



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO

**FACULTAD DE QUÍMICO FARMACOBIOLOGÍA
PROGRAMA INSTITUCIONAL DE MAESTRÍA INSTITUCIONAL EN
CIENCIAS BIOLÓGICAS**

BIOTECNOLOGÍA ALIMENTARIA

**“REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LAS ISOFORMAS α DE
LA BOMBA DE SODIO Y POTASIO POR SEROTONINA EN
CORTEZA CEREBRAL DE RATAS CON ESTRÉS NUTRICIONAL”**

TESIS QUE PRESENTA:

Q.F.B. CLAUDIA SUSANA BAUTISTA GARCÍA

PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

DIRECTOR DE TESIS:

D.C. ROSALÍO MERCADO CAMARGO

Tesis parcialmente apoyada por CIC-UMSNH-26.2 (2012), CONACYT – BCVU 239234

MORELIA, MICHOACÁN, ABRIL DEL 2012



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

**Tesis parcialmente apoyada por CIC-UMSNH-26.2 (2012),
CONACYT – BCVU 239234**

DEDICATORIA

A mis amados padres Beatriz García y Francisco Bautista por su confianza y apoyo incondicional.

AGRADECIMIENTOS

Al D.C. Rosalío Mercado Camargo quien sembró en mí el deseo de hacer investigación agradezco infinitamente su apoyo y confianza para realizar este trabajo.

Gracias a mis sinodales D.C. Alejandra Ochoa, D.C. Consuelo Cortes, D.C. Daniel Godínez, D.C. Joel López y D.C. Héctor Martínez por su tiempo y sus valiosas observaciones.

A todos mis compañeros de laboratorio que son más que mis amigos, gracias por su ayuda y amistad, por ustedes viví una de las etapas más bonitas de mi vida... Beto Esquivel, Gustavo Nava, Gabriela Flores, Angélica Salgado, Blanca Juárez, Jaime Acosta, Omar Sifuentes, y Mayra Martínez.

I. ÍNDICE

	Página
DEDICATORIA.....	II
AGRADECIMIENTOS.....	III
I. ÍNDICE.....	1
I.1. Índice de figuras.....	3
I.2. Índice de tablas.....	5
II. LISTA DE ABREVIATURAS.....	6
III. RESUMEN.....	8
IV. ABSTRACT.....	9
V. INTRODUCCIÓN.....	10
V.1. Sistema nervioso.....	10
V.1.1. Tipos de neuronas.....	11
V.1.2. Células gliales.....	13
V.1.3. Corteza cerebral.....	15
V.2. Sistema serotoninérgico cerebral.....	16
V.4. Restricción Protéico Calórica.....	20
V.5. Bomba de Sodio y Potasio.....	22
VI. JUSTIFICACIÓN.....	28
VII. HIPÓTESIS.....	29
VIII. OBJETIVOS.....	30
VIII.1. Objetivo general.....	30
VIII.2. Objetivos específicos.....	30
IX. MATERIAL Y MÉTODOS.....	31
IX.1. Animales.....	31

IX.2. Estimulación de la síntesis de serotonina	31
IX.2.1. Administración de L-Trp.....	31
IX.2.2. Restricción proteico-calórica (RPC).....	32
IX.3. Preparación de los homogeneizados de corteza cerebral	32
IX.4. Determinación de la actividad específica de la bomba de sodio y potasio.....	33
IX.5. Obtención de ARN Total	34
IX.6. Retrotranscripción	34
IX.7. PCR	35
IX.8. Análisis estadístico	36
X. RESULTADOS.....	37
X.1. Peso corporal y consumo de alimento de las madres.....	37
X.2. Consumo de alimento de las crías.....	38
X.3. Peso y Longitud céfalo-sacra de las crías en un esquema de RPC desde el nacimiento hasta los 60 días de edad	39
X.4. Expresión de las isoformas α de la bomba de sodio y potasio en corteza cerebral de ratas	41
X.5. Actividad de la Bomba de Sodio y Potasio.....	47
XI. DISCUSIÓN	50
XII. CONCLUSIÓN	54
XIII. BIBLIOGRAFÍA	55

I.1. Índice de figuras

Figura 1. Representación esquemática de una neurona.....	11
Figura 2. Tipos de neuronas de acuerdo a su número de neuritas.	11
Figura 3. Tipos de neuronas de acuerdo a su arborización terminal.....	12
Figura 4. Tipos de células gliales.	14
Figura 5. Citoarquitectura de la corteza cerebral.....	15
Figura 6. Áreas funcionales de la corteza cerebral.	16
Figura 7. Catabolismo del L-Trp.....	17
Figura 8. Síntesis de Serotonina.....	18
Figura 9. Representación esquemática de la Bomba de Sodio y Potasio.....	24
Figura 10. Sitios de unión de los substratos de la Bomba de sodio y potasio.....	25
Figura 11. Alineamiento de aminoácido de las 3 isoformas α de la bomba de sodio y potasio en humano.....	27
Figura 13. Consumo de alimento de las ratas madre.....	37
Figura 14. Peso corporal de las ratas madres.....	38
Figura 15. Consumo de alimento de las crías.....	39
Figura 16. Peso corporal de las crías.....	40
Figura 17. Longitud céfalo-sacra de las crías.....	41
Figura 18. Productos de amplificación para las 3 isoformas α de la bomba de sodio y potasio en corteza cerebral de ratas control, L-Trp y RPC a 55°C por 30 ciclos.....	42
Figura 19. Productos de amplificación del gen de la β -actina en corteza cerebral de ratas de los diferentes grupos experimentales.....	43
Figura 20. Expresión de la β -actina en corteza cerebral de ratas de los 5 grupos experimentales.....	43
Figura 21. Productos de amplificación del gen de la isoforma $\alpha 1$ de la bomba de sodio y potasio en corteza cerebral de ratas.....	44
Figura 22. Expresión relativa de la isoforma $\alpha 1$ en corteza cerebral de ratas.....	44

Figura 23. Productos de amplificación del gen de la isoforma $\alpha 2$ de la bomba de sodio y potasio en corteza cerebral de ratas.. 45

Figura 24. Productos de amplificación de la isoforma $\alpha 2$ y β -actina de la bomba de sodio y potasio en corteza cerebral de ratas.. 45

Figura 25. Expresión de la isoforma $\alpha 2$ de la bomba de sodio y potasio en corteza cerebral de ratas. 46

Figura 26. Productos de amplificación de la isoforma $\alpha 3$ de la bomba de sodio y potasio en corteza cerebral de ratas.. 46

Figura 27. Expresión de la isoforma $\alpha 3$ de la bomba de sodio y potasio en corteza cerebral.. 47

Figura 27. Actividad de la bomba de sodio y potasio en homogeneizado de corteza cerebral.. 48

I.2. Índice de tablas

Tabla I. Subunidades α y β de la Bomba de Sodio y Potasio.	26
Tabla II. Identidad entre las isoformas α - α y β - β de la bomba de sodio y potasio.	27
Tabla III. Oligonucleótidos empleados para amplificar los genes para la β -Actina y las 3 isoformas α de la bomba de sodio y potasio.	35

II. LISTA DE ABREVIATURAS.

• ° C	– Grados centígrados
• µg	– Microgramos
• µL	– Microlitros
• µM	– Micromolar
• 5-HIAA	– Ácido-5- hidroxindolacético
• 5-HT	– Serotonina
• 5-HTT	– Transportador de la serotonina
• AADC	– Descarboxilasa de aminoácidos aromáticos
• ADNc	– Ácido desoxirribonucleico complementario
• ARN	– Ácido ribonucleico
• ARNm	– Ácido ribonucleico mensajero
• ATP	– Adenosinatrifosfato
• BHE	– Barrera hematoencefálica
• Ca ⁺⁺	– Calcio
• FL	– Fracción libre
• g	– Gramos
• h.	– Horas
• K ⁺	– Potasio
• KCl	– Cloruro de Potasio
• Kg	– Kilogramos
• LCS	– Longitud céfalo-sacra
• L-Trp	– L-Triptófano
• MAO	– Monoaminooxidasa
• mg	– Miligramos
• Mg ₂ Cl	– Cloruro de magnesio
• mL	– Mililitro
• mM	– Milimolar
• N	– Normal

- **Na⁺** – **Sodio**
- **NaCl** – **Cloruro de sodio**
- **NAD⁺** – **Nicotiamida-adenina dinucleótido**
- **nm** – **Nanómetros**
- **PKA** – **Proteína quinasa A**
- **PKC** – **Proteína quinasa C**
- **PCR** – **Reacción en cadena de la polimerasa**
- **Pi** – **Fosfato inorgánico**
- **RPC** – **Restricción proteico calórica**
- **RN** – **Recuperada al nacimiento**
- **RD** – **Recuperada al destete**
- **rpm** – **Revoluciones por minuto**
- **RT** – **Transcriptasa reversa**
- **SN** – **Sistema nervioso**
- **SNC** – **Sistema nervioso central**
- **SNP** – **Sistema nervioso periférico**
- **TA** – **Temperatura ambiente**
- **TCA** – **Ácido tricloroacético**
- **TPH** – **Triptófano hidroxilasa**
- **U** – **Unidad**

III. RESUMEN

La bomba de sodio y potasio es una enzima de membrana responsable de mantener el potencial de membrana, el volumen celular, el pH citoplásmico y el gradiente electroquímico de los iones Na^+ y K^+ . Es un heterodímero formado por la subunidad catalítica α y la subunidad β . La bomba de sodio y potasio es regulada por factores extrínsecos tales como la serotonina, se ha observado la estimulación de la actividad de la enzima con un incremento en la V_{max} en diferentes regiones cerebrales sugiriendo una interacción funcional entre el sistema serotoninérgico y la bomba de sodio y potasio. La serotonina es un neurotransmisor que se sintetiza en el sistema nervioso central a partir del aminoácido esencial L-Trp. Se ha documentado que la administración de L-Trp y estados de estrés nutricional como la restricción proteico calórica *in útero* incrementan la concentración de serotonina en el sistema nervioso central por un aumento en la fracción libre de L-Trp. El incremento en la V_{max} de reacción de la bomba de sodio y potasio por serotonina, sugiere que posiblemente el mecanismo de activación es a través del aumento en la expresión del gen de la subunidad catalítica α de la enzima, por lo que el objetivo del presente trabajo fue determinar si en estados de estrés nutricional y la administración del aminoácido esencial L-Trp incrementa la expresión de la subunidad catalítica α de la bomba de sodio y potasio en corteza cerebral de ratas, para lo cual se utilizó la técnica de RT-PCR y la determinación de la actividad específica de la enzima. Los resultados muestran que hay un incremento en la expresión del gen de la isoforma $\alpha 2$ de la bomba de sodio y potasio y la actividad de la enzima. Se observó también que en los grupos recuperado al destete y recuperado al nacimiento del grupo con restricción proteico-calórica aumento la expresión de la isoforma $\alpha 2$ y la actividad de la enzima comparada con el grupo control. Estos resultados sugieren que la serotonina incrementa la actividad de la bomba de sodio y potasio a través de incrementar la expresión del gen de la isoforma $\alpha 2$ y que en el estrés nutricional probablemente se activen factores de transcripción como el del gen de la isoforma $\alpha 2$ de la bomba de sodio y potasio.

Palabras clave: L-Triptófano, Restricción Proteico-Calórica, Sistema Nervioso Central.

IV. ABSTRACT

The sodium and potassium pump is a membrane enzyme responsible to keep membrane potential, cell volume, cytoplasmic pH and the electrochemical gradient of the Na^+ y K^+ ions. It is a heterodimer formed by catalytic subunit α and the β subunit. The sodium and potassium pump is regulated by extrinsic factors like serotonin, it has been observed that the stimulation of the activity from the enzyme with an increase in the V_{max} in different brain parts, which suggest a functional interaction between the serotonergic system and the sodium and potassium pump. Serotonin is a neurotransmitter which is synthesized in the central nervous system from the essential aminoacid L-Trp. It has been documented that L-Trp administration together with nutritional stress situations like the protein calorie restriction in utero increase serotonin concentration in the central nervous system, due to an increase in the free fraction of the L-Trp. There is a V_{max} reaction increase from the sodium and potassium pump caused by serotonin, it suggests that the possible activation mechanism is through an increased expression of the catalytic subunit α gene, so that the aim of this study was to determinate if during nutritional stress situations and performing L-Trp administration, the expression of the catalytic subunit α from the sodium and potassium pump is increased in rats cerebral cortex. RT-PCR techniques were used, also specific activity of the enzyme was determined. The results show that the subunit $\alpha 2$ gene expression and the enzyme activity were increased. At the same time, it was observed that in groups recovered at weaning and recovered at birth which were under the scheme of protein calorie restriction, the subunit $\alpha 2$ gene expression and the enzyme activity were increased in comparison with the control group. These results suggest that serotonin increases the sodium and potassium pump activity through an expression increase from the subunit $\alpha 2$, moreover nutritional stress situations might be responsible of the activation from transcription factors like the subunit $\alpha 2$ gene from the sodium and potassium pump.

Keywords: L-Tryptophan, Protein-Calorie Restriction, Central Nervous System.

V. INTRODUCCIÓN

V.1. Sistema nervioso

El sistema nervioso (SN) está formado por un conjunto de estructuras centrales y periféricas interconectadas que se extienden por todo el organismo e influyen de manera directa sobre los demás sistemas. El SN no solo se encarga del análisis de las sensaciones y de la generación de acciones motoras, sino que define la concepción del propio cuerpo, del ambiente que lo rodea y confiere la individualidad, además determina el estado de ánimo.

Desde el punto de vista estructural, el SN está constituido por células gliales, vasos sanguíneos y neuronas que se comunican entre sí y con los efectores (músculo esquelético, músculo liso y glándulas). En algunos casos las neuronas establecen circuitos a distancia con los efectores y en otros casos de manera local, generalmente modificando la acción de las neuronas que se proyectan a otras estructuras.

Las neuronas (**Figura 1**) son las células responsables de la conducción de los impulsos nerviosos, están constituidas por un soma o cuerpo celular que posee extensiones filamentosas denominadas dendritas y axones. La porción terminal neuronal es el botón presináptico. El axón es la unidad principal conductora en la neurona, las señales eléctricas propagadas a lo largo del axón constituyen el potencial de acción; la porción terminal del axón se divide en finas ramas que tienen contacto con otras neuronas, el punto de contacto se le denomina sinapsis. 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 (Bear *et al.*, 2001).

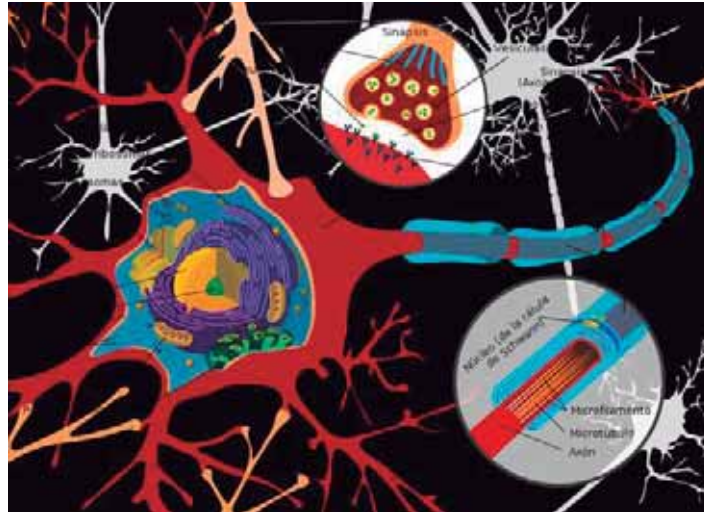


Figura 1. Representación esquemática de una neurona. Prolongaciones citoplásmicas de una neurona, las dendritas reciben el impulso nervioso y lo prolongan a lo largo del axón recubierto de mielina para conducir el impulso de manera rápida y eficiente hasta en botón presináptico para una comunicación nerviosa con otra neurona. (Tomada de: www.divulcat.com/.../Mayo, 2008).

