



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE
HIDALGO**

FACULTAD DE QUÍMICO FARMACOBIOLOGÍA

LABORATORIO DE NEUROBIOLOGÍA

**ACTIVIDAD DE LA BOMBA DE SODIO Y POTASIO EN
CEREBELO DE RATAS CON ESTRÉS NUTRICIONAL:
PRIMERA GENERACIÓN.**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICO FARMACOBIOLOGO**

PRESENTA:

OSCAR VILLICAÑA VALENCIA

ASESOR DE TESIS

Doc. en Neurociencias. ROSALIO MERCADO CAMARGO

**TESÍS PARCIALMENTE APOYADA POR CIC-UMSNH 2014,
CONACYT-ANUIES-ECOS-NORD M12-S01**

Morelia, Michoacán a julio de 2014

No creo que la ciencia sea difícil de enseñar por que los humanos no estén preparados para ella. En cambio: tenemos una inclinación profunda por la ciencia, en todos los tiempos, lugares y culturas. Ha sido el medio de supervivencia. Es nuestro derecho de nacimiento. Cuando, por indiferencia, falta de atención, incompetencia, alejamos a los niños de la ciencia les estamos privando de un derecho, los despojamos de las herramientas necesarias para manejar su futuro.

Carl Sagan

(El mundo y sus demonios, la ciencia como luz en la oscuridad)

1995

AGRADECIMIENTO Y DEDICATORIA

Especial agradecimientos al doctor Rosalio por haberme aceptado en su laboratorio, a mis compañeros de laboratorio chucho, Edson, y en especial a Robe y Susy que sin ellos hubiera sido mas prolongado este proceso, todos me ayudaron de diferentes maneras a completar esta meta, muchas gracias.

La dedicatoria de este trabajo va completamente para mi familia, mi madre Gloria que siempre trabajo duro a sobre manera para que yo pudiera continuar estudiando, a mis hermanas Gloria y María que siempre me aguantaron en mis momentos de desvelos y frustración, y a mi hermano Julio.

Contenido

I.- ÍNDICE DE FIGURAS	I
II.- LISTA DE ABREVIATURAS	II
III.- RESUMEN	IV
IV.-ABSTRACT	V
CEREBELO	1
ESTRUCTURA	2
Recepción de la información en la corteza cerebelar	3
Participación del cerebelo en la regulación de las funciones motoras	5
Cerebelo y aprendizaje motor	5
GLÍA	7
NEURONAS	9
Principales neurotransmisores	12
5 HIDROXITRIPTAMINA (SEROTONINA)	13
RESTRICCIÓN PROTEICO CALÓRICA	15
LA BOMBA DE SODIO POTASIO ATPasa	17
ESTRUCTURA DE LA BOMBA DE SODIO Y POTASIO	18
MECANISMO DE ACCIÓN	21
JUSTIFICACIÓN	22
HIPOTESIS	23
OBJETIVO	23
MATERIAL Y METODOS	23
RESTRICCIÓN PROTEICA CALORICA	23
DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LA BOMBA DE SODIO POTASIO	25
ANÁLISIS ESTADÍSTICO	25
RESULTADOS	26
DISCUSIÓN	30
CONCLUSIÓN	33
BIBLIOGRAFIA	34

I.- ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Imagen del cerebelo de una rata.....	1
Figura 2. Estructura laminar del cerebelo junto con sus células.....	2
Figura 3. Elementos celulares en una sección para sagital de un folio cerebelar.....	4
Figura 4. Esquema químico de la síntesis y metabolismo de 5-HT.....	13
Figura 5. Características funcionales de los receptores de la 5-HT.....	14
Figura 6. Mapa de densidad electrónica de la Na^+/K^+ ATPasa	18
Figura 7. Diagrama mostrando el arreglo topográfico de las isoformas.....	18
Figura 8. Estructura de Na^+/K^+ -ATPasa representada en una forma sin desplegar.....	19
Figura 9. Distribución y función de las isoformas de Na^+/K^+ -ATPasa.....	20
Figura 10. Peso corporal de las madres.....	25
Figura 11. Consumo de alimento de las madres.....	26
Figura 12. Consumo de alimento de las crías.....	26
Figura 13. Peso corporal de las crías.....	27
Figura 14. Longitud céfalo-sacra de las crías.....	28
Figura 15. Actividad enzimática de la Na^+/K^+ -ATPasa en cerebelo.....	29

II.- LISTA DE ABREVIATURAS

5-HT: 5-Hidroxitriptamina

AE: Actividad enzimática

ATP: Adenosina trifosfato

Ca⁺: Ion calcio

C°: Grados Celsius

DC: Desnutrido continuo

DD: Desnutrido al destete

DN: Desnutrido al nacimiento

g: Gramos

GABA: Ácido Gama Amino Butírico

Hrs.: Horas

K⁺: Ion potasio

kDa: Kilo Dalton

LCR: Líquido Cefalorraquídeo

LTD: Depresión a largo plazo

MAO: Mono Amino Oxidasa

mM: mili moles

Mg⁺: Ion magnesio

m/s: metros sobre segundo

mV: Mili volts

nm: Nano moles

nM: Nano molar

RD: Recuperado al destete

RN: Recuperado al nacimiento
RNA: Ácido ribonucleico
RPC: Restricción Proteico Calórica
rpm: Revoluciones por minuto
SNC: Sistema nervioso central
SNP: Sistema nervioso periférico
TPH: Triptófano hidroxilasa
 μ l: Micro litros
 μ m: Micro metros

III.- RESUMEN

La bomba de sodio y potasio es una enzima responsable del funcionamiento de la célula animal mamífera pues regula el potencial de membrana manteniendo la forma y estructura de la célula, también mantiene el pH del citoplasma para su correcto funcionamiento. Se ha demostrado que altos niveles en las concentraciones de serotonina derivados de la restricción proteico-calórica durante el desarrollo modifican la actividad de esta enzima en el cerebro. Estas modificaciones ocurren en las células gliales, células que cumplen roles de maduración neuronal, formación de circuitos neuronales, estructuración cerebral, regulación de la producción neuronal y la población de las neuronas existentes eliminando las innecesarias, además de ser las células mas abundantes en el cerebro. La importancia de dichas células en el cerebro es única, por tanto, el fin de esta investigación fue determinar si los cambios en estas células ocurren también en la primera generación de ratas derivadas de madres con Restricción Proteico Calórica en el área cerebelar. Este interés es debido al papel motriz y de percepción que cumple el cerebelo en el humano y en todos los mamíferos. Para esto mantuvimos a 4 grupos de ratas de la cepa Wistar bajo diferentes variantes de Restricción Proteico Calórica, esto porque se ha demostrado que cuando el estrés nutricional ocurre en etapas críticas de desarrollo conlleva cambios inherentes a un aumento en el porcentaje de la síntesis de serotonina. Los resultados en este estudio muestran que existe un aumento en la actividad de la bomba de sodio y potasio en los 4 grupos bajo Restricción Proteico Calórica comparados con un control, además también se observaron variantes en el consumo de alimento, talla y peso comparados con el grupo control. Esto sugiere que el estrés nutricional durante el desarrollo produce cambios epigenéticos que se mantiene en las generaciones sucesivas.

Palabras clave: Serotonina, restricción proteico-calórica, glía.

IV.-ABSTRACT

The sodium/potassium ATPase is an enzyme responsible of the animal mammal cell functioning, it regulates membrane potential, keeping the cell structure and its shape, it ALSO regulates cytoplasm pH for a correct cell functioning. It has been shown that higher levels of serotonin induced by caloric proteic restriction during development concentration modify the sodium pump activity in the brain. These modifications occur on glial cells, these cells develop roles of neuronal maturation, formation of neuronal circuits, brain structuration, and regulation of the existing population of neurons and in neuronal production, eliminating unnecessary neurons, besides being the most abundant cells in the brain. The importance of this cells in the brain is unique, therefore, the goal of this investigation was to determinate if the changes in these cells occur in the cerebellar area in rats from a group of undernourished mothers. Such interest is due to motor and perception role that develops in humans and mammals. For this we kept 4 groups of rats of Wistar strain under different variants of a Proteic Caloric Restriction, this because it has been shown that when nutritional stress occurs in critical stages of development entails inherent changes to an increase in the percent of synthesis of serotonin. The results show that there exists an increase of the sodium/potassium pump activity in the four groups under a proteic caloric restriction compared with the control group. We also observed variations of food consumption, size and weight in the experimental groups compared with their corresponding control group. These results suggest us that nutritional stress induced epigenetic changes which are transmitted to subsequent generations.

Key Words: Serotonin, caloric-proteic restriction, glia.

CEREBELO

Tejido constituido de una región central llamada vermis (significa gusano en latín por la forma que asemeja), dos hemisferios cerebelosos, uno a cada lado del vermis y dos pequeños flóculos colocados de forma lateral (Fig.1), que tiene las siguientes funciones (Freitas, et. al., 2010):

- 1.-Mantener el equilibrio a través del oído interior, que contiene receptores de balance.
- 2.-Mantener el tono muscular, regulación de la marcha, movimientos de motricidad gruesa y movimientos simétricos.
- 3.- Coordinación de movimientos finos, tales como tocar piano o escribir. (Freitas, et.al., 2010).

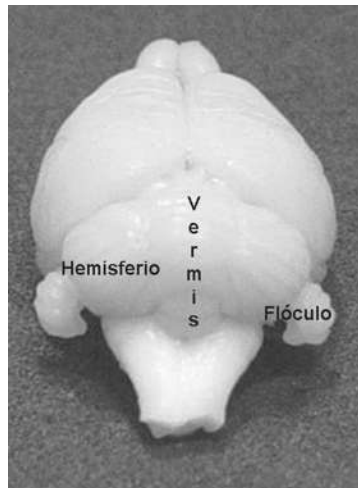


Fig. 1. Imagen del cerebelo de una rata (imagen tomada de García et.al., 2009).

ESTRUCTURA

Estructuralmente el cerebelo está constituido por tres estructuras laminares. Las capas del exterior al interior son: **La capa molecular** la cual contiene axones de neuronas granulares, dendritas de las células de Purkinje, células de canasta y células estrelladas, seguida por la **capa intermedia** (capa de las células de Purkinje) en donde se encuentran los cuerpos de células de Purkinje y la glía de Bergmann, finalmente la **capa más interna** (capa granular) que contiene las células granulares, células de Golgi, células de Lugaro (Xu, et. al., 2013) y a través de estas 3 capas atraviesan las fibras trepadoras (Fig. 2).

Al interior de la capa granular se encuentran embebidos tres núcleos cerebelares profundos: el fastigiado o medial, el interpósito o intermedio (dividido en anterior y posterior), y el dentado o lateral (García, et. al., 2009).

