

11261
6
2ej



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

F. M.

Centro de Neurobiología
Campus Juriquilla, Qro.

UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE
MEXICO

Caracterización del receptor que
participa en la regulación por serotonina
de la Na⁺/K⁺-ATPasa cerebral.

TESIS

Que para obtener el grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS (NEUROBIOLOGIA).

Biomedicas

presenta

María Teresa Peña Rangel.

TUTOR

Dr. Jorge Hernández Rodríguez.

Querétaro, Qro.

1999.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

275542.

1.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

PAGINACION

DISCONTINUA

El presente trabajo se realizó en el laboratorio de Biología Celular y Microbiología de la Licenciatura en Biología de la Facultad de Ciencias Naturales de la Universidad Autónoma de Querétaro y en el laboratorio de Neurontogenia del Departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias del Centro de Investigaciones y de Estudios Avanzados del IPN (CINVESTAV), México bajo la dirección del Dr. Jorge Hernández Rodríguez, investigador titular del mismo Centro. Durante la realización del trabajo se contó con el apoyo de una beca del CONACYT.

INDICE

	Página
RESUMEN.....	4
SUMMARY.....	6
INTRODUCCION	
El sistema serotoninérgico cerebral	
Generalidades.....	8
Síntesis de la serotonina.....	10
Receptores serotoninérgicos cerebrales.....	11
Adenosin trifosfohidrolasa estimulada por Na^+/K^+ dependiente de Mg^+ (Na^+/K^+ -ATPasa o bomba de Na^+/K^+).	
Características generales de la Na^+/K^+ -ATPasa cerebral.....	14
Función de la Na^+/K^+ -ATPasa	15
Isoformas del complejo enzimático en el cerebro.....	17
Regulación del complejo enzimático.....	18
Regulación de la Na^+/K^+ -ATPasa cerebral por serotonina	18
OBJETIVOS.....	22
HIPOTESIS.....	22
MATERIAL Y METODOS	
Material biológico.....	23
Preparación de los homogeneizados de cerebro.....	23
Obtención de las fracciones enriquecidas con membranas gliales o neuronales.....	23
Medición de la actividad específica de la Na^+/K^+ -ATPasa cerebral.....	24
RESULTADOS Y DISCUSION	26
CONCLUSIONES.....	36
REFERENCIAS.....	59

RESUMEN

Existen varios reguladores intrínsecos (Na^+ , Mg^+ , ATP, K^+) y algunos extrínsecos como hormonas o neurotransmisores, que modifican la actividad de la Na^+/K^+ -ATPasa en diferentes tejidos. Se ha demostrado que la serotonina (5-HT) modula la actividad de la enzima en varias regiones cerebrales. La mayor respuesta se ha observado en regiones ricas en terminales serotoninérgicas como la corteza cerebral, el hipocampo y el estriado. Otros experimentos han sugerido que esta modulación ocurre en las células gliales (astrocitos) a través de un receptor (o receptores) de serotonina que hasta antes de este trabajo no se habían caracterizado. Se ha observado que la cinética de la bomba de Na^+/K^+ se modifica en presencia de serotonina en preparaciones membranales de células gliales de cerebro o en astrocitos cultivados con un aumento de la V_{max} . La serotonina induce la exposición de más sitios activos del complejo enzimático lo que se corroboró con un aumento en la unión de ^3H -ouabaina. En la actualidad se conocen varios tipos y subtipos de receptores serotoninérgicos nombrados 5-HT1A a 5-HT7. El presente trabajo nos permitió obtener información sobre los sistemas de receptores serotoninérgicos involucrados en la regulación de la Na^+/K^+ -ATPasa, utilizando un criterio farmacológico.

Se midió la actividad de la bomba de Na^+/K^+ en cuatro regiones cerebrales: corteza cerebral, cerebelo, hipocampo y tallo cerebral. Se observó un aumento en la actividad de la enzima dependiente de la concentración con un agonista de receptores 5-HT1A, la 8-OH-DPAT, en homogeneizados o en fracciones enriquecidas con membranas gliales de la corteza cerebral y en el hipocampo. La espiperona, un antagonista 5-HT1A inhibió completamente la respuesta a la 8-OH-DPAT pero no a la 5-HT. Resultó muy interesante que la 8-OH-DPAT no tuvo ningún efecto sobre la actividad de la bomba de sodio en el cerebelo en donde el LSD, un agonista de los

receptores 5-HT₆ mostró una respuesta dependiente de la dosis, muy similar a la obtenida con 5-HT. Se confirmó la falta de respuesta a la 5-HT y a otros agonistas en el tallo cerebral.

Todos estos resultados demuestran una vez más que la serotonina modula la actividad de la Na⁺/K⁺-ATPasa en astrocitos en el cerebro y no sólo a través de un tipo de receptor serotoninérgico. Nuestros datos apoyan que el receptor involucrado es diferente dependiendo de la región cerebral. En la corteza cerebral hay una regulación parcial sobre la bomba de Na⁺/K⁺, a través de receptores 5-HT_{1A}, en el hipocampo hay una regulación total por los receptores 5-HT_{1A} y en el cerebelo, son los receptores 5-HT₆ los que están involucrados específicamente. Los resultados de esta investigación aportan información nueva que permite conocer más integralmente el mecanismo de la regulación de la bomba de Na⁺ por la serotonina en el cerebro lo que parece depender de las características funcionales de cada región cerebral involucrando diferentes tipos de receptores serotoninérgicos que en este caso se localizan en las células gliales.

SUMMARY

There are several intrinsic regulatory factors (Na^+ , Mg^{++} , ATP, K^+) or extrinsic ones like hormones or neurotransmitters which modify the activity of the Na^+/K^+ -ATPase in different tissues. It has been shown that in several rat brain regions, serotonin (5-HT) modulates the Na^+/K^+ -ATPase activity. The higher response was observed in the regions rich in serotonergic terminals such as the cerebral cortex, hippocampus and striatum. Other experiments suggested that this modulation is exerted on astrocytes through a specific serotonin receptor which has not been yet characterized. In the implicit mechanism, the kinetics of Na^+/K^+ -ATPase is modified in membrane preparations of glial cells from brain or in cultured astrocytes with increase of the reaction rate by serotonin inducing the exposure of more active sites of the enzyme complex confirmed by an increase of the ^3H -ouabain binding. Actually several types and subtypes of serotonergic receptors are known named 5-HT1 to 5-HT7, which take part in diverse functions. The present work allowed us to get specific information on the serotonergic receptor's system involved in Na^+/K^+ -ATPase regulation through a pharmacological approach.

The activity of the Na^+/K^+ pump was measured in four brain regions. A concentration-dependent increase in the enzyme activity was observed with the 5-HT1A agonist, 8-OH-DPAT, in homogenates or in fractions enriched with glial membranes from the cerebral cortex and from the hippocampus. Spiperon a 5-HT1A antagonist inhibited completely the response to 8-OH-DPAT but not that to 5-HT. Interestingly 8-OH-DPAT had no effect on the Na^+/K^+ -ATPase activity in the cerebellum where LSD, a 5-HT6 agonist elicited a dose-dependent response similar to that of 5-HT. In the brainstem, a lack of response to 5-HT and other agonists was confirmed.

Altogether these results confirm that serotonin modulates Na^+/K^+ -ATPase activity in astrocytes in the brain not through only one type of 5-HT receptor. According to the brain region the involved receptor is different. In the cerebral cortex there is a partial regulation by 5-HT1A, but in the hippocampus there is a total regulation by 5-HT1A and the cerebellum 5-HT6 seem to be involved more specifically.

The results from the present investigation give new information that allow a more integral knowledge of the regulatory mechanism that serotonin exerts on the Na⁺ pump in the brain, involving different serotonin receptor's systems located in this case in glial cells.

INTRODUCCION

El sistema serotoninérgico cerebral.

Generalidades.

A mediados del siglo XIX se había observado que un compuesto presente en el suero de humano inducía un aumento en la frecuencia cardíaca y respiratoria así como un aumento en la presión sanguínea. Otros efectos consistían en un incremento en la peristalsis del intestino delgado. Cuando se inició la caracterización de la molécula vasoconstrictora encontrada en el suero, se le llamó serotonina, y enteramina la que provocaba la contracción en el intestino (Rapport et al., 1948). Posteriormente se aisló el principio activo de ambas fuentes tisulares y sus características coincidieron con la 5-hidroxitriptamina o 5-HT. Twarog y Page en 1953, demostraron la presencia de 5-HT en el sistema nervioso central (SNC). Amin y col., en 1954 encontraron concentraciones importantes en el hipotálamo (Siegel et al., 1989).

La serotonina es producida por varios tipos de células, no solamente la sintetizan las neuronas sino también las células cromafines de la mucosa intestinal en los mamíferos y en otros animales como reptiles, anfibios, peces y aves e incluso está presente en los vegetales. La 5-HT no atraviesa la barrera hematoencefálica y se ha demostrado que las neuronas sintetizan su propia serotonina (McGeer et al., 1987). De hecho sólo del 1 al 2 % de la serotonina total, está presente en el cerebro.

Woolley y Shaw (McGeer et al., 1987) observaron que algunos compuestos como el ácido lisérgico o LSD que tiene una gran similitud con la serotonina por su naturaleza indol, altera los patrones de comportamiento en los humanos y propusieron que las alteraciones en la transmisión serotoninérgica cerebral podrían ser la causa de algunas enfermedades mentales. Su hipótesis permanece vigente sobre todo en relación con algunas formas de depresión.

Existen estudios en los que se atribuye al sistema serotoninérgico cerebral una participación en la regulación de diversas funciones orgánicas como: el control de la temperatura corporal, la secreción endócrina, el comportamiento sexual, el dolor, la presión sanguínea y los mecanismos fisiológicos del sueño (Siegel et al., 1989). Se ha observado que hay una alteración en la conducta

alimentaria en cuanto a la selección de nutrimentos como consecuencia de la activación del sistema serotoninérgico producida por la desnutrición temprana en ratas (Díaz et al., 1993; Shor-Posner y Grinker, 1986). Se ha descrito que el control temporal, se pierde en animales tratados con agonistas de la 5-HT (Oscós y Hernández, 1982). Por otra parte varios investigadores, entre ellos Manjarréz et al (1988), Gromová et al., Ahmad y Zamenhof (Evrard y Minkowski, 1989) y Mercado y Hernández (1992) y Mercado et al (1998), han demostrado que la serotonina tiene una función como un factor promotor en la diferenciación neuronal en el cerebro fetal teniendo una influencia trófica durante el desarrollo cerebral.

El efecto general de la serotonina a nivel celular, es la disminución en la excitabilidad neuronal. En las neuronas del hipocampo, la 5-HT disminuye la velocidad de disparo a través de un aumento en la conductancia al K^+ (Segal, 1981). Pero también tiene efectos opuestos es decir facilitadores, sobre la acción excitadora producida por estimulación eléctrica, cerrando los canales de K^+ y también se le considera un neuromodulador (Siegelbaum et al., 1982). Lo anterior parece estar en función de la existencia de varios tipos de receptores, de los que se tratará mas adelante, de su distribución así como de las vías de transducción de señales intracelulares. De hecho se dice que la serotonina tiene un mecanismo de acción metabotrópico induciendo cambios tróficos, lo que implica una serie de procesos químicos en las células blanco (McGeer et al., 1987).

Los principales grupos de células serotoninérgicas cerebrales, se han determinado en la rata utilizando técnicas inmunohistoquímicas (Steinbush, 1981 y Lidof, 1980), aunque también se han hecho determinaciones en el cerebro de otros animales mostrándose una gran concordancia entre diferentes especies. De acuerdo a la designación alfanumérica descrita por Dahlstrom y Fuxe (1964), los principales grupos de células serotoninérgicas están en el núcleo del rafe dorsal (grupo B7), en el núcleo superior central (grupo B8), en el núcleo del rafe magno (grupo B3), en el núcleo del rafe oscuro (grupo B2) y en el núcleo del rafe pálido (grupo B1) (McGeer, 1987). Aunque los grupos celulares serotoninérgicos son muy pocos en el SNC, sus terminales son ubicuas, pues cada área del cerebro y de la médula espinal está inervada. Están inervados el diencefalo, el sistema límbico, el locus coeruleus, el núcleo del tracto solitario y el estriado. La distribución de estas terminales se ha estudiado por histofluorescencia, autoradiografía e inmunocitoquímica y es

muy similar en los diferentes grupos de vertebrados, lo que sugiere que este sistema es filogenéticamente muy antiguo (Siegel et al., 1989). Por lo tanto, existe el consenso de que el sistema serotoninérgico participa en la regulación de diversas funciones cerebrales, como se mencionó antes.

Los criterios que debe cumplir un compuesto para ser considerado un neurotransmisor se describen a continuación. En una neurona tiene que existir una maquinaria biosintética capaz de producir el neurotransmisor, los mecanismos de su transporte hacia la terminal y los de su liberación al espacio presináptico. En las neuronas blanco deberían estar presentes los receptores membranales que reconozcan al neurotransmisor. Este compuesto administrado exógenamente (agonista), será capaz de reproducir el efecto *in vitro* y la acción del neurotransmisor debe ser bloqueada por antagonistas. Finalmente termina el efecto del compuesto por la presencia de un aparato enzimático que lo cataboliza. De acuerdo a lo anterior, la serotonina cumple con todos los criterios y por lo tanto es considerado un neurotransmisor.

Síntesis de la serotonina

Las neuronas serotoninérgicas cerebrales captan el L-triptofano (L-Trp), que es el precursor cuya concentración en este órgano es de 30 μ M aproximadamente. Debido a que los niveles de L-triptofano en el plasma varían durante el día, esto influye en los niveles de síntesis de la 5-HT cerebral. Una vez captado el aminoácido, es hidroxilado por la enzima triptofano-5-hidroxilasa (Jequier et al., 1969). Esta reacción es el paso limitante en la biosíntesis de la serotonina. Cualquier cambio en la actividad de la misma, altera la velocidad de síntesis de la 5-HT y como consecuencia se modifica el nivel de la serotonina. Debido a que la concentración de L-triptofano siempre es menor al valor de la constante de Michaelis o K_m , que es el parámetro cinético que se refiere a la afinidad de una enzima por su sustrato, al administrar este sustrato se produce un aumento en los niveles de triptofano en el cerebro, en la actividad de la triptofano-5-hidroxilasa y en la síntesis de la serotonina (Manjarréz et al., 1988). El producto de esta reacción es el 5-hidroxitriptofano. Existen varias drogas que bloquean esta reacción como las anfetaminas y la

cocaína y otras como la p-clorofenilalanina que es un inhibidor competitivo que se une a la enzima en el sitio activo (Hamon et al., 1981).

La siguiente reacción es la descarboxilación del 5-hidroxitriptofano para producir serotonina. Es catalizada por la enzima 5-hidroxitriptofano descarboxilasa. Esta no parece ser una etapa limitante pues la inhibición de esta enzima no disminuye notablemente los niveles de serotonina. Todo esto se lleva a cabo en el citosol de la terminal presináptica y posteriormente por transporte activo la serotonina atraviesa las membranas de las vesículas en donde se almacena en la terminal presináptica. El catabolismo de la 5-HT implica una desaminación por la enzima monoamino oxidasa dando como producto ácido 5-hidroxiindolacético que puede ser oxidado o reducido dependiendo de los niveles del nicotina-adenina dinucleótido reducido u oxidado o NAD^+/NADH en el tejido (Esquema 1).

En resumen, la velocidad de síntesis de la 5-HT esta limitada por la disponibilidad de triptofano, de cofactores enzimáticos como las biopterinas, de O_2 y de Ca^{++} pues el aumento en la síntesis de 5-hidroxitriptofano es dependiente de Ca^{++} ya que fosforilaciones dependientes de este ión aumentan la V_{max} de la triptofano-5 hidroxilasa (Manjarréz et al., 1994). La V_{max} o velocidad máxima es otro parámetro cinético que se refiere al número de sitios activos.

Receptores serotoninérgicos cerebrales.

Los neurotransmisores al igual que las hormonas actúan sobre los receptores membranales específicos siendo estos últimos glucoproteínas que están presentes en las membranas postsinápticas en concentraciones menores de las de los neurotransmisores presinápticos que actúan sobre ellos. Estos receptores se sintetizan en el citoplasma y se transportan a sitios específicos en la bicapa lipídica de la membrana plasmática (Alberts et al., 1994).

Cada neurona tiene una variedad de receptores sobre su membrana y del repertorio que contenga, dependerá su versatilidad sobre la capacidad de respuesta. Algunos compuestos son agonistas, es decir, imitan la actividad en este caso del neurotransmisor con una cinética muy parecida y otros, son antagonistas lo que significa que su afinidad es alta pero bloquean la

activación del receptor y la cascada de señalización intracelular. Debe existir al menos un tipo de receptor para cada neurotransmisor. En 1957 Gaddum y Picarelli propusieron que el efecto de la serotonina estaba mediado por dos tipos de receptores diferentes, pero no fue sino hasta la década pasada que la caracterización de diferentes receptores se ha realizado de manera sistemática (Sanders-Busch, 1988). En especial existen diversos estudios de unión de compuestos agonistas y antagonistas, que apoyan la existencia de subtipos de receptores serotoninérgicos. Aunque en principio, se hablaba de receptores M (sensibles a morfina) y receptores D (sensibles a dibenzilina) posteriormente se designaron como S1 y S2, 5-HT1, 5-HT2, etc. Se hizo evidente la necesidad de definir una terminología para nombrar a los subtipos de receptores serotoninérgicos y se decidió por el término de 5-HT1 hasta 5-HT7. Los receptores 5-HT1 están involucrados en la dilatación arterial, en la inhibición de la transmisión de señales en el simpático y la autoinhibición en el cerebro. Los receptores 5-HT2 participan en la agregación de plaquetas. Los receptores 5-HT3 median el reflejo Bezold-Jarisch que consiste en una respuesta a la serotonina de hipotensión como consecuencia de una bradicardia súbita y transitoria y también participa en la liberación de catecolaminas en el músculo cardíaco. Están empezando a caracterizarse los receptores 5-HT4 de los cuales ya se tienen algunas evidencias en cerdos, involucrados en la taquicardia inducida por 5-HT y que no es bloqueada por drogas que se unen a los receptores 5HT1, 5HT2 o 5-HT3 (Dumuis et al., 1988). En cuanto a los receptores 5-HT5, tienen una gran homología con los receptores de la familia 5-HT1 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 (Peroutka, 1994). Se clonó el gen que codifica para un receptor 5-HT no descrito, que difiere en cuanto a las características fisiológicas y en cuanto a la distribución en el SNC con respecto a otros y se designó 5-HT7 (Jakeman et al., 1994). La clasificación actual así como las funciones en las que participan los receptores serotoninérgicos en el SNC, se resumen en la tabla 1 modificada de Villalón et al (1995).

Se han considerado tres criterios para caracterizar a un receptor y definir el tipo o subtipo del mismo: a) un criterio operacional que se refiere a la acción de drogas agonistas o antagonistas;

Tabla 1. Receptores serotoninérgicos

Receptor	Agonista	Ki	Antagonista	Ki	Mecanismo	Localización
5-HT1A	8-OH-DPAT buspirona ipsapirona 5-CT dopamina 5-MDMT	1-10 nM 15 nM 15 nM	NAN-190 spiroxatrina propranolol spiperona ketanserina metiotepina WAY100635	0.6 nM 4 nM 55 nM 1 uM 95 nM	AMPc	septum, amígdala, y corteza cerebral (1) hipocampo (2)
5-HT1B	piperazina 5-CT CP93129 (3) SB216641 (3)	27 nM	spiperona cianopindolol GR55562 (3)	1 uM 3 uM	AMPc	substancia nigra, globus pallidus y subicullum
5-HT1D	sumatripan 5-HT 5-CT piperazina metergolina LY694,247 (3)	20 nM 2 nM 7 uM 2 nM	metergolina metiotepina GR127935 (3)		AMPc	substancia nigra, globus pallidus y subicullum. corteza frontal (2)
5-HT1E	5-HT 8-OH-DPAT TFMPP 5-CAT 5-CT	4 nM	ketanserina metiotepina GTP-gama		AMPc	corteza cerebral
5-HT1F	5-HT sumatripan 5-CT	50 nM	metiotepina			hipocampo y corteza cerebral
5-HT2A	I-DOI H-DOB CH3-5-HT		metergolina ketanserina ritanserina spiperona mesulergina metisergida LY53857 (3)	1-10 nM 0.1 uM	fosfolipasa C	corteza cerebral núcleo caudado complejo amig dalóide, tálamo e hipotálamo.
5-HT3	2Me-5-HT 5-HTQ fenilbiguanidii 1-3 clorofenil- biguanidina	500 nM 17 nM 1 uM 1.5 nM	MDL72222 zacoprida ondasetron tropisetron motoclopramida	5-50 nM 1 nM 1-13 nM 1 nM 0.2 uM	canales iónicos	

continuación de la tabla 1

Receptor	Agonista	Ki	Antagonista	Ki	Mecanismo	Localización
5-HT2B	Me-5-HT BW723C86 (3)		LY53857 (3)			amígdala, corteza, caudado e hipotálamo (2)
5-HT4	renzaprida zacoprida cizaprida 5-HT BIMU8 (3)	5 nM 0.2 nM 2 nM	tropisetron SDZ205-557 SB204070 (3) GR113808 (3)		AMPc	hipocampo, estriado, sustancia nigra y tubérculo olfatorio amígdala (2)
5-HT1C o 5-HT2C	Me-5-HT		mesulergina LY53857 (3) SB200646 (3)		fosfolipasa C	plexo coroideo ganglios basales, hipotálamo
5-HT5	LSD ergotamina	0.3 nM				corteza cerebral, hipocampo e hipotálamo.
5-HT6	5-CT LSD		metiotepina amoxipina clozapina		AMPc	estriado, tubérculo olfatorio, corteza cerebral e hipocampo y amígdala (2)
5-HT7			LY215840 (1)		AMPc	tálamo, hipocampo y sist. límbico. amígdala (2).

(1) Cushing, D. et al, 1996.

(2) Meneses, A and Hong, E. , 1997.

(3) Hoyer, D. And Martin, G. , 1997.

b) un criterio estructural que corresponde a la secuencia de aminoácidos y c) un criterio transduccional que establece el mecanismo de señales intracelulares a las que está acoplado.

