

# Actividad de la bomba de sodio y potasio en cerebelo de ratas con diabetes mellitus experimental

Esquivel-García R, Lara-Ramírez L, Bautista-García CS, y Mercado-Camargo R. ✉

1Laboratorio de Neurobiología, Facultad de Químico Farmacobiología, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

## Resumen

La epidemiología de la diabetes mellitus señala con claridad que se trata de un problema de primera magnitud a nivel mundial; la falta de control adecuado de la enfermedad acelera las complicaciones crónicas y promueve la manifestación de múltiples fisiopatologías, como la neuropatía diabética. Una alteración importante en el desarrollo de dichas anomalías es la disminución en la actividad de la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasa en muchos tejidos periféricos de animales con diabetes mellitus experimental (DME). Para observar si los cambios en la actividad de la enzima a nivel periférico ocurren también a nivel central, se planteó estudiar en un modelo de ratas con DME la afección en la homeóstasis del cerebelo, estructura fundamental del sistema nervioso. Por lo cual el objetivo del presente trabajo fue evaluar la actividad de la bomba de sodio y potasio en el cerebelo de ratas con DME y su respuesta a la serotonina (5-HT). Se aprecia un descenso significativo en la actividad específica de la enzima en las diferentes preparaciones de tejido cerebeloso, las curvas dosis-respuesta con serotonina (5-HT) evidencian la estimulación de la actividad de la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasa por el neurotransmisor en homogeneizado y la fracción glial del cerebelo, siendo mayor el estímulo en el cerebelo de ratas con DME, mientras que la fracción neuronal no mostró respuesta a 5-HT. En conclusión, la DM causa alteraciones importantes como la disminución en la actividad de la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasa y cambios en la relación de esta enzima con el sistema serotoninérgico en el cerebelo de rata, lo que aunado a cambios del balance energético cerebral podría afectar gravemente la actividad neuronal trayendo consigo grandes consecuencias así como daños estructurales y funcionales del sistema nervioso central.

**Palabras clave:** *bomba de sodio y potasio, serotonina, diabetes mellitus.*

## Abstract

The diabetes mellitus epidemiology clearly indicates that this is a major problem worldwide; the lack of adequate control of the disease accelerates chronic complications and promotes the expression of multiple pathologies, such as diabetic neuropathy. A significant change in the development of these abnormalities is the decrease in the activity of the  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase in many peripheral tissues of rats with experimental diabetes mellitus (EDM). To see whether changes in the activity of the enzyme at a peripheral level also occur centrally, it has been proposed a study in a rat model of experimental diabetes mellitus homeostasis condition in the cerebellum, which is a central nervous system structure. So, the aim of the present study was to evaluate the activity of the  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase in cerebellum of rats with EDM and its response to serotonin (5-HT). Results show a significant decrease in the specific activity of the enzyme in many tissue preparations of cerebellum, and the dose-response curves to 5-HT show stimulation of the activity of the  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase in the homogenate and glial fraction; while stimulation is higher in the cerebellum of rats with experimental diabetes mellitus, the neuronal fraction showed no response to 5-HT. In conclusion, diabetes mellitus causes important disruptions as the decrease in the activity of the  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase and changes in the relationship of this enzyme with the serotonergic system in the rat cerebellum, those changes in energy balance brain could affect neuronal activity seriously bringing great consequences and structural and functional damage of the central nervous system.

**Key words:** *sodium-potassium pump, serotonin, diabetes mellitus.*

## Introducción

La diabetes mellitus (DM) es una enfermedad metabólica, caracterizada por complicaciones crónicas como la hiperglucemia, debida a que las células no absorben ni utilizan la glucosa de modo eficiente por una inadecuada secreción de insulina en las células  $\beta$  del páncreas ó por resistencia de las células a la acción de esta hormona en los diversos tejidos del organismo (ADA, 2011). Su epidemiología señala con claridad que se trata de un problema de primer magnitud a nivel mundial, del que se predice tiende a incrementarse por el envejecimiento de la población, la creciente prevalencia de obesidad, sedentarismo y cambios en la dieta (OMS, 2010). La falta de un control adecuado de la DM, principalmente de la glucemia, acelera las complicaciones de la

enfermedad, manifestándose en múltiples fisiopatologías, como la neuropatía diabética (Tsfaye *et al.*, 2010). La búsqueda de alteraciones en diversas estructuras cerebrales ha sido la pauta para interpretar los trastornos funcionales que la DM causa en el sistema nervioso.