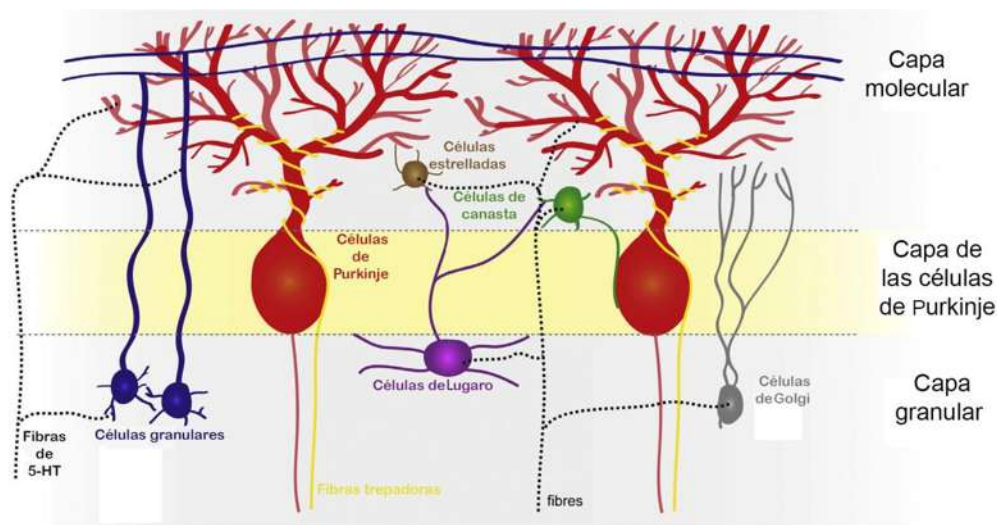


Fig. 2 Estructura laminar del cerebelo junto con sus células (Modificado de Oostland y Van hooft 2013).

El núcleo fastigiado recibe información del vermis y proyecta hacia los núcleos vestibulares y formación reticular, ejerciendo influencia sobre las neuronas motoras de la médula espinal (vía el tracto vestibulo espinal y retículo espinal, respectivamente). Es probable que a través de estas conexiones el cerebelo

participe en la regulación del tono muscular, la postura y los reflejos medulares (García, et. al., 2009).

El núcleo interpósito recibe aferencias de la zona intermedia (localizada entre el vermis y el hemisferio lateral), y proyecta hacia el núcleo rojo contralateral, ejerciendo influencia sobre las motoneuronas flexoras de la médula espinal (vía el tracto rubroespinal). Esta vía está implicada en la organización de los movimientos finos (García, et. al., 2009).

El núcleo dentado recibe información de los hemisferios laterales y proyecta a la corteza motora y premotora, vía el núcleo ventrolateral del tálamo del lado opuesto. Además de influir sobre neuronas talámicas, también es posible que el cerebelo sea capaz de activar los comandos motores de la corteza cerebral (Diedrichsen, et. al., 2010).

Recepción de la información en la corteza cerebelar

La corteza cerebelar recibe información principalmente por 2 vías aferentes:

Las fibras musgosas: (que hacen relevo a las células granulares) éstas provienen de los núcleos pontinos, espinales, trigéminos y vestibulares, así como de visuales y auditivas. Transmiten potenciales de acción a alta frecuencia y producen en las células de Purkinje una frecuencia de disparo. Proveen información acerca de la dirección, velocidad y fuerza del movimiento (Chizhikov y Millen, 2003) (Fig. 3).

Las fibras trepadoras: provienen de la oliva inferior, estas fibras se enredan en el árbol dendrítico de las células de Purkinje, transmiten potenciales de acción de baja frecuencia, pero un sólo disparo de estas fibras produce en las células de Purkinje una ráfaga de potenciales de acción (Uusiaari y Schutter, 2011) (Fig. 3).

Las células de Purkinje (Fig. 3) son neuronas estructurales fundamentales del cerebelo, las cuales reciben aproximadamente de 80 mil a 175 mil contactos sinápticos de fibras paralelas y unos 300 contactos de 1 sola fibra trepadora. Así mismo, son inhibitorias de los núcleos profundos y vestibulares, constituyen la única vía de salida de información desde la corteza cerebelar (Xu et. al., 2013).

La importancia de las células de Purkinje radica en que estas células colectan señales generadas alrededor de 200,000 células granulares, y por lo tanto puede actuar como integradora, estas células tienen un largo árbol dendrítico procesando entradas sinápticas y un compartimiento somático responsable por generar el potencial de acción (D'angelo et. al., 2010).

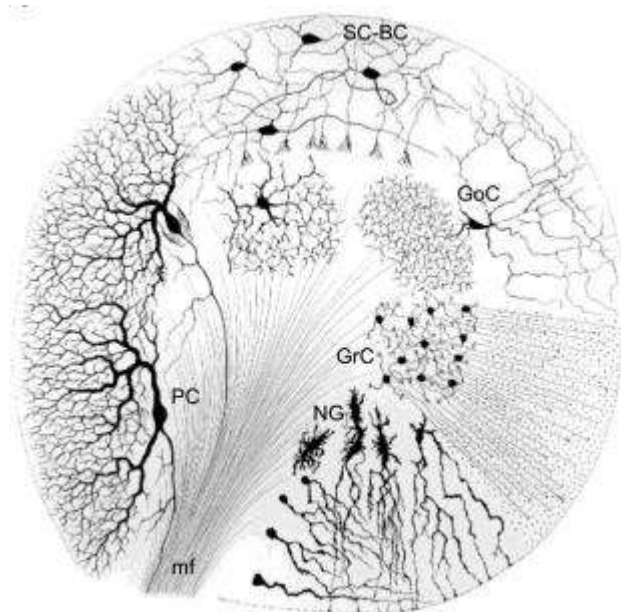


Fig. 3 Elementos celulares en una sección parasagital de un folio cerebelar, se puede ver células de Purkinje (PC), células estrelladas y de canasta (SC/BC), células de Golgi (GoC), células granulares (GrC), fibras musgosas (mf) y células neurogliales (NG) (imagen tomada de D'angelo, et.al., 2010).

Participación del cerebelo en la regulación de las funciones motoras

El cerebelo funciona como un comparador de las diferencias existentes entre las órdenes motoras y sus resultados prácticos, tratando de disminuir los desajustes que se producen durante el movimiento (Betaon y Mariën, 2010). El cerebelo recibe información de los planes motores que se elaboran en la corteza cerebral a través de las señales eferentes que llegan por el tracto corticopontocerebeloso y por el haz espinocerebeloso ventral. Además, al cerebelo se le informa del resultado de esos planes motores a través de señales aferentes de propioceptores musculares, receptores articulares y cutáneos, y de los sistemas visual, acústico y vestibular (Sotelo, 2004). Mediante la comparación de ambas informaciones, el cerebelo se encarga de corregir la evolución de los actos motores en cada momento determinado del desarrollo de dichos actos y, además, ayuda mediante el entrenamiento y la repetición a su sincronización y perfeccionamiento. Así, su acción da como resultado un acto motor armónico, suave y continuo, características que pueden perderse tras una lesión cerebelosa (Tirapu, et. al., 2011).

Cerebelo y aprendizaje motor

Un tipo de plasticidad sináptica caracterizada en el cerebelo como elemento de memoria, denominado Depresión a Largo Plazo (LTD) el cual consiste en una disminución en el índice de disparo de las células de Purkinje en el registro extracelular (Ito, 2001).

Estudios in vitro han demostrado una disminución de la actividad sináptica entre fibras trepadoras, fibras paralelas, y células de Purkinje, que suprime la excitación presináptica por despolarización postsináptica. Al respecto, se han identificado varios mensajeros retrógrados, pero los candidatos más probables son los cannabinoides endógenos, los cuales son liberados desde la célula de Purkinje (Hibi y Shimizu, 2011).

Aun con este conocimiento poco se sabe si este mecanismo de LTD presenta un papel íntegro ejecutando el aprendizaje motor, de ahí se ha recurrido a modelos como un intento de corroborar hallazgos (García, et. al., 2009).

Modelo de aprendizaje motor

* ***Adaptación del reflejo vestíbulo-ocular:*** El reflejo vestíbulo-ocular asegura que cuando la cabeza gira en una dirección, los ojos se muevan en dirección opuesta con exactamente la misma velocidad. Esto hace posible mantener la mirada fija en un objeto, evitando el deslizamiento de la imagen en la retina. Las fibras trepadoras que llegan hasta el flóculo proveen información acerca del deslizamiento retinal y comunican al cerebelo si la velocidad del movimiento del ojo es incorrecta. Por su parte, la información acerca del movimiento de la cabeza desde el aparato vestibular es provista por las fibras musgosas, que también finalizan en la capa granular del flóculo (D'angelo, et. al., 2010).

* ***Condicionamiento pavloviano de parpadeo:*** Consiste en la presentación de un soplo en el ojo de un animal (en conejo despierto), lo que produce una respuesta incondicionada de parpadeo. Si el soplo ahora es precedido por un sonido (estímulo condicionado), el conejo eventualmente reaccionará con parpadeo cuando el sonido sea presentado primero (Broodal, 1992).

Todos estos procesos son realizados mediante componentes celulares denominados **neuronas**.

En el sistema nervioso existen 2 tipos principales de células; neuronas y neuroglía (células gliales).

GLÍA

Neuroglía (células gliales): Éstas representan el grupo más numeroso de células en el cerebro y están prestando roles estructurales, de soporte metabólico y trófico para las neuronas (Sheridan y Murphy, 2013). Las células gliales controlan, fundamentalmente, el microambiente celular en lo que respecta a la composición iónica, los niveles de neurotransmisores y el suministro de citoquinas y otros factores de crecimiento (Corty y Freeman, 2013).

Las células gliales se clasifican en:

Glía SNC

- **Astroцитos:** son las células gliales más numerosas y diversas en el SNC:
 - Astroцитos protoplásmicos: presentes en la materia gris.
 - Astroцитos fibrosos: presentes en la materia blanca.
 - Astroцитos velate: también encontrados en el cerebelo.
 - Astroцитos interlaminares: específico para corteza cerebelar.
 - Astroцитos Tanocitos: cuerpo de rafe y la hipófisis.
 - Astroglía perivascular y marginal: astroцитos, ependimocitos, células coroides plexoras, células de pigmentación retinal.

Limpian desechos del cerebro, transportan nutrientes hacia las neuronas, digieren parte de las neuronas muertas, regulan el contenido del espacio extracelular (Caruso, et. al., 2013, Verkhratsky y Butt, 2007).
- **Oligodendrocitos:** La función principal de los oligodendrocitos es la producción de mielina, cuya función es recubrir parte de los axones

en las neuronas del SNC y asistir la intermitente aceleración de la propagación del potencial de acción (Coulpier, et. al., 2010).

- **Epéndimocitos:** Las células del epitelio ependimario (epéndimocitos, tanicitos) revisten las cavidades internas del SNC que contienen al líquido cefalorraquídeo LCR (ventrículos cerebrales y conducto del epéndimo). (Verkhatsky y Butt., 2007).