V.1.1. Tipos de neuronas

Las neuronas se dividen en diferentes categorías de acuerdo a la función y lugar anatómico. Se clasifican de acuerdo al número de neuritas (axones y dendritas) que se extienden desde el soma, una neurona con una sola neurita se le llama unipolar, con dos neuritas bipolar y con tres o más neuritas multipolar (**Figura 2**).

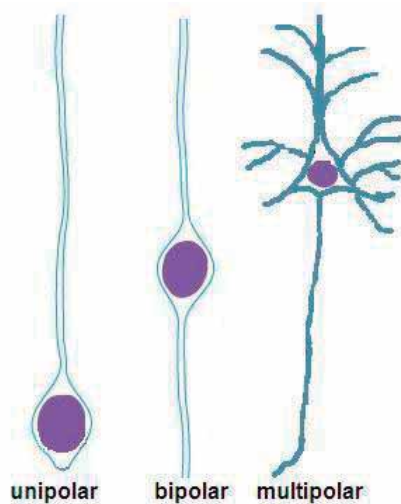


Figura 2. Tipos de neuronas de acuerdo a su número de neuritas. Clasificación de las neuronas de acuerdo al número de neuritas (axones, dendritas y espinas) que se extienden desde el soma. (Modificada de Higginbotham y Gleeson, 2007)

La clasificación basada en dendritas, se refiere a que las neuronas son específicas de la región del cerebro en que se sitúen y su función específica, por ejemplo, las neuronas piramidales se encuentran en la corteza cerebral y en la superficie del cerebelo, las neuronas estrelladas en corteza cerebral y cerebelo, las neuronas poliédricas en la médula, las neuronas esféricas en los ganglios y las células de Purkinje en el cerebelo (**Figura 3**).

Según sus conexiones se dividen en neuronas sensoriales primarias, son las neuronas que se encuentran en la superficie del cuerpo como las de la piel y la retina del ojo y las neuronas motoras que son las que controlan los movimientos de los músculos.

Según la longitud del axón, las neuronas se clasifican en neuronas Golgi tipo I que son neuronas de axones largos y neuronas Golgi tipo II que son neuronas de axones cortos (Glickstein, 2006).

Según el mediador químico, las neuronas se clasifican en neuronas colinérgicas liberan acetilcolina, las noradrenérgicas liberan adrenalina, las dopaminérgicas, liberan dopamina, las gabaérgicas liberan GABA (ácido γ -aminobutírico) y las serotoninérgicas liberan serotonina (Herlenius y Lagercrantz, 2001).

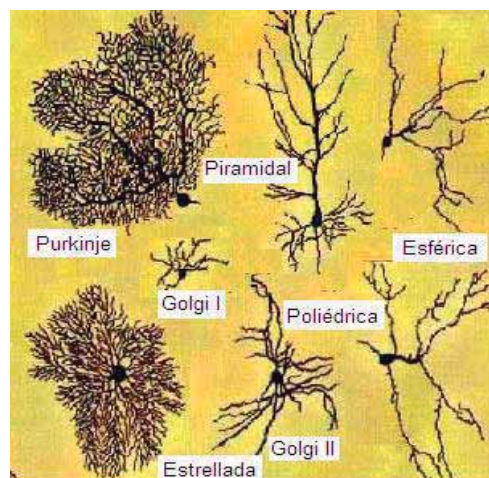


Figura 3. Tipos de neuronas de acuerdo a su arborización terminal. Las neuronas se clasifican de acuerdo al espesor de las prolongaciones citoplásmicas que parten del soma, son una estructura clave para la comunicación entre las neuronas y tejido específico (Modificada de Parrish, *et al.*, 2007).

V.1.2. Células gliales

Los cuerpos neuronales están rodeados por las células gliales. En el sistema nervioso central de los vertebrados hay entre 10 y 50 veces más células gliales que neuronas. Las células gliales no funcionan como transmisoras de señales 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 regeneración nerviosa. Las principales funciones de las células gliales son: dar soporte, estructura y consistencia del cerebro, además, aíslan ciertos grupos neuronales y recolectan los restos celulares originados por la lesión o muerte de una neurona (Barren, 1999). Mantienen la concentración de iones K^+ del líquido extracelular; algunas células gliales captan y retiran los neurotransmisores liberados en la sinapsis durante la transmisión del impulso nervioso, algunas células gliales ayudan a formar un revestimiento impermeable en los capilares y vénulas del encéfalo generando la barrera hematoencefálica evitando así que penetren ciertas sustancias tóxicas al cerebro.

En el sistema nervioso predominan cinco tipos de células gliales (**Figura 4**): microglia, células endoteliales, oligodendrocitos, células de Schwann y los astrocitos (Johansson *et al.*, 1999).

La microglia actúa como macrófago ya que prolifera después de una lesión y ayuda a reparar el daño. Las células endoteliales producen el líquido cefalorraquídeo y recubren los ventrículos del sistema nervioso. Los oligodendrocitos sintetizan la mielina en SNC y las células Schwann en sistema nervioso periférico (SNP).

Los astrocitos son un tipo de células gliales que se encuentra en mayor proporción en el cerebro, estas células se encuentran en el espacio intersticial entre las neuronas de aproximadamente 20 nm (Bear *et al.*, 2001), la función principal de esta célula es la regulación de iones en el espacio extracelular, remueven neurotransmisores de la hendidura sináptica, mantiene el equilibrio químico, eléctrico

y por lo tanto el potencial de membrana para el buen funcionamiento neuronal, funcionan como amortiguadores de K^+ en el espacio extracelular ya que expresan canales de potasio, regulan la homeostasis del K^+ por estimulación de la actividad de la Na^+/K^+ -ATPasa, los astrocitos poseen mayor afinidad por el K^+ y un incremento en la concentración de K^+ estimula la actividad de la bomba (Mercado y Hernández, 1992), modula el flujo sanguíneo ya que envuelven a los capilares, forman la barrera hematoencefálica, median el flujo del agua por activación de la aquaporina 4 (Simard y Nedergaard, 2004).

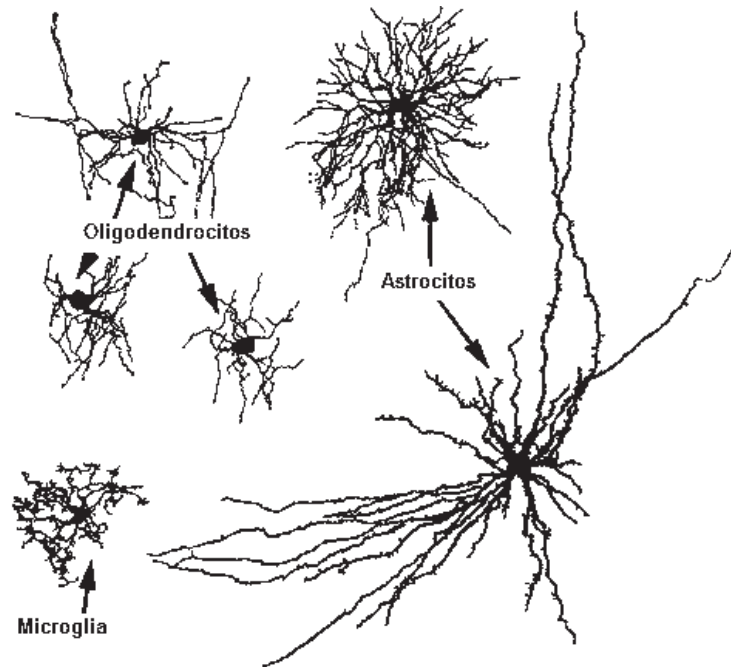


Figura 4. Tipos de células gliales. Las células gliales se diferencian por su morfología y tamaño, sus prolongaciones citoplásmicas a diferencia de las neuronas captan nutrientes de los vasos sanguíneos para transmitirlos a las neuronas, constituyen la barrera hematoencefálica y tienen un importante papel durante el desarrollo ontogenético ya que guían a las neuronas a la posición cerebral en la que tienen que quedar situadas.

(Tomada de http://www.neurologiaveterinaria.com/shared/php/getimage.php?id=glia_celulas_500.jpg).

Durante el desarrollo cerebral, algunos tipos de células gliales guían la migración de neuronas y dirigen el crecimiento de los axones (Luhmann *et al.*, 2002), en corteza cerebral guían la migración de las células piramidales en las diferentes capas que constituyen este tejido.

V.1.3. Corteza cerebral

La corteza cerebral es la responsable de las sensaciones, percepciones, movimientos voluntarios, el habla, el aprendizaje y la cognición. Está organizada por placas u hojas, la primera placa está formada por una zona marginal carente de neuronas llamada capa molecular, donde únicamente se concentran prolongaciones de las dendritas llamadas dendritas apicales que separan la corteza cerebral de la superficie del cerebro, las placas II, III, IV, V y VI (**Figura 5**) están constituidas por neuronas piramidales, al conjunto de estas placas se les conoce como placas corticales (Luhman *et al*, 2002).

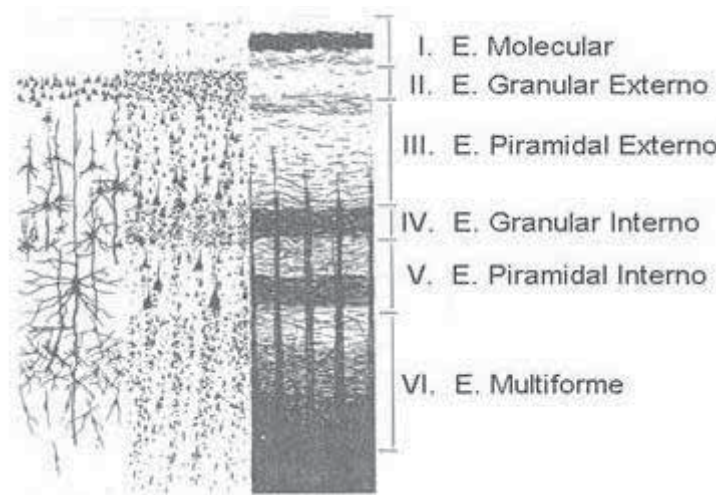


Figura 5. Citoarquitectura de la corteza cerebral. La corteza cerebral está constituida por 6 capas corticales de neuronas piramidales excepto la capa I llamada capa molecular, donde se concentra solo dendritas apicales provenientes de las neuronas. (Modificada de http://www.med.ufro.cl/Recursos/neuroanatomia/archivos/9_citoarquitectura_archivos/Page311.html).

La corteza cerebral está organizada en varias áreas de acuerdo a su estructura lobular relacionada con sus funciones (**Figura 6**), como área visual situada en el lóbulo occipital, área sensorial (tacto) y área auditiva localizada en el lóbulo parietal, área gustativa localizada entre el lóbulo de la ínsula y el parietal, área auditiva en el lóbulo temporal la cual se ha relacionado con la comprensión, el aprendizaje y el

habla, el área motora primaria en el lóbulo frontal y la corteza visual al lóbulo occipital (Bear *et al.*, 2001).

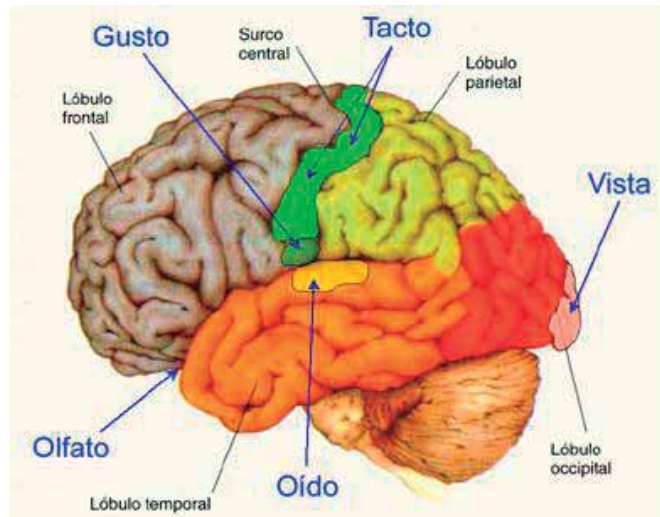


Figura 6. Áreas funcionales de la corteza cerebral. La corteza cerebral está organizada en diferentes áreas de acuerdo a su estructura lobular que se relaciona con funciones como la vista, el oído, el gusto, el olfato y el tacto (Modificada de Hagmann *et al.*, 2008).

Algunas de las funciones específicas que se llevan a cabo en la corteza cerebral son a través de neurotransmisores tales como la serotonina.

V.2. Sistema serotoninérgico cerebral

El sistema serotoninérgico cerebral se localiza en la parte media del tallo cerebral, agrupándose en nueve núcleos que se clasifican de acuerdo a su origen embrionario, a este complejo se le conoce como complejo nuclear del Rafé. El neurotransmisor de este sistema es la serotonina (5-HT o 5-OH-Triptamina) que se sintetiza a partir del aminoácido esencial L-Trp y a nivel periférico en las células enterocromafines del intestino delgado y en el SNC en el complejo nuclear del Rafé (neuronas serotoninérgicas). El L-triptófano una vez absorbido del tracto gastrointestinal se distribuye a los tejidos de todo el organismo. El L-triptófano que proviene de la dieta al entrar al torrente sanguíneo se encuentra en dos fracciones, una unida a la albúmina de manera no covalente y otra fracción que circula en forma libre (FL)

(Tagliamonte *et al.*, 1973; Salter *et al.*, 1989), la cual compete 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 barrera hematoencefálica (De Boer *et al.*, 2003). Las concentraciones de serotonina en el cerebro dependen de las concentraciones de L-Trp libre. El 90% de L-Trp se encuentra unido a la albúmina de manera no covalente, el 10% se encuentra en forma libre y de este, el 2% cruza la barrera hematoencefálica para la síntesis de serotonina. La concentración del L-Trp libre es de 37 μM en circulación y en plasma tiene un tiempo de vida media de 1 hora 30 minutos, el catabolismo del L-Trp es de 2.24 $\mu\text{mol/hora}$ (Salter *et al.*, 1989). Una estrategia experimental para estimular la síntesis de 5-HT es la administración de L-Trp (Hernández, 1979) y condiciones de restricción proteico- calórica o desnutrición intrauterina (Hernández, 1990).

El L-Trp se utiliza para la síntesis de la serotonina, proteínas y de niacina (**Figura 7**).

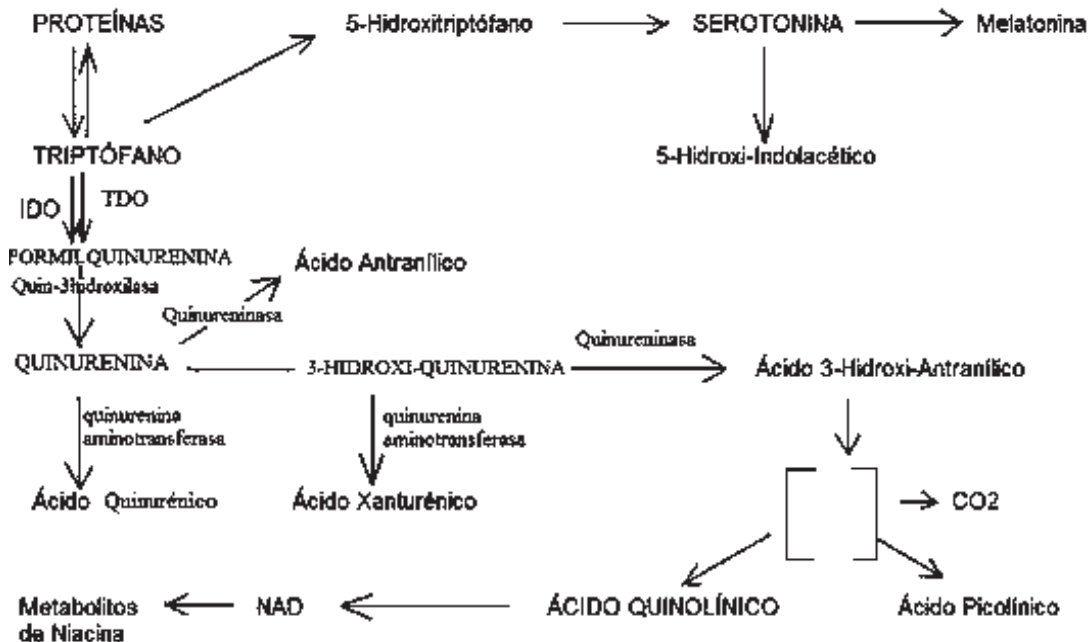


Figura 7. Catabolismo del L-Trp. El L-Trp es un aminoácido precursor de la serotonina, metabolitos como la niacina y quinurerina, además de que puede formar parte de proteínas principalmente de membrana (Tomada de http://invesalia.es/descargas/Publicaciones/Publicacion/Nut_ESQ.pdf).