En resumen se puede observar que los receptores del tipo 5-HT1 están acoplados al sistema de adenilil ciclasa a través de proteínas G del tipo inhibidor. Los receptores 5-HT2 están acoplados al sistema de recambio de fosfoinosítidos. En lo que se refiere al sistema de receptores 5-HT3 están acoplados a canales iónicos de Ca^{++} . Por último, los receptores 5-HT4 también están acoplados al sistema de adenilil ciclasa pero a través de proteínas G estimuladoras (Humphrey et al., 1993). En cuanto a los otros tipos de receptores como 5-HT5, 5-HT6 y 5-HT7 no se tienen evidencias suficientes de acuerdo a los criterios señalados anteriormente y siguen caracterizándose.

Para conocer la distribución de los subtipos de receptores 5-HT en el cerebro de la rata, se ha estudiado la unión de agonistas marcados con radioisótopos. A partir de esos estudios se concluye que en la corteza piriforme, el tubérculo olfatorio y el núcleo olfatorio anterior contienen los tres subtipos de receptores 5-HT1, mientras que la capa plexiforme externa del bulbo olfatorio es muy rica en receptores 5-HT1A y la capa granular interna contiene predominantemente sitios 5-HT1B. En la neocorteza, las capas con mayor abundancia de receptores 5-HT1 son las IV-VI con sitios 5-HT1A y 5-HT1B. La corteza frontal contiene principalmente receptores del subtipo 5-HT1B aunque también están presentes los 5-HT1A y 5-HT1C. En cuanto a los receptores 5-HT2, son muy abundantes en todas las capas y áreas de la corteza cerebral. El hipocampo es una región con abundancia de sitios 5-HT1A y 5-HT1B y sólo en el núcleo parafascicular que es la parte posterior de esa región, hay una cantidad considerable de 5-HT2. En el complejo amigdalóide, el tálamo y el hipotálamo, el subtipo con mayor densidad es el 5-HT1B. Sobre los receptores 5-HT3 apenas se han empezado a hacer estudios de distribución y sólo se sabe que están presentes en el sistema nervioso periférico y en el sistema nervioso central. No se han hecho estudios de distribución del resto de subtipos de receptores serotoninérgicos (Sanders-Bush, 1988).

Es clara la gran diversidad de receptores serotoninérgicos y más que una excepción, es un fenómeno común en los sistemas biológicos aún para otros receptores, enzimas, transportadores, etc., lo que refleja que en el transcurso de la evolución, cuando surge una variante con

propiedades funcionales idóneas para determinado microambiente, se conserva al proporcionar ventajas adaptativas a los individuos que la poseen.

Adenosin trifosfohidrolasa estimulada por Na^+/K^+ dependiente de Mg^{++} , (Na^+/K^+ -ATPasa o bomba de Na^+/K^+).

Características generales de la Na^+/K^+ ATPasa cerebral.

La membrana plasmática le permite a la célula mantener las concentraciones de solutos en su citoplasma, diferentes a las del fluido extracelular y en cada uno de los compartimentos intracelulares rodeados por membrana. Las células han desarrollado mecanismos para transportar nutrimentos a través de sus membranas, excretar productos de desecho o con alguna función en los procesos de comunicación y regular las concentraciones de diversos iones. En particular, al generar diferencias de concentraciones iónicas a través de la bicapa lipídica, las membranas tienen la capacidad de almacenar energía potencial en forma de gradientes electroquímicos que se utilizan en los procesos de transporte, en la transmisión de señales eléctricas en células excitables y en la síntesis de adenosin trifosfato o ATP (Alberts et al., 1994).

En los sistemas de transporte hay dos tipos de proteínas involucradas, las permeasas que reconocen compuestos específicos y experimentan una serie de cambios conformacionales que les permiten transferir el soluto a través de la membrana y los canales iónicos que forman poros hidrofílicos transmembranales. Estas proteínas realizan un transporte pasivo pues el movimiento responde tanto a un gradiente de concentración como a un gradiente eléctrico (Stein, 1990).

Sin embargo las células requieren de proteínas que bombean ciertos solutos a través de la membrana contra un gradiente electroquímico por lo que es necesario consumir energía, lo que se conoce como transporte activo. La actividad de estas proteínas está acoplada a una fuente de energía metabólica, tal como la hidrólisis de ATP o un gradiente iónico. Todos los procesos de transporte activo en animales transportan cationes H^+ , Na^+ , K^+ y Ca^{++} (Darnell et al., 1990). A los sistemas protéicos que lo realizan se les denomina bombas y aquí nos referiremos a las características de la bomba de Na^+/K^+ o Na^+/K^+ ATPasa.

Las evidencias más convincentes de que la hidrólisis de ATP provee la energía para que ocurra el transporte de Na^+ y K^+ , provinieron de experimentos realizados en fantasmas de eritrocitos en los que las concentraciones de iones, ATP y drogas se pueden variar en ambos lados de la membrana. Se encontró que :

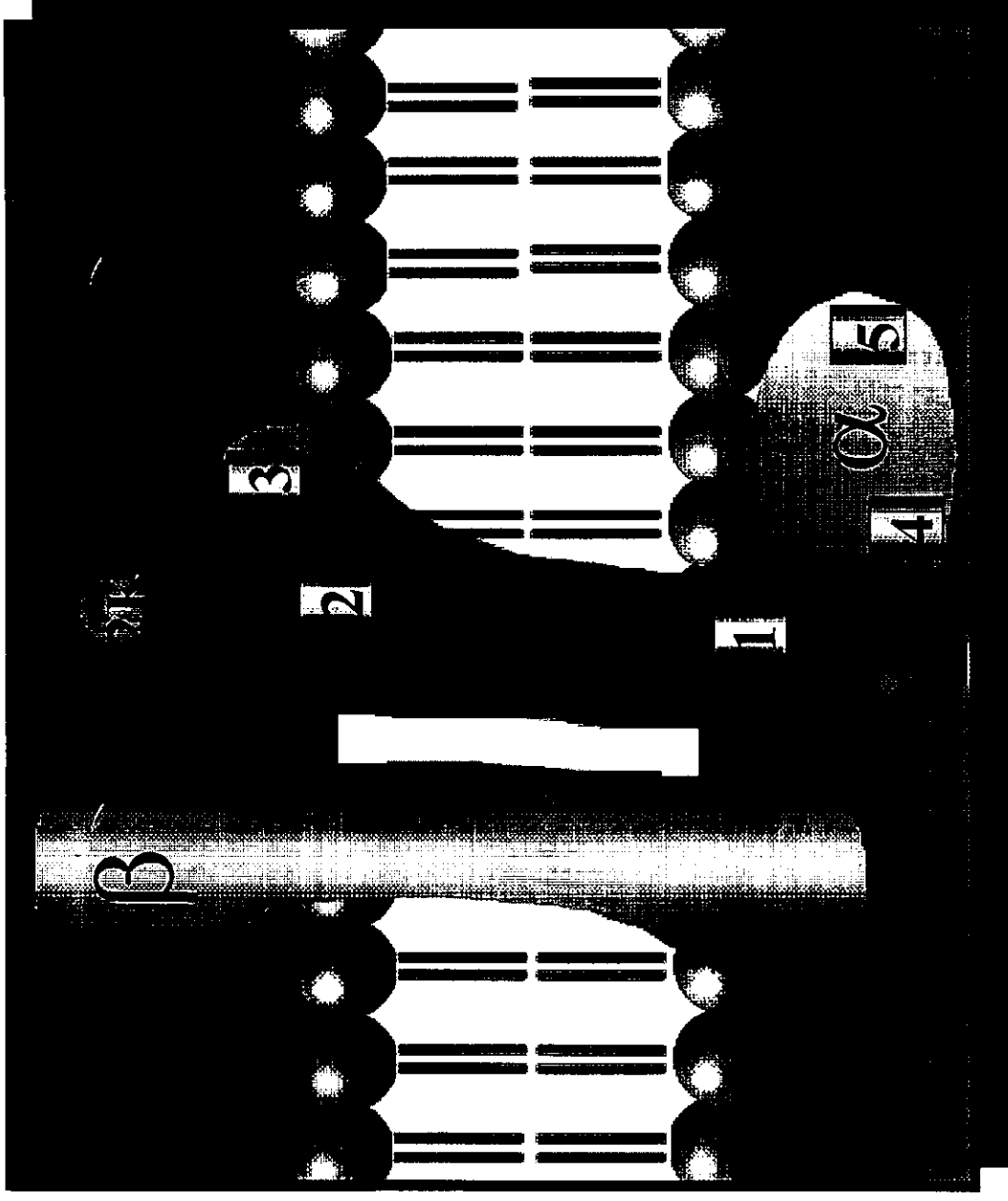
- a) El transporte de Na^+ y K^+ está acoplado a la hidrólisis de ATP y que no se lleva a cabo uno sin el otro.
- b) El transporte de iones y la hidrólisis de ATP solamente se llevan a cabo cuando en el exterior, hay K^+ y en el citoplasma hay Na^+ y ATP.
- c) Por cada molécula de ATP hidrolizado se bombean tres iones Na^+ hacia afuera y dos iones K^+ hacia el citoplasma en células del cerebro (Horisberger et al., 1991), aunque esta relación puede variar dependiendo del tejido (Mercer, 1993).

En 1941 Dean sugirió la presencia de una bomba de Na^+ en la membrana plasmática de células de animales, sin embargo fue Skou (1957) quien demostró en forma concluyente que una enzima que hidrolizaba ATP requería la presencia de Na^+ y K^+ para su actividad. Lo que constituyó una observación muy valiosa para relacionar la bomba con esta ATPasa fue el hecho de que un inhibidor de la bomba, la ouabaina, también inhibía a la ATPasa.

Función de la Na^+/K^+ -ATPasa.

La bomba de Na^+/K^+ es un sistema enzimático que hidroliza ATP y de acuerdo a la Comisión de Enzimas o EC que establece un sistema de nomenclatura internacional, es designada EC. 3.6.1.3. que se refiere a que lleva a cabo una reacción de hidrólisis, actúa sobre un enlace anhidro y específicamente es una fosfohidrolasa (Lehninger, 1994). Es la responsable de mantener diferencias de concentración de Na^+ y K^+ a través de la membrana. La concentración de K^+ en promedio es 30 veces mayor dentro de las células que fuera y en caso del Na^+ la situación es inversa, pues hay diez veces más en el espacio extracelular. En las neuronas están entrando y saliendo continuamente pequeñas cantidades de Na^+ y K^+ , respectivamente durante la propagación de impulsos nerviosos, a través de canales. Es la Na^+/K^+ -ATPasa la que restablece el equilibrio

Estructura de la ATPasa Na^+/K^+



1) Sitio de unión al Na^+ ; 2) Sitio de unión al K^+ ; 3) Sitio de unión a la Ouabaína; 4) Sitio de fosforilación y 5) Sitio de unión al ATP

entre los iones Na^+ y K^+ que es la condición en la que no hay flujo neto de estos iones a través de la membrana y restablece el potencial de reposo de -70 mV, característico de varios tipos celulares. En el caso de las neuronas esto es crucial para su funcionamiento.

La velocidad de bombeo es regulada por las concentraciones de Na^+ intracelular y las concentraciones de K^+ extracelular. Sin embargo bajo condiciones fisiológicas normales las concentraciones de Na^+ intracelular generalmente es menor que la requerida para ocupar el 50% de los sitios de Na^+ mientras que la concentración de K^+ extracelular es suficiente para ocupar al máximo los sitios de K^+ . Por lo tanto la velocidad de bombeo está mas influenciada por las concentraciones de Na^+ intracelular que por las de K^+ extracelular. Otros factores que influyen en la actividad de la enzima son las concentraciones de ATP, Mg^{++} , adenosin difosfato o ADP y fosfato inorgánico o Pi (Stahl, 1986). Se ha medido la actividad específica de la Na^+/K^+ -ATPasa en el cerebro de la rata adulta la cual es de $13 \mu\text{moles de Pi/mg de proteina/hr}$ (Yoshimura, 1973). Los sitios o números de bombas de Na^+/K^+ por unidad de membrana se pueden determinar por unión de 3H-ouabaina. En el SNC la bomba de Na^+/K^+ está concentrada en los nódulos de Ranvier y procesos axonales finos, dendritas y membranas de células gliales que rodean a los cuerpos neuronales en el cerebro, cerebelo y en la médula espinal.

El complejo enzimático de la Na^+/K^+ -ATPasa está formado por dos subunidades α de 110 Kd y 2 β de 40 Kd aproximadamente. El complejo atraviesa la membrana plasmática con segmentos hidrofílicos que se extienden hacia el espacio extracelular y hacia el citoplasma. La subunidad α tiene los sitios de unión para el Na^+ y el ATP hacia la región citoplásmica y para el K^+ y la ouabaina hacia la superficie externa. Aunque no se conoce la función de la subunidad β se piensa que participa en el ensamblaje del complejo proteínico en la membrana plasmática (Stys et al., 1995).

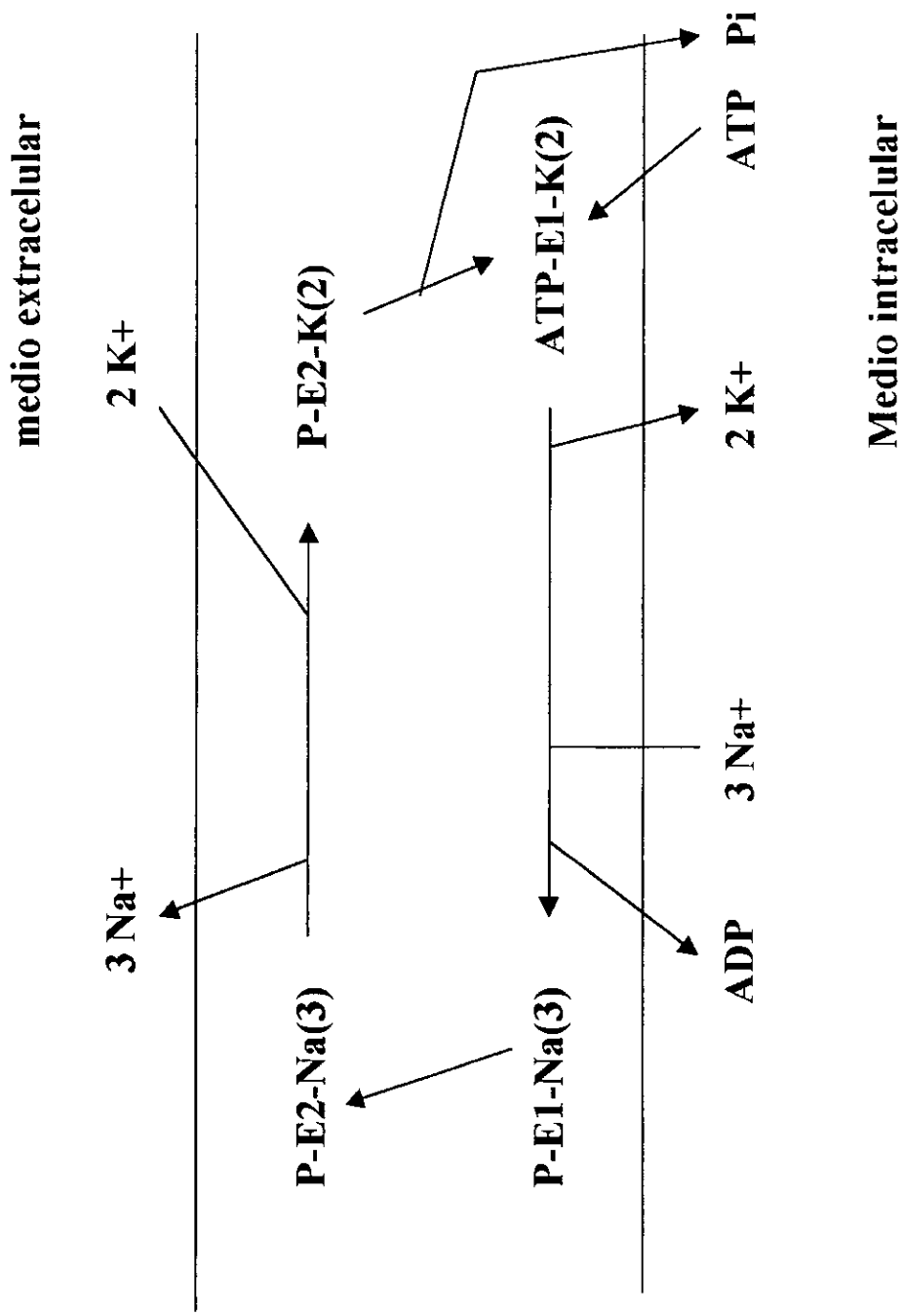
Actualmente se tiene una explicación parcial de cómo la hidrólisis del ATP esta acoplada al transporte de iones. En una conformación E1 del complejo enzimático, hay gran afinidad por ATP en el lado citoplásmico y esta unión aumenta la afinidad por los iones Na^+ . La unión de este ion hace que el grupo fosfato terminal del ATP se transfiera a un residuo de ácido aspártico que forma parte del sitio activo de la ATPasa. El estado E1~P induce un cambio conformacional a E2-P durante el cual el Na^+ queda expuesto hacia el lado extracelular con una disminución de su afinidad

por el complejo liberándose al espacio extracelular. Durante este proceso parte de la energía libre se ha disipado. En esta conformación el K^+ se une al sitio extracelular de la enzima y el resto de la energía libre se disipa al desfosforilarse la misma revirtiendo del estado E2 a E1. En el nuevo estado el K^+ queda expuesto al lado citoplásmico y su afinidad por la bomba de Na^+/K^+ disminuye, lo que provoca su liberación (Horisberger et al., 1991) (Esquema 2).

Isoformas del complejo enzimático de la Na^+/K^+ -ATPasa.

Las subunidades α y β tienen isoformas múltiples y son codificadas por varios genes. Las isoformas α muestran diferentes afinidades por los glucósidos cardiacos y su distribución se ha estudiado de acuerdo a las características de unión y movilidad electroforética (Sweadner, 1989). La Na^+/K^+ -ATPasa con mayor afinidad a la ouabaina contiene la subunidad α_3 , la de afinidad intermedia contiene la subunidad α_2 y la de muy baja afinidad, es la que tiene la subunidad α_1 (Sweadner K. 1989). Se sugiere que las isoformas varían en cuanto a sus características de bombeo de acuerdo a las necesidades de cada tipo celular específico. En el SNC se expresan las tres isoformas α a lo largo del desarrollo ontogénico pero en varias proporciones dependiendo de la región y del tipo celular (Mercado y Hernández, 1994). En la actualidad se considera que las neuronas expresan las tres isoformas en varias combinaciones y que la glia expresa principalmente las isoformas α_1 y α_2 . El hecho de que las isoformas α sean productos de genes diferentes indica que están sujetos a una regulación diferencial aún dentro de una misma célula, además de las regulaciones postraduccionales. También hay isoformas de la subunidad β , como consecuencia de varias formas de edición postranscripcionales (Warrs et al., 1991). Antonelli y colaboradores (1995), utilizaron la técnica de hibridación in situ con sondas de oligonucleótidos sintéticos y localizaron ARNm que codifican para tres isoformas de la subunidad α y una isoforma de la subunidad β de la Na^+/K^+ -ATPasa en el hipotálamo de rata, haciendo además pruebas de unión con 3H -ouabaina mediante la técnica de autoradiografía cuantitativa y sus resultados indicaron que la isoforma α_3 está distribuida en la parte ventral media del hipotálamo, el núcleo

Esquema 2. Mecanismo simplificado de funcionamiento de la Na^+/K^+ -ATPasa.



supraóptico, el núcleo paraventricular y el área hipotalámica anterior. La isoforma $\alpha 2$ tuvo una distribución uniforme en el hipotálamo lo que sugiere su ubicación en las células gliales.

Regulación del complejo enzimático.

Existen reguladores extrínsecos como son algunos neurotransmisores y hormonas que modifican la actividad de la enzima (Hernández, 1992). Por ejemplo se ha demostrado que la hormona tiroidea induce la síntesis de ARNm de la Na^+/K^+ -ATPasa en varios tejidos (Schmitt y McDonough, 1986). Los corticosteroides aumentan la actividad de la bomba en el intestino delgado y en el riñón influyendo en la regulación del balance de sales y de agua. La insulina también regula la actividad de la bomba en el músculo y en el cerebro al aumentar su afinidad por el Na^+ y como ese aumento es bloqueado por monensina, la cual inhibe el transporte de proteínas a través del aparato de Golgi, se piensa que la insulina actúa en la translocación de las subunidades de la Na^+/K^+ -ATPasa a la membrana (Clausen y Flatman, 1987). Algunos neurotransmisores como la norepinefrina, la dopamina y la serotonina también están involucrados en la regulación de la bomba de Na^+/K^+ (Hernández, 1992). Se ha descrito la estimulación de la misma por acción de la norepinefrina en tejido adiposo (Herd et al., 1970) y en membranas sinaptosomales de cerebro de rata (Clausen y Formby, 1967).

Regulación de la Na^+/K^+ -ATPasa por serotonina.

Se ha demostrado que la estimulación de la síntesis de la 5-HT por la administración de precursores serotoninérgicos como el L-triptofano o el 5-hidroxitriptofano, produce un aumento en la actividad de la Na^+/K^+ -ATPasa en la corteza cerebral de rata (Hernández, 1979). Yoshimura (1973) observó que las catecolaminas aumentan la actividad de la Na^+/K^+ -ATPasa en el cerebro de rata. El mismo efecto se tiene con agonistas serotoninérgicos como la quipazina o la 5-OH-3 metoxitriptamina que aunque no son específicos de algún subtipo de receptor serotoninérgico, inducen un aumento en la actividad de la Na^+/K^+ -ATPasa. Es importante mencionar que los

efectos de los agonistas se revierten cuando se administran antagonistas como metisergida o ciproheptadina (Hernández, 1982) en ratas adultas.