Glía SNP:

- **Células de Schwann:** Hay 4 tipos de células de Schwann en el SNP: células Schwann mielinizantes, células de Schwann no mielinizantes, células de Schwann perisinápticas de la unión neuromuscular y células de Schwann como terminal sensorial de neuritas. El contacto continuo con los axones es particularmente importante, esto ya que los precursores de estas células mueren al perderse este contacto. Tienen la función de formar mielina para las neuronas del SNP, de formar una membrana protectora alrededor de los axones de cada uno en el SNP (Verkhatsky y Butt, 2007).
- **Células capsulares o satélites:** Rodean dendritas y axones de las neuronas de los ganglios espinales, craneales y viscerales. Suelen formar en los cuerpos neuronales un revestimiento constituido por la superposición de varias capas de membrana plegadas, disposición que recuerda la vaina de mielina de las fibras periféricas. La superficie externa de las células satélites está cubierta por membrana basal que se continúa de una célula a otra y reviste a las células de Schwann del primer internodo (Ohara, et. al., 2010).

- **Célula de Müller:** Principal componente glial de la retina en los vertebrados. Se relacionan con el desarrollo, organización y función de la retina. Puede que tengan algo que ver con el crecimiento del ojo y que intervengan en la modulación del procesamiento de la información en las neuronas circundantes (Verkhatsky y Butt, 2007).

Células microgliales: Las microglía son las células inmunocompetentes residentes del SNC las cuales se activan por encima de varios tipos de enfermedades y lesiones del cerebro. Representan cerca de el 10% de las células gliales en el cerebro, son originarios de mielomonocitos. Las células microgliales pueden aparecer de 3 formas distintas: la microglía en reposo, microglia activada y la microglía fagocítica. Residen en todas las partes del cerebro con la más alta densidad en hipocampo, telencéfalo olfatorio, ganglios basales y la sustancia negra. Cada célula de microglía individual es responsable por despejar un territorio definido de alrededor de $500 \mu\text{m}^3$; el proceso de las células en descanso nunca está en contacto con las otras, están equipadas con numerosos receptores y moléculas reconocedoras de sitios inmunes (Corty y Freeman, 2013).

NEURONAS

Neuronas: Son células del tejido nervioso que se interconectan formando redes de comunicación para transmitir señales a zonas definidas del sistema nervioso (Parekh y Ascoli, 2013).

Funciones:

- Recibir señales desde receptores sensoriales.
- Conducir señales como impulsos nerviosos que consisten en cambios de polaridad a nivel de membrana celular.

- Transmitir señales a otras neuronas o células efectoras (Parekh y Ascoli, 2013).

Estructura:

En cada neurona existen 4 componentes:

Soma: Zona de la célula donde se ubica el núcleo y desde el cuál nacen dos tipos de prolongaciones

Axón: Conduce impulsos nerviosos de esa neurona hacia otra desde el soma.

Dendritas: Prolongaciones cortas del soma reciben y conducen los impulsos hacia el mismo.

Mielina: Sustancia que se condensa a la forma de una vaina discontinua cuya función es cubrir el axón para acelerar el paso del impulso eléctrico (Torre y Bonni, 2011).

Clasificación por función:

- **Sensitivas:** Conducen los impulsos de la piel u otros órganos de los sentidos a la médula espinal y al cerebro.
- **Motoras:** Llevan los impulsos fuera del cerebro y la médula espinal a los efectores (músculos y glándulas.)
- **Internunciales:** Forman vínculos en las vías neuronales, conduciendo impulsos de las neuronas aferentes a las eferentes (Aguilar, 2011).

Según número y distribución de prolongaciones:

- **Pseudo-unipolares:** Nace sólo una prolongación que se bifurca y se comporta funcionalmente como un axón, salvo en sus extremos ramificados en que la rama periférica reciben señales y funcionan como dendritas y transmiten el impulso sin que éste pase por el soma neuronal.
- **Bipolares:** Además del axón tiene sólo una dendrita se les encuentra asociadas a receptores en la retina y en la mucosa olfatoria.
- **Multipolares:** Además del axón nacen desde dos o más de mil dendritas lo que les permite recibir terminales axónicos desde múltiples neuronas distintas. La mayoría de las neuronas son de este tipo. Un caso extremo lo constituyen las células de Purkinje que reciben más de 200.000 terminales nerviosas (Aguilar, 2011).

Por el mediador químico:

- **Colinérgicas:** Liberan acetilcolina.
- **Noradrenérgicas:** Liberan noradrenalina.
- **Dopaminérgicas:** Liberan dopamina.
- **Gabaérgicas:** Libera GABA, es decir ácido gamma aminobutírico.
- **Serotoninérgicas:** Liberan serotonina.

Sinapsis.

La neurona tiene 2 funciones principales: La propagación del potencial de acción (impulso) a través del axón y su transmisión a otras neuronas o a células efectoras para inducir una respuesta. Estas células efectoras pueden ser del músculo esquelético y cardíaco, glándulas exocrinas y endocrinas reguladas por el sistema nervioso. La conducción de un impulso a través del axón es un fenómeno eléctrico causado por el intercambio de iones Na^+ y K^+ a lo largo de la membrana. En cambio, la transmisión del impulso de una neurona a otra o a una célula efectora

no neuronal depende de la acción de neurotransmisores específicos sobre receptores también específicos (Scimemi y Beato, 2009).

Cada neurona individual genera un potencial de acción idéntico después de cada estímulo y lo conduce a una velocidad fija a lo largo del axón. La velocidad depende del diámetro axonal y del grado de mielinización. En las fibras mielínicas la velocidad en metros/segundo (m/s) es aproximadamente 3,7 veces su diámetro (m); por ejemplo, para una fibra mielinizada grande (20 m) la velocidad es de unos 75m/s. En las fibras amielínicas, con diámetro entre 1 y 4 m, la velocidad es de 1 a 4 m/s. La conexión funcional entre dos neuronas puede establecerse entre el axón y el cuerpo celular, entre el axón y la dendrita (la zona receptiva de la neurona), entre un cuerpo celular y otro o entre una dendrita y otra (Aguilar, 2011).

Principales neurotransmisores

Los aminoácidos **glutamato** y **aspartato** son los principales neurotransmisores excitatorios del SNC. Están presentes en la corteza cerebral, el cerebelo y la medula espinal.

El ácido **g-aminobutírico** (GABA)

La **acetilcolina**

La **dopamina**

La **noradrenalina**

La **b-endorfina**

La **metencefalina** y **leuencefalina**

Las **dinorfinas**

5 HIDROXITRIPTAMINA (SEROTONINA)

La 5-Hidroxitriptamina (serotonina) es un neurotransmisor que se encuentra en una amplia distribución en la naturaleza, que en mamíferos se sintetiza principalmente por las neuronas de los núcleos de rafé del tronco cerebral que se proyectan en todo el sistema nervioso central, con la mayor densidad en los ganglios basales y estructuras límbicas. Ésta presenta una gran diversidad de efectos: actividades humores a movimientos peristálticos del intestino, ciclo circadiano y más efectos dependiendo de los receptores de membrana específicos a los que esté mediados (Zhang, et. al., 2012).

Síntesis

La síntesis de la serotonina ocurre en dos pasos:

1° el L-Triptófano (L-trp) es hidroxilado a L-5 hidroxitriptófano.

2° Después descarboxilado por la enzima triptófano hidroxilasa (TPH) a 5-hidroxitriptamina (Ducy y Karsenty, 2010) (Fig. 4).

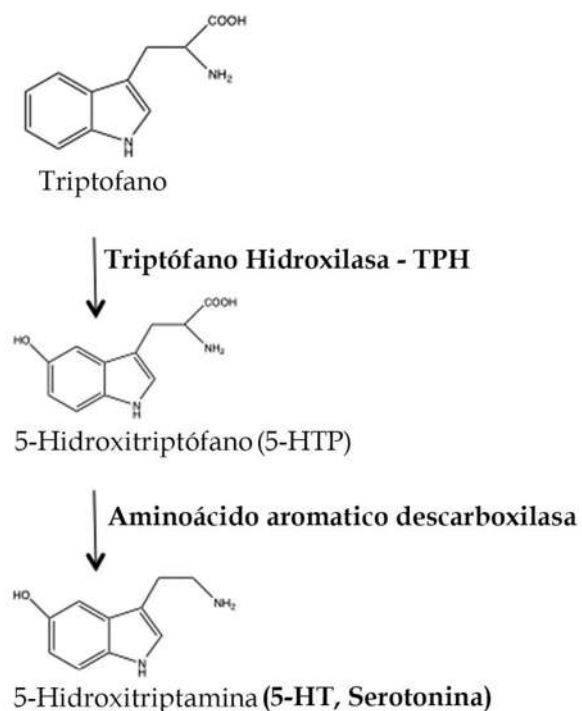


Fig.4 Esquema químico de la síntesis y metabolismo de 5-HT (Modificada de Watts, et. al. 2012).

Las funciones de la 5-HT depende del receptor que active. En la actualidad se conocen 7 familias de 5-HT (Fig. 5).

Farmacológica y funcionalmente hay una mayor comprensión de las familias 5-HT₁, 5-HT₂, 5-HT₃ y 5-HT₄ que de los subtipos 5-HT₅, 5-HT₆, y 5-HT₇. Las familias receptoras de 5-HT son receptores acoplados a proteínas G a excepción de 5-HT₃ que actúa a través de canales iónicos. La familia 5-HT, más relacionado con los receptores 5-HT_{1D} comprende a los receptores 5-HT_{5A} y receptores 5-HT_{5B}. Estudios sobre la localización del RNA mensajero, principalmente en el cerebro humano y de forma limitada en el cerebro de rata han demostrado una amplia distribución central de subtipos, a pesar de ello los receptores 5-HT₅ son probablemente los menos estudiados y existen pocos estudios acerca de la respuesta fisiológica y el sitio de unión de estos receptores (Sari, 2013).

Receptor	Agonistas	Antagonistas	S. transduccional	Función
5-HT1A	8-OH-DPAT, indorrenato	WAY-100 635	(-) AC	Cambios conductuales, hipotensión central
5-HT1B	5-CT $\geq$ 5-HT > sumatriptán	SB-224 289	(-) AC	Vasoconstricción, inhibición trigeminal
r5-HT1B	CP-93 129	GR-127 935, Clonopindolol	(-) AC	Vasoconstricción, auto/heterorreceptor
5-HT1D	PNU-142 633, sumatriptán	GR-127 935, BRL-15 572	(-) AC	Heterorreceptor en la aurícula humana
5-ht1E	5-HT	☒ Metiotepina	(-) AC	-----
5-ht1F	Sumatriptán, LY-344 864	Metisergida	(-) AC	Inhibición trigeminal
5-HT2A	α -Metil-5-HT, DOI	Ketanserina	(+) PLC	Vasoconstricción, agregación de plaquetas
5-HT2B	α -Metil-5-HT, DOI	Rauwolscina	(+) PLC	Constricción en el fondo del estómago de la rata; relajación
5-HT2C	Ro-60-0175	RO-60-0491, Mesulergina	(+) PLC	Regulación del LCF; erección
5-HT3	2-metil-5-HT, 5-MeOT Inactiva	MDL-72 222, Tropicetrón, ICS-205-930	Canales Na ⁺ /K ⁺	Despolarización
5-HT4	5-MeOT, renzaprida	GR-113 808, ☒ Tropicetrón	(+) AC	Taquicardia humana y porcina
5-ht5A/5B	5-HT, ergotamina	LSD, 5-CT, SB-699 551-A	5-ht5A (-) AC	¿Simpatoinhibición cardíaca?
5-HT6	5-MeOT $\geq$ 5-HT > 5-CT	Ro 04-6790, SB-357 134, SB-399 885	(+) AC	Consolidación de la memoria
5-HT7	5-CT > 5-HT $\geq$ 5-MeOT, LY-215 840 Sumatriptán Inactivo	Mesulergina, Clozapina, SB-258 719	(+) AC	Vasorelajación, taquicardia felina

Fig. 5 Características funcionales de los receptores de la 5-HT (imagen tomada de Sánchez, et. al., 2009).

Se ha reportado en la bibliografía que en estados de estrés alimenticio o un régimen de restricción proteico calórica aumenta la concentración de L- Triptófano libre, por lo tanto hay un aumento de serotonina (Antoneli, et. al., 1997).

RESTRICCIÓN PROTEICO CALÓRICA

La restricción proteico calórica (RPC) intrauterina o restricción alimentaria intrauterina se da cuando los requerimientos corporales de proteínas o sustratos de energía, o ambos, no se satisfacen por medio de la alimentación. Este tipo de restricción agrupa un gran espectro de problemas clínicos las cuales dependen de la deficiencia de proteínas y/o calorías, de las etapas donde ocurre, el tiempo que dure y la sinergia con algún otro tipo de afecciones nutricionales o infecciones (Sánchez, et. al., 2013). Sus efectos van desde la pérdida de peso o retraso del crecimiento hasta síndrome clínicos específicos que con frecuencia se relacionan con deficiencias de vitaminas y minerales. Si estos ocurren en el embarazo en las madres da un variado crecimiento fetal, morbilidad y mortalidad, a su vez se ve

afectado el desarrollo inmediato y a largo plazo en los niños (Albarrán, et. al., 2008).

Existen 3 teorías para los cambios producidos por una restricción proteica calórica:

TEORIA DEL DESARROLLO FETAL DE LA ENFERMEDAD

Comúnmente conocida como la hipótesis de Barker, establece que una alteración en el útero sería capaz de producir una programación anormal de diversos sistemas relacionados entre sí que se manifestaría en una etapa adulta y bajo condiciones específicas de crecimiento. Estudios epidemiológicos de Barker muestran que aquellos individuos con un bajo peso al nacimiento tienen un riesgo aumentado de padecer enfermedades cardiovasculares y otras alteraciones asociadas (accidente cerebrovascular, diabetes mellitus tipo 2, hipertensión arterial y síndrome metabólico) en la edad adulta. Estos estudios dieron lugar a plantear la hipótesis del origen fetal o programación fetal (Moreno y Serra, 2001).

HIPÓTESIS DEL FENOTIPO AHORRADOR (“THRIFTY”)

Esta hipótesis sugiere que la restricción fetal puede inducir adaptaciones fisiológicas y/o metabólicas en el feto para asegurar su adecuada alimentación y obtención de nutrientes para los órganos vitales a expensas de órganos menos vitales. Se propone que si un feto en crecimiento es mal nutrido o restringido, adoptará varias estrategias para maximizar sus oportunidades de supervivencia postnatal (Hales y Barker, 2001):

1º Distribuye selectivamente los nutrientes a fin de alterar el crecimiento de los diferentes órganos.

2º Ocurre la programación metabólica conduciendo a cambios metabólicos en la progenie lo que incrementa sus probabilidades dadas las condiciones durante una situación de pobre nutrición postnatal (Sánchez, et. al., 2013).

Estas modificaciones generan alteraciones al estado de salud si el organismo experimenta alteraciones nutricionales durante el desarrollo intrauterino o una buena alimentación postnatal (lactancia) incrementando el riesgo de padecer enfermedades relacionadas con el síndrome metabólico (Albarrán, et. al., 2008).

HIPÓTESIS DEL DESARROLLO ACELERADO

Esta hipótesis enfatiza el papel que juega la nutrición postnatal en la programación fetal adversa y se cuestiona los efectos causales de la desnutrición o restricción fetal por si mismo. Esta parece encontrar además en algunos apoyos modelos animales de crecimiento postnatal acelerado, un daño en la tolerancia a la glucosa y en el tiempo de vida de un animal (Albarrán, et. al., 2008).

Al presentarse esta falta de proteínas se produce una menor cantidad de albúmina, que es la enzima que se conjuga con el L-triptófano. Al haber una menor cantidad de albúmina aumenta la fracción libre de L-triptófano resultando en una mayor cantidad disponible para atravesar la barrera hematoencefálica, al ocurrir esto se producen alteraciones que afectan diferentes funciones, una de ellas es la actividad de la Na^+/K^+ ATPasa a causa de un aumento en la síntesis de serotonina (Peña, et. al., 1999).

LA BOMBA DE SODIO POTASIO ATPasa

Como en todas las demás células de los mamíferos la neurona consiste de citoplasma rodeado por una membrana celular compuesta de una bicapa lipídica con proteínas incrustadas que atraviesan la membrana. Dicha capa la hace

altamente impermeable al líquido extracelular y citoplasmático. Esta impermeabilidad se logra debido a un potencial de membrana que es regulado por la concentración de los cationes y enzimas que permiten la entrada y salida de los mismos, que se encuentran incrustadas en la bicapa lipídica (Sandtner, et. al., 2011). Las enzimas más importantes son las denominadas ATPasas (Abood y Gerard, 1954), se sabe que los cationes que afectan esta permeabilidad son Na^+ , K^+ , Mg^+ y Ca^+ . Estos componentes extra e intracelulares juegan un papel vital en el correcto funcionamiento de toda célula, debido a que el equilibrio que mantienen estos cationes permite mantener la permeabilidad. Una de estas enzimas que es de mucha relevancia para dicho fin es la Na^+/K^+ -ATPasa que se encarga de regular la concentración de Sodio y Potasio extracelular (Skou y Esmann, 1957).

En el espacio intra y extracelular se encuentran estos 2 cationes que son Na^+ y K^+ , al interior de la célula se encuentra el Na^+ debido a que el potencial de membrana es de -70 mV y el potencial del Na^+ es de +64mV, y el K^+ tiende a afluir hacia afuera puesto que su potencial es de -91mV que es más negativo que el potencial transmembrana (Skou y Esmann, 1992). La enzima bombea 3Na^+ y 2K^+ en contra de su gradiente de concentración, esto requiere de energía, derivada de la hidrólisis de un fosfato de ATP (Obradovic, et. al., 2013).

ESTRUCTURA DE LA BOMBA DE SODIO Y POTASIO

La Na^+/K^+ -ATPasa es un hetero oligómero compuesto de 3 sub-unidades, α (alfa), β (beta) y γ (gamma) (Fig. 6 y 7).

La sub-unidad más amplia es la **α (alfa)** (peso molecular 110kDa), contiene sitios de anclaje para Na^+ y K^+ , también posee el sitio de fosforilación movable, donde la terminal fosfato del ATP es atada a la proteína vía un residuo aspartil. La unidad alfa tiene 10 dominios transmembranales y 2 bucles intracelulares orientados de tal forma que las terminales amino y carboxil terminen situadas al interior de la célula.

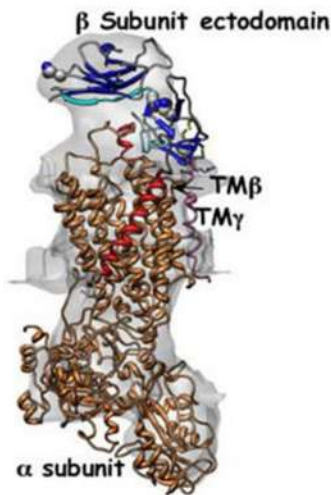


Fig. 6 Mapa de densidad electrónica de la Na^+/K^+ -ATPasa. Propuestas de lóbulos tipo inmunoglobulina del ectodominio subunidad beta encajado en la mapa de densidad electrónica de la Na^+/K^+ -ATPasa junto con la subunidad alfa (imagen tomada de Karlisch, et. al., 2008).

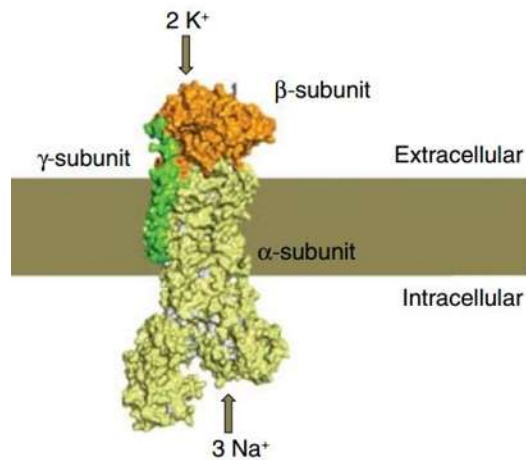


Fig. 7 Diagrama mostrando el arreglo topográfico de las isoformas α (alfa) amarillo, β (beta) naranja y γ (gamma) de verde, dibujada utilizando: PDB2ZXE (imagen tomada de Obradovic, et.al., 2013).

La sub-unidad β es más pequeña y altamente glicosidada (peso molecular 33-35 kDa) tiene la función de estabilizar la sub-unidad alfa. Se piensa que también modula la afinidad de los cationes. Estudios in vitro usando proteínas puras indican que una separación de alfa y beta resulta en una falta de medibilidad de la actividad enzimática. La sub-unidad beta tiene una corta cola citoplásmica, un segmento transmembranal con un largo segmento extracelular glicosilado y actúa como chaperón para el correcto acoplamiento y entrega de la sub-unidad alfa a la membrana, (fig.8).

Existen 3 isoformas de la sub-unidad beta ($\beta 1$, $\beta 2$ y $\beta 3$), la isoforma $\beta 2$ es la más predominante en cerebro y músculo (Obradovic et al., 2013). Aun no se sabe específicamente la función de la isoforma γ (FXYP), se sabe que sirve para estabilizar la isoforma β para un correcto funcionamiento de la Na^+/K^+ -ATPasa.

