco encefálico .....</i>	<i>13</i>
<i>Figura 8. Diagrama de biosíntesis de la serotonina .....</i>	<i>14</i>
<i>Figura 9. Esquema que muestra las posibles rutas de segundos mensajeros de la serotonina mediada por los receptores serotoninérgicos 5-HT<sub>2</sub>. ....</i>	<i>16</i>
<i>Figura 10. Estructura general de la bomba de sodio y potasio unida a la membrana plasmática.....</i>	<i>18</i>
<i>Figura 11. Imagen de las posibles posiciones en las que se puede encontrar unida la ouabaina a la subunidad <math>\alpha</math> de la Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPasa. ....</i>	<i>19</i>
<i>Figura 12. Topología estructural de la Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPasa. ....</i>	<i>20</i>
<i>Figura 13. Modelo de la estructura terciaria de la subunidad <math>\beta</math>.....</i>	<i>22</i>
<i>Figura 14. Diagrama que muestra los pasos que conducen a la formación estructural correcta de la Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPasa en el retículo endoplasmático. ....</i>	<i>23</i>
<i>Figura 15. Mecanismo del ciclo enzimático de la bomba de sodio y potasio .....</i>	<i>24</i>
<i>Figura 16. Mecanismo de regulación de la Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPasa por dopamina. (DA) .....</i>	<i>28</i>
<i>Figura 17. Secuencia de los primeros 30 aminoácidos de la subunidad <math>\alpha</math>1 de la Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPasa de cuatro especies distintas: humano, cerdo, ratón y rata.....</i>	<i>29</i>
<i>Figura 18. Peso corporal de las madres sometidas a experimentación.....</i>	<i>40</i>
<i>Figura 19. Cantidad de alimento consumido por las madres. ....</i>	<i>41</i>
<i>Figura 20. Análisis de la talla de las crías . ....</i>	<i>42</i>
<i>Figura 21. Peso corporal de las crías . ....</i>	<i>43</i>
<i>Figura 22. Cantidad de alimento consumido por las crías.....</i>	<i>44</i>
<i>Figura 23. Productos de amplificación del gen de <math>\beta</math>-actina.....</i>	<i>45</i>
<i>Figura 24. Expresión relativa del gen de <math>\beta</math>-actina .....</i>	<i>45</i>
<i>Figura 25. Productos de amplificación del gen de la subunidad <math>\alpha</math>1. ....</i>	<i>46</i>
<i>Figura 26. Expresión relativa de gen de la subunidad <math>\alpha</math>1 . ....</i>	<i>46</i>
<i>Figura 27. Productos de amplificación del gen de la subunidad <math>\alpha</math>2. ....</i>	<i>47</i>
<i>Figura 28. Expresión relativa de gen de la subunidad <math>\alpha</math>2.....</i>	<i>48</i>
<i>Figura 31. Productos de amplificación del gen de la subunidad <math>\alpha</math>3. ....</i>	<i>50</i>
<i>Figura 33. Actividad específica de la Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPasa.....</i>	<i>51</i>
<i>Figura 34. Propuesta del mecanismo de regulación de la subunidad <math>\alpha</math>2 de la Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPasa por serotonina. ....</i>	<i>58</i>

## ii. INDICE DE TABLAS

## Página

<i>Tabla I. Familia de receptores serotoninérgicos.....</i>	<i>15</i>
<i>Tabla II. Oligonucleotidos específicos utilizados para analizar la expresión de las subunidades <math>\alpha 1</math>, <math>\alpha 2</math>, <math>\alpha 3</math> de la <math>\text{Na}^+/\text{K}^+\text{ATPasa}</math> y para el gen de la <math>\beta</math>-actina.....</i>	<i>38</i>



### iii. INDICE DE ABREVIATURAS

<b>5-HIAA</b>	Ácido 5-hidroxiindolacético
<b>5-HT</b>	5-Hidroxitriptamina
<b>AC</b>	Adenilato ciclasa
<b>ADNc</b>	Acido desoxirribonucleico complementario
<b>ARN</b>	Acido ribonucleico
<b>ARNm</b>	Acido ribonucleico mensajero
<b>ATP</b>	Adenosina trifosfato
<b>C</b>	Control
<b>Fig.</b>	Figura
<b>g</b>	Gramos
<b>HCl</b>	Acido clorhídrico
<b>hrs</b>	Horas
<b>K<sup>+</sup></b>	Ion potasio
<b>KCl</b>	Cloruro de potasio
<b>KDa</b>	Kilodaltons
<b>Kg</b>	Kilogramo
<b>Km</b>	Constante de Michaelis
<b>L-Trp.</b>	L-triptófano
<b>MAO</b>	Monoaminoxidasa

<b>mg</b>	Miligramo
<b>Mg<sup>+</sup></b>	Ion magnesio
<b>ml</b>	Mililitro
<b>mM</b>	Milimolar
<b>mm</b>	Milímetro
<b>MM</b>	Marcador de peso molecular
<b>Na<sup>+</sup></b>	Ion sodio
<b>NE</b>	Norepinefrina
<b>nm</b>	Nanómetro
<b>°C</b>	Grados Celsius
<b>pb</b>	Pares de bases
<b>PCR:</b>	Reacción en cadena de la polimerasa
<b>pH</b>	Potencial de hidrogeno
<b>Pi</b>	Fosfato inorgánico
<b>PKA</b>	Protein kinasa A
<b>PKC</b>	Protein kinasa C
<b>PLC</b>	Fosfolipasa C
<b>RD</b>	Recuperado al destete
<b>RN</b>	Recuperado al nacimiento
<b>RPC</b>	Restricción proteico-calórica
<b>RPM</b>	Revoluciones por minuto

<b>RT</b>	Transcriptasa reversa
<b>SNC</b>	Sistema nervioso central
<b>SNP</b>	Sistema nervioso periférico
<b>TA</b>	Temperatura ambiente
<b>TCA</b>	Acido tricloroacético
<b>TPH</b>	Triptófano hidroxilasa
<b>U</b>	Unidad
<b>UV</b>	Ultravioleta
<b>V</b>	Voltios
<b>Vmax</b>	Velocidad máxima
<b>µg</b>	Microgramo
<b>µl</b>	Microlitro
<b>µm</b>	Micrómetro

#### **iv. RESUMEN**

La bomba de sodio y potasio ( $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasa) es un complejo enzimático que se encuentra en la membrana plasmática de todas las células animales, está constituido por 2 subunidades  $\alpha$ , de las cuales existen 4 isoformas ( $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$  y  $\alpha 4$ ), y 2 subunidades  $\beta$  de las cuales se conocen 3 isoformas ( $\beta 1$ ,  $\beta 2$  y  $\beta 3$ ), esta enzima regula la concentración de los iones  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$ , mantiene el volumen celular y restablece el potencial de membrana, entre otras. Por otro lado, se sabe que la serotonina (5-HT, 5-hidroxitriptamina) incrementa la actividad de la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasa de las células gliales en el cerebelo de ratas e incluso se ha observado que la serotonina produce un incremento de la  $V_{\text{max}}$  en la cinética de la enzima y un incremento en la unión de ouabaína a la bomba de sodio y potasio. En el cerebelo de ratas con restricción proteico-calórica (RPC), la 5-HT es sintetizada a partir del aminoácido esencial L-triptófano. Experimentalmente se puede activar su síntesis administrando su precursor o en esquemas de desnutrición proteico-calórica, es decir en condiciones de estrés nutricional. En la interacción serotonina-bomba de sodio y potasio se desconoce el mecanismo a través del cual la 5-HT activa a la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasa, por lo que el objetivo del presente trabajo fue determinar si se incrementa la expresión de la subunidad catalítica  $\alpha$  de ésta enzima en el cerebelo de ratas con estrés nutricional mediante la técnica de RT-PCR. Los resultados mostraron que en el cerebelo de ratas con RPC se incremento la expresión del gen de la isoforma  $\alpha 2$  un 24.7% y la actividad enzimática se incrementó 18.2%. En el cerebelo de ratas en las cuales se administro L-triptófano, se incrementó la expresión de la isoforma  $\alpha 2$  en un 70% y la actividad de la enzima se incrementó un 46.6%. En relación a las otras dos isoformas de la subunidad  $\alpha$  ( $\alpha 1$  y  $\alpha 3$ ), éstas no mostraron cambios en su expresión en ningún grupo comparado con sus respectivos controles. Estos datos sugieren que la 5-HT incrementa la actividad de la bomba de sodio y potasio a través del incremento de la expresión de la subunidad catalítica  $\alpha 2$  en el cerebelo de ratas con estrés nutricional.

**Palabras clave:** *L-triptófano, glia, bomba de sodio y potasio, restricción proteico-calórica.*

## **v. ABSTRACT**

The sodium and potassium pump ( $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase) is an enzymatic complex which is located in the plasmatic membrane of all animal cells, it is constituted by 2  $\alpha$  subunit, of which there are 4 isoforms ( $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$  y  $\alpha 4$ ) and 2  $\beta$  subunits of which are known 3 isoforms ( $\beta 1$ ,  $\beta 2$  y  $\beta 3$ ), this enzyme regulates the  $\text{Na}^+$  and  $\text{K}^+$  ions concentration, it maintains the cellular volume and resets the membrane potential among others. One the other hand, it is know that serotonin (5-hidroxitriptamine) increase the  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase activity of glial cells in the cerebellum of rats, and has been observed an increasement in the  $V_{\text{max}}$  of the kinetic enzymatic induced by serotonin also an increasment in the union of the ouabaina to the sodium and potassium pump. In rats cerebellum with protein-caloric restriction (RPC), the serotonin (5-HT), it is synthesized from the essential aminoacid L-tryptophan. Experimentally its synthesis can be activated by administering its predecessor or schemes of malnutrition protein-caloric under conditions of nutritional stress. In the interaction serotonin-sodium and potassium pump it is unknown the mechanism whereby the 5-HT activated to  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase, so the aim of this study was to determine whether increasing the expression  $\alpha$  catalytic subunit of this enzyme in the cerebellum of rats with nutritional stress by the technique of RT-PCR. The results showed that in the cerebellum of rats with RPC the expression of gen from the  $\alpha 2$  subunit was increased in 24.7 % and the enzymatic activity was increased 18.2%. In the cerebellum of rats in which were administered with L-tryptophan the expression of the  $\alpha 2$  isoform was increased in 70% and the enzymatic activity was increased in 46.6%. In relationship with the other isoforms of the  $\alpha$  subunit ( $\alpha 1$  and  $\alpha 2$ ) they did not show changes in their expression in any group compared with the control group. This data suggest that the 5-HT increase the activity of sodium and potassium pump through the increase of expression of the  $\alpha 2$  catalytic subunit in cerebellum of rats with nutritional stress.

**Keywords:** L-tryptophan, glfal, sodium and potassium pump, restriction protein-caloric.

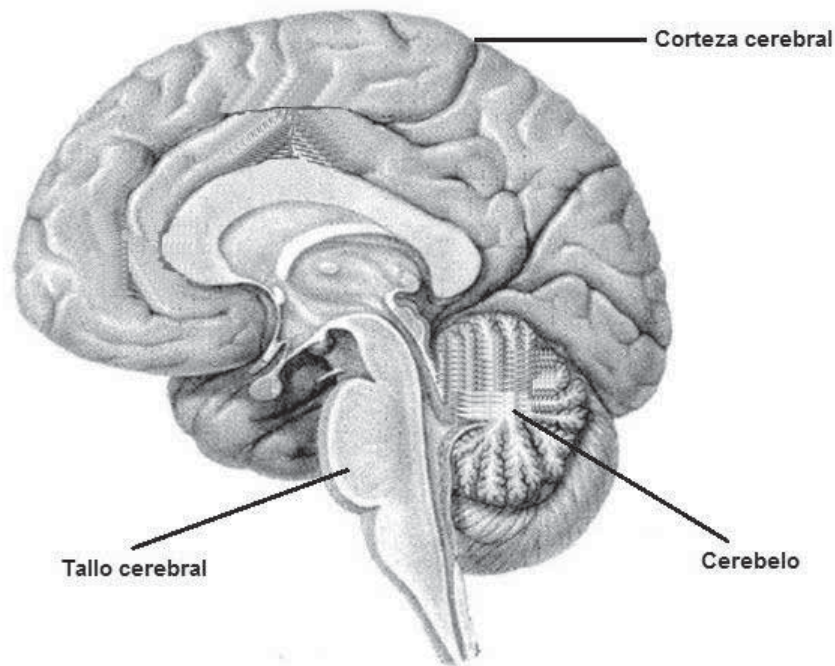
# I. INTRODUCCION

## I.1 SISTEMA NERVIOSO

El sistema nervioso es uno de los sistemas más complejos que han desarrollado algunos organismos a través de la evolución, lleva a cabo un gran número de procesos como los cognitivos y las acciones motrices de alta precisión, el sistema recibe literalmente miles de datos de los distintos órganos y sentidos, una vez que los datos son recibidos estos son procesados y analizados en el encéfalo para posteriormente tomar una decisión y/o ejecutar acciones motrices. Con base en su anatomía el sistema nervioso se divide en sistema nervioso central (SNC) y sistema nervioso periférico (SNP), el SNC está constituido por: *prosencefalo (cerebro), mesencefalo, romboencefalo (protuberancia, bulbo raquídeo, cerebelo) y médula espinal (Bishop, 1982)*, cada una de estas estructuras desempeña una función muy específica, pero dependen unas de otras para, en conjunto, formar este complejo sistema aún desconocido, como lo es el sistema nervioso. De estos sistemas en la naturaleza el máximo exponente es el sistema nervioso que posee el *Homo sapiens*, el cual no solo puede permitirnos actividades motrices complejas y precisas sino que también permite realizar procesos cognitivos avanzados y procesos emocionales únicos de nuestra especie (*Pakensepp, 2011; Berrete et al., 2011*).

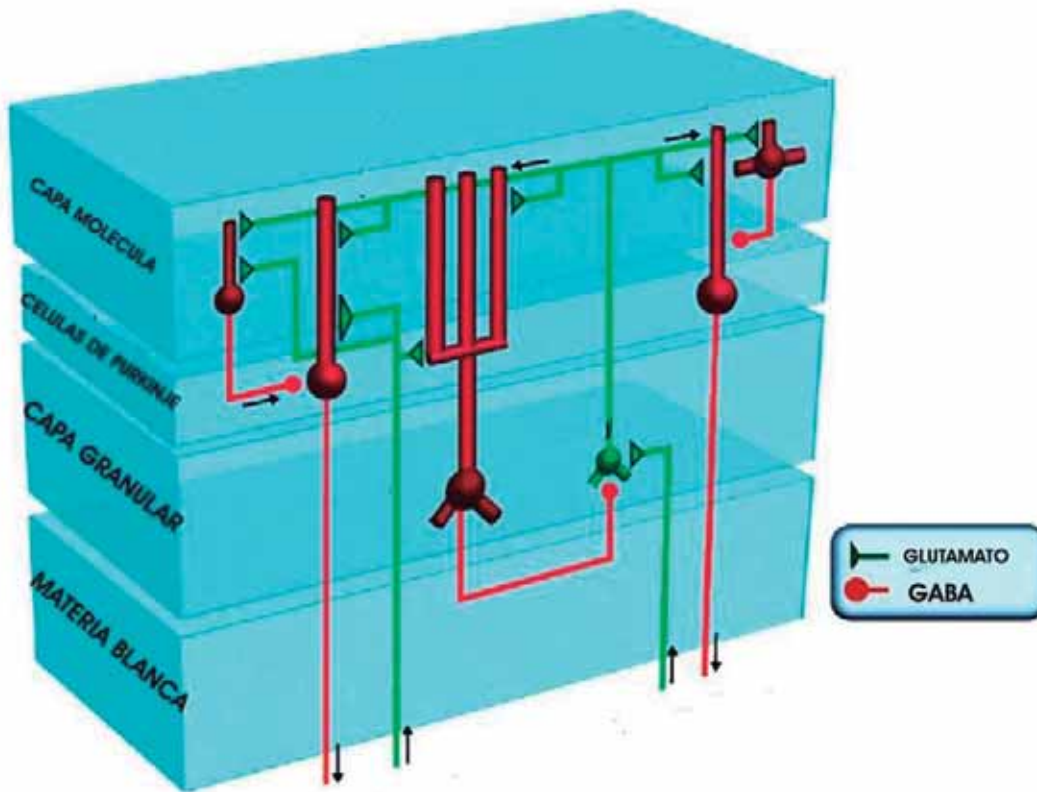
## I.2 ANATOMIA Y FISIOLOGIA DEL CEREBELO

La palabra cerebelo proviene del latín *cerebellum* que significa “*pequeño cerebro*”, esta estructura está ubicada en la parte posterior de la cavidad craneana, se sitúa por debajo de la parte posterior del cerebro y detrás del tronco cerebral, el cerebelo posee dos hemisferios cerebelosos, los cuales están unidos por una estructura saliente llamada vermis (*Manto, 2012*) (*Fig. 1*).



**Figura 1. Corte sagital que muestra la ubicación anatómica del cerebelo dentro del sistema nervioso central, se muestran también el tallo y la corteza cerebral (Modificado de: Sedler, 2010).**

De la constitución fisiológica del cerebelo destaca la corteza cerebelosa, en la cual se distinguen tres subcapas celulares (*Fig. 2*): 1) La capa molecular la cual está compuesta principalmente de los axones de las células granulares, así como de las dendritas de las células de Purkinje. 2) La capa celular de Purkinje se encuentra debajo de la capa molecular y consta de células del mismo nombre, cuyas dendritas se extienden hacia abajo en dirección a la materia blanca y 3) La capa granular que contiene células neuronales pequeñas, y en el borde extremo se encuentran neuronas de Golgi tipo I (*Doost et al., 2011*).



**Figura 2.** Representación esquemática de las capas celulares que constituyen la corteza cerebrosa, se muestran las tres capas que la constituyen, la capa molecular, la capa de células de Purkinje, la capa granular y una capa que ya no pertenece a la corteza cerebral, la cual es llamada capa de materia blanca (Doost et al., 2011).

El cerebelo tiene su origen embriológico en el ectodermo y continúa su desarrollo durante las primeras semanas, e incluso meses, de vida postnatal en los mamíferos. Se ha documentado que las capacidades motrices y respuestas dependientes del cerebelo son directamente proporcionales al desarrollo anatómico y funcional del mismo, como bien se sabe algunos mamíferos como los roedores y por supuesto los humanos, no cuentan con muchas habilidades motrices ni equilibrio al nacer; sin embargo, conforme avanzan los días posteriores al nacimiento se van adquiriendo estas habilidades, y esto se debe a que el desarrollo del cerebelo continua hasta llegar a su madurez (Mackay y Turner, 2005).



La cantidad de funciones que desempeña el cerebelo tal vez no sea tan grande como las que pueden desempeñar otras estructuras, pero si son de gran importancia, las funciones que se le han atribuido al cerebelo hasta el momento son: el control de la postura, el balance, la coordinación motriz y los movimientos finos, así como la adaptación de respuestas oculares, aprendizaje de algunos comportamientos condicionados y recientemente se le ha atribuido una participación en procesos emocionales y cognitivos (*Yeganeh et al., 2011*). Estas recientes atribuciones al cerebelo fueron hechas debido a que se observó un patrón de cambios conductuales en pacientes con daño cerebeloso al cual llamaron *síndrome cognitivo afectivo cerebeloso*, en el cual se observa que los pacientes sufren un cambio de personalidad caracterizado por pérdida del afecto, desinhibición o conducta inapropiada (*Hernández et al., 2010*).

Las funciones que desempeña el cerebelo en parte dependen de una gran red neuronal en la que participan otras estructuras del sistema nervioso, como lo es la corteza cerebral de la cual recibe fibras aferentes, las que convergen en la corteza cerebelosa (*Manto y Jessendi, 2012*), pero las funciones no solo dependen de redes neuronales sino también de la presencia, funcionalidad y la correcta acción de las células gliales, de las cuales tal vez no se conozca tanto como de las neuronas que son las más estudiadas en los últimos años; sin embargo, son tan importantes como las neuronas, de tal manera que la asociación neurona-glia permite al cerebelo desempeñar importantes funciones.

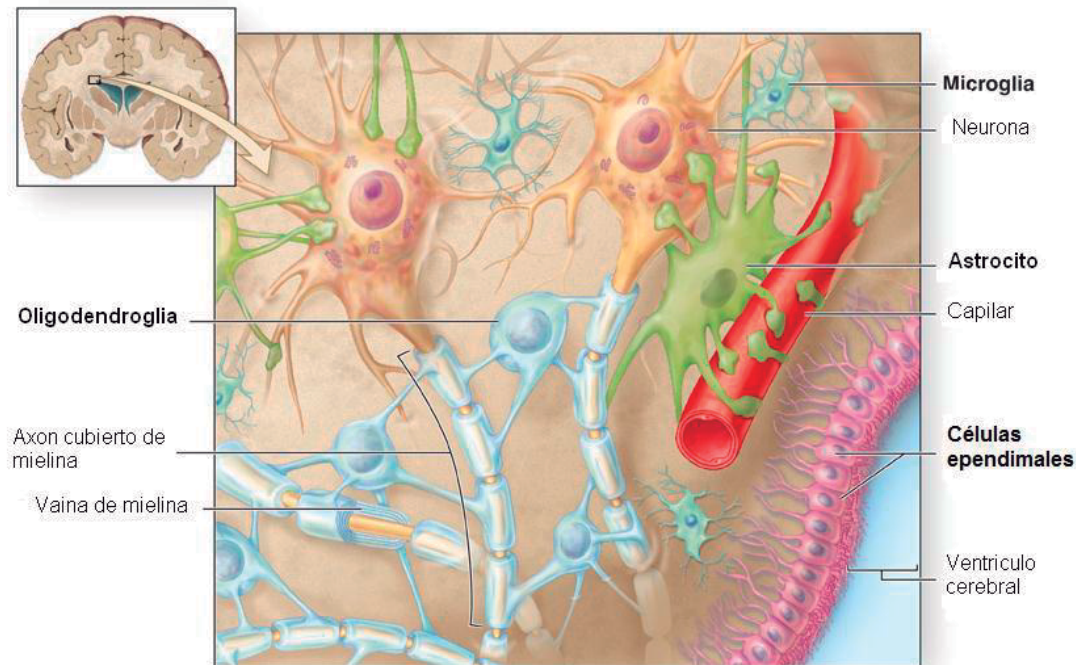
### **I.3 CELULAS DEL SISTEMA NERVIOSO**

Cuando se habla de células del sistema nervioso generalmente se asocian al concepto de las neuronas; sin embargo, éstas no son las únicas células que constituyen al sistema nervioso, este sistema está conformado por dos tipos de células: la neurona y la glía.

#### **I.31 GLIA**

La *células gliales* son un tipo de células exclusivas del sistema nervioso (Fig. 3), sus funciones son el sostén metabólico y estructural de las neuronas (*Balabanov et al., 1988*), el aislamiento axonal para permitir una transmisión más

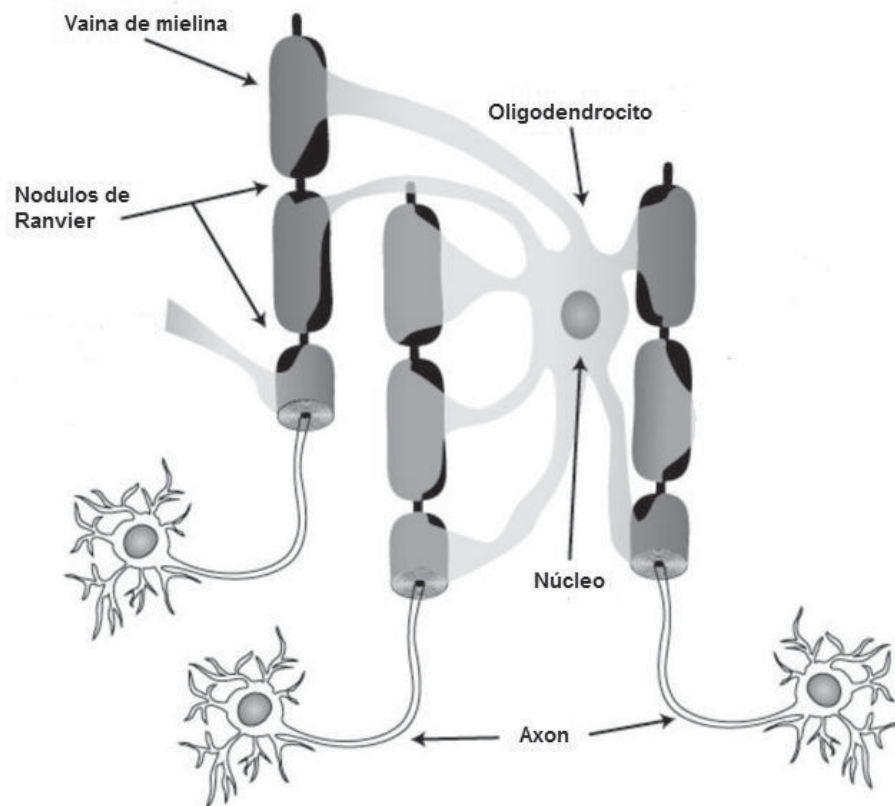
eficiente de impulsos eléctricos a través del mismo, así como controlar la composición iónica del medio extracelular y los nutrientes necesarios para las neuronas. Hasta el momento se han identificado 5 tipos de células gliales (Somjen, 2002; Lavezzi et al., 2010; Yoon et al., 2011; Herring y Konradi, 2011):



**Figura 3. Se muestran cuatro tipos de células gliales que le proporciona estructura y función al sistema nervioso, la microglia, la oligodendroglia formando vainas de mielina que cubren los axones de las neuronas, los astrocitos unidos a los vasos sanguíneos y las células ependimales formando un ventrículo (Modificado de: Colección de ilustraciones - neuroglia, Libres de Derechos [www.fotosearch.com](http://www.fotosearch.com))**

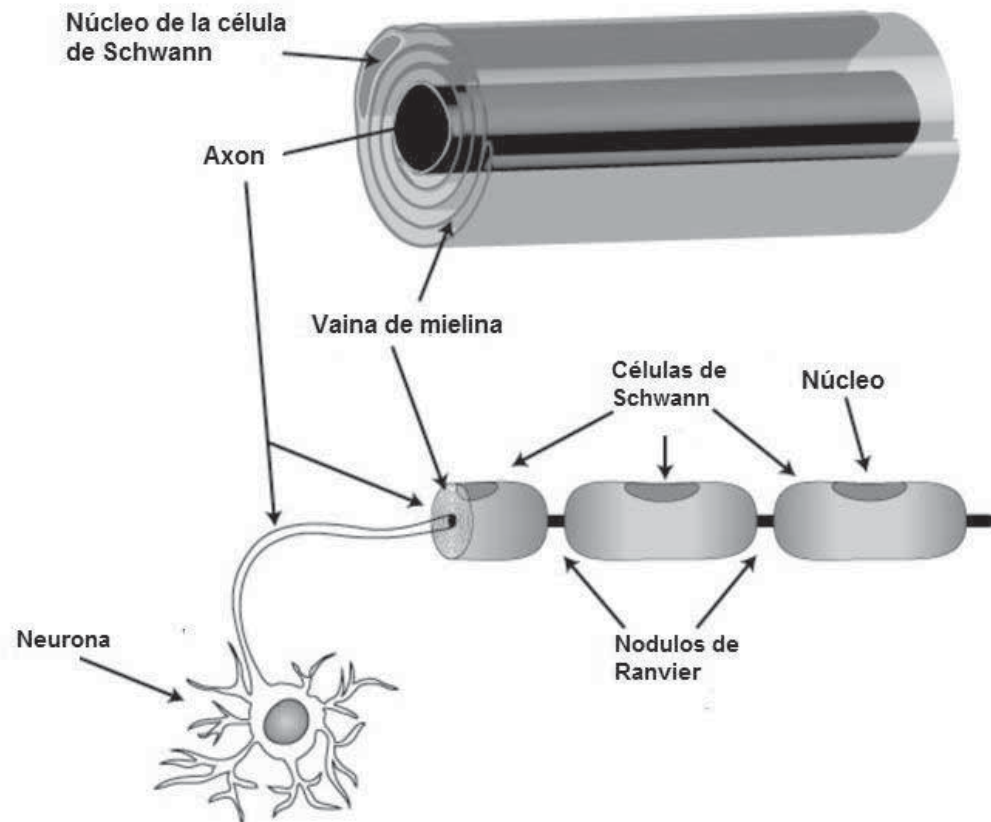
- 1) Oligodendroglía:** las células oligodendrogiales tienen su origen embriológico como células neuroectodermales inmaduras que se convierten en células oligodendrogiales maduras a causa del gangliósido  $G_{D3}$  que funciona como factor trófico durante el desarrollo postnatal del cerebelo. Algunas de las características particulares de estas células son: su soma que se encuentra en un rango de entre 10 a 20  $\mu\text{m}$ , su forma es más o menos globular y tiene una mayor densidad que los astrocitos (Fig. 4),

contienen desmosomas que le permiten unirse a otras células oligodendrogliales, su núcleo es ovoide y la proliferación de estas células se encuentra restringida al SNC. Este linaje celular tiene por función la producción de mielina que cubrirá los axones de las neuronas únicamente en el SNC, la producción de esta proteína ocurre durante un proceso rápido de mielinización del sistema nervioso en el que se sintetizan una gran cantidad de lípidos y proteínas, las células oligodendrogliales son capaces de producir muchas vainas de mielina que generarán internodos, los cuales varían en cantidad desde 30 hasta 50 internodos por célula (*Reynolds y Wilkin, 1988*).



**Figura 4. Célula oligodendroglial**, se encuentra formando varios internodos que aíslan a los axones neuronales, se muestra el núcleo de la célula oligodendroglial y los nodulos de Ranvier (*Herring y Konradi, 2011*).

**2) Células de Schwann:** estas células también son productoras de mielina y llevan a cabo la misma función que las células oligodendrogliales, aislar los axones de las neuronas para que se lleve a cabo una buena conducción nerviosa. Existen algunas diferencias entre estos dos tipos celulares, la primera es que las células de Schwann son exclusivas del sistema nervioso periférico; otra diferencia importante es la cantidad de internodos que generan por célula, mientras la oligodendroglia puede generar de 30 a 50 internodos por célula, las células de Schwann solo pueden generar un internodo por cada célula. El cuerpo de estas células está en contacto directo con el axón formando los internodos, mientras que la oligodendroglía extiende varias prolongaciones formando así las vainas de mielina (*Herring y Konradi, 2011*) (Fig. 5).



**Figura 5. Células de Schwann,** se muestran tres células de Schwann y sus núcleos, cada una de estas células se encuentra formando una vaina de mielina sobre el axón de una neurona, también se muestran los nódulos de Ranvier que separan entre sí a estas células (*Herring y Konradi, 2011*).

- 3) Células endodiales:** es una línea celular que se encarga de cubrir los ventrículos del sistema nervioso donde se producen el líquido cefalorraquídeo. Estas células son características porque tienen microvellosidades que se extienden desde la parte basal de la célula hacia las cavidades de los ventrículos. En cuanto a sus propiedades bioquímicas se sabe que contiene desmosomas y poros a través de los cuales se unen estructuralmente y se comunican entre sí. Son dependientes de cationes divalentes y su membrana es de tipo liso (*Robinson y Eimmerman, 1973; Lavezzi et al., 2010*).
- 4) Microglía:** Son considerados una población de macrófagos presentes en el sistema nervioso central debido a que expresan marcadores de superficie similares a los que expresan los macrófagos presentes en los tejidos periféricos (*Navascués et al., 2000*). Algunas de sus funciones son; fagocitosis, presentación de antígenos, liberación de citocinas y citotoxinas entre otras. Estas células se encuentran arrestadas en la etapa G0 del ciclo celular, pero llega a ser activada su proliferación cuando expresan el complejo principal de histocompatibilidad, lo cual ocurre durante los procesos de inflamación, infección, trauma, isquemia o en algunas enfermedades como el Alzheimer, Parkinson y esclerosis múltiple. Además de estas funciones otros estudios han demostrado que debido a la gran cantidad de canales iónicos que tienen estas células, participan también en el mantenimiento del potencial de membrana y regulan indirectamente las concentraciones iónicas del SNC (*Eder, 1998*).
- 1) Astrocitos:** Estas células se encuentran principalmente formando la barrera hematoencefálica controlando lo que entra y sale del cerebro, se han clasificado en dos tipos: 1) Astrocitos protoplásmicos y 2) Astrocitos fibrosos, aunque los dos pertenecen al mismo tipo celular. Se ha sugerido que los dos grupos pueden derivar de diferentes progenitores y que las células que originan a los astrocitos fibrosos son las mismas que dan origen

a la oligodendroglia. Sin embargo, los componentes estructurales entre los dos subtipos de astrocitos son iguales, los astrocitos protoplásmicos se encuentran principalmente en la materia gris y los fibrosos en la materia blanca (*Reynolds y Wilkin, 1988*).

Después de una lesión importante en el sistema nervioso se ha observado que se incrementa la cantidad de astrocitos, la proliferación es tanto de astrocitos fibrosos como protoplásmicos, y éstos ocupan la región donde se generó la lesión, lo que parece ser un proceso equivalente a una cicatrización. Además de esta función las células participan de manera importante con la neuronas en el metabolismo, transporte de agua y electrolitos, lo que permite la regulación de los niveles iónicos del cerebro (*Somjen, 2002*).

El mantener los niveles de iones basales permite también que la neurona recupere su potencial de acción, el cual se pierde tras una despolarización, esto a través de canales iónicos y bombas iónicas como la bomba de sodio, la cual utiliza la energía del ATP para transportar iones en contra de un gradiente de concentración.

Los astrocitos son células que como ya se ha descrito, llevan a cabo funciones distintas a las neuronas; sin embargo, algunos datos experimentales han mostrado que son modulados por neurotransmisores al igual que las neuronas. Ahora se sabe que el astrocito expresa también el receptor serotoninérgico 5-HT<sub>2B</sub> y que este receptor es funcional. Debido a que el uso de agonistas específicos causan un incremento en las concentraciones intracelulares de Ca<sup>+2</sup>, se propuso que los cambios en las concentraciones del ion Ca<sup>+2</sup> son causados por el fosfatidil inositol 3-fosfato (IP3) que se produce por la acción de la fosfolipasa C (PLC), enzima que se activa en la vía de transducción de señal de todos los receptores 5-HT<sub>2</sub> (*Sandén et al., 2000*),

### **I.32 NEURONA**

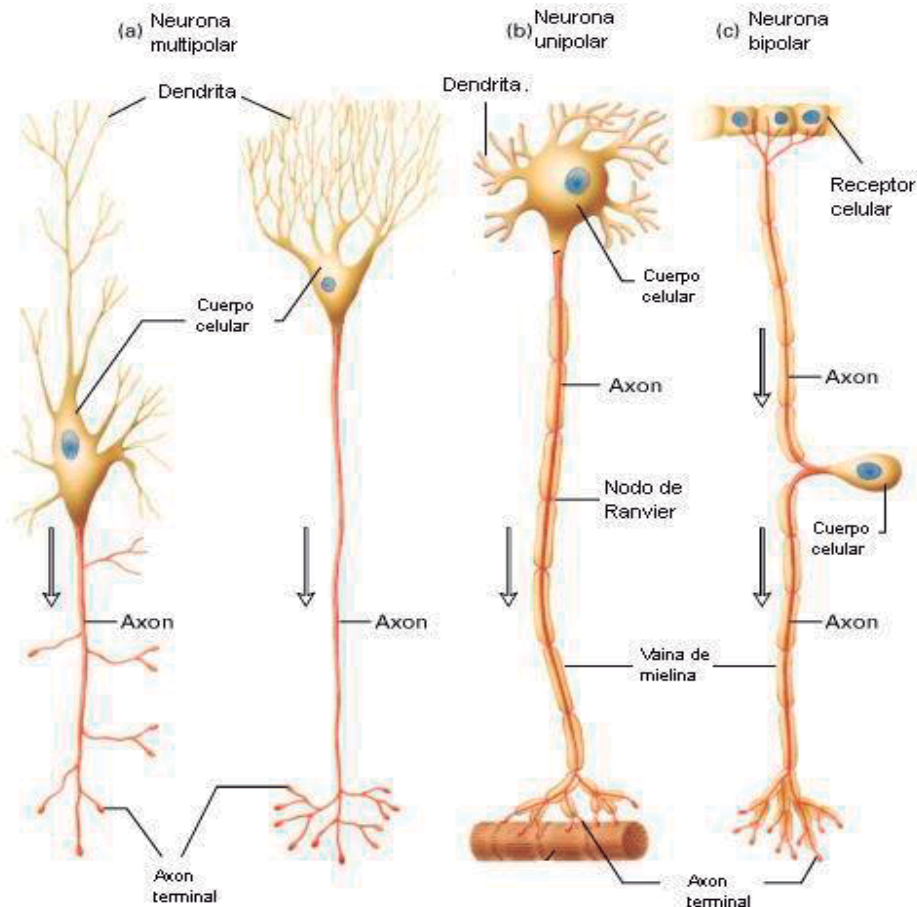
La neurona es una célula excitable del sistema nervioso que recibe, transmite y procesa toda la información que un organismo obtiene tanto de su

medio externo como del interno, estas células están constituidas por un soma o cuerpo celular, dendritas y un axón (Fig. 6). Este es el estereotipo morfológico que se tiene de las neuronas; sin embargo, estas células son polimórficas y es así que parte de su clasificación se basa en su forma celular, además de su localización, su función o los neurotransmisores que sintetice.

Algunas de las formas que podemos encontrar entre las neuronas pueden ser pequeñas granuladas o globulares con un diámetro de entre 6 y 8  $\mu\text{m}$ , con forma de pera como lo es el caso de las células de Purkinje presentes en el cerebelo, estrelladas que varían en su diámetro el cual puede ir desde 60 hasta 80  $\mu\text{m}$ , a pesar de que la forma de las neuronas puede ser distinta, las estructuras que la componen no cambian, estas estructuras llevan a cabo funciones distintas por ejemplo: las dendritas representan la función receptiva de la transmisión nerviosa entre las neuronas, la gran cantidad de ramificaciones de las dendritas son cortas y le permite a la neurona recibir señales de una gran cantidad de neuronas adyacentes. Los axones emergen del cuerpo neuronal y es la prolongación más larga de estas células, frecuentemente se encuentran cubiertos de mielina por segmentos cortos llamados internodos los cuales, como ya se ha descrito previamente, son formados por la oligodendroglía en el SNC y por las células de Schwann en el SNP, a la sección libre de mielina que se encuentra entre cada internodo se le llama nódulo de Ranvier.

La sinapsis de las neuronas se llevan a cabo entre el axón de la neurona presináptica y las dendritas de las neuronas intercomunicantes, esta comunicación está basada en el flujo de neurotransmisores (sinapsis química), o en el flujo de iones mediante canales que unen físicamente a las neuronas y que facilitan el cruce de estos iones a través de la membrana plasmática (sinapsis eléctrica), estas son las formas mediante las cuales se comunican las neuronas, lo que permite que estas células reciban e interpreten una gran cantidad de información. La sinapsis química emplea células sensoriales nociceptivas y motoneuronas en las cuales pueden ocurrir dos eventos opuestos la estimulación o la depresión de las funciones neuronales, estos procesos pueden ser alterados por cambios en el

contenido de los iones  $\text{Ca}^{+2}$  y/o  $\text{Mg}^{+2}$  entre otros, y se ha demostrado que la cantidad de neurotransmisor liberado por la neurona presináptica tiene efecto directo sobre la transmisión sináptica (Nicholls y Purves, 1972)



**Figura 6. Modelo estructural de una neurona y las partes que la componen, se muestra el núcleo, cuerpo celular, dendritas, axón, receptor celular, vainas de mielina y nodos de Ranvier (Modificado de [http://www.als-ny.org/index.php?page=als\\_about](http://www.als-ny.org/index.php?page=als_about)).**

## I.4 NEUROTRANSMISORES

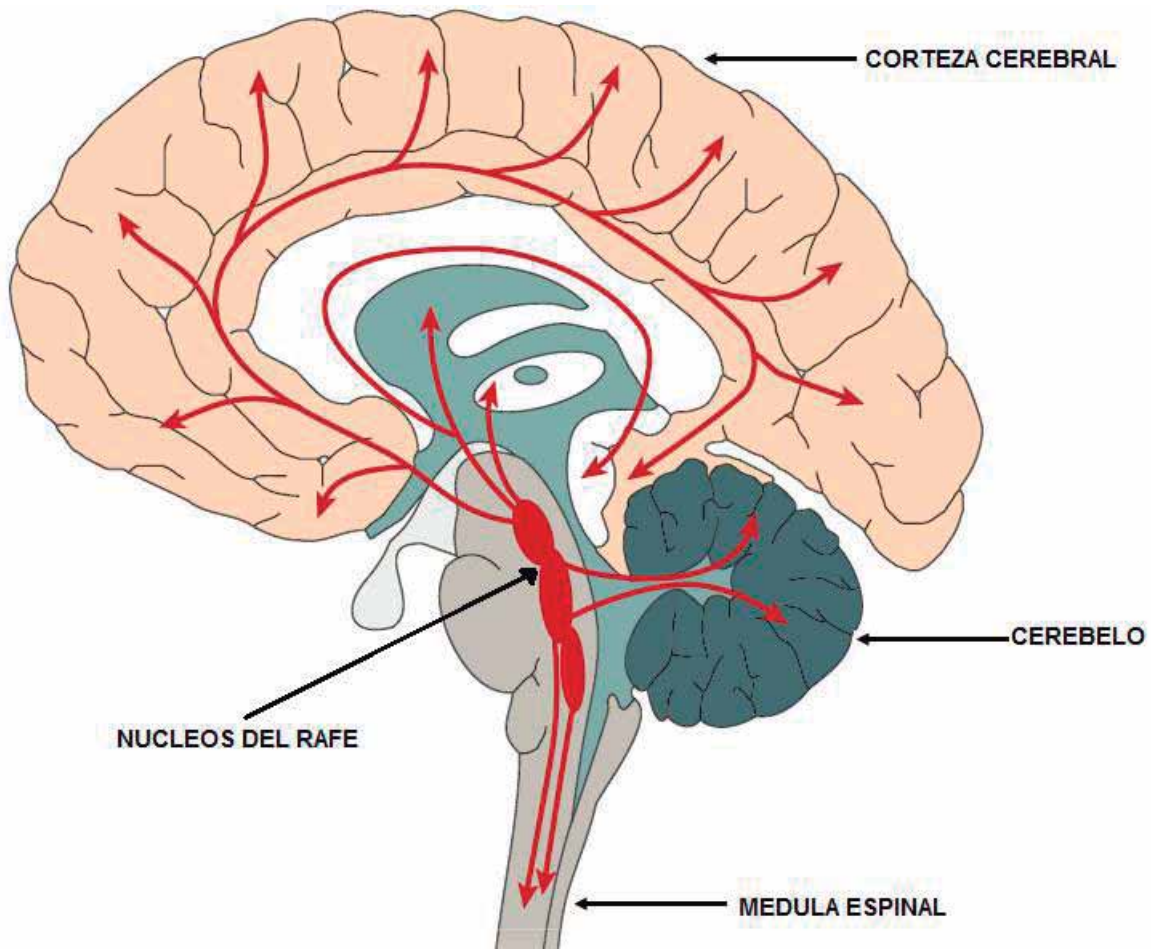
Existen una gran cantidad de neurotransmisores los cuales son liberados por las terminales sinápticas, estas sustancias son la base de la comunicación química entre las neuronas, además también pueden participar en los procesos de desarrollo celular como es el caso de la dopamina, GABA, glutamato y serotonina los cuales tienen un papel clave durante la neurogénesis, por mencionar algunos.



Los neurotransmisores tienen funciones particulares que dependen de la cantidad, el tipo de neurotransmisor y la región en la que sea liberado, por ejemplo la serotonina y dopamina están relacionados con conductas emocionales, motivación, movimientos entre otros (*Platel et al., 2010*). Para el caso de la serotonina la transducción de la señal en la célula esta acoplada a proteínas G en casi todos los receptores serotoninérgicos excepto para el 5-HT<sub>3</sub> (*Tabla 1*).

## **I.5 SISTEMA SEROTONINERGICO**

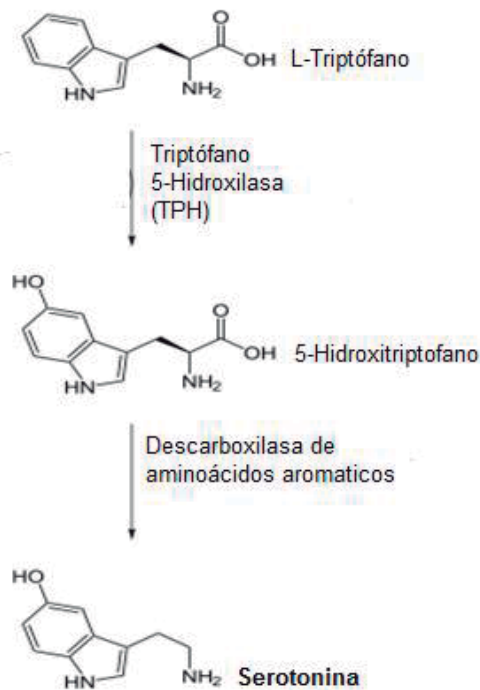
La serotonina o 5-hidroxitriptamina (5-HT) es una amina aromática que pertenece a la familia de las indolaminas y está compuesta de un anillo indol hidroxilado en la posición 5 y una cadena lateral etilamínica. Se distribuye ampliamente en las plantas y animales, en los mamíferos se localiza en las plaquetas y mastocitos, su síntesis se lleva a cabo principalmente en dos regiones, a nivel periférico en las células enterocromafines que se ubican en la mucosa del tubo digestivo, con mayor densidad en el duodeno. Estas células se encargan de sintetizar y almacenar la mayor parte de la serotonina total presente en un organismo y a nivel del sistema nervioso central la síntesis se lleva a cabo en la parte media de tallo cerebral específicamente en grupos de neuronas llamadas núcleos del Rafé, los cuales surgen del tronco encefálico y extienden sus prolongaciones hasta la corteza cerebral y el cerebelo (*Reis, 2007*) (Fig. 7).



**Figura 7. Ubicación anatómica de los núcleos de Rafé en el tronco encefálico y sus prolongaciones hacia el cerebelo y la corteza cerebral, también se muestran sus prolongaciones hacia la médula espinal (Modificado de: Berger et al., 2009.)**

La 5-HT se sintetiza a partir del aminoácido esencial L-triptófano, en el plasma este aminoácido se encuentra en dos fracciones, una fracción unida a la albúmina y la otra fracción libre, es esta fracción libre la que puede ingresar al SNC para que se lleve a cabo la biosíntesis de 5-HT. El primer paso de la biosíntesis comienza con la conversión de L-triptófano en 5-hidroxitriptófano catalizada por la acción de la enzima limitante, triptófano 5-hidroxilasa (TPH). Posteriormente se lleva a cabo una descarboxilación a cargo de una descarboxilasa de aminoácidos aromáticos, que convierte el compuesto en 5-HT (Fig. 8). Algunos estudios han demostrado que la administración de precursores serotoninérgicos como el L-triptófano estimula al sistema serotoninérgico y se

incrementan las concentraciones de serotonina (Hernández, 1979; Chen et al., 1992). Por otra parte la degradación de la 5-HT se lleva a cabo por la monoaminooxidasa (MAO) para convertir a la serotonina en ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA).



**Figura 8. Diagrama de biosíntesis de la serotonina**, en el cual se muestran los dos pasos bioquímicos que da origen a la serotonina, con la participación de la triptófano 5-Hidroxilasa y la descarboxilasa de aminoácidos aromáticos. (Modificado de: Le Floc'h et al., 2010)

También se ha demostrado que cambios en el estado nutricional de un organismo, como lo es la desnutrición intrauterina en ratas, causa modificaciones en el sistema serotoninérgico. Un estudio en el que se desnutrió a un grupo de ratas durante la etapa de gestación demostró que las crías de estos animales tuvieron un incremento en las concentraciones de serotonina, también se modificó la cinética enzimática de la enzima limitante (TPH) y se volvió más afín la enzima por su sustrato, esto se observó aún cuando los animales desnutridos *in útero* fueron recuperados nutricionalmente (Manjarréz et al., 1998).

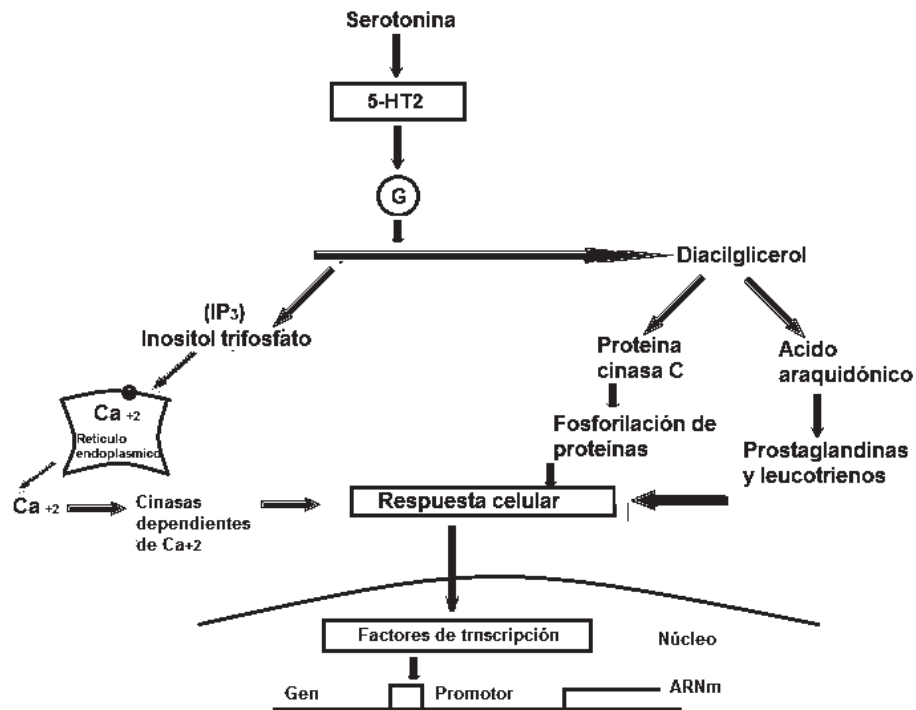
## I.6 FUNCIONES DE LA SEROTONINA

La serotonina tiene un gran número de funciones, algunas de estas son: modular conductas emocionales, regular la conducta sexual, los ciclos de sueño y vigilia, promover la agregación plaquetaria, regular la conducta alimenticia, participa como factor trófico en algunas etapas de desarrollo (*Ressler y Nemeroff, 2000*), e incrementar la actividad de la Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPasa (*Middelto et al., 1990; Mercado y Hernández, 1992; Hernández et al., 1999*). Para llevar a cabo estas funciones este neurotransmisor actúa como ligando de un gran número de receptores, hasta el momento se han caracterizado 7 familias y 16 subtipos que se describen brevemente en la Tabla I en función de su mecanismo de acción y las proteínas a las que esta acoplada su vía de transducción de la señal.

**Tabla I. Familia de receptores serotoninérgicos** (Modificado de: *Pytlak et al., 2011*)

<b>FAMILIA</b>	<b>POTENCIAL</b>	<b>TIPO</b>	<b>MACANISMO DE ACCION</b>
5-HT <sub>1</sub>	Inhibitorio	Acoplado a proteína G <sub>i</sub> /G <sub>o</sub>	Disminución de la concentración intracelular de AMPc
5-HT <sub>2</sub>	Excitatorio	Acoplado a proteína G <sub>q11</sub>	Incremento en la concentración intracelular de IP3 y DAG
5-HT <sub>3</sub>	Excitatorio	Canales iónicos	Despolarización de la membrana plasmática
5-HT <sub>4</sub>	Excitatorio	Acoplado a proteína G <sub>s</sub>	Incremento en la concentración intracelular de AMPc
5-HT <sub>5</sub>	Inhibitorio	Acoplado a proteína G <sub>i</sub> /G <sub>o</sub>	Disminución en la concentración intracelular de AMPc
5-HT <sub>6</sub>	Excitatorio	Acoplado a proteína G <sub>s</sub>	Incremento en la concentración intracelular de AMPc
5-HT <sub>7</sub>	Excitatorio	Acoplado a proteína G <sub>s</sub>	Incremento en la concentración intracelular de AMPc

Con relación a la participación de la serotonina en la conducta existe evidencia que modificaciones en los niveles de expresión de los receptores son la causa de depresión crónica. En esta patología se ha observado un incremento en el número de receptores 5-HT<sub>2A</sub> en la corteza prefrontal. De manera similar en la esquizofrenia también se presenta un incremento en la expresión de los receptores 5-HT<sub>2A</sub> en la corteza temporal, hipocampo y núcleo acumbens, la vía de transducción de señales de los receptores 5-HT<sub>2</sub> esta acoplada a proteínas “G” (Fig. 9), (Pandey et al., 1995).



**Figura 9. Esquema que muestra las posibles rutas de segundos mensajeros de la serotonina mediada por los receptores serotoninérgicos 5-HT<sub>2</sub>, (IP3) inositol trifosfato, (DG) Diacilglicerol, (Ca<sup>+2</sup>) ion calcio, (ARNm) Acido ribonucleico mensajero, (Modificado de: Pandey et al., 1995).**

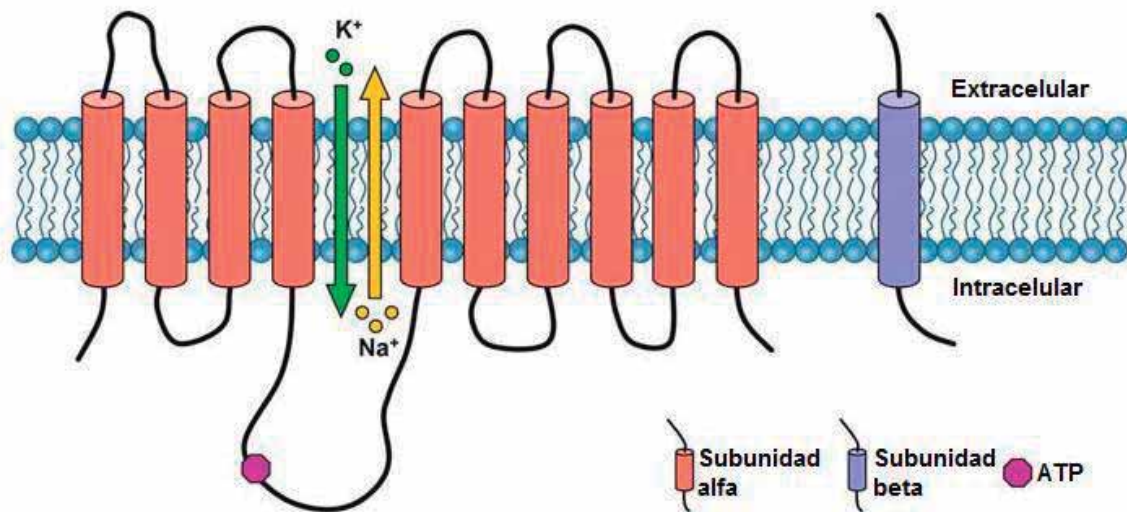
Por otra parte, una conducta primitiva que también es regulada por la serotonina es la conducta alimenticia, la cual se ha estudiado ampliamente en los últimos 50 años. Actualmente se sabe que para la regulación de la conducta alimentaria, la serotonina cuenta con una gran red que conecta el sistema periférico, que está monitorizando constantemente el tracto gastrointestinal y la ingesta energética, con una red central que se encarga de procesar toda esa

información y generar una respuesta. A nivel central el hipotálamo es inervado por el tracto paraventricular dorsal del Rafé y el núcleo hipotalámico dorsomedial que también recibe inervación de los núcleos del Rafé y son pieza clave en la regulación de la conducta alimenticia. Algunos resultados experimentales muestran que un daño en estas zonas o modificaciones de las concentraciones de serotonina puede causar una regulación deficiente en la ingesta de alimento causando patologías como la anorexia o la obesidad (*Blundell, 1992; Kaye et al., 1998*).

Otra función de la serotonina es la regulación de la actividad de la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasa, de la cual solo se mencionan algunos antecedentes debido a que se abordará con detalle más adelante. Se dice que esta interacción serotonina-bomba de sodio aún es desconocida en gran parte y algunos datos experimentales han mostrado que en el sistema nervioso la serotonina estimula la actividad de la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasa de las células gliales únicamente (*Hernández et al., 1999*), además se ha identificado la participación de la isoforma  $\alpha 2$  (*Antoneli et al., 1997*), y la participación de algunos receptores como el  $5\text{-HT}_{1A}$ ,  $5\text{-HT}_6$ , y  $5\text{-HT}_{2A}$  (*Hernández et al., 1999; Middleton et al., 1990*) en la activación de la bomba de sodio y potasio.

## **I.7 BOMBA DE SODIO Y POTASIO ( $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasa)**

Uno de los sistemas enzimáticos presentes de manera ubicua, en la membrana plasmática de las células de los mamíferos es la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasa (adenosina trifosfohidrolasa estimulada por  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  dependiente de  $\text{Mg}^+$ ), esta enzima está constituida por 2 subunidades  $\alpha$  y 2 subunidades  $\beta$ , el peso molecular de la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasa solubilizada es de 380 kDa y la proporción de las subunidades  $\alpha/\beta$  es 1:1 y constituyen un tetrámero  $2\alpha/2\beta$  con los lípidos y carbohidratos de la membrana celular unidos a la enzima (*Scheiner, 2002*) (Fig. 10).

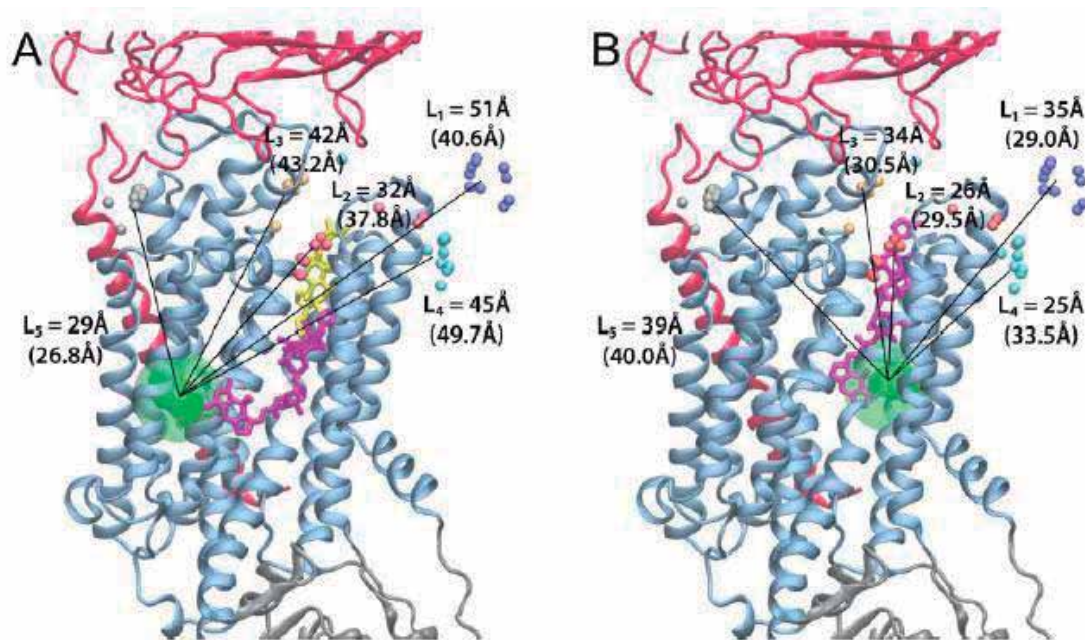


**Figura 10. Estructura general de la bomba de sodio y potasio unida a la membrana plasmática,**  $K^+$ : ion potasio,  $Na^+$ : ion sodio, los tubos de color naranja representa las regiones hidrofóbicas que atraviesan la membrana plasmática de la subunidad alfa, los tubos azules representan la región hidrofóbica de la subunidad beta que atraviesa a la membrana plasmática, la esfera de color morado representa una molécula de ATP (Adenosina trifosfato) unida a la subunidad beta (Modificado de: Gottron y Lo, 2009).

### 1.71 SUBUNIDAD $\alpha$ (ALFA)

La subunidad  $\alpha$  atraviesa 10 veces la membrana plasmática, presenta segmentos hidrofílicos (Figura 11) que se extienden hacia el espacio extracelular y hacia el citoplasma (Blanco y Mercer, 1998). Esta subunidad es el sitio activo de la enzima que promueve la hidrólisis de ATP. La actividad de la enzima depende de la concentración de esta molécula, las concentraciones normales de ATP que permiten la actividad de la  $Na^+/K^+$  ATPasa se encuentran entre 300 y 800 mM. La subunidad  $\alpha$  tiene los sitios de unión para el  $Na^+$  en la porción intracelular y la activación de la enzima se lleva a cabo cuando las concentraciones de  $Na^+$  se encuentran entre 10-40 mM dependiendo del tejido. En la porción extracelular de la subunidad  $\alpha$  se encuentra el dominio de unión para el  $K^+$ . También se sabe que esteroides cardiotónicos como la ouabaina inhiben la actividad de la enzima (Therien y Blostein, 2000). La subunidad  $\alpha$  presenta 4 isoformas ( $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\alpha_3$ ,  $\alpha_4$ ), las 3 primeras subunidades se caracterizaron con base en su sensibilidad por la ouabaina, la que presenta mayor sensibilidad a la ouabaina es la subunidad  $\alpha_3$ , la  $\alpha_2$  tiene una sensibilidad intermedia, la subunidad  $\alpha_1$  es de muy baja sensibilidad.

Estudios más recientes sobre la ouabaina han mostrado que existen dos sitios de unión en la subunidad  $\alpha$  (Fig. 11), un sitio más cercano al espacio extracelular con una aparente baja afinidad por esta molécula y un sitio más cercano al espacio intracelular con una aparente afinidad elevada por el glucósido cardíaco, con estos resultados se propone un mecanismo secuencial de unión a la ouabaina que permitirá entender y mejorar los tratamientos médicos que se indican en pacientes con insuficiencia cardíaca, debido a que los principales medicamentos que se usan son glucósidos cardiotónicos o análogos, así mismo entender las funciones de la ouabaina endógena (Sandtner et al., 2011).



**Figura 11. Imagen de las posibles posiciones en las que se puede encontrar unida la ouabaina a la subunidad  $\alpha$  de la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPasa. A) Sitio de unión de alta afinidad por la ouabaina, con mayor cercanía al espacio intracelular, B) Sitio de unión de baja afinidad por la ouabaina, con mayor cercanía hacia el espacio extracelular, A $^\circ$ : Angstrom (Tomado de Sandtner et al., 2011).**

La secuenciación de la subunidad  $\alpha$  de la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPasa se llevó a cabo en 1987 y se demostró que ésta subunidad presenta una homología del 97% en la secuencia de aminoácidos de rata y de humano (Hara et al., 1987). En cuanto a las isoformas presentes en la rata se sabe actualmente que varían muy poco en su longitud, la isoforma  $\alpha_3$  es la más pequeña con 1014 residuos de aminoácidos,



la  $\alpha 2$  posee 1021, la  $\alpha 1$  1024 y la más grande es la  $\alpha 4$  con 1028 residuos de aminoácidos. En la figura 12 se muestra la topología de la subunidad  $\alpha$  de la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasa, en la que se puede observar que existe una alta variabilidad estructural en la región amino-terminal, en contraste se observa que la región cercana al carboxilo-terminal se encuentran muy conservada (Blanco y Mercer, 1998).

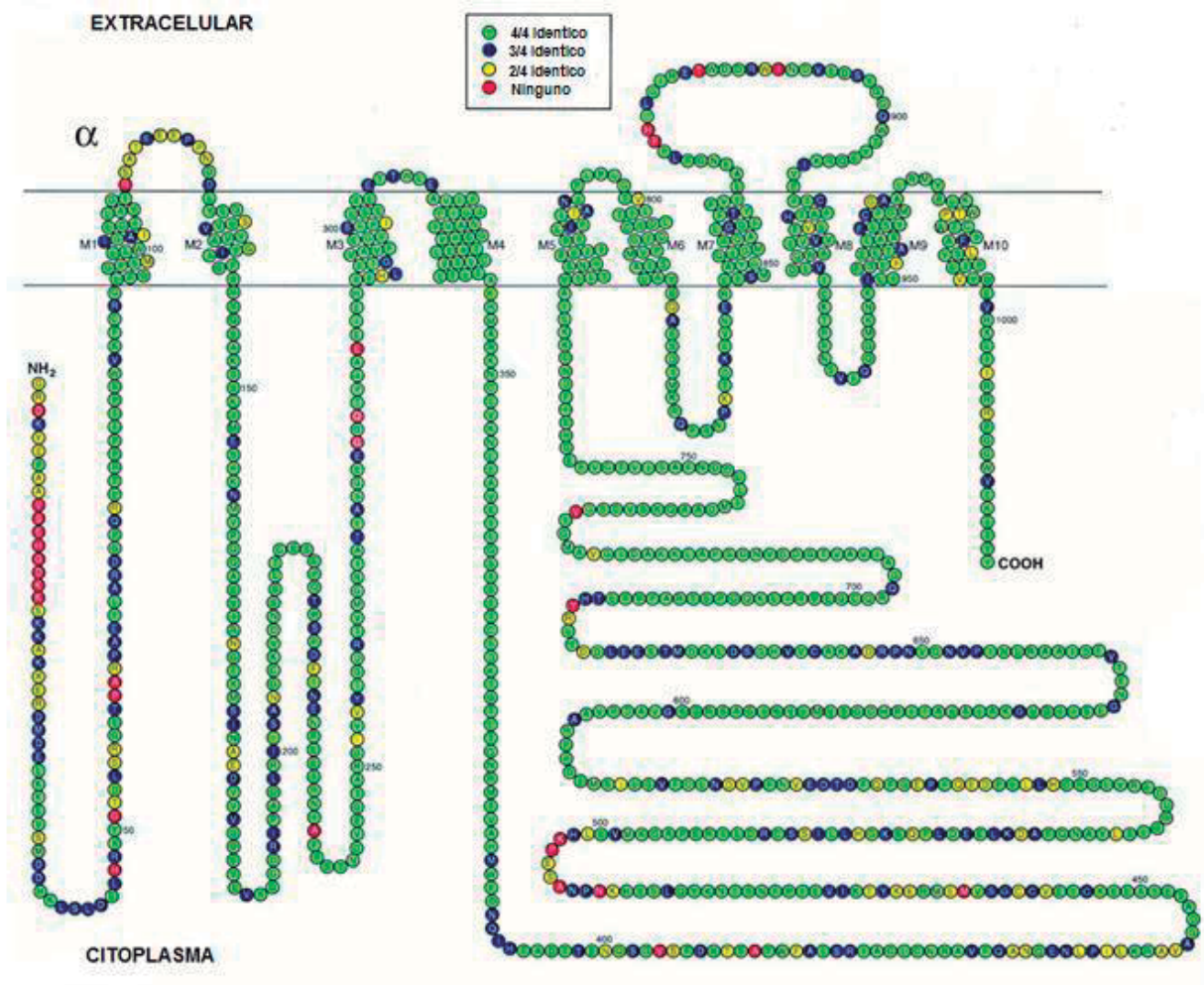
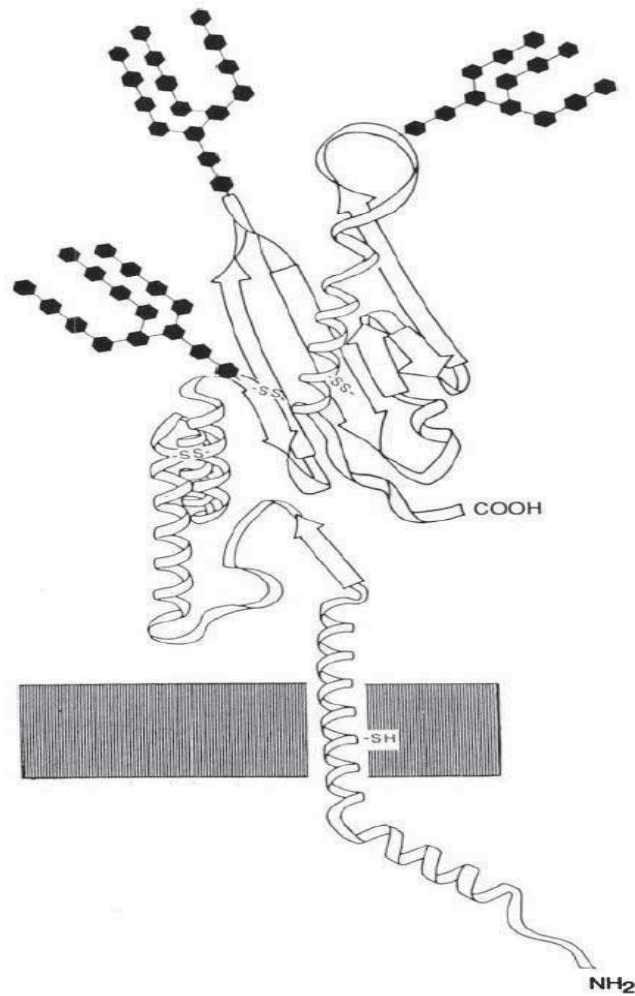


Figura 12. Topología estructural de la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPasa y la secuencia de aminoácidos de las subunidades  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$  y  $\alpha 4$ , el color verde indica que los aminoácidos de las cuatro isoformas son idénticos, el color azul que tres aminoácidos de las cuatro isoformas son idénticos, el color amarillo que dos aminoácidos de los cuatro son idénticos, y el color rojo que ninguno muestra identidad (Modificado de Blanco y Mercer, 1998).