En ratas en desarrollo en las que se provoca un aumento en la síntesis de serotonina, se observó un aumento paralelo en la actividad de la Na^+/K^+ -ATPasa cerebral (Hernández y Chagoya, 1986). Sin embargo la activación de la enzima por los agonistas de la 5-HT durante el desarrollo postnatal, se observa después del día 15 (Hernández, 1982). Loizou (1969) observó que a partir de la tercera semana de edad postnatal, madura el sistema serotoninérgico y Zifa et al., (1988), describieron un aumento importante en el número de receptores y de sinapsis serotoninérgicas en el cerebro de la rata. Por otra parte la gliogénesis también es un evento postnatal lo que explica porqué la interacción entre el sistema serotoninérgico y la Na^+/K^+ -ATPasa aparece hasta este período del desarrollo.

En investigaciones realizadas por Hernández (1987), se demostró una respuesta en la actividad de la enzima dependiente de la concentración de serotonina, en diferentes regiones del cerebro de la rata. La mayor respuesta correspondió a la corteza cerebral, al hipocampo, al cuerpo estriado y al cerebelo. Todo lo anterior y en particular los estudios farmacológicos iniciales con agonistas serotoninérgicos que activan a la Na^+/K^+ -ATPasa y antagonistas que neutralizan dicho efecto, han permitido inferir que la actividad de la enzima cerebral es regulada a través de un receptor específico de la serotonina. El hecho de que las regiones en donde se observa mayor actividad de la enzima es en aquellas inervadas por terminales serotoninérgicas y los resultados de experimentos de denervación con 5,7-dihidroxitriptamina de estas mismas al nacimiento, que induce una hipersensibilidad de la actividad de la bomba de Na^+/K^+ a los agonistas, apoyaron dicho planteamiento, sugiriendo además que se trata de un fenómeno postsináptico (Fillion et al., 1982).

Mercado y Hernández (1992), iniciaron estudios para obtener más información acerca del mecanismo involucrado en la activación por serotonina de la bomba de Na^+/K^+ en el cerebro. Así se estudió el efecto de la 5-HT sobre la cinética de la enzima con ATP, Na^+ o K^+ en homogeneizados o en preparaciones subcelulares de corteza cerebral, así como en preparaciones de membranas gliales o neuronales. Sus resultados demuestran un incremento en la V_{max} de la

enzima inducido por 5-HT en los homogeneizados de la corteza cerebral en donde están presentes tanto membranas neuronales como gliales, pero dicho incremento no se observa en fracciones sinaptosomales o microsomales que contienen principalmente membranas neuronales. Lo anterior sugirió que la isoforma de la Na^+/K^+ -ATPasa regulada por serotonina podría ser la de las células gliales. Esta hipótesis fue apoyada por experimentos en preparaciones de astrocitos o neuronas cultivados, cuyos resultados demostraron que la Na^+/K^+ -ATPasa estimulada por la serotonina, es la que se localiza en los astrocitos y no la de las neuronas (Mercado y Hernández, 1992). Resultados previos de Logan y O'Donovan (1976), apoyan dicha localización ya que no observaron respuesta de la Na^+/K^+ -ATPasa en membranas sinaptosomales. Los datos anteriores son un ejemplo de la comunicación funcional neurona-glía en el cerebro de los mamíferos fenómeno que también se ha observado en invertebrados (Frixione y Hernández, 1989).

Se sabe que un exceso de K^+ en el medio extracelular cerebral por anomalías en el transporte de este ion, altera las propiedades eléctricas de las neuronas como ocurre en la epilepsia. Hernández y Condés-Lara (1989), han observado que en ratas con kindling amigdalino no hay respuesta de la Na^+/K^+ -ATPasa a la serotonina en algunas regiones del cerebro. Frixione y Hernández (1989), han observado que la serotonina afecta la regulación iónica, en particular de Na^+ y de Ca^{++} , como parte de los mecanismos de migración de los gránulos de pigmentos en los fotorreceptores de crustáceos y que dicho fenómeno está también mediado por la regulación de la bomba de Na^+/K^+ por la serotonina. Estos datos apoyan el papel funcional de este mecanismo de regulación de la bomba de Na^+ y K^+ por serotonina, en el cerebro y sistema nervioso en diferentes especies.

Investigaciones realizadas por Antonelli y colaboradores (1998) al utilizar la técnica de autoradiografía cuantitativa de la unión de ^3H -ouabaina, para reconocer la distribución de la Na^+/K^+ -ATPasa sensible a la serotonina en el cerebro de la rata, concluyeron que la isoforma involucrada en la respuesta a la 5-HT, puede ser la α_2 , con base en su afinidad por el glucósido. Cuando se utilizan concentraciones de ouabaina del orden de 50 nM, el neurotransmisor no modifica la unión del glucósido ya que esa concentración corresponde a la isoforma de alta

afinidad, la $\alpha 3$, en cambio a concentraciones mayores (1,500 nM) la isoforma que se activa es la $\alpha 2$ que predomina en los astrocitos.

OBJETIVOS

Investigar algunas características de los receptores que participan en la activación por serotonina, de la actividad de la Na^+/K^+ -ATPasa observada en homogeneizados de diversas regiones cerebrales, así como en fracciones membranales gliales, utilizando un criterio farmacológico a base de compuestos agonistas o antagonistas serotoninérgicos.

HIPOTESIS

Se propone que alguno(s) de los receptores serotoninérgicos ya descritos en la literatura o bien uno diferente, esté(n) involucrado(s) en el mecanismo de interacción entre la 5-HT y la bomba de Na^+/K^+ , en las células gliales del cerebro de la rata.

OBJETIVOS

Investigar algunas características de los receptores que participan en la activación por serotonina, de la actividad de la Na^+/K^+ -ATPasa observada en homogeneizados de diversas regiones cerebrales, así como en fracciones membranales gliales, utilizando un criterio farmacológico a base de compuestos agonistas o antagonistas serotoninérgicos.

HIPOTESIS

Se propone que alguno(s) de los receptores serotoninérgicos ya descritos en la literatura o bien uno diferente, esté(n) involucrado(s) en el mecanismo de interacción entre la 5-HT y la bomba de Na^+/K^+ , en las células gliales del cerebro de la rata.

MATERIAL Y METODOS

Material biológico.

Se utilizaron ratas Wistar macho adultos de 200 g de peso que se mantuvieron bajo condiciones ambientales controladas de ciclos de luz-obscuridad 12h-12h, temperaturas de 20-24 °C y fueron alimentados ad libitum.

Preparación de los homogeneizados de cerebro.

Los animales se sacrificaron entre las 9:00 y 12:00 AM e inmediatamente se perfundió el cerebro in situ con 15 ml de solución salina isotónica fría que se inyectó en el ventrículo izquierdo drenando a través de la vena cava inferior.

Se extrajo el cerebro y sobre una superficie fría se hizo la disección de las siguientes regiones cerebrales: la corteza cerebral, el hipocampo, el tallo cerebral y el cerebelo. Se homogeneizaron por separado en 10 volúmenes de una solución amortiguadora Tris-HCl 50 mM a pH 7.4, con 10 pasos a 700 rpm en un homogeneizador de vidrio con un vástago de teflón de 0.25 mm de luz. Se hizo la determinación de proteínas por el método de Lowry et al (1951) para tener concentraciones finales de 1 mg de proteína/ml. A estos homogeneizados se les midió la actividad específica de la Na^+/K^+ -ATPasa como se describe más adelante, en ausencia y presencia de agonistas o antagonistas serotoninérgicos.

Obtención de las fracciones enriquecidas con membranas gliales o neuronales.

Se utilizó el método descrito por Rose S (1967). Se disecó la corteza cerebral de 5 ratas macho adultos y se hicieron pasar primero a través de una malla de nylon de 100 μm de poro y después de 40 μm , trabajando en un amortiguador de fosfatos 10 mM pH 7.4 conteniendo 100 mM de KCl y

Ficoll al 10%. El filtrado se depositó en volúmenes de 2.5 ml sobre un gradiente de Ficoll al 30% en un amortiguador de fosfatos 10 mM pH 7.4, 100 mM de KCl y 1.45 M de sacarosa y se centrifugó a 142,000 g por 45 minutos. Se obtuvieron cuatro fracciones de las cuales la interfase de Ficoll 10-30% correspondió a la fracción glial y la interfase Ficoll 30%-sacarosa a la fracción neuronal. Cada fracción se resuspendió en el amortiguador Tris-HCl 50 mM pH 7.4 en una concentración final de 1 mg de proteína / ml para los ensayos de actividad enzimática. El criterio de pureza de las fracciones se determinó con la medición de la actividad de una enzima neuronal, la triptofano-5-hidroxisasa y la glial con la prueba de proteína fibrilar ácida (GFAP) (Mercado y Hernández, 1992).

Medición de la actividad específica de la Na^+/K^+ -ATPasa cerebral.

La actividad de la Na^+/K^+ -ATPasa se midió con el método usado por Hernández (1979), por triplicado en alícuotas de 50 μl del homogeneizado o de las fracciones enriquecidas con membranas gliales o neuronales. Se preincubó el tejido durante 10 minutos a 37 °C en agitación constante en un incubador metabólico con el amortiguador Tris-HCl 50 mM pH 7.4 con MgCl_2 6 mM, KCl 20 mM, NaCl 100 mM sin ouabaina para medir actividad total o con ouabaina 0.6 mM para medir actividad específica, en un volumen final de 150 μl . Se incubó el tejido con las diferentes concentraciones de agonistas y/o antagonistas mencionadas en las tablas correspondientes y ATP 3 mM durante 5 minutos a 37 °C en agitación constante. En los tubos en los que se utilizó serotonina como agonista, se añadió pargilina 10^{-4}M , inhibidor de la monoaminoxidasa para evitar la degradación del neurotransmisor, y se tuvieron los controles correspondientes. La reacción se detuvo añadiendo 20 μl de ácido tricloroacético frío al 50 %. Las muestras se centrifugaron a 2,300 rpm durante 10 minutos y se tomaron 100 μl del sobrenadante en donde se llevó a cabo la determinación de Pi, producto de la hidrólisis, con el reactivo a base de ácido sulfúrico, molibdato de amonio y sulfato ferroso. El Pi se determinó espectrofotométricamente a 800 nm a los 10 minutos de iniciada la reacción, de acuerdo al método de Fiske C y Subbarrow Y. (1925).

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

Los resultados se sometieron a un análisis de varianza (ANOVA).

RESULTADOS Y DISCUSION

Puesto que la forma de caracterizar al receptor de serotonina se planeó a través de un criterio farmacológico, se utilizaron varios agonistas y/o antagonistas serotoninérgicos, haciendo curvas de dosis respuesta sobre la actividad de la bomba de Na^+/K^+ .

En principio se hizo una curva de dosis respuesta a la 5-HT tratando de reproducir los efectos reportados en la literatura por este neurotransmisor sobre la Na^+/K^+ -ATPasa en homogeneizados de la corteza cerebral (Hernández, 1987 y Mercado y Hernández, 1992). Se utilizaron concentraciones de serotonina de 10^{-12} M a 10^{-3} M. Como se observa en la tabla II y en la gráfica 1, hay diferencias significativas en la actividad de la enzima de la corteza cerebral, con respecto al control. En todas las gráficas y en las tablas presentadas en la tesis, se señala con un asterisco a los tratamientos en los que hay diferencias significativas con respecto a la actividad basal, los datos de los controles. El mayor porcentaje de estimulación se obtiene con una concentración de 10^{-6} M de 5-HT aunque no hay diferencias significativas entre este tratamiento y las concentraciones mayores.

Después de estos resultados, se procedió a utilizar un agonista específico de los receptores 5-HT_{1A} (Gozlan et al., 1983) y determinar si este receptor estaba involucrado en la estimulación de la bomba de Na^+/K^+ en la corteza cerebral. Como se observa en la tabla III y gráfica 2, hay un incremento máximo en la actividad de la Na^+/K^+ -ATPasa con la 8-OH-DPAT de un 29% con la concentración de 10^{-3} M, lo que representa el 58 % de lo obtenido con la 5-HT. Esto indica que una parte de la estimulación de la enzima de la corteza cerebral, está mediada por los receptores 5-HT_{1A}. La diferencia del 47 % que responde a 5-HT está probablemente mediada por otro receptor serotoninérgico, siendo un candidato el receptor 5-HT₂ que está reportado para esa región y porque en un experimento preliminar con ketanserina, un antagonista 5-HT₂, se bloquea esa estimulación. Se hizo una serie de experimentos para ver si la 5-HT y la 8-OH-DPAT actuaban sobre el mismo tipo de receptor usándose simultáneamente. El resultado mostró un bloqueo total de la activación de la bomba de Na^+/K^+ (tabla IV y figura 3). Estos resultados apoyaron nuestra propuesta de que la 8-OH-DPAT podría activar a la enzima a través de los

receptores 5-HT_{1A} y la serotonina a través de otro receptor serotoninérgico diferente, aunque si bien es cierto que la serotonina se une a todos los subtipos de receptores serotoninérgicos, lo hace con diferente afinidad y es probable que en las condiciones experimentales en las que se trabajó, no tuviera las posibilidades de activar a los 5-HT_{1A} pero sí a otro subtipo de receptor. El bloqueo de la activación de la enzima por 5-HT pudiera deberse a que las vías intracelulares a las que están acoplados los receptores involucrados sean antagónicas. Cuando menos debería observarse el mismo porcentaje de estimulación obtenido con la 5-HT sola cuando ambos agonistas están presentes, pensando que se ha alcanzado un nivel de saturación. Esto sin embargo podría explicarse tomando en cuenta que los subtipos de receptores serotoninérgicos están acoplados a diferentes sistemas de transducción (Peroutka 1994; Martin y Humprey, 1994) Por lo anterior, se decidió realizar algunos experimentos tratando de dilucidar el mensajero secundario que media la respuesta para cada uno de los posibles receptores involucrados en la estimulación por la 5-HT y por la 8-OH-DPAT de la bomba de Na⁺ y K⁺, en la corteza cerebral, manipulando algunos elementos de los sistemas de transducción, como el AMPc y algunas sustancias como la isobutilmetil xantina y la toxina Pertussis, que nos pudieran explicar los resultados anteriores. Los experimentos se describen más adelante.

Con el objeto de tener otros elementos de especificidad sobre la participación de los receptores 5-HT_{1A} en la estimulación de la Na⁺/K⁺-ATPasa, se hicieron otros experimentos, incubando el tejido previamente durante 2, 4, 6 o 10 minutos, con la espiperona un antagonista con cierta especificidad sobre los receptores 5-HT_{1A}, a una concentración de 4×10^{-6} M. Los resultados se muestran en la tabla V y en la gráfica 4 y se observa que la estimulación de la enzima por 5-HT no se modifica de manera significativa cuando el tejido se incubaba previamente con este antagonista 5-HT_{1A} en ninguno de los tiempos de incubación. Sin embargo, la activación de la bomba de Na⁺/K⁺ por el agonista 5-HT_{1A}, la 8-OH-DPAT se neutraliza totalmente por la espiperona, aún con tiempos más cortos de incubación. Con lo anterior, se demuestra que efectivamente parte de la respuesta de la Na⁺/K⁺-ATPasa en la corteza cerebral está mediada por los receptores 5-HT_{1A} en un 50 % y en la restante interviene otro tipo de receptor serotoninérgico. Sin embargo es de llamar la atención que no hay una disminución de la estimulación por 5-HT en presencia de

espiperona, y la explicación que se puede dar a esto como se mencionó en párrafos anteriores, es que bajo estas condiciones experimentales quizá los receptores 5-HT_{1A} no son susceptibles a activación por 5-HT por estar desensibilizados quizá por efectos de saturación, y la estimulación observada esta mediada por otro subtipo de receptor serotoninérgico.

Se sabe que la 5-HT estimula a la ATPasa de Na⁺/K⁺ en astrocitos cultivados y en fracciones enriquecidas con membranas gliales (Mercado y Hernández, 1992), sin embargo no sabíamos sobre que tipo celular actúa la 8-OH-DPAT. Por lo tanto se hicieron experimentos en fracciones enriquecidas con membranas gliales o neuronales de corteza cerebral como se describe en los métodos. De acuerdo a lo que se muestra en la tabla VI y figura 5 se confirmó que la 5-HT no estimula la actividad de la bomba de sodio en membranas neuronales, incluso hay una inhibición como se ha descrito por algunos autores (Sastry y Phillips, 1992; Catarsi y Brunelli, 1991 y Mercado y Hernández, 1992). Tampoco el agonista 8-OH-DPAT, indujo ningún efecto sobre la actividad de la enzima en la fracción neuronal, lo cual no significa que no estén presentes los receptores 5-HT_{1A} en neuronas de la corteza cerebral sino que en esta región parecen no estar acoplados a la actividad de la Na⁺/K⁺-ATPasa. Parece ser, por éstos y resultados previos que la 5-HT regula la actividad neuronal activando mecanismos inhibitorios (Rodríguez de Lores, 1989) sobre la enzima, aunque desde nuestro punto de vista preferimos hablar de una falta de estimulación de la bomba neuronal por que los datos muestran mucha variabilidad. En cambio en la fracción de membranas gliales la 5-HT produjo una estimulación del 49.5% que corresponde a la estimulación observada en los homogeneizados de la corteza cerebral, y con una de estimulación del 18% con la 8-OH-DPAT sobre su control a una concentración de 10⁻⁵M siendo un poco menor a la respuesta observada en el homogeneizado. Como se mencionó anteriormente, no hay reportes de la estimulación de la Na⁺/K⁺-ATPasa por la 8-OH-DPAT y la modulación de la bomba glial a través de los receptores 5-HT_{1A}, que también es un resultado original del presente trabajo.

Para tener más argumentos sobre la participación de los receptores 5-HT_{1A} en la activación de la enzima glial, se utilizó nuevamente el antagonista 5-HT_{1A}, la espiperona ya que de ser cierta nuestra suposición, al incubar previamente con la espiperona, deberíamos observar un bloqueo de

la estimulación inducida por la 8-OH-DPAT en glía. Como se observa en la tabla VII y figura 6, conforme se aumenta la concentración de la espiperona, se bloquea la acción de la 8-OH-DPAT en las fracciones gliales de la corteza cerebral y no tuvo efecto sobre la estimulación producida por la 5-HT en esta misma fracción. En la fracción neuronal la espiperona ni neutraliza la inhibición de la Na^+/K^+ -ATPasa por la 5-HT ni afecta la actividad basal obtenida con la 8-OH-DPAT. Esto es otro argumento en favor de que una parte de la población de los receptores involucrados en la respuesta en esta región cerebral, son del subtipo 5-HT_{1A}, que se localizan en las células gliales y muy probablemente en los astrocitos. Apoyando esto, Whitaker-Azmitia et al (1993) han reportado la presencia de receptores 5-HT_{1A} en astrocitos in vivo con técnicas de hibridación *in situ* en varias regiones cerebrales, entre ellas la corteza cerebral.

Regresando al punto del efecto nulo que se observó al incubar el homogeneizado de corteza cerebral en presencia de la 5-HT y la 8-OH-DPAT y pensando en que la señal intracelular que se genera al unirse la 8-OH-DPAT a los receptores 5-HT_{1A} y la que se genera con la 5-HT al unirse al otro subtipo de receptor son antagónicas, se decidió hacer algunos experimentos utilizando el AMPc por los antecedentes que se tienen de que los receptores 5-HT_{1A} en el sistema nervioso, están acoplados al sistema de la adenilato ciclasa negativamente. Por lo anterior y por no contar en el laboratorio con un sistema para medir niveles de AMPc se decidió medir la activación de la enzima en presencia de AMPc en homogeneizados de corteza cerebral, esperando un bloqueo de la respuesta observada previamente con 8-OH-DPAT si de manera natural, esto produce una inhibición de la adenilato ciclasa. Aunque se hicieron pruebas a diferentes tiempos de incubación, sólo se muestran los resultados obtenidos con incubaciones de cinco minutos con AMPc. En la tabla VIII se observa una estimulación del 28% con AMPc lo que significa que por sí solo este mensajero intracelular induce una activación de la bomba. La respuesta observada por 5-HT fue del 51% y por 5-HT y AMPc fue del 44% en presencia de ambos. Sin embargo estos experimentos no garantizan que el AMPc sea el mensajero secundario a través del cual estén actuando los receptores serotoninérgicos sobre la Na^+/K^+ -ATPasa y parecen contradictorios con lo que sabemos acerca de los sistemas de transducción del receptor 5-HT_{1A}, que al activarse hacen que disminuyan los niveles del AMPc. Vimos que era necesario experimentar en las fracciones

enriquecidas con membranas gliales o neuronales para saber en qué tipo celular se estaba produciendo el efecto del AMPc. Los resultados se muestran en la tabla IX y figura 7 y la estimulación con AMPc resultó ser sobre la fracción neuronal. En la fracción glial el AMPc redujo la activación producida por la 5-HT. Cuando se utilizó la 8-OH-DPAT en combinación con el AMPc, lo que se obtuvo fue una inhibición total de la estimulación de la bomba glial.

Todo esto indica que los receptores 5-HT_{1A} gliales sobre los que actúa la 8-OH-DPAT, en efecto están acoplados al sistema de la adenilato ciclasa inhibiéndola y en condiciones naturales la disminución en los niveles del AMPc sean los responsables de activar algunas proteínas del tipo de las kinasas que fueran directamente las responsables de estimular a la Na⁺/K⁺-ATPasa, como está reportado por varios autores aunque en otros sistemas biológicos (Bertorello et al, 1991; Ibarra et al, 1993 y Middleton, 1993). Por otro lado parecería que la 5-HT se une a algún tipo de receptor serotoninérgico de los que de acuerdo a la literatura, están acoplados a proteínas Gp como los 5-HT_{2A}, 5-HT_{2B} o 5-HT_{2C}. Se denomina Gp las proteínas G acopladas a la fosfolipasa C. También es probable que el efecto del AMPc sea inespecífico ya que existen algunos trabajos en los que se reporta la regulación de la bomba de sodio al incrementarse los niveles del AMPc por unión de varias hormonas o neurotransmisores a sus respectivos receptores como la epinefrina, norepinefrina y dopamina y cuando menos en astrocitos se han reportado receptores adrenérgicos, colinérgicos, a GABA, a glutamato, y a neuropéptidos.