Una vez que el L-Trp llega a las neuronas serotoninérgicas es hidroxilado a 5-hidroxitriptófano por la triptófano 5- hidroxilasa (TPH) de la cual se han descrito dos isoformas (TPH1 y TPH2) y es la enzima limitante de la síntesis de 5-HT (**Figura 8**). La enzima que convierte el 5-hidroxitriptófano en 5-HT es la descarboxilasa de aminoácidos aromáticos (AADC), está ampliamente distribuida y tiene alta especificidad por el sustrato, este es un paso rápido ya que en el encéfalo no se encuentra 5-hidroxitriptófano (Walther *et al.*, 2009).

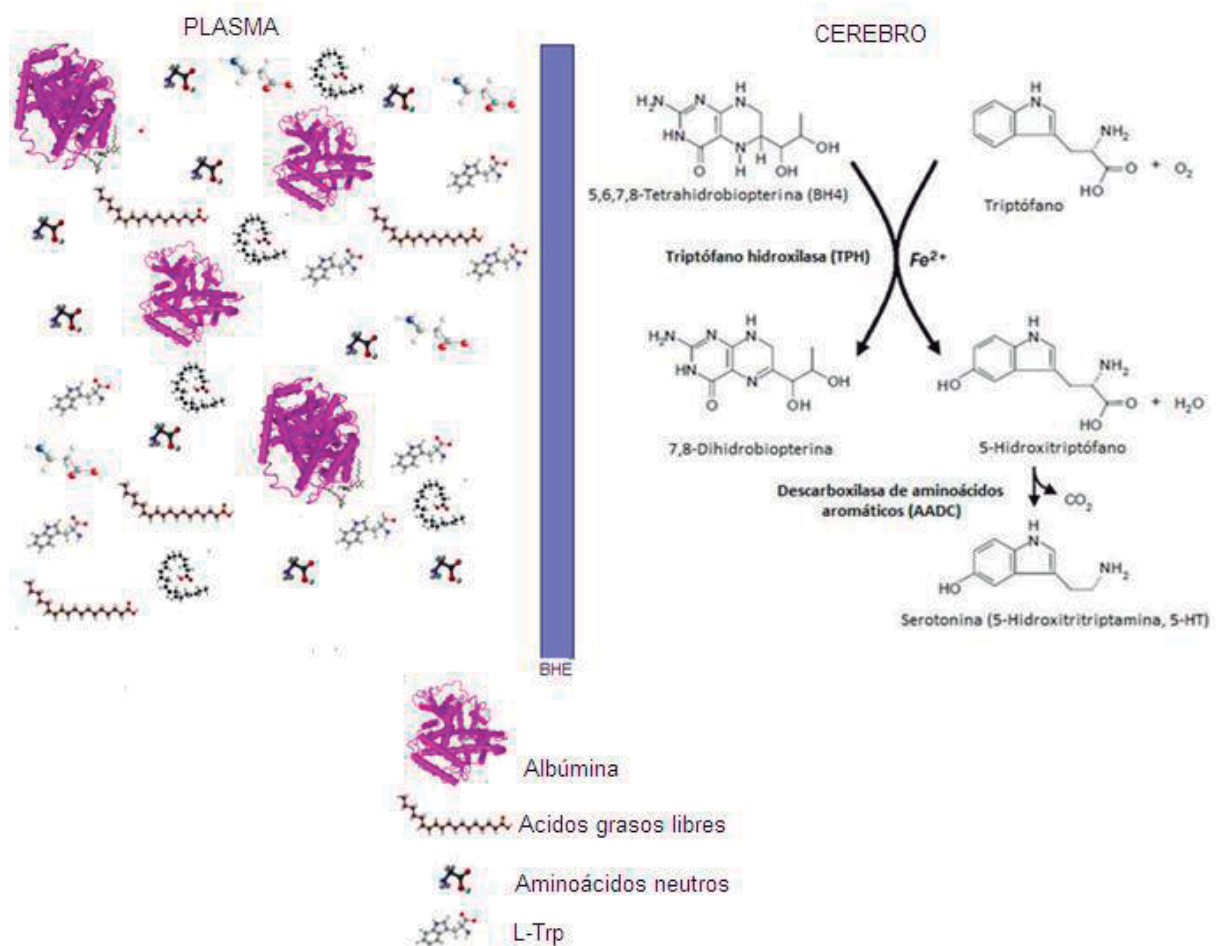


Figura 8. Síntesis de Serotonina. El L-Trp se encuentra en dos fracciones, una unida a la albúmina y una fracción libre, esta última compete con aminoácidos neutros y ácidos grasos libres para cruzar la barrera hematoencefálica, una vez que este la cruza es hidroxilado por la enzima triptófano hidroxilasa y posteriormente descaboxilado por la descarboxilasa de aminoácidos aromáticos sintetizando así la serotonina (Modificada de Lidoy y Molliver, 1982).

La serotonina se acumula en las vesículas sinápticas y es liberada por exocitosis, dentro de las vesículas es protegida de la enzima monoaminoxidasa tipo B (MAO) la cual convierte a la 5-HT en 5-hidroxi-indolacetaldehído, el cual es oxidado por una acetaldéhidó deshidrogenasa dependiente de NADH para formar como producto final ácido 5-hidroxi-indolacético (5-HIAA). 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 MAO. Otro mecanismo de control es la recaptura de 5-HT del espacio sináptico a través del transportador de serotonina (5-HTT) situado en las neuronas presinápticas; por medio de este mecanismo la serotonina puede seguir dos caminos uno la degradación por la MAO y un segundo camino el ser reciclada en vesículas y posteriormente ser liberada nuevamente (Smith *et al.*, 2004).

Existen ciertos factores en el organismo que participan en la regulación de la concentración de la FL del L-Trp en el plasma, entre ellos se encuentra la constante de afinidad que tiene el aminoácido para unirse a la albúmina; la concentración de albúmina y ácidos grasos libres, estos últimos desplazan al L-Trp de su unión con la albúmina, de tal manera aumenta la disponibilidad del aminoácido para su transporte al cerebro y conlleva a un aumento en la síntesis de 5-HT. La concentración de la FL del L-Trp depende también de la concentración de los aminoácidos neutros ya que compiten por su transportador en la BHE, así una disminución en la concentración de estos aminoácidos en el plasma permitirán un mayor paso del L-Trp al cerebro y un aumento en la síntesis de 5-HT (Huether *et al.*, 1992). Por lo tanto, un incremento en la concentración de L-Trp por administración aumenta la síntesis de serotonina (Hernández y Chagoya, 1986), también se ha observado que en modelos de restricción proteico calórica (RPC) hay un aumento en síntesis de serotonina ya que se eleva la FL de L-Trp por una disminución en la síntesis de albúmina (Hernández, 1990).

Se ha asociado estados de desnutrición al desarrollo de enfermedades cardiovasculares, como la diabetes y la obesidad en adultos. En animales con desnutrición perinatal se produce hiperfagia y un incremento en los niveles de serotonina en el cerebro. La desnutrición en edades tempranas induce cambios en la estructura y plasticidad del cerebro, estos cambios persisten hasta la edad adulta, las alteraciones en los circuitos hipotalámicos debido a la desnutrición desarrollan efectos sobre la ingesta de comida y por lo tanto conduce a la obesidad (Orozco *et al.*, 2009). La desnutrición durante la gestación y la lactancia resulta en programación de hiperfagia en las crías por cambios en los niveles de expresión de neurotransmisores como la serotonina (Lopes *et al.*, 2008).

V.4. Restricción protéico calórica

La desnutrición intrauterina conduce a la programación anormal de diversas vías metabólicas con un aumento de morbilidad coronaria en la vida adulta, como el desarrollo de resistencia a la insulina, hipertensión, hiperlipidemias y valores elevados de fibrinógeno en plasma (Miñana y Escobar, 2007). Estudios en animales desnutridos mostraron que los que tenían bajo peso al nacimiento no llegaban a alcanzar el tamaño de sus congéneres nacidos con peso normal ni al llegar a la madurez (Manjarréz *et al.*, 1998).

El crecimiento y el desarrollo del feto están determinados por tres factores: el estado nutricional de la madre, la función placentaria y la capacidad del feto para utilizar nutrientes. Se ha demostrado en ratas durante la gestación que una dieta restrictiva, sobre todo de proteínas, causa la disminución del peso al nacimiento y en la edad adulta hipertensión e intolerancia a la glucosa, algunos órganos de estos animales presentan un tamaño menor, mientras el cerebro y los pulmones mantienen un crecimiento normal (Moreno y Dalmau, 2001).

La desnutrición durante las primeras etapas del desarrollo y en la edad adulta produce una alteración específica sobre el sistema serotoninérgico cerebral por un

aumento en los niveles de serotonina lo que se traduce en un patrón anormal de la conducta alimentaria en el adulto (Díaz *et al.*, 1993).

Animales desnutridos durante la vida fetal y que al nacer son sometidos a un esquema normal de nutrición, tuvieron aumentos somatométricos suficientes que les permitió alcanzar el crecimiento físico similar a los controles. Se sabe que al eliminar la restricción de nutrientes durante la vida intrauterina o postnatal y recuperar las células en proceso de crecimiento estas pueden continuar con su programa genéticamente determinado, siempre y cuando el medio nutricional y endócrino sea el óptimo, lo que les permite a estos animales una recuperación física completa. El aumento de peso en animales recuperados es debido a una mayor eficiencia en la utilización de la energía por las células del organismo, aunque la recuperación nutricional predispone al desarrollo de la obesidad durante la vida adulta (Miñana y Escobar, 2007). El aumento en la ingesta de alimento y la obesidad se consideran causa y efecto, secundaria a características determinadas genéticamente o factores epigenéticos que interactúan durante el desarrollo y crecimiento del organismo (Orozco *et al.*, 2009). Esta interacción probablemente determina la condición nutricional del individuo durante la etapa adulta. Por otro lado, gran parte de los mecanismos biológicos que regulan la ingesta de alimento normal o durante la recuperación nutricia residen en el cerebro, por lo que se ha propuesto que la serotonina cerebral participa en la regulación de la conducta alimentaria donde tiene un papel inhibitorio de la saciedad, regula el peso corporal junto con otros sistemas neuronales; interactúa con el sistema dopaminérgico para el control del comportamiento de la selección de los nutrientes y regula la ingesta de proteínas (Manjarréz *et al.*, 1998).

Existen estudios en los que se atribuye al sistema serotoninérgico cerebral participación en diferentes funciones como la regulación de los ciclos de sueño y vigilia, la conducta sexual (Hull *et al.*, 2004), la regulación termociceptiva, regulación de la conducta alimentaria, como factor trófico (Colas *et al.*, 1999; Lauder *et al.*, 1981) y un incremento en la actividad de la bomba de sodio y potasio (Mercado

y Hernández, 1992), la cual es uno de los sistemas enzimáticos presentes en la membrana plasmática y es la responsable del establecimiento del gradiente electroquímico de los iones Na^+ y K^+ (Feraille y Doucet, 2001). Estas funciones se llevan a cabo a través de la activación de receptores específicos, algunos acoplados a canales iónicos y otros a segundos mensajeros, hasta el momento se conocen 7 familias y 14 subfamilias. Los receptores 5-HT_1 están involucrados en la dilatación arterial y en la inhibición de la transmisión de señales en el sistema nervioso parasimpático, el receptor 5-HT_{1A} se ha relacionado con neurogénesis, neuroprotección, plasticidad neuronal, ansiedad, depresión, aprendizaje y memoria (Polter y Li, 2010); los 5-HT_2 participan en la agregación plaquetaria; los receptores 5-HT_3 median el reflejo Bezold-Jarish que consiste en la respuesta a la serotonina como consecuencia de una bradicardia súbita y transitoria, también participa en la liberación de catecolaminas en el músculo cardíaco; los 5-HT_4 están involucrados en la taquicardia inducida por 5-HT y que no es bloqueada por fármacos que se unen a los receptores 5-HT_1 , 5-HT_2 o 5-HT_3 (Dumuis *et al.*, 1988). En cuanto a los receptores 5-HT_5 , tienen una gran homología a los receptores de la familia 5-HT_1 y se sabe que se expresan en la corteza cerebral en el hipocampo, en el bulbo olfatorio y en la capa granular del cerebelo pero aun no se conocen todas las funciones en las que participan. El receptor 5-HT_6 se relaciona con la memoria y el aprendizaje al igual que el receptor 5-HT_7 (Pérez *et al.*, 2006)

V.5. Bomba de Sodio y Potasio

La bomba de sodio y potasio es una enzima de membrana responsable de mantener el potencial de membrana, el volumen celular, el pH citoplasmático y los niveles de Ca^{++} intracelular por activación de proteínas de recambio de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{++}$, (Therien y Blostein, 2000), además mantiene el gradiente electroquímico de los iones Na^+ y K^+ (Feraille y Doucet, 2001). El complejo enzimático atraviesa la membrana plasmática con segmentos hidrofílicos que se extienden hacia el espacio extracelular y hacia el citoplasma. Está constituida por dos subunidades α y dos subunidades β en proporción 1:1; y una proteína accesoria la subunidad γ (**Figura 9**).

La subunidad α tiene 10 dominios transmembranales y un peso molecular de 113kDa, es la responsable de la función catalítica de la enzima, tiene un sitio catalítico para el ATP, un sitio de inhibición para la ouabaína y un sitio de fijación para el Na^+ y K^+ (Clifford y Kaplan, 2009).

La subunidad β es una proteína que atraviesa la membrana, dependiendo del grado de glicosilación, su peso molecular varía de 40 o 60 kDa, se considera como una proteína chaperona ya que estabiliza la isoforma α , además de anclar la enzima a la membrana y puede ser una subunidad regulatoria. Es una proteína no enzimática pero muy importante ya que mantiene funciones como la estabilidad de la bomba de sodio y potasio, interacción célula-célula y regula la migración celular (vía glicosiltransferasas). Se ha descrito que la isoforma $\beta 2$ promueve la adhesión celular en células gliales y media la interacción astrocito-neurona (Tokhtaeva *et al.*, 2009).

Otra subunidad asociada a la Na^+/K^+ -ATPasa es una proteína de la familia FXYD, documentada como subunidad γ , su peso molecular es de 7 a 17 kDa se ha observado que esta tiene una interacción de forma no covalente con la enzima aumentando la afinidad por el Na^+ , se ha documentado que modifica el voltaje dependiente de K^+ , esta subunidad es una proteína accesoria pero no forma parte de la estructura del heterodímero (Feschenko *et al.*, 2003). A pesar de lo anterior como una proteína accesoria se ha reportado que regula la actividad de la Na^+/K^+ -ATPasa, ya que esta proteína puede ser fosforilada por PKC o PKA conduciendo a cambios conformacionales de la bomba de sodio y potasio o activando segundos mensajeros (Teriete *et al.*, 2009).

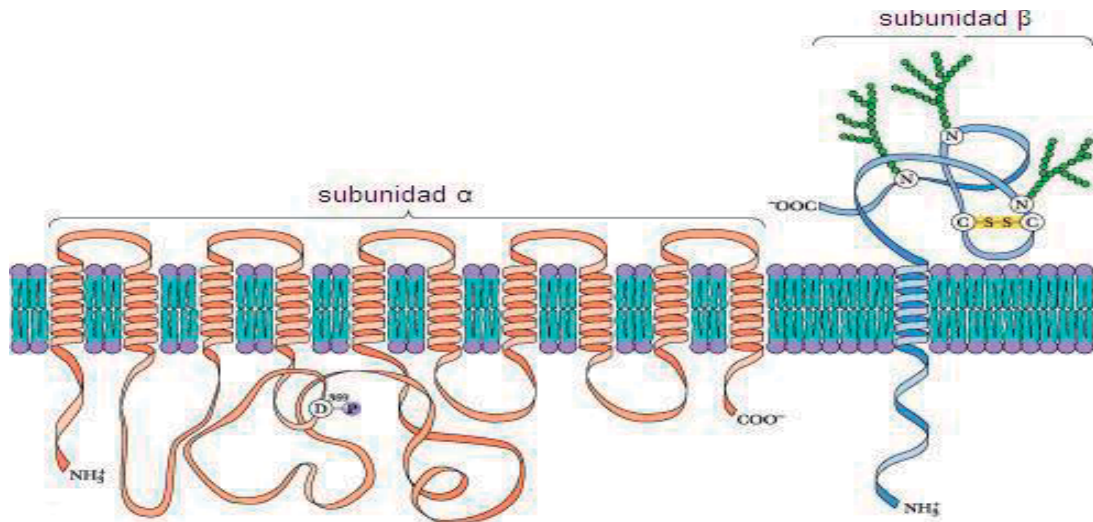


Figura 9. Representación esquemática de la Bomba de Sodio y Potasio. Se muestra la subunidad α y β , dominios hidrofóbicos e hidrofílicos de la enzima, sitios de fosforilación en la subunidad α (Tomada de: http://www.smiba.org.ar/med_interna/vol_03/03_02_03.htm).

El dominio extracelular de la subunidad α tiene afinidad por glucósidos cardioactivos entre ellos la ouabaína y ladigitoxina, y un sitio de unión al potasio. Los glucósidos cardioactivos son sustancias constituidas de una porción esteroide, una porción glicosídica que actúan sobre el músculo cardíaco y por tanto se utilizan como fármacos contra la insuficiencia cardíaca, pueden aislarse en forma glicosídica de hojas de plantas como la *Digitalis purpurea* o del plasma sanguíneo de mamíferos. Los cardiotónicos tienen acción inotrópica positiva, es decir, incrementa la fuerza de contracción del músculo cardíaco. Por otro lado, las hojas de digital tienen un efecto diurético ya que inhiben la bomba de sodio y potasio, induciendo dos efectos; un efecto inotrópico y un efecto neurohumoral (Shwinger *et al.*, 2002).

Los glucósidos cardioactivos, tales como digoxina, Ouabaina y compuestos relacionados, son sustancias que inhiben la bomba de sodio y potasio, tienen un fuerte efecto inotrópico sobre el corazón por esta razón, algunos de estos fármacos se utilizan actualmente en el tratamiento de la insuficiencia cardíaca congestiva y arritmias cardíacas. Algunos de estos efectos están relacionados con la estructura esteroide de glucósidos, una propiedad que también hace modulaciones finas de la síntesis de colesterol y las hormonas esteroides (Riganti *et al.*, 2011).

El mecanismo empleado por el sistema enzimático de la bomba de sodio y potasio comienza con la unión de 3 iones de Na^+ a la subunidad α , seguida por la fosforilación de esta subunidad por el ATP induciendo un cambio conformacional quedando el Na^+ expuesto hacia el espacio extracelular. Sobre esta conformación el K^+ se une al sitio extracelular de la enzima, por desfosforilación se recupera la conformación original, en el cual el K^+ queda expuesto hacia el citoplasma y disminuyendo su afinidad por la bomba de sodio y potasio (**Figura 10**), lo cual provoca su liberación hacia el interior de la célula e iniciando nuevamente el ciclo (Blanco y Mercer, 1998).

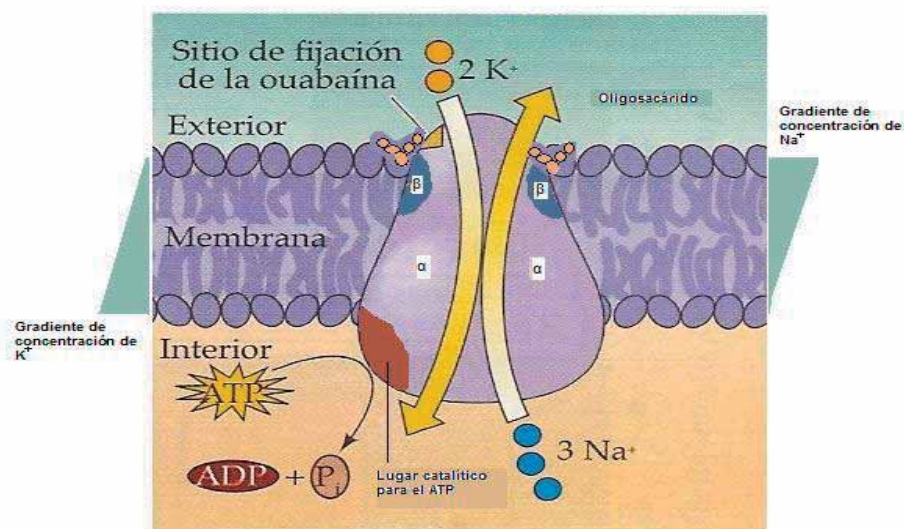


Figura 10. Sitios de unión de los substratos de la Bomba de sodio y potasio. Muestra el dominio extracelular de la subunidad α por los glucósidos cardioactivos entre ellos la ouabaína y la digitoxina, un sitio de unión al potasio y uno para el sodio, el sitio catalítico para el ATP y las subunidades β que anclan la enzima a la membrana (Tomada de Purves *et al.*, 2002).

La subunidad α se expresa en 4 isoformas distintas ($\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$ y $\alpha 4$) (**Figura 11**) y la subunidad β en 3 isoformas ($\beta 1$, $\beta 2$ y $\beta 3$), las isoformas $\alpha 1$ y $\beta 1$ predominan en riñón; la isoforma $\alpha 2$ en corteza renal, células gliales, corazón y papilas; la $\beta 2$ en músculo esquelético, glándula pineal, tejido nervioso; la $\alpha 3$ en neuronas, las $\alpha 4$ en testículo y la $\beta 3$ en retina, pulmón, hígado y testículo, la combinación de éstas es específica de cada tejido, y la expresión depende de los requerimientos celulares, por ejemplo,

mantiene el potencial de membrana que confiere propiedades excitables al músculo y los nervios, en riñón reabsorbe el Na^+ para mantener la homeostasis, la combinación es regida por genes alternativos y procesos postranscripcionales (Blanco y Mercer, 1998). La cinética, la afinidad por ATP, Na^+ y K^+ , la inhibición por Ca^{++} y ouabaína es diferente para cada isoforma (**Tabla I**).

Tabla I. Subunidades α y β de la Bomba de Sodio y Potasio.

Combinación	Tejido específico	Propiedades enzimáticas
$\alpha 1\beta 1$	Epitelio Plexo coroideo Riñón Tejido nervioso	Alta afinidad por el K^+ Baja afinidad por el ATP Afinidad intermedia para el Na^+ Sensible a la ouabaína Se inhibe fácilmente por el Ca^{++}
$\alpha 1\beta 2$	Glándula pineal	Afinidad intermedia para el Na^+ Baja afinidad por el ATP Afinidad intermedia para el K^+
$\alpha 2\beta 1$	Plexo coroideo Músculo	Se inhibe fácilmente por el Ca^{++} Afinidad intermedia para el Na^+ Afinidad intermedia para el ATP Alta afinidad para el K^+
$\alpha 2\beta 2$	Astrocitos Corazón	Alta afinidad por el Na^+ Afinidad intermedia para el K^+ Afinidad intermedia por el por el ATP Sensible a la inhibición por Ca^{++}
$\alpha 3\beta 1$	Tejido nervioso	Baja afinidad por el Na^+ Baja afinidad para el K^+ Alta afinidad por el Na^+ Se inhibe fácilmente por ouabaína
$\alpha 3\beta 2$	Glándula pineal	Alta afinidad por el Na^+ Baja afinidad para el K^+ Alta afinidad por el ATP
$\alpha 4\beta 1$	Testículo	Afinidad intermedia para el K^+ Afinidad intermedia por el por el ATP
$\alpha 4\beta 3$	Testículo	Afinidad intermedia para el K^+ Afinidad intermedia por el por el ATP

La combinación, la cinética, la inhibición por Ca^{++} y la sensibilidad por la ouabaína es diferente para cada combinación de isoformas de la bomba de sodio y potasio, y estos requerimientos son dependientes de tejido específico (Modificada de Blanco y Mercer, 1998).

Humano	$\alpha 1$	(650)	IPVSQVNP	RD	AKACVVHGSD	(864)	GGFFTYFVILAENGFLP
Humano	$\alpha 2$	(647)	IPMSQVNP	RE	AKACVVHGSD	(861)	GGFFTYFVILAENGFLP
Humano	$\alpha 3$	(640)	IPVSQVNP	RD	AKACVIHGTD	(854)	GGFFSYFVILAENGFLP

Figura 11. Alineamiento de aminoácido de las 3 isoformas α de la bomba de sodio y potasio en humano. La isoforma con mayor afinidad a la ouabaína es la subunidad $\alpha 3$, la de afinidad intermedia la subunidad $\alpha 2$ y la de muy baja afinidad es la subunidad $\alpha 1$. Las cajas grises muestran los aminoácidos conservados (Tomada de: doi:10.1371/journal.pbio.1000540.goo1).

Tabla II. Identidad entre las isoformas α - α y β - β de la bomba de sodio y potasio.

Isoformas	Grado de identidad
$\alpha 1$ - $\alpha 2$	92%
$\alpha 1$ - $\alpha 3$	96%
$\alpha 1$ - $\alpha 4$	78%
$\beta 1$ - $\beta 2$	95%
$\beta 1$ - $\beta 3$	68%
$\beta 2$ - $\beta 3$	61%

El grado de identidad entre las isoformas reside en los aminoácidos conservados, la expresión de los genes es alternativa y dependen de los requerimientos celulares de cada tejido para remover los iones de Na^+ y K^+ .

VI. JUSTIFICACIÓN

Se ha demostrado que la bomba de sodio es regulada por factores extrínsecos tales como la 5-HT, la cual incrementa su actividad en diferentes regiones cerebrales (Hernández, 1990; Therien y Blostein, 2000). Por otro lado se ha observado que en estados de estrés nutricional como la restricción proteico-calórica *in útero* y la administración de L-Trp incrementan los niveles de serotonina (Hernández, 1979; Rajani *et al.*, 2006; Lopes *et al.*, 2008) y que una vez recuperados la animales con RPC la vía biosintética de la serotonina queda alterada (Manjarréz, 1998). Por otro lado, Mercado y Hernández (1992) demostraron que existe modificación de la cinética de la enzima inducida en animales con RPC aumentando la V_{max} (Manjarréz *et al.*, 2003) lo que sugiere que probablemente se incremente la expresión de los genes de la bomba de sodio y potasio lo cual no se conoce. Dada la relevancia que tienen por un lado la bomba de sodio y potasio y el sistema serotoninérgico en cuanto a su participación en diversas funciones del organismo y a que se ha propuesto en trabajos previos una relación funcional entre ambos sistemas esto aunado a que los mecanismos de regulación de la actividad de la enzima nos lleva a proponer la siguiente:

VII. HIPÓTESIS

La estimulación de la síntesis de serotonina incrementa la actividad y la expresión de los genes de las isoformas α de la bomba de sodio y potasio en corteza cerebral de ratas con estrés nutricional.

VIII. OBJETIVOS

VIII.1. Objetivo general

Determinar si la estimulación de la síntesis de serotonina incrementa la actividad y la expresión de los genes de las isoformas α de la bomba de sodio y potasio en corteza cerebral de ratas con estrés nutricional y si el efecto permanece en condiciones de recuperación nutricional.

VIII.2. Objetivos específicos

- Determinar si se modifica la actividad de la bomba de sodio y potasio en corteza cerebral de ratas tratadas con L-Trp y con restricción proteico calórica *in útero*.
- Determinar si la estimulación de la síntesis de serotonina induce la expresión de los genes de las 3 isoformas α de la bomba de sodio y potasio en corteza cerebral de ratas.

IX. MATERIAL Y MÉTODOS

IX.1. Animales

Las ratas de experimentación se trataron de acuerdo a las normas nacionales de cuidados y manejo en animales de experimentación, los cuales estuvieron en vigilancia en el bioterio de la Facultad de Químico Farmacobiología de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo de acuerdo con las disposiciones generales del Reglamento de la Ley General de Salud y la norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 (especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio).

Los animales se mantuvieron en un área asignada bajo las condiciones ambientales de control de temperatura, humedad relativa de 60% y ciclos de luz-oscuridad (Capítulo 6, de la NOM-062-ZOO-1999). El sacrificio de los animales fue por el método físico de decapitación (Capítulo 9, de la NOM-062-ZOO-1999). El manejo con respecto a la disposición final de productos biológicos se determinó de acuerdo con lo establecido en la NOM-087-ECOL-1995.

IX.2. Estimulación de la síntesis de serotonina

IX.2.1. Administración de L-Trp

Se utilizaron ratas macho adultas de la cepa Wistar de $200\text{g} \pm 20\text{g}$ de peso corporal, a las cuales se les administró vía intraperitoneal 100 mg/kg de L-Trp durante 5 días, se mantuvieron bajo condiciones ambientales controladas de ciclos de luz-oscuridad de 12 h. cada uno, humedad relativa del 60% y temperatura de $20\text{-}25^{\circ}\text{C}$. Con un régimen nutricional *ad libitum* tanto de agua como de alimento (purina Chow), en el bioterio local de la Facultad de Químico Farmacobiología.

IX.2.2. Restricción proteico-calórica (RPC)

Se seleccionó un grupo de 8 ratas hembras nulíparas de 2 meses de edad de 200 ± 20 g, a las cuales se les midió el consumo de alimento (Purina Chow) durante 1 semana, al término de esta, se midió el consumo de alimento promedio y se separaron en 2 grupos de 4 ratas, un grupo control y un grupo con RPC al cual se les proporcionó el 50% del alimento promedio consumido por el grupo control, para mantener un esquema de restricción alimenticia. A las 2 semanas los 2 grupos de ratas fueron apareadas y se alimentaron *ad libitum* y agua, al término de este tiempo se separaron en jaulas individuales, a las 3 semanas de gestación se continuó con el esquema de restricción.

Después del parto, se formó el grupo con RPC recuperado al nacimiento (alimento *ad libitum*), al día 21 postnatal todas las crías fueron destetadas y se continuó con el mismo esquema de RPC y se formó el grupo RPC recuperado al destete (alimento *ad libitum*).

Se realizó el seguimiento de consumo de alimento y peso de las ratas de las madres y cada cría, cada semana, hasta los 2 meses de edad (día 60). Se extrajeron muestras de corteza cerebral de las ratas de los grupos mencionados al día 60 postnatal.

IX.3. Preparación de los homogeneizados de corteza cerebral

Los animales se sacrificaron por desnucación cervical e inmediatamente se perfundieron con 20 ml de solución salina isotónica fría al 0.9% que se inyectaron en el ventrículo izquierdo del corazón. Se extrajo el encéfalo y sobre una superficie fría se disectó la corteza cerebral, la cual se homogeneizó en 10 volúmenes de solución amortiguadora Tris-HCl 50mM a pH 7.4 a 700 rpm a 4°C en un homogeneizador Thomas de vidrio con un vástago de teflón de 0.25 mm de tolerancia de diámetro.