Una estructura localizada en el sistema nervioso central es el cerebelo, se le atribuyen diversas funciones, como su participación en procesos emocionales y cognitivos por la integración de información de las vías sensitivas, y la capacidad de precisar órdenes de las vías motoras para lograr una buena coordinación motriz (Hernández *et al.*, 2010; Yeganeh *et al.*, 2011). Las funciones que desempeña el cerebelo dependen de la correcta acción de células nerviosas (neuronas y células gliales), las cuales forman complejas interrelaciones entre ellas y se relacionan con otras regiones del sistema nervioso en una forma compleja y dinámica, en gran medida por neurotransmisión química intercelular

✉ **Autor de correspondencia:** Rosalio Mercado Camargo. Laboratorio de Neurobiología, Facultad de Químico Farmacobiología, U.M.S.N.H. Tzintzuntzan # 173, Col. Matamoros, C.P. 58240, Morelia, Michoacán, Tel/Fax: (443) 314-2809 Ext. 208. E-mail: ros421@hotmail.com

(Bloom, 2005; Manto and Jessendi, 2012). Se ha observado que la DM afecta a sistemas de neurotransmisión y grupos neuronales específicos; como es el caso del sistema serotoninérgico cerebral donde la DM induce cambios importantes en la biosíntesis de su neurotransmisor y receptores (Sumiyoshi *et al.*, 1997; Manjarréz *et al.*, 2000; Salgado *et al.*, 2012).

Las neuronas serotoninérgicas tienen sus cuerpos celulares localizados en el tallo cerebral, sus prolongaciones axónicas inervan el encéfalo y la médula espinal; el neurotransmisor específico del sistema serotoninérgico es la 5-hidroxitriptamina (serotonina, 5-HT) que participa en una gran variedad de funciones cerebrales, entre ellas regulación de los ciclos de sueño-vigilia, temperatura, apetito, estado de ánimo, función cognitiva, percepción sensitiva, actividad motora, comportamiento sexual, secreción de hormonas, y en células gliales regula la función de la Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPasa (Mercado and Hernández, 1992; Berger *et al.*, 2009). Es por ello que cualquier modificación en este sistema de neurotransmisión cerebral tenga repercusión en el funcionamiento óptimo del organismo (Sanders-Bush y Mayer, 2005).

La Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPasa localizada en células nerviosas puede llegar a acaparar dos tercios del total de la energía celular en forma de ATP para realizar su función, con lo que restablece el potencial eléctrico de membrana, mantiene los gradientes de Na<sup>+</sup> y K<sup>+</sup> a través de la bicapa lipídica, controla el pH y el volumen celular, además proporciona la fuerza impulsora para el transporte de otros solutos con ayuda de Na<sup>+</sup>, como iones, glucosa y agua (Skou, 1992; Mann *et al.*, 2003). La enzima esta conformada por un tetrámero de polipéptidos ensamblados en pares, los dos principales son las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$ . Los polipéptidos  $\alpha$  constituyen la subunidad catalítica principal, designada subunidad  $\alpha$ , que contiene la actividad catalítica de la enzima, pues cuenta con el sitio de unión del ATP y los sitios de fijación de cationes; la subunidad  $\beta$ , una glicoproteína auxiliar, tiene la función de estabilizar la subunidad  $\alpha$ , facilitar su encaminamiento y la inserción en la membrana celular (Kaplan, 2002; Jorgensen *et al.*, 2003). La Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPasa tiene 3 isoformas de la subunidad  $\beta$  y 4 isoformas de la subunidad  $\alpha$  que presentan una distribución tejido específica, lo que sugiere una función especializada de la enzima dependiente del tejido que se trate, ya que las diversas isoenzimas se caracterizan por propiedades enzimáticas y un patrón de expresión particulares muy regulados que dependen del tipo de célula, etapa de desarrollo, y la estimulación por hormonas ó neurotransmisores (Mercado and Hernández, 1994; Therien and Blostein, 2000; Blanco, 2005).