Tratando de obtener más elementos acerca de la participación del AMPc como mensajero intracelular en la activación de la Na⁺/K⁺-ATPasa en la corteza cerebral, se utilizó la isobutil metilxantina, un inhibidor de la fosfodiesterasa de AMPc, la enzima que hidroliza este compuesto y lo inactiva, se usó en combinación con el AMPc y la 8-OH-DPAT. La idea de utilizar la xantina fue la de mantener elevados el nivel de AMPc endógeno. Los resultados se muestran en la tabla X y la gráfica 8 y lo que se observó fue que en la fracción glial se redujo la respuesta a la 8-OH-DPAT en un 60% y se notó una tendencia a disminuir la actividad basal de la Na⁺/K⁺-ATPasa cuando se utilizó simultáneamente el AMPc y la xantina. En la fracción neuronal, los efectos son exactamente los opuestos, la xantina tendió a potenciar el efecto estimulador del AMPc. Estos resultados son acordes a los observados con el AMPc como se esperaba. Existen varios reportes (Ewart y Klip,

1995) que refieren inhibición de la bomba de sodio cuando se incrementan los niveles de AMPc por efecto de la forskolina que estimula a la adenilato ciclasa, de isobutil-metilxantina y de teofilina, siendo esta última un inhibidor de la fosfodiesterasa del AMPc, y de manera inversa se reporta una estimulación de la Na^+/K^+ -ATPasa cuando se activan las fosfatasa.

Todo lo anterior explica los resultados obtenidos con la 8-OH-DPAT y la 5-HT ya que la primera es un agonista 5-HT_{1A} y este subtipo de receptores está acoplado a proteínas G_i y por tanto la unión del ligando provoca inhibición de la adenilato ciclasa, lo que sugiere que sea el mecanismo de estimulación de la Na^+/K^+ -ATPasa glial a través del sistema receptor 5-HT_{1A} y que la estimulación restante por la 5-HT pudiera ser a través de otro subtipo de receptor serotoninérgico acoplado a proteínas G_p , como los 5-HT_{2A}, 5-HT_{2B} o 5-HT_{2C}, como ya se mencionó.

Otro elemento experimental para tener mas información respecto a la participación de las proteínas G es utilizando la toxina Pertussis que se une específicamente a este tipo de proteínas G e impide que se lleve a cabo la cascada de señalización intracelular, por lo que se hizo una serie de experimentos en homogeneizados de corteza cerebral. Se llevaron a cabo preincubando el tejido durante cuatro horas en agitación constante a 30 °C utilizando concentraciones de 1, 5, 10 y 50 μM de toxina Pertussis. Los resultados obtenidos demuestran que la actividad de la Na^+/K^+ -ATPasa es ligeramente menor cuando se incuba el tejido por tiempos largos (4 horas) pero sin diferencias significativas con la actividad basal de la enzima con respecto a las preincubaciones normales de 10 minutos. La preincubación con Pertussis en todas las concentraciones utilizadas, previo a la incubación con 5-HT no produce ningún cambio sobre la estimulación de la Na^+/K^+ -ATPasa. Sin embargo cuando el tejido se preincuba con la toxina y posteriormente con la 8-OH-DPAT, se bloquea la respuesta observada con el agonista de una manera dosis dependiente, lo que puede interpretarse como una prueba mas de que en este sistema son los receptores 5-HT_{1A} acoplados a proteínas G_i que al ser inactivadas por la toxina, bloquean la secuencia de señales que finalmente llevan a la estimulación de la enzima (tabla XI y figura 9).

Además de la presencia de los receptores 5-HT_{1A} en la corteza cerebral, existen varios trabajos en donde se reportan su presencia en astrocitos de hipocampo (Carzon et al, 1996 y Whitaker-Azmitia et al 1993) y por ello decidimos investigar si en esta región también están

acoplados los receptores 5-HT_{1A} a la regulación de la Na⁺/K⁺-ATPasa, como se demostró en la corteza cerebral.

Evaluamos el efecto de la 5-HT y la 8-OH-DPAT en homogeneizados de hipocampo y los resultados se muestran en la tabla XII y figura 10. Los datos nos sugieren que en el hipocampo, la estimulación de la Na⁺/K⁺-ATPasa también es a través de los receptores 5-HT_{1A} y a diferencia de lo observado en la corteza cerebral, la respuesta inducida por la 8-OH-DPAT fue igual a la provocada por la 5-HT. La diferencia en la magnitud de la activación de la bomba de sodio quizá se deba a que es menor la población de receptores que reconocen a la 5-HT en el hipocampo, comparado con el de la población de receptores que la reconocen en la corteza cerebral o hay diferencias en la afinidad por los agonistas. En la literatura tampoco está reportado un efecto estimulador de la 8-OH-DPAT sobre la bomba de Na⁺/K⁺ en el hipocampo. Hernández (1987), ya había reportado la estimulación de la Na⁺/K⁺-ATPasa por serotonina en esta región pero sin identificar al receptor serotoninérgico responsable. Es muy probable que esta activación sea también sobre la bomba glial considerando los resultados en astrocitos cultivados (Mercado y Hernández, 1992). Whitaker-Azmitia et al (1993) han reportado la presencia de receptores 5-HT_{1A} en astrocitos de hipocampo, no en neuronas y apoyados en esta información suponemos que la respuesta de estimulación se presenta en los astrocitos.

Con respecto a la presencia de este tipo de receptores en otras regiones cerebrales, Verge et al (1991), señalan que es muy reducido el número de receptores 5-HT_{1A} en el cerebelo de ratas adultas aunque estos son muy abundantes en los primeros días postnatales y conforme transcurren los días se "diluyen" quedando en menor densidad. Considerando lo anterior se hicieron algunas mediciones de actividad de la Na⁺/K⁺-ATPasa en homogeneizados de cerebelo de rata adulta en respuesta a la 8-OH-DPAT la que de acuerdo a la baja densidad de estos receptores no debería tener ningún efecto o muy bajo. Los resultados se muestran en la tabla XIII y en la figura 11 en donde se observó un porcentaje máximo de estimulación con 5-HT, del 42% con respecto a la actividad basal y en efecto, lo más importante fué la observación de que en el cerebelo a diferencia de la corteza cerebral y del hipocampo, la 8-OH-DPAT no tuvo efecto sobre la actividad de la enzima, con ninguna concentración. Esto nos indica que en la respuesta de la

Na^+/K^+ -ATPasa a agentes serotoninérgicos en el cerebelo, no participan los receptores 5-HT_{1A} y la serotonina debe estar actuando sobre otro subtipo de receptores serotoninérgicos, y como lo señalamos más adelante, muy probablemente a través de los 5-HT₆ que están presentes en esta región en la rata adulta (Kohen, 1996). Puesto que los receptores 5-HT_{1A} son muy abundantes en el cerebelo de ratas recién nacidas, hubiera sido interesante medir el efecto de la 8-OH-DPAT sobre la actividad de la bomba de sodio en esta etapa de desarrollo postnatal, sin embargo no era parte de nuestro objetivo estudiar la regulación de la enzima a lo largo del desarrollo y porque también considerando las investigaciones realizadas por Loizou (1969), quien reporta que es a partir de la tercera semana del nacimiento cuando se inicia el período de maduración del sistema serotoninérgico en el cerebro de la rata, y por otro lado Hernández (1982), observó que la respuesta de la bomba de sodio cerebral a la 5-HT aparece a partir del día 21 postnatal.

Con base en lo anterior se hicieron experimentos para medir la actividad de la Na^+/K^+ -ATPasa en homogeneizados del cerebelo en presencia de diferentes concentraciones de LSD, el ácido lisérgico, que aunque no es un agonista específico, tiene una alta afinidad por los receptores 5-HT₆.

Los resultados mostrados en la tabla XIV y en la figura 12 señalan una estimulación de la Na^+/K^+ -ATPasa en el cerebelo con el LSD, de la misma magnitud que la que se obtiene con serotonina aunque se requieren concentraciones mayores a 10^{-6}M de LSD para observar el efecto, lo que puede explicarse quizá por diferencias en la afinidad de los receptores 5-HT₆ a serotonina con respecto al LSD. Por otra parte también se probó el efecto de este agonista en la corteza cerebral en donde el LSD no induce activación de la enzima. Todo lo anterior apoya pues la participación del sistema receptor 5-HT₆ en la regulación de la Na^+/K^+ -ATPasa en el cerebelo ya que su agonista induce una activación de la misma intensidad que la 5-HT.

Debido a que surgió la inquietud de que la serotonina estuviera actuando no necesariamente a través de los receptores sino de los sistemas de captación de serotonina, se llevaron a cabo experimentos utilizando compuestos que interfieren específicamente con los sistemas de captación del neurotransmisor, tanto en las células neuronales como en las gliales, como la fluoxetina. En lo que se obtenía la droga y puesto que en la literatura está reportado que el sistema

de captación de 5-HT esta mediado por Na^+ (Vijendra y Kimelberg, 1994; Amundson et al., 1992; Fuller y Wong, 1999), decidimos hacer algunas pruebas preliminares de estimulación de la bomba de sodio con 5-HT en homogeneizados de corteza cerebral en ausencia de Na^+ y así tener información sobre la posible participación de estos sistemas en la regulación de la Na^+/K^+ -ATPasa cerebral. Debe señalarse que no es una ausencia total de Na^+ al no añadirse al amortiguador de la mezcla de reacción ya que hay Na^+ endógeno en el tejido. Las pruebas consistieron en medir la actividad de la bomba de sodio en homogeneizados de corteza cerebral en presencia de 5-HT incubando sin Na^+ . Puesto que el Na^+ es un elemento que forma parte de la mezcla de incubación, se le sustituyó por colina para no modificar la osmolaridad de la solución. La actividad de la Na^+/K^+ -ATPasa con 5-HT en presencia de Na^+ fue de $9.3 \pm 0.37 \mu\text{mol de Pi/mg/h}$ (controles) y en ausencia del mismo fue de $7.2 \pm 0.24 \mu\text{mol de Pi/mg/h}$. Los resultados mostrados en la tabla XV señalan que no hay diferencias significativas en los porcentajes de estimulación con la 5-HT (47 y 40% respectivamente), con respecto a la actividad basal. Si el sistema de captación de serotonina estuviera involucrado en la estimulación de la Na^+/K^+ -ATPasa, los resultados deberían haber dado diferencias significativas entre las dos condiciones probadas. Para tener elementos más específicos se hicieron otros experimentos con fracciones enriquecidas con membranas gliales de corteza cerebral, bajo las mismas condiciones. Aunque los porcentajes de estimulación de la enzima son menores que los obtenidos con los homogeneizados (37% en presencia de Na^+ y 31% en ausencia del mismo), no hay diferencias significativas entre ellos, lo cual es otro argumento en favor de que la estimulación esta mediada por receptores y no a través de los sistemas de captación (uptake).

Una vez que se obtuvo la fluoxetina, se llevaron a cabo experimentos de la siguiente manera: Se hicieron preincubaciones de homogeneizados de la corteza cerebral con fluoxetina a concentraciones de 5, 10 y 50 μM durante 5, 10 y 15 minutos. Posteriormente se incubó el tejido con 5-HT (10^{-5} M) teniendo los respectivos controles. Los resultados se muestran en la tabla XVI y en la figura 13 en donde se observa que no hay diferencias significativas entre el porcentaje de estimulación de la bomba de sodio por serotonina y por 5-HT cuando su captación es inhibida por la fluoxetina, con ninguna de las concentraciones utilizadas y para ningún tiempo de incubación, lo

que amplía y confirma lo observado en ausencia de Na^+ , que el efecto del neurotransmisor no es a través de un sistema de captación sino a través de los receptores membranales. Se repitió el mismo esquema del experimento anterior utilizando las membranas gliales y los resultados fueron muy similares (tabla XVII y figura 14).

CONCLUSIONES

- 1) Se confirmó la estimulación de la Na^+/K^+ -ATPasa por serotonina en la corteza cerebral, en el hipocampo y en el cerebelo.
- 2) La respuesta de activación de la enzima no es a través de los sistemas de captación de 5-HT, sino de receptores serotoninérgicos.
- 3) Por primera vez se demostró que los receptores 5-HT_{1A} median la estimulación de la Na^+/K^+ -ATPasa glial, en la corteza cerebral y en el hipocampo.
- 4) La serotonina y la 8-OH-DPAT, inducen un bloqueo de la estimulación, cuando ambos agonistas están presentes. Los resultados obtenidos con AMPc, xantina y la toxina Pertussis sugieren que la 8-OH-DPAT media su efecto sobre Na^+/K^+ -ATPasa glial, disminuyendo los niveles de AMPc y la 5-HT provoca lo opuesto.
- 5) En el cerebelo, los receptores 5-HT_{1A} no participan en la estimulación de la bomba de sodio y es a través de los receptores 5-HT₆ que se transduce la respuesta.
- 6) Lo anterior nos permite proponer que la estimulación de la Na^+/K^+ -ATPasa por serotonina, involucra un sistema receptor diferente en cada área cerebral. Aunque nada se sabe sobre la vía de señalización que activa a la bomba de sodio glial mediada por neurotransmisores, nuestros resultados indican que los receptores 5-HT_{1A} en glia regulan la actividad de la adenilato ciclasa acoplada a proteínas Gi en la corteza cerebral. Recientemente se demostró en otro sistema receptor, 5-HT_{2A} la activación de la fosfolipasa C, otra vía de señalización, en astrocitos cultivados. Este podría ser el mecanismo de estimulación de la Na^+/K^+ -ATPasa en corteza cerebral que no es explicado por los receptores 5-HT_{1A}.

7) La presencia de varios tipos de receptores en las distintas regiones cerebrales muestran la complejidad con la que los astrocitos responden a cambios metabólicos locales, lo que apoya su participación en el mantenimiento de los niveles de K^+ en los microambientes de cada región. Este trabajo da más argumentos de la relación funcional entre las neuronas serotoninérgicas y las células gliales y proporciona evidencias de sistemas receptores específicos que median la actividad de la bomba de sodio por serotonina.

TABLA II. Curva de dosis respuesta a la serotonina sobre la actividad de la Na⁺/K⁺-ATPasa en homogeneizados de corteza cerebral de rata.

Serotonina (M)	Actividad específica (μ mol de Pi/mg/h)	Estimulación con respecto al control (%)
control	7.4 \pm 0.52	(Actividad basal)
10 ⁻¹²	8.06 \pm 0.42	8.9
10 ⁻¹¹	8.26 \pm 0.37	11.6
10 ⁻¹⁰	8.31 \pm 0.58	12.3
10 ⁻⁹	9.14 \pm 0.76 *	23.5
10 ⁻⁸	9.44 \pm 0.71 *	27.6
10 ⁻⁷	10.01 \pm 0.62 *	35.7
10 ⁻⁶	11.05 \pm 0.74 *	49.3
10 ⁻⁵	10.91 \pm 0.83 *	47.4
10 ⁻⁴	10.85 \pm 0.80 *	46.6
10 ⁻³	10.98 \pm 0.72 *	48.4

Se muestran los promedios \pm la d.e. de 10 experimentos por triplicado. El asterisco se refiere a diferencias significativas entre los tratamientos y los controles con una $p < 0.05$.

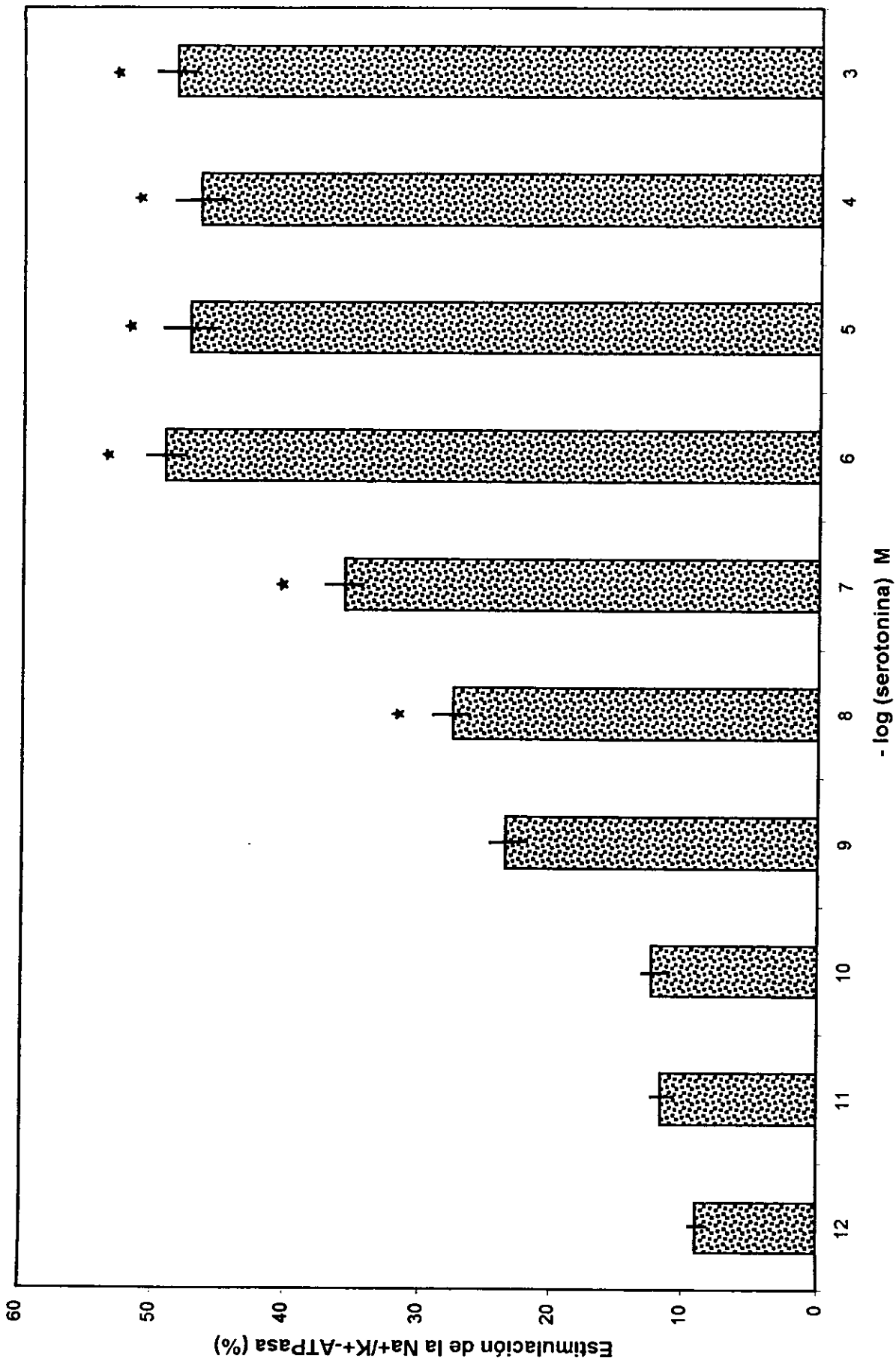


Fig 1. Estimulación por serotonina de la actividad de la Na⁺/K⁺-ATPasa en homogeneizados de corteza cerebral. Los datos son el promedio \pm d.e. de ocho experimentos por sextuplicado. La actividad basal fue 7.4 ± 0.52 umol de Pi/mg/h. Se muestra la significancia entre la actividad basal y los tratamientos para todas las gráficas (* p < 0.05).

TABLA III. Curva de dosis respuesta a la 8-OH-DPAT sobre la actividad de la Na⁺/K⁺-ATPasa en homogeneizados de corteza cerebral de rata.

8-OH-DPAT (M)	Actividad específica ($\mu\text{mol de Pi/mg/h}$)	Estimulación con respecto al control (%)
control	8.42 \pm 0.33	---
5 X 10 ⁻⁹	9.45 \pm 0.76	12.2
10 ⁻⁸	10.18 \pm 0.66 *	20.9
10 ⁻⁷	10.63 \pm 0.70 *	26.2
10 ⁻⁶	10.52 \pm 0.83 *	24.9
10 ⁻⁵	10.60 \pm 0.81 *	25.9
10 ⁻⁴	10.69 \pm 0.52 *	27.0
10 ⁻³	10.86 \pm 0.74 *	28.9
5-HT (10 ⁻⁹)	12.70 \pm 0.93 *	50.8

Se muestran los promedios \pm la d.e. de 7 experimentos por triplicado. El asterisco se refiere a diferencias significativas entre los tratamientos y los controles con una $p < 0.05$.

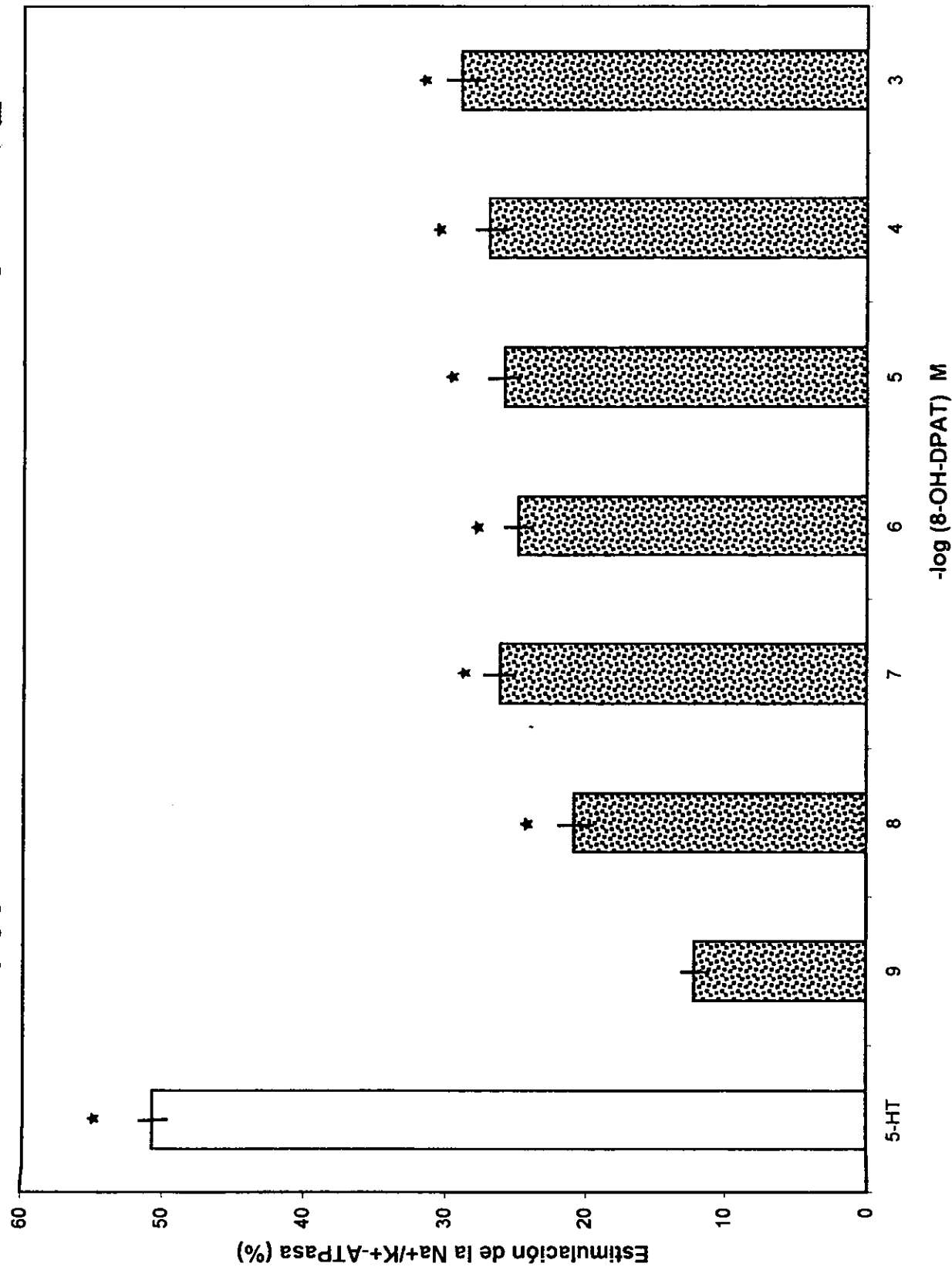


Fig 2. Estimulación por 5-HT (10⁻⁵ M) o 8-OH-DPAT (diferentes concentraciones), sobre la actividad de la Na⁺/K⁺-ATPasa en homogeneizados de corteza cerebral. Se muestran los promedios \pm d.e. de 6 experimentos por sextuplicado. La actividad basal fue 8.42 ± 0.33 μ mol de Pi/mg/h. Se muestra la significancia entre la actividad basal y los tratamientos (* p < 0.05).

TABLA IV. Estimulación de la Na⁺/K⁺-ATPasa de homogeneizados de corteza cerebral en presencia de 5-HT, 8-OH-DPAT o incubando simultáneamente con ambos agonistas manteniendo constante la concentración de la 5-HT y cambiando las concentraciones de la 8-OH-DPAT.

Agonista (M)	Actividad específica ($\mu\text{mol de Pi/mg/h}$)	Estimulación con respecto al control (%)
control	7.8 \pm 0.29	---
5-HT (10 ⁻⁵)	11.4 \pm 0.52 *	46.2
8-OH-DPAT (10 ⁻⁵)	9.6 \pm 0.38 *	23.1
5-HT+8-OH-DPAT (10 ⁻⁹)	9.1 \pm 0.4 *	16.6
5-HT+8-OH-DPAT (10 ⁻⁷)	8.6 \pm 0.27	10.3
5-HT+8-OH-DPAT (10 ⁻⁵)	7.9 \pm 0.31	1.3
5-HT+8-OH-DPAT (10 ⁻³)	8.0 \pm 0.36	2.5

Se muestran los promedios \pm d.e. de tres experimentos por sextuplicado. El asterisco se refiere a diferencias significativas entre los tratamientos y los controles con una $p < 0.05$.

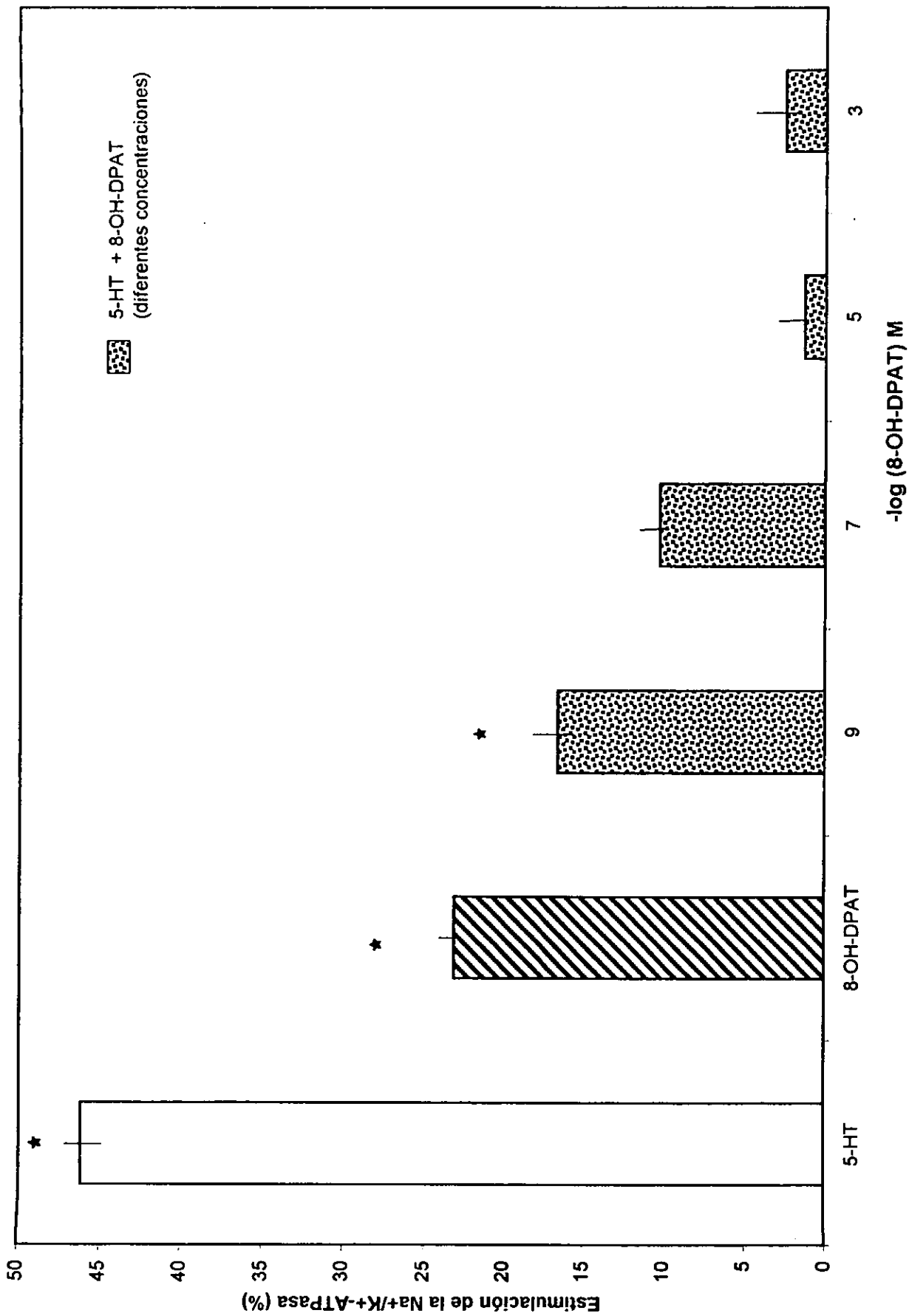


Fig 3. Estimulación de la Na⁺/K⁺-ATPasa de homogeneizados de corteza cerebral en presencia de 5-HT (10⁻⁵ M), 8-OH-DPAT (10⁻⁵ M) o incubando simultáneamente con ambos agonistas, manteniendo constante la concentración de la 5-HT y cambiando la concentración de la 8-OH-DPAT. Se muestran los promedios \pm d.e de tres experimentos por sextuplicado. La actividad basal fue 7.8 ± 0.29 μ mol de Pi/mg/h. Se muestra la significancia entre la actividad basal y los tratamientos (* p < 0.05).

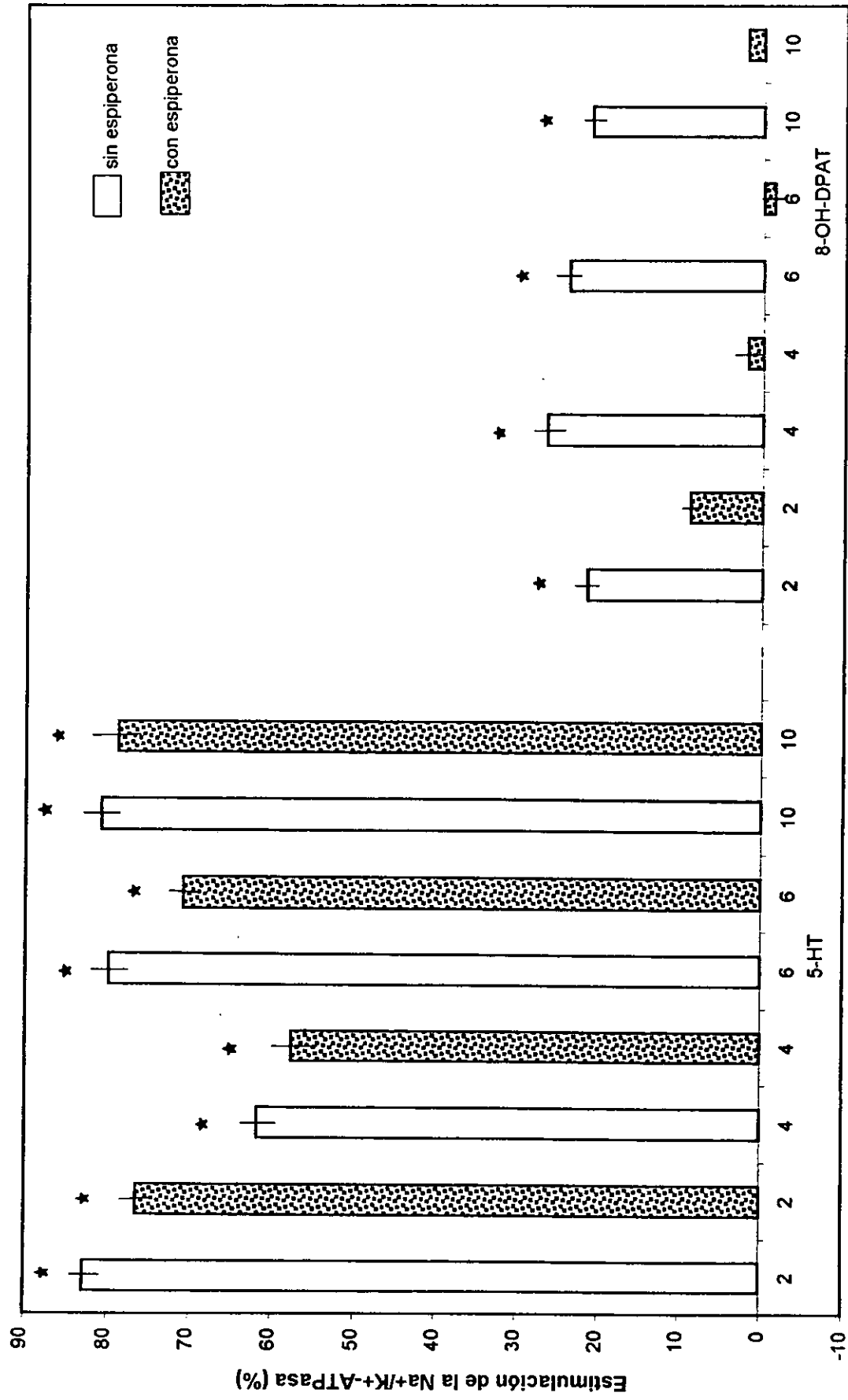
TABLA V. Estimulación de la actividad de la Na^+/K^+ -ATPasa en homogeneizados de corteza cerebral, por 5-HT (10^{-5} M) o 8-OH-DPAT (10^{-5} M) incubando previamente el tejido con un antagonista 5-HT_{1A}, la espiperona, durante 2,4, 6 y 10 minutos.

Preincubación c/espiperona (minutos)	Tratamiento	Actividad específica ($\mu\text{mol Pi/mg/h}$)	Estimulación sobre el control (%)
2/sin	control	8.39 ± 0.28	---
2/sin	5-HT	$15.35 \pm 0.87^*$	82.9
2/con	5-HT	$14.82 \pm 0.91^*$	76.6
2/sin	8-OH-DPAT	$10.21 \pm 0.42^*$	21.6
2/con	8-OH-DPAT	9.14 ± 0.37	8.9
4/sin	control	9.41 ± 0.60	---
4/sin	5-HT	$15.24 \pm 0.96^*$	61.9
4/con	5-HT	$14.84 \pm 1.02^*$	57.7
4/sin	8-OH-DPAT	$11.9 \pm 1.46^*$	26.5
4/con	8-OH-DPAT	9.59 ± 0.8	1.9
6/sin	control	9.63 ± 0.59	---
6/sin	5-HT	$17.33 \pm 1.95^*$	79.9
6/con	5-HT	$16.46 \pm 1.48^*$	70.9
6/con	8-OH-DPAT	$11.94 \pm 0.89^*$	23.9
6/con	8-OH-DPAT	9.5 ± 0.39	-1.4

Continuación de la tabla V

10/sin	control	9.50 ± 0.74	---
10/sin	5-HT	17.19 ± 1.6 *	80.9
10/con	5-HT	17.00 ± 1.18 *	78.9
10/sin	8-OH-DPAT	10.15 ± 0.8 *	21.1
10/con	8-OH-DPAT	8.55 ± 0.37	2.0

Se muestran los promedios ± d.e. de cuatro experimentos por triplicado. El asterisco se refiere a diferencias significativas entre los tratamientos y los controles con una $p < 0.05$.



preincubación con espiperona (min)

Fig 4. Estimulación de la actividad de la Na⁺/K⁺-ATPasa de homogeneizados de corteza cerebral, por 5-HT (10 -5 M) o 8-OH-DPAT (10 -5 M) incubando previamente el tejido con espiperona durante 2, 4, 6 o 10 minutos. Se muestran los promedios ± d.e. de cuatro experimentos por triplicado. La actividad basal fue 8.39 ± 0.28, 9.41 ± 0.6, 9.63 ± 0.59 y 9.5 ± 0.74 umol de Pi/mg/h para cada tiempo de incubación respectivamente. Se muestra la significancia entre la actividad basal y los tratamientos (* p < 0.05).

TABLA VI. Estimulación de la Na^+/K^+ -ATPasa de fracciones enriquecidas con membranas gliales o neuronales de corteza cerebral incubadas con 5-HT (10^{-5} M) o 8-OH-DPAT a diferentes concentraciones.

Fracción	Agonista (M)	Actividad específica ($\mu\text{mol Pi/mg/h}$)	Estimulación con respecto al control (%)
glial	control	11.2 ± 0.28	---
	5-HT	$16.7 \pm 0.92^*$	49.1
	8-OH-DPAT (10^{-9})	11.5 ± 0.53	2.6
	8-OH-DPAT (10^{-7})	12.0 ± 0.56	7.1
	8-OH-DPAT (10^{-5})	$13.2 \pm 0.61^*$	17.9
	8-OH-DPAT (10^{-3})	$12.9 \pm 0.7^*$	15.2
	neuronal	control	9.6 ± 0.51
5-HT		8.5 ± 0.62	-11.5
8-OH-DPAT (10^{-9})		9.9 ± 0.43	3.1
8-OH-DPAT (10^{-7})		9.4 ± 0.49	-2.3

Continuación de la tabla VI

8-OH-DPAT (10 ⁻⁵)	10.0 ± 0.55	4.1
8-OH-DPAT (10 ⁻³)	9.9 ± 0.38	3.1

Se muestran los promedios ± d.s. de tres experimentos por sextuplicado. El asterisco se refiere a diferencias significativas entre los tratamientos y los controles con una $p < 0.05$.

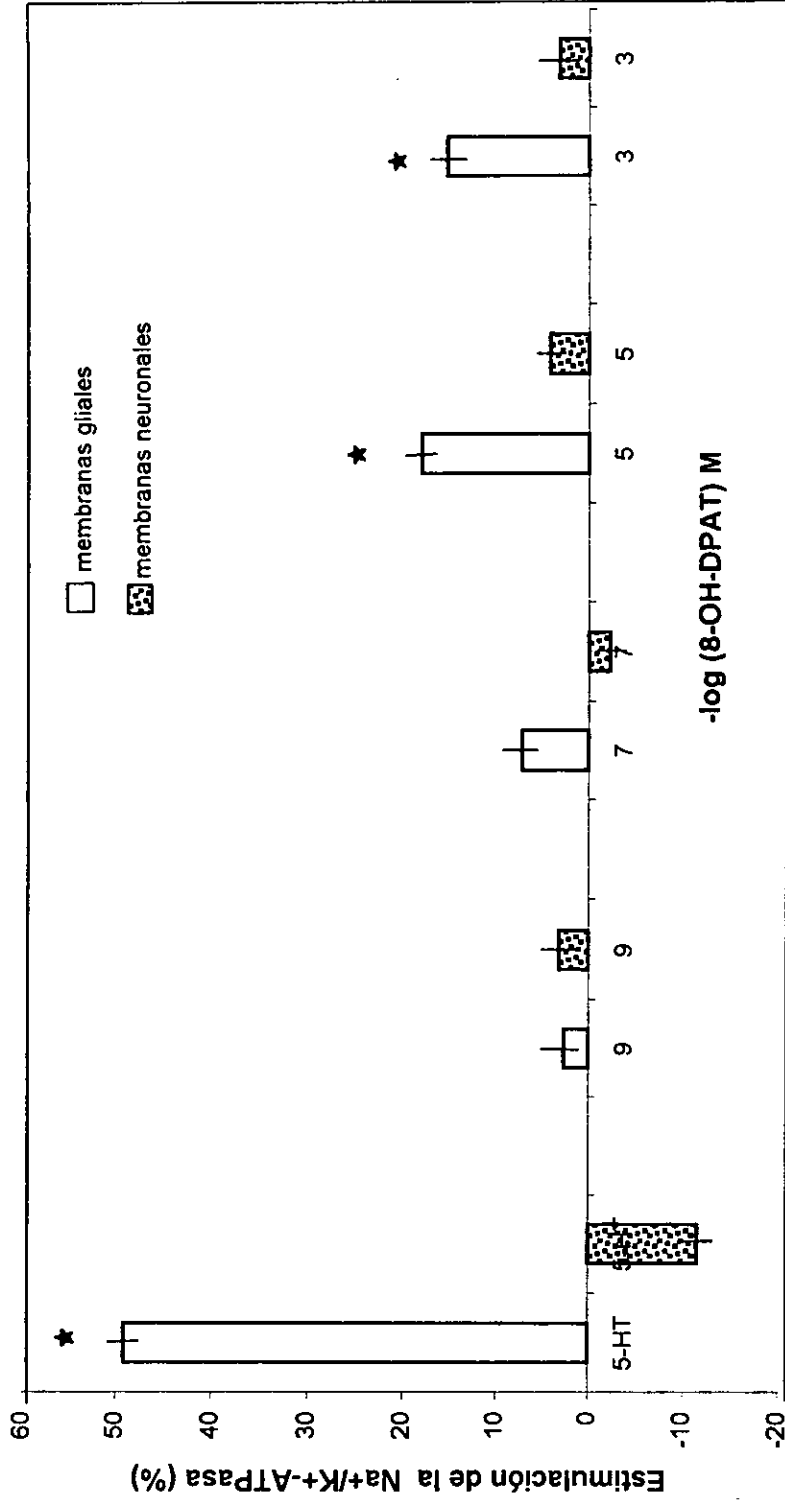


Fig 5. Estimulación por serotonina (10^{-5} M) de la Na⁺/K⁺-ATPasa de fracciones enriquecidas con membranas gliales o neuronales de la corteza cerebral. Se muestran los promedios \pm d.s. de tres experimentos por triplicado. Las actividades basales glial y neuronal fueron 11.2 ± 0.28 y 9.6 ± 0.51 μ mol Pi/mg/h respectivamente. Se muestra la significancia entre la actividad basal y los tratamientos (* $p < 0.05$).

TABLA VII. Estimulación de la Na⁺/K⁺-ATPasa de fracciones enriquecidas con membranas gliales o neuronales de corteza cerebral incubadas por 5 minutos con espiperona a diferentes concentraciones previo a la incubación con 5-HT (10⁻⁵M) o 8-OH-DPAT (10⁻⁵M).

Fracción	Agonista (M)	Actividad específica (μmol Pi/mg/h)	Estimulación con respecto al control (%)
glial	control	10.7 ± 0.28	---
	5-HT	14.8 ± 0.63*	38.3
	5-HT+espiperona (10 ⁻⁹)	14.4 ± 0.49*	34.5
	5-HT+espiperona (10 ⁻⁷)	14.1 ± 0.37*	31.8
	5-HT+espiperona (10 ⁻⁵)	14.0 ± 0.71*	30.8
	5-HT+espiperona (10 ⁻³)	14.1 ± 0.52*	31.8
	8-OH-DPAT	13.3 ± 0.35*	24.3
	8-OH-DPAT+espiperona (10 ⁻⁹)	12.5 ± 0.43*	16.8
	8-OH-DPAT+espiperona (10 ⁻⁷)	12.0 ± 0.5	12.1
	8-OH-DPAT+espiperona (10 ⁻⁵)	11.1 ± 0.41	3.7
	8-OH-DPAT+espiperona (10 ⁻³)	10.8 ± 0.33	0.9

Continuación de la tabla VII

neuronal	control	9.1 ± 0.5	---
	5-HT	7.1 ± 0.46*	-22.0
	5-HT+espiperona (10 ⁻⁹)	8.4 ± 0.31	-7.7
	5-HT+espiperona (10 ⁻⁷)	8.1 ± 0.45	-11.1
	5-HT+espiperona (10 ⁻⁵)	7.1 ± 0.39*	-22.0
	5-HT+espiperona (10 ⁻³)	8.6 ± 0.42	-5.5
	8-OH-DPAT	9.5 ± 0.47	4.4
	8-OH-DPAT+espiperona (10 ⁻⁹)	9.7 ± 0.38	6.6
	8-OH-DPAT+espiperona (10 ⁻⁷)	9.5 ± 0.36	4.4
	8-OH-DPAT+espiperona (10 ⁻⁵)	9.6 ± 0.38	5.5
	8-OH-DPAT+espiperona (10 ⁻³)	9.5 ± 0.42	4.4

Se muestra el promedio ± d.e. de tres experimentos por sextuplicado. El asterisco se refiere a diferencias significativas entre los tratamientos y los controles con una $p < 0.05$.

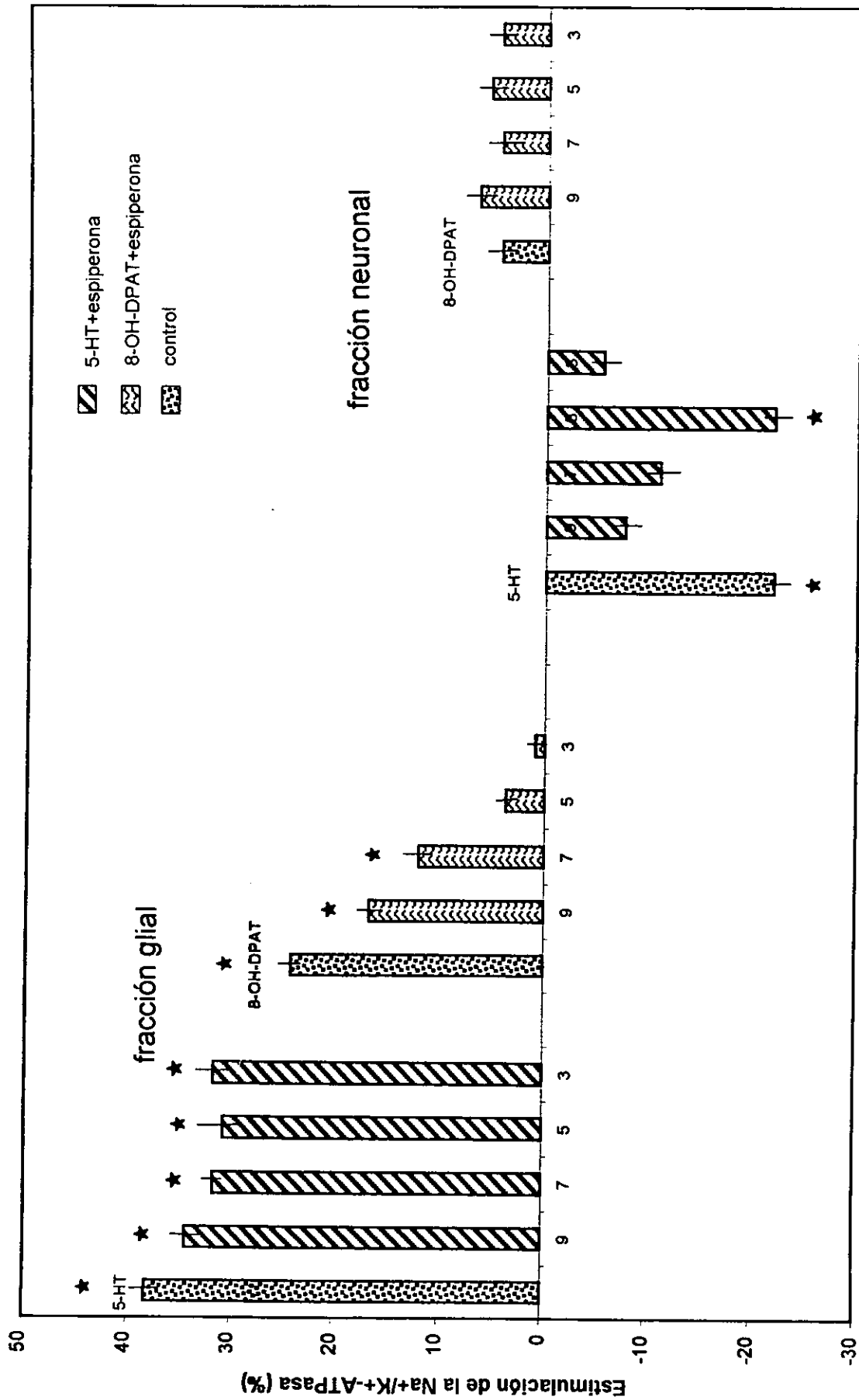


Fig 6. Estimulación por 5-HT (10⁻⁵ M) o 8-OH-DPAT (10⁻⁵ M), de la Na⁺/K⁺-ATPasa de fracciones enriquecidas con membranas gliales o neuronales de corteza cerebral, preincubadas durante 5 minutos con espiperona a diferentes concentraciones. Se muestran los promedios \pm d.e. de tres experimentos por sextuplicado. La actividad basal en la fracción glial y neuronal fue 10.7 ± 0.28 y 9.1 ± 0.5 μ mol de Pi/mg/h respectivamente. Se muestra la significancia entre la actividad basal y los tratamientos (* p < 0.05).

TABLA VIII. Estimulación de la Na⁺/K⁺-ATPasa en homogeneizados de corteza cerebral en presencia de 5-HT (10⁻⁵M) y/o AMPc 100 nM con 5 minutos de incubación.

Tratamiento	Actividad específica ($\mu\text{mol Pi/mg/h}$)	Estimulación con respecto al control (%)
control	8.8 \pm 0.37	---
* 5-HT	13.3 \pm 0.66	51.1
AMPc	11.3 \pm 0.49	28.4
5-HT+AMPc	12.7 \pm 0.66	44.3

Se muestran los promedios \pm d.e. de 4 experimentos por sextuplicado. El asterisco se refiere a diferencias significativas entre los tratamientos y los controles con una $p < 0.05$.

TABLA IX. Respuesta de la Na^+/K^+ -ATPasa de fracciones enriquecidas con membranas gliales o neuronales de corteza cerebral, bajo la acción de 5-HT (10^{-5}M) o 8-OH-DPAT (10^{-5}M) e incubando previamente con AMPc 100 nM, durante 5 minutos.

Fracción	Tratamiento	Actividad específica ($\mu\text{mol Pi/mg/h}$)	Estimulación con respecto al control (%)
glial	control	10.8 ± 0.42	---
	5-HT	$15.3 \pm 0.8^*$	42
	5-HT+AMPc	$13.1 \pm 0.59^*$	21
	8-OH-DPAT	$13.4 \pm 0.47^*$	24
	8-OH-DPAT+AMPc	11.1 ± 0.36	3
	AMPc	11.3 ± 0.52	5
neuronal	control	9.4 ± 0.3	---
	5-HT	8.3 ± 0.31	-12
	5-HT+AMPc	9.0 ± 0.39	-4
	8-OH-DPAT	9.7 ± 0.42	3
	8-OH-DPAT+AMPc	$11.8 \pm 0.57^*$	26
	AMPc	$11.3 \pm 0.4^*$	20

Se muestran los promedios \pm d.s. de dos experimentos por sextuplicado. El asterisco se refiere a diferencias significativas entre los tratamientos y los controles con una $p < 0.05$.

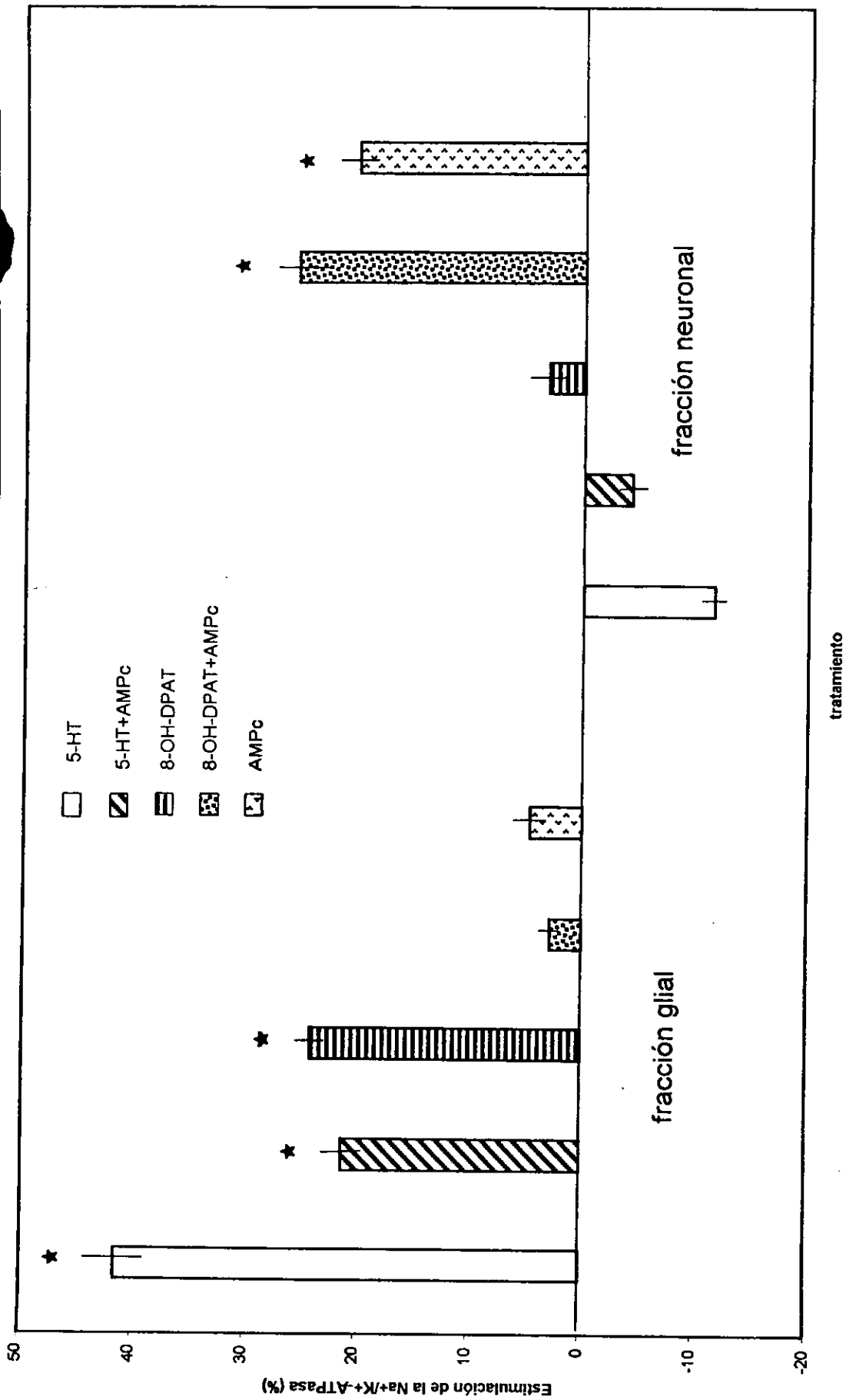
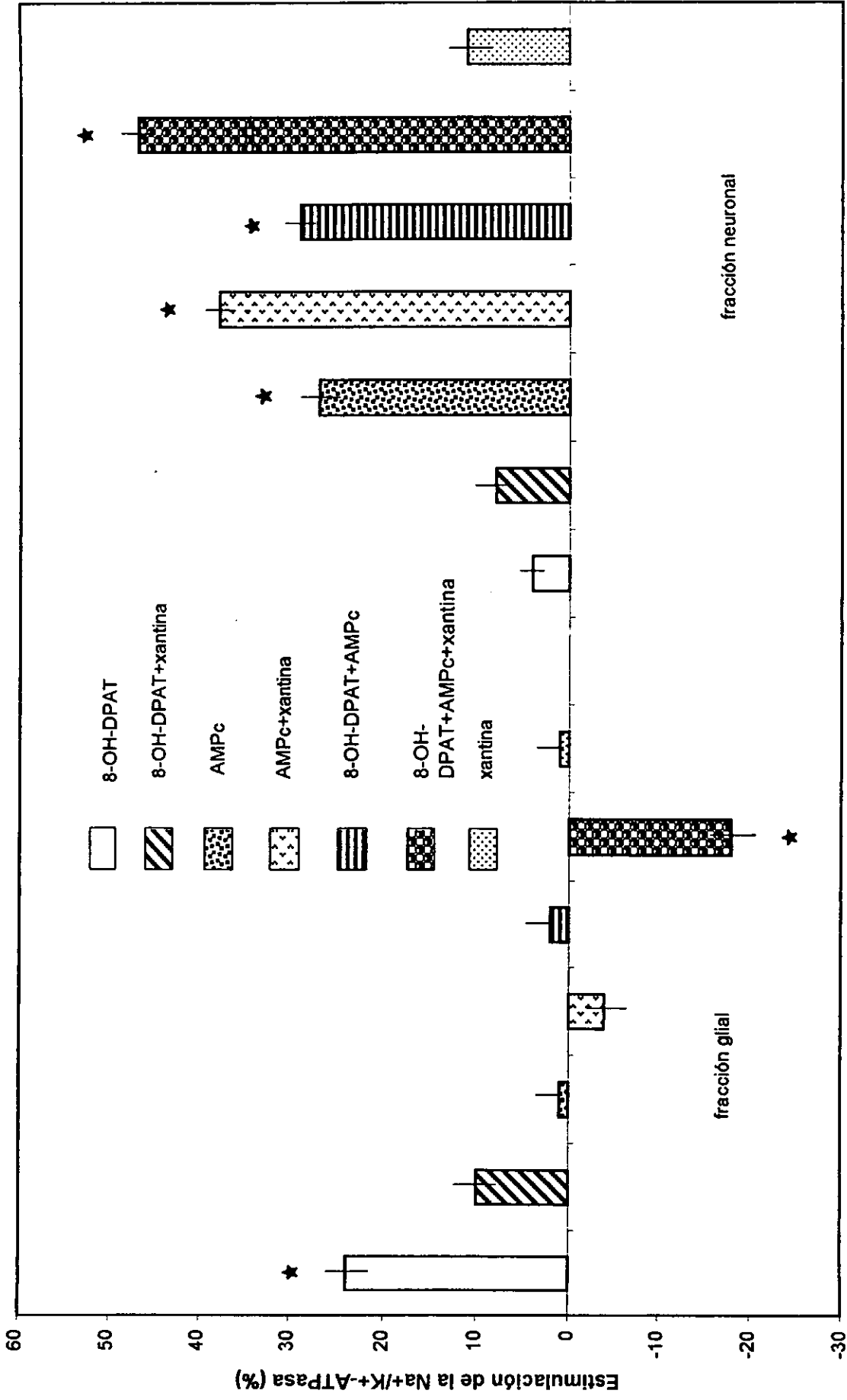


Fig. 7. Estimulación de la Na⁺/K⁺-ATPasa de fracciones enriquecidas con membranas gliales o neuronales de corteza cerebral por 5-HT (-log 5 M) o 8-OH-DPAT (-log 5 M), incubando previamente con AMPC 100 nM durante 5 minutos. La actividad específica en las fracción glial o neuronal fue 10.8 ± 0.42 y 9.4 ± 0.3 respectivamente. Se muestra la significancia entre la actividad basal y los tratamientos y los promedios ± d.s. de dos experimentos por sextuplicado.

TABLA X. Estimulación de la actividad de la Na⁺/K⁺-ATPasa de fracciones enriquecidas con membranas gliales o neuronales de corteza cerebral, bajo la acción de la 8-OH-DPAT (10⁻⁵M) e incubando previamente con AMPc 100 nM e isobutil-metilxantina 0.5 mM, durante 5 minutos.

Fracción	Tratamiento	Actividad específica ($\mu\text{mol Pi/mg/h}$)	Estimulación con respecto al control (%)
	control	11.2 \pm 0.58	---
	8-OH-DPAT	13.9 \pm 0.47*	24
	8-OH-DPAT+xantina	12.3 \pm 0.53	10
	AMPc	11.3 \pm 0.41	1
glial	AMPc+xantina	10.8 \pm 0.39	-4
	8-OH-DPAT+AMPc	11.4 \pm 0.5	2
	8-OH-DPAT+AMPc+xantina	9.2 \pm 0.35*	-18
	xantina	11.1 \pm 0.46	1
	control	9.0 \pm 0.22	---
	8-OH-DPAT	9.4 \pm 0.41	4
	8-OH-DPAT+xantina	9.7 \pm 0.39	8
	AMPc	11.4 \pm 0.55*	27
neuronal	AMPc+xantina	12.4 \pm 0.52*	38
	8-OH-DPAT+AMPc	11.6 \pm 0.38*	29
	8-OH-DPAT+AMPc+xantina	13.2 \pm 0.44*	47
	xantina	10.0 \pm 0.36	11

Se muestran los promedios \pm d.s. de dos experimentos por sextuplicado. * p < 0.05



tratamiento

Fig 8. Estimulación de la $Na^+/K^+-ATPasa$ en fracciones enriquecidas con membranas gliales o neuronales de corteza cerebral, por 8-OH-DPAT (10⁻⁵ M), incubando previamente con AMPc 100 nM y/o isobutil-metixantina 0.5 mM durante 5 minutos. Se muestran los promedios \pm d.e. de dos experimentos por sextuplicado. La actividad basal de la fracción glial y neuronal fue 11.2 ± 0.58 y 9.0 ± 0.22 μ mol de P_i /mg/h respectivamente. Se muestra la significancia entre la actividad basal y los tratamientos (* $p < 0.05$).

TABLA XI. Estimulación de la Na^+/K^+ -ATPasa en homogeneizados de corteza cerebral en presencia de 5-HT (10^{-5} M) o 8-OH-DPAT (10^{-5} M), incubando previamente con toxina Pertussis a diferentes concentraciones (P1 1 μM , P2 5 μM , P3 10 μM y P4 50 μM).

Tratamiento	Actividad específica ($\mu\text{mol Pi}/\text{mg}/\text{h}$)	Estimulación con respecto al control (%)
control	8.2 ± 0.3	---
5-HT	$12.2 \pm 0.51^*$	49
5-HT+P1	$12.1 \pm 0.46^*$	48
5-HT+P2	$11.8 \pm 0.39^*$	44
5-HT+P3	$12.5 \pm 0.6^*$	52
5-HT+P4	$12.2 \pm 0.37^*$	49
8-OH-DPAT	$10.2 \pm 0.44^*$	24
8-OH-DPAT+P1	$9.8 \pm 0.48^*$	19
8-OH-DPAT+P2	9.3 ± 0.35	13
8-OH-DPAT+P3	8.9 ± 0.31	9
8-OH-DPAT+P4	8.5 ± 0.47	4

Se muestra el promedio \pm d.s. de tres experimentos por triplicado. El asterisco se refiere a diferencias significativas entre los tratamientos y los controles con una $p < 0.05$.

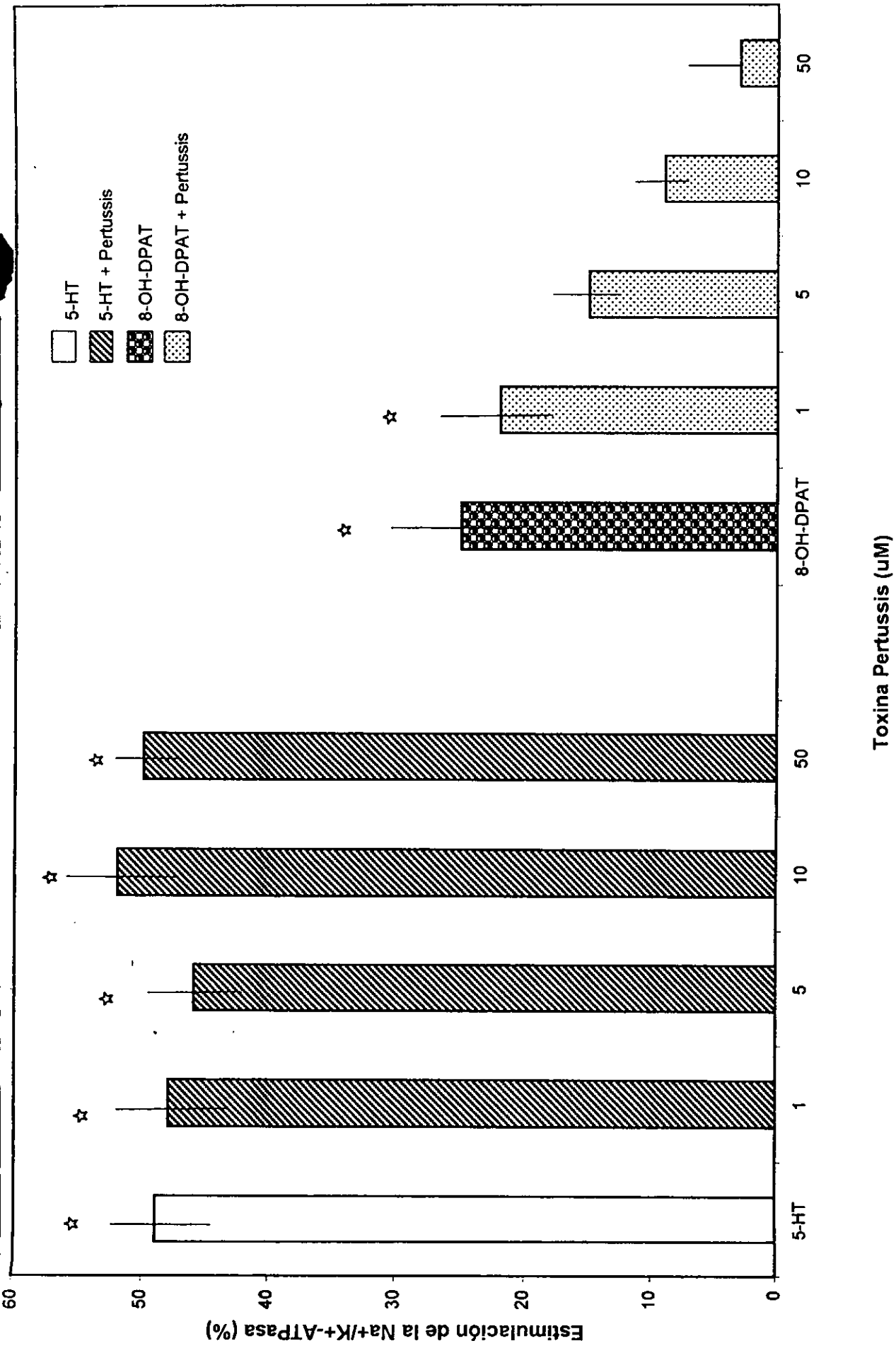


Fig 9. Estimulación de la Na⁺/K⁺-ATPasa en homogeneizados de corteza cerebral con 5-HT (10⁻⁵ M) o 8-OH-DPAT (10⁻⁵ M), preincubados con toxina Pertussis en diferentes concentraciones (p1 1 uM, P2 5 uM, P3 10 uM y P4 50 uM). Se muestran los promedios ± d.s. de tres experimentos por triplicado. La actividad basal fue 8.2 ± 0.3 umol Pi/mg/h. Se muestra la significancia entre la actividad basal y los tratamientos (* p < 0.05).

TABLA XII. Curva de dosis respuesta a 5-HT o 8-OH-DPAT de la Na^+/K^+ -ATPasa en homogeneizados de hipocampo.

Agonista (M)	Actividad específica ($\mu\text{mol Pi/mg/h}$)	Estimulación con respecto al control (%)
control	8.7 ± 0.33	—
5-HT (10^{-9})	8.8 ± 0.45	1
5-HT (10^{-8})	8.9 ± 0.29	2
5-HT (10^{-7})	9.2 ± 0.51	6
5-HT (10^{-6})	$10.0 \pm 0.46^*$	15
5-HT (10^{-5})	$10.7 \pm 0.37^*$	23
5-HT (10^{-4})	$11.3 \pm 0.5^*$	30
5-HT (10^{-3})	$11.0 \pm 0.52^*$	26
8-OH-DPAT (10^{-9})	9.0 ± 0.32	3
8-OH-DPAT (10^{-8})	8.9 ± 0.34	2
8-OH-DPAT (10^{-7})	9.1 ± 0.39	5
8-OH-DPAT (10^{-6})	9.3 ± 0.41	7
8-OH-DPAT (10^{-5})	$9.9 \pm 0.35^*$	14
8-OH-DPAT (10^{-4})	$10.7 \pm 0.56^*$	23
8-OH-DPAT (10^{-3})	$10.5 \pm 0.57^*$	21

Se muestran los promedios \pm d.s. de tres experimentos por sextuplicado. El asterisco se refiere a diferencias significativas entre los tratamientos y los controles con una $p < 0.05$.

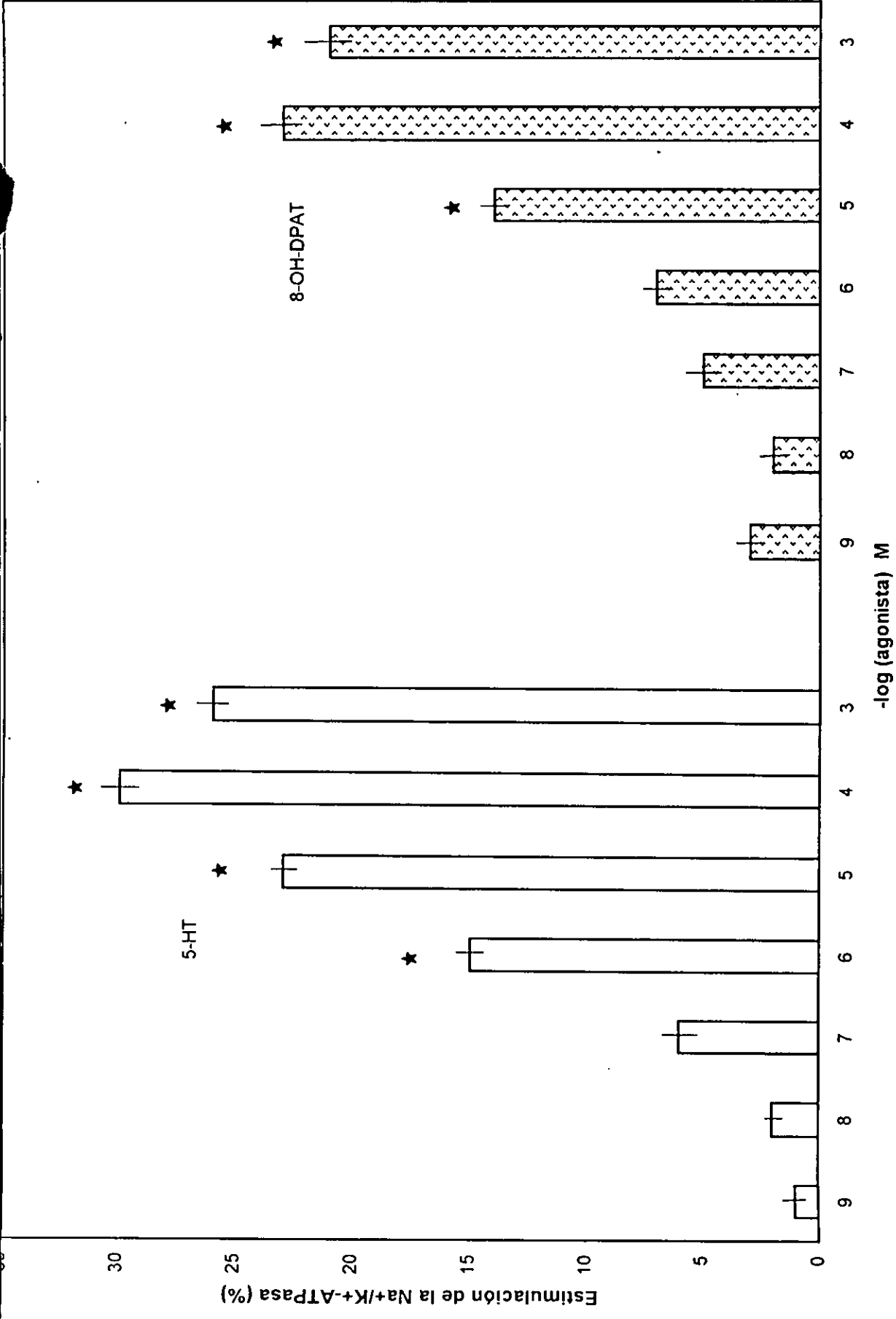


Fig 10. Estimulación de la Na⁺/K⁺-ATPasa en homogeneizados de hipocampo, por 5-HT o 8-OH-DPAT. Se muestran los promedios \pm d.e de tres experimentos por sextuplicado. La actividad basal fue 8.7 ± 0.33 umol de Pi/mg/h. Se muestra la significancia entre la actividad basal y los tratamientos (* p < 0.01).

TABLA XIII. Estimulación de la Na⁺/K⁺-ATPasa en homogeneizados de cerebelo en respuesta a la 5-HT o a la 8-OH-DPAT.

Agonista (M)	Actividad específica ($\mu\text{mol Pi/mg/h}$)	Estimulación con respecto al control (%)
control	7.3 \pm 0.4	—
5-HT (10 ⁻⁹)	7.4 \pm 0.28	1
5-HT (10 ⁻⁷)	8.2 \pm 0.33	12
5-HT (10 ⁻⁵)	10.1 \pm 0.47*	38
5-HT (10 ⁻³)	10.4 \pm 0.49*	42
8-OH-DPAT (10 ⁻⁹)	7.6 \pm 0.25	4
8-OH-DPAT (10 ⁻⁷)	7.4 \pm 0.34	1
8-OH-DPAT (10 ⁻⁵)	7.3 \pm 0.28	0
8-OH-DPAT (10 ⁻³)	7.6 \pm 0.33	4

Se muestra el promedio \pm d.s. de tres experimentos por sextuplicado. El asterisco se refiere a diferencias significativas entre los tratamientos y los controles con una $p < 0.05$.

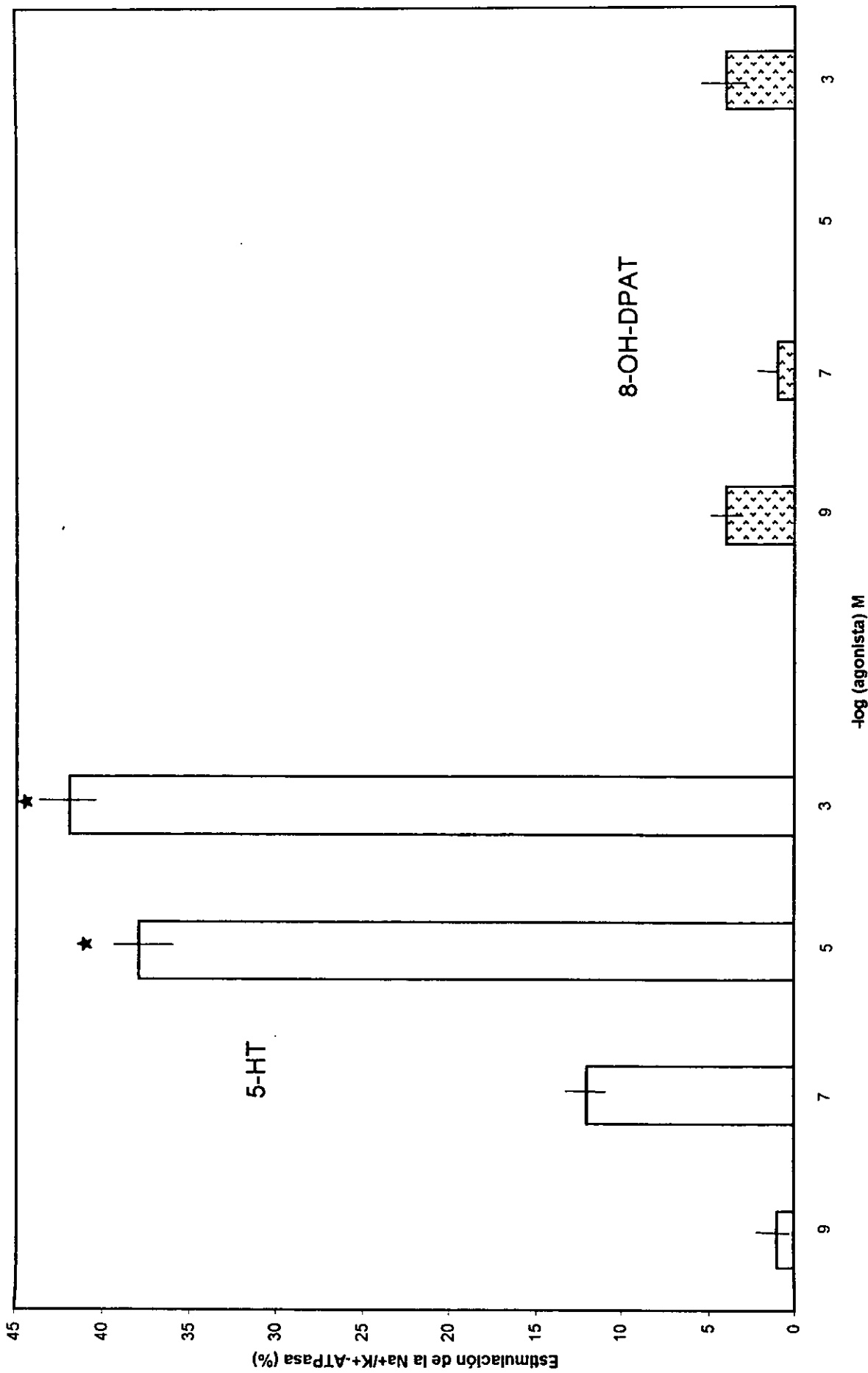


Fig. 11. Estimulación de la Na⁺/K⁺-ATPasa de homogeneizados de cerebelo en respuesta a la 5-HT o a la 8-OH-DPAT a diferentes concentraciones. La actividad específica fue de 7.3 ± 0.4 umol Pi/mg/h. Se muestra la significancia entre la actividad basal y los tratamientos y los promedios ± la d.s. de tres experimentos por sextuplicado.

TABLA XIV. Estimulación de la Na⁺/K⁺-ATPasa en homogeneizados de cerebelo y de corteza cerebral en respuesta a la 5-HT (10⁻⁵ M) o LSD a diferentes concentraciones.

Región	Agonista (M)	Actividad específica (μmol Pi/mg/h)	Estimulación con respecto al control (%)
cerebelo	control	10.5 ± 0.3	---
	5-HT	16.4 ± 0.72*	56
	5-HT+LSD (1 X 10 ⁻⁶)	11.0 ± 0.54	5
	5-HT+LSD (5 X 10 ⁻⁶)	12.3 ± 0.57	17
	5-HT+LSD (1 X 10 ⁻⁵)	12.7 ± 0.51*	21
	5-HT+LSD (5 X 10 ⁻⁵)	13.6 ± 0.63*	30
	5-HT+LSD (1 X 10 ⁻⁴)	15.0 ± 0.65*	43
	5-HT+LSD (5 X 10 ⁻⁴)	15.5 ± 0.77*	48
	5-HT+LSD (1 X 10 ⁻³)	16.3 ± 0.73*	55
	control	8.8 ± 0.33	---
	5-HT	13.8 ± 0.61*	57
	5-HT+LSD (1 X 10 ⁻⁶)	9.1 ± 0.4	3

Continuación de la tabla XIV

	5-HT+LSD (5 X 10 ⁻⁶)	9.2 ± 0.37	5
corteza c.	5-HT+LSD (1 X 10 ⁻⁵)	8.9 ± 0.29	1
	5-HT+LSD (5 X 10 ⁻⁶)	8.7 ± 0.35	-1
	5-HT+LSD (1 X 10 ⁻⁴)	8.9 ± 0.27	1
	5-HT+LSD (5 X 10 ⁻⁴)	8.8 ± 0.29	0
	5-HT+LSD (1 X 10 ⁻³)	9.0 ± 0.36	2

Se muestran los promedios ± d.s. de tres experimentos por triplicado. El asterisco se refiere a diferencias significativas entre los tratamientos y los controles con una $p < 0.05$.

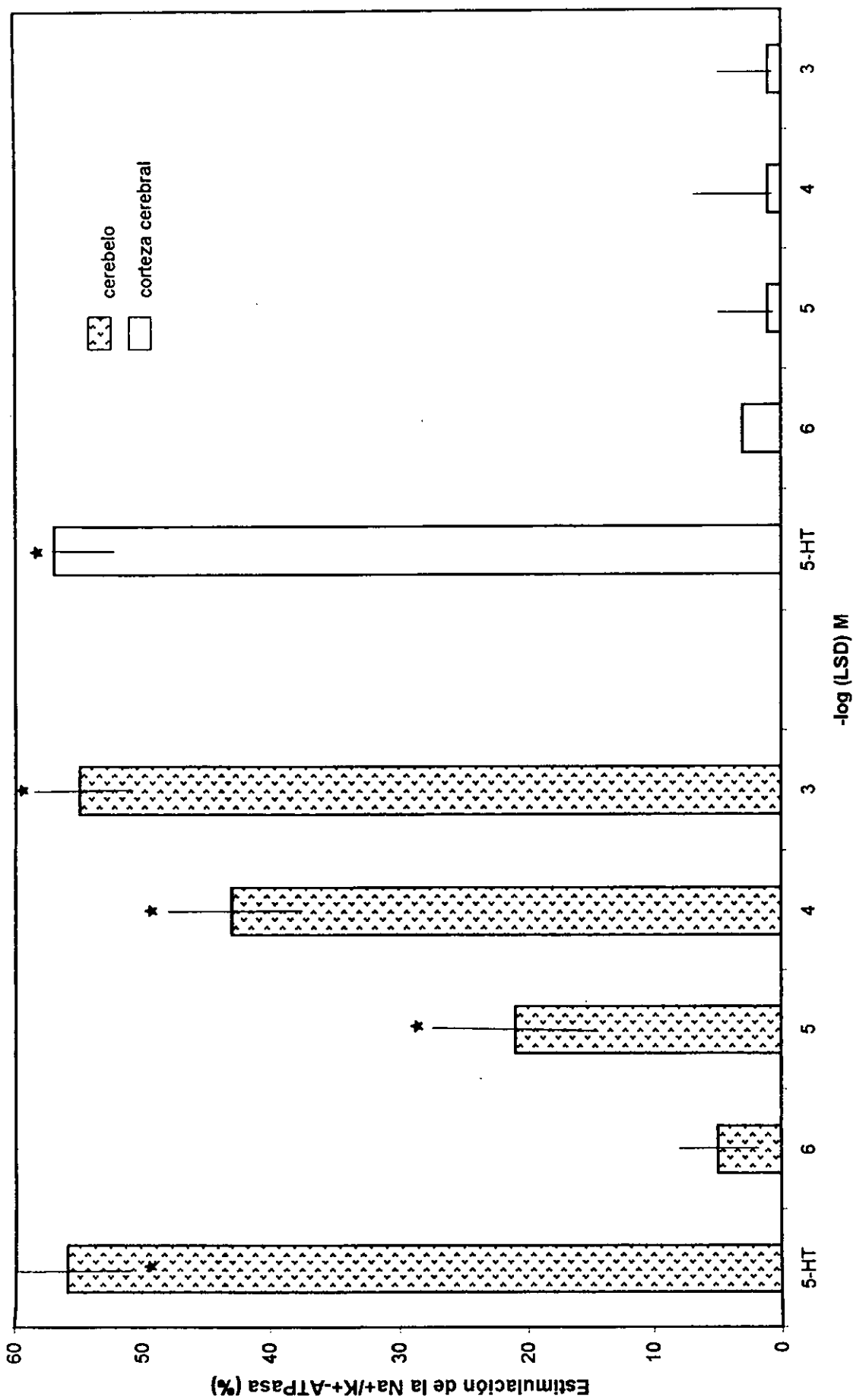


Fig 12. Estimulación por serotonina (10⁻⁵ M) o LSD (diferentes concentraciones) de la actividad de la Na⁺/K⁺-ATPasa en homogeneizados de cerebello y de corteza cerebral. Se muestran los promedio \pm d.s. de tres experimentos por triplicado. Las actividades basales fueron 10.5 ± 0.3 y 8.8 ± 0.33 μ mol Pi/mg/h respectivamente. Se muestra la significancia entre la actividad basal y los tratamientos (* p < 0.05).

TABLA XV. Estimulación por 5-HT de la Na⁺/K⁺-ATPasa en homogeneizados o fracciones enriquecidas con membranas gliales de corteza cerebral con o sin Na⁺.

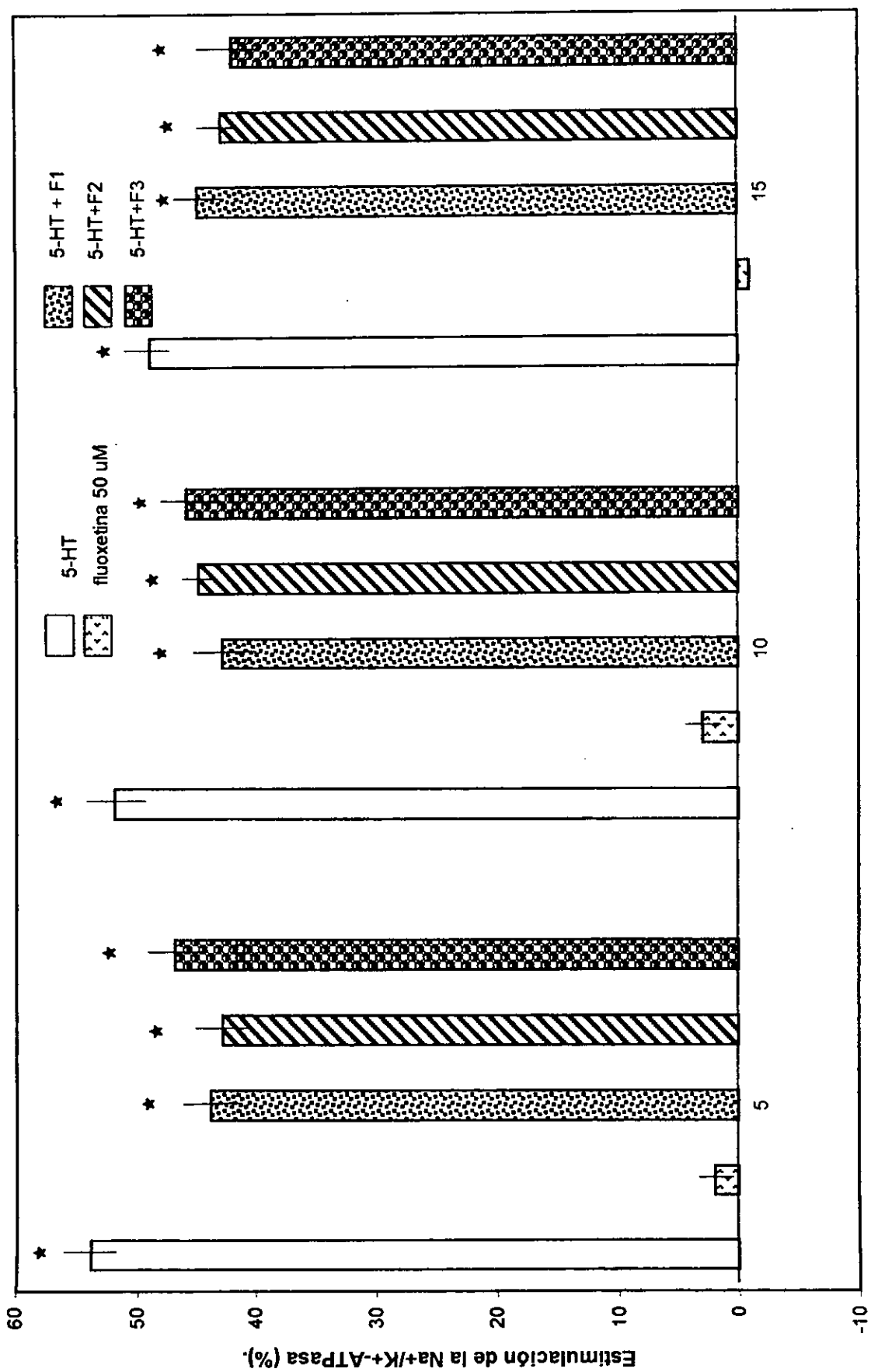
Tejido	Tratamiento	Actividad específica ($\mu\text{mol Pi/mg/h}$)	Estimulación con respecto al control (%)
homogenado	control c/Na ⁺	9.3 \pm 0.42	---
	5-HT c/Na ⁺	13.7 \pm 0.61*	47
	control s/Na ⁺	7.2 \pm 0.24	---
	5-HT s/Na ⁺	10.1 \pm 0.38*	40
glial	control c/Na ⁺	11.5 \pm 0.43	---
	5-HT c/Na ⁺	16.0 \pm 0.77 *	37
	control s/Na ⁺	9.3 \pm 0.35	---
	5-HT s/Na ⁺	11.9 \pm 0.56*	31

Se muestran los promedios \pm d.s. de dos experimentos por triplicado. El asterisco se refiere a diferencias significativas entre los tratamientos y los controles con una $p < 0.05$.

TABLA XVI. Estimulación de la Na⁺/K⁺-ATPasa por 5-HT en homogeneizados de corteza cerebral, con preincubaciones en presencia de fluoxetina a diferentes concentraciones (F1 5 μ M, F2 10 μ M, y F3 50 μ M), con tiempos de incubación de 5, 10 y 15 minutos.

Tratamiento	Incubación (min)	Actividad específica (μ mol Pi/mg/h)	Estimulación con respecto al control (%)
control	5	8.7 \pm 0.36	—
5-HT	5	13.4 \pm 0.52*	54
F1	5	8.9 \pm 0.36	2
5-HT+F1	5	12.5 \pm 0.44*	44
5-HT+F2	5	12.4 \pm 0.58*	43
5-HT+F3	5	12.8 \pm 0.53*	47
control	10	9.1 \pm 0.39	—
5-HT	10	13.8 \pm 0.65*	52
F1	10	9.4 \pm 0.4	3
5-HT+F1	10	13.0 \pm 0.57*	43
5-HT+F2	10	13.2 \pm 0.43*	45
5-HT+F3	10	13.3 \pm 0.48*	46
control	15	8.6 \pm 0.31	—
5-HT	15	12.8 \pm 0.56*	49
F1	15	8.5 \pm 0.34	-1
5-HT+F1	15	12.5 \pm 0.52*	45
5-HT+F2	15	12.3 \pm 0.68*	43
5-HT+F3	15	12.2 \pm 0.5*	42

Se muestran los promedios \pm d.s. de dos experimentos por sextuplicado. * $p < 0.05$.



tiempo de preincubación (min)

Fig 13. Estimulación de la Na⁺/K⁺-ATPasa por 5-HT en homogeneizados de corteza cerebral, preincubando con fluoxetina a diferentes concentraciones (F1 5 uM, F2 10 uM y F3 50 uM) con tiempos de incubación de 5, 10 y 15 minutos. La actividad basal fue 8.7 ± 0.36 , 9.1 ± 0.39 y 8.6 ± 0.31 umol de Pi/mg/h para 5, 10 y 15 minutos respectivamente. Se muestra la significancia entre la actividad basal y los tratamientos y los promedios \pm d.e. de dos experimentos por sextuplicado (* p < 0.01).

TABLA XVII. Estimulación de la Na^+/K^+ -ATPasa por 5-HT en fracciones enriquecidas con membranas gliales de corteza cerebral, con preincubaciones en presencia de fluoxetina a diferentes concentraciones (F1 5 μM , F2 10 μM , y F3 50 μM), con tiempos de incubación de 5, 10 y 15 minutos.

Tratamiento	Incubación (min)	Actividad específica ($\mu\text{mol Pi/mg/h}$)	Estimulación con respecto al control (%)
control	5	10.5 ± 0.42	—
5-HT	5	15.5 ± 0.71	48
F1	5	10.8 ± 0.47	3
5-HT+F1	5	$14.7 \pm 0.65^{**}$	40
5-HT+F2	5	$14.5 \pm 0.63^*$	38
5-HT+F3	5	$14.4 \pm 0.61^*$	37
control	10	9.9 ± 0.34	—
5-HT	10	$14.1 \pm 0.55^*$	42
F1	10	10.4 ± 0.4	5
5-HT+F1	10	$14.0 \pm 0.67^*$	41
5-HT+F2	10	$14.2 \pm 0.61^*$	43
5-HT+F3	10	$13.9 \pm 0.68^*$	40
control	15	10.4 ± 0.52	—
5-HT	15	$12.8 \pm 0.56^*$	55
F1	15	10.5 ± 0.41	1
5-HT+F1	15	$14.7 \pm 0.65^*$	41

Continuación de la tabla XVII

5-HT+F2	15	14.7 ± 0.68*	41
5-HT+F3	15	14.9 ± 0.49*	43

Se muestran los promedios ± d.s. de dos experimentos por sextuplicado. El asterisco se refiere a diferencias significativas entre los tratamientos y los controles con una $p < 0.05$.

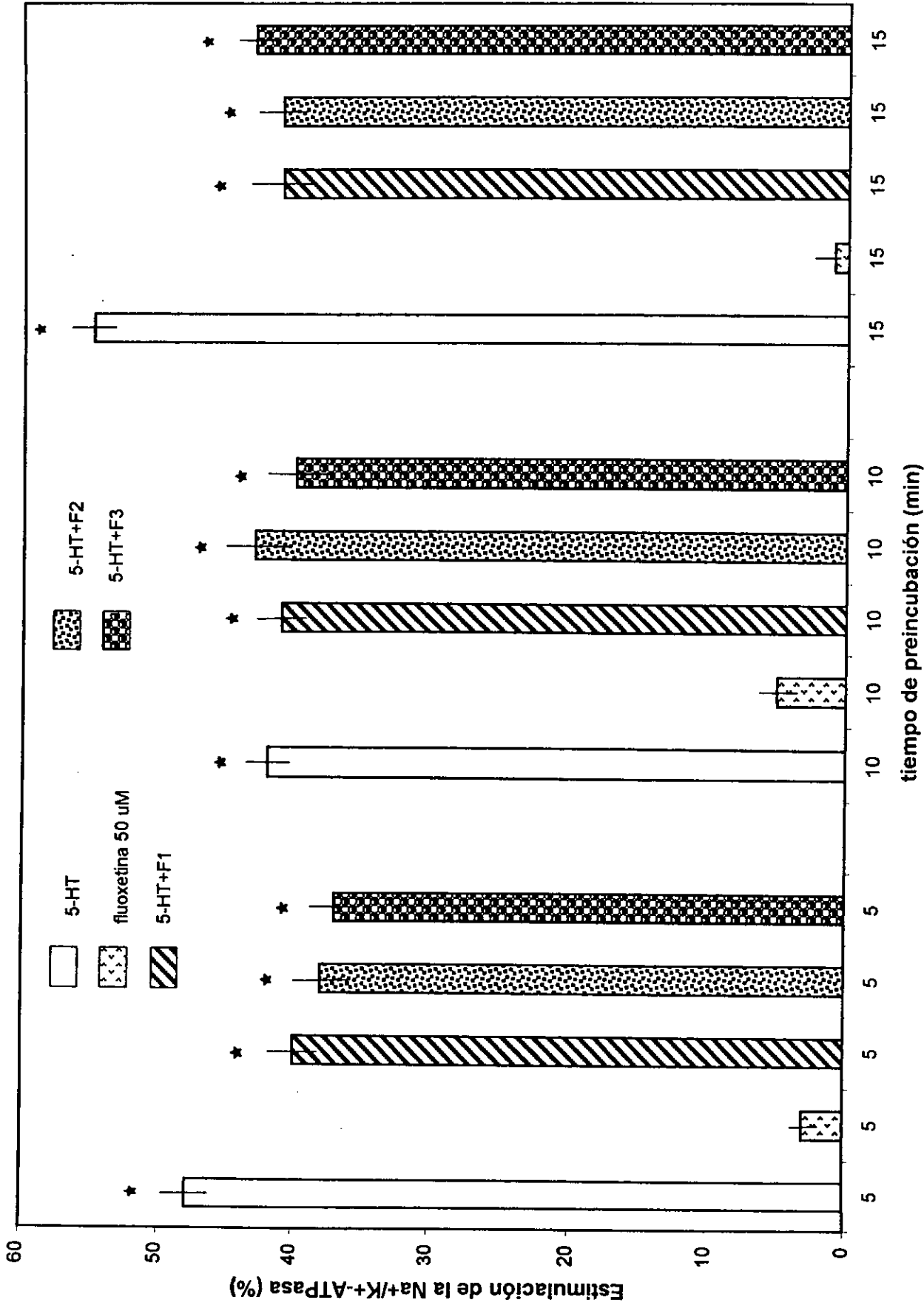


Fig 14. Estimulación de la Na⁺/K⁺-ATPasa por 5-HT en fracciones enriquecidas con membranas gliales de corteza cerebral, preincubando con fluoxetina a diferentes concentraciones (F1 5 uM, F2 10 uM y F3 50 uM), con diferentes tiempos de incubación. La actividad basal de los controles fue 10.5 ± 0.42, 9.9 ± 0.34 y 10.4 ± 0.52 umol de Pi/mg/h para 5, 10 y 15 minutos de incubación

REFERENCIAS

- Amundson, R., Goderie, S. and Kimelberg, H. (1992). Uptake of (³H)serotonin and (³H)glutamate by primary astrocyte cultures. II. Differences in cultures prepared from different brain regions. *Glia* (6): 9-18.
- Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K. And Watson J. (1994). **Molecular Biology of the Cell**. Third edition. Garland Publishing Inc. New York & London. 1294 p.
- Antonelli M., Costa Lieste M., Baskin D., Stahl W. and Schwartz M. (1995). Localization of Na⁺/K⁺-ATPase isoforms in the hypothalamus of the rat. *Cell Mol Biol* 41(1): 79-85.
- Antonelli M., Costa Lieste M., Mercado, R. and Hernández R. J. (1998). Serotonin Modulation of Low-Affinity Ouabain Binding in Rat Brain Determined by Quantitative Autoradiography. *Neurochem. Res.* 23: 939-944.
- Bertorello, A. and Katz, I. (1993). Short -term regulation of renal Na-K-ATPase activity: physiological relevance and cellular mechanism. *Am. J. Physiol.* 265. F743-F755
- Bradley P., Engel G., Feniuk W., Fozard J., Humphrey P., Middemiss D., Mylecharane E., Richardson B., and Saxena P. (1986). Proposals for the clasification and nomenclature of funcional receptors for 5-hydroxytryptamine. *Neuropharmacology* 25: 563-571.
- Carzon, M., Thomas, E. and Danielson, P. (1996). The 5-HT_{5A} serotonin receptor is expressed predominantly by astrocytes in which it inhibits cAMP accumulation: a mechanism for neuronal suppression of reactive astrocytes. *Glia* (17): 317-326.
- Clausen T. and Flatman J. (1987). Effects of insulin and epinephrine on Na⁺/K⁺ and glucose transport in soleus muscle. *Am. J. Physiol.* 252:E492-499.
- Darnell, J., Lodish, H., and Baltimore, D. (1990). *Molecular Cell Biology*, 2nd ed. New York: Scientific American Books.
- Dahlstrom A. and Fuxe K. (1964). An evidence for the existence of monoamine-containing neurons in the central nervous system. *Acta Physiol. Scand.* (Suppl 232) 268, 285, 320, 329.
- Díaz M., Chagoya G. y Hernández R. J. (1993). Modificación por desnutrición ontogénica de la neurotransmisión serotoninérgica cerebral y de una conducta relacionada. *Bol. Med. Hosp. Infant. Mex* 50(1): 17-26.
- Dumuis A., Bouhelal R., Sebben M. and Bockaert J. (1988). A 5-HT receptor in the central nervous system positively coupled with adenylyl cyclase, is antagonized by IC S 205-930. *Eur. J. Pharmacol.* 146: 187-195.
- Evrard P. and Minkowski A. (1989). *Developmental Neurobiology*. Nestlé nutrition. Raven Press New York. 315 p.
- Ewart, S. and Klip, A. (1995). Hormonal regulation of the Na⁺-K⁺-ATPase: mechanisms underlying rapid and sustained changes in pump activity. *Am. J. Physiol.* 269 (cell Physiol. 38): C295-C311.
- Fillion M., Hernández R. J., Bauguen C. and Fillion G. (1982). Postnatal development of high affinity neuronal recognition sites for 3H-5-HT in rat brain. *Dev. Neurosc.* 5:484-491.

- Fiske C. and Subbarow Y. (1925). The colorimetric determination of phosphorous. *J. Biol. Chem.* 66: 375-400.
- Frixione E. And Hernández R. J. (1989). Modulation of screening-pigment position in crayfish photoreceptors by serotonin: possible involvement of Na⁺/K⁺-ATPase activity. *J. Exp. Biol* 143: 459-473.
- Fuller, R. and Wong, D. (199). Serotonin uptake and serotonin uptake inhibition. *Annals New York Academy of Sciences*.68-80
- Gozlan, H., Mestikawy, S., Picket, L., Glowinsky, J. and Hamon, M. (1983). Identification of presynaptic serotonergic autoreceptors using a new ligand: 3H-DPAT. *Nature* 305: 140-142.
- Gray E. And Whittaker V. (1962). The isolation of nerve endings from brain: an electron-microscopic study of cell fragments by homogenization and centrifugation. *J. Anat. Lond.* 96: 79-88.
- Hamon M., Bourgoin S., Artaud F. And Mestikawy S. (1981). The respective roles of tryptophan uptake and tryptophan hydroxylase in the regulation of serotonin synthesis in the central nervous system. *J. Physiol. Paris* 77: 269-279.
- Herd A., Horwitz A. and Smith E. (1970). *Experientia* 26: 825-826.
- Hernández R. J. (1979). Na⁺/K⁺-ATPase activity in the brain cortex of rats ontogenetically malnourished and treated with serotonin precursors. *Brain Research* 162: 348-352.
- Hernández R. J. (1982). A serotonin agonist-antagonist reversible effects on Na⁺/K⁺-ATPase activity in the developing rat brain. *Dev. Neurosci.* 5: 326-331.
- Hernández R. J. and 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.
- Hernández R. J. (1987). Brain Na⁺/K⁺-ATPase activity possibly regulated by a specific serotonin receptor. *Brain Research* 408: 399-402.
- Hernández R. J. and Condés-Lara M. (1989). Serotonin-dependent Na⁺,K⁺ ATPase in kindled rats: a study in various brain regions. *Brain Research* 480: 403-406.
- Hernández R. J. (1992). Na⁺/K⁺-ATPase regulation by neurotransmitters. *Neurochem Int.* 20 (1): 1-10.
- Horisberger, J., Lemas, V., Kraehenbuhl, J. and Rossier, B. (1991). Structure-function relationship of Na, K-ATPase. *Annu. Rev. Physiol.* 53: 565-584.
- Humphrey, F., Harting, P. and Hoyer, D. (1993). A proposed new nomenclature for 5-HT receptor. *Trends Pharmacol. Sci.* 14: 233-241.
- Ibarra, F., Aperia, A., Svensson, L., Eklof, A. and Greengard, P. (1993). Bidirectional regulation of Na, K-ATPase activity by dopamine and an alfa adrenergic agonist. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:21-24.
- Jakeman, L., Bonhaus, D., Ramsey, Y., Wong, E., Chan, H., Bach, C., Eglén, R. and Tsou, A. (1993). Characterization and localization of mRNA for a novel serotonin (5-HT) receptor positively coupled to adenylyl cyclase in guinea pig brain. *Soc. Neurosci. Abstr.* 19: 1164-1168.

- Kohen, R., Metcalf, M., Khan, N., Druck, T., Huebner, K., Lachowicz, J., Meltzer, H., Sibley, D., Roth, B. and Hamblin, M. (1996). Cloning, Characterization, and Chromosomal localization of a human 5-HT₆ serotonin receptor. *J. Neurochem.* 66: 47-56.
- Jequier, E., Robinson, D., Lovenberg, W. and Sjoerdsma A. (1969). Further studies on tryptophan hydroxylase in rat brainstem and beef pineal. *Biochem. Pharmacol* 18: 1071-1081.
- Lidof, H., Grzanna R. and Molliver, M. (1980). The serotonin innervation of the cerebral cortex in the rat an immunocytochemical analysis. *Neuroscience* 5: 207-227.
- Logan, C. and O'Donovan, J. (1976). The effects of ouabain and the activation of neural membrane ATPase by biogenic amines. *J. Neurochem.* 27: 185-189.
- Loizou, L. (1969). The development of monoamine containing neurons in the brain of the albino rat. *J. Anat.* 104: 588.
- Lowry, O., Rosebrough, N., Farr, A. and Randall, R. (1951). Protein measurement with the Folin phenol of reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.
- Manjarréz, G., Chagoya, G. y Hernández R. J. (1988). Perinatal brain serotonin metabolism in rats malnourished in utero. *Biol. Neonate* 54: 232-240.
- Martin, G. and Humprey, P. (1994). Receptors for 5-hydroxytryptamine: current perspectives on classification and nomenclature. *Neuropharmacol.* 33: 261-273.
- McGeer, L. P., Eccles, J. S. and McGeer, E. G. (1987). *Molecular Neurobiology of the Mammalian Brain*. Plenum Press. New York and London 774 p.
- Mercado, R. and Hernández R. J. (1992). Regulatory role of a neurotransmitter (5-HT) on glial Na⁺/K⁺-ATPase in rat brain. *Neurochem Int.* 21(1): 119-127.
- Mercado, R. and Hernández R. J. (1994). Biochemical properties of Na⁺/K⁺-ATPase in axonal growth cone particles isolated from fetal rat brain. *Int. J. Devl. Neuroscience* 12(5): 485-489.
- Mercado, R., Floran, B. and Hernández R. J. (1998). Regulated release of serotonin from axonal growth cones isolated from the fetal rat brain. *Neurochem Int.* 103-106.
- Mercer, R. (1993). Structure of the Na, K-ATPase. *Int. Rev. Cytol.* 137 C: 139-168.
- Middleton, J., Khan, W., Collinsworth, G., Hannun, Y., Medford, R. (1993). Heterogeneity of protein kinase C-mediated rapid regulation of Na/K-ATPase in kidney epithelial cells. *J. Biol. Chem.* 268: 15958-15964.
- Oscós, A. and Hernández R. J. (1982). Gestational malnutrition and drugs affecting brain serotonin: Effects on temporal control behaviour. *Behavioral and Neural Biology.* 34: 358-371.
- Peroutka, S (1994). 5-Hydroxytryptamine receptors. In *Handbook of Receptors and Channels. G Protein-coupled receptors*. Ed. Stephen J. Peroutka. CRC Press London. 335 p.
- Rapport M., Green A. and Page H. (1948). Partial purification of the vasoconstrictor in beef serum. *J. Biol. Chem.* 174: 735-739.
- Rodríguez de Lores Amaiz G., Antonelli de Gómez de Lima M. and Girardi, E. (1989). Different properties of two brain extracts separated in Sephadex G-50 that modify synaptosomal ATPase activities. *Neurochem. Res.* 13:229-235.

- Rose, S. (1967). Preparation of enriched fraction from cerebral cortex containing isolated, metabolically active neuronal and glial cells. *Biochem. J.* 102:33-43.
- Sanders-Bush, E. (1988). *The serotonin receptors*. The Human Press Clifton, New Jersey. 338 p.
- Sastry, and Phillips, (1992)
- Segal, M. (1981). The action of serotonin in the rat hippocampus. *Adv. Exptl. Med. Biol.* 133: 375-390.
- Siegel G., Agranoff B., Albers R. and Molinoff P. (1989). *Basic Neurochemistry*. Fourth ed. Raven Press New York N. Y. 984 p.
- Siegelbaum, S.A., Camardo, J. S., and Kandel, E. R. (1982). Serotonin and cyclic AMP close single K⁺ channels in *Aplysia* sensory neurones. *Nature* 299: 413-417.
- Schmitt, A. and McDonough, A. (1986). Developmental and thyroid hormone regulation of two molecular forms of Na⁺/K⁺-ATPase in brain. *J. Biol. Chem.* 261: 10439-10444.
- Skou, J. (1957). The influence of some cations on a adenosin triphosphatase from peripheral nerves. *B. A. B.* 23: 394-401.
- Shor-Posner, G and Grinker, A. (1986). Hypothalamic serotonin in the control of meal patterns and macronutrients selection. *Brain Res Bull.* 17: 663-671
- Stahl, W. (1986). The Na, K-ATPase of nervous tissue. *Neurochem Int.* 8: 449-476.
- Stein, W. (1990). *Channels, Carriers and Pumps: An Introduction to Membrane Transport*. San Diego, CA. Academic Press.
- Steinbush, W (1981). Serotonin-immunoreactive neurons and their projections in the CNS. *Handbook of Chemical Neuroanatomy. Vol 3: Classical Transmitters and Transmitters receptors in the CNS. Part III.* A Bjorklund, T. Hokfelt and M. Kuhar (eds) Elsevier, New York. 175 p.
- Sweadner, K. (1989). Isozymes of the Na⁺/K⁺-ATPase. *Biochem. Biophys. Acta.* 185-220.
- Verge, D., Matthiessen, L., Daval, G., Bailly, Y., Kia, H. and Hamon, M (1991). Localization of 5-HT_{1A} serotonin receptors in the cerebellum of young rats. *Neurochem. Int.* 19 (4): 425-431.
- Villalón, C., Terrón, J., Ramírez-San Juan, E. and Saxena, P.(1995). 5-Hydroxytryptamine: Considerations about discovery, receptor classification and relevance to medical research. *Arch. Med. Res.* 26(4): 331-344.
- Vjendra, D and Kimelberg, H. (1994). Na⁺-Dependent, fluoxetine-sensitive serotonin uptake by astrocytes tissue-printed from rat cerebral cortex. *J. Neurosc.* 14(8): 4972-4988.
- Watts, A., Sánchez-Watts, G., Emanuel, J. and Levenson, R. (1991). Cell-specific expression of mRNAs encoding Na⁺,K⁺-ATPase α and β -subunit isoforms within the rat central nervous system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 7425-7429.
- Whitaker-Azmitia, P., Clarke, C. and Azmitia, E. (1993). Localization of 5-HT 1^a receptors to astroglial cells in adult rats: Implications for neuronal-glia interactions and psychoactive drug mechanism of action. *Synapse* (14): 201-205.
- Yoshimura, K.(1973). Activation of Na⁺,K⁺-ATPase in rat brain by catecholamine. *J. Biochem* (74): 389-391.

Zifa, E., Hernández R. J., Fayolle, C. and Fillion, G. (1988). Postnatal development of 5-HT₁ receptors: (3H)5-HT binding sites and 5-HT induced adenylate cyclase activations in rat brain cortex. *Develop. Brain. Res.* 44: 133-140.