### **I.72 SUBUNIDAD $\beta$ (BETA)**

La subunidad beta ( $\beta$ ) es un segmento proteico de tamaño pequeño con un peso aproximado de 55 KDa., esta proteína presenta 3 isoformas ( $\beta$ 1,  $\beta$ 2, y  $\beta$ 3), contienen un segmento transmembranal, un tallo citoplasmático corto amino-terminal, la subunidad está compuesta de 302-304 aminoácidos dependiendo de la especie y el tejido, presenta un patrón de tres enlaces N-carbohidrato expuestos en la región extracelular de la proteína, también tres regiones fuertemente anfipáticas entre los aminoácidos 95-110, 120-130 y 140-150, así como la presencia de puentes disulfuro en los aminoácidos 125 y 148 (Fig. 13) (*Mcdonough et al., 1990*).



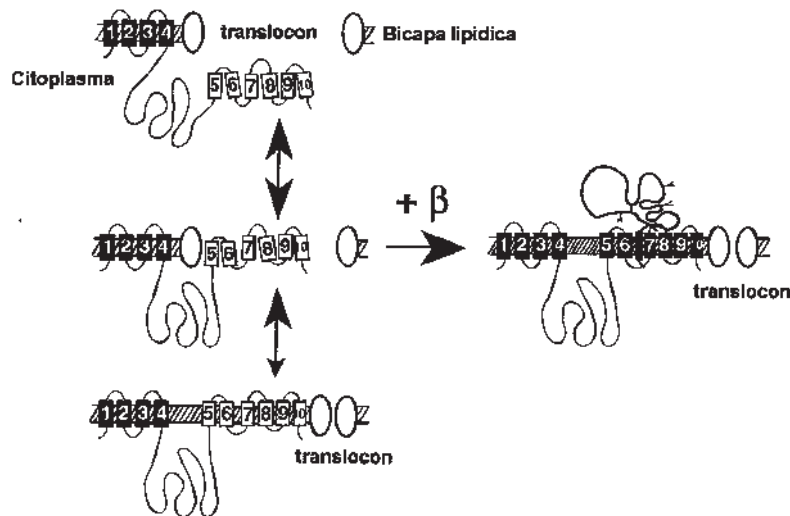
**Figura 13. Modelo de la estructura terciaria de la subunidad  $\beta$  en el que se muestran los sitios glicosilados y los puentes disulfuro (Tomado de Mcdonough et al., 1990).**

La subunidad  $\beta$  no se asocia directamente con el transporte de los iones; sin embargo, actualmente se sabe que lleva a cabo dos funciones indispensables para la formación y funcionamiento correcto de la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasa:

1.- Función de chaperona, para permitir la correcta inserción de la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasa en la membrana plasmática, permitiendo así una maduración estructural y funcional.

El proceso de síntesis de proteínas inicia en los ribosomas a partir del ARNm el cual es traducido a una proteína, La  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasa es formada correctamente en el retículo endoplasmático, posteriormente es enviada a la

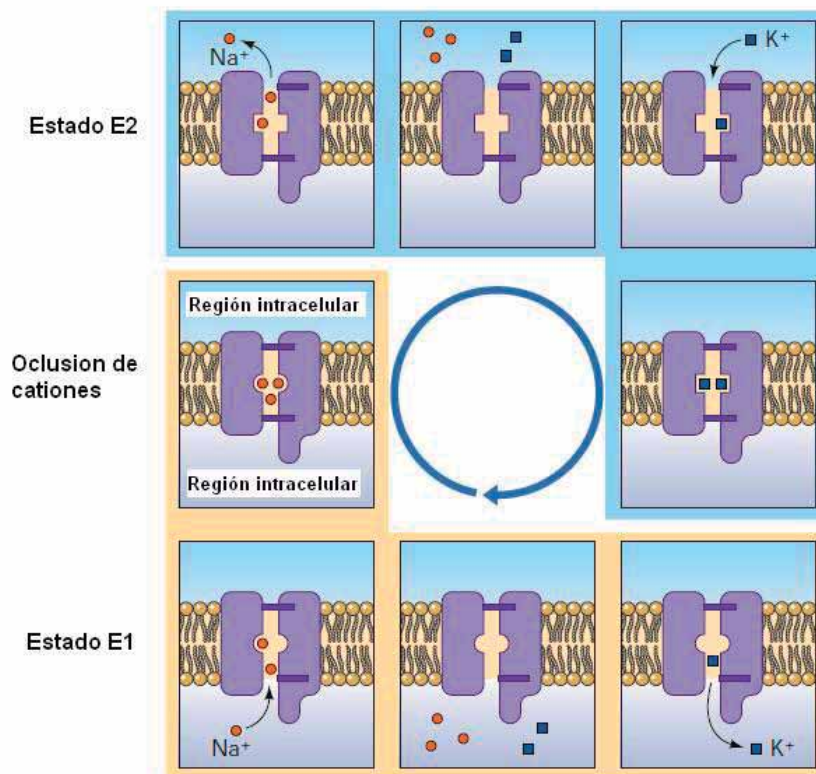
membrana plasmática donde debe ser insertada. Para el caso de la isoforma  $\alpha$  esta tiene 10 segmentos transmembranales y en el proceso de inserción inicialmente solo se insertan los primeros 4 segmentos hidrofóbicos, para que puedan insertarse correctamente los segmentos faltantes se necesita de la subunidad  $\beta$ . Además esta subunidad  $\beta$  evita la exposición de los segmentos 7 y 8, evitando así que la proteína sea degradada (Geering, 2001) (Fig. 14).



**Figura 14. Diagrama que muestra los pasos que conducen a la formación estructural correcta de la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPasa en el retículo endoplasmático (Modificado de Geering, 2001).**

2.- La asociación con la subunidad  $\beta$  determina algunas de las propiedades intrínsecas del transporte de los iones (Geering, 2001).

Una vez que se ha logrado la formación del complejo enzimático y su correcta inserción en la membrana plasmática, la enzima inicia su actividad con la unión de 3 iones de  $\text{Na}^+$  en la región intracelular de la subunidad  $\alpha$ , seguida por la fosforilación de la subunidad  $\alpha$  por el ATP, el cual induce un cambio conformacional que conduce a la expulsión de los 3 iones  $\text{Na}^+$  hacia el espacio extracelular, en esta conformación la enzima incrementa su afinidad por el  $\text{K}^+$  el cual se une al dominio extracelular, y por defosforilación se recupera la conformación original, lo que provoca que el  $\text{K}^+$  entre al citoplasma y así poder iniciar nuevamente el ciclo (Fig. 15) (Horisberger, 2004).



**Figura 15. Mecanismo del ciclo enzimático de la bomba de sodio y potasio,** se muestran tres conformaciones de la enzima, E1: un estado en el que los iones Na<sup>+</sup> se unen a la enzima en la región intracelular, y en otra etapa del ciclo los iones K<sup>+</sup> ingresan a la parte intracelular, E2: En esta conformación los iones Na<sup>+</sup> salen al espacio extracelular y en otra etapa del ciclo los iones K<sup>+</sup> se unen al complejo enzimático y una última conformación en la que el Na<sup>+</sup> y en una etapa distinta el K<sup>+</sup> se encuentran ocluidos en el complejo enzimático (Modificado de: Horisberger, 2004)

Se ha propuesto que la Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPasa está regulada por factores intrínsecos y extrínsecos tales como neurotransmisores y hormonas, entre los neurotransmisores que más se han estudiado está la norepinefrina (NE) seguido de la serotonina (Hernández, 1992; Efendiev y Pedemonte 2006; Vizi y Oberfrank, 1992).

Esta enzima es de suma importancia debido a las funciones que desempeña en los distintos tejidos, el complejo enzimático debe ser capaz de adaptarse a los cambios celulares y a los estímulos fisiológicos, su regulación se presenta en respuesta a los requerimientos celulares, por ejemplo los estímulos fisiológicos como la propagación del impulso nervioso, el ejercicio o cambios en la

dieta, todo esto requiere de sistemas de regulación que en parte son llevados a cabo por el expresión tejido-específica de las distintas isoformas de la enzima (*Blanco y Mercer, 1998*),

### **I.10 PROTEINAS REGULATORIAS DE LA ATPasa**

Existe un grupo de siete proteínas adicionales a la Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPasa denominadas FXYD que se han identificado en mamíferos: FXYD1 (PLM; Fosfoleman) es el principal sustrato de fosforilación por PKA y PKC estimulada por hormonas (*Feschenko et al., 1993*); FXYD2 (gama) es única en su tipo por tener dos variantes debido a un “splicing” alternativo (FXYD2a y FXYD2b); FXYD3 (Mat8; proteína de tumor mamario 8kDa); FXYD4 (CHIF; Factor inducido por hormonas corticosteroides) (*Bénguin et al., 2001*); FXYD5 (RIC; parecido a canal iónico), FXYD6 y FXYD7, las cuales son expresadas únicamente en cerebro; se postula que tiene un papel importante en la excitabilidad neuronal durante el desarrollo postnatal y en el cerebro adulto. Se sabe que estas proteínas también tienen una expresión tejido-específica, y se ha observado que modificaciones en estas estructuras pueden tener efectos importantes sobre la función de la Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPasa, como es el caso de la proteína FXYD2 que al ser modificada causa una hipomagnesemia demostrando que los cambios en estas proteínas pueden estar relacionadas con patofisiologías importantes (*Franzin et al., 2007; Geering, 2006*).

### **I.8 ISOFORMAS Y TEJIDOS DE EXPRESION**

Como se ha mencionado, la Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPasa es una proteína ubicua que tiene varias isoformas de la subunidad  $\alpha$ , esta es la subunidad que tiene la función catalítica (*Sagall et al., 2001*); también tiene distinta sensibilidad a la ouabaina, la expresión de esta isoforma es tejido-específica, lo que significa que las isoformas son únicas o predominan más en algunos tejidos (*Herrera et al., 1987*). Se ha propuesto que esto se debe a que esos tejidos cumplen funciones específicas por lo que también requieren de la formación de un heterodímero específico para llevar a cabo esa función, se sabe que la isoforma  $\alpha_3$  se expresa principalmente en neuronas y la  $\alpha_2$  en células gliales (*Blanco y Mercer, 1998*).

Estudios sobre la expresión de la isoforma  $\alpha 4$  de humano han demostrado que se encuentra codificada en el gen ATP1A4 de humano y que su expresión se encuentra de manera específica en los testículos; así mismo, muestra del 76% al 78% de identidad en la secuencia de aminoácidos con las isoformas  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  y  $\alpha 3$  de la rata (*Shamraj y Lingrel, 1994*). Debido a que se ha demostrado que la expresión de esta isoforma  $\alpha 4$  se encuentra únicamente expresada en los testículos no se estudió su expresión en el presente trabajo ya que éste se enfoca en el cerebelo.

### **I.9 GENES QUE CODIFICAN PARA LA $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasa**

En el *Homo sapiens*, el cromosoma 1 contiene el gen ATP1A1 que codifica para la isoforma  $\alpha 1$ . También en el cromosoma 1 se encuentra el gen ATP1A2 que codifica para la isoforma  $\alpha 2$  de la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasa, en el cromosoma 19 se localiza el gen ATP1A3 que codifica para la isoforma  $\alpha 3$  y por último el gen ATP1A4 que codifica para la isoforma  $\alpha 4$  se encuentra en el cromosoma 1.

El gen de la isoforma  $\alpha 2$  de humano fue caracterizado en 1989 y se demostró que cuenta con 23 exones de 25 kb aproximadamente. La secuencia de aminoácidos muestra un 99% de identidad con la isoforma  $\alpha 2$  de la rata; también se encontró que la región 5' terminal contiene sitios de unión para los factores de transcripción AP-1, AP-2 y NF-1, así como un potencial sitio de reconocimiento para Sp1 y posibles sitios de unión para glucocorticoides (*Shull et al., 1989*).

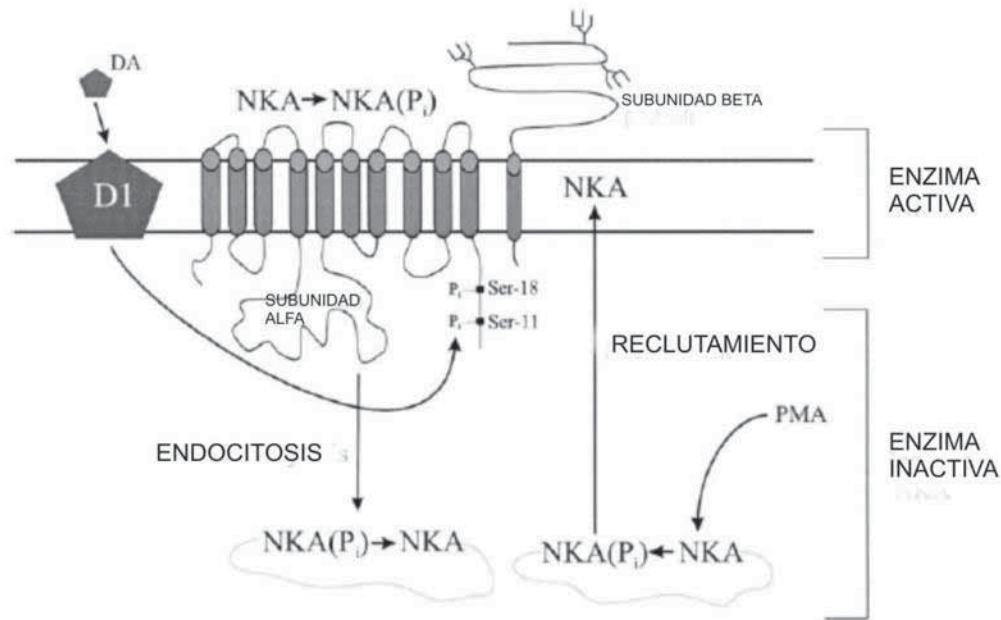
En otras especies de importancia científica, como lo es el ratón, las isoformas de la subunidad  $\alpha$  están localizadas también en diferentes genes, el gen *Atpa-1* que codifica para la isoforma  $\alpha 1$  se encuentra localizado en el cromosoma 3, el gen *Atpa-2* que corresponde a la isoforma  $\alpha 2$  está codificado en el cromosoma 2 y el gen *Atpa-3* que codifica para la isoforma  $\alpha 3$  se ubicado en el cromosoma 1 (*Kent et al., 1987*).

## I.10 MECANISMOS Y SITIOS DE REGULACION DE LA ACTIVIDAD Y EXPRESION DE LA Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPasa

Los sistemas de regulación de la actividad de la Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPasa son muy variados, pueden depender de las condiciones y las necesidades celulares, la expresión tejido-específica de las distintas isoformas funge como un sistema de regulación de la actividad debido a que las distintas isoformas de la subunidad  $\alpha$  tienen una sensibilidad distinta a glucósidos cardiotónicos como la ouabaina, y las distintas combinaciones de las isoformas  $\alpha$  con las 3 isoformas de la subunidad  $\beta$  le confieren propiedades únicas a la enzima (*Blanco y Mercer, 1998*).

Otro sistema de regulación de la actividad de la enzima y la expresión de la enzima es llevado a cabo por la dopamina, angiotensina y serotonina, entre otras (*Gomes y Da-Silva, 2002*). En un estudio se demostró que la dopamina causa una disminución en la actividad de la Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPasa expresada principalmente en el riñón de rata, se observó que la dopamina disminuye la actividad de la enzima debido a que causa una fosforilación de los residuos de aminoácidos serina-11 y serina-18 de la subunidad  $\alpha$  con una consecuente internalización del complejo enzimático, por lo que se presenta una disminución en la actividad de la Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPasa (Fig. 16). Sin embargo, la angiotensina II y la serotonina incrementan la actividad de la Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPasa, se ha propuesto que la angiotensina causa este efecto también mediado por la fosforilación del aminoácido serina-11 de la subunidad  $\alpha_1$  en enzimas que no están ancladas a la membrana plasmática, esta propuesta de regulación se lleva a cabo en humanos, de tal manera que con esta fosforilación las moléculas de la Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPasa viajan y se posicionan correctamente en la membrana plasmática, teniendo como resultado un incremento en la función de la enzima (*Efendiev y Pedemonte, 2006*) (Fig. 16).





**Figura 16. Mecanismo de regulación de la Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPasa por dopamina. (DA): Dopamina, (NKA (P<sub>i</sub>)): Sodio potasio ATPasa fosforilada, (NKA): Sodio potasio ATPasa, PMA: Ester de forbol, (Modificado de: Efendiev y Pedemonte, 2006)**

Se sabe que para el caso de los humanos en la secuencia de aminoácidos no se encuentra un residuo de serina-18 (Fig. 16), aun así se ha demostrado que un éster de forbol (PMA) puede causar un efecto de estimulación de la actividad de la enzima, la cual se propone que es mediada también por la fosforilación de un residuo de serina-11 debido a que este es conservado en la secuencia de aminoácidos en rata y humano (Fig. 17). Aunque causando un efecto opuesto en humanos con respecto a las ratas, en las cuales la dopamina causa una disminución de la actividad de la enzima fosforilando el mismo aminoácido (Efendiev y Pedemonte, 2006).

	1	11	21
<b>HUMANO</b>	GRDKYEPA	AVSEQGDKK	GKKGKKDRDMDE
<b>CERDO</b>	GRDKYEPA	AVSEHGDKK	KAKKERDMDE
<b>RATON</b>	GRDKYEPA	AVSEHGDKK	GKKAKKERDMDE
<b>RATA</b>	GRDKYEPA	AVSEHGDKK	SKKAKKERDMDE
		↑	↑

**Figura 17. Secuencia de los primeros 30 aminoácidos de la subunidad  $\alpha 1$  de la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPasa de cuatro especies distintas: humano, cerdo, ratón y rata, las flechas indican la posición de los residuos de aminoácidos serina11 y 18 respectivamente (Modificado de: Efendiev y Pedemonte, 2006).**

Por otra parte, algunos estudios sobre los mecanismos de regulación de la expresión de la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasa han mostrado la participación de los factores transcripcionales STAT3 y STAT5 asociados con JAK, dando como resultado la activación de la ruta JAK/STAT, la formación de este complejo es inducida por interleucina 2 en linfocitos, este modelo de regulación a largo plazo conduce al incremento en la expresión de la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasa y específicamente el tetrámero  $\alpha 1/\beta 1$  (Karitskaya et al., 2008).

Entre los sistemas de regulación de la expresión de la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasa destaca también el caso de la subunidad  $\beta$ , el cual está determinado por la presencia de una región no traducible en la parte 3' de la secuencia de nucleótidos de ARNm la cual permite que se exprese la proteína. En un estudio en el que se modificó la secuencia de nucleótidos en esta región demuestran los efectos negativos sobre la expresión causados por las mutaciones: 1) disminución en la transcripción, 2) se incrementa la degradación del ARNm y 3) disminución en la eficiencia de la traducción (Shao y Ismaili, 2003), esto demuestra que la presencia de esta región no traducible en el ARNm también es un sistema de regulación de la expresión.

También se ha documentado que la actividad de la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasa es inhibida por moléculas como la ouabaina y la digitoxina (Vizi y Oberfrank, 1992). Sin embargo, este estudio también han demostrado que estas sustancias no solo inhibe la actividad de la enzima sino que también regulan la expresión de las distintas isoformas como se observó en un estudio en el que se midió la expresión del ARNm de las isoformas  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  y  $\alpha 3$  en varios tejidos de rata y se obtuvo como resultado un incremento en la expresión de la isoforma  $\alpha 1$  en el hipotálamo de ratas tratadas con ouabaina (Wang et al., 2000).

Las condiciones metabólicas de las células también influyen sobre la regulación de la expresión de la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasa, y se ha comprobado que dietas altas en grasa modifican la expresión de esta enzima, un estudio demostró que la isoforma  $\alpha 1$  incremento su expresión 1.6 veces mientras las subunidades  $\alpha 2$  y  $\beta 1$  disminuyeron 2 veces su expresión en el músculo esquelético de ratas con una dieta elevada en grasa comparado con su control. La actividad de la enzima se encuentra disminuida también en los animales con dietas elevadas en grasa, pero los niveles de expresión fueron restaurados en  $\alpha 2$  y  $\beta 1$  cuando los animales se sometieron a un programa de ejercicio, esto demuestra claramente que las condiciones metabólicas de un organismo tienen efecto sobre la expresión de la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasa (Galuska et al., 2009).

## II. JUSTIFICACION

Se ha documentado ampliamente la relación funcional que existe entre la serotonina y la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasa, algunos estudios han demostrado que condiciones de desnutrición ó RPC y la administración de precursores serotoninergicos incrementan la síntesis de serotonina en el SNC, la administración de los precursores serotoninergicos también incrementan la actividad de la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasa. Se ha observado la participación de los receptores serotoninérgicos  $5\text{-HT}_{1A}$ ,  $5\text{-HT}_2$  y  $5\text{-HT}_6$  en varias regiones del sistema nervioso central, se ha demostrado que únicamente la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasa presente en la células gliales es estimulada por serotonina, mientras que la enzima presente en la células neuronales no responde al estímulo por este neurotransmisor. Por otro parte estudios de autorradiografía cuantitativa mostraron que la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasa que responde a la serotonina está presente en la membrana plasmática de las células gliales las cuales expresan principalmente la isoforma  $\alpha 2$ .

Otro estudio indican que en la interacción serotonina- $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasa se modifica la cinética de la enzima por serotonina en membranas gliales, en la cual se observó un incremento significativo en la  $V_{\text{max}}$  pero no en la  $K_m$ . Esto, aunado a un incremento en los sitios de unión para la ouabaina en tejidos de ratas con RPC sugiere que probablemente se incremente la expresión de la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasa, por lo cual planteamos lo siguiente:

### **III. HIPOTESIS**

La estimulación de la síntesis de serotonina incrementa la expresión de las subunidades catalíticas  $\alpha$  de la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasa en cerebelo de ratas con estrés nutricional.

### **IV.OBJETIVOS**

#### **IV.1 OBJETIVO GENERAL**

Determinar si la estimulación de la síntesis de serotonina causada por estrés nutricional y la administración de L-Triptófano modifican la expresión de la subunidad catalítica  $\alpha$  de la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasa.

#### **IV.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS**

- Determinar si existen cambios en la actividad específica de la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasa en cerebelo de ratas en las cuales se estimuló la síntesis de serotonina.
- Determinar si existen cambios en la expresión del gen de la subunidad  $\alpha$  de la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasa en cerebelo de ratas en las cuales se estimuló la síntesis de serotonina.

## **V. MATERIAL Y METODOS**

### **V.1 ANIMALES**

Para todos los modelos experimentales del presente estudio se utilizaron ratas de la cepa Wistar, las cuales fueron criadas bajo condiciones estándar de bioterio, con ciclos de luz-oscuridad de 12 h., humedad relativa del 60%, temperatura de  $20 \pm 5^{\circ}\text{C}$ , en la Facultad de Químico Farmacobiología.

### **V.2 ADMINISTRACION DE L-TRIPTOFANO**

Se utilizaron 8 ratas macho adultas de la cepa Wistar de  $380 \text{ g} \pm 17 \text{ g}$  de peso corporal, las cuales se mantuvieron bajo las siguientes condiciones: Ciclos de luz-oscuridad de 12 h. cada uno, humedad relativa del 60% y temperatura de  $20 \pm 5^{\circ}\text{C}$ , régimen nutricional *ad libitum* tanto de agua como de alimento (Purina Chow), las ratas fueron divididas en 2 grupos (4 ratas cada uno), a un grupo se le administró una dosis de 100 mg/kg de L-triptófano metil-éster vía intraperitoneal por un periodo de 6 días continuos a las 8 am., al cual se le denominó Grupo-triptófano (GT); al segundo grupo, se le administró el mismo volumen de solución salina al 0.9% que a los animales GT según su peso corporal a este grupo se le denominó grupo control (GC).

### **V.3 RESTRICCION PROTEICO-CALORICA**

Se seleccionaron 8 ratas hembras nulíparas de la cepa Wistar con un peso de  $240 \pm 20\text{g}$ , las ratas fueron adaptadas durante dos semanas a las siguientes condiciones ambientales: temperatura  $20 \pm 5^{\circ}\text{C}$ , periodos de luz obscuridad de 12 h, humedad relativa del 60%, durante este periodo de adaptación los animales control recibieron una dieta a base de alimento de la marca Purina Chow para ratas y agua *ad libitum*. El grupo en restricción proteico-calórica recibió el 50% del alimento consumido por los animales control.

Después de dos semanas con este régimen nutricional las hembras de ambos grupos fueron cruzadas con machos alimentados normalmente, durante el periodo de gestación los animales fueron mantenidos bajo las condiciones previamente descritas, un grupo en restricción y el otro con alimentación normal.

Al nacimiento las camadas del grupo RPC se dividieron en tres grupos un grupo continuo bajo un régimen alimenticio de restricción del 50% por lo que su restricción alimenticia fue continua y se le denominó RPC; un segundo grupo fue recuperado nutricionalmente inmediatamente después del nacimiento, al cual se le denominó recuperado al nacimiento (RN) y un tercer grupo el cual fue recuperado nutricionalmente al término del periodo de lactancia que dura 21 días, grupo al cual se le denominó recuperado al destete (RD), los grupos control, RPC, RN y RD continuaron con sus respectivos regímenes alimenticios hasta los 60 días postnatales que fueron sacrificadas.

#### **V.4 OBTENCION DE TEJIDOS**

Para la determinación de la actividad basal de la Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPasa los animales fueron sacrificados mediante luxación cervical (*De Aluja, 2002*). Se realizó una incisión media torácica exponiendo el corazón para la perfusión en el ventrículo izquierdo con solución salina isotónica fría al 0.9%, para remover la sangre de los tejidos, posteriormente fueron decapitados, se realizaron dos cortes desde el hueso occipital hasta llegar al hueso frontal y tener expuesto al encéfalo. Se extrajo el cerebelo y se homogenizó a 10 volúmenes de una solución amortiguadora de Tris-HCl 50 mM a pH = 7.4, con 10 pasos a 700 rpm en un homogeneizador Thomas de émbolo de teflón de 0.25mm de tolerancia en su diámetro, para ser congelado y posteriormente determinar la actividad enzimática de la Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>- ATPasa.

#### **V.5 DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD ESPECIFICA DE LA Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>ATPasa**

La actividad de la Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPasa en los grupos RPC, RN y RD se determinó a los 60 días postnatales, mediante un método espectrofotométrico, en alícuotas de 25 µL equivalentes a 50 µg de proteína del homogenizado. Se incubaron en un medio que contenía Tris-HCl 50 mM pH = 7.4, Mg<sub>2</sub>Cl 6 mM, KCl 15 mM, NaCl 120 mM con agua y con ouabaína 0.8 mM.

Se incubó el tejido durante 5 minutos en un baño metabólico Dubnoff con agitación constante a 37°C y posteriormente se adicionó 50 µL ATP (adenosina-

trifosfato, sal libre de vanadio) pH de 6.5, 3mM, finalmente la reacción se detuvo a los 15 minutos adicionando 20  $\mu$ L de TCA (ácido tricloroacético) frío al 50%. Se colocaron las muestras en una placa de hielo para después centrifugarlas a 3,000 rpm durante 10 minutos, se tomaron 100  $\mu$ L del sobrenadante para determinar el Pi liberado a tubos de ensayo que contenían 500  $\mu$ L 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  $\mu$ L de agua, los tubos se agitaron vigorosamente y se midió la absorbencia. El Pi se determinó espectrofotométricamente a 800 nm a los 10 minutos de iniciada la reacción, de acuerdo al método de Fiske y Subbarow (1925).

Las lecturas de absorbencia se interpolaron en una curva patrón de fosfato de potasio que se corrió en cada experimento, la actividad de la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasa fue calculada como la diferencia entre la actividad medida en presencia de ouabaína y la actividad total.

## **V.6 OBTENCION DE ARN TOTAL**

Después de la microdissección del cerebelo, el tejido se introdujo en un tubo Eppendorf libre de RNasas y DNasas que contenía 1 ml de TRIZOL<sup>®</sup> (Invitrogen) y se homogeneizó con un mini polytron, se dejó reposar por 5 minutos a temperatura ambiente (TA), posteriormente el homogeneizado se agitó por 15 segundos y se agregaron 200 $\mu$ l de cloroformo por cada mililitro de TRIZOL<sup>®</sup> usado para homogeneizar. La mezcla se dejó reposar a TA por 15 minutos, al término de este tiempo fue centrifugada a 11, 240 RPM durante 15 minutos a 4°C, el ARN fue recuperado de la fase acuosa en un tubo nuevo y tratada con 500 $\mu$ l de isopropanol por 10 minutos a TA. Posteriormente se centrifugó a 11, 240 RPM por 10 minutos a 4°C, después de la centrifugación el sobrenadante fue eliminado y la pastilla depositada en el fondo del tubo se lavó con 1 ml de etanol al 75%, después de eliminar el etanol el tubo se dejó secar por 10 minutos a TA, finalmente el ARN fue resuspendido en 40  $\mu$ l de agua libre de RNasas.

El ARN obtenido se trató con 1 unidad (U) de DNasa I (Sigma) en un medio de reacción (sigma) durante 15 minutos a 37 °C, se adicionó solución de paro de la



reacción y se incubó la mezcla de reacción a 70 °C durante 10 min., el ARN que se obtuvo fue almacenado a -80°C para evitar la degradación.

## **V.7 CUANTIFICACION DE ARN TOTAL**

Una vez obtenido el ARN total del tejido se procedió a cuantificarlo, tomando una dilución 1:100, la cuantificación de ARN total se realizó midiendo la densidad óptica (DO) a 260 nm. Un valor de DO<sub>260</sub> igual a 1 corresponde a 40 µg/ml de ARN total. Para calcular la pureza se midió también el valor de DO a 280 nm y el cociente obtenido a partir de DO<sub>260</sub>/ DO<sub>280</sub> nos proporciona el valor de pureza, un valor de 1.7-1.9 fue considerado aceptable.

## **V.8 REACCION DE TRANSCRIPCION REVERSA (RT) y PCR**

La reacción de RT fue utilizada para sintetizar ADN complementario (ADNc) a partir de una matriz de ARN de interés. La RT se llevó a cabo a partir de 5 µg ARN total, en un volumen final de 20 µl conteniendo 25 µg/ml de oligo d(T) (Invitrogen), 500 nM de dNTP's Mix (Invitrogen). La reacción se incubó a 65°C por 5 min y después 5 min en hielo. Se añadieron 4 µl de 5X First-Strand Buffer (Invitrogen), 10 mM de ditioneitol (dTT) (Invitrogen) y 2 U/µl de inhibidor de RNAsa (Invitrogen), luego se incubó a 37°C durante 2 min. Finalmente, se adicionaron 10 U/µl de la enzima transcriptasa reversa M-MLV (Invitrogen) y posteriormente se incubó a 37°C por 50 min, la reacción se inactivó mediante el calentamiento a 70°C por 15 min. En cada reacción se corrió un control en el cual la enzima transcriptasa reversa fue sustituida por agua, dicho control fue identificado como RT negativo.

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se llevo a cabo a partir del ADNc, utilizando oligonucleótidos específicos para amplificar los genes que codifican para las isoformas  $\alpha$ 1,  $\alpha$ 2 y  $\alpha$ 3 (Tabla II) y para el gen de la  $\beta$ -actina (Tabla II) la cual se utilizo como control interno. La reacción se lleva a cabo bajo las siguientes condiciones: un paso de desnaturalización durante 5 minutos a 95 °C, seguido de 30 ciclos (45 segundos a 95 °C, 45 segundos a 55°C y 1 minuto a 72 °C) para las isoformas  $\alpha$ 1,  $\alpha$ 2 y  $\alpha$ 3. Para la  $\beta$ -actina fueron 30 ciclos (45 segundos a 95 °C, 45 segundos a 59 °C y 1 minuto a 72 °C) y un paso final de 7

minutos a 72 °C. Los productos de PCR se resolvieron por electroforesis en gel de agarosa al 2 %.

**Tabla II. Oligonucleótidos específicos utilizados para analizar la expresión de las subunidades  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$  de la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasa y para el gen de la  $\beta$ -actina de la especie *Rattus norvegicus*.**

$\beta$ -Actina	<b>Directo: 5'AGCGCTTCCGGTGTCCA3'</b> <b>Reverso: 5'GGCTGTGATCTCCTTCT3'</b>  <b>200pb</b>
Isoforma- $\alpha 1$	<b>Directo: 5'AAGGACGCCTTTCAGAATGCCT3'</b> <b>Reverso: 5'TGACCATGATGACCTTAATCC3'</b>  <b>247pb</b>
Isoforma- $\alpha 2$	<b>Directo: 5'CACCTACTTTGTAATACTGGC3'</b> <b>Reverso:</b> <b>5'ATCAGGATCTTGTTCTTCATGCC3'</b>  <b>264pb</b>
Isoforma- $\alpha 3$	<b>Directo: 5'GACCCCAATGACAACCGATA3'</b> <b>Reverso: 5'CATGGACATGAGACCCACGAA3'</b>  <b>285pb</b>

*(Hao Wang, Wei-Qing Yuan, 2000)*

## V.9 ANALISIS ESTADISTICO

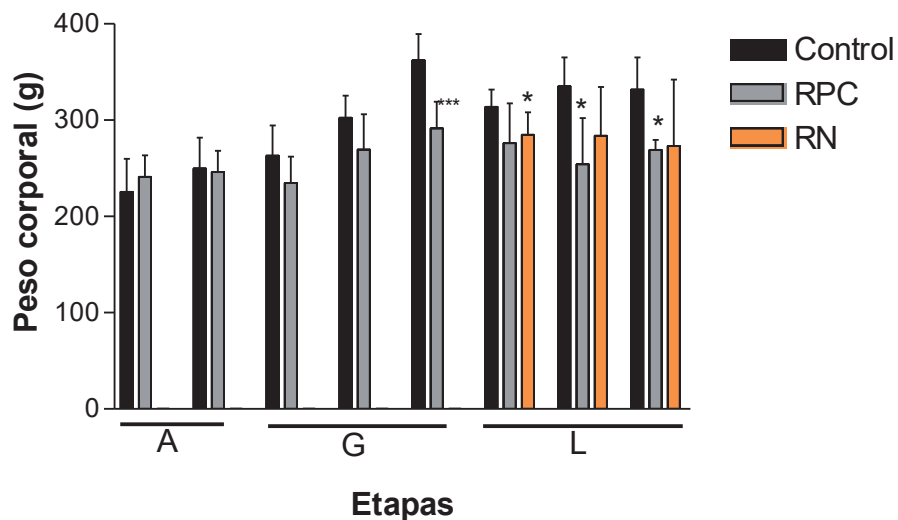
Se calculó la media y desviación estándar de los datos obtenidos, se utilizó la "t" de Student para determinar las diferencias entre los grupos y se considero diferencia estadísticamente significativa a partir de un valor de  $P < 0.01$ . Para calcular la "t" de Student y graficar los resultados se utilizó el programa Graph Pad Prism V. 3.0. La cuantificación de la expresión de los genes se realizo por densitometría de los productos de amplificación, la cual se realizó con el programa Image J. 1.4 (<http://rsbweb.nih.gov/ij/download.html>)

## VI. RESULTADOS

### VI.1 VALIDACION DEL MODELO DE RESTRICCIÓN PROTEICO-CALORICA (RPC)

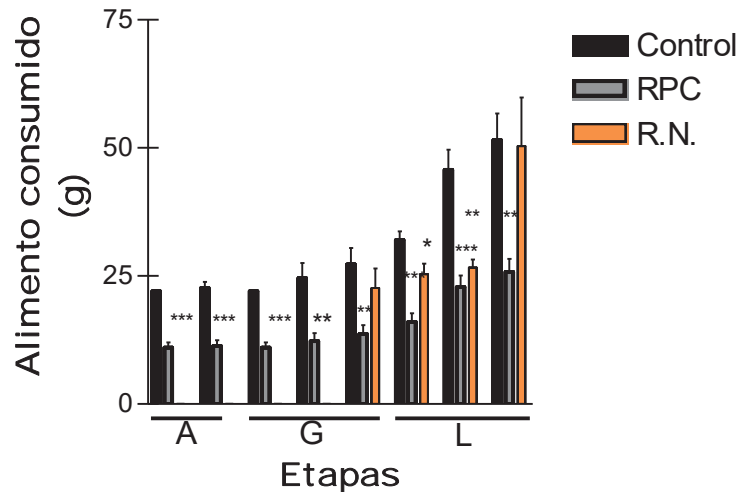
Existe un gran número de estudios que demuestran que las condiciones de desnutrición en etapas tempranas del desarrollo afectan directamente al sistema serotoninérgico y modifican las concentraciones de serotonina en el SNC, las dos causas que se sabe que afectan la síntesis de serotonina en este modelo de desnutrición son: 1) Existe una disminución en la cantidad de albumina en el organismo, si el triptófano se encuentra en dos fracciones, una unida a la albumina y la otra libre, la disminución en la cantidad de albumina causa que se incremente el triptófano libre en relación al triptófano unido a la albumina, por lo que se incrementa la cantidad de L-triptófano que ingresa al SNC causando un incremento en la concentraciones de serotonina, 2) se presenta una modificación en la actividad de la triptófano 5-hidroxilasa, la cual muestra una mayor afinidad por el sustrato, así que esto aunado al incremento en la cantidad de triptófano que ingresa al cerebro causa el incremento en las concentraciones de serotonina a nivel central (*Hernández, 1979; Hernández, 1990; Manjarréz, 1988; Manjarréz, 1993; Manjarréz, 1998*).

La figura 18 muestra el peso corporal en gramos de los animales de experimentación, se puede observar que los animales con RPC mostraron una disminución estadísticamente significativa del peso corporal en la última semana de gestación y las dos últimas semanas de lactancia en comparación con el grupo control.



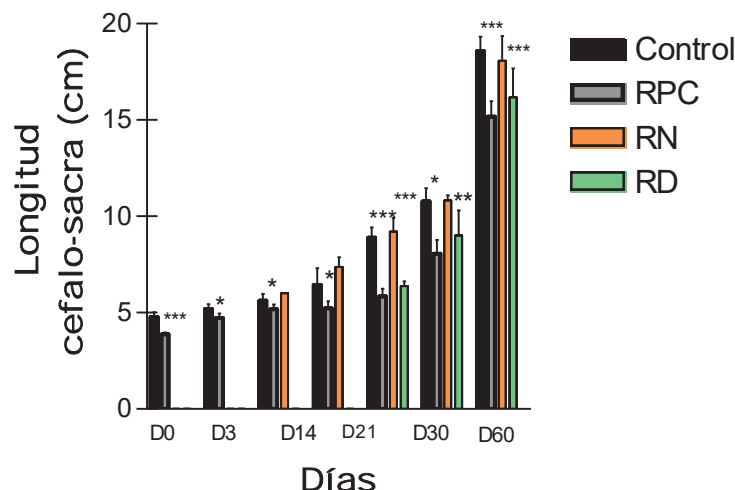
**Figura 18. Peso corporal de las madres sometidas a experimentación.** (RPC) Restricción proteico-calórica, (RN) recuperado al nacimiento. (A) Adaptación, (G) Gestación, (L) Lactancia, cada barra representa la  $X \pm D.E.$  de 4 animales por cada grupo, se aplicó la prueba de "t" de Student, se comparó el grupo tratado contra el grupo control, \*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.0001$

En la figura 19 se muestra el consumo de alimento de las hembras que se utilizaron en los tres esquemas experimentales (Control, RPC, RN). En esta figura se observa que los animales recuperados al nacimiento (RN) presentan un incremento en el consumo comparado con el grupo RPC, pero comparado con el control es estadísticamente menor el consumo de alimento únicamente en las dos primeras semanas de lactancia.



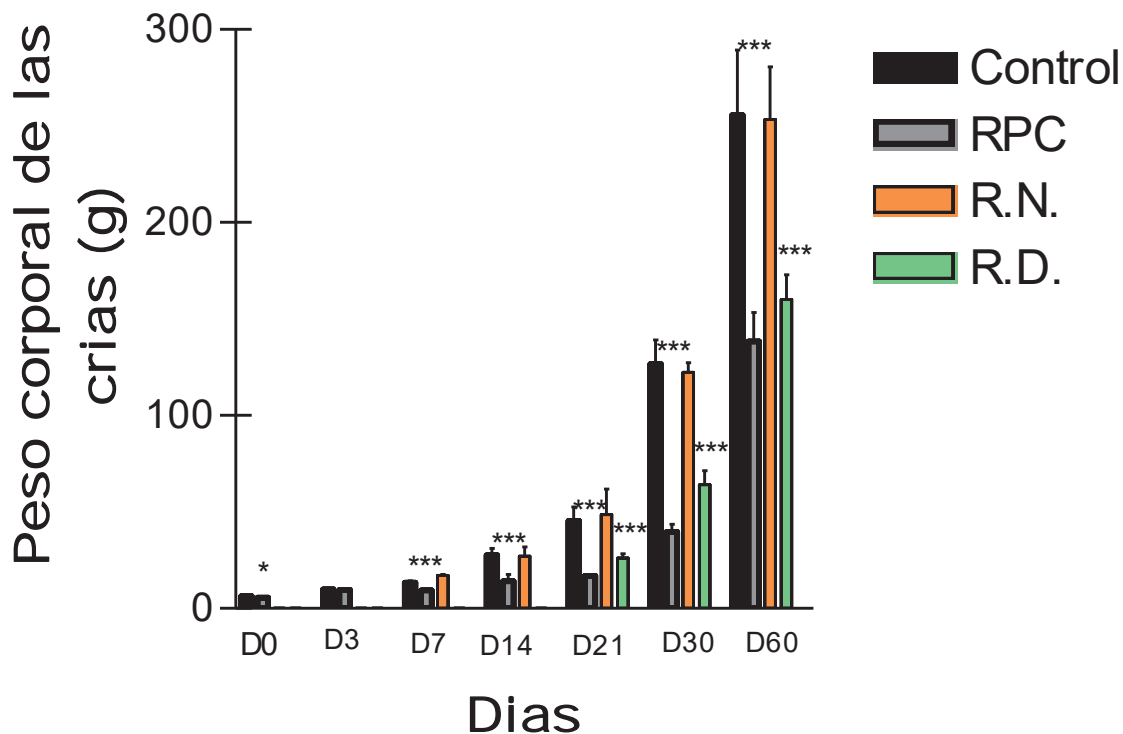
**Figura 19. Cantidad de alimento consumido por las madres.** (RPC) Restricción proteico-calórica, (RN) recuperado al nacimiento. (A) Adaptación, (G) Gestación, (L) Lactancia,  $X \pm D.E.$  de 4 animales por cada grupo, se aplicó la prueba de “t” de Student y se comparó el grupo tratado contra el grupo control, \*  $P < 0.01$ , \*\*  $P < 0.001$ , \*\*\*  $P < 0.0001$ .

La figura 20 muestra la longitud céfalo-sacra (LCS) de las crías de los grupos control, RPC, RN y RD. En esta figura se puede observar que existen diferencias estadísticamente significativas entre el grupo RPC y el grupo control en todas las etapas, mostrando que la restricción alimenticia durante la gestación causa un retraso en el desarrollo corporal, mientras que el grupo RN recupera por completo su talla hasta alcanzar en su desarrollo a los animales control y no se muestran cambios en la longitud céfalo-sacra comparado con el control. Por su parte el grupo RD muestra una disminución en la talla corporal en las tres etapas que se evaluó el grupo experimental, esto muestra que la etapa de lactancia es una etapa clave del desarrollo de un organismo.



**Figura 20. Análisis de la talla de las crías de los grupos control, (RPC) restricción proteico-calórica (RN) recuperada al nacimiento, (RD) recuperado al destete.**  $X \pm D.E.$  de 4 animales por cada grupo, se aplicó la prueba de "t" de Student para comparar el grupo tratado contra el grupo control, \*  $P < 0.01$ , \*\*  $P < 0.001$ , \*\*\*  $P < 0.0001$ .

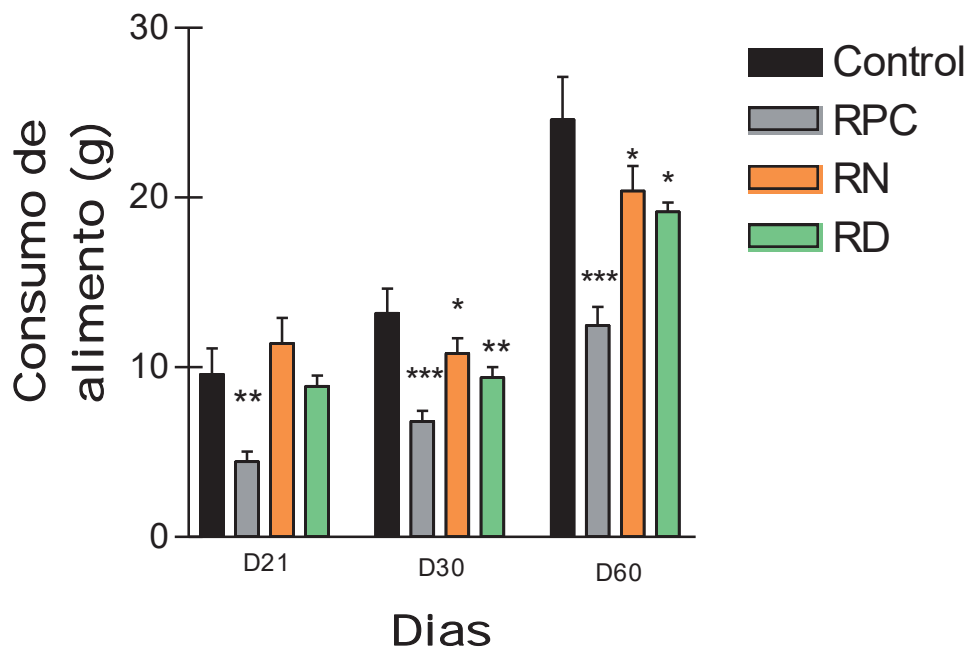
En la figura 21 se muestra el análisis del peso corporal de los animales control, el grupo en restricción proteico-calórica (RPC), recuperados al nacimiento (RN) y recuperados al destete (RD). En esta figura se puede observar que los animales en RPC presentan un menor peso corporal en casi todas las etapas que se evaluaron excepto en el día 3 postnatal. Probablemente en esta etapa el organismo de los animales en un intento por regular su peso aprovecha al máximo los nutrientes y alcanza el peso de los animales control, sin embargo como los animales continúan en restricción durante las siguientes etapas no pueden alcanzar el peso de los animales control. Por otra parte el grupo RD presenta una disminución estadísticamente significativa en su peso corporal comparado con el control en las tres etapas que fue evaluado, mientras el grupo RN no muestra cambios estadísticamente significativos comparados con el grupo control.



**Figura 21. Peso corporal de las crías de los grupos control, (RPC) restricción proteico-calórica (RN), recuperada al nacimiento, (RD) recuperado al destete.**  $X \pm D.E.$  de 4 animales por cada grupo, se aplicó la prueba de "t" de Student para comparar el grupo tratado contra el grupo control, \*  $P < 0.01$ , \*\*  $P < 0.001$ , \*\*\*  $P < 0.0001$ .

En la figura 22 se muestra el consumo de alimento de los animales control y de los animales con RPC a los cuales se les proporcionó el 50% del alimento consumido por el grupo control. Los grupos RN muestra un menor consumo de alimento estadísticamente significativo comparado con el grupo control a partir del día 30 hasta el día 60 postnatal, a pesar de que existe un menor consumo de alimento del grupo RN este no muestra cambios en el peso corporal, esto se correlaciona con otros estudios en los que se ha observado que las crías de madres expuestas a desnutrición en su etapa gestacional son susceptibles de desarrollar trastornos metabólicos como la obesidad (Levin, 2008).





**Figura 22.** Consumo de alimento por las crías de los grupos control, (RPC) restricción proteico-calórica, (RN) recuperada al nacimiento, (RD) recuperado al destete.  $\bar{X} \pm D.E.$  de 4 animales por cada grupo, se aplicó la prueba de “t” de Student para comparar el grupo tratado contra el grupo control, \*  $P < 0.01$ , \*\*  $P < 0.001$ , \*\*\*  $P < 0.0001$ .

## VI.2 EXPRESION DE LAS ISOFORMAS $\alpha 1$ , $\alpha 2$ Y $\alpha 3$ DE LA $Na^+/K^+$ -ATPasa

En la figura 23 se muestra un gel de agarosa al 2% en el que se observan los productos de amplificación del gen de la  $\beta$ -actina correspondiente a la talla esperada de 200 pb. Este estudio se realizó con el objetivo de determinar si existen cambios en la expresión del gen de  $\beta$ -actina causados por el tratamiento con L-triptófano o la restricción proteico-calórica (RPC) y valorar si se puede utilizar el gen como un control de expresión.

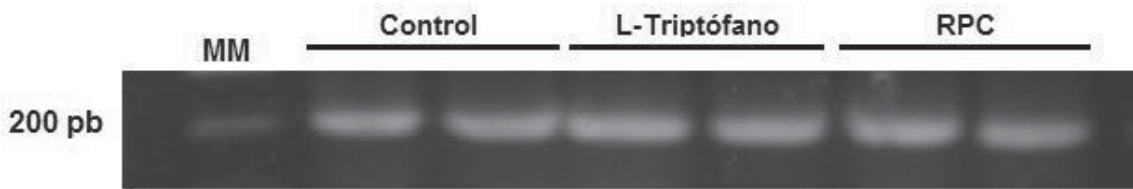


Figura 23. Productos de amplificación del gen de  $\beta$ -actina de cerebelo de rata, separados mediante electroforesis en un gel de agarosa al 2%, (RPC): Restricción proteico-calórica, (MM): Marcador de peso molecular, (pb): Pares de bases.

En la figura 24 se muestra la expresión relativa del gen de  $\beta$ -actina, al aplicar la prueba de “t” de Student se observó que no hay diferencias significativas en la expresión del gen en los grupos RPC y tratados con L-triptófano comparados con el control, por lo cual se puede concluir que el gen de la  $\beta$ -actina si se puede usar como control interno de expresión en el presente estudio.

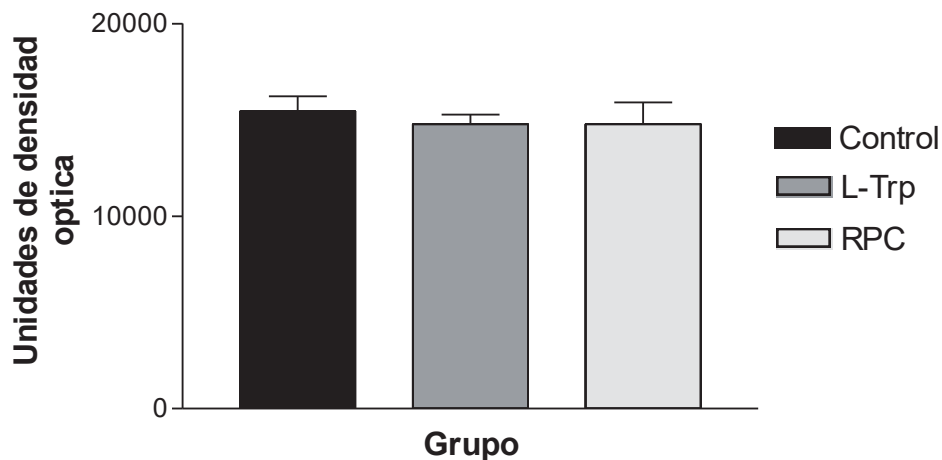
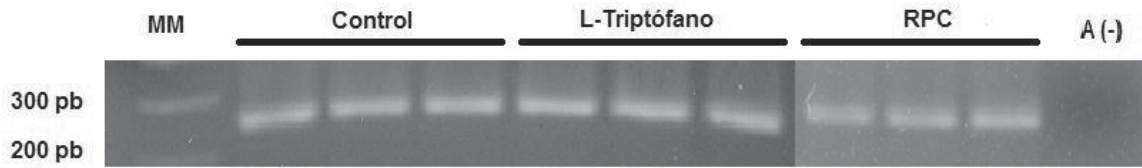


Figura 24. Expresión relativa del gen de  $\beta$ -actina en cerebelo de ratas, medida en unidades de densidad óptica, de los grupos control, L-triptófano y (RPC) restricción proteico-calórica.  $X \pm$  D.E. de 4 animales por cada grupo, se aplicó la prueba de “t” de Student para comparar el grupo tratado contra el grupo control.

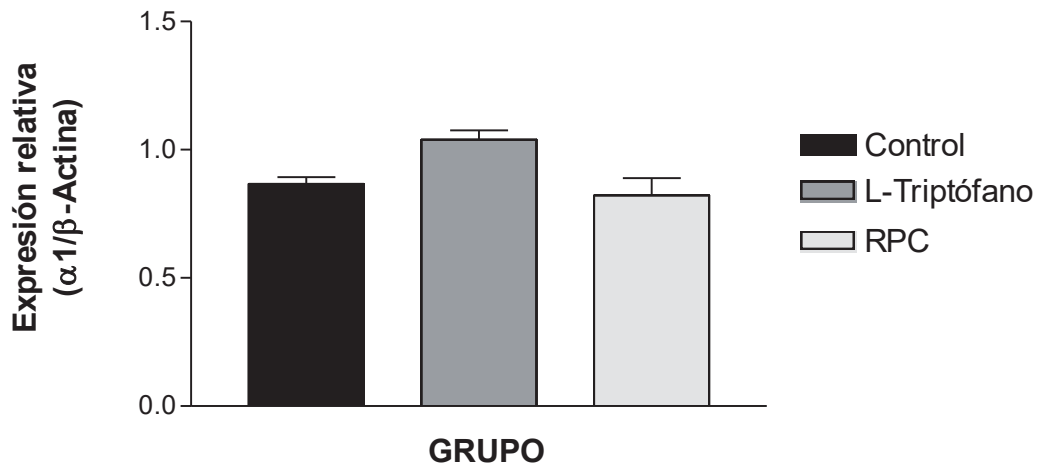
La isoforma  $\alpha 1$  de la  $Na^+/K^+$  ATPasa se encuentra expresada en casi todos los tejidos humanos, pero de todos los tipos celulares que constituyen al SNC las neuronas son las que expresan principalmente la isoforma  $\alpha 1$  (Blanco y Mercer, 1998), en la figura 25 se muestra un gel de agarosa representativo con los

productos de amplificación del gen de la subunidad  $\alpha 1$  correspondientes a la talla esperada de 247 pb.



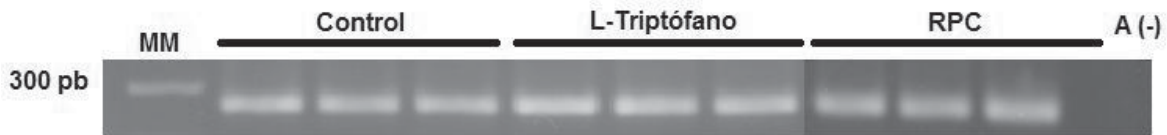
**Figura 25.** *Productos de amplificación del gen de la subunidad  $\alpha 1$  de la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPasa en cerebelo de ratas tratadas con L-triptófano y (RPC) Restricción proteico-calórica. (MM) Marcador de peso molecular, (pb): Pares de bases, (A (-)): Control negativo.*

La figura 26 muestra los niveles de expresión relativa del gen de la subunidad  $\alpha 1$  de la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasa de los grupos control, tratados con L-triptófano y en RPC, en la cual se puede observar que no existen cambios estadísticamente significativos entre los grupos. Probablemente no se observan cambios en los niveles de expresión debido a que esta isoforma se expresa principalmente en neuronas, y la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasa presente en las neuronas no es activada por serotonina.



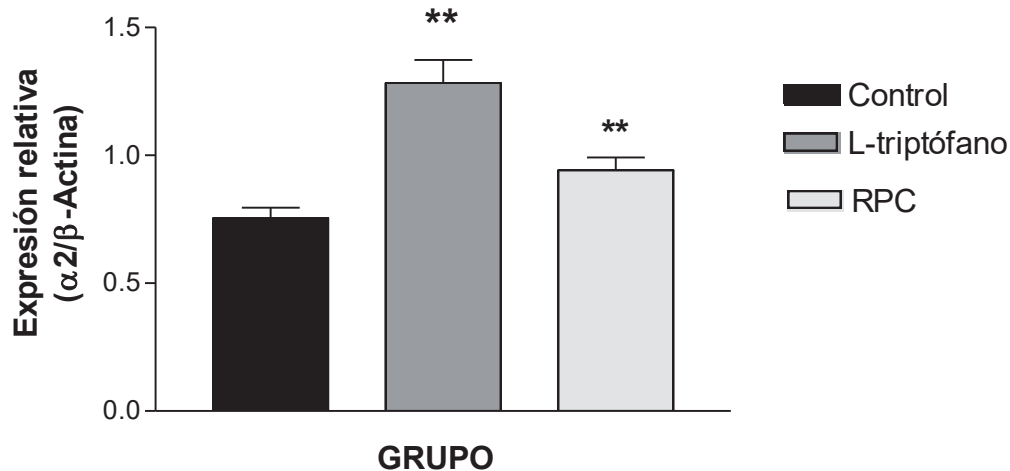
**Figura 26.** *Expresión relativa de gen de la subunidad  $\alpha 1$  de la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPasa en cerebelo de ratas tratadas con L-triptófano, (RPC): Restricción proteico-calórica.  $X \pm D.E.$  de 3 experimentos independientes, se aplicó la prueba de "t" de Student para comparar el grupo tratado contra el grupo control.*

En el presente trabajo se analizó la expresión del gen de la isoforma  $\alpha 2$  en homogeneizado de cerebelo obteniendo como resultado la amplificación del gen de la subunidad  $\alpha 2$  en cerebelo de ratas tratadas con L-triptófano, correspondientes a la talla esperada de 264 pb.



**Figura 27. Productos de amplificación del gen de la subunidad  $\alpha 2$  de la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPasa en cerebelo de ratas tratadas con L-triptófano y (RPC) Restricción proteico-calórica. (MM) Marcador de peso molecular, (pb): Pares de bases, (A (-)): Control negativo.**

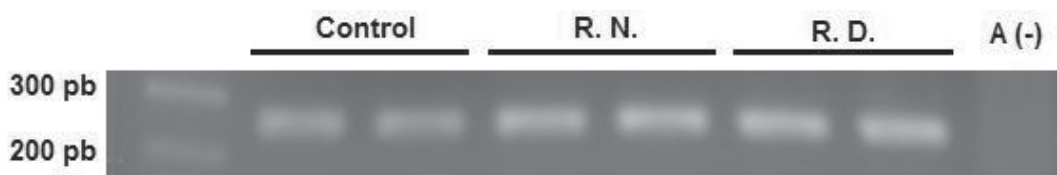
En la figura 28 se muestra la expresión relativa del gen de la subunidad  $\alpha 2$  en cerebelo de rata, en la cual se puede observar que existe un incremento estadísticamente significativo del 70% en la expresión del gen de esta isoforma en el grupo de animales tratados con L-triptófano comparado con el grupo control. Por otra parte el grupo con RPC mostró un incremento del 24.7%. Con base en estos resultados proponemos que la serotonina tiene efecto de regulación a la alta sobre la expresión de la subunidad  $\alpha 2$  de la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasa en cerebelo, probablemente debido a que las células gliales expresan principalmente esta isoforma, y se ha demostrado que la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPasa presente en las células gliales incrementa su actividad al ser estimulada con serotonina.



**Figura 28. Expresión relativa de gen de la subunidad  $\alpha 2$  de la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPasa en cerebelo de ratas tratadas y en (RPC) Restricción proteico-calórica,  $X \pm D.E.$  de 3 experimentos independientes, se aplicó la prueba de "t" de Student comparando el grupo tratado contra el grupo control, \*\*  $P < 0.001$ .**

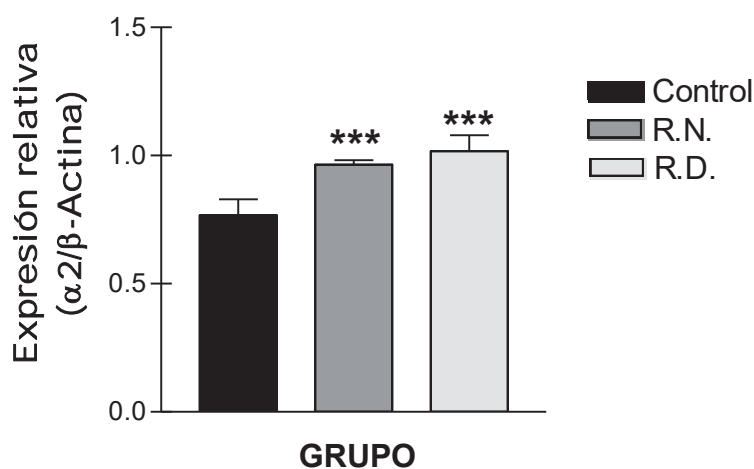
Debido a que se observaron cambios en la expresión del gen de la subunidad  $\alpha 2$  de la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasa se decidió evaluar este mismo gen en otros dos modelos experimentales, un grupo de animales sometidos a RPC durante la etapa gestacional y recuperado nutricionalmente al nacimiento (RN), y otro grupo recuperado al término de la etapa de lactancia o recuperado al destete (RD), con el objetivo de demostrar si la recuperación nutricional modifica la expresión del gen de la subunidad  $\alpha 2$  de la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasa.

En la figura 29 se muestra un gel representativo de los productos de amplificación del gen de la isoforma  $\alpha 2$  de los grupos recuperados nutricionalmente al nacimiento (RN) y al destete (RD) de cerebelo de ratas, los productos corresponden a la talla esperada de 264 pb.



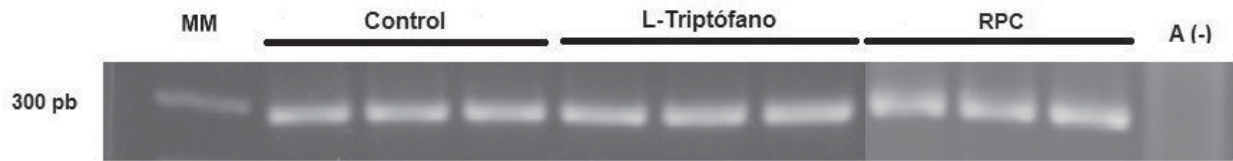
**Figura 29. Productos de amplificación del gen de la subunidad  $\alpha 2$  de la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPasa en cerebelo de ratas tratadas (RN) Recuperadas al nacimiento y (RD) Recuperadas al destete. (MM) Marcador de peso molecular, (pb): Pares de bases, (A (-)): Control negativo.**

En la figura 30 se muestra la expresión relativa del gen de la subunidad  $\alpha 2$  de los grupos control, RN y RD, en la cual se puede observar que existe un incremento estadísticamente significativo (25.7%) en la expresión del gen de esta isoforma en el grupo de animales RN comparado con el control. Por otra parte el grupo RD mostró un incremento del 32.5%, con estos resultados se muestra que la RPC durante la etapa gestacional causa un incremento en la expresión del gen de la subunidad  $\alpha 2$  de la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasa, que estos cambios son permanentes y la recuperación nutricional no revierte el efecto causado por el estrés nutricional sobre la expresión de la isoforma  $\alpha 2$ .



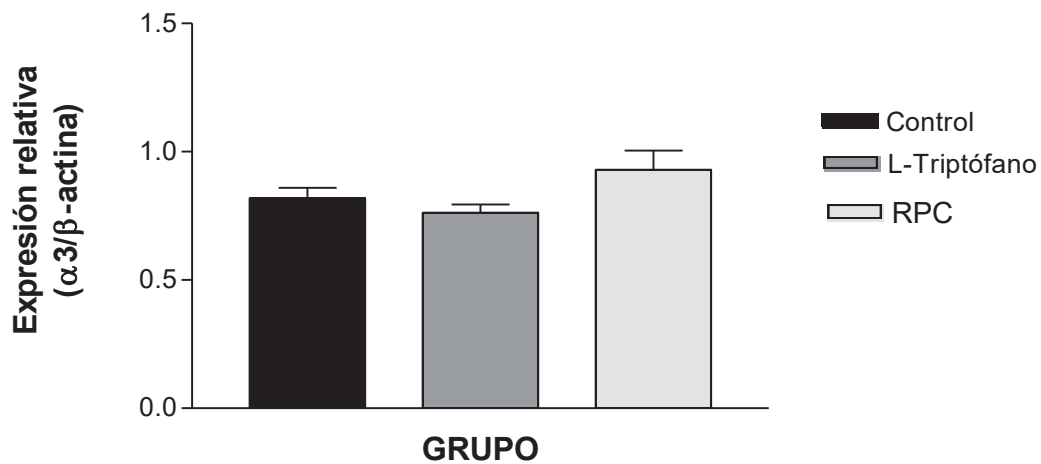
**Figura 30. Expresión relativa de gen de la subunidad  $\alpha 2$  de la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPasa en cerebelo de ratas, (RN) Recuperado al nacimiento, (RD) Recuperado al destete, se muestra  $X \pm D.E.$  de 3 experimentos independientes, se aplico la prueba de "t" de Student para comparar el grupo tratado contra el grupo control, \*\*\*  $P < 0.0001$ .**

En la figura 31 se muestra un gel de agarosa representativo que muestra los productos de amplificación del gen de la subunidad  $\alpha 3$  de la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasa, correspondientes a la talla esperada de 285 pb.



**Figura 29. Productos de amplificación del gen de la subunidad  $\alpha 3$  de la  $Na^+/K^+$  ATPasa en cerebelo de ratas tratadas con L-triptófano y (RPC) Restricción proteico-calórica. (MM) Marcador de peso molecular, (pb): Pares de bases, (A (-)): Control negativo.**

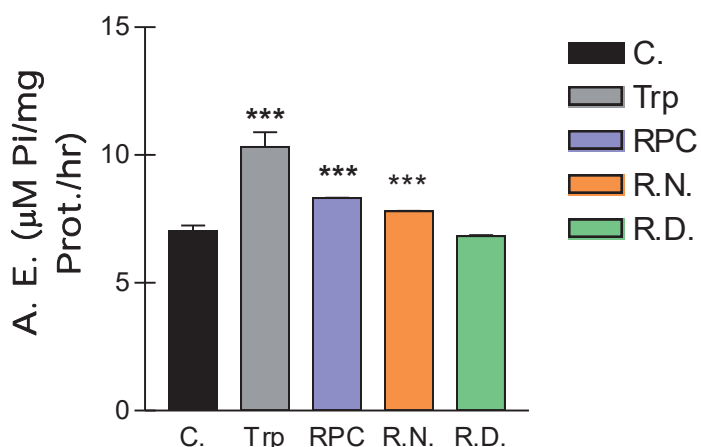
En la figura 32 se muestra la expresión relativa de la subunidad  $\alpha 3$  en los grupos tratados con L-triptófano y en RPC. Se observó que no existen cambios estadísticamente significativos de la expresión de este gen entre los grupos. En el SNC la subunidad  $\alpha 3$  al igual que la subunidad  $\alpha 1$  se expresa predominantemente en las neuronas (Blanco y Mercer, 1998) razón por la cual proponemos no se modifica su expresión, debido a que la  $Na^+/K^+$ -ATPasa presente en las neuronas no es estimulada por serotonina.



**Figura 32. Expresión relativa de la subunidad  $\alpha 3$  de la  $Na^+/K^+$  ATPasa en cerebelo de ratas tratadas con L-triptófano y (RPC) Restricción proteico-calórica, se muestra  $X \pm D.E.$  de 3 experimentos independientes, se aplico la prueba de "t" de Student para comparar el grupo tratado contra el grupo control.**

### VI.3 DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA

La administración de serotonina y precursores serotoninérgicos causan un incremento en la actividad de la Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPasa (Hernández et al., 1979), por lo que se decidió evaluar el efecto del L-triptófano y la restricción alimenticia en la etapa gestacional sobre la actividad de la Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPasa. Los resultados se muestran en la figura 33, se observó un incremento del 46.6% en la actividad de la enzima en los animales tratados con L-triptófano, además un incremento del 18% en los animales con RPC, y un incremento del 10% en los animales RN. Estos datos tienen correlación con el incremento en la expresión del gen de la subunidad  $\alpha 2$  de la Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPasa observado en estos modelos experimentales, lo cual sugiere que el incremento en la expresión del gen puede traducirse en proteína y causar un incremento en la actividad de la enzima como se observa en estos resultados experimentales. Sin embargo, los animales RD no muestran cambios en la actividad de la enzima en comparación con su control, pero sí en la expresión del gen de la subunidad  $\alpha 2$ , esto puede deberse a que la restricción proteico-calórica causa también cambios en otros sistemas hormonales como el de la insulina, que también regula la actividad de la enzima.



**Figura 30. Actividad específica de la Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPasa en cerebelo de ratas, (C) Control, (Trp) L-triptófano, (RPC) Restricción proteico-calórica, (RN) Recuperado al nacimiento, (RD) Recuperado al destete, se muestra X ± D.E. de 4 experimentos realizados por triplicado. \*\*\* P< 0.0001.**



## VII. DISCUSION

La Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPasa es una enzima indispensable para las células animales, por esta razón sus sistemas de regulación tanto de la actividad como de la expresión de la enzima son muy variados, este estudio fue enfocado en evaluar el efecto de la estimulación de la síntesis de serotonina sobre la expresión de los genes de las subunidades  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  y  $\alpha 3$  de la Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPasa en cerebelo de ratas.

Se han desarrollado modelos experimentales que permiten incrementar las concentraciones de serotonina en el SNC, se sabe que la serotonina se sintetiza a partir del aminoácido esencial L-triptófano, a nivel periférico las células enterocromafines llevan a cabo su síntesis y la serotonina que se sintetiza en esta zona representa más del 90% de la serotonina total de un organismo; sin embargo, esta serotonina no ingresa al sistema nervioso central debido a que este sistema se encuentra protegido por la barrera hematoencefálica, solo pueden cruzar pequeñas moléculas como ácidos grasos de cadena corta y algunos aminoácidos entre ellos el L-triptófano, este aminoácido viaja a través del sistema circulatorio en dos fracciones, una fracción unida a la albúmina y la otra libre, es a partir de la fracción libre de L-triptófano que ingresa al SNC que se sintetiza la serotonina en los núcleos del Rafé, de tal manera que si se incrementa la cantidad de L-triptófano en el torrente sanguíneo también se incrementa la cantidad del aminoácido libre que ingresa al SNC y se estimula la síntesis de serotonina incrementándose la concentración de este neurotransmisor en el SNC (*Hernández, 1979*). Otro modelo experimental en el que se incrementa la síntesis de serotonina es un esquema de restricción proteico calórica (RPC) en el que se ha documentado ampliamente que se modifica la síntesis de serotonina en la etapa adulta (Día 60 postnatal), los datos experimentales muestran que la triptófano 5-hidroxilasa (TPH), enzima limitante en la biosíntesis de serotonina, tiene una mayor afinidad por el sustrato, además de que la RPC disminuye la cantidad de albumina disponible por lo que existe poco triptófano unido a la albumina y una mayor cantidad libre, esta es la causa de que las concentraciones de serotonina en el SNC se incrementen. Como ya se menciono, la zona de

síntesis de serotonina en el SNC se lleva a cabo en los núcleos del Rafé, los cuales tienen inervación hacia la corteza cerebral y el cerebelo, de tal manera que en estas dos regiones del sistema nervioso se incrementan las concentraciones de serotonina (*Hernández, 1979; Manjarréz et al., 1988; Manjarréz et al., 1993; Manjarréz et al., 1998*). Estos dos modelos experimentales fueron utilizados en el presente trabajo con el objetivo de incrementar las concentraciones de serotonina en el SNC, para posteriormente evaluar la actividad específica y la expresión del gen de las subunidades  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  y  $\alpha 3$  de la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasa en cerebelo de ratas.

Con respecto a la relación funcional serotonina- $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasa existen un gran número de estudios que demuestran que la serotonina incrementa la actividad de la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasa (*Midelton et al., 1990; Hernández et al., 1979; Manjarréz et al., 1998; Díaz et al., 1993*) y que existe esta relación funcional, se ha observado que al evaluar la cinética enzimática de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasa en presencia de serotonina se modifica la cinética en homogeneizado de corteza cerebral, pero al aislar membranas gliales y neuronales se observó que en las membranas neuronales no se modifica la cinética, este incremento de la actividad de la enzima solo ocurre en fracciones de membrana gliales (*Mercado y Hernández, 1992*). Por lo cual se puede inferir que los resultados del presente trabajo corresponden a la respuesta de las células gliales ya que son las enzimas presentes en estas células las que responden a la serotonina y la isoforma de la subunidad catalítica de la bomba de sodio y potasio que expresan estas células es la  $\alpha 2$ . También se ha observado que la expresión del receptor  $5\text{-HT}_{1A}$  en células HeLa incrementa la actividad de la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasa en un 38%, mostrando también un cambio en las concentraciones de  $\text{Ca}^{+2}$  intracelular, estos estudios muestran claramente que la serotonina tiene una relación funcional con  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasa a través del receptor  $5\text{-HT}_{1A}$ . Otros estudios han demostrado también la participación de diferentes receptores serotoninérgicos a través de los cuales se incrementa la actividad de esta enzima, el uso de agonistas y antagonistas demostraron la participación de los receptores  $5\text{-HT}_{1A}$  en corteza cerebral,  $5\text{-HT}_2$  y  $5\text{-HT}_6$  en cerebelo de ratas (*Peña et al., 1998*).

En este estudio se evaluaron los niveles de expresión del gen de la subunidad  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  y  $\alpha 3$  de la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasa, y aunque existe una isoforma  $\alpha 4$  no se determinó su expresión debido a que las primeras tres isoformas son las que se expresan en el SNC y la isoforma  $\alpha 4$  se expresa únicamente en testículo (*Shamraj y Lingrel, 1994*). En relación a la expresión de las distintas isoformas se ha documentado que su expresión es tejido-específica, en el sistema nervioso existen varios tipos de células las cuales expresan también distintas isoformas  $\alpha$ , las neuronas expresan principalmente las isoformas  $\alpha 3$  y  $\alpha 1$  (*Blanco y Mercer 1998*), mientras que las células gliales específicamente los astrocitos expresan principalmente la isoforma  $\alpha 2$  (*Antonelli et al., 1997; Zhang et al., 2005, Peng et al., 1977*). Los datos experimentales de este trabajo muestran que solo se presentan cambios significativos en la subunidad  $\alpha 2$  pero no en la isoforma  $\alpha 1$  ni  $\alpha 3$ , relacionando los antecedentes con los resultados experimentales podemos sugerir que el incremento en la expresión del gen de la isoforma  $\alpha 2$  es debido a que esta isoforma se expresa principalmente en los astrocitos pertenecientes al grupo de células gliales del SNC, de las cuales se sabe que responde al estímulo por serotonina (*Mercado y Hernández, 1992*).

Los resultados experimentales muestran la validación del modelo experimental de restricción proteico-calórica evaluando la longitud céfalo-sacra, el consumo de alimento y el peso corporal. Estos datos muestran diferencias estadísticamente significativas en la longitud céfalo-sacra de los animales RPC comparados con su control, mostrando que la RPC tiene un efecto directo sobre el desarrollo de los animales, datos que coinciden con los de otros investigadores (*Manjarréz et al., 1988; Manjarréz et al., 1993; Manjarréz et al., 1998*). La investigación de la RPC ha mostrado más datos en los que se ha observado que no solo se disminuye la talla de los animales cuando sufre desnutrición durante la gestación, sino que también se afecta el desarrollo del sistema nervioso, se han observado cambios morfológicos y funcionales en ratas que fueron sometidas a este estrés nutricional durante etapas tempranas del desarrollo, y una de las estructuras más afectadas del SNC es el cerebelo (*Levitsky et al., 1995*). En cuanto a los cambios funcionales causados por la condición de RPC se han

identificado modificaciones en los niveles de síntesis de algunos neurotransmisores principalmente dopamina y serotonina, además muchos de estos cambios son permanentes (*Shoemaker y Wurtman, 1973*). En cuanto al consumo de alimento de las crías de madres en RPC en su etapa gestacional los resultados experimentales muestran diferencias significativas entre el RPC y el grupo control debido a que el RPC recibió 50% de la cantidad de alimento consumido por el grupo control, pero los grupos en los que se recuperaron nutricionalmente los animales (RN y RD) muestra datos importantes en cuanto al consumo de alimento, estos dos grupos RN y RD muestran una disminución significativa en la ingesta de alimento comparado con el grupo control, sin embargo se observa un incremento significativo en el peso corporal, lo cual tiene relación con la hipótesis del fenotipo ahorrador (*Villares y Serra, 2001*). En esta hipótesis varios investigadores muestran que la condición de desnutrición en la etapa gestacional genera un fenotipo que aprovecha al máximo los nutrientes y los almacena, de tal manera que aunque el consumo de alimento sea menor que el control el aprovechamiento será mayor causando también una mayor acumulación de nutrientes en el organismo, un aumento en el peso corporal (*Woods y D'Alessio, 2008*) y el desarrollo de enfermedades crónico-degenerativas como la diabetes mellitus e hipertensión (*Levin, 2008; Ashton, N. 2000*).

El grupo de ratas con RPC no mostro modificaciones en la expresión del gen de las isoformas  $\alpha 1$  y  $\alpha 3$ ; sin embargo, la expresión de la isoforma  $\alpha 2$  se encuentra incrementada en un 24.7%, la actividad enzimática de la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasa muestra también un incremento del 18.2% en homogeneizado de cerebelo, se sugieres que es debido a que la RPC causa un incremento en las concentraciones de serotonina en el SNC y la serotonina incrementa la expresión del gen de la subunidad  $\alpha 2$  lo cual causa un incremento en la actividad de la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasa (*Hernández, 1979*). Con el objetivo de evaluar sí la recuperación nutricional restablece los niveles de expresión de este gen se estudiaron dos grupos de ratas adicionales. El grupo RN, el cual mostró también un incremento estadísticamente significativo en la expresión del gen del 25.7%, y un incremento del 10.9 % en la actividad enzimática, por otro lado el grupo RD muestra un

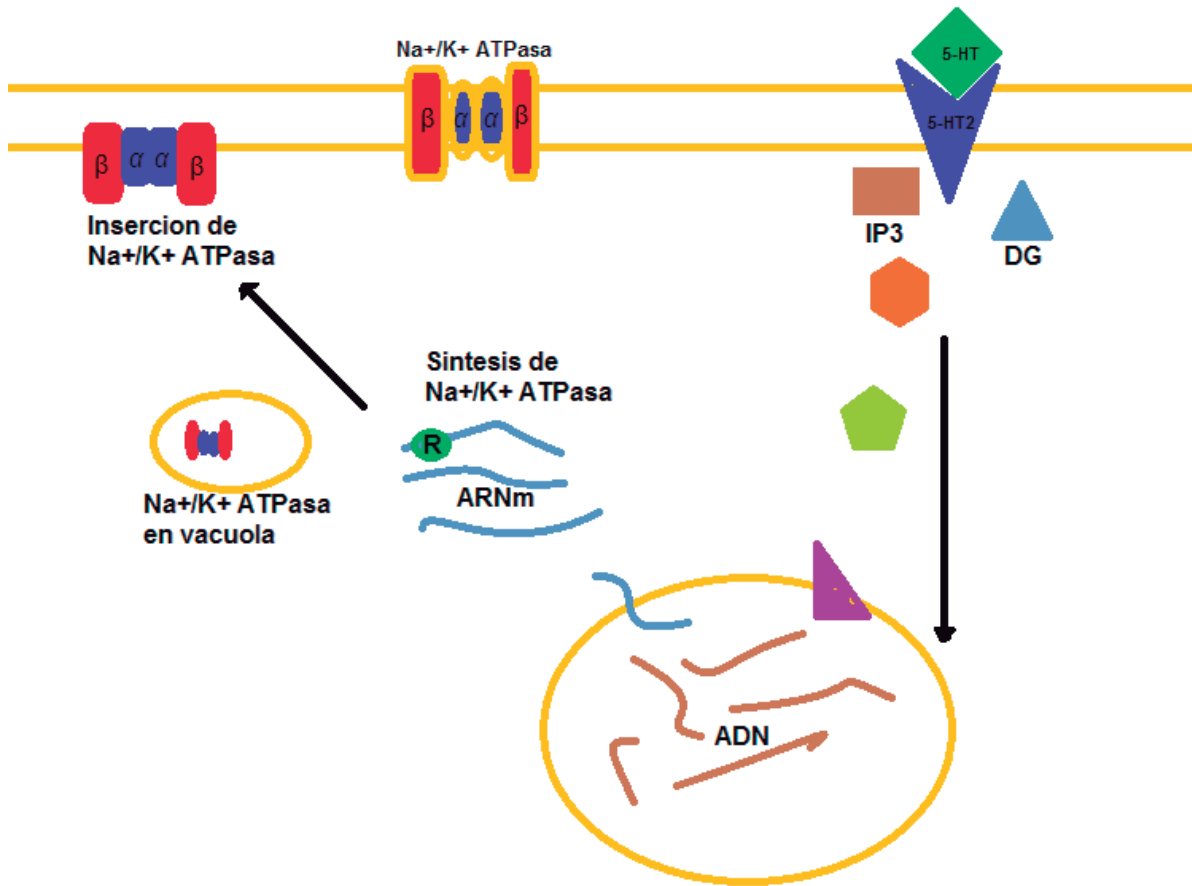
incremento del 32.5% en la expresión del gen de la subunidad  $\alpha 2$  de la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasa; sin embargo, en este grupo no se observan cambios estadísticamente significativos en la actividad enzimática, probablemente es debido a que la RPC durante la lactancia afecta sistemas hormonales los cuales también regulan la actividad de la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasa (*Ewart y Klip, 1995, Bergel et al., 1998, Omatsu y Kitasato, 1990, Hill, 2011*).

Al evaluar los niveles de expresión en cerebelo de los genes de las isoformas  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  y  $\alpha 3$  en el grupo de animales tratados con L-triptófano, se demostró que no ocurren cambios de expresión en las isoformas  $\alpha 1$  y  $\alpha 3$ ; sin embargo, el gen de la isoforma  $\alpha 2$  muestran un incremento estadísticamente significativo del 70% comparado con el grupo control. Al determinar la actividad específica de la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasa se observó un incremento en la actividad de la enzima del 46.6% en los animales tratados comparados con su control, estos resultados concuerdan con los de otros investigadores (*Peña et al., 1998; Mercado y Hernández, 1992*), con estos datos experimentales se propone que es la serotonina la que causa las modificaciones en los niveles de expresión de los genes y la actividad enzimática, debido a que se sabe que la administración del L-triptófano estimula al sistema serotoninérgico, pero no se tienen reportes de que este modelo experimental modifiquen otros sistemas de neurotransmisión u hormonales que son las principales moléculas que regulan la actividad y expresión de la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasa.

En otros estudios se ha observado también incremento en la expresión del gen de la isoforma  $\alpha 2$  y en la actividad de la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasa en homogeneizado de corteza cerebral de ratas sometidas a las mismas condiciones experimentales a las realizados en el presente trabajo (*Bautista, 2012*). Sin embargo, comparando la expresión del gen de la isoforma  $\alpha 2$  entre el cerebelo y la corteza cerebral, se observa un mayor incremento tanto de la expresión del gen como de la actividad de la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasa en el cerebelo. Se sugiere que esto puede deberse a que el cerebelo lleva a cabo principalmente funciones motrices (*Yeganeh et al., 2011; Manto y Jessendi, 2012*), mientras que la corteza cerebral desempeña en gran

parte de funciones cognitivas, auditivas y gustativas entre otras (Luhman et al., 2002). Las funciones que desempeña el cerebelo se ven afectadas en trastornos como el déficit de atención e hiperactividad, patologías que están relacionadas con un incremento en la síntesis de serotonina (Halmoy et al., 2010; Xu et al., 2009) como en el caso de la estimulación de la síntesis de serotonina tanto aguda como crónica que se utilizó en el presente trabajo.

Con los resultados experimentales proponemos que la estimulación de la síntesis de serotonina incrementa los niveles de expresión del gen de la subunidad  $\alpha 2$  de la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasa que posteriormente es traducido a proteína, la cual también incrementa el número de la enzima en la membrana plasmática de la célula. De tal manera que la actividad de la enzima se encuentra incrementada. La serotonina lleva a cabo su función a través de receptores serotoninérgicos, de los cuales se sabe que los astrocitos expresan el  $5\text{-HT}_{2B}$  y la estimulación de este receptor causa un incremento en la concentraciones intracelulares de  $\text{Ca}^{+2}$  (Sandén et al., 2000), el cual podría activar factores de transcripción dependientes de calcio que induzcan el incremento en la expresión del gen de la subunidad  $\alpha 2$  y el incremento en su actividad (Fig. 34).



**Figura 31. Propuesta del mecanismo de regulación de la subunidad  $\alpha_2$  de la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPasa por serotonina**, en la que se muestra la unión de la  $5\text{-HT}$  al receptor serotoninérgico  $5\text{-HT}_2$  y dos segundos mensajeros;  $\text{IP}_3$ , Fosfatidil inositol 3- fosfato,  $\text{DG}$ ; Diacil glicerol, también se muestra un modelo esquemático del núcleo que en su interior contiene  $\text{ADN}$ ; Acido desoxirribonucleico, en la región citoplasmática se indica con líneas azules al  $\text{ARNm}$ ; Acido ribonucleico mensajero, en el círculo de color verde con la letra  $\text{R}$ ; Ribosoma y también se muestra la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasa.

## **VII.1 CONCLUSION**

El estrés nutricional incrementa la expresión de la subunidad catalítica  $\alpha 2$  de la Na<sup>+</sup>/K ATPasa en glia de cerebelo de ratas.



## VIII. BIBLIOGRAFIA

- Antonelli, C., Costa, L. M., Mercado, C. R. and Hernández, R. J. 1997. Serotonin modulation of low-affinity ouabain binding in rat brain determined by quantitative autoradiography. *Neurochemical Research*. 7: 939-944.
- Argullo, L., Baltrons, M. A. and Garcia, A. 1995. Calcium-dependent nitric oxide formation in glial cells. *Brain Research*. 689: 160-168.
- Ashton, N. 2000. Perinatal development and adult blood pressure. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 33: 731-740.
- Attenburrow, M. J., Williams, C., Odontiadis, J., Reed, A., Powell, J., Cowen, P. J., Harmer, C. J. 2005. Acute administration of nutritionally sourced tryptophan increases fear recognition. *Psychopharmacology*. 169: 104–107.
- Balabanov, Y. V., Bobryshev, Y. V. and Chumasov, E. I. 1987. Features of glial growth in tissue cultures of rat cerebral cortex. *Math. Naturwiss*. 2: 165-169.
- Bautista, G. C. S. 2012. Regulación de la expresión de las isoformas  $\alpha$  de la bomba de sodio y potasio por serotonina en corteza cerebral de ratas con estrés nutricional (Tesis maestría). Facultad de Químico Farmacobiología. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Morelia, Michoacán, México. 1-90.
- Béguin, P., Crambert, G., Guennoun, S., Garty, H., Horisberger, J. and KaË thi, G. 2001. CHIF, a member of the FXYD protein family, is a regulator of Na,K-ATPase distinct from the  $\gamma$ -subunit. *Journal Embryology*. 15: 3993-4002.
- Benfante, R., Antonini, R. A., Vaccari, M., Flora A., Chens., Clementi, F. and Fornasari, D. 2005. The expression of the human neuronal  $\alpha 3$  Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase subunit gene is regulated by the activity of the Sp1 and NF- $\gamma$  transcription factors. *Journal Biochemical*. 386: 63-72.

- Bergel, M. E., Omsby B. L., Bunnag, O., Hori, M. T., Tuck, M. L. and Golub M. S. 1998. Increased functional Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>-pump activity in the vasculature of fructose-fed hyperinsulinemic and hypertensive rats. *Hipertense Research*. 21: 73-80.
- Berger, M., Gray, J. A., and Roth, B. L. 2009. The expanded biology of serotonin. *The Annual Review of Medicine*. 60: 355-366.
- Berret, B., Chiovetto, E., Nori, F., Pozzo, T. 2011. Evidence for composite cost functions in arm movement planning: an inverse optimal control approach. *Plos Computational Biology*. 7: 1-18.
- Bishop, B. 1982, Neural plasticity. plasticity in the developing nervous system. *Journal of the American Physical Therapy Association*. 82: 1122-1131.
- Blanco, G. and Mercer, R. W. 1998. Isozymes of the Na-K-ATPase: heterogeneity in structure, diversity in function. *Journal Renal Physiology*. 275: 633-650.
- Blundell, J. E. 1992. Serotonin and the biology of feeding. *American Journal Clinical Nutrition*. 155S-159S.
- Boyzo, A., Ayala J., Gutiérrez R. and Hernández, R. J. 2003. Neuroaminidase activity in different regions of the seizing epileptic and no-epileptic brain, *Brain Research*. 964: 211-217.
- Chagoya, G. and Hernández, J. 1983. L-Tryptophan during gestation induces an increase in brain tryptophan 5-hydroxylase activity and serotonin synthesis. *Proceeding West Pharmacology*. 26: 369-372.
- Chen, J. C., Tonkinss, J., Galler, J. A. and Volicer, L. 1992. Prenatal protein malnutrition in rats enhances serotonin release from hippocampus. *The Journal of Nutrition*. 2138-2143.
- Choi, D. S. and Maroteaux, L. 1996. Immunohistochemical localization of the serotonin 5-HT<sub>2B</sub> receptor in mouse gut cardiovascular system and brain. *Federation of the Societies of Biochemistry and Molecular Biology*. 391: 45-51.

- Chung, S. H., Kim, C. T., Jung, Y. H., Lee, N. S., Jeong, Y. G. 2010. Early cerebellar granule cell migration in the mouse embryonic development. *Anatomy and Cell Biology*. 43: 86-95.
- De Aluja, S. A. 2002. Animales de laboratorio y la norma oficial Mexicana (NOM-062-ZOO-1999) *Gaceta Medica Mexicana*. 3: 295-298.
- Desfrere, L., Karlsson, M., Hiyoshi, H., Malmersjo, S. 2008. Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase signal transduction triggers CREB activation and dendritic growth. *PNAS*. 7: 2212-2217.
- Díaz, M., Chagoya, G. G., Hernández, R. J. 1993. Modificación por desnutrición ontogénica de la neurotransmisión serotoninérgica cerebral y de una conducta relacionada. *Boletín Médico del Hospital Infantil de México*. 1: 17-26.
- Doost, P. Y., Gruber, O., Falakai, P., and Schmitt, A. 2001. The role of the cerebellum in schizophrenia. *Clinics*. 66: 71-77.
- Dostanic, I., Lorenz, J. N., Schultz, J., Grupp, I. L. and Neumann, J. 2003. The  $\alpha 2$  Isoform of Na,K-ATPase mediates ouabain-induced cardiac inotropy in mice. *The Journal of Biological Chemistry*. 52: 53026–53034.
- Eder, C. 1998. Ion channels in microglia (brain macrophages). *The American Physiological Society*. 275: 327-342.
- Efendiev, R. and Pedemonte, C. H. 2006. Contrary to rat-type, human-type Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase is phosphorylated at the same aminoacid by hormones that produce opposite effects on enzyme activity. *Journal American Society of Nephrology*. 17: 31-38.
- Elaine, T. W., and Andrade, R. 2010. Htr2a gene and 5-HT<sub>2A</sub> receptor expression in the cerebral cortex studied using genetically modified mice. *Neuroscience*. 36: 1-12.
- España, R. A., and Scammell, T. E. 2011. Sleep neurobiology from a clinical perspective. *sleep neurobiology for the clinician*. *Journal Sleep*. 34: 845-858.

- Ewart, H. S. and Klip, A. 1995. Hormonal regulation of the Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase: mechanisms underlying rapid and sustained changes in pump activity. American physiology Society. C295-C311.
- Feschenko, M. S., Donnet, C., Wetzel R. K., Asinovski N. K. 2003. Phospholeman, a single-span membrane protein, is an accessory protein of Na,K-ATPase in cerebellum and choroid plexus. The Journal Neuroscience. 23: 2161-2169.
- Fiske, C. and Subbarrow, Y. 1925. The colorimetric determination of phosphorus. Journal Biological Chemistry. 66: 375-400.
- Franzin, M. C., Gong X. M., Teriete, P., Marassi, F. M. 2007. Structures of the FXYP regulatory proteins in lipid micelles and membranes. Journal Bioenergetics Biomembranes. 6: 379-383
- Galuska, D., Kotova, O., Barres, R., Chibalina, D., Benziane, B. and Chinbalin, A. 2009. Altered expression and insulin-induced trafficking of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase in rat skeletal muscle: effects of high diet and exercise. Endocrinology and Metabolism. 297. E38-E49.
- Geerin, K. 2001. The functional role of  $\beta$  subunit in oligomeric P-Type ATPases. Journal of Bioenergetics and Biomembranes. 33: 425-438.
- Geering, K. 2006. FXYP proteins: new regulators on Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase. Journal American Renal Physiology. 290: 241-250
- Gomes, P. and Soares da-silva, P. 2002. Role of cAMP-PKA-PLC signaling cascade on dopamine-induced PKC-mediated inhibition of renal Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase activity. Journal Physiology. 282: 1084-1096.
- Gottron, M. A., and Lo D. C. 2010. The Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase as a drug target for ischemic stroke. News Strategies in Stroke Intervention. 129-151.
- Halmoy, A., Johanson, S., Winge, I., McKinney, J., and Haavik, J. Attention deficit/hyperactivity disorder symptoms in offspring of mothers with impaired serotonin production. Arch Gen Psychiatry. 67: 1033-1043.

- Hara, Y., Urayama, O., Kawakami, K., Nojima, H., Nagamune, H., Kojima, T., Ohta, T., Nagano, K., Nakao, M. 1987. Primary structures of two types of alpha-subunit of rat brain Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase deduced from cDNA sequences. *Journal Biochemistry*. 102: 43-58.
- Henrring, N. R. and Konradi, C. 2011. Myelin, copper, and the cuprizone model of schizophrenia. *National Institutes of Health*. 3: 23.40.
- Hernández, G. P., Tirapu, U. J., Iglesias, F. L. y Luna, L. P. 2010. Participación del cerebelo en la regulación del afecto, la emoción y la conducta. *Neurología*. 51: 597-609.
- Hernández, R. J. 1979. Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> -ATPase activity in the brain cortex of rats ontogenetically malnourished and treated with serotonin precursors. *Brain Research*. 162: 348-358.
- Hernández, R. J. 1990. Early experimental influences on serotonin pathways during brain development. *Journal Physiology* 7: 261- 267.
- Hernández, R. J. 1992. Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase Regulation by Neurotransmitters, *Neurochemistry*. 20: 1980-1992.
- Hernández, R. J. and Chagoya, G. 1986. Brain serotonin synthesis and Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase activity increased postnatally after prenatal administration of L-Tryptophan. *Developmental Brain Research*. 25: 221-226.
- Hernández, R. J. and Condés, L. M. 1989. Serotonin-dependent (Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>) ATPase in kindled rats: a study in various brain regions. *Brain Research*. 480: 403-406.
- Hernández, R. J., Peña, R. M. T. and Mercado, C. R. 1999. Regulation of glial Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase by serotonin: identification of participating receptors. *Neurochemical Research*. 24, 5: 643-649
- Herrera, V. L., Emanuel, J. R., Opazo, N. R., Levenson, R. and Ginar, B. N. 1987. Three differentially expressed Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase  $\alpha$  subunit isoforms: structural and functional implications. *The Journal of Cell Biology*. 105: 1855-1865.

- Herring, N. R. and Konradi, C. 2011. Myelin, copper, and the cuprizone model of schizophrenia. *National Institute of Health*. 3: 23-40
- Hill D. J. 2011. Nutritional programming of pancreatic  $\beta$ -cell plasticity. *World Journal of Diabetes*. 8: 119-126.
- Horisberger, J. D. 2004. Recent insights in to the structure and mechanism of the sodium pump. *American Physiology Society*. 19: 377-387.
- Karitskaya, I. A., Aksenov, N. D., Vasileva, I. O. and Marakhova, I. L. 2008. Long-term regulation of  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase pump in human lymphocytes: Role of JAK/STAT and MAPK signaling pathways. *Cell and Tissue Biology*. 1: 23-32.
- Kaye, W., Gendall, K. and Strober, M. 1998. Serotonin neuronal function and selective serotonin reuptake inhibitor treatment in anorexia and bulimia nervosa. *Biological Psychiatry*. 44: 825-838.
- Kent, B. R., Fallows, A. D., Geissler, E. 1987. Genes encoding  $\alpha$  and  $\beta$  subunits of  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase are located on three different chromosomes in the mouse. *Proceeding National Academy Science*. 84: 5369-5373.
- Kobayashi, M., Shimomura, A., Hagiwara, M. and Kawakami, K. 1997. Phosphorylation of ATF-1 enhances its DNA binding and transcription of the  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase  $\alpha 1$  subunit gene promoter. *Nucleic Acids Research*. 4: 877-882.
- Lavezzin, A. M., Corna, M. F., Maturri, L. 2010. Ependymal alterations in sudden intrauterine unexplained death and sudden infant death syndrome: possible primary consequence of prenatal exposure to cigarette smoking. *Neural Development*. 5: 1-17.
- Le Floc'h, N., Otten, W. y Merlot, E. 2010. Tryptophan metabolism, from nutrition to potential therapeutic applications. *Amino Acids*. 10: 726-752.
- Levin, B. E. 2008. Epigenetic influences on food intake and physical activity level: Review of Animal Studies. *National Institute of Health*. 16: 1-6.

- Lowry, O., Rosebrough, N. F. A. and Randall, R. 1951. Protein measured with the folin phenol of reagent. *Journal Biology*. 193: 265-275.
- Luhman, H.J., Hanganu I., and Kilb, W., 2002. Cellular physiology of the neonatal rat cerebral cortex. *Brain Research Bulletin*, 60:345-353
- Manjarréz, G. G., Chagolla, G. G., Hernández, R. J. 1988. Desnutrición intrauterina. II. L-triptófano, triptófano-5-hidroxilasa y serotonina en el cerebro de la rata. *Boletín Médico del Hospital Infantil de México*. 12: 808-816.
- Manjarréz, G. G., Chagolla, G. G., Hernández, R. J. 1993. Cambios epigenéticos en la expresión de una proteína funcional en el cerebro, inducidos por desnutrición gestacional. *Boletín Médico del Hospital Infantil de México*. 2: 88-95.
- Manjarréz, G. G., Herrera, M. R., Hernández, Z. E., Manuel, A. L., González, R. M. y Hernández, R. J. 1998. Elevación crónica de la síntesis de serotonina cerebral en rata adulta desnutrida in útero y recuperada nutricionalmente durante el amamantamiento. *Boletín Médico del Hospital Infantil de México*. 11: 651-657.
- Manjarréz, G. G., Herrera, R., León, M., Hernández, R. J. 2006. A low brain serotonergic neurotransmission in children with type 1 diabetes detected through the intensity dependence of auditory evoked potentials. *Diabetes Care*. 29: 73–77.
- Manto, M. and Jessendi, P. 2012. Cerebellum: links between development, developmental disorders and motor learning. *Frontiers in Neuroanatomy*. 6: 1-10.
- Mcdonough A. A., Geering K. and Farley R. A. 1990. The sodium pump needs its  $\beta$  subunit. *The journal of federation of America Societies for Experimental Biology*. 4: 1598-1604.
- McKay, B. E. and Turner, R. W. 2005. Physiological and morphological development of the rat cerebellar Purkinje cell. *Journal Physiology*. 567: 829–850.
- Mercado, C. R. and Hernández, R. J. 1992. A molecular recognizing system of serotonin in rat fetal axonal growth cones: uptake and high affinity binding. *Developmental Brain Research*. 69: 133-137.

- Mercado, C. R. and Hernández, R. J. 1992. Regulatory role of neurotransmitter (5-HT) on glia Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase in the rat brain. *Neurochemistry*. 21: 119-127.
- Mercado, C. R., Floran, B. and Hernández, R. J. 1998. Regulated release of serotonin from axonal growth cones isolated from fetal rat brain. *Neurochemistry*. 103-106.
- Middleton, J. P., Raymond, J. R., Whorton, A. R. and Dennis, V. W. 1990. Short-term regulation of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> adenosine triphosphatase by recombinant human serotonin 5-HT<sub>1A</sub> receptor expressed in Hela cells. *Journal Clinical Investigation*. 86: 1799-1805.
- Mogami, H., Lloyd, C. and Gallacher, V. D. 1997. Phospholipase C inhibitor, U73122, releases intracellular Ca<sup>2+</sup>, potentiates Ins (1, 4, 5) P<sub>3</sub>-mediated Ca<sup>2+</sup> release and directly activates ion channels in mouse pancreatic acinar cells. *Journal Biochemistry*. 324: 645-651.
- Müller, E. H., Juvvadi, P., Thompson, C. B., Tumyan, L., Croyle, M., Lingrel, J. B., Schwinger, R. H., McDonough, A. A. and Farley, R. A. 2001. Ouabain and substrate affinities of human Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase  $\alpha_1\beta_1$ ,  $\alpha_2\beta_1$ , and  $\alpha_3\beta_1$  when expressed separately in yeast cells. *American Journal Physiology Cell*. 281: 1355-1364.
- Navascués, J., Calvete, R., Marin, T. J. and Cuadros, M. A. 2000. Entry, dispersion and differentiation of microglia in the developing central nervous system. *Annals Academic Brazil*. 72: 91-102.
- Nicholls, J., Purves, D. 1972. A comparison of chemical and electrical synaptic transmission between single sensory cells and a motoneurone in the central nervous system of the leech. *Journal Physiology*. 225. 637-656.
- Nichols, D. E. and Nichols, C. D. 2008. Serotonin receptor. *Chemical Society*. 108: 1614–1641.
- Noda, M., Higashida, H., Aoki, S. and Wada, K. 2004. Multiple signal transduction pathways mediated by 5-HT receptors. *Molecular Neurobiology*. 29: 31-39.



- O'Neill, H., Lebeck, J., Collins, P. B., Kwon, T. H. 2008. Aldosterone-mediated apical Targeting of ENaC subunits in bluted in rats with streptozotocin-induced diabetes mellitus. *Nephrology Dialysis Transplantation*. 23: 1546-1555.
- Omatsu, M. and Kitasato, H. 1990. Insulin stimulates the translocation of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-dependent ATPase molecules from intracellular stores to the plasma membrane in frog skeletal muscle. *Journal Biochemical*. 272: 727-733.
- Osawa, Y., Kanamori, H., Seki, E., Hoshi, M., Ohtaki, H., Yasuda, Y., et al., 2011. L-Tryptophan-mediated enhancement of susceptibility to nonalcoholic fatty liver disease is dependent on the mammalian target of rapamycin. *Journal of Biological Chemistry*. 286: 34800-34808.
- Pandey, S. C., Davis, J. M., Pandey, G. N. 1995. Phosphoinositide system-linked serotonin receptor subtypes and their pharmacological properties and clinical correlates. *Journal Psychiatry Neuroscience*. 20: 215- 225.
- Panksepp, J. 2011. Cross-species affective neuroscience decoding of the primal affective experiences of humans and related animals. *Plos One*. 6: 1-15.
- Platel, J. C., Stamboulian, S., Nguyen, I. and Bordey A. 2010. Neurotransmitter signaling in postnatal neurogenesis: the first leg. *Brain Research*. 63: 60-71.
- Potaman, V. N., Usserys, D. W. and Sinden, R. R. 1996. Formation of a combined H-DNA/open TATA box structure in the promoter sequence of the human Na,K-ATPase  $\alpha$ 2 gene. *The Journal of Biological Chemistry*. 23: 13441-13447.
- Pytliak, M., Vargová, V., Mechírová, V., Felsöci, M. 2011. Serotonin receptors- from molecular biology to clinical applications. *Physiological Research*. 1-18.
- Raymond, J. R., Mukhin, Y. V., Gettys, T. W. 1999. The recombinant 5-HT<sub>1A</sub> receptor: G Protein coupling and signaling pathways. *British Journal Physiology*. 127: 1751-1764.
- Reis, L. C. 2007. Role of the serotonergic system in the sodium appetite control. *Annals of the Brazilian Academy of Sciences*. 79: 261-283.

- Ressler, K.J. and Nemeroff, C.B. 2000, Role of serotonergic and noradrenergic systems in the pathophysiology of depression and anxiety disorders. *Depress Anxiety* 1: 2-19.
- Reusens B., Theys N. and Remacle C. 2011. Alteration of mitochondrial function in adult rat offspring of malnourished dams. *World Journal of Diabetes*. 9: 149-157.
- Reynolds, R. and Wilkin, G. P. 1988. Development of macroglial cells in rat cerebellum. *Development*. 102. 409-425
- Robinson, A. G. and Zimmerman, E. A. 1973. Cerebrospinal fluid and ependymal neurophysin. *The Journal of Clinical Investigation*. 52. 1260-12667.
- Sadner W. Egwolf B. Khalili Araghi F. Sanchez Rodriguez J. E. 2011 Ouabain binding site in a functioning  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase. *Journal Biochemistry*. 286: 1-16.
- Sandén, N., Thorlin T., Blomstrand, F., Hansson P. E. 2000. 5-Hydroxytryptamine<sub>2B</sub> receptors stimulate  $\text{Ca}^{+2}$  increases in culture astrocytes from three different brain regions. *Neurochemistry*. 36: 427-434.
- Sandrine, V. P., Duran, M. J., Deborah, I., and Thomas, A. 2002. Structure/function analysis of  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase central isoform-specific region: involvement in PKC regulation, *Journal Physiology. Renal Physiology* 283: 1066–1074.
- Sandtner, W., Egwolf, B., Araghi, F. K., Sánchez, R. J., Roux, E., Bezanilla, F. and Holmgren, M. 2011. Ouabain binding site in a functioning  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase. *Journal Biochemistry*. 1-16.
- Scheiner, G. B. 2002. The sodium pump. Its molecular properties and mechanics of ion transport. *Journal of Biological Chemistry*. 269: 24-24-2433.
- Schneider, J. W., Mercer R. W., Caplan, M., Retting J. M., Sweadner, K. J., Benz, E. J. and Levenson R. 1985. Molecular cloning of rat brain  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase  $\alpha$ -subunit cDNA. *Proceeding National Academy Science*. 82: 6357-6361.

- Segall, L., Daly, S. E. and Blostein, R. 2001. Mechanism basis for kinetic differences between the rat  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ , and  $\alpha 3$  isoforms of the Na, K-ATPase. *The Journal of Biological Chemistry*. 34: 31535-31541.
- Seidler, R. D. 2010. Neural correlates of motor learning, transfer of learning, and learning to Learn. *National Institute of Health*. 38: 1-13
- Serluca, F. C., Sidow, A., M. J. et al. 2001. Portioning of tissue expression accompanies multiple duplications of the Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase  $\alpha$  subunit gene. *Genome Research*. 11: 1625-1631.
- Shamraj, O. I. and Lingrel, J. B. 1994. A putative fourth Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase  $\alpha$  subunit gene expressed in testis. *Proceeding National Academy Science*. 12952-12956.
- Shao, Y. and Ismaili F. B. 2003. Control of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase  $\beta_1$ -subunit expression: role of 3'-untranslated region. *American Journal Physiology Cell Physiology*. 286: C580-C585.
- Shinoda, T., Ogawa, H., Cornelius, F., and Toyoshima, C. 2009. Crystal structure of the sodium–potassium pump at 2.4Å resolution. *Nature*. 459: 446-451.
- Shull, M. M., Pugh, D. G. and Lingrel, J. B. 1989. Characterization of the human Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase  $\alpha 2$  gene and identification of ontogenic restriction fragment length polymorphisms. *The Journal of Biological Chemistry*. 29: 17532-17543.
- Somjen, G. G. 2002. Ion regulation in the brain: implications for pathophysiology. *The Neuroscientist*. 254-267.
- Sweadner, K., Feschenko, M. S., 2001. Predicted location and limited accessibility of protein kinase A phosphorylation site on Na-K-ATPase. *Journal Physiology*. 280: 1017-1026.
- Teotia, M. D. and Teotia, S. P. 1975. Serotonin metabolism in children with Kwashiorkor. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 28: 1284-1288.

- Therien, A. G. and Blostein, R. 2000. Mechanisms of sodium pump regulation. *Journal Physiology*. 279: 541-566
- Vasić, V.,\* Momić, T., Petković, M. and Krstić, D. 2008. Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase as the target enzyme for organic and inorganic compounds. *Sensors*. 8: 8321-8360.
- Villares J. M. and Serra J. D. 2001. Alteraciones en la nutrición fetal y efectos a largo plazo: ¿Algo más que una hipótesis?. *Acta Pediátrica Española*. 59: 50-58
- Vizi. E. S. and Oberfrank F. 1992. Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase, its endogenous ligands and neurotransmitter release. *Neurochemical*. 20: 11-17.
- Wang, H., Yuan, W. Q. and Lu Z. R. 200. Differential regulation of the sodium pump  $\alpha$ -subunit isoform gen by ouabain and digoxin in tissues of rats. *Hypertension Research*. 23: S55-S60.
- Wohlpert, K.L. and Molinoff, P. B. 1999. Regulation of levels of 5-HT<sub>2A</sub> receptor. *Anales of the New York Academy of Science*. 861: 128-135.
- Woods, S. C. and D'Alesso, D. A. 2008. Central control of body weight and appetite. *Journal Clinical Endocrinal Metabolic*. 93: S37-S50
- Xu, X., Brookes, K., Sun, B., Llott, N. and Asherson, P. 2009. Investigation of the serotonin 2<sub>C</sub> receptor gene in attention deficit hyperactivity disorder in UK samples. *Biomedical Central Research Notes*. 2: 1-4
- Yeganeh, D. P., Gruber, O., Falkai, P. and Schmitt, A. 2011. The role of the cerebellum in schizophrenia: From cognition to molecular pathways. *Clinics* 66: 71-77
- Yoon, B. E., Jo, S., Woo, J., Lee, J. H., Kim, T., Kim, D., and Lee, C. J. 2011. The amount of astrocytic GABA positively correlates with the degree of tonic inhibition in hippocampal CA1 and cerebellum. *Molecular Brain*. 4: 1-7.
- Zhang, J., Yeol M. L., Cavalli, M. and Mordecai, P. 2005. Sodium pump  $\alpha$ 2 subunits control myogenic tone and blood pressure in mice. *Journal Physiology*. 569: 243-256.