Posteriormente se determinó la cantidad de proteína por el método de Lowry *et al.* (1951).

IX.4. Determinación de la actividad específica de la bomba de sodio y potasio

La actividad de la bomba de sodio y potasio se determinó por el método modificado por Mercado y Hernández (1992). En alícuotas de 25 μL equivalentes a 50 μg de proteína del homogenizado se incubaron (en un medio de Tris-HCl 50 $\text{pH} = 7.4$, Mg_2Cl 6mM, KCl 15mM, NaCl 120mM) con agua para medir la actividad total y ouabaína 0.8 mM para medir la actividad específica de la bomba de sodio y potasio. Se incubó el tejido durante 5 minutos en un baño metabólico Dubnoff, con agitación constante a 37°C . Se adicionaron 50 μL ATP (adenosin-5-trifosfato, sal libre de vanadio), $\text{pH} 6.5$, 3mM por 25 minutos, y finalmente la reacción se detuvo a los 10 minutos adicionando 20 μL de TCA (ácido tricloroacético) frío al 50%, colocando las muestras en una placa de hielo para después centrifugarlas a 3000 rpm durante 10 min. Se tomaron 100 μL del sobrenadante para determinar el Pi liberado en tubos de ensayo que contenían 500 μL de solución de sulfato ferroso al 4%, ácido sulfúrico 1.14 N y molibdato de amonio al 1%, se completó el volumen final con 400 μL de agua, los tubos se agitaron vigorosamente y se midió la absorbancia.

El Pi se determinó espectrofotométricamente a 800 nm a los 10 minutos de iniciada la reacción, de acuerdo al método de Fiske y Subbarow (1925). Las lecturas de absorbancia se extrapolaron en una curva patrón de fosfato de potasio que se corrió en cada experimento. La actividad de la Na^+/K^+ -ATPasa se calculó con la diferencia entre la actividad en presencia de ouabaína y la actividad total por triplicado.

IX.5. Obtención de ARN Total

Después de la disección de la corteza, esta se introdujo en un tubo Eppendorf libre de ARNasas y ADNasas con 1 ml de TRIZOL[®] (Invitrogen) y se homogeneizó con ayuda de un minipolytron. El homogeneizado se agitó y se agregó 200 μ L de cloroformo por cada mililitro de TRIZOL[®], la mezcla se dejó reposar a temperatura ambiente por 15 minutos y se centrifugó a 15, 000 rpm durante 15 minutos a 4°C, el ARN se recuperó de la fase acuosa. La fase acuosa recuperada se recolectó en un tubo nuevo tratado con isopropanol (500 μ L/mL de TRIZOL[®]), después de la incubación por 10 minutos a temperatura ambiente se centrifugó (11 240 rpm) por 10 minutos a 4°C. Después de la centrifugación el sobrenadante se eliminó y la pastilla se dejó en el fondo del tubo y se lavó con 1 mL de etanol al 70%. Después de eliminar el etanol del tubo se dejó secando por 10 minutos a temperatura ambiente (TA). Finalmente el ARN total se resuspendió en 20 μ L de agua libre de ARNasas.

El ARN obtenido se trató con 1 unidad (U) de DNasa I (Sigma) en un medio de reacción (Sigma) durante 15 minutos a TA. El ARN se guardó a -80°C para evitar la degradación.

Una vez obtenido el RNA total de la corteza se procedió a cuantificar por espectrofotometría el ARN, tomando una dilución 1:100 para cada una de las muestras a 260 nm de absorbencia.

IX.6. Retrotranscripción

El ARN total se empleó para la obtención ADNc mediante la reacción de transcripción reversa (RT) 5 μ g de ARN total se utilizaron para la síntesis de ADNc usando Reverse-Transcriptase (Invitrogen). La reacción fue conducida en un volumen total de 20 μ L siguiendo las instrucciones del fabricante. En cada reacción se corrió un control en el cual la enzima transcriptasa reversa se sustituyó por agua. Dicho control fue identificado como RT negativo.

IX.7. PCR

El ADNc se corrió con los siguientes parámetros: un paso de desnaturalización 5 minutos a 95°C y 30 ciclos de 45 segundos a 95°C, 45 segundos a 55°C para las isoformas α y 45 segundos a 59°C para la β -actina y 1 minuto a 72°C, un paso final de la reacción 7 minutos a 72°C. Los productos de PCR se resolvieron por electroforesis en gel de agarosa al 1.5 %. Los oligonucleótidos empleados para amplificar los genes de la β -actina y de las isoformas de la subunidad catalítica α de la bomba de sodio y potasio se muestran en la tabla IV.

Tabla III. Oligonucleótidos empleados para amplificar los genes para la β -Actina y las 3 isoformas α de la bomba de sodio y potasio.

Especificidad	Sentido	Secuencia (5'-3')	Tamaño molecular del amplificado (pb)	Referencia
Isoforma α 1	Directo	AAGGACGCCTTTCAGAATGCCT	247	Wang <i>et al.</i> , 2000
	Reverso	TGACCATGATGACCTTAAATCC		
Isoforma α 2	Directo	CACCTAACTTTGTAATACTGGC	264	Wang <i>et al.</i> , 2000
	Reverso	ATCAGGATCTTGTTCTTCATGCC		
Isoforma α 3	Directo	GACCCCAATGACAACCGATA	285	Wang <i>et al.</i> , 2000
	Reverso	CATGGACATGAGACCCACGAA		
β -actina	Directo	CTCGTTGCCGATGGTGA	200	Acosta, 2010.
	Reverso	AGCGCTTCCGGTGTCCA		

Para analizar los cambios relativos en la expresión de las isoformas α se eligió la β -actina como control interno, ya que no varió su expresión con las condiciones experimentales.

IX.8. Análisis estadístico

Para el análisis de los resultados se utilizó el programa GraphPad Prisma 4.0 en el cual se calculó el promedio y la desviación estándar de los resultados experimentales y se empleó la “t” de student para observar la diferencia estadística de los grupos experimentales respecto al control.

En el análisis de la densitometría se utilizó el programa “ImageJ” (<http://rsbweb.nih.gov>).

X. RESULTADOS

X.1. Peso corporal y consumo de alimento de las madres

Con el propósito de evaluar el modelo de restricción proteico-calórica *in útero*, se midió el peso de las madres al inicio del experimento y durante cada semana a lo largo del experimento. En la **figura 13** se muestra la cantidad de alimento ingerido, se puede observar que las ratas del grupo control y del grupo recuperado aumentan el consumo de alimento durante la gestación y en el período de alimentación de sus crías. El consumo de alimento del grupo recuperado es menor respecto al grupo control en la sexta y séptima semana, que corresponde al periodo de lactancia. En la **figura 14** se muestra el peso de las ratas madre. El grupo con RPC no obtuvo la misma ganancia en peso que el control en la quinta, séptima y octava semana, si no hasta la cuarta y sexta semana que corresponde a una semana previa al nacimiento y la primera semana de lactancia, el grupo recuperado al nacimiento de las crías y durante toda la lactancia tiende a recuperar el peso y se puede observar que no hay cambios significativos respecto al grupo control.

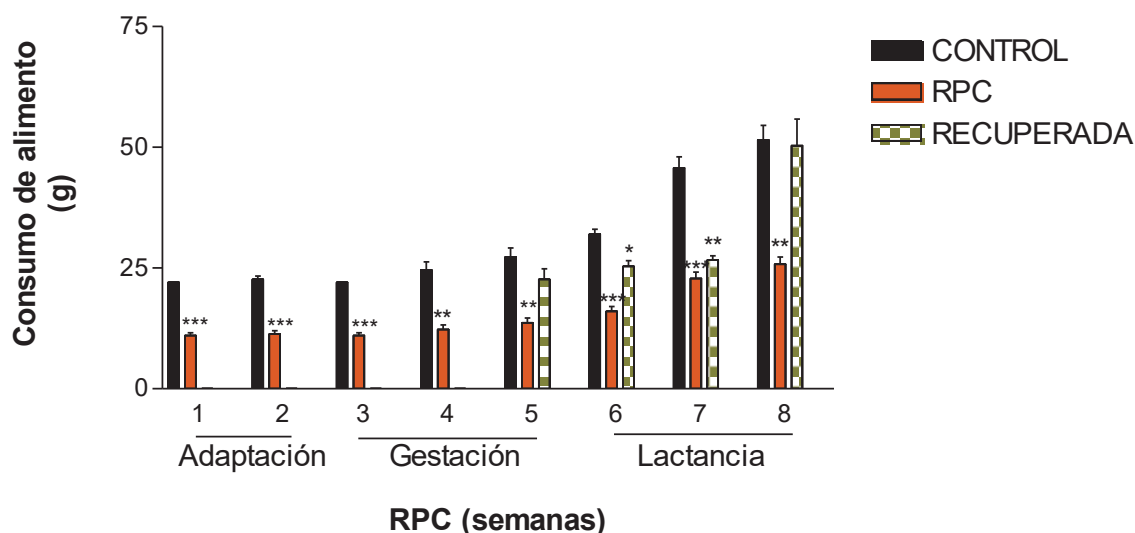


Figura 12. Consumo de alimento de las ratas madre. Ingesta de alimento de ratas madres control (C), con restricción proteico calórica (RPC) y recuperadas (R) desde la adaptación al modelo de restricción, la gestación y la lactancia de las crías. Los valores de la gráfica corresponden a tres experimentos independientes por triplicado. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$ indican cambios significativos con respecto al grupo control.

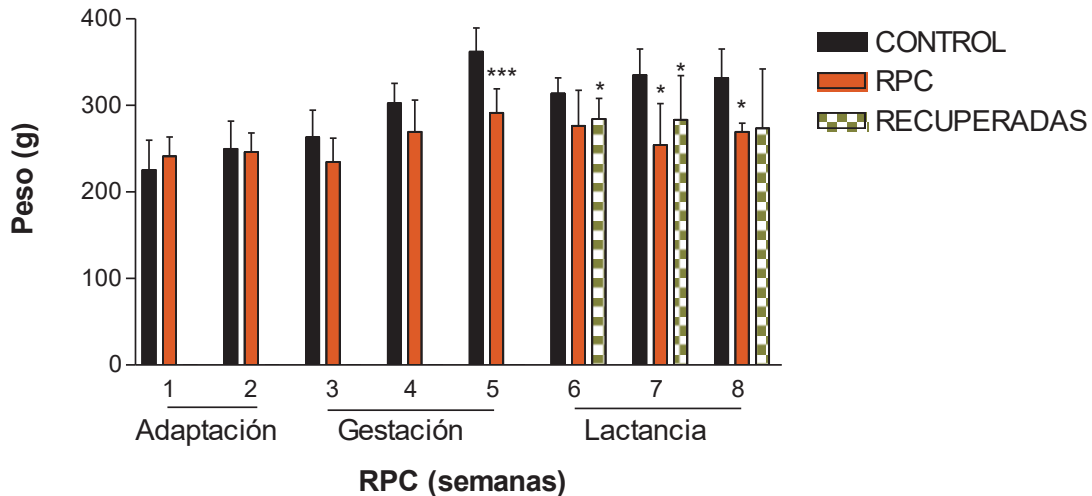


Figura 13. Peso corporal de las ratas madres. Evolución del peso corporal de las ratas madre control (C), con restricción proteico calórica (RPC) y recuperadas (R) desde la adaptación al modelo de restricción, la gestación y la lactancia de las crías. Los valores de la gráfica corresponden a tres experimentos independientes por triplicado * $p \leq 0.05$, *** $p \leq 0.001$ indican cambios significativos con respecto al grupo control.

X.2. Consumo de alimento de las crías

A partir del día 21 se midió el consumo de alimento de las crías hasta el día 60, se mantuvo el mismo esquema de RPC que las madres, proporcionando el 50% del alimento a las RPC con respecto al grupo control de las crías, mientras que se le proporcionó alimento *ad libitum* a las recuperadas al nacimiento y al destete. Se observa que hay un aumento en el consumo de alimento en los dos grupos recuperados con respecto al grupo RPC durante el periodo de análisis, aunque son menores al grupo control, excepto al día 21 donde el grupo recuperado al nacimiento consume más alimento que el grupo control (**figura 15**). Durante el desarrollo de este experimento se demostró que los dos grupos recuperados consumen menor cantidad de alimento que el grupo control aunque la recuperación sea al nacimiento o al destete después del día 21 de edad.

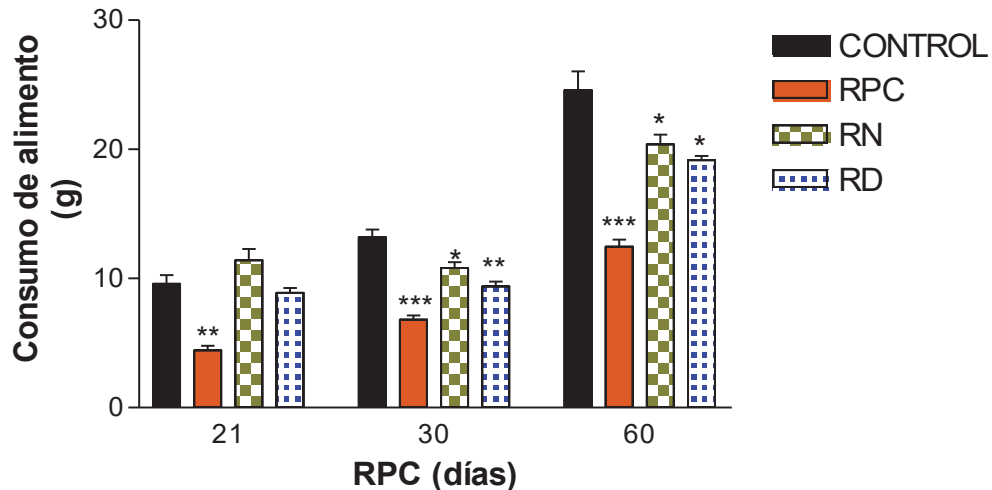


Figura 14. Consumo de alimento de las crías. Ingesta de alimento de las crías control (C), con restricción proteico calórica (RPC), recuperadas al nacimiento (RN) y recuperadas al destete (RD) desde el destete hasta la edad considerada como adultos (60 días). Los valores de la gráfica corresponden a tres experimentos independientes por triplicado. Las gráficas indican * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$ cambios significativos con respecto al grupo control.

X.3. Peso y Longitud céfalo-sacra de las crías en un esquema de RPC desde el nacimiento hasta los 60 días de edad

Con el objeto de observar la talla y peso con respecto a la ingesta de alimento se midió el peso corporal y longitud céfalo-sacra (LCS) de las crías de cada grupo experimental en los días 0, 3, 7, 14, 21, 30 y 60. Se observó diferencia significativa en el peso y la talla al nacimiento entre las crías de los grupos que presentaron RPC con respecto al grupo control (**Figuras 16 y 17**). Se muestra que el peso del grupo en RPC al 50% y el grupo RD es menor con respecto al grupo control en todas las etapas (excepto el día 3 del RPC), el grupo RN alcanza el peso del grupo control en todas las etapas e incluso es mayor al día 7 (durante la lactancia). Estos datos indican que el grupo con RPC tiene un peso por debajo del grupo control y aunque aumentan de peso durante todo las etapas se encuentran disminuida en forma significativa respecto al grupo control excepto al día 3 donde no se muestran cambios significativos entre ambos grupos. En los dos grupos recuperados hay cambios significativos con respecto al grupo control, pero es muy diferente la tendencia del peso del grupo recuperado al nacimiento y del grupo recuperado al

destete, ya que el grupo recuperado al nacimiento tiende a igualar el peso respecto al grupo control y el recuperado al destete nunca alcanza el peso del grupo control. El grupo recuperado al nacimiento aumenta de peso igual que el grupo control pero con una menor cantidad de ingesta de alimento y el grupo recuperado al destete en ninguna etapa alcanza el peso del grupo control (**Figura 16**). En cuanto a la longitud céfalo-sacra del grupo con RPC se observa una talla menor respecto al grupo control al igual que el grupo recuperado al nacimiento, mientras que el grupo recuperado al destete alcanza la talla del grupo control, excepto al día 14 donde que aumenta de talla. Estos resultados sugieren que durante la restricción proteico calórica *in útero* pueden existir cambios epigenéticos de los individuos ya que con menor cantidad en la ingesta de comida respecto al grupo control aumentan de peso y talla. Se observa que dependiendo de la etapa de recuperación el individuo llega a recuperarse casi como el individuo control (recuperado al nacimiento, periodo de lactancia) y que al destete nunca alcanza peso y talla normal, pero sí aumenta más que el grupo con RPC.

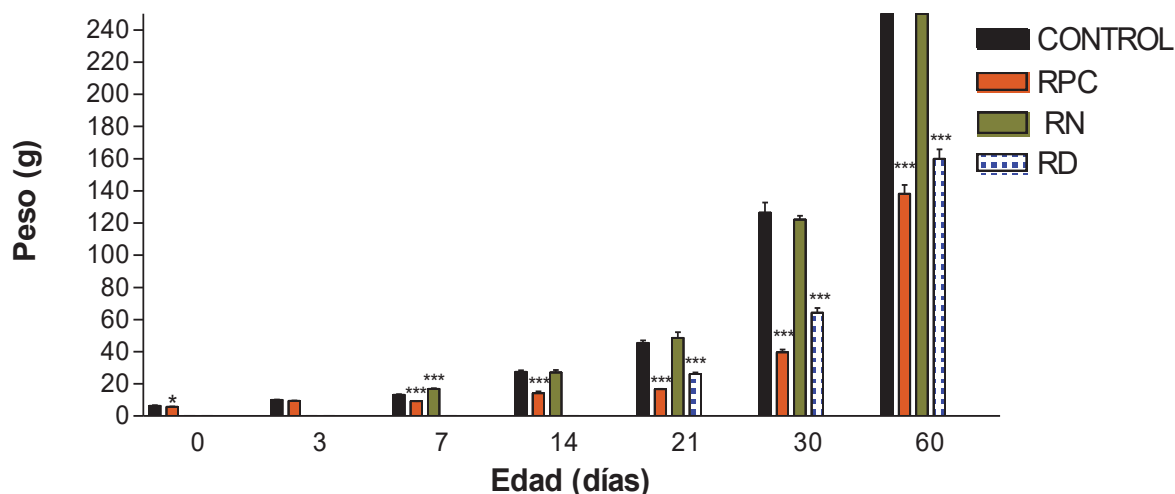


Figura 15. Peso corporal de las crías. Evolución del peso corporal de las crías control (C), con restricción proteico calórica (RPC), recuperadas (RN) y recuperadas al destete (RD) desde el nacimiento considerado como día 0 hasta el día 60 considerado como edad adulta. Los valores de la gráfica corresponden a tres experimentos independientes por triplicado * $p \leq 0.05$, *** $p \leq 0.001$ indican cambios significativos con respecto al grupo control.

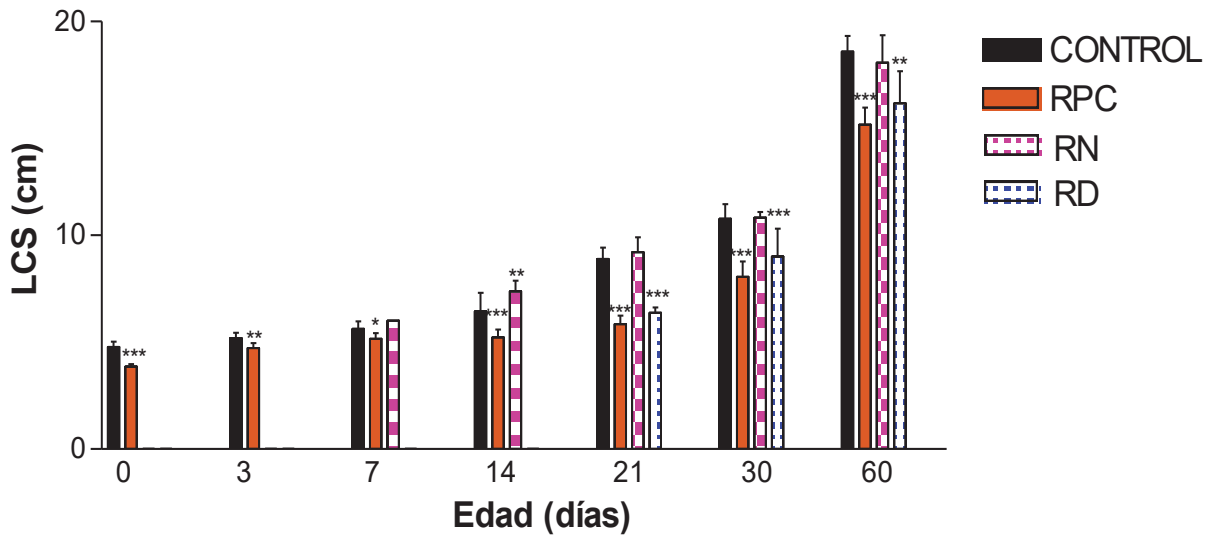


Figura 16. Longitud céfalo-sacra de las crías. Evolución de la longitud céfalo-sacra de las crías control (C), con restricción proteico calórica (RPC), recuperadas (RN) y recuperadas al destete (RD) desde el nacimiento considerado como día 0 hasta el día 60 considerado como edad adulta. Los valores de 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.

X.4. Expresión de las isoformas α de la bomba de sodio y potasio en corteza cerebral de ratas

Para estandarizar las condiciones y determinar si la estimulación de la síntesis de serotonina por administración de L-Trp y la RPC modificó la expresión de los genes para las isoformas α de la bomba de sodio y potasio, se analizó la expresión de estas mediante la técnica de RT-PCR. Inicialmente se evaluó la eficiencia de los oligonucleótidos para amplificar las isoformas α_1 , α_2 y α_3 en un gradiente de temperatura (55°C , 59°C y 60°C) con 30 ciclos y utilizó como control el gen constitutivo de la β -actina. Adicionalmente, se corroboró que los productos de amplificación mostraran un solo amplicón y la talla esperada de 247 pb para la subunidad α_1 , 264 pb para la subunidad α_2 y 285 pb para la subunidad α_3 , en los diferentes grupos. Las condiciones óptimas para la amplificación de la isoforma α fue a 55°C por 30 ciclos (**Figura 18**). Una vez establecidas las condiciones de amplificación se realizaron los ensayos bajo estos parámetros y posteriormente a la

cuantificación relativa de la expresión de estos genes en la corteza cerebral de ratas tratadas con L-Trp, con RPC al 50%, RN y RD.

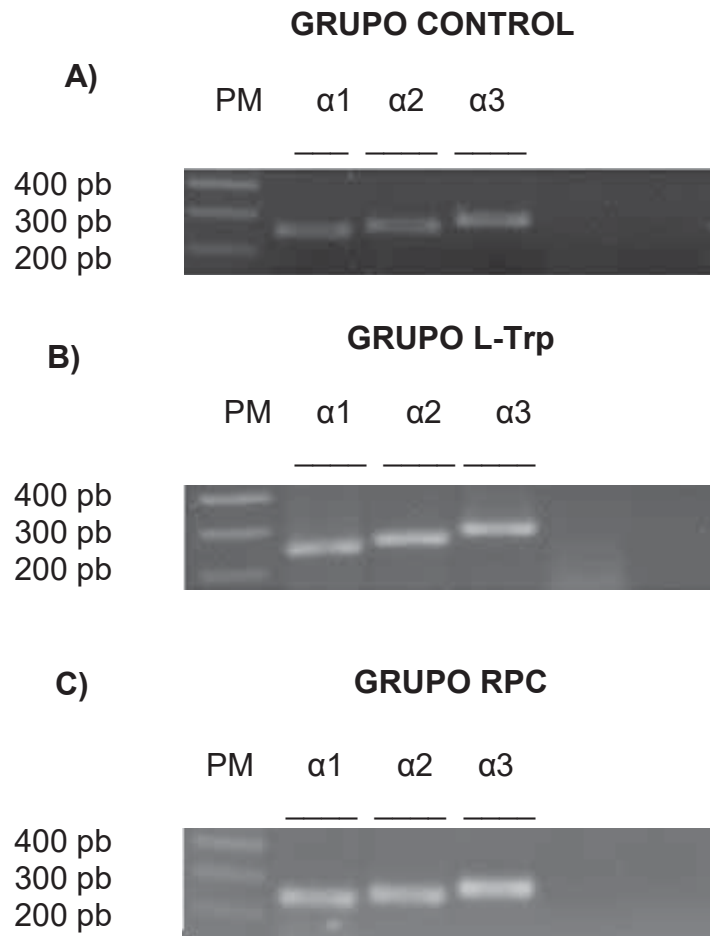


Figura 17. Productos de amplificación para las 3 isoformas α de la bomba de sodio y potasio en corteza cerebral de ratas control, L-Trp y RPC a 55°C por 30 ciclos. Muestra el tamaño correspondiente a las isoformas $\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\alpha 3$ de la bomba de sodio y potasio de los grupos control (A), del grupo administrado con L-Trp (B) y del grupo con restricción proteico calórica (C) en un gel representativo.

La **Figura 19** muestra los productos de amplificación del gen de la β -actina, se observan productos de tamaño de 200 pb, este gen se usó como gen de referencia ya que no muestra cambios en la expresión en ninguno de los 5 grupos experimentales de este estudio (**Figura 20**).

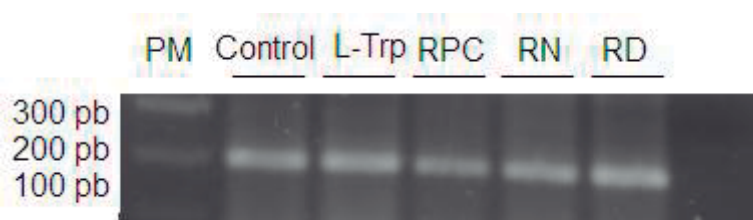


Figura 18. Productos de amplificación del gen de la β -actina en corteza cerebral de ratas de los diferentes grupos experimentales. Muestra el tamaño correspondiente al gen de la β -actina de 200 pb del grupo control, administradas con L-Trp (L-Trp), con restricción proteico calórica (RPC), recuperado al nacimiento (RN) y recuperado al destete (RD) en un gel representativo.

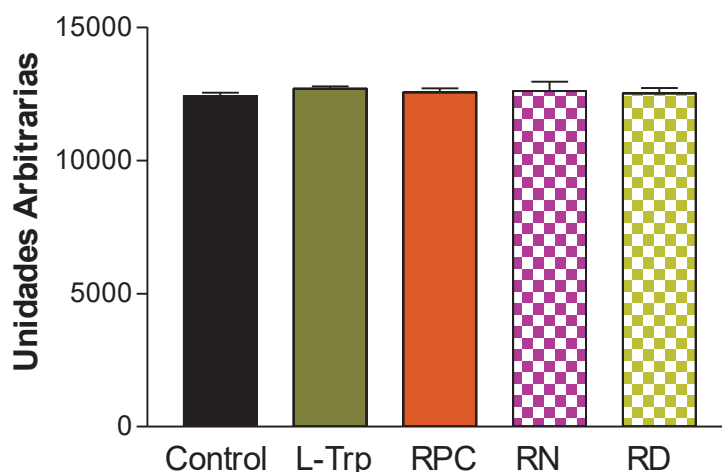


Figura 19. Expresión de la β -actina en corteza cerebral de ratas de los 5 grupos experimentales. Expresión de la β -actina en el grupo control, administrados con L-Trp (L-Trp), con restricción proteico-calórica (RPC), recuperada al nacimiento (RN) y recuperada al destete (RD). Los valores de la gráfica corresponden a tres experimentos independientes por triplicado. No se muestran cambios significativos con respecto al grupo control.

Una vez validado el gen de referencia se analizaron los productos de amplificación para la 3 isoformas α de la bomba de sodio y potasio en la corteza cerebral de ratas tratadas con L-Trp y con RPC.

En la **Figura 21** se muestra los productos de amplificación del gen $\alpha 1$ de la bomba de sodio y potasio con un tamaño de 247 pb. No hubo diferencias significativas del grupo L-Trp y RPC con respecto al grupo control (**Figura 22**).

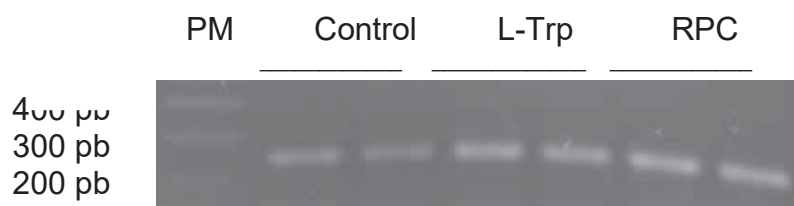


Figura 20. Productos de amplificación del gen de la isoforma $\alpha 1$ de la bomba de sodio y potasio en corteza cerebral de ratas. Muestra el tamaño correspondiente al gen de la isoforma $\alpha 1$ de 247 pb del grupo control, administradas con L-Trp (L-Trp) y con restricción proteico calórica (RPC) en un gel representativo.

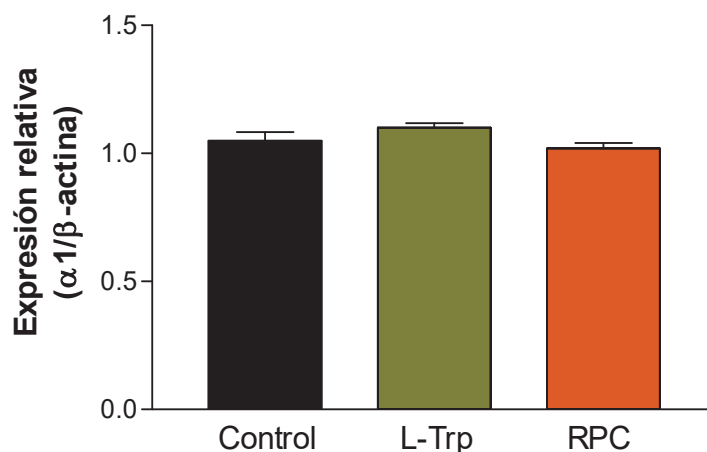


Figura 21. Expresión relativa de la isoforma $\alpha 1$ en corteza cerebral de ratas. Expresión de la isoforma $\alpha 1$ en el grupo control, administrados con L-Trp (L-Trp) y con restricción proteico calórica (RPC). Los valores de la gráfica corresponden a tres experimentos independientes por triplicado. No se muestran cambios significativos con respecto al grupo control.

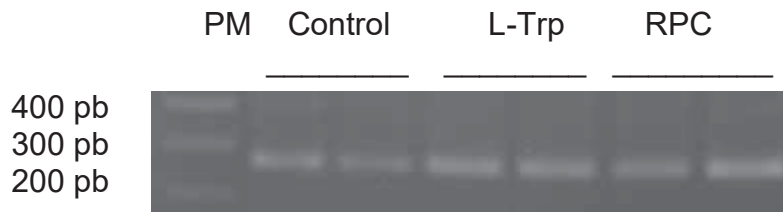


Figura 22. Productos de amplificación del gen de la isoforma $\alpha 2$ de la bomba de sodio y potasio en corteza cerebral de ratas. Muestra el tamaño correspondiente al gen de la isoforma $\alpha 1$ de 264 pb del grupo control, administradas con L-Trp (L-Trp) y con restricción proteico calórica (RPC) en un gel representativo.

En un principio solo se analizó la expresión de las 3 isoformas α de la bomba de sodio y potasio en 2 grupos con respecto al control, el grupo administrado con L-Trp y el grupo con RPC. Se observaron cambios únicamente en la expresión de la isoforma $\alpha 2$ en ambos grupos, por lo que se decidió analizar otros 2 grupos; el recuperado al nacimiento y recuperado al destete, ya que antecedentes han demostrado que queda alterada la vía serotoninérgica en ratas sometidas a restricción proteico calórica *in útero* (Manjarrézet *al.*, 1998).

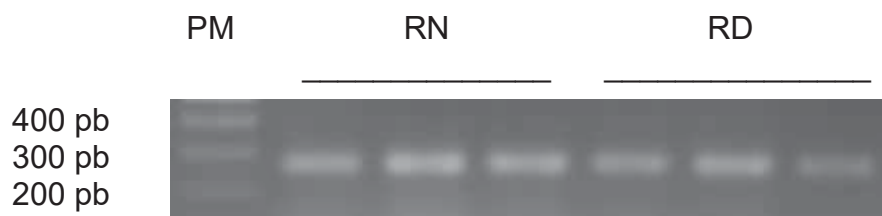


Figura 23. Productos de amplificación de la isoforma $\alpha 2$ y β -actina de la bomba de sodio y potasio en corteza cerebral de ratas. Muestra el tamaño correspondiente al gen de la isoforma $\alpha 1$ de 264 pb del grupo recuperado al nacimiento (RN) y recuperado al destete (RD) en un gel representativo.

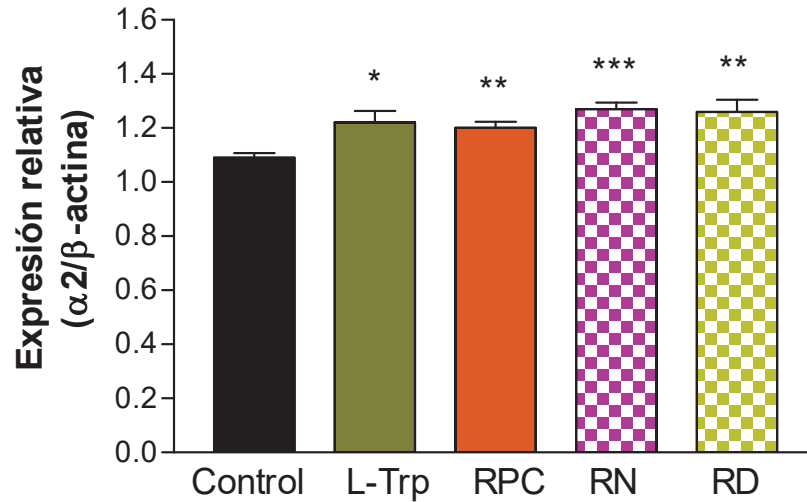


Figura 24. Expresión de la isoforma $\alpha 2$ de la bomba de sodio y potasio en corteza cerebral de ratas. Expresión de la isoforma $\alpha 2$ del grupo control, administrados con L-Trp (L-Trp), con restricción proteico calórica (RPC), recuperado al nacimiento (RN) y recuperado al destete (RD). Los valores de la gráfica corresponden a tres experimentos independientes por triplicado. * $p \leq 0.05$ para el grupo tratado con L-Trp y ** $p \leq 0.01$ para el grupo con RPC, *** $p \leq 0.001$ para el grupo RN, ** $p \leq 0.01$ para el grupo RD con respecto al grupo control.

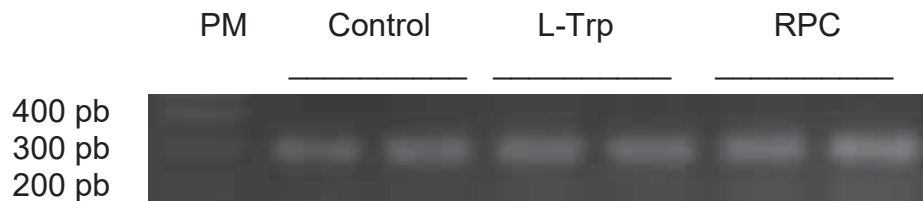


Figura 25. Productos de amplificación de la isoforma $\alpha 3$ de la bomba de sodio y potasio en corteza cerebral de ratas. Muestra el tamaño correspondiente al gen de la isoforma $\alpha 3$ de 287 pb del grupo control, administrado con L-Trp (L-Trp) y con restricción proteico calórica (RPC) en un gel representativo.

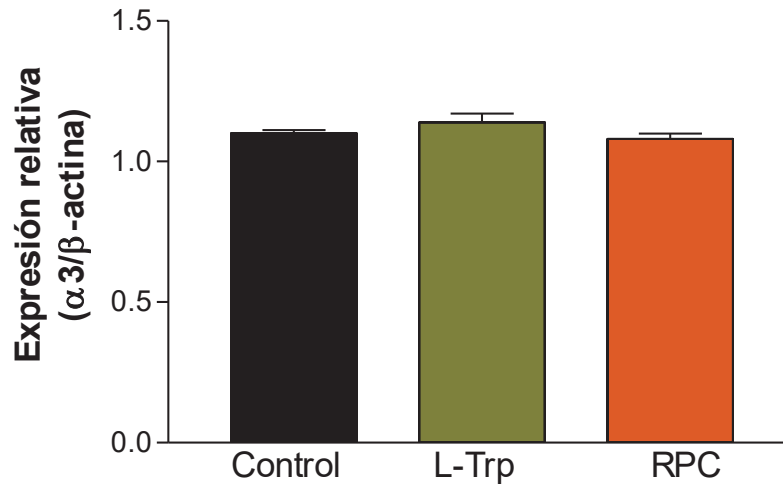


Figura 26. Expresión de la isoforma $\alpha 3$ de la bomba de sodio y potasio en corteza cerebral. Expresión de la isoforma $\alpha 3$ del grupo control, administrados con L-Trp (L-Trp) y con restricción proteico calórica (RPC). Los valores de la gráfica corresponden a tres experimentos independientes por triplicado. No se muestran cambios significativos con respecto al grupo control.

Para la isoforma $\alpha 1$ no hubo diferencias significativas del grupo tratadas con L-Trp y RPC con respecto al grupo control (**Figura 22**), para la isoforma $\alpha 2$ el grupo tratado con L-Trp aumentó la expresión relativa del RNAm un 11.9 % y el grupo con RPC aumentó un 10.9% con respecto al grupo control, únicamente en esta isoforma se observaron cambios significativos sobre la expresión del RNAm por lo que se decidió medir la expresión del grupo RD y RN, se observó un aumento de 16.51% para el grupo RN y 15.56% para el grupo RD con respecto al control (**Figura 25**). Para la isoforma $\alpha 3$ tampoco hubo cambios significativos de los grupos L-Trp y RPC con respecto al grupo control (**Figura 27**).

X.5. Actividad de la Bomba de Sodio y Potasio

Se ha propuesto que la bomba de sodio y potasio es regulada por factores extrínsecos como la serotonina, y que la administración de L-Trp y estados de restricción proteico calórica estimula la síntesis de serotonina (Hernández, 1992) y

ésta aumenta la actividad de la enzima. Algunos antecedentes muestran que la activación de la enzima es exclusiva de las células gliales y los resultados anteriores muestran que la única isoforma que induce su expresión es la subunidad $\alpha 2$, esta isoforma es la que se expresa en células gliales. A continuación se decidió medir la actividad de la bomba de sodio y potasio en la corteza cerebral de ratas administradas con L-Trp, ratas con RPC, RN y RD, los resultados se muestran en la **Figura 28**. Se observa un incremento en la actividad de la bomba de sodio y potasio de un 32% en la corteza cerebral de ratas tratadas con L-Trp, un 26% en ratas con RPC, un 13% en el grupo RN y un 7% en el grupo RD con respecto al grupo control.

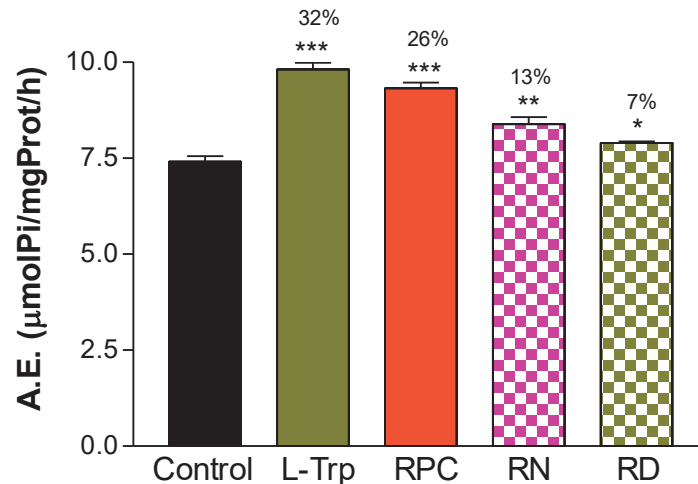


Figura 27. Actividad de la bomba de sodio y potasio en homogeneizado de corteza cerebral. La actividad de bomba de sodio y potasio aumento en todos los grupos experimentales pero en diferente porcentaje, 32% en el grupo tratado con L-Trp (L-Trp), 26% en el grupo con restricción proteico calórica (RPC), 13% en el grupo recuperado al nacimiento (RN) y 7% en el grupo recuperado al destete (RD). Las gráficas corresponden a tres experimentos independientes por triplicado. *** $p \leq 0.001$, ** $p \leq 0.01$ y * $p \leq 0.05$ respecto al grupo control.

Estos resultados sugieren que el aumento en la actividad de la bomba de sodio y potasio en homogeneizado de corteza cerebral corresponde a células gliales de corteza cerebral ya que la única isoforma que induce a la expresión de RNAm es la isoforma $\alpha 2$.

Se observa que el porcentaje de activación de la enzima es mayor en el grupo tratado con L-Trp debido a que la administración intraperitoneal es aguda y se alcanzan buenos valores basales en la concentración de serotonina ya que el tejido se extrae en poco tiempo de la inducción (Hernández, 1999), en el grupo con RPC se encuentra aumentada debido a que en este estado la concentración de albúmina queda disminuida y por lo tanto hay un aumento en la fracción libre del L-Trp por lo que hay un aumento en la síntesis de serotonina en comparación con el grupo control. En cuando a los grupos recuperados la actividad de la enzima se encuentra aumentada en comparación con el grupo control pero no como el grupo L-Trp o RPC, ya que queda alterada la vía serotoninérgica en ratas con restricción proteico calórica *in útero* aunque se recuperen nutricionalmente.

XI. DISCUSIÓN

El objetivo del presente trabajo fue determinar si en condiciones de estimulación de la síntesis de serotonina se tiene efecto sobre la actividad de la bomba de sodio y potasio y sobre la expresión de las isoformas de la subunidad catalítica de la enzima, por lo cuál, se estimuló la síntesis de serotonina mediante dos modelos experimentales, la administración intraperitoneal de L-Trp. aminoácido esencial precursor de la síntesis de serotonina y mediante el modelo de restricción proteico calórica in útero. En el presente trabajo no medimos la concentración de serotonina ya que existen antecedentes de nuestro laboratorio y de otros laboratorios que muestran que las estrategias experimentales utilizadas incrementan la síntesis de serotonina (Hernández, 1979; Rajani et al., 2006; Lopes et al., 2008).

Los resultados obtenidos muestran que existe un incremento en el RNAm de la isoforma $\alpha 2$ de la bomba de sodio y potasio, sin cambios en la expresión de las isoformas $\alpha 1$ y $\alpha 3$. Este incremento en la isoforma $\alpha 2$ sugiere un aumento en la expresión de la bomba de sodio y potasio en células gliales, las cuales son las que responden al estímulo de la serotonina y expresan predominantemente la isoforma $\alpha 2$ (Mosley et. al., 2007). Como ya se menciono, las células gliales son las encargadas de mantener el equilibrio electroquímico en el sistema nervioso central para la buena señalización neuronal (Bear et al., 2001).

En relación a la actividad de la bomba de sodio y potasio, los resultados obtenidos muestran que la administración del L-Trp incrementa la actividad de la bomba de sodio y potasio en corteza cerebral hasta un 32% y un 26% en ratas con RPC, 13% en ratas RN y 7% en ratas del grupo RD, tenemos algunos antecedentes en los que se han utilizado agonistas específicos del receptor 5-HT_{1A} y los cuáles incrementan la actividad de la enzima en corteza cerebral específicamente en células gliales (Peña et al., 1999) y cambios en la cinética enzimática de la bomba por un aumento de la V_{max} en diferentes regiones cerebrales (Mercado y Hernández, 1992; Manjarréz et al., 2003), este aumento puede ser a través de la activación del receptor 5-HT_{1A} que se encuentra en mayor proporción en corteza cerebral (Polter y Li, 2010). Con relación al incremento en la actividad de la enzima en los grupos

recuperados al nacimiento y al destete, se ha reportado que en animales desnutridos in útero mediante esquema de RPC, queda activada la vía serotoninérgica, es decir, se observa mayor síntesis de 5-HT y mayor actividad de la TPH comparadas con su respectivo grupo control, y aunque se recuperen nutricionalmente (Manjarréz et al., 1998), la serotonina se encuentra aumentada por lo tanto incrementa la actividad de la bomba de sodio y potasio, este efecto puede tener un significado funcional, por ejemplo para neutralizar la concentración de K^+ extracelular ya que se ha observado que en animales con RPC aumenta las concentraciones de este ión.

La conexión funcional de la serotonina y la bomba de sodio y potasio en tejido nervioso tiene una importancia relevante, ya que se debe de mantener un gradiente iónico en neuronas y glia para mantener el potencial de membrana.

En relación a los resultados obtenidos en el grupo administrado con L-Trp., se ha documentado que en desnutrición y esquemas de restricción proteica existe una baja en la síntesis de proteínas y por lo tanto en la concentración de la albúmina, y por consiguiente se presenta un aumento en la concentración en la fracción libre del L-Trp, el cuál atraviesa la BHE y incrementa la síntesis de serotonina y por lo tanto se presenta aumento en la actividad de la bomba de sodio y potasio (Hernández y Chagoya, 1986), aumenta también el ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA) producto de la degradación de la serotonina por un aumento en la síntesis de la misma (Chen et. al., 1992), o porque la TPH no se satura como en condiciones normales, o por cambios polimórficos en el 5-HTT (Kaye et. al., 2005) lo que lleva a una mayor concentración de serotonina, un incremento en la actividad de la bomba de sodio y potasio y por lo tanto un aumento en la remoción de K^+ por cambios en la cinética de la enzima.

Investigaciones epidemiológicas muestran que estados de desnutrición o restricción proteica durante el desarrollo son factores predisponentes para el desarrollo de la obesidad, diabetes y enfermedades cardiovasculares en el adulto, ya que como se muestra en las gráficas del modelo de restricción proteico calórica y aunque se recupere los grupos a diferentes etapas con menor ingesta de alimento aumentan de peso igual que el grupo control o en ocasiones hasta rebasan los valores de peso de una rata control como se observa en el grupo recuperado al nacimiento y que queda

alterada la conducta alimentaria regulada por serotonina por lo que estos individuos se satisfacen más rápido que las control pero aumentan la talla y el peso (Orozco et al., 2009).

En el grupo recuperado al destete el efecto es más severo en cuanto a la talla y el peso, ya que aunque son recuperadas nutricionalmente aumentan de talla y peso pero no alcanzan los valores de una rata control y aunque incrementa la expresión de gen de la isoforma $\alpha 2$, la actividad de la bomba de sodio y potasio aumenta comparada con el grupo control pero no de la misma manera que los demás grupos experimentales, esto sugiere que se incrementa la expresión del gen de la isoforma $\alpha 2$ la bomba de sodio y potasio pero que tal vez las enzimas no están tan activas como en los otros grupos experimentales y que entre más tiempo de restricción proteico calórica los efectos son más críticos.

Estudios experimentales de animales bajo un esquema de restricción proteica muestran que la programación es la respuesta a estados de desnutrición gestacional para adaptarse a periodos críticos durante el desarrollo fetal y una permanente modificación fisiológica y metabólica para sobrevivir, como el aumento de tejido adiposo para garantizar energía al metabolismo (Miñana y Escobar, 2007).

La programación y epigenética del individuo es producto de alteraciones y cambios en los niveles de neurotransmisores, por ejemplo, el aumento en la concentración de la serotonina induce a desestabilización en la acción anoréxica por esta misma, cambios en los circuitos hipotalámicos y por lo tanto desordenes en la ingesta de comida (Lopes et al., 2088), esto explica los resultados obtenidos donde los grupos RN y RD muestran una ganancia de peso con una ingesta menor a la del grupo control. Se ha demostrado que en estados de desnutrición se presenta un menor peso cerebral, menor concentración de proteínas, menor contenido de DNA y RNA (Leiva et al., 2001), por lo que en estados de desnutrición se reduce la división celular del cerebro, la mielinización, los procesos organizacionales del cerebro como la neurogénesis, migración celular y diferenciación, lo que conduce a ciertas formas de epilepsia, retraso mental y esquizofrenia por alteraciones en este proceso del desarrollo (Leiva et al., 2001). Se ha demostrado que en modelos efectuados en ratas, que se afecta el crecimiento del cuerpo calloso por lo tanto área de fibras que

conecta los hemisferios cerebrales en los mamíferos y a la vez, es bien conocido que en ratas con restricción durante la gestación, se altera la simetría cerebral y el crecimiento de las células piramidales, que son las que se expresan en corteza cerebral (Leiva, et al., 2001).

La relevancia fisiológica del aumento en la expresión de la isoforma $\alpha 2$ del presente trabajo es que se pueden revertir varias patologías o afecciones neurológicas, ya que en animales knock-out para las isoformas α conduce a patologías como la ansiedad, desórdenes motores, afecciones sobre el aprendizaje y memoria espacial, esto por un aumento en la excitabilidad en neuronas piramidales y por un aumento de K^+ extracelular debido a que los mecanismos de remoción son insuficientes por la falta de ATPasas (Mosley et. al., 2007).

Se ha observado defectos en el comportamiento de animales por cambios en los niveles de expresión de los genes que codifican para las isoformas α , la reducción en la expresión de la isoforma $\alpha 2$ y $\alpha 3$ resulta en déficit en la atención, aprendizaje y memoria (Leiva et al., 2001), también se han observado reducción de la actividad locomotora por cambios en la isoforma $\alpha 2$ e hiperactividad por reducción de la expresión de la isoforma $\alpha 3$, por lo tanto reducción en la expresión de la isoforma $\alpha 2$ conduce a una reducción de la bomba de sodio y potasio ya que es la encargada de mantener la excitabilidad eléctrica de las células para mantener la polaridad de las neuronas y la serotonina puede ayudar a revertir este efecto.

Se ha observado que en el cerebelo la serotonina incrementa la actividad de la bomba de sodio y potasio y que también se incrementa la expresión de la isoforma $\alpha 2$ en ratas con estrés nutricional (Nava, 2012), lo que nos sugiere que los resultados obtenidos en el presente trabajo son comunes en cuanto a la activación de los factores de transcripción en esta condición, es decir, el efecto de la activación de la bomba de sodio y potasio por serotonina está relacionado con incrementos en la expresión de la enzima.

XII. CONCLUSIÓN

Estados de estrés nutricional incrementan la expresión del gen de la isoforma $\alpha 2$ y la actividad de la bomba de sodio y potasio en la corteza cerebral de ratas.

XIII. BIBLIOGRAFÍA

- Acosta, Ch. J., (2010) Neurontogenia del receptor 5-HT_{2B} de la papila caliciforme del receptor 5-HT_{2B} de la papila caliciforme de la rata. (Tesis de Maestría). Facultad de Químico Farmacobiología. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Morelia, Michoacán, México.
- Barren, A. B. (1999) A New Role for Glia: Generation of Neurons!. *Minireview Cell*.97: 667–670
- Bear, F.M., Connor, B. W. y Paradiso, M.A. (2001) *Neuroscience exploring the brain*. Editorial Lippincott Williams & Wilkins. Segunda edición. Cap. 2:23-47
- Blanco, G. y Mercer, W. R.(1998) Isoenzymes of Na⁺/K⁺-ATPase: heterogeneity in structure, diversity and function. *Am. J. Physiology Renal Physiol*.275:F633-F650.
- Chen, C.J., Tonkiss, J., Galler, R.J. yVolicer, L. (1992) Prenatal protein malnutrition in rats enhances serotonin release from hippocampus. *J. of Nutrition*.122: 2138-2143.
- Clifford, J., R. y Kaplan, H., J. (2009) Regulation of Na⁺/K⁺-ATPase subunit abundance by translational repression. *J. Biol. Chem*.34:22905-22915.
- Colas, J.F., Launary, J.M. Vonesch, J.L., Hickel, P., y Maroteaux, L. (1999) Serotonin synchronise convergent extension of ectoderm with morphogenetic gastrulation movements in *Drosophila*. *Mech. Dev*.87:77-91.
- De Boer, A.G., Van der Sandt, I.C. y Gaillard, P.J. (2003) The role of Drug Transporters at the Blood- Brain Barrier. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol*.43:629-656.
- Diaz, M.A., Chagoya, G. G. y Hernández, R. J. (1993) Modificación por la desnutrición ontogénica de la neurotransmisión serotoninérgica cerebral y de conducta relacionada. *Biol. Med. Infant.Mex*.50. 17:26.
- Dumuis, A., Bouhelal, R., Sebbe, M. y Bockaert, J. (1988) A 5-HT receptor in the central nervous system positively coupled with adenylycyclase, is antagonized by IC S 205-930. *Eur. J. Pharmacol*.146:187-195.
- Feraille, E., y Doucet, A. (2001) Hormonal control of Na⁺/K⁺-ATPase dependent sodium transport in the kidney. *Physiol. Rev*.81:395-418.

- Feschenko, S.M., Donnet, C., Wetzel, K. R., Asinovski, K. N., Jones, R. L. y Sweadner, J.K.(2003) Phospholemmann a Single Span membrane protein, is an accessory protein of Na,K-ATPase in cerebellum and Choroid plexus. *J. Neuro.*23(6):2161-2169.
- Fiske, C. y Subabarrow, Y. (1925) The colorimetric determination of phosphorus. *J. Biol. Chem.*66: 375-400.
- Glickstein, M. (2006) Golgi and Cajal the neuron doctrine and the 100th anniversary of the 1906 Nobel Prize. *Magazine Current Biology.*6 No.5:147-151.
- Hagmann, P., Cammoun, L., Gigandet, X., Meuli, R., Honey, J. C., Wedeen, J. V. y Sporns, O. (2008) Mapping the Structural Coreof Human Cerebral Cortex. *Plos Biology.*6: 1479-1493).
- Herlenius, E. y Lagercrantz, H. (2001) Neurotransmitters and neuromodulators during early human development. *Rev. of Early Human Dev.*65:21–37.
- Hernández, R.J. (1979) Na⁺/K⁺-ATPase activity en de brain cortex of rats ontogenetically malnourished and treated with serotonin precursor. *Brain Res.*162:348-358.
- Hernández, R.J. (1990) Early experimental influences on Serotonin Pathways during brain development. *Adv. Exp. Med. Biol.*265:261-267.
- Hernández, R.J. y Chagoya, G. (1986) Brain serotonin synthesis and Na⁺/K⁺-ATPase activity are increased postnatally after prenatal administration of L-Tryptophan. *Dev. Brain. Res.*25:221-226.
- Higginbotham, R.G. y Gleeson G.J. (2007) The centrosome in neuronal development. *Review Trends of neurosciences.*30: 276-283.
- Huether, G., Hajak, G., Reimer, A., Poeggeler, B., Blömer, M., Rodenbeck, A. y Rüther, E. (1992) The metabolic fate of infusedL -tryptophan in men: possible clinical implications of the accumulation of circulating tryptophan and tryptophan metabolites.*Psychophar.*109:422-432
- Hull, M.E., Muschamp, W.J. y Sato, S. (2004) Dopamine and Serotonin: influences on male sexual behavior. *Physiol. Behav.*83:291-307.
- Johansson, C.B., Momma, S., Clarke, D.L., Risling, M., Lendahl, U. y Friesen, J. (1999) Identification of a neural stem cell in the adult mammalian central nervous system. *J. Cell.*96:25–34.

- Kaye, H.W., Frank, G.K., Bailer, F.U., Henry, S.E., Meltzer, C.C., Price, J.C., Mathis, A. C. and Wagner, A. (2005) Serotonin alterations in anorexia and bulimia nervosa: New insights from imaging studies. *Physiol. and Behav.* 85:73-81.
- Lauder, J.M., Wallace, J.A. y Krebs, H. (1981) Roles of serotonin in neuroembryogenesis. *Adv. Exp. Med. Biol.* 133: 477-506.
- Leiva, P. B., Inzuanza B. N., Pérez T. H., Castro G. V., Jasana M. J., Toro D. T., Almagiá F. A., Navarro D. A., Urrutia C. M., Cervilla O.J. e Ivanovic M. D. (2001) Algunas consideraciones sobre el impacto de la desnutrición en el desarrollo cerebral, inteligencia y rendimiento escolar. *Archivoslatinoamericanos de nutrición.* 51(1).69:71.
- Lidov, G.H., Molliver, E.M, (1982) An immunohistochemical study of serotonin neuron development in the rat: Ascending pathways and terminal fields. *Brain Res. Bulletin.* 8:389-430
- Lopes, S. S., Orozco, S. R., Grit I., Manhães, C. R. y Bolaños, J. F. (2008) Perinatal protein restriction reduces the inhibitory action of serotonin on food intake. *J. of Neuroscience.* 1:9.
- Lowry, O., Rosebrough, N., Farr, A. y Randall, R. (1951) Protein measured with the Folin phenol of reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.
- Luhmann, H.J., Hanganu I., y Kilb, W., (2002) Cellular physiology of the neonatal rat cerebral cortex. *Brain Res. Bulletin.* 60:345-353.
- Manjarrez, G. G., Herrera, M. R., Hernández, Z. E., Manuel, A. L., González, R. M. y Hernández, R. J. (1998) Elevación crónica de la síntesis de serotonina cerebral en rata adulta desnutrida in utero y recuperada nutricionalmente durante el amamantamiento. *Biol. Med. Hosp. Infant. Mex.* 55:651-657.
- Manjarrez, G., Manuel, L., Mercado, R. y Hernández, J. (2003) Serotonergic receptors in the brain of in utero undernourished rats. *International Journal of Developmental Neuroscience.* 21(5):283-289
- Mercado, C. R. y Hernández, R. J. (1992) Regulatory role of a neurotransmitter (5-HT) on glial Na⁺/K⁺-ATPase in the rat brain. *Neurochem.* 1:119-127.
- Miñana, S.M. y Escobar, C. (2007) Increased Susceptibility to Metabolic Alterations in Young Adult Females Exposed to Early Malnutrition. *J. Biol. Scienc.* 3:12-19.
- Moreno, V.J. y Dalmau, S.J. (2001) Alteraciones en la nutrición fetal y efectos a largo plazo: ¿algo más que un hipótesis?. *Acta Pediátrica Española.* 59: 573-58.

- Mosley, E. A., Williams, M.T., Schaefer, L.T., Bohanan, S.C., Neumann, C.J., Behbehani, M. M., Vorhees, V.C. y Lingrel, B.J. (2007) Deficiency in Na⁺/K⁺-ATPase α isoform genes alters spatial learning, motor activity and anxiety in mice. *J. of Neurosc.*27(3):616-626.
- Nava, G.G. (2012) Regulación de la expresión de las isoformas alfa de la bomba de sodio y potasio por serotonina en cerebelo de ratas con estrés nutricional (Tesis de Maestría). Facultad de Químico Farmacobiología. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Morelia, Michoacán, México.
- NORMA Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999. Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. Pág.1-58.
- NORMA Oficial Mexicana NOM-087-ECOL-1995. Que establece los requisitos para la separación, envasado, almacenamiento, recolección, transporte, tratamiento y disposición final de los residuos peligrosos biológico-infecciosos que se generan en establecimientos que presten atención médica. Pág.1-16.
- Orozco, S.R., Lopes, S.S., Barbosa, M.R., Grit, I., Le Bloch, J., Nguyen, P., Manhães, C. R. y Bolaños, J. F. (2009) Perinatal undernutrition-induced obesity is independent of the developmental programming of feeding. *J. Physiol. & Behav.* 96:481-492.
- Parrish, Z. J., Emoto, K., Kim, D.M. y Jan, N.J. (2007) Mechanisms that Regulate Establishment, Maintenance, and Remodeling of Dendritic Fields. *Annual Rev. of Neurosc.*30: 399-423.
- Peña, R. T., Mercado, C.R. y Hernández, R.J (1999) Regulation of glial Na⁺/K⁺-ATPase by Serotonin: Identification of participating receptors. *Neurochem. Res.* 24(5):643-649.
- Pérez, G.G., Liy, S.G. y Meneses, A. (2006) Receptores serotoninérgicos y memoria. *Rev. Mex. de análisis de la conducta.*32:241-269.
- Polter, A.M., and Li, X. (2010) 5-HT_{1A} Receptor-regulated signal transduction pathways in brain. *J. Cellular Signalling.*22 :1406-1412.
- Purves, A., Fitzpatrick, K., LaMantia y McNamara (2002) Invitación a la neurociencia. Edit.Panamericana.Pág. 88
- Rajani K., Uma Maheswara R., y Raju, T.N., (2006) Behavioral, morphological and physiological shift in the rats administered with tryptophan deficient regime. *Nutr.Hosp.*21(5):596-603

- Riganti, C., Campia, I., Kopecka, J., Gazzano, E., Doublier, S., Aldieri, E., Bosia, A. y Ghigo D. (2011) Pleiotropic effects of cardioactive glycosides. *Cur. Med. Chem.*18(6):872-885.
- Salter, M., Knoules, G.R., y Pogson, I.Ch. (1989) How does displacement of albumn-bound tryptophan cause sustained increases in the free tryptophan concentration in plasma and 5-hydroxytryptamine synthesis in the brain. *J. Biochem.*262 :365-368.
- Shwinger, R. H. G., Hening, B., Müller-Ehmsen, J. y Keld, K. (2002) The Na⁺/K⁺-ATPase in the failing human heart. *Cardiovascular Res.*57:913-920.
- Simard, M., y Nedergaard, M. (2004) The neurobiology of glia in the context of water and ion homeostasis. *Rev. Neurosc.*129:877-896.
- Smith, L.J., Henderson, J.A., Abell, C.W. y Bethea, C. L. (2004) Effects of ovarian steroids and raloxifene on proteins that synthesize, transport, and degrade serotonin in the raphe region of macaques. *J. Neuropsychophar.*29(11):2035-2045.
- Tagliamonte, A., Biggio, G., Virgin, L., y Gessa, GL. (1973) Free tryptophan in serum controls brain tryptophan level and serotonin synthesis. *Life Sci.*12(6): 277-287.
- Teriete, P., Thai, K., Choi, J. y Marassi F. (2009) Effects of PKA phosphorylation on the conformation of the Na⁺/K⁺-ATPase regulatory protein FXYD1. *Biochem. Biophys.*1788 (11):2462-2470.
- Therien, G.A. y Blostein R. (2000) Mechanisms of sodium pump regulation. *J. Cell. Physiol.* Rev.279:C41-C566.
- Tokhtaeva, E., Sachs, G. y Vagin O. (2009) Assembly with the Na⁺/K⁺-ATPase α 1 subunit is required for Export of β 1 and β 1 Subunits from the Endoplasmic Reticulum. *J. Biochem.*848 (48):11421-11431.
- Walther, D.J., Peter, J.U., Bashammakh, S., Hörtnagl, H., Voits, M., Fink, H. y Bader, M. (2009) Synthesis of serotonin by a second tryptophan hydroxylase isoform. *Science.*20: 398-399.
- Wang, H., Yuang, Q. W. y Lu R.Z. (2000) Differential regulation of the Sodium pump α - subunit isoform gene by ouabain and digoxin in tissues of rats. *Hypertens. Res.*23:55-60.