Los sitios de unión del ATP están localizados en el bucle citoplásmico más largo. La sub-unidad alfa tiene cuatro isoformas ($\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$ y $\alpha 4$), la isoforma 2 es la que más se expresa en el cerebro (Obradovic et. al., 2013)

Dependiendo de la distribución y las isoformas la Na^+/K^+ -ATPasa cumple diferentes roles (Cereijido et. al., 2011) (Fig. 5 y 9)

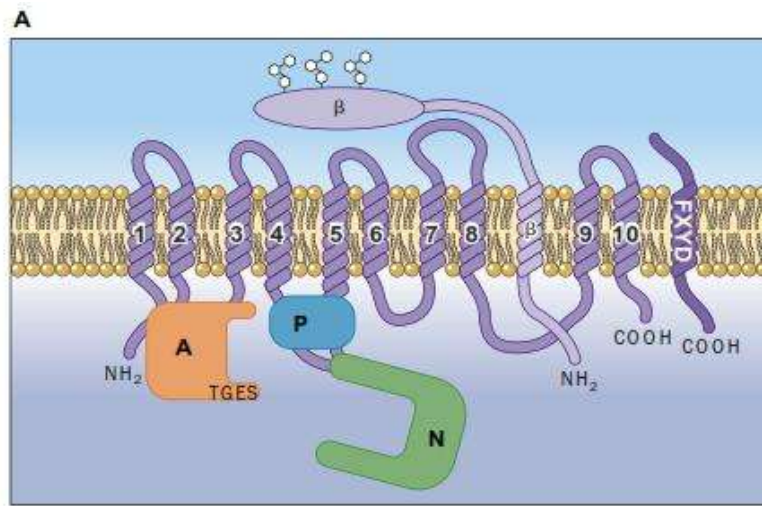


Fig. 8 Estructura de Na^+/K^+ ATPasa representada en una forma sin desplegar de 10 segmentos transmembranales, forma un segmento envoltorio alrededor de 3 segmentos transmembranales 4°, 5° y 6°. Los colores muestran el dominio actor (A; Naranja) el cual está constituido por un segmento terminal NH_2 precedente del 1er segmento transmembranal y de el bucle intracelular entre el 2° y 3° segmento transmembranal que contiene los TGES, motivo por el cual está involucrado en la desfosforilación. El dominio de fosforilación (P; Azul) está conformado por las partes cercanas y lejanas de el bucle grande entre el 4° y 5° segmento transmembranal. En su parte inicial contiene el DKTGT motivo por el cual junto con el residuo aspartil D376, en el cual el fosfato del ATP es transferido (Imagen tomada de Horisberg, 2004).

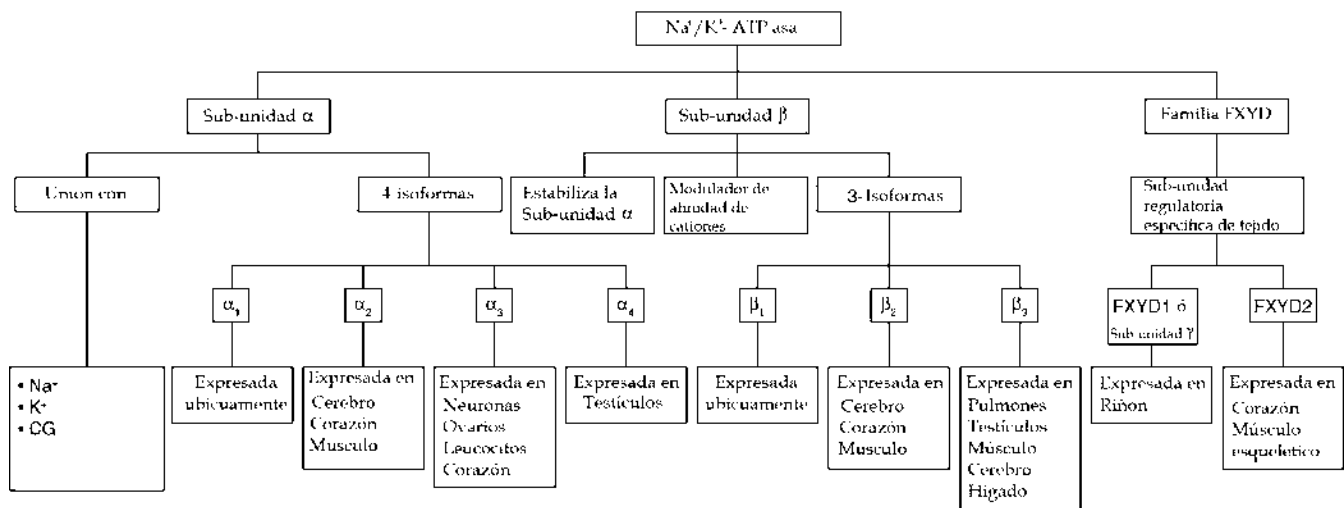


Fig. 9 Distribución y función de las isoformas de Na⁺/K⁺ ATPasa (Modificado de Obradovic et. al., 2013)

MECANISMO DE ACCIÓN

El mecanismo incluye ATP con una baja afinidad acelerando el transporte interno de dos iones K⁺, trayendo esto un cambio conformacional de transición en el cual se ligan tres iones de Na⁺ orientados hacia el sitio citoplasmático. Para mover el sodio se necesita la fosforilación del ATP y poder transportar hacia afuera los tres iones de Na⁺ y al momento de activar la desfosforilación se da la inclusión de los dos iones de K⁺. El Magnesio sirve como factor para el anclaje de la parte fosfato del ATP, ya que sin éste no se podría anclar el residuo aspartil del ATP y para el correcto funcionamiento de la misma es necesario este procedimiento de fosforilación y desfosforilación. El ciclo puede funcionar en ambos sentidos dependiendo del potencial de membrana y de las demás funciones de la célula que pudiesen estar desequilibradas (Dobrestov y Stimers, 2010).

JUSTIFICACIÓN

La desnutrición es un problema que afecta un alto porcentaje de la humanidad derivando en el síndrome metabólico, por esto, es necesario estudiar los problemas que trae a corto y largo plazo, desde un punto de vista nutricional y molecular, por lo que es importante estudiarla con el fin de evitar o disminuir las afecciones que éste produce.

Uno de los sistemas que se ven afectados es el sistema nervioso central, más puntualmente el sistema serotoninérgico, el cual sintetiza a la serotonina que es un neurotransmisor muy importante en el funcionamiento del cerebro. Ésta tiene relación con funciones elementales, como en el comportamiento psico-emocional, en la regulación de la temperatura, en el sueño, en la memoria, en el aprendizaje, en la conducta sexual, en la percepción del dolor, en la regulación de la actividad de la Na^+/K^+ -ATPasa en glía, etc., teniendo esto diferentes repercusiones en cada uno de los componentes del cerebro, incluyendo al cerebelo.

El cerebelo es el encargado de funciones básicas y necesarias para nuestra vida diaria como es el atarse las agujetas, andar en bicicleta, lavarse los dientes, bañarse, aprender a tocar un instrumento, peinarse, etc. Habiendo una relación directa entre la serotonina y el cerebelo, debido a la alta inervación por serotonina en el cerebelo y que ésta modifica la actividad de la Na^+/K^+ -ATPasa en todas las células gliales, incluidas las en el cerebelo.

En la actualidad se ha demostrado que bajo condiciones de nutrición limitada se aumenta la cantidad de serotonina en el cerebro, afectando esto de manera directa a una enzima denominada Na^+/K^+ -ATPasa que es vital para la vida celular de cualquier mamífero, pues, si ésta no funcionara de manera correcta derivaría en irregularidades en la función celular pudiendo resultar en la muerte.

En el presente trabajo tenemos el interés en conocer si las modificaciones observadas entre el sistema serotoninérgico y la bomba de sodio y potasio en

ratas con estrés nutricional se mantienen en la primera generación derivadas de madres con estrés nutricional por lo que nos planteamos lo siguiente:

HIPÓTESIS

El estrés nutricional induce cambios epigenéticos en la relación serotonina-actividad bomba de sodio y potasio en cerebelo de ratas.

OBJETIVO

Determinar si hay un incremento de la Na^+/K^+ -ATPasa en el cerebelo usando ratas bajo un régimen de Restricción Proteico Calórica.

MATERIAL Y MÉTODOS

Material biológico.

Los animales para el presente trabajo fueron ratas de la cepa Wistar, con pesos de 240 ± 20 g, los cuales se mantuvieron en el bioterio del laboratorio de Neurobiología de la Facultad de Químico Farmacobiología de la U.M.S.N.H., siguiendo protocolos vigentes para el uso de animales de investigación, con alimento y agua ad-libitum, ciclos de luz y oscuridad de 12Hrs. (7-9H), temperatura de 20.0 ± 5 °C y humedad relativa de $60.0 \pm 5\%$.

RESTRICCIÓN PROTEICA CALÓRICA

Se seleccionaron 8 ratas hembras de la cepa Wistar, fueron adaptadas durante 2 semanas a las siguientes condiciones ambientales: temperatura 20 ± 5 °C, periodos de luz y oscuridad de 12Hrs., humedad relativa del 60%. Durante este periodo de adaptación los animales control recibieron una dieta a base de alimento marca

purina Chow para ratas y agua ad-libitum. El grupo con restricción proteico calórica recibió el 50% del alimento consumido por los animales control.

Manteniendo este régimen nutricional por 2 semanas, ambos grupos fueron puestos a cruce con machos alimentados ad-libitum. Durante el periodo de gestación los animales fueron mantenidos bajo las condiciones previamente descritas, un grupo en restricción y el otro alimentado ad-libitum.

Al nacimiento las camadas del grupo RPC se dividieron en 5 grupos: Un grupo continuo bajo un régimen alimenticio del 50% por lo que su restricción alimenticia fue continua denominándolo **Desnutrido continuo (DC)**, un segundo fue recuperado nutricionalmente inmediatamente después del nacimiento, al cual se le denominó **Recuperado al nacimiento (RN)**, un tercer grupo **Recuperado al destete (RD)**, un cuarto grupo se le aplicó un régimen alimenticio del 50% al día de el nacimiento, denominado **Desnutrido al nacimiento (DN)** y a otro se le aplicó el mismo régimen alimenticio al destete y se le denominó **Desnutrido al destete (DD)**.

OBTENCIÓN DE TEJIDOS

Los animales fueron sacrificados entre las 09:00 y 12:00 Hrs. por fractura cervical, se realizó una incisión media torácica exponiendo el corazón para la perfusión del cerebro in situ con 20 ml de solución salina isotónica fría que se inyectó en el ventrículo izquierdo, inmediatamente fueron decapitados para posteriormente realizar 2 incisiones en los extremos del hueso occipital hasta llegar al hueso frontal y tener expuesto el encéfalo se extrajo el cerebelo y se homogenizó a 10 volúmenes de Tris-HCL 50mM pH 7.4, MgCl₂ 6mM, KCl 20nM, NaCl 120mM (trizma) para ser congelado y posteriormente determinar la actividad enzimática de la Na⁺/K⁺-ATPasa.

DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LA BOMBA DE SODIO POTASIO

Para la determinación de la actividad de la Na^+/K^+ -ATPasa se realizó una curva por el método modificado de Lowry, posteriormente el tejido homogenizado con trizma se encubó a 150 CPM a 37 °C por 10 minutos en un incubador metabólico Dubnoff, cada tejido se dividió en 2 grupos, uno sin antagonista y otro utilizando utilizando ouabaina bovina como antagonista. Se adicionaron 50µl de solución de ATP 12 mM, pasados los 10 min. Se adicionó una solución de ácido tricloroacético al 50% y se pusieron en baño de hielo por 10 min; transcurrido este tiempo se centrifugó a 3500 rpm por 10 min. Al termino de este periodo se tomaron 100 µl del sobrenadante y se recibieron en otro tubo con 400µl de H_2O al cual se le agregó 500µl de una disolución de Molibdato acidificado con sulfato ferroso (FeSO_4) para su posterior lectura en espectrofómetro a 800 nm a los 10 minutos iniciada la reacción.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se calculó la media y desviación estándar de los datos obtenidos y se utilizó el método “t” de student para calcular y graficar resultados. Se consideró diferencia estadísticamente significativa a partir de un valor de $P < 0.05$ y se utilizó el programa Graph Prism V. 3.0.

RESULTADOS

Peso corporal y consumo de alimento de las madres

Con la finalidad de evaluar el modelo de restricción proteico calórica in útero, se tomó medida a partir del peso inicial y cada semana (Fig.10). Pudimos observar que las madres que se mantuvieron con RPC (DC) las semanas 1 y 2 obtuvieron un peso corporal homogéneo y de la semana 3 a la 8 se notó una diferencia importante en los pesos, sobresaliendo las semanas 4 y 5 donde se observó un decremento significativo. Mientras que las recuperadas al nacimiento tuvieron un pequeño cambio significativo con respecto al control, representando esto una pequeña disminución del peso corporal en comparación con el control. A su vez se registró la cantidad de alimento consumido por las mismas (Fig.11), observando así que el grupo que se encontraba bajo DC se le suministró la mitad del alimento consumido por el grupo control, y el grupo recuperado presentó un aumento del consumo en la sexta semana, teniendo una ingesta poco mayor con respecto al control.

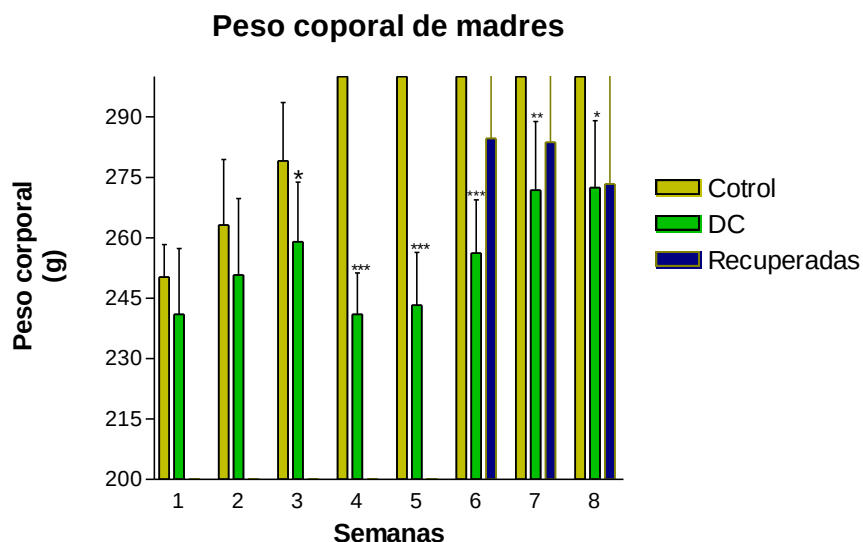


Fig.10 Peso corporal de las madres: Peso corporal de las madres control, restricción proteico calórica y recuperadas a través de la adaptación, gestación y lactancia. Los valores de la gráfica corresponden a tres experimentos independientes por triplicado * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$ indican cambios significativos con respecto al grupo control.

Consumo de alimento madres

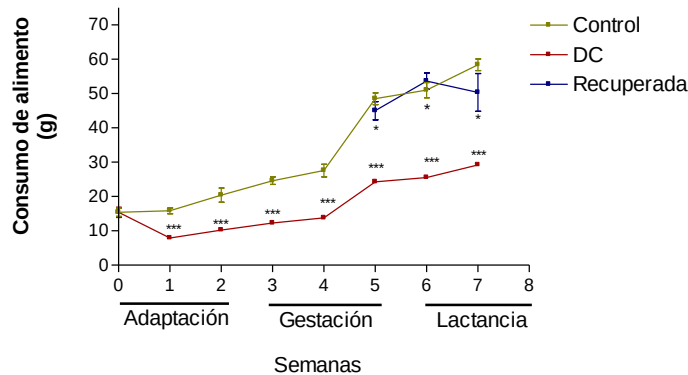


Fig.11 Consumo de alimento de las madres: Ingesta del alimento de las madres control, restricción proteico calórica y recuperadas a través de la adaptación, gestación y lactancia. Los valores de la gráfica corresponden a tres experimentos independientes por triplicado * $p \leq 0.05$, *** $p \leq 0.001$ indican cambios significativos con respecto al grupo control.

Consumo de alimento en las crías: Desde el nacimiento de las crías y a lo largo de 60 días se midió la cantidad de alimento consumido (Fig.12), el grupo DC se mantuvo con el 50% de alimento del consumido por el control, mientras que pudimos observar un menor consumo de alimento por los grupos RN y RD con cambios significativos con respecto al control, y teniendo el RN un consumo mayor con respecto al RD.

Consumo de alimento crías

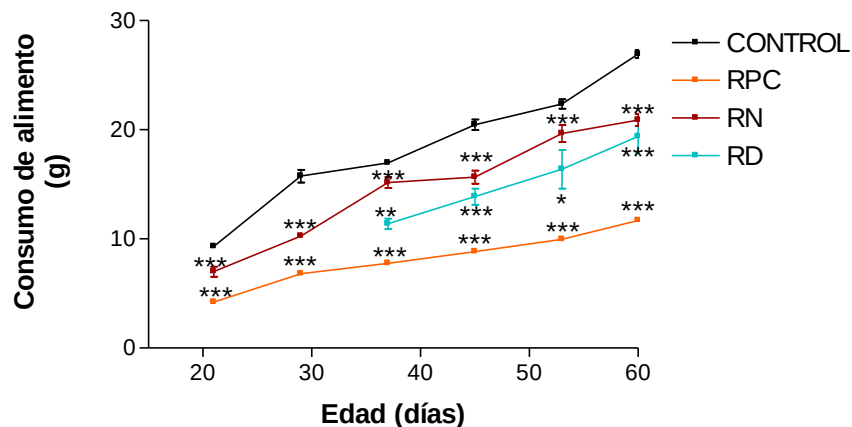


Fig.12 Consumo de alimento de las crías: Ingesta de alimentos de crías de los grupos CONTROL, RPC, R.N. y R.D. en 60 días. Los valores de la gráfica corresponden a tres experimentos independientes por triplicado. Las gráficas indican * $p \leq 0.05$, *** $p \leq 0.001$ cambios significativos con respecto al grupo control.

Peso corporal de las crías en esquema RPC durante 60 días a partir del nacimiento

Con la finalidad de hacer un análisis de los grupos se hizo una comparativa de los mismos y la manera en que afectó el esquema (Fig.13). Pudimos observar que los grupos DC y DN presentaron un bajo peso corporal con respecto al control a lo largo de los 60 días. A los 14 días se incorporó el grupo RN el cual mostró una menor disminución que los grupos DC y DN, se fue recuperando durante los días 21 y 30, pero aun así fue menor que el del control pues en el día 60 no pudo alcanzar el mismo peso corporal quedando considerablemente por debajo del control excepto el día 14, este día el peso fue el mismo que el control. En el día 21 se incorporaron 2 grupos más: RD y DD, en el día 21 el grupo RD mostró un peso significativamente menor que el control, mientras que el grupo DD la disminución comparativa con el control fue menor casi el mismo que el RN, estos 2 grupos (RD y DD) en el día 30 se equipararon y en el día 60 el grupo RD superó en peso al grupo DD, pero aun sí se mantuvieron ambos con disminuciones significativas con respecto al control y el día 21 DD es mayor que RD.

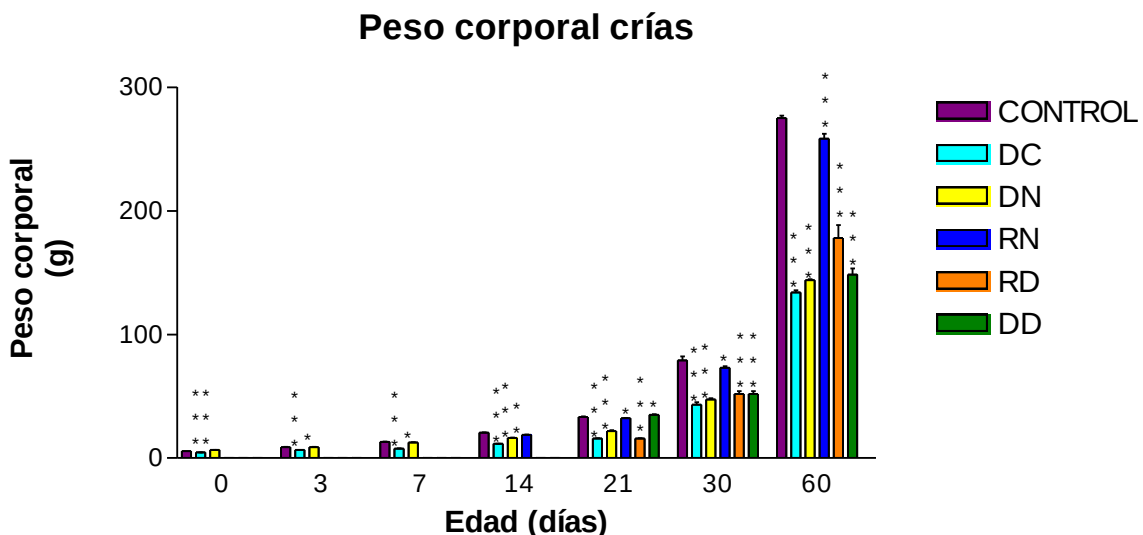


Fig.13 Peso corporal de las crías: Desarrollo de los pesos corporales de crías al lapso de 60 días bajo un esquema de RPC, con los grupos CONTROL, DC, DN, RN, RD y DD. Los valores de la gráfica corresponden a tres experimentos independientes por triplicado. Las gráficas indican $*p \leq 0.05$, $*** p \leq 0.001$ cambios significativos con respecto al grupo control.

Longitud céfalo-sacra de las crías en esquema RPC durante 60 días a partir del nacimiento

Continuando con el estudio comparativo, se prosiguió con la medición de las tallas (Fig.14). Iniciamos la comparación, DN aumentó con respecto al control los días 0 al 7, del día 14 al 60 se observó un decremento con respecto al control, aun así DN se mantuvo un poco mayor que el DC pero de los días 30 al 60 se equipararon en longitud entre ellos mismos. El día 14 se incorporó el grupo RN que en el día 21 superó al control y posteriormente se desarrolló en menor proporción y el control lo igualó en longitud, el día 21 se incorporaron 2 grupos mas, RD y DD, teniendo ambos un desarrollo menor en comparación con el control hasta los 60 días.

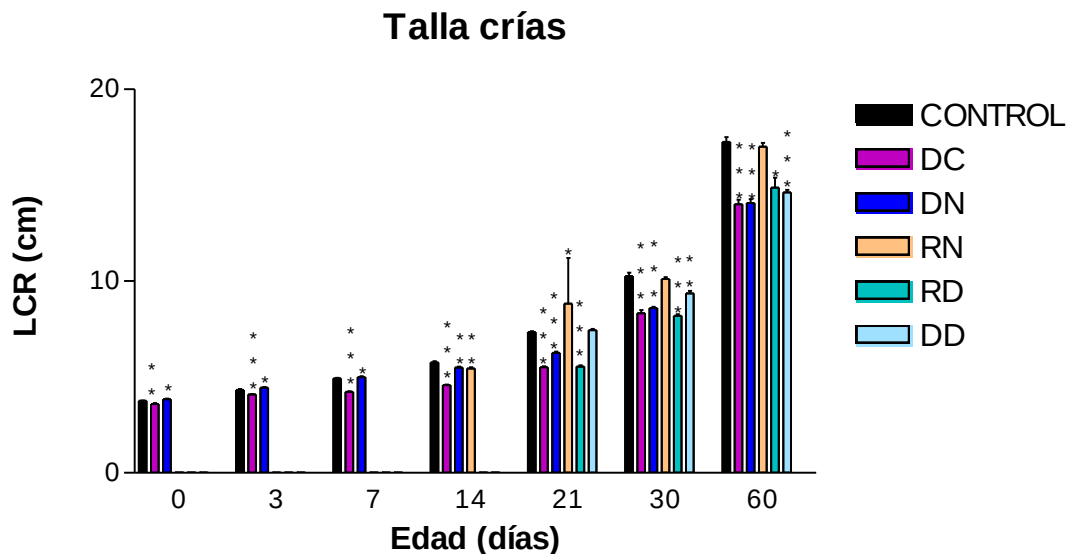


Fig.14 Longitud céfalo-sacra de las crías: Longitud céfalo-sacra de las crías bajo RPC en un lapso de 60 días, incluyendo los grupos CNOTROL, DC, DN, RN, RD y DD Los valores de la gráfica corresponden a tres experimentos independientes por triplicado * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$ indican cambios significativos con respecto al grupo control.

Actividad de la Bomba de Sodio y Potasio

Finalmente a los 60 días se midió la actividad enzimática (AE) de la bomba de Na^+/K^+ en cerebelo, con lo cual pudimos apreciar de qué manera se ve afectada la actividad de esta enzima en el cerebelo, teniendo como resultados que el grupo con mayor A.E. fue el DN, una actividad mucho mayor que el control, seguido de del grupo DC, DD, RD y RN en ese orden, todos los grupos tuvieron una actividad mayor que el control.

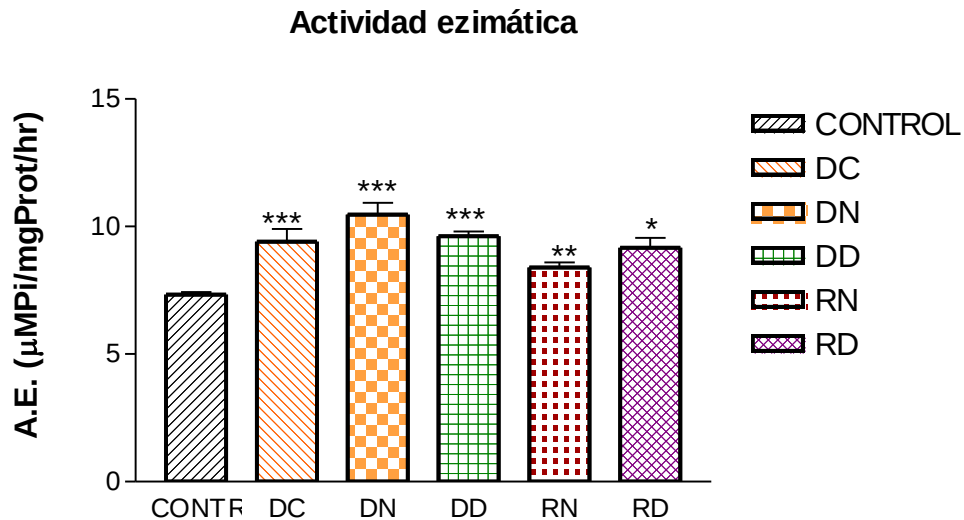


Fig.15 Actividad enzimática de la Na^+/K^+ -ATPasa en cerebelo: Actividad de la Na^+/K^+ -ATPasa en cerebelo bajo esquema de RPC en un lapso de 60 días incluyendo los grupos CONTROL, DC, DN, RN, RD y DD. Los valores de la gráfica corresponden a tres experimentos independientes por triplicado. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$ indican cambios significativos con respecto al grupo control.

DISCUSIÓN

Se ha mostrado en estudios que la nutrición de la madre puede afectar el desarrollo intrauterino y a lo largo de la vida de las crías, teniendo la variable nutricional un efecto contundente en el peso y la talla de la progenie, ya que el feto

o recién nacido dispone sólo de la alimentación directa de la madre y a partir de esta crea sus reservas nutricionales, lo que lo condiciona a una reprogramación metabólica y cambios en el desarrollo fetal (Sánchez et al., 2013). Estos cambios son causados por programación genética y epigenética intrauterinas, proceso explicado más certeramente por la hipótesis del fenotipo ahorrador, en donde se plantea el hecho de que al haber una limitada alimentación en las etapas embrionaria y fetal se producen cambios en la programación genética, en el cual se da prioridad energética a la formación de los órganos vitales, dejando en segundo plano los órganos secundarios. Aunado a esto, una programación para desarrollar un mayor almacenaje de lípidos por su valor energético y genes que retrasan la utilización de algunos nutrientes (Rojas et al., 2009 y Sánchez et al., 2013).

El resultado de esta inadecuada nutrición se puede apreciar como disminución de la talla corporal y tamaño de órganos internos, y consecuentemente una función anormal de los órganos afectados, ya sea produciendo en menor cantidad algunas enzimas, causando cambios en su actividad, o no sintetizándolas (Sánchez, et al., 2013). Una proteína que se ve afectada y fue de nuestro particular interés para el procedimiento de este experimento fue la albúmina, puesto que la disminución en la producción de esta representa un aumento de la fracción libre de L-triptófano, ya que dentro de sus funciones está la de transportar este aminoácido hasta la barrera hematoencefálica para posteriormente ser utilizado en la síntesis de 5-HT (Nicholson et al., 2000).

Una vez que los cambios en la programación genética han ocurrido, la próxima etapa postnatal representa una continuidad de las alteraciones en la programación genética previamente efectuadas en el vientre materno, esto debido a que la fuente única de alimentación de la cría continúa siendo la provista por la madre durante la lactancia, por consecuente, la alimentación materna significa una posible reprogramación o una constante en las programaciones intrauterinas (Valiente, et al., 1999). Efectos directos de la lactancia cuando la madre modifica su alimentación, como puede ser el cambio de un estado de mala nutrición a una

nutrición adecuada o viceversa, se pueden apreciar en el peso y talla de las crías, como se observa en la figura 13 y 14. Las crías que intrauterinamente estaban en un estado de restricción de nutrientes y al ser la madre recuperada en su alimentación durante la lactancia mostraron una ganancia de talla y peso corporal con respecto al grupo que mantuvo la restricción nutricional durante la lactancia que muestra el menor peso y talla de los grupos experimentales, sin embargo, estas crías recuperadas nutricionalmente no alcanzaron las características del grupo control en ambos parámetros. Cuando a las madres con nutrición adecuada se les restringió nutricionalmente durante la lactancia, sus crías mostraron una disminución considerable de la talla y peso de las crías comparadas con el grupo control. Estos resultados apoyan la hipótesis del fenotipo ahorrador y nos permiten apreciar que está ocurriendo una programación epigenética que muestra sinergismo con la alimentación post-natal para garantizar una mayor supervivencia de las crías al adaptarse a la disposición energética del medio (Rojas, et. al., 2009).

Se ha observado que cuando a un animal se le restringe nutricionalmente durante su desarrollo intrauterino, hay un incremento en los niveles de serotonina cerebral (Hernández, 1987), este hecho da lugar al desarrollo de diversas alteraciones entre las que se ha observado cambios en la actividad de una enzima que participa en el transporte iónico de la membrana celular, la Na^+/K^+ -ATPasa, la cual incrementa su actividad a nivel del sistema nervioso central por encontrarse aumentada la concentración de serotonina cerebral (Peña, et. al., 1999), investigaciones al respecto señalan que este fenómeno solo ocurre cuando el animal desnutrido durante su desarrollo fetal alcanza la edad adulta.

La actividad de la Na^+/K^+ -ATPasa es importante ya que ayuda a mantener el potencial de membrana celular y con ello favorecer la adecuada función de diversas estructuras cerebrales, por ejemplo del cerebelo, el cual participa en las funciones motoras, en la precisión y coordinación de las mismas. En estudios previos realizados por nuestro grupo de trabajo se ha reportado que el tipo celular donde la 5-HT regula la actividad de la Na^+/K^+ -ATPasa es en células gliales, las

cuales ayudan a dar una estructura al cerebro, de soporte metabólico y trófico para las neuronas, pudiéndose destacar que en el cerebelo participan activamente en la formación de la estructura laminar, migración de células en el desarrollo cerebelar (Xu et al., 2013).

Resultados de este estudio muestran que parte de los cambios que se observan en la actividad de la Na^+/K^+ -ATPasa en cerebro cuando existe una limitante nutricional, ocurren de igual manera a nivel del cerebelo, donde pudimos apreciar, que todos los grupos obtuvieron valores mayores de actividad que el grupo control podemos observar en la figura 15, que el grupo que destaco con una actividad mayor que el resto fue el DN como, con lo cual podemos corroborar que un punto clave en la programación y desarrollo es la lactancia, pues al disminuir la constatale alimenticia en esta etapa, observamos la mayor producción de serotonina de los 3 grupos con restricción, mientras que los 2 grupos con recuperación alimenticia el que mantuvo un cambio no tan significativo o más cercano al control fue el grupo RN.

CONCLUSIÓN

En la primera generación de ratas con RPC se mantiene la interacción serotonina-bomba de sodio y potasio, lo que puede representar un mecanismo compensatorio ante el reto nutricional del organismo y a una mayor regulación de la enzima por parte serotonina.

BIBLIOGRAFIA

Abood, L. G. y Gerard R. W. (1954) Cellular Compendium. J. Physiology. Vol. 43 Pag. 379.

Albarrán-Bravo S., Acosta-Chávez J., Guzmán Quevedo O., Hernández-Rebollar M., Mercado-Camargo R., (2008) Implementación de un modelo de restricción proteico-calórico en ratas para el estudio del síndrome metabólico. *Biológicas* N° 10, 79-86.

Antoneli C., Costa L.M., Mercado C.R. y Hernández, R. J.(1997) Serotonine modulation of low-affinity ouabain binding in rat brain determinated by quantitative autoradiography. *Neurochemichal Research*, 689: 160-168.

Aguilar-Morales, J.E. (2011) La neurona y las células de soporte del sistema nervioso. México: Asociación Oaxaqueña de Psicología A.C.

Beaton, A. y Marriën P. (2010) Lenguaje cognition and the cerebellum grappling with an enigma cortex., Ed. Elseveier, Vol. 46, pags. 811-820.

Brodal, P. (1992) The Central Nervous System: structure and function. New York, Oxford University Press, pag. 80-85.

Caruso, C., Carniglia, L., Durand, D., Scimonelli, T. y Lasaga, M., (2013) Astrocytes: new targets of melanocortin 4 receptor, *Journal of molecular endocrinology*. Vol. 51, 33-50

Cerejido, M., Contreras, R.G., Shoshani, L. y Lare, I. (2011) The Na⁺/K⁺ -ATPase as a self –adhesion molecule and hormone receptor. *Am J Physiol Cell Physiol*, Vol. 302, pags. 473-481.

Chizhiko, V. y Millen, J.K. (2003) Development an malformation of the cerebellum on mice, *J. Molecular genetics and metabolism*, Vol.80: 54-65.

Corty, M.M. y Freeman M.R. (2013) Architecs in neural circuit design: Glia control neurons numbers and connectivity . *J. of cell biology*, Vol. 203, N°3, 395-405.

Coulpier, F., Decker, L., Funalot, B., Vallat, J. M., García, B.F., Charnay, P., Topilko, P. (2010) CNS/PNS Boundary transgression by central glia in the absence of Schwann cells or Krox20/Egr2 function. *Journal of Neuroscience*, 30 (17): 5958-5967.

D'Angelo, E., Mazzarello, P., Prestori, F., Mapelli, J., Solinas, S., Cesana, E., Gandolfi, D., Congi, L., Lombardo, P. (2010) the cerebellar network: from structure to function and dynamics,. *Brain research Reviews*, 66: 5-15.

Diedrichsen, J., Maderwald, S., Küper, M., Thürling, M., Rabe, K., Gizewski E.R., Ladd, M.E. y Timmann, D. (2010) Imaging the deep cerebellar nuclei: A probabilistic atlas and normalization procedure. *Neuroimage* . Vol. 54(3), pags. 1786-1794.

Dobrestov, M. y Stimers R.J., (2010) Muscle spindle afferents and mystery of the α_3 isoform of Na^+/K^+ ATPase. *The Journal of Physiology*, 588: 21, 4061

Ducy P. y Karsenty G., (2010) The two faces of serotonin in bone biology. *Journal cell biology*. Vol. 19, N°1, pags. 7-13.

Freitas, R., Casado, A. J., Buarque, L. C., Portela, A., Clemente, A. y De Sousa, C. F.. (2010) Cerebellar vermis: Topography variations, *J. Morphol*, 282 (2): 439-443.

García, R., Hernández, E., Concha, A., Pérez, C. A., García L. I., Hernández, M. E. y Manzo, J. (2009) El cerebelo y sus funciones. *Rev. Med. UV*, 24-60

Hales, C. N. y Barker, D. J. (2001) The thrifty phenotype hypothesis. *J. Br. Med. Bull.* 60: 5-20.

Hernández, R.J. (1987) Brain Na^+/K^+ ATPase activity possibly regulates by a specific serotonin receptor. *Brain Res.* 408: 399-402.

Hibi, M. y Shimizu, T. (2011) Development of the cerebellum and cerebelar neural circuits, publicado en línea el 19 de enero 2011 en Wiley online library (wileyonlinelibrary.com).DOI 10.1002/dneu.20875.

Horisberg, J.D., (2004) Recent insights into the structure and mechanism of the sodium pump. *J. Physiology* Vol. 9, pags. 377-387.

Ito, M. (2001) Cerebellar long-term depression: Characterization signal transduction, and functional roles, *Physiological Revs.* 81 (3):1143-1195.

Karlish, S.J.D. , Tal, D., Kapri-Paredes, K., Belogus, T., Haviv, H., Dinitz, E., (2008) The sodium-potassium pump: structure, function, regulation and pharmacology. *Life Science open day*. Vol. pags??

Moreno, J. M., y Serra, D. (2001) Alteraciones en la nutrición fetal y efectos a largo plazo: ¿Algo más que una hipótesis? . *Acta Pediátrica Española* 59: 573-581.

Nicholson, J.P., Wolmarans M.R. y Park G.R. (2000) The role of albumin in critical illness. *J Physiol.* 589 (21): 5019-5020.

Obradovic, M., Bjelogrić, P., Rizzo, M., Katslki, N., Haldara, M., Stewart J.A., Jovanovic, A. y Isenovic, E.R., (2013) Effects of obesity and estradiol on Na⁺/K⁺ -ATPase and their relevance to cardiovascular diseases. *Journal of Endocrinology*, 218(3): 13-23.

Ohara, T.P., Vit, J.P., Bhargava, A., Romero, M., Sundberg, C., Charles, A.C. y Jasmine, L. (2010) Gliopathic pain: when satellite Glia Cells go bad. *J. Neuroscientist*, 15(5): 450-463.

Oostland, M. y Van Hooft, J.A. (2013) The role of serotonin in cerebellar development. *Neuroscience*, 248: 201-212.

Parek, R. y Ascoli G.A. (2013) Neural morphology goes digital: A Research Hub For Cellular and System Neuroscience. *J. Neurosci.* 77 (6): 1017-1038.

Peña-Rangel, M.T., Mercado-Camargo, R. y Hernández-Rodríguez, J., (1999), Regulation glial of Na⁺/K⁺ ATPase by serotonin: identification of participating receptors, *Neurochemical Res.* 24 (3): 643-649.

Pytliak, M., Varagova, V., Mechirova, V. y Felsoci M. (2011) Serotonine receptors—from molecular Biology to clinical applications. *Physiological Res.* 60: 15-25.

Rojas, D., Salazar, L., Romo, J. y Mercado, R., (2009) efecto de la restricción calórico-proteica sobre la adipogénesis, *Biológicas*, 11: 22-28.

Sánchez, F.J., Gesterio, E., Espárrago, M., Rodríguez, B. y Bastida, S. (2013) La alimentación de la madre durante el embarazo condiciona el desarrollo pancreático, el status hormonal del feto la concentración de biomarcadores al nacimiento de diabetes mellitus y síndrome metabólico. *Nutr. Hosp.* 28 (2): 250-274.

Sánchez, L.A., Centurión, D., Lozano, C.J., Muñoz, I.E., Cobos, P.L.E. y Villalón M.C. (2009) Receptores de la serotonina que inhiben el tono simpático vasopresor en la rata descerebrada y desmedulada. *Arch. Cardiol.* 79(2): 83-94.

Sandtner, W., Egwolf, B., Khalili-Araghi, F., Sánchez-Rodríguez, B.R., Benzanilla F. y Holmgren, M. (2011) Ouabain binding site in a functioning Na^+/K^+ ATPase. *Journal of Biological Chemistry*, 286 (44): 38177-38183

Sánchez, M.F.J., Gesteiro, E., Esparrago, R. M., Rodríguez, B.B. y Bastida, S., (2013) La alimentación de la madre durante el embarazo condiciona el desarrollo pancreático, el estatus hormonal del feto y la concentración de biomarcadores al nacimiento de diabetes mellitus y síndrome metabólico, *Nutr. Hosp.* 28(2): 250-274.

Sari, Y. (2013) Role of 5-hydroxytryptamine 1B(5-HT1B) receptors in the regulation of ethanol intake in rodents. *Journal of Psychopharmacology*, 27(1): 3-12.

Scimemi, A. y Beato M., (2009) Determining the Neurotransmitter Concentration Profile at Active Synapses. *Mol Neurobiol.* 40: 289-306.

Sheridan, G.K y Murphy, K.J. (2013) Neuron– glia crosstalk in health and disease: fractalkine and CX3 CR1 take centre stage. *Open Biol.* 3: 130181.
<http://dx.doi.org/10.1098/rsob.130181>

Skou, J.C. y Esmann, M. (1992) The Na,K-ATPase . *J. Bioenerg. Biomembr.* 24: 249-256.

Sotelo, C. (2004) Cellular and genetic regulation of the development of the cerebellar system. *Progress in neurobiology.* 72: 295-339

Tirapu, U. J., Luna, L.P., Iglesias, F.M.A. y Hernández, G.P. (2011) Contribución del Cerebelo a los procesos cognitivos: avances actuales. *Rev. Neurol.* 53 (301): 1-15.

Torre, U.L. y Bonni A. (2011) Transcriptional regulation of neuronal polarity and morphogenesis in the mammalian brain. *J. Neuron*, 72(1): 22-40.

Uusissari, M. y Schutter E.D. (2011) The mysterious microcircuitry of the cerebellar nuclei. *J Physiol.* 589 (14): 3441-3457.

Valiente, D., Alfonso, C., Bernardo, M. G., Molina J.R. y González V. T. (1999) Crecimiento y composición corporal de las crías sometidas a restricción alimentaria. *Rev Cubana Invest Biomed.* Vol. 18(2), pags. 1-7

Verkhratsky, A. y Butt A. (2007) *Glial neurobiology a text book*, Editorial Jhon Wiley & sons, LTD, England,. Pags. 13-28,125 ISBN 978-0-470-01564-3

Watts, W.S., Morrison, F.S., Davis, P.R. y Barman M.S. (2012) Serotonin and blood pressure Regulation. *Pharmacological Reviews.* Vol. 64, N°2, pags. 359-388.

Xu, H., Yang, Y., Tang, X., Zhao, M., Liang, F., Xu, P., Hou, B., Xing, Y., Bao, X. y Fan, X. (2013) Bergman glía function in granule cell migration during cerebellum development. *J. Mol Neurobiol.*

Zhang, N.L., Su, W.S., Guo, F., Guo, C.H., Shi, L.H., Li, Y.W., Lui, X. y Wang, L.Y. (2012). *J. BMC Neuroscience*, Vol. 13(10), pags. 1-7.