La regulación de la Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPasa es compleja, su actividad puede ser regulada por diferentes factores intrínsecos y extrínsecos (Therien and Blostein, 2000). La regulación extrínseca en diversos tejidos está bajo el control de una serie de hormonas circulantes, proteínas y neurotransmisores, como la 5-HT, que participan en el control a corto y largo plazo sobre su actividad (Hernández, 1992; Ewart and Klip, 1995). La regulación a corto plazo involucra generalmente efectos directos en el comportamiento cinético de la enzima o la translocación de las bombas de sodio entre los depósitos intracelulares y la membrana plasmática, mientras el control a largo plazo induce la síntesis de la bomba o su degradación. La relación funcional entre la 5-HT y la Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPasa se ha demostrado mediante el empleo de precursores serotoninérgicos

y condiciones de desnutrición en los que incrementa la síntesis del neurotransmisor, además del empleo de fármacos específicos para receptores serotoninérgicos, con lo que se ha apreciado que la serotonina aumenta la actividad de la enzima particularmente en células gliales (Peña *et al.*, 1999).

La actividad de la Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPasa esta disminuida en la membrana celular de muchos tejidos obtenidos de animales con diabetes mellitus experimental (DME) a nivel periférico, entre los que se incluyen riñón, corazón, intestino y nervios periféricos; este defecto tiene un papel importante en el desarrollo de las complicaciones de la DM (Ng *et al.*, 1993; Barada *et al.*, 1994; Vague *et al.*, 2004). Para establecer si cambios producidos por la DM sobre la actividad de la enzima observados a nivel periférico pueden ocurrir en el sistema nervioso central, en el presente trabajo se planteó estudiar si el estado de DM afecta la homeostasis del cerebelo, donde alteraciones en la actividad de la Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPasa ó en su regulación por serotonina podrían modificar la estrecha relación entre células nerviosas causando problemas en las diversas funciones de ésta estructura cerebral.

## Material y métodos

Se utilizaron ratas macho adultas de la cepa Wistar de 300 ± 10g de peso corporal, las cuales fueron mantenidas en el bioterio del Laboratorio de Neurobiología de la Facultad de Química Farmacobiología de la U.M.S.N.H., siguiendo los protocolos vigentes para el uso de animales de investigación (SAGARPA, 2001), con alimento y agua *ad-libitum*, ciclos de luz y oscuridad de 12 horas (7-19 horas), temperatura de 24 ± 2 °C y humedad relativa de 60.0±5%.

Las ratas fueron distribuidas en dos grupos: un grupo experimental formado por ratas con diabetes mellitus experimental (DME) posterior a la administración de estreptozotocina (STZ) vía intraperitoneal, en dosis única de 55 mg/Kg de peso disuelta en solución amortiguadora de citratos pH 4.5; y un grupo control (C), al cual se le administró un volumen equivalente del vehículo. Se monitoreo el estado de glucemia, las ratas con concentración mayor a 200 mg/dL de glucosa en sangre se consideraron con DME.

Tres semanas posteriores a la administración de STZ, las ratas se sacrificaron mediante lesión cervical, y realizando una incisión media torácica se perfundió el cerebro *in situ* con 20 ml de solución salina isotónica fría que se inyectó en el ventrículo izquierdo del corazón. Rápidamente se obtuvo el cerebro y se disecó el cerebelo, el cual se homogeneizó en 10 volúmenes de solución amortiguadora Tris-HCl 50 mM a pH 7.4, con 10 pasos a 700 rpm en un homogeneizador Thomas con vástago de teflón de 0.25 mm de luz. Se realizó determinación del contenido proteico del tejido cerebeloso por el método de Lowry *et al.*, (1951) para tener concentraciones finales de 2 µg de proteína/µl empleando albúmina bovina como estándar. A los homogeneizados de ambos grupos se les determinó la actividad específica (A. E.) de la Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPasa con el método empleado por Mercado y Hernández (1992), por triplicado de alícuotas de 25 µl del homogeneizado de cerebelo equivalentes a 50 µg de proteína. Para valorar la regulación serotoninérgica sobre la actividad de la bomba de sodio y potasio se realizaron curvas dosis-respuesta con 5-HT en un rango de concentraciones de 1.0x10<sup>-4</sup> - 1.0x10<sup>-12</sup> M.

La obtención de las fracciones enriquecidas con membranas gliales y neuronales de los dos grupos se realizó mediante el método descrito por Rose (1967), una vez que se disecó el cerebelo fue finamente cortado y colocado en una solución de Ficoll al 10% en amortiguador de fosfatos a pH 7.4, se hizo pasar a través de una malla de nylon de 110 µm de poro mediante presión mecánica y después en una de 48 µm. El filtrado se colocó en un gradiente de sacarosa 1.45 M y Ficoll al 30%. Se centrifugó a 39,000 rpm por 45 minutos a 4°C. Se obtuvieron cuatro fracciones de las cuales la interfase de Ficoll 10-30% correspondió a la fracción glial y la interfase Ficoll 30%-sacarosa a la fracción neuronal, corroborándose con ayuda de microscopio óptico. Se colectaron las bandas y se diluyeron en Tris-HCl 50 mM pH 7.4, se centrifugaron a 9,000 rpm 10 minutos y finalmente se resuspendió cada fracción en 1ml de Tris-HCl 50 mM pH 7.4. Se realizó determinación de contenido proteico de ambas fracciones, al igual que la actividad específica de la Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPasa y las correspondientes curvas dosis-respuesta con 5-HT.

En el análisis estadístico de los datos se evaluaron las medidas de tendencia central, se observó homogeneidad, y se empleó la prueba “t” de Student para realizar comparación entre los grupos C y DME. Las curvas patrón de proteína y de fosfatos se sometieron a regresión lineal, mientras que para las curvas dosis-respuesta se empleó un modelo sigmoidal (Motulsky, 2003).

### Resultados

Nuestros resultados muestran que el grupo DME tuvo un aumento significativo de la glucosa sanguínea a partir de la 1ª semana posterior a la aplicación de la STZ en comparación con el grupo C (p<0.001), también el grupo DME, mantuvo un aumento significativo en la ingesta de alimento y agua en relación con el tiempo de evolución de la enfermedad al comparar con sus controles. El peso corporal fue significativamente menor en el grupo DME desde la primera semana de la aplicación de la STZ (p<0.01) (Tabla 1).

La curva patrón empleada en la determinación de la concentración de proteína en el homogeneizado de cerebelo fue lineal en el rango de concentraciones comprendido entre 10 y 30 µg/µl con un coeficiente de correlación lineal (R) de 0.9966.

En la determinación del Pi liberado para valorar la actividad de la Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPasa, la curva patrón de fosfatos presentó un R=0.9997 en un rango de concentraciones de 25 a 100 µmol/µl.

Un parámetro de gran importancia que se midió en el presente trabajo fue la actividad de la Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPasa en el cerebelo de la rata. Como se aprecia en la figura 1, el grupo DME mostró un descenso significativo en la actividad enzimática en preparaciones de homogeneizado de cerebelo en comparación con el grupo C (p<0.001); ésta disminución corresponde al 26.34%. Una alteración similar se apreció en las fracciones membranales gliales y neuronales de cerebelo, donde la actividad de la Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPasa del grupo DME también disminuyó significativamente (p<0.001); la actividad específica de la enzima mostró un descenso de 29.59% en la fracción glial (figura 2) y hasta un 46.71% en la fracción neuronal al comparar con sus respectivos controles (figura 3).

La figura 4 muestra la curva dosis-respuesta de la bomba de sodio y potasio a la serotonina en homogeneizado de corteza cerebelosa. El análisis de las curvas dosis-respuesta de los grupos C y DME, se realizó con un modelo sigmoidal en donde se obtuvo un valor de R=0.985 ± 0.004 (p<0.05). En homogeneizado de cerebelo (figura 4), las curvas dosis-respuesta con serotonina evidencian la existencia de una respuesta positiva en la actividad de la Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPasa por el neurotransmisor, presentándose un mayor efecto en el grupo DME con una estimulación de 86.83%, mientras que en el grupo C fue de 24.32%. Se obtuvieron las dosis efectivas cuando el estímulo alcanza un 50% (DE<sub>50</sub>), las cuales fueron de 5.65x10<sup>-9</sup> M en el grupo C y de 1.11x10<sup>-7</sup> M para el grupo DME.

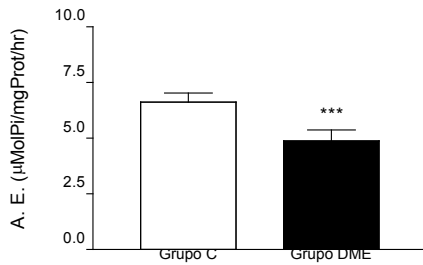
La figura 5 muestra el efecto de la 5-HT sobre la actividad de la Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPasa en la fracción glial de cerebelo, se observó una respuesta similar al neurotransmisor como la observada en homogeneizado cerebeloso, donde el efecto de estimulación enzimática alcanzó un 42.77% para el grupo C con una DE<sub>50</sub> de 1.09x10<sup>-9</sup> M y en el grupo DME una DE<sub>50</sub> de 1.34x10<sup>-9</sup> M con 52.28% de estimulación.

La relación dosis-efecto de la 5-HT en la actividad de la Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPasa en la fracción neuronal cerebeloso mostró un

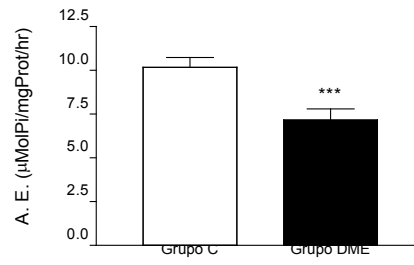
Tabla 1. Registro de parámetros fisiológicos en ratas con DME y controles.

Parámetro	Pre-inducción		Tiempo pos-inducción					
	Grupo C	Grupo DME	1ª Semana		2ª Semana		3ª Semana	
			Grupo C	Grupo DME	Grupo C	Grupo DME	Grupo C	Grupo DME
Glucosa sanguínea	99.8±4.02	98.6±3.07	98.4±3.44	420.0±14.18 ***	101.7±2.43	431.5±25.52 ***	100.4±3.16	416.0±29.54 ***
Peso corporal	300.5±5.98	300.6±5.13	312.3±11.25	289.6±7.76 **	346.2±10.22	268.6±8.86 ***	382.5±7.45	275.6±10.71 ***
Alimento consumido	24.12±0.78	23.13±0.99	25.67±0.39	34.08±1.89 ***	22.83±0.84	42.20±1.80 ***	23.14±0.64	40.12±1.17 ***
Agua ingerida	46.2±6.94	47.5±5.34	46.6±6.05	153.0±18.00 ***	47.2±4.78	168.3±16.07 ***	48.2±11.09	176.5±9.19 ***

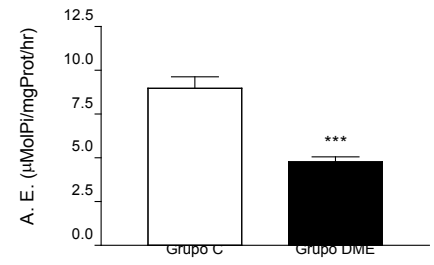
Valores promedio ± desviación estándar de 6 animales por grupo. \*\* P< 0.01 \*\*\*P< 0.001.



**Figura 1.** Actividad específica de la Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPasa en homogenizado de cerebelo de ratas con DME y controles. Valores promedio ± desviación estándar de 12 experimentos realizados por triplicado. \*\*\*P<0.001.



**Figura 2.** Actividad específica de la Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPasa en la fracción de membranas gliales de cerebelo de ratas con DME y controles. Valores promedio ± desviación estándar de 6 experimentos realizados por triplicado. \*\*\*P<0.001.



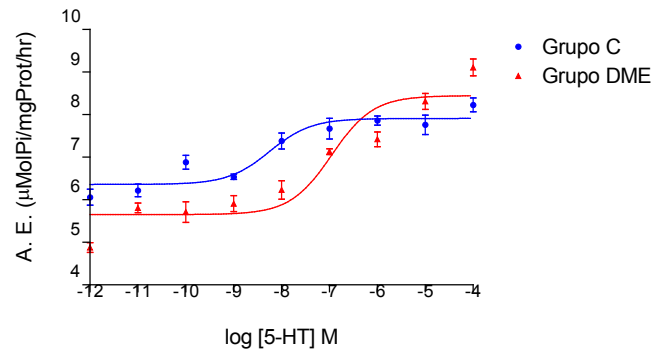
**Figura 3.** Actividad específica de la Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPasa en la fracción de membranas neuronales de cerebelo de ratas con DME y controles. Valores promedio ± desviación estándar de 6 experimentos realizados por triplicado. \*\*\*P<0.001.

comportamiento de antagonista en el grupo C y en el grupo DME se observó agonismo inverso con las dosis probadas de una mayor concentración del neurotransmisor (**figura 6**). La  $DE_{50}$  para el grupo DME correspondió a  $5.65 \times 10^{-6}$  M; el porcentaje de inhibición que se presentó fue de 3.86% ( $p < 0.05$ ).

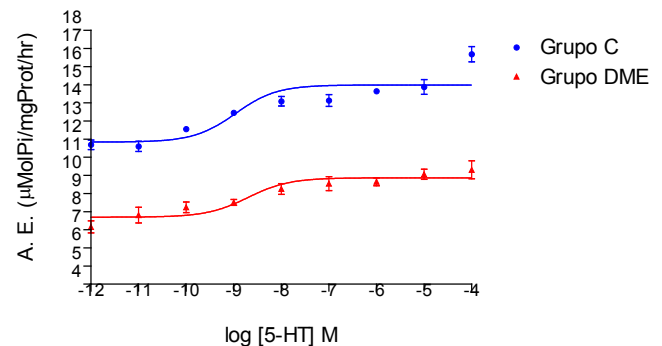
## Discusión.

En el presente trabajo, mediante la aplicación una dosis única de STZ, se implementó un modelo de DME en ratas macho adultas, obteniendo resultados que mantuvieron relación con el tiempo en que se realizó el experimento como la presencia de hiperglucemia y la pérdida de peso (**tabla 1**), al igual se observaron signos como la polifagia, poliuria y polidipsia; los datos concuerdan con los obtenidos anteriormente en nuestro laboratorio y por otros investigadores, confirmando la correcta implementación del modelo de DME insulino-dependiente por la acción destructiva que la STZ causa sobre las células  $\beta$  del páncreas (Juárez, 2008; Lenzen, 2008).

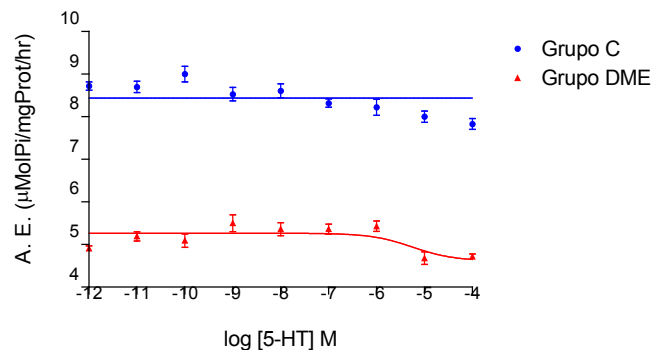
Para establecer si los cambios inducidos por la DM sobre la Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPasa observados a nivel periférico ocurren en el sistema nervioso central, se realizó la búsqueda de alteraciones en la actividad de la Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPasa en cerebelo, una estructura localizada en el encéfalo a la que se le atribuyen funciones de gran importancia (Hernández *et al.*, 2010; Yeganeh *et al.*, 2011). Como resultado se obtuvo que existe un descenso significativo en la actividad de la enzima en preparaciones de homogeneizado cerebeloso del grupo DME en comparación con el grupo C (**figura 1**); la disminución alcanza hasta un 26.34%, lo cual concuerda con reportes anteriores de que la DM en ratas se asocia con una disminución en la actividad de la Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPasa en las membranas celulares de diversos tejidos (Ng *et al.*, 1993; Barada *et al.*, 1994; Vague *et al.*, 2004). La disminución en la actividad de la Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPasa producida por la DM en el cerebelo, posiblemente ocurre por la disminución en la síntesis de hormonas y neurotransmisores, entre los que se encuentran la insulina y la serotonina (Manjarréz *et al.*, 2000), que involucre un mecanismo de regulación a la baja de la enzima que podría disminuir el número de bombas por disminución de su síntesis ó incrementar la degradación proteica (Ewart and Klip, 1995; Racciah *et al.*, 1998); lo que podría deberse a cambios del balance energético donde se promueven mecanismos de catabolismo anaeróbico, reducción de antioxidantes y aumento en la producción de especies reactivas de oxígeno, todo esto daña



**Figura 4.** Curvas dosis-respuesta de 5-HT sobre la actividad de la Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPasa en homogenizado de cerebelo de ratas con DME y controles. Valores promedio ± desviación estándar de 6 experimentos realizados por triplicado.



**Figura 5.** Curvas dosis-respuesta de 5-HT sobre la actividad de la Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPasa en la fracción de membranas gliales de cerebelo de ratas con DME y controles. Valores promedio ± desviación estándar de 6 experimentos realizados por triplicado.



**Figura 6.** Curvas dosis-respuesta de 5-HT sobre la actividad de la Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPasa en la fracción de membranas neuronales de cerebelo de ratas con DME y controles. Valores promedio ± desviación estándar de 6 experimentos realizados por triplicado.

estructuras fundamentales de la célula y afecta los sistemas de síntesis de nuevos componentes; también se ha observado que algunos elementos de las membranas celulares, los cuales se alteran durante la diabetes, juegan un papel importante en la expresión de las subunidades de la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasa y modifican su afinidad al sodio (Murphy, 1990), lo que influye en la estructura de la membrana celular y causa un desequilibrio en la concentración de iones en el interior y exterior celular (Egleton *et al.*, 2003), promoviendo una reducción en la velocidad de conducción nerviosa y complicaciones electrofisiológicas, como las que caracterizan la neuropatía diabética periférica (Scarpini *et al.*, 1993; Raccach *et al.*, 1994).

Al precisar que tipo de célula nerviosa se ve afectado por la DM en el cerebelo, se analizó la actividad de la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasa en fracciones membranales gliales y neuronales, donde la actividad específica de la bomba mostró un descenso significativo de 29.59% en la fracción glial (**figura 2**) y hasta un 46.71% en la fracción neuronal (**figura 3**) al comparar entre los grupos DME y C. Las células gliales tienen una participación primordial en la actividad neuronal, porque ayudan a captar y retirar neurotransmisores liberados en la sinapsis, recuperan los potenciales de acción con la restauración de los gradientes iónicos, aíslan los axones con mielina para permitir que las señales viajen a la velocidad adecuada (Kandel, 2001; Schwartz and Westbrook, 2001), y colaboran para mantener el balance energético cerebral, ya que en el cerebro la mitad de la glucosa presente en el espacio extracelular es captada por células gliales, como los astrocitos, por medio de la actividad de transportadores específicos dependientes de glutamato acoplados a la actividad de la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasa (Magistretti *et al.*, 1999); las neuronas consumen mucha más energía que los astrocitos, lo que sugiere que de alguna manera estos últimos sostienen las demandas incrementadas de energía resultantes de la activación neuronal por medio de cantidades adicionales de sustratos, como el lactato (Magistretti, 2006). La disminución en la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasa en células nerviosas del cerebelo que se presenta por la DM, podría disminuir la cantidad de energía disponible para que esta estructura realice su función, generándose un retardo en la remoción de neurotransmisores e iones de la hendidura sináptica, donde la naturaleza propia del tipo de sinapsis determinaría que las neuronas permanezcan despolarizadas o hiperpolarizadas por tiempos mayores, trayendo con ello grandes consecuencias así como daños irreversibles (Gloor, 1997).

Los resultados obtenidos mediante las curvas dosis-respuesta con 5-HT en homogeneizados de cerebelo (**figura 4**), evidencian la existencia de una estimulación en la actividad de la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasa por el neurotransmisor, el estímulo fue de 24.32% para el grupo C y en el grupo DME se observó un estímulo que alcanzó el 86.83%, requiriéndose una menor concentración del neurotransmisor en el grupo C para observar el efecto; lo que concuerda con estudios que muestran que la 5-HT incrementa la actividad de la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasa en el cerebro de la rata adulta (Hernández, 1992; Mercado and Hernández, 1994). El efecto de la 5-HT fue mayor para la actividad de la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasa del grupo DME, si bien la actividad específica basal de la enzima es menor en preparaciones de homogeneizado cerebeloso del grupo DME (**figura 1**), y además se ha señalado que en ratas

diabéticas los niveles de 5-HT y la expresión de sus receptores están disminuidos (Sumiyoshi *et al.*, 1997; Manjarréz *et al.*, 2000; Salgado *et al.*, 2012), es posible que para hacer frente a las alteraciones que causa la DM en esta estructura cerebral se involucre un mecanismo de respuesta donde se promueva que la relación entre el sistema serotoninérgico y la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasa sea más eficiente.

El efecto de la 5-HT sobre la actividad de la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasa en la fracción glial de cerebelo (**figura 5**), se observó una respuesta similar al neurotransmisor como la observada en homogeneizado cerebeloso, donde el efecto de estimulación enzimática alcanzó un 42.77% para el grupo C y en el grupo DME fue de 52.28%. En la fracción neuronal la 5-HT promovió un comportamiento de agonismo inverso en la actividad de la enzima en el grupo DME, mientras que el grupo C el comportamiento fue antagonismo (**figura 6**), con un porcentaje de inhibición de 3.86% para el grupo DME, donde las dosis probadas fueron de una mayor concentración del neurotransmisor. Se aprecia nuevamente que el efecto de la 5-HT es mayor en ambas fracciones membranales de cerebelo para el grupo DME. Se puede sugerir que la relación entre el sistema serotoninérgico y el incremento en la actividad de la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasa ocurre en células gliales, donde la isoforma  $\alpha 2$  está involucrada, mientras que, las isoformas  $\alpha 1$  y  $\alpha 3$  neuronales muestran una respuesta mínima y opuesta a la observada en la glía; es así como para los diferentes tipos de células nerviosas existe una función particularmente especializada entre estos dos sistemas, mediada por la expresión de los diversos tipos de receptores serotoninérgicos y la distribución de las subunidades catalíticas de la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasa para cada tipo celular. Lo anterior relacionado a reportes como que el incremento de la actividad de la enzima por acción de la 5-HT ocurre en células gliales (Mercado and Hernández, 1992), y que en dicha relación participan receptores serotoninérgicos como el  $5\text{-HT}_{1A}$  en corteza cerebral y los receptores  $5\text{-HT}_2$  y  $5\text{-HT}_6$  en cerebelo (Peña *et al.*, 1999); además, que las isoformas  $\alpha 1$  y  $\alpha 3$  se expresan principalmente en neuronas mientras que la isoforma  $\alpha 2$  se expresa en células gliales, como los astrocitos (Antonelli *et al.*, 1997; Blanco and Mercer, 1998), los cuales también expresan algunos receptores de 5-HT (Sandén *et al.*, 2000).

## Conclusión

Los resultados obtenidos sugieren que la DM causa alteraciones importantes a nivel del sistema nervioso central como la disminución en la actividad de la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasa y la respuesta de esta enzima a la serotonina, lo que puede ocasionar daños estructurales y funcionales del sistema nervioso central, específicamente en el cerebelo.

## Agradecimientos

Trabajo parcialmente apoyado por CIC-26.2 (2012)-U.M.S.N.H

## Referencias

- American Diabetes Association [ADA] (2011) Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care*. 34: S62-S69.
- Antonelli C, Costa M, Mercado R, and Hernández J (1997) Serotonin modulation of low-affinity ouabain binding in rat brain determined

- by quantitative autoradiography. *Neurochemical Research*. 7: 939-944.
- Barada K, Okolo C, Field M, and Cortas N** (1994) Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase in diabetic rat small intestine. Changes at protein and mRNA levels and role of glucagon. *J. Clin. Invest.* 93(6): 2725-2731.
- Berger M, Gray JA, and Roth BL** (2009) The expanded biology of serotonin. *Annu. Rev. Med.* 60: 355-366.
- Blanco G, and Mercer RW** (1998) Isozymes of the Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase: heterogeneity in structure, diversity in function. *Journal Renal physiology*. 275: 633-650.
- Blanco G** (2005) Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase subunit heterogeneity as a mechanism for tissue-specific ion regulation. *Semin Nephrol.* 25: 292-303.
- Bloom FE** (2005) Neurotransmission y sistema nervioso central. En Hardman JG, Limbird LE, and Gilman AG (eds.), *Goodman & Gilman, las bases farmacológicas de la terapéutica*. 11ª ed. Edit. McGraw-Hill. Cap 12. 317-340.
- Egleton RD, Campos CC, Huber JD, Brown RC, and Davis TP** (2003) Differential effects of diabetes on rat choroid plexus ion transporter expression. *Diabetes*. 52: 1496-1501.
- Ewart HS, and Klip A** (1995) Hormonal regulation of the Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase: mechanisms underlying rapid and sustained changes in pump activity. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 269(2): C295-C311.
- Gloor SM** (1997) Relevance of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase to local extracellular potassium homeostasis and modulation of synaptