



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLAS DE HIDALGO**

**FACULTAD DE QUÍMICO FARMACOBIOLOGÍA  
LABORATORIO DE NEUROBIOLOGÍA**

**TITULO DE LA TESIS:**

**DIABETES MELLITUS EXPERIMENTAL: ACTIVIDAD DE LA BOMBA  
SODIO Y POTASIO EN CEREBELO DE RATAS MACHO.**

**TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO DE QUIMICOFARMACOBÍOLOGO**

**PRESENTADO POR:**

***p.Q.F.B. LOURDES LARA RAMÍREZ.***

**ASESOR DE TESIS:**

**DC. ROSALIO MERCADO CAMARGO.**

**TESIS PARCIALMENTE APOYADA POR CIC 26.2, COECYT-CB07021309**

**MORELIA, MICHOACAN**

**AGOSTO 2008.**

## ***DEDICATORIAS.***

**Con todo mi amor dedicado a la persona más importante en mi vida, por quien vivo día a día, por quien lucho por ser cada vez mejor, por ti mi niño.....Esperanza, fuerza, vulnerabilidad, inocencia, futuro, valentía, pureza, amor, confianza.... Fernando Yahir mi hijo es dueño de todo eso, y más. Gracias mi vida por existir y por estar a mi lado TE AMO. Que Dios te bendiga siempre.**

**A mi mamá Ma. de Lourdes Ramírez con todo respeto, admiración y mi amor incondicional porque has dado todo por mí sin pensarlo, por ser mi ejemplo a seguir, por ser quien me dio la vida y gracias a ti hoy, yo puedo disfrutar de hechos y creaciones maravillosas a tu lado y al lado de la gente que amo. Simplemente por ser más que mi madre, el ángel que cuida, vela y guía mi camino te quiero con toda el alma mami.**

**A Juan Carlos, Ana Árale, Joel Antonio y Miguel Ángel por su apoyo, su confianza y el cariño que siempre me brindan, con amor, todo este esfuerzo y dedicación para ustedes mis hermanos.**

**Y a cada una de las personas que forma parte de mi vida.**

## **AGRADECIMIENTOS.**

**Son muchas las personas a las que agradezco su apoyo, su confianza, su paciencia, su sabiduría, sus consejos los cuales me han permitido llegar hasta aquí y me abren camino para empezar una nueva etapa de mi vida.**

**GRACIAS a toda mi familia, a mi Fer, a mi mamá, a mi mejor amiga mi hermana, a mis hermanos, a mis princesas Paola y Mary Fer, Julieta, Gris, Alejandro, a mis tíos a mis primos, a ti a pesar de que no estas conmigo te debo el hecho de que yo este aquí; a cada uno de ustedes por la valentía la fuerza de no dejarme caer, por enseñarme a vivir y ser mejor cada día, a través de sus ejemplos, de sus consejos y por todo el apoyo incondicional hacia mi persona, humildemente y sinceramente muchas gracias los amo a todos.**

**Gracias corazón por todo el cariño y el apoyo que de alguna u otra manera siempre me has dado y sobre todo por no olvidarme T.Q.M. Eleazar.**

**A todos mis amigos y compañeros del Laboratorio por su amistad, compañerismo, cariño, ayuda, confianza, apoyo, valentía, fuerza y paciencia: Angie, Blanca, Susan, Karina, Gaby, Magali, Carla, Soco, Lucy, Cris, Saky, Xitlali, Omar, Jaime, Luis, Tavo, Beto y bueno muchos más, ustedes saben que a todos los quiero mucho y les agradezco mil todos aquellos momentos que pasamos juntos.**

**Un profundo agradecimiento al DC. Rosalío Mercado C. por todas sus enseñanzas, sus consejos, por todo el apoyo que me brindo y por darme la oportunidad de pertenecer a su equipo de investigación muchas gracias Doctor por está muy grata experiencia.**

**A mis revisores de Tesis la QFB. Armida Sánchez G., MC. Berenice Yahuaca y el DC. Rafael Ortiz A. por aceptar tomar un tiempo y dedicarlo a mi proyecto, Gracias, por sus buenos consejos y recomendaciones para concluir satisfactoriamente mi proyecto de investigación.**

## ÍNDICE

|                              |     |
|------------------------------|-----|
| CONTENIDO.....               | i   |
| INDICE FIGURAS Y TABLAS..... | iii |
| LISTA ABREVIATURAS.....      | v   |

## CAPITULO

|                                                                                        |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1. RESUMEN.....                                                                        | 1  |
| 2. ABSTRACT.....                                                                       | 2  |
| 3. NTRODUCCIÓN.....                                                                    | 3  |
| 3.1 Sistema Nervioso.....                                                              | 3  |
| 3.2 Cerebelo.....                                                                      | 8  |
| 3.3 Neurotransmisores.....                                                             | 10 |
| 3.4 Sistema Serotoninérgico Cerebral.....                                              | 11 |
| 3.5 Receptores Serotoninérgicos.....                                                   | 18 |
| 3.6 Bomba de sodio y potasio.....                                                      | 21 |
| 3.7 $\text{Na}^+/\text{K}^+$ ATPasa y Sistema Serotoninérgico.....                     | 24 |
| 3.8 Alteraciones de la $\text{Na}^+/\text{K}^+$ ATPasa en Diabetes Mellitus .....      | 25 |
| 4. HIPÓTESIS.....                                                                      | 27 |
| 5. OBJETIVOS .....                                                                     | 27 |
| 5.1 Objetivo general.....                                                              | 27 |
| 5.2 Objetivos específicos.....                                                         | 27 |
| 6. MATERIALES Y MÉTODOS.....                                                           | 28 |
| 6.1 Inducción de Diabetes.....                                                         | 28 |
| 6.2 Preparación de homogeneizado de cerebelo .....                                     | 28 |
| 6.3 Obtención de las fracciones enriquecidas con membranas gliales y/o neuronales..... | 29 |
| 6.4 Determinación de la actividad de la $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasa.....          | 29 |
| 7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....                                                           | 30 |
| 8. RESULTADOS.....                                                                     | 31 |
| 9. DISCUSIÓN.....                                                                      | 43 |
| 10. CONCLUSIÓN.....                                                                    | 46 |
| 11. BIBLIOGRAFÍA.....                                                                  | 47 |

## ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS.

| Figura                                                                                                                                            | Página |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|
| 1. Esquema del cerebro humano.....                                                                                                                | 3      |
| 2. Representación esquemática de una neurona.....                                                                                                 | 4      |
| 3. Representación esquemática del Mecanismo de liberación de un neurotransmisor.....                                                              | 7      |
| 4. Esquema del cerebelo humano.....                                                                                                               | 8      |
| 5. Muestra el esquema de un corte sagital del cerebro de rata que muestra la distribución del sistema serotoninérgico y su innervación.....       | 12     |
| 6. Muestra el Transporte de L-Trp a través de la barrera hematoencefálica.....                                                                    | 13     |
| 7. Mecanismo catalíticos en la síntesis de la serotonina.....                                                                                     | 14     |
| 8. Representación esquemática de la sodio potasio ATPasa.....                                                                                     | 22     |
| 9. Modelo de la bomba de sodio y potasio.....                                                                                                     | 23     |
| 10. Actividad Específica de la bomba de Na <sup>+</sup> y K <sup>+</sup> en homogeneizado de cerebelo de ratas macho adultas.....                 | 31     |
| 11. Actividad Específica de la bomba de Na <sup>+</sup> y K <sup>+</sup> en membranas gliales de cerebelo de ratas macho adultas.....             | 32     |
| 12. Actividad Específica de la bomba de Na <sup>+</sup> y K <sup>+</sup> en fracciones membranales neuronales de cerebelo.....                    | 32     |
| 13. Efecto de la Serotonina sobre la actividad de la bomba de sodio y potasio en homogeneizado de ratas macho adultas controles y diabéticas..... | 33     |
| 14. Estimulación de la Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> ATPasa en homogeneizado de cerebelo de ratas macho Adultas.....                            | 34     |

|     |                                                                                                                                                                             |    |
|-----|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 15. | Efecto de la Serotonina sobre la actividad de la bomba de $\text{Na}^+$ y $\text{K}^+$ -ATPasa en membranas gliales de cerebelo de rata control y diabético.....            | 35 |
| 16. | Estimulación de la $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasa en fracciones membranales gliales de Cerebelo.....                                                                      | 36 |
| 17. | Efecto de la 5-HT sobre la actividad de la $\text{Na}^+/\text{K}^+$ ATPasa en membranas neuronales de cerebelo de rata macho adulta grupo control y diabético.....          | 37 |
| 18. | Efecto del antagonista 5-HT <sub>2</sub> sobre la actividad de la bomba de $\text{Na}^+$ y $\text{K}^+$ en homogenizado de cerebelo de ratas macho adultas.....             | 38 |
| 19. | Porcentaje de Inhibición de la Bomba de $\text{Na}^+$ y $\text{K}^+$ en homogeneizado de cerebelo de ratas macho adultas.....                                               | 39 |
| 20. | Efecto de la Espiperona sobre la actividad de la $\text{Na}^+/\text{K}^+$ ATPasa en membranas gliales de cerebelo de ratas control y diabético.....                         | 40 |
| 21. | Porcentaje de inhibición de la actividad de la $\text{Na}^+/\text{K}^+$ ATPasa con Espiperona en membranas gliales de cerebelo.....                                         | 41 |
| 21. | Efecto del antagonista (Espiperona) sobre la actividad de la $\text{Na}^+/\text{K}^+$ ATPasa en membranas neuronales de cerebelo rata macho adulta control y diabético..... | 42 |

Índice de tablas.

|                                           |    |
|-------------------------------------------|----|
| Tabla I. Receptores serotoninérgicos..... | 20 |
|-------------------------------------------|----|

### **LISTA DE ABREVIATURAS**

|                   |                                              |
|-------------------|----------------------------------------------|
| • $\mu$ l         | microlito                                    |
| • $\mu$ m         | micrómetro                                   |
| • 5-HIAA          | Ácido 5-Hidroxi-indolacético                 |
| • 5-HT            | 5-hidroxitriptamina                          |
| • 5-HTTP          | 5-hidroxitriptófano                          |
| • 5-HTT           | Transportador de serotonina.                 |
| • AADC            | Descarboxilasa de los aminoácidos aromáticos |
| • a.a             | Aminoácidos                                  |
| • aa              | Aminoácidos neutros                          |
| • ADA             | American Diabetes Association                |
| • AMP             | 3', 5' –adenosina monofosfato cíclico        |
| • ATP             | Adenosin trifosfato                          |
| • BHE             | Barrera hematoencefálica                     |
| • DAG             | Diacilglicerol                               |
| • DM              | Diabetes Mellitus                            |
| • dl              | Decilitro.                                   |
| • D.E             | Desviación Estandar                          |
| • DM1             | Diabetes mellitus 1                          |
| • DM2             | Diabetes mellitus 2                          |
| • FL Trp          | Fracción libre del L-Trp                     |
| • g               | Gramos                                       |
| • hr              | Hora                                         |
| • IDM             | Diabetes insulino-dependiente                |
| • NIDM            | Diabetes no insulino-dependiente             |
| • IP <sub>3</sub> | Inositol 1,4,5 trifosfato                    |
| • K <sup>+</sup>  | Potasio                                      |
| • KCl             | Cloruro de potasio                           |

|             |                                   |
|-------------|-----------------------------------|
| • KDa       | Kilodaltones                      |
| • $K_m$     | Constante de Michaelis            |
| • L-Trp     | L-Triptófano                      |
| • M         | Molar                             |
| • MAO       | Monoaminoxidasa                   |
| • mg        | Miligramos                        |
| • $Mg^{++}$ | Magnesio                          |
| • $MgCl_2$  | Cloruro de magnesio               |
| • ml        | Mililitros                        |
| • mm        | Milímetros                        |
| • mM        | Milimolar                         |
| • $Na^+$    | Sodio                             |
| • NaCl      | Cloruro de sodio                  |
| • NE        | Norepinefrina.                    |
| • °C        | Grados centígrados                |
| • OMS       | Organización Mundial de la Salud  |
| • pH        | Potencial hidrógeno               |
| • $P_i$     | Fosfato inorgánico                |
| • $PIP_2$   | Fosfatidil inositol-4,5-difosfato |
| • rpm       | Revoluciones por minuto           |
| • SERT      | Transportadores de serotonina.    |
| • SNC       | Sistema Nervioso Central          |
| • SNP       | Sistema Nervioso Periférico       |
| • STZ       | Estreptozotocina.                 |





## 1. RESUMEN

La  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasa es una enzima que actúa como un transportador de iones en la membrana plasmática de todas las células de los mamíferos manteniendo una homeostasis iónica. La diabetes mellitus es un desorden metabólico caracterizado por un aumento en la concentración de glucosa en torrente sanguíneo (hiperglicemia) y presenta complicaciones microvasculares en varios órganos y tejidos a largo plazo, una de ellas la neuropatía diabética que se caracteriza por cambios neuroanatómicos y disminución en la velocidad de transmisión, estas alteraciones se han asociado con disminución de la actividad de la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasa a nivel periférico en animales diabéticos. Por otro lado, en estudios de nuestro laboratorio se ha observado activación de la bomba de sodio y potasio por la serotonina (5-HT), así como el fenómeno agonismo inverso en la interacción entre la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasa con antagonistas serotoninérgicos. No es claro si a nivel central existe disminución de la actividad de la enzima y si esta se modifica por la serotonina. Por lo que en el presente trabajo se estudio el efecto de la diabetes mellitus tipo 1 (DM1) sobre la actividad de la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasa en homogeneizados, fracciones membranales gliales y/o neuronales de cerebelo de ratas macho adultas. La DM1 fue inducida en ratas mediante la administración de estreptozotocina. Los resultados muestran disminución en la actividad de la enzima en todas las preparaciones estudiadas. Por otra parte la 5-HT incrementó la actividad de la bomba sodio y potasio y se observó el efecto de agonismo inverso por la espiperona (antagonista de 5-HT). Estos resultados sugieren que a nivel central se reduce la actividad de la bomba de sodio y potasio y la serotonina no revierte el efecto de la DM1 sobre la actividad de la enzima.

PALABRAS CLAVE:  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasa, diabetes mellitus, serotonina, espiperona, agonismo inverso.

## 2. ABSTRACT

The  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase is an enzyme that acts as a transport of ions into the cell membrane of all cells of mammals maintaining ionic homeostasis. Diabetes mellitus is a metabolic disorder characterized by an increase in the concentration of glucose in the bloodstream (hyperglycemia) and presents microvascular complications in various organs and tissues in the long-term, diabetic neuropathy is characterized by changes in neuroanatomy and a decrease in nerve conduction velocity, these alterations are associated with a reduction of the activity of the  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase at peripheral level in diabetic animals. On the other hand, studies in our laboratory has been observed activation of the sodium and potassium pump by serotonin (5-HT) and also an inverse agonism phenomena has been seen in the interaction between the  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase with serotonergic antagonists. It is not clear whether at the central level if there is a decreased in the activity of the enzyme and if 5-HT also activate the enzyme activity. Therefore the objective of the present work was to study the effect of diabetes mellitus type 1 (DM1) on the activity of the  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase in homogenized, in membranal glial and / or neural fractions of cerebellum of adult male rats. DM1 was induced in rats by administration of streptozotocin. The results show a reduction of the enzyme activity in the DM1 experimental group in all preparations assayed. Moreover, the 5-HT increased the activity of sodium and potassium pump in the DM1 group and the spiperone had effect of agonist inverse on the enzyme activity. These results suggest that at the central level is reduced activity of the pump sodium and potassium and serotonin not reversed the effect of the DM1 on the enzyme activity.

Keyword:  $\text{Na}^+ / \text{K}^+$ -ATPase, diabetes mellitus, serotonin, spiperone, inverse agonism.

### 3. INTRODUCCIÓN

#### 3.1 SISTEMA NERVIOSO.

El sistema nervioso es el conjunto de elementos que están relacionados con la recepción de estímulos, la transmisión de impulsos nerviosos y/o la activación de los mecanismos de los músculos. Desde un punto de vista estructural o anatómico, las dos primeras divisiones del sistema nervioso son el sistema nervioso central (SNC) y el sistema nervioso periférico (SNP). El sistema nervioso central consta de encéfalo y médula espinal y es ahí donde se integra y relaciona la información sensitiva aferente, se generan los pensamientos, emociones, se forma y almacena la memoria (figura 1). El sistema nervioso periférico formado por nervios y neuronas que residen o extienden fuera del sistema nervioso central hacia los miembros y órganos. El SNP está compuesto por el sistema nervioso somático y el sistema nervioso autónomo o vegetativo. El sistema nervioso somático consiste en fibras nerviosas que envían información al SNC. El sistema nervioso autónomo controla el músculo liso de las vísceras y glándulas y se divide en sistema nervioso simpático y sistema nervioso parasimpático.

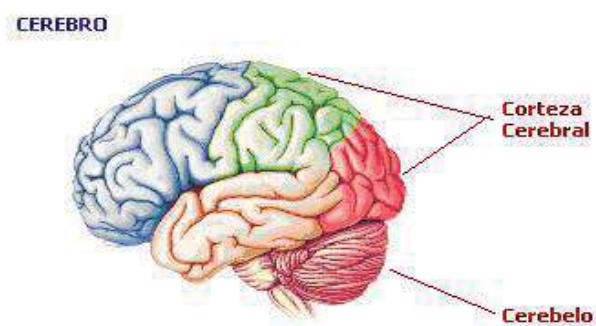


Fig. 1 Esquema del cerebro humano. (NEUROCIENCE EXPLORING THE BRAIN)

El sistema nervioso esta constituido principalmente por dos tipos celulares, las neuronas y las células gliales.

La neurona es una célula nerviosa excitable y especializada en la recepción de estímulos y en la conducción del impulso nervioso. El impulso nervioso, en las neuronas de un organismo vivo, viaja desde las dendritas, donde se recibe el estímulo, hacia la terminal presináptica.

La neurona esta formada por un cuerpo celular y diferentes prolongaciones denominadas dendritas y axones. El tamaño del cuerpo celular puede ser desde 5 hasta 135  $\mu\text{m}$ , las prolongaciones y dendritas pueden extenderse a una distancia de más de un metro (Fig.2).

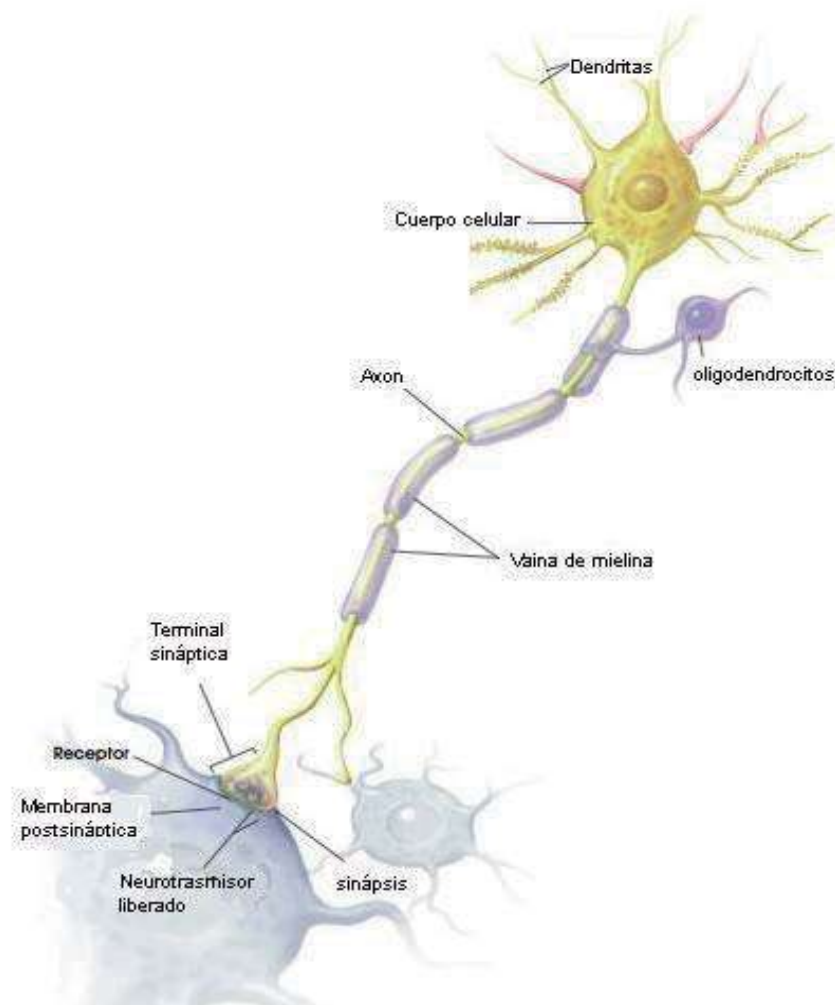


Fig.2 Representación esquemática de una neurona. ([www.stemcells.nih.gov/.../images/figure81.jpg](http://www.stemcells.nih.gov/.../images/figure81.jpg)).

El axón es la unidad principal conductora en la neurona, las señales eléctricas propagadas a lo largo del axón constituyen el potencial de acción; la porción terminal del axón se divide en finas ramas que tienen contacto con otras neuronas, el punto de contacto se denomina sinapsis (Kandel *et al.*, 1997<sup>a</sup>). La dendrita constituye la parte de la neurona que recibe los estímulos y el axón es la parte especializada en distribuir estos estímulos desde la zona dendrítica (Villie, 1997). Las prolongaciones neuronales que se encargan de conducir las señales están recubiertas por mielina. La mielina actúa como aislante electroquímico, permitiendo el transporte saltatorio del impulso nervioso. Las zonas no mielinizadas de la neurona, reciben el nombre de Nodos de Ranvier y es a través de ellos que el potencial de acción se desplaza en forma saltatoria. En el sistema nervioso periférico la mielina es producida por las células de Schwan, mientras que los oligodendrocitos la producen en el sistema nervioso central (Kandel *et al.*, 1997<sup>b</sup>).

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

- Dan soporte, estructura y consistencia al cerebro, además, aíslan ciertos grupos neuronales y recolectan los restos celulares originados por la lesión o muerte de una neurona.
- Durante el desarrollo cerebral algunos tipos de células gliales guían la migración de neuronas y dirigen el crecimiento de los axones.

- Mantienen la concentración de iones  $K^+$  del líquido extracelular; algunas células gliales captan y retiran los neurotransmisores liberados en la sinápsis, durante la transmisión del impulso nervioso.
- Algunas células gliales ayudan a formar un revestimiento impermeable en los capilares y venulas del encéfalo generando la barrera hematoencefálica evitando así que penetren ciertas sustancias tóxicas al cerebro.

La neurotransmisión química en la sinápsis presenta cuatro etapas 1) síntesis de sustancias transmisoras, 2) almacenamiento y liberación del transmisor, 3) interacción del transmisor con el receptor en la membrana postsináptica, 4) eliminación del transmisor de la hendidura sináptica. Existen dos tipos de sinápsis, eléctricas y químicas.

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

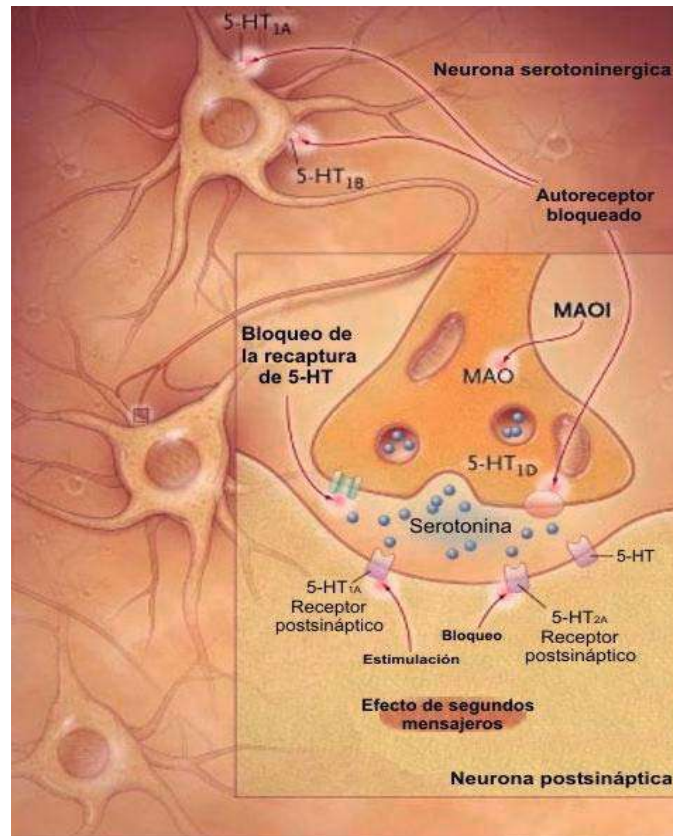


Fig.3 Mecanismo de liberación de un neurotransmisor (pepyc.com/img/lectura3/11f1.jp)

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



### 3.2 EL CEREBELO

El cerebelo forma parte de la masa encefálica; el cual está alojado en la cavidad craneana y se sitúa por la parte posterior del cerebro y detrás del tronco cerebral, en la fosa craneana posterior. El cerebelo presenta una estructura central llamada vermis flaqueada por regiones laterales conocidos como hemisferios, presentan surcos en su superficie que dividen a la corteza en regiones o lóbulos. Al igual que el cerebro presenta una corteza cerebelosa de sustancia gris, que envuelve una compleja organización de sustancia blanca.

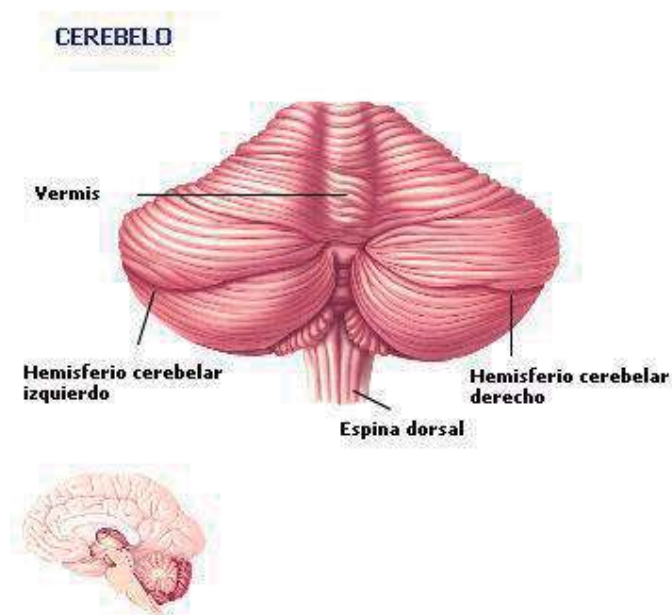


Fig. 4 Esquema del cerebelo Humano (NEUROSCIENCE EXPLORING THE BRAIN.)

Los dos mayores compartimentos anatómicos en los que puede dividirse el cerebelo son la corteza y el núcleo. La corteza cerebelar tiene dos aferentes excitadoras, las fibras trepadoras (CF) y las fibras musgosas, en cuanto a las células de purkinje son la única vía de salida de información de la corteza cerebelar. El núcleo cerebelar es el principal blanco de los axones de las células de purkinje y recibe colaterales de las fibras trepadoras y musgosas (Raymond *et al.*, 1996; Voog and Glickstein, 1995).

La corteza cerebelar presenta tres capas, la Molecular (ML) la de Neuronas de Purkinje (NP) y la de Neurona de la Granulosa (NG). La capa molecular tiene dos tipos de neuronas, las células estrelladas que son más externas y las células en canasto ubicadas más internamente, la capa de las células de Purkinje la forma un sólo estrato de neuronas y las dendritas de estas neuronas se expanden como en abanico en la capa molecular. En la capa granular se encuentran células neuronales pequeñas y empaquetadas y algunas neuronas tipo golgi que arborizan sus dendritas en la capa molecular y cuyos axones terminan formando sinápsis con las dendritas de las células granulares (Kandel, 1991) Los axones de las células de Purkinje se proyectan hacia la sustancia blanca para hacer sinapsis con los núcleos intracerebelosos.

El cerebelo recibe información procedente de piel, articulaciones, músculos, aparato vestibular y ojos en relación con el movimiento realizado, así como de la corteza cerebral motora en relación con los planes motores. El cerebelo esta interconectado con áreas corticales relacionadas con funciones perceptivas, emotivas y cognitivas frecuentemente referidos a funciones ejecutivas, así mismo esta relacionado con funciones vegetativas (circulación sanguínea y respiración), (Ghez and Thach, 2000; Llianás and Walton, 1990).

Desde el punto de vista funcional el cerebelo es la estructura nerviosa encargada de la coordinación y ordenación de los actos motores (motricidad gruesa) como caminar, correr, y otros más específicos (motricidad fina) como enhebrar una aguja. Se ha propuesto que el cerebelo participa de modo directo y activo en los procesos de aprendizaje de tareas motoras y quizá también donde dicha información queda almacenada en forma de memoria.; esta participación se añadiría de alguna manera a su papel regulador y coordinador de la reacción de actos motores concretos (Kim and Thompson, 1997; Krupa *et al.*, 1993)

### 3.3 NEUROTRANSMISORES.

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

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

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

Existen criterios para considerar a un compuesto como neurotransmisor:

- La maquinaria biosintética de neurotransmisor debe estar presente en la célula presináptica.
- Deben de existir mecanismos de transporte hacia la terminal presináptica y mecanismos específicos de su liberación al espacio sináptico.
- En las neuronas blanco deberán estar presentes los receptores membranales que reconozcan al neurotransmisor.

- Este compuesto administrado exógenamente (agonista), será capaz de reproducir el efecto *in vitro* y la acción del neurotransmisor debe ser bloqueada por antagonistas.
- Debe estar presente un sistema enzimático que lo catabolice.

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

### 3.4 SISTEMA SEROTONINÉRGICO CEREBRAL

La serotonina es un neurotransmisor de gran importancia para el desarrollo del sistema nervioso y su función (Boullosa *et al.*, 1993; Kaumann *et al.*, 1994). La indolalquilamina 5-hidroxitriptamina (5-HT; serotonina) inicialmente identificada por el interés de sus efectos cardiovasculares y respiratorios así como su implicación en el aumento de la presión sanguínea (vasoconstrictora) y en la peristalsis del intestino delgado y fue llamada serotonina por encontrarse en el suero, y enteramina la del intestino (Rapport *et al.*, 1948).

Twarog y col. (1953) observaron que la 5-HT es sintetizada en el cerebro y Amin y col (1954) encontraron concentraciones importantes en el hipotálamo. Existe serotonina en todo el cuerpo pero esta no atraviesa la BHE por lo cual el cerebro sintetiza su propia 5-HT. En el SNC la serotonina es sintetizada exclusivamente por neuronas especializadas llamadas neuronas serotoninérgicas, lo cual ha sido demostrado por métodos de inmunohistoquímica de fluorescencia. Las células serotoninérgicas se concentran en la parte media del tallo cerebral, agrupándose en nueve núcleos que han sido clasificados de acuerdo a su origen embrionario, conocidos como complejo nuclear del Rafé (Steinbush *et al.*, 1978), en la fig 5 Dahlstrom y Fluxe (1964) describieron nueve grupos de cuerpos celulares que contienen serotonina, a los que ellos designaron desde B1 hasta B9.

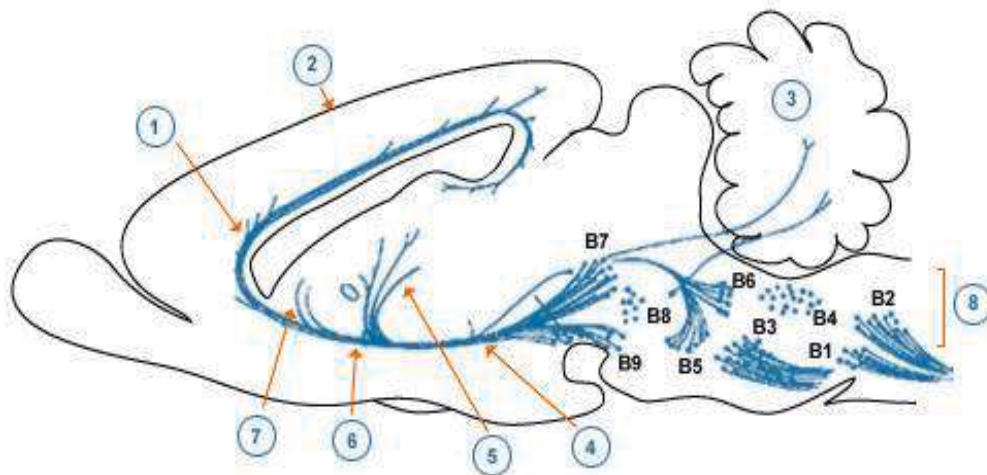


Fig. 5 Esquema de un corte sagital del cerebro de rata que muestra la distribución del sistema serotoninérgico y su innervación.

El grupo más grande de células serotoninérgicas es el grupo B7 contiguo a un grupo más pequeño de células serotoninérgicas, B6. Los grupos B6 y B7 son a menudo considerados conjuntamente como el núcleo dorsal del Rafe. Otro cuerpo de celulares serotoninérgicos prominente, es el B8 que corresponde al núcleo medio de Rafe, llamado también el núcleo central superior. El grupo B9, parte del tegmento ventrolateral del puente y del cerebro medio. Las proyecciones serotoninérgicas ascendentes, que inervan la corteza cerebral y otras regiones del cerebro anterior, provienen del Rafe dorsal, el Rafe medio y el grupo celular B9. El otro núcleo del Rafe, B1 a B5 está situado más caudalmente y contiene un número menor de células serotoninérgicas (Molliver, 1987; Tork, 1990).

El triptófano (L-Trp) es el aminoácido esencial precursor de la síntesis de 5-HT. El triptófano una vez absorbido del tracto gastrointestinal se distribuye a los tejidos de todo el organismo. El L-triptófano que proviene de la dieta (Zeisel *et al.*, 1981) al entrar al torrente sanguíneo se encuentra en dos fracciones una la que se encuentra unida a la albúmina en un 80-90% y otra fracción que circula en forma libre (FL) (Taglimonte *et al.*, 1973) la cual compite con otros aminoácidos neutros (tirosina, fenilalanina, leucina, isoleucina y valina) para atravesar la

barrera hematoencefálica. El ingreso del L-Trp al SNC depende de un mecanismo de transporte saturable localizado en la BHE (Taglimonte *et al.*, 1973; De Boer *et al.*, 2003) como se muestra en la Fig. 6.

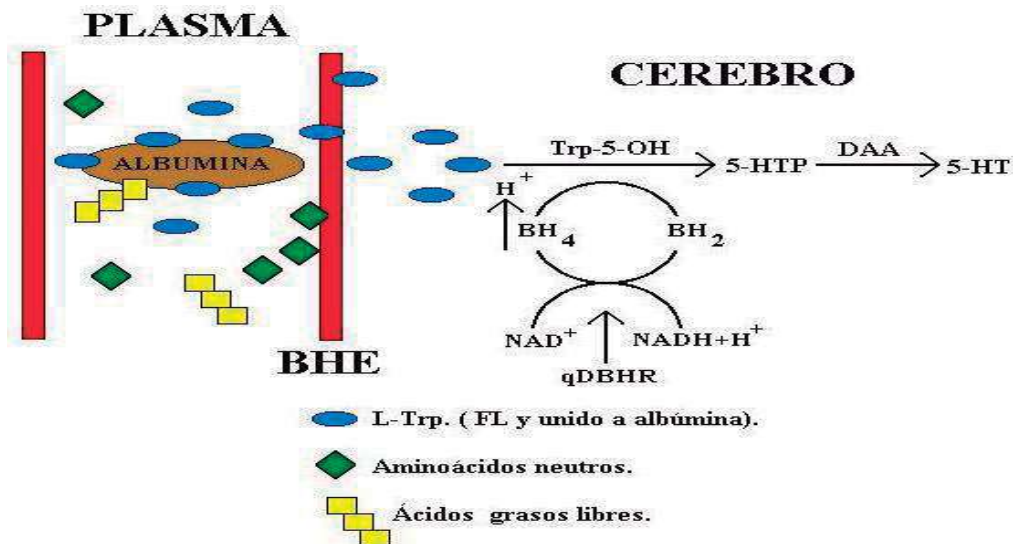


Fig. 6 Transporte de L-Trp a través de la barrera hematoencefálica

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

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

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

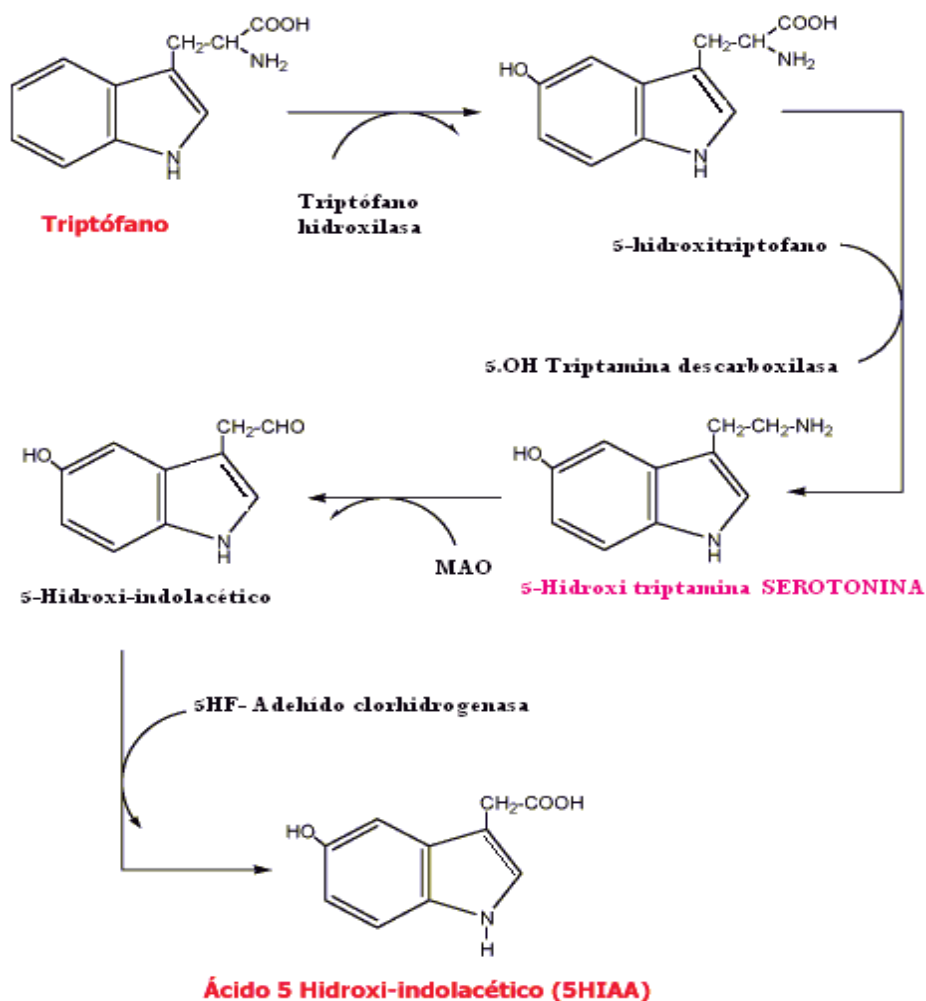


Fig. 7 Mecanismo catalítico en la síntesis y catabolismo de la serotonina. ([www.biopsicologia.net/fichas/fig-01-0010.gif](http://www.biopsicologia.net/fichas/fig-01-0010.gif))

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

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



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

- a) Tubo digestivo: se encuentran en las células enterocromáfines que a partir del L-Trp sintetizan, almacenan, y liberan 5-HT que tiene la función de regular la motilidad intestinal por medio de la red mientérica de neuronas entre las capas del músculo liso ( Gershon, 1991)
- b) Las plaquetas: estas expresan mecanismos para la captación, almacenamiento y la descarga endocítica de 5-HT. La función principal de las plaquetas es obturar orificios en los endotelios lesionados, cuando las plaquetas establecen contacto con el endotelio lesionado, liberando sustancias que promueven la adherencia plaquetaria y la liberación de 5-HT con inclusión de ADP, trombina y tromboxano A<sub>2</sub>. la 5-HT se une a los receptores 5-HT<sub>2A</sub> y desencadena la agregación. La descarga del factor de relajación derivado del endotelio (óxido nítrico y quizá otros componentes) antagoniza la acción vasoconstrictora del tromboxano y de la 5-HT (Furchgott and Vanhoutte, 1989).
- c) Aparato cardiovascular: la serotonina induce varias funciones del corazón que resultan de la activación de subtipos de receptores 5-HT, estimulación y/o inhibición de la actividad autónoma o predominio de las reacciones reflejas de la 5-HT (Sexena and Villalón 1990).

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

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

- Timia:

El papel de la 5-HT en la regulación de la timia ha sido desarrollado a partir de las hipótesis de Van Praag (Van Praag, 1981; Van Praag *et al.*, 1986; Van Praag *et al.*, 1987). Avala esta teoría el hecho de que una dieta libre de triptófano a las cinco horas de la ingesta y coincidiendo con el pico plasmático mas bajo de este aminoácido, produce un estado depresivo moderado en voluntarios sanos.

- Sueño:

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

- Conducta Sexual.

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

- Regulación termonociceptiva

La 5-HT produce un efecto dual sobre la termia según el receptor estimulado, por ejemplo si se estimula el 5-HT<sub>1</sub> se produce hipotermia y si es el 5-HT<sub>2</sub> hipertermia (Clinke and Digovic, 1992).

- Conducta alimentaria

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

- Factor Trófico:

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

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

### 3.5 RECEPTORES SEROTONINÉRGICOS.

Para ejercer su efecto los neurotransmisores al igual que las hormonas deben actuar en el tejido blanco, en estructuras específicas denominadas receptores, término introducido por Ehrlich y Langley (1978).

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

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

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

La tabla I muestra los tipos y subtipos de receptores serotoninérgicos descritos a la fecha.

Los subtipos de receptores de la 5-HT se expresan en patrones distintos, pero a menudo superpuestos y se encuentran acoplados a diferentes mecanismos transmembrana de señalización. En la actualidad se reconocen cuatro familias de receptores de 5-HT con funciones conocidas que son 5-HT<sub>1</sub> al 5-HT<sub>4</sub>. Las familias de receptores 5-HT<sub>1</sub>, 5-HT<sub>2</sub> y 5-HT<sub>4-7</sub> son miembros de la superfamilia de receptores acoplados a proteínas G, el receptor 5-HT<sub>3</sub>, por otra parte, es un canal de iones de compuerta de ligando que da paso a Na<sup>+</sup> y K<sup>+</sup> y tiene una topología esperada de membrana compatible con la del receptor colinérgico nicotínico (Hoyer *et al.*, 1994). Además, estos receptores difieren por su localización en el SNC (Bockaert *et al.*, 1994).

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

Esta vía puede producir la estimulación del sistema de la adenilato ciclasa responsable de la formación del AMPc, la inhibición o la estimulación de la fosfolipasa C responsable de la conversión del Fosfatidil inositol-4,5-difosfato (PIP<sub>2</sub>) en inositol 1,4,5 trifosfato (IP<sub>3</sub>) y diacilglicerol (DAG) (Bockaert *et al.*, 1994; Boullosa *et al.*, 1993; Kaumann *et al.*, 1994).

## Los receptores 5-HT2.

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

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

**TABLA I. RECEPTORES SEROTONINÉRGICOS.**

| Tipo o subtipo de receptor | Distribución                                      | Mecanismo postreceptor                                            |
|----------------------------|---------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------|
| 5-HT <sub>1A</sub>         | Núcleos de Rafé<br>Hipocampo                      | ↓AMPc, canales de K <sup>+</sup>                                  |
| 5-HT <sub>1B</sub>         | Sustancia Nigra, Globo pálido y Ganglios basales. | ↓AMPc                                                             |
| 5-HT <sub>1Da,b</sub>      | Cerebro                                           | ↓AMPc                                                             |
| 5-HT <sub>1E</sub>         | Corteza Cerebral, Putamen                         | ↓AMPc                                                             |
| 5-HT <sub>1F</sub>         | Corteza Cerebral, Hipocampo                       | ↓AMPc                                                             |
| 5-HT <sub>2A</sub>         | Plaquetas, Músculo Liso y Corteza Cerebral        | ↑IP3                                                              |
| 5-HT <sub>2B</sub>         | Estómago (fondo)                                  | ↑IP3                                                              |
| 5-HT <sub>2C</sub>         | Coroides, Hipocampo y Sustancia Negra             | ↑IP3                                                              |
| 5-HT <sub>3</sub>          | Area Postrema, Nervios sensitivos y entéricos.    | El receptor es un canal iónica de Na <sup>+</sup> -K <sup>+</sup> |
| 5-HT <sub>4</sub>          | SNC, Neuronas mientéricas y músculo liso          | ↑AMPc                                                             |
| 5-HT <sub>5A,B</sub>       | Cerebro                                           | Desconocido                                                       |
| 5-HT <sub>6,7</sub>        | Cerebro                                           | ↑AMPc                                                             |

### 3.6 BOMBA DE SODIO Y POTASIO

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

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

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

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

Uno de los sistemas enzimáticos presentes en la membrana plasmática es la bomba de  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  (adenosin trifosfohidrolasa estimulada por  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  dependiente de Mg, E.C.3.6.1.3), es una enzima plasmática ubicua siendo esta la responsable del establecimiento del gradiente electroquímico de los iones  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  (Feraille and Doucet, 2001) (Fig.8).

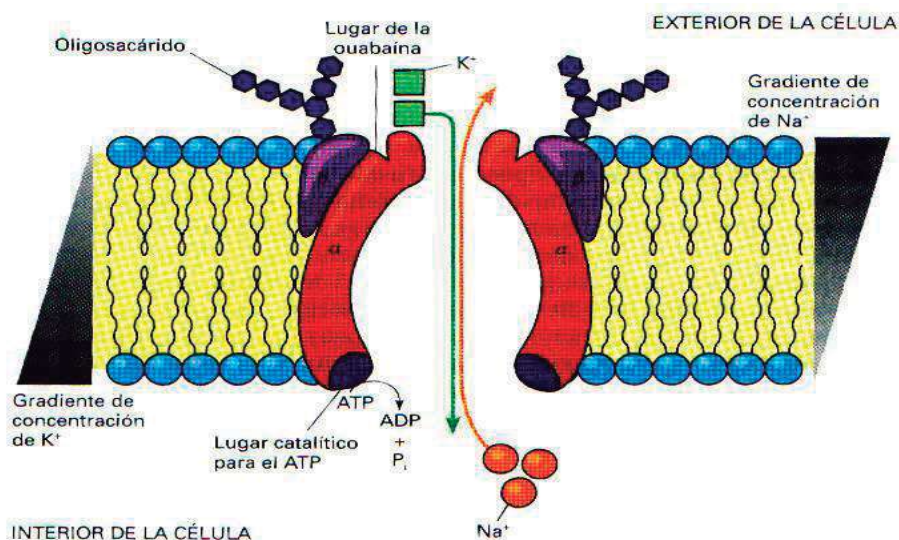


Fig.8 Representación de la sodio potasio ATPasa.  
(<http://www.egbeck.de/skripten/bilder/nkpu1.jpg>)

La Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPasa esta formada por dos subunidades  $\alpha$  con un peso molecular de 110kDa y dos subunidades  $\beta$  de 55kDa cada una. El complejo atraviesa la membrana plasmática con segmentos hidrofílicos que se extienden hacia el espacio extracelular y hacia el citoplasma. La subunidad  $\alpha$  es la porción de la enzima que se fosforila mientras que el ATP es hidrolizado. Es la subunidad  $\alpha$  la que tiene los centros de unión para el Na<sup>+</sup> y el ATP en la superficie intracelular. Del lado exterior están las uniones para esteroides cardiotónicos, entre ellos la ouabaina y la digitoxina y el potasio. La Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPasa con mayor afinidad para la ouabaina contiene la subunidad  $\alpha_3$ , la de afinidad intermedia contiene la subunidad  $\alpha_2$  y la de muy baja afinidad, es la que contiene la subunidad  $\alpha_1$ . En la actualidad se considera que las neuronas expresan las tres isoformas en varias combinaciones y que la glía expresa principalmente las isoformas  $\alpha_1$  y  $\alpha_2$ .

La subunidad  $\beta$  es una glucoproteína y su función es el reparto y una inserción apropiada de la subunidad  $\alpha$  en la membrana (McDonough *et al.*, 1990), y puede ser una subunidad regulatoria (Geering, 2001).

El peso molecular de la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPasa solubilizada es de 380 kDa, la proporción de las subunidades alfa/beta es 1:1 y constituyen un tetrámero  $\alpha_2/\beta_2$  con los lípidos y carbohidratos de la membrana celular unidos a la enzima, el peso molecular de la haloenzima es aproximadamente de 440kDa.

El mecanismo empleado por el sistema enzimático de la bomba de sodio y potasio se muestra en la figura 9: comienza con la unión de 3 iones de  $\text{Na}^+$  a la subunidad  $\alpha$  (1), seguida por la fosforilación de la subunidad  $\alpha$  por el ATP (2) induciendo un cambio conformacional quedando el  $\text{Na}^+$  expuesto hacia el espacio extracelular (3). En esta conformación el  $\text{K}^+$  se une al sitio extracelular de la enzima (4), por desfosforilación se recupera la conformación original (5), estado en el cual el  $\text{K}^+$  queda expuesto hacia el citoplasma y disminuyendo su afinidad por la bomba de sodio y potasio, lo cual provoca su liberación hacia el interior de la célula (6) reiniciado nuevamente el ciclo.

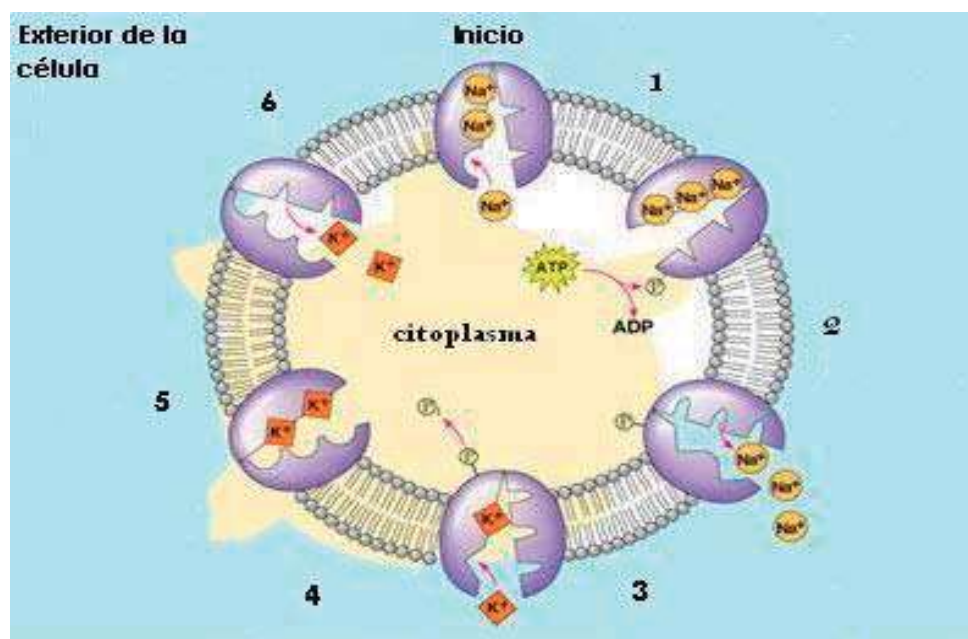


Fig. 9. Modelo de la bomba de sodio y potasio  
([http://fajerpc.magnet.fsu.edu/Education/2010/Lectures/12\\_Membrane\\_Transport.htm](http://fajerpc.magnet.fsu.edu/Education/2010/Lectures/12_Membrane_Transport.htm))



La transición al estado abierto al exterior, que permite la liberación de  $\text{Na}^+$  y la captura de  $\text{K}^+$ , se produce tras la fosforilación de la subunidad  $\alpha$  y la liberación del ADP.

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

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

### 3.7 $\text{Na}^+/\text{K}^+$ ATPasa y SISTEMA SEROTONINÉRGICO

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

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

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

Por otro lado los resultados de Chávez (2003) confirman la participación del receptor 5-HT<sub>2</sub> en la estimulación de la Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPasa con  $\alpha$ -metil (agonista específico para el receptor 5-HT<sub>2</sub>) y al utilizar antagonistas del receptor 5-HT<sub>2</sub> observó en forma preliminar un efecto inhibitorio sobre la actividad de la enzima.

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

- Interacción del neurotransmisor con receptores serotoninérgicos específicos de la membrana de la célula blanco (Castelluci *et al.*, 1982), cambiando la permeabilidad al sodio y al potasio, o bien alterando la conformación de la enzima. (Powis *et al* 1981).
- Por interacción directa del neurotransmisor con un sitio específico de la molécula de la Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPasa.
- Por aumentar el número de moléculas de ATPasa disponibles, en experimentos crónicos.

### 3.8 ALTERACIÓN EN LA Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup> ATPasa EN DIABETES MELLITUS

La diabetes mellitus (DM) es una enfermedad de disfunción metabólica que se caracteriza por un aumento de glucosa en sangre (hiperglicemia), por un déficit absoluto o relativo de la insulina, y por alteraciones en el metabolismo de carbohidratos, proteínas y grasas (ADA, 2007). La American Diabetes Association (ADA) con la Organización Mundial de la Salud (OMS) clasificaron la diabetes en:

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

La diabetes mellitus está asociada a complicaciones que llegan a ser un problema de salud pública. La patofisiología de la diabetes mellitus es multifactorial, se ha observado tanto alteraciones en la estructura, organización y funciones proteicas en membranas de células y tejidos (ej. Retina, glomérulo, eritrocitos, nervios) culminando en complicaciones diabéticas como es retinopatía, nefropatía y neuropatía periférica (Carneiro, 2004; Naka *et al.*, 1995).

La neuropatía ha sido caracterizada en ratas diabéticas inducidas con estreptozotocina (STZ), (DM1). Este modelo experimental de DM1 presenta en general la misma patología, alteraciones funcionales y bioquímicas presentes en humanos diabéticos (Dyck *et al.* 1988; Biessels *et al.*, 1999). Con relación a la actividad de la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasa se ha reportado disminución gradual en la actividad de la enzima, una reducción en la velocidad de conducción de los nervios periféricos debidos a degeneración axonal y a la desmielinización paranodal (Sugimoto *et al.*, 2000). Recientes estudios sugieren que la depresión de la actividad de la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPasa, en la membrana plasmática es un sello distintivo de la neuropatía diabética (Loenillem *et al.*, 2007).

Das *et al* (1976) describieron por primera vez una disminución de esta actividad enzimática en el nervio ciático de ratas diabéticas. Existen diversos mecanismos que se han propuesto para explicar la disminución en la actividad de la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  -ATPasa: un agotamiento de la concentración del mio-inositol intracelular, un aumento del flujo a través de la vía aldosa reductasa, y una alteración en la actividad de la proteína quinasa C (PKC) (Greene *et al.*, 1987). Otros cambios metabólicos pueden también disminuir la actividad enzimática, un aumento en el proceso de glicosilación no enzimático, un incremento en el estrés oxidativo. Así mismo, la disminución de la actividad de la bomba de sodio y potasio se asocia con un incremento de la inactivación de los canales de sodio y una acumulación de sodio intra-axonal en el nodo, lo que resulta en una inflamación paranodal (Sima and Sigimoto, 1999).

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

#### **4. HIPÓTESIS**

La serotonina estimula la actividad de la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasa cerebelar en ratas con DM1.

#### **5. OBJETIVOS**

##### **5.1 OBJETIVO GENERAL**

Determinar el efecto de la serotonina sobre la actividad de la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasa en el cerebelo de ratas con DM1.

##### **5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Inducir DM1 experimentalmente en ratas.
2. Estandarizar la técnica para determinar la actividad de la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasa
3. Aislar fracciones membranales gliales y/o neuronales a partir de cerebelo de ratas macho adultas.
4. Determinar el efecto de la 5-HT sobre la actividad de la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasa en el cerebelo de ratas con DM1.
5. Determinar el efecto de antagonistas del receptor  $5\text{-HT}_{1A}$  y  $5\text{-HT}_{2B}$  sobre la actividad de la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasa.

## 6. MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizaron ratas macho adultas de la cepa Wistar de  $280 \pm 20$ g de peso corporal las cuales se mantuvieron bajo condiciones ambientales controladas de ciclos de luz-oscuridad de 12 hrs. cada uno, humedad relativa de 80% y temperatura de 20-24° C. Se sometieron a un régimen nutricional *ad libitum* tanto de agua como de alimento purina Chow.

### 6.1 INDUCCIÓN DE DIABETES MELLITUS

A un grupo de ratas se les administró 55 mg/kg de estreptozotocina (STZ) disuelta en solución buffer de citratos, a otro grupo de ratas se les administró solución buffer de citratos. A los dos días después de la administración de STZ se les determinó la concentración de glucosa mediante toma de muestra de la vena caudal y con el sistema de automedición de glucosa en sangre ONETOUCH Ultra. Las ratas con concentración mayor a 200 mg/dl se tomaron como ratas con DM1, la determinación de glucosa en sangre se realizó cada semana, a las tres semanas las ratas se sacrificaron y se obtuvieron los tejidos, (Juárez, 2008)

### 6.2 PREPARACIÓN DE HOMOGENEIZADO DE CEREBELO

Los animales se sacrificaron entre las 9:00 y las 10:00 a.m. por desnucación cervical e inmediatamente se perfundieron con 20 ml de solución salina isotónica fría al 0.9% que se inyectó en el ventrículo izquierdo del corazón. Se extrajo el encéfalo y sobre una superficie fría se hizo la disección del cerebelo, el cual se homogeneizó en 10 volúmenes de una solución amortiguadora Tris-HCl 50mM a pH 7.4 con 10 pasos a 700rpm a 4°C en un homogeneizador Thomas de vidrio con un vástago de teflón de 0.25 mm de tolerancia de diámetro. Posteriormente se realizó la determinación de proteína por el método de Lowry *et al.*, (1951).

### **6.3 OBTENCIÓN DE LAS FRACCIONES ENRIQUECIDAS CON MEMBRANAS GLIALES Y/O NEURONALES.**

Se utilizó el método descrito por Rose (Rose, 1967). Se disectó la corteza cerebral y el cerebelo de 6 ratas macho adultas, las cuales al ser finamente cortadas fueron recibidas en una solución que contenía Ficoll al 10% en una solución amortiguadora de fosfatos a pH 7.4, y se hicieron pasar a través de una malla de nylon de 110  $\mu\text{m}$  de poro mediante presión mecánica y después en una de 48  $\mu\text{m}$ .

El filtrado se homogeneizó manualmente tres veces, la suspensión resultante se colocó en un gradiente de sacarosa 1.45 M y Ficoll al 30%. Se centrifugó a 39000 rpm por 45 minutos a 4°C. Se obtuvieron cuatro fracciones de las cuales la interfase de Ficoll 10-30% correspondió a la fracción glial y la interfase Ficoll 30% - sacarosa a la fracción neuronal. Se colectaron las bandas y se diluyeron en Tris-HCl 50 mM pH 7.4, se centrifugaron a 9000 rpm 10 minutos y finalmente se resuspendió cada fracción en 1mL de Tris-HCl 50 mM pH 7.4 y se guardaron en congelación.

### **6.4 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LA $\text{Na}^+/\text{K}^+$ ATPasa.**

La actividad de la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPasa se midió con el método utilizado por Mercado y Hernández (1992) por triplicado en alícuotas de 25  $\mu\text{l}$  equivalente a 50  $\mu\text{g}$  de proteína del homogeneizado o de las fracciones enriquecidas con membranas gliales y neuronales: se incubó el tejido durante 5 minutos a 37°C en agitación constante en un incubador metabólico con el amortiguador Tris-HCl 50mM pH 7.4 con  $\text{MgCl}_2$  6mM, KCl 20mM, NaCl 120mM sin ouabaina para medir la actividad total y con ouabaina 0.6 mM para medir la actividad específica de la bomba de sodio y potasio. Se incubó durante 20 minutos a 37°C en presencia de serotonina y diferentes antagonistas: ritanserina, espiperona y ciproheptadina. Se adicionó ATP 3mM durante 10 minutos en agitación constante. La reacción se detuvo adicionando 20  $\mu\text{l}$  de ácido tricloroacético frío al 50% colocando las muestras en una placa de hielo para después ser

centrifugadas a 3000 rpm durante 10 minutos. Se tomaron 100  $\mu$ l del sobrenadante para determinar el Pi liberado.

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

La actividad específica de la enzima se obtuvo a partir de la diferencia entre la actividad total y la actividad medida en presencia de ouabaina.

## 7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

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

## 8. RESULTADOS

Con respecto a la concentración de glucosa en la sangre, las ratas del grupo control presentaron  $100 \pm 10$  mg/dl mientras que las ratas que recibieron STZ presentaron  $500 \pm 50$  mg/dl lo que indicó la presencia de hiperglicemia, presentaron polifagia (aumento de la ingesta de comida), polidipsia (aumento en la ingesta de líquidos), poliuria (volumen urinario excesivo) y pérdida de peso.

La fig.10 muestra la actividad específica de la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPasa en preparaciones de homogeneizado de cerebelo en el grupo de ratas control y diabético. Se observa una disminución estadísticamente significativa ( $p < 0.0001$ ) en el grupo de ratas diabéticas comparadas con el grupo control, esta disminución corresponde al 25% en la actividad de la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPasa del grupo control.

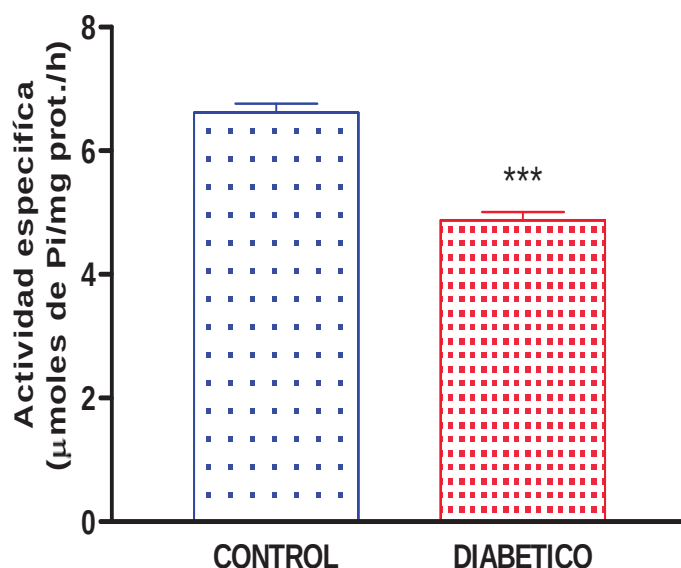


Fig. 10 Actividad específica de la bomba de  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  en homogeneizado de cerebelo de ratas macho adultas.  $\bar{X} \pm \text{D.E.}$  de 6 experimentos realizados por triplicado. \*\*\*  $p < 0.0001$ .



Las Fig. 11 y 12 muestran la actividad específica de la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPasa en fracciones membranales gliales (Fig.9) y/o neuronales (Fig.10) de cerebelo de ratas control y diabéticas. Se observa una disminución significativa ( $p < 0.001$ ) de la actividad específica de la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPasa en fracciones membranales gliales (42%) y en la fracción membranal neuronal (48%).

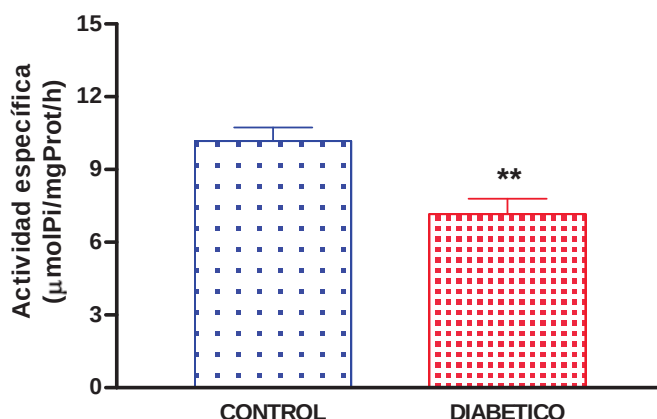


Fig. 11 Actividad específica de la bomba de  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  en fracciones membranales gliales aisladas de cerebelo de ratas macho adultas.  $\bar{X} \pm \text{D.E.}$  de 6 experimentos realizados por triplicado. \*  $p < 0.001$ .

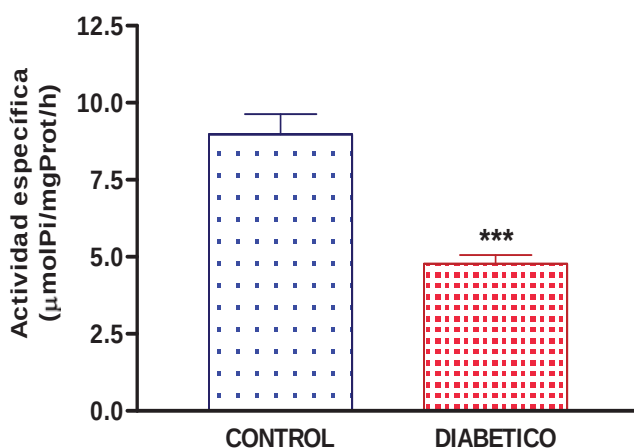


Fig. 12 Actividad específica de la bomba de  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  en fracciones membranales neuronales aisladas de cerebelo de ratas macho adultas.  $\bar{X} \pm \text{D.E.}$  de 6 experimentos realizados por triplicado. \*  $p < 0.0001$ .

La Fig. 13 muestra el efecto de la serotonina sobre la actividad de la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasa en homogeneizado de cerebelo de ratas macho adultas controles y diabéticas. Se obtuvo  $\text{DE}_{50}$   $6.69 \times 10^{-9}$  M en el grupo control y de  $7.37 \times 10^{-8}$  M en las ratas diabéticas.

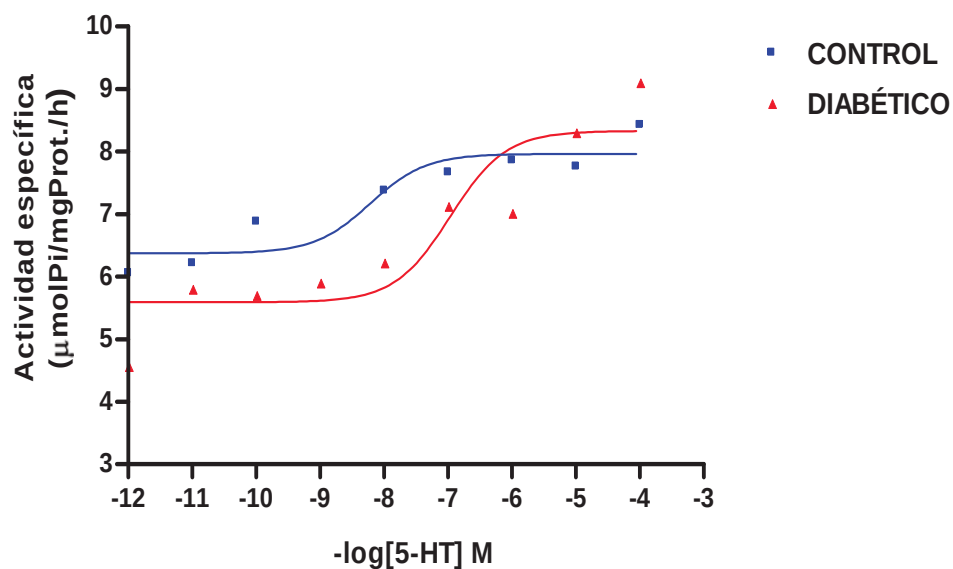


Fig. 13. Curva dosis–respuesta de la 5-HT sobre la actividad de la bomba de sodio y potasio en homogeneizado de cerebelo de ratas.  $\bar{X} \pm \text{D.E}$  de 6 experimentos realizados por triplicado.

La Fig. 14 muestra el porcentaje de estimulación de la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasa por serotonina en homogeneizado de cerebelo de ratas. En el grupo control el porcentaje de estimulación máximo fue de 41% mientras que en el grupo de ratas diabéticas el porcentaje de estimulación fue de 90%.

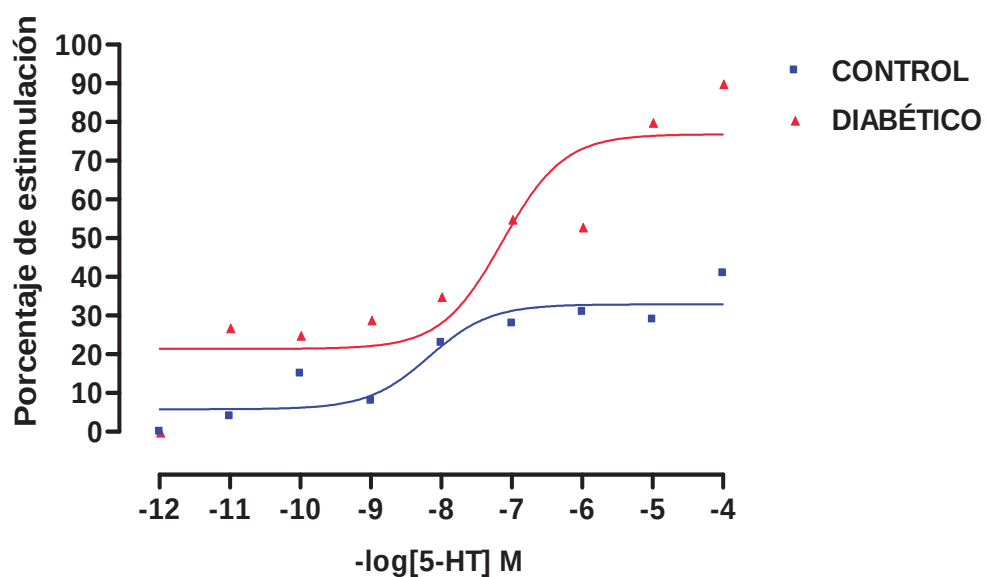


Fig. 14. Porcentaje de estimulación de la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPasa por serotonina en homogeneizado de cerebelo de ratas.  $\bar{X} \pm \text{D.E}$  de 6 experimentos realizados por triplicado.

La Fig. 15 muestra el efecto de la serotonina sobre la actividad de la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasa en membranas gliales de cerebelo de rata. La  $\text{DE}_{50}$  fue de  $1.70 \times 10^{-9}$  M en el grupo control y de  $4.67 \times 10^{-9}$  M en el grupo diabético.

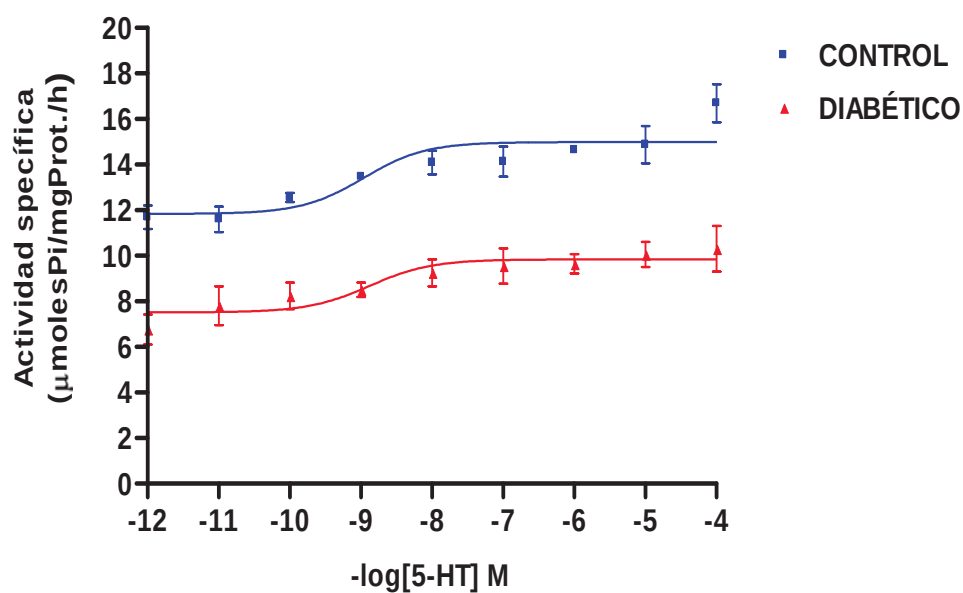


Fig. 15. Efecto de la serotonina sobre la actividad de la bomba de  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$ -ATPasa en membranas gliales aisladas de cerebelo de rata.  $\bar{X} \pm \text{D.E.}$  de 6 experimentos realizados por triplicado.

La Fig. 16 muestra el porcentaje de estimulación de la actividad de la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPasa por 5-HT en membranas gliales de cerebelo de rata. El porcentaje máximo de estimulación en grupo control fue de 42% y de 52 % en el grupo diabético.

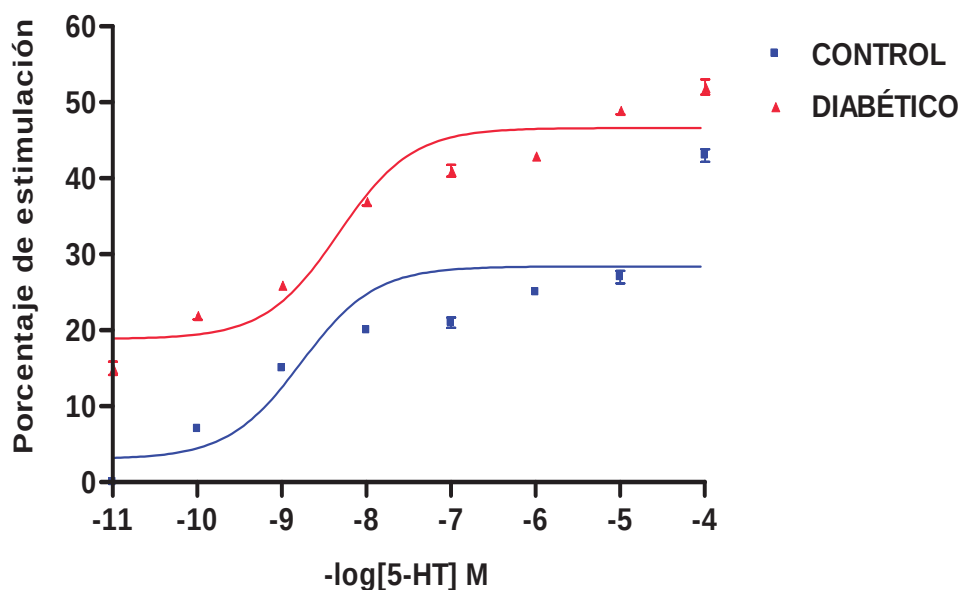


Fig. 16. Porcentaje de estimulación de la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasa por 5-HT en fracciones membranales gliales de cerebelo de ratas.  $\bar{X} \pm \text{D.E}$  de 6 experimentos realizados por triplicado.

La Fig. 17 muestra el efecto de la 5-HT sobre la actividad de la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPasa en membranas neuronales de cerebelo de rata macho adulta, donde se puede apreciar que la serotonina no estimuló la actividad de la enzima en ambos grupos (control y diabético).

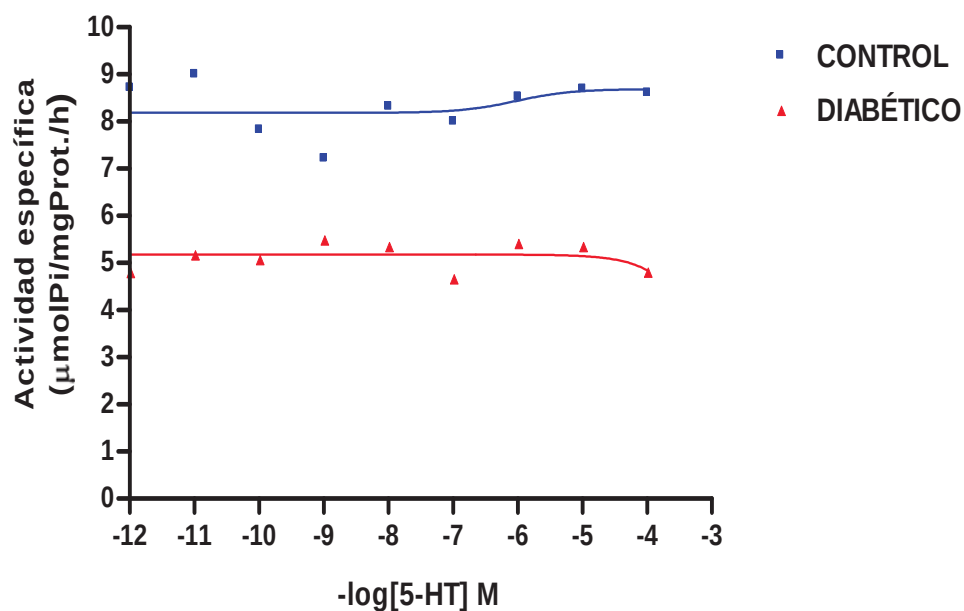


Fig. 17. Efecto de la 5-HT sobre la actividad de la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPasa en membranas neuronales aisladas de cerebelo de rata macho adulta.  $\bar{X} \pm \text{D.E}$  de 6 experimentos realizados por triplicado.

La Fig. 18 muestra el efecto del antagonista espiperona sobre la actividad de la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasa en homogeneizado de cerebelo de ratas. Se observa que el antagonista inhibió la actividad de la enzima en forma dosis – dependiente, con una  $\text{DE}_{50}$  de  $10^{-8}$  en ambos grupos.

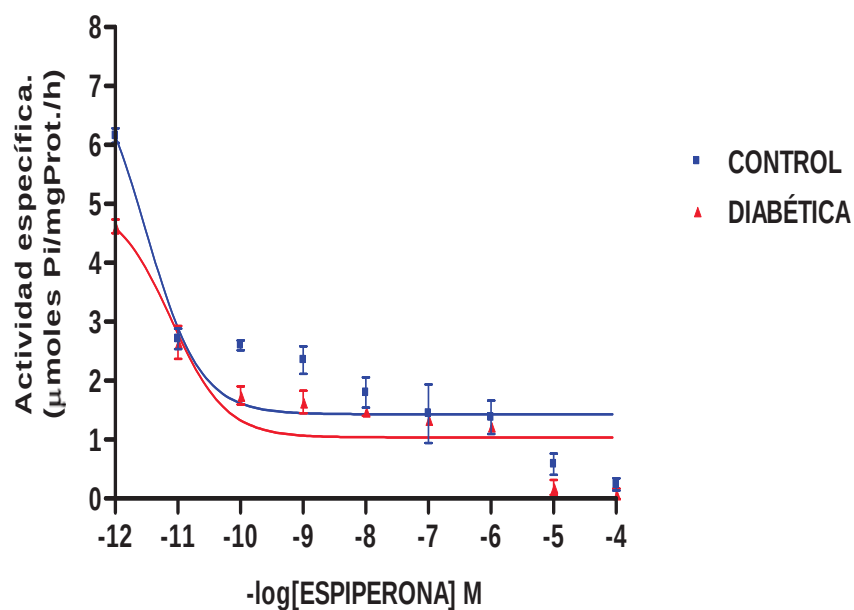


Fig. 18. Efecto de la espiperona sobre la actividad de la bomba de  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  en homogeneizado de cerebelo de ratas.  $\text{X} \pm \text{D.E.}$  de 6 experimentos realizados por triplicado.

La Fig.19 muestra el porcentaje de inhibición de la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasa por espiperona en homogeneizado de cerebelo. Se puede observar la inhibición fue similar en ambos grupos.

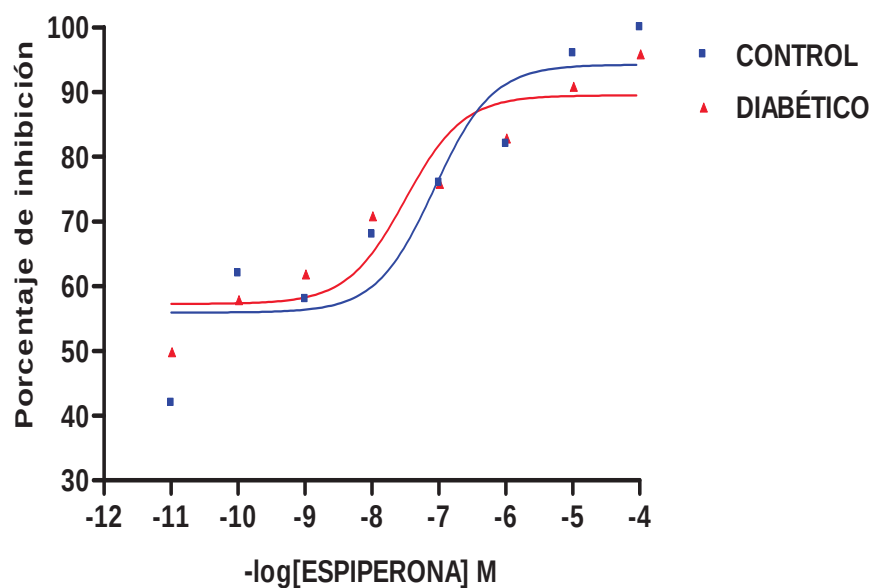


Fig.19. Porcentaje de Inhibición de la Bomba de  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  por espiperona en homogeneizado de cerebelo de ratas macho adultas.  $\bar{X} \pm \text{D.E.}$  de 6 experimentos realizados por triplicado.



La Fig. 20 muestra el efecto de la espiperona sobre la actividad de la bomba de sodio y potasio en fracciones membranales gliales de cerebelo de ratas macho. En donde se observa una disminución de la actividad de la enzima, su  $DE_{50}$  calculada fue de  $7.6 \times 10^{-9}$  M para el grupo control y de  $8.8 \times 10^{-6}$  M para el grupo diabético.

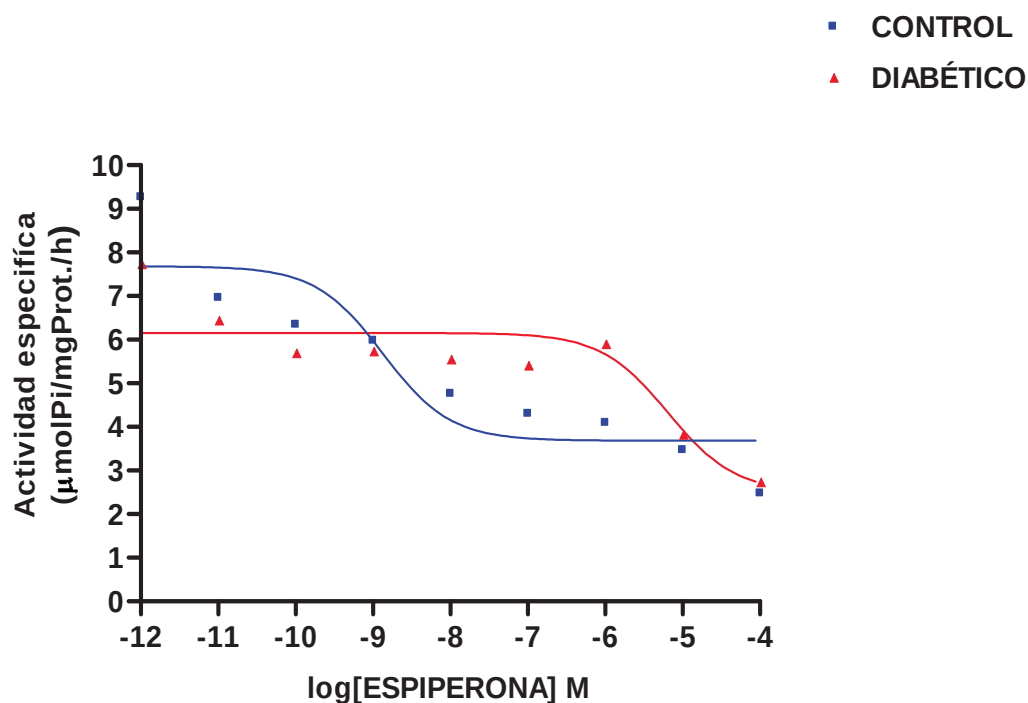


Fig .20. Efecto de la espiperona sobre la actividad de la  $Na^+/K^+$  ATPasa en membranas gliales aisladas de cerebelo de ratas.  $X \pm D.E.$  de 4 experimentos realizados por triplicado.

La fig. 21 muestra el porcentaje de inhibición de la enzima por la espiperona en membranas gliales aisladas de cerebelo.

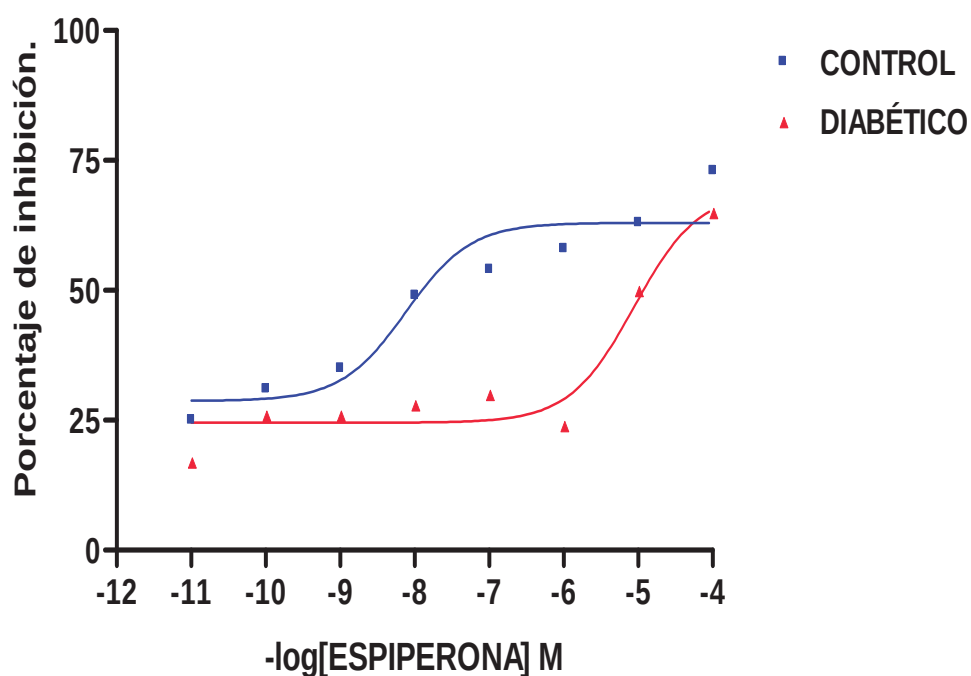


Fig. 21. Porcentaje de inhibición de la actividad de la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPasa por la espiperona en membranas gliales de cerebelo de ratas macho adultas.

La Fig. 22 muestra el efecto de la espiperona sobre la actividad de la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPasa en membranas neuronales de cerebelo de rata macho control y diabética adulta, donde se puede apreciar que no hubo efecto sobre la actividad de la enzima.

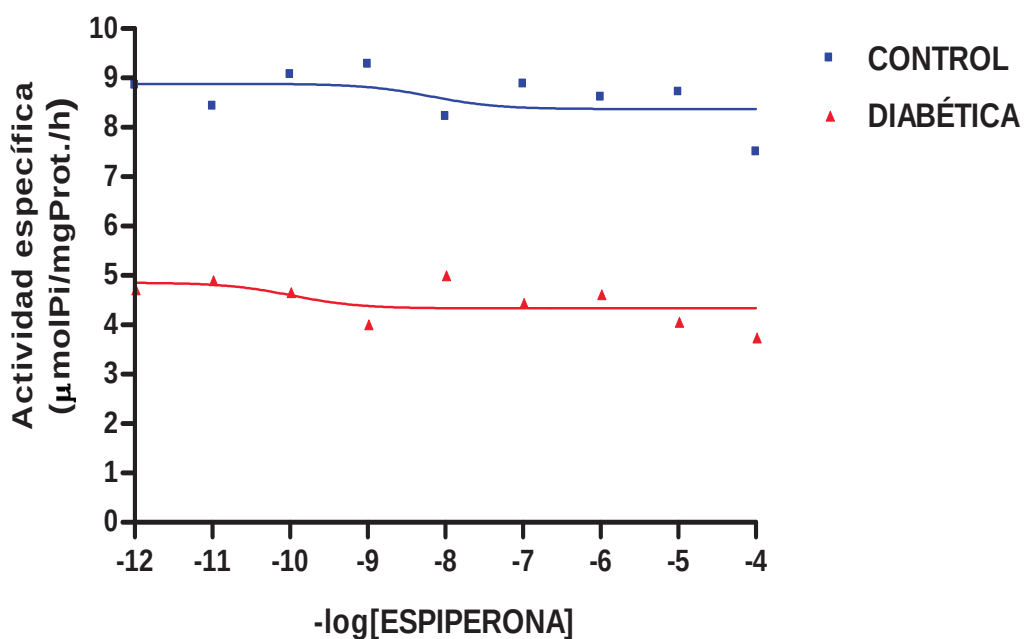


Fig. 22. Efecto de la espiperona sobre la actividad de la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPasa en membranas neuronales de cerebelo rata macho adulta control y diabética.  $\bar{X} \pm \text{D.E.}$  de 6 experimentos realizados por triplicado.

## 9. DISCUSIÓN

La presencia de hiperglicemia en las ratas administradas con STZ indica que efectivamente existe alteración en el metabolismo de la glucosa similar a la observada en pacientes con diabetes, Alain (1969) y Juárez (2008) empleando el mismo modelo experimental, es decir, la inducción de diabetes con STZ condujo a hiperglicemia en las ratas con DM1, lo que indica que efectivamente la administración de estreptozotocina es un buen método para inducir DM1.

La actividad basal de la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPasa de las diferentes preparaciones empleadas correspondió a las actividades reportadas por Caudillo (2005) en las mismas preparaciones, lo que establece que la técnica para determinar la actividad de la enzima fue estandarizada adecuadamente.

En relación a la bomba de sodio y potasio en las ratas con DM1, esta fue menor que en las ratas del grupo control, Das *et al.*, (1976) reportaron disminución de la actividad de la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPasa en el nervio ciático de ratas con DM1. Posteriormente Sima y Sigimoto (1999) confirmaron esta alteración de la actividad de la enzima también a nivel periférico. Varios mecanismos se han sugerido para explicar la disminución de la actividad de la enzima: el aumento de la vía del poliol, un decremento de la concentración del mionositol, una alteración en la actividad de la protein cinasa C (PKC) (Greene *et al.*, 1987). También se ha propuesto que ésta disminución esta en relación con un incremento en el estrés oxidativo y un aumento en el proceso de glicosilación no enzimática (GNE). Probablemente la disminución de la actividad de la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasa a nivel central en las ratas con DM1 ocurra por alteraciones del metabolismo de las células gliales y/o neuronales como ocurre a nivel periférico.

Como ya se mencionó la 5-HT regula la actividad de la bomba de sodio y potasio en corteza y cerebelo (Hernández, 1992; Caudillo, 2005; Celis, 2005), nuestros resultados muestran la estimulación de la actividad de la enzima por serotonina en homogeneizado y fracciones membranales gliales en el grupo control y diabético, una explicación a ello puede ser la interacción de receptores específicos de membrana, para la 5-HT los cuales están en estrecha asociación con la bomba de sodio y potasio modificando su actividad específica, mecanismo propuesto por Hernández (1987). En relación con la activación de la enzima por 5-HT es a través de la estimulación de receptores serotoninérgicos.

En las ratas con DM1 el incremento de la actividad de la Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPasa por la 5-HT no alcanzó los valores basales de la actividad basal de la enzima, probablemente las alteraciones a nivel del metabolismo celular en las ratas con DM1 no permiten que el complejo enzimático funcione adecuadamente. La diabetes mellitus presenta una alteración en la síntesis de 5-HT a nivel cerebral. En estudios recientes se ha observado que durante la diabetes mellitus existe una disminución de la biosíntesis de serotonina debido a una alteración de la fracción libre del L-Trp en el plasma y cerebro a la par con una inhibición de la enzima limitante la triptófano hidroxilasa 2 (TPH2) (Manjarréz *et al.*, 2000; Herrera *et al.*, 2005; Manjarréz *et al.* al 2006), esto podría explicar la disminución de la actividad de basal de la enzima en las ratas con DM1.

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

Respecto a la fracción membranal neuronal ésta no mostró efecto con la 5-HT, estos resultados sugieren que la Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPasa glial es la que responde a la 5-HT en el caso del homogeneizado en grupo control y diabético.

El efecto de agonista inverso surgió de observaciones experimentales de que algunas drogas son capaces de reducir la actividad del sistema del receptor que eran activados en ausencia de sus agonistas. Dado que los agonistas incrementan la actividad del receptor a esta actividad opuesta o negativa se le conoce como agonismo inverso (Strage, 2002). El efecto de la espiperona antagonistas del receptor 5-HT<sub>1A</sub> y 5-HT<sub>2A</sub> sobre la actividad de la bomba sodio y potasio mostró una inhibición de la actividad de la enzima. Estos resultados confirman la participación del receptor 5-HT<sub>2A</sub> que es el tipo de receptor que se encuentra en mayor densidad en cerebelo y no el 5-HT<sub>1A</sub> que es el que se encuentra mayormente en corteza cerebral. Como se puede observar la espiperona siendo un antagonista serotoninérgico actúa como un agonista inverso.

## 10. CONCLUSIONES

- La DM1 disminuye la actividad de la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasa cerebelar.
- La DM1 modifica la actividad de la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasa cerebelar.

## 11. REFERENCIAS

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION (ADA). Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. DIABETES CARE, VOLUME 30, SUPPLEMENT 1, JANUARY 2007.

Amin, A.H., Crawford, T.B.B., and Gaddum, J.H. (1954) The distribution of substance P and 5-hidroxytryptamine in the central nervous system of the dog. J. Physiol. 126:596-618.

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

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

Biessels, G.J., Cristino, N.A, Rutten, G.J., Hamers, F.P., Erkelens, D.W., Gispen, WH. (1999). Neurophysiological changes in the central and peripheral nervous system of streptozotocin-diabetic rats. Brain, 122: 757-768.

Blundell, J.E. (1984). Serotonin and Appetite. Neuro pharmacology. 23: 1537-1551.

Bockaert, J., Ansanay, H. , Sebben, M., Waeber, C., Dumius, A., and Fagni, L. (1994) 5-HT<sub>4</sub> Receptors: brain distribution and long-term blockade of K<sup>+</sup> channels in cultured neurons in: Book of Abstracts of the 5-HT Third Iuphar Meeting on serotonin. Chicago.

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

Boullosa, O. and López-Mato, A.M. (1997) Actualización sobre neurotransmisión serotoninérgica. Rev. Alcmeon. Vol.5, No.4.

Boullosa, O., López-Mato, A., and Cetkovich-Bakmas, M. (1993) Recientes avances en la configuración de la neurotransmisión serotoninérgica en: Actualización en psiquiatría Biológica.



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

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

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

Castelluci, V.F., Nairn, A., Greengard, P., Schwartz, J.H. and Kandel, E.R. (1982) Inhibitor of adenosine, 3-monophosphate-dependent protein kinase blacks presynaptic facilitation in aplysia. *J.Neurosci.* 2: 1673-1681.

Caudillo, N. ME., (2005) Efecto de antagonistas 5-HT<sub>2</sub> sobre la actividad de la bomba de sodio y potasio en cerebelo de ratas macho. Tesis de Licenciatura. Escuela de Químico Farmacobiología. U.M.S.N.H. Morelia, México.

Celis, N.K. (2005) Los antagonistas del receptor 5-Ht<sub>2</sub> tienen efectos de agonismo inverso sobre la actividad de la bomba de sodio y potasio. Tesis de Licenciatura. Escuela de Químico-Farmacobiología U.M.S.N.H., Morelia Mich.

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

Clinke, G., and Digovic, C. (1992) Pharmacological modulation of the serotoninerg system: and overview of the effects on normal and pathological. In: Abstracts of 2<sup>nd</sup>, International Symposium on serotonin. Giovani Lorensizini Medical Foundation. Houston.

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

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

Dahlstroem, A. And Fuxe, K. (1964) An evidence for the existence of monoamine-containing neurons in the central nervous system. *Acta Physiol. Scand.* 62: 232-255.

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

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

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

De Robertis (h.)-Hib\_ponzio.(2000) *Biología Celular y Molecular*. Editorial El Ateneo. 4:96-101.

Donetti, A. et al (1994) Binding of (<sup>3</sup>H) – GR 113808 to 5-HT<sub>4</sub> receptors in human frontal cortex. In: *Book of abstracts of the 5-HT third luphar meetinhg on serotonin*. 84. Chicago.

Dyck, P.J., Zimmerman, B., Vilen, T.H., Minnerath, S.R., Karnes, J.L., Yao, J.K., Poduslo, J.F., (1988) Nerve glucose, fructose, sorbitol, myo-inositol, and fiber degeneration and regeneration in diabetic neuropathy. *N Engl J Med* 319:542-548.

Ehrlich, P.(1909) *Über den jetzigen stand der chemotherapie* Berichte. 42:17-47.

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

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

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

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

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

Ghez, C., Thach, W.T. (2000) The cerebellum. In Kandel ER, Schawart JH, Jjessell TM, eds. *Principles of neural science*. New York: Elsevier; p 832-854.

Grahme-Smith, D.G. (1964) Tryptophan hydroxylation in brain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* Cap.16:586-592.

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

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

Hernandez, R.J. (1992)  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase regulation by neurotransmitters. *Neurochem Int.* 20:1-10.

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

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

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

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

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

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

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

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

Kandel, E., (1991) *Principales of Neuronal Science*. Third edition; Appleton & Lange, Noewalk, Connecticut.

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

Kim, J.J., Thompson, R.F. (1997) Cerebellar circuits and synaptic mechanisms involved in classical eyeblink conditioning. *TINA*; 20:177-181.

Krupa, D.J., Thompson, J.K., Thompson, R.F. (1993) Localization of memory trace in the mammalian brain. *Science*; 260: 989-91.

Langley, J.M. (1978) *The serotonin receptors*. The human Press Clifton. New Jersey. 338.

Lauder, J.M. (1988) Neurotransmitters as morphogens. *Prog. Brain Res* 73: 365-387.

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

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

Lehkuneic, E., and López-Mato, A. (1992) Uso de recaptadores serotoninérgicos en el tratamiento del insomnio. *Universidad de Buenos Aires*. 110-120.

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

Llianás, R., and Walton, K.D. (1990) *The synaptic organization of the brain*. Oxford: Oxford University Press;. p.214-245.

Lovenberg, W., Jequier, E., and Sjoerdsma, A. (1967) Tryptophan hydroxylation: measurement in pineal gland, brainstem, and carcinoid tumor. *Science*. 155:217-219.

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

Manjarrez G, Herrera, R., Leon, M. and Hernández, 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

Manjares, G.G., Herrera, M.J.R, Bueno, S.S., González, R.M., Hernández, R.J. (2000) Cambios en la biosíntesis de serotonina cerebral en ratas con diabetes mellitus inducida por estreptozotocina: efecto del tratamiento con insulina. *Rev Invest.*; 52: 509–516.

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

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

Mercado, C.R., Floran, B., and Hernández, R.J. (1998) Regulated release of serotonin from axonal growth cones isolated from fetal rat brain. *Neurochem: Int.* 103-106.

Mercado, R. and Hernández, R. (1992) Regulatory role of a neurotransmitter (5-HT) on glial  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase in the rat brain. *Neurochem. Int.* 21: 119-127.

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

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

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

Pacheco, M.A., Pastor, T.E., and Wecker, L. (2003) Phosphorylation of the  $\alpha_4$ -subunit of human  $\alpha_4\beta_2$  Nicotinic receptors: role of the cAMP-dependent protein kinase A (PKA) and protein kinase C (PKC). *Mol. Brain. Res.* 114:65-72.

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

Potiou, P., and Boulou, R. (1977) Pharmacologie du tryptophane. *Path Biol.* 25:565.

Powis, D.A. (1981) Does  $\text{Na}^+ / \text{K}^+$  ATPase play a role in the regulation of neurotransmitter release by presynaptic adrenoceptors?. *Biochem. Pharmacol.* 10: 2389-2397.

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

Raymond, J.L., Lisberg, S.G., and Mauk, M.D., (1996) The cerebellum: a neuronal learning machine. Science, 272:1126-1131.

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

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

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

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

Sickich, L. Hickok, J.M. and Todd, R.D. (1990) 5-HT<sub>1</sub> Autoreceptors control neurite branching during development. Brain Res.56:269-274.

Siegel, G., Agranoff, B., Albers, R. & Molinoff, P. (1989) Basic Neurochemistry. Editorial Raven Press. 984 .

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

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

Strage, P.G (2002) Mechanism of inverse agonis at G-Protein-coupled receptors. TRENDS in pharmacological Sciences. Elsevier Science. Vol.23.

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

Taglimonte, A., Biggio, G., vargin, L., and Gessa, G.L. (1973) Free tryptophan in serum controls brain tryptophan level and serotonin synthesis. *Life Sci.* 12(6): 277-287.

Twarog, B.M. and Page, I.H. (1953) Serotonin contet of some mammalian tisúes and urine and a method for its determination. *Am J. Physiol* 175: 157-161.

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

Therien, A. G. & Bostein, R. (2000) Mechanisms of sodium pump regulation. *Am. J. Physiol.* 279: C541- C566.

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

Van Praag, H.M. (1981) Central monoamines and the pathogenesis of depression. *Handbook of biological psychiatry. Affect. Disord.* 4: 275 290.

Van Praag, H.M., Khan, R.S. and Asnis, G.M., et al. (1987) A serotonin hypothesis of panic disorder. *Journal Affect Disord.* 13: 1-8.

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

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

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

Voog, J. and Glickstein, M., (1998) the anatomy of the cerebellum. *Trends in Neurosci.* 21:370-375.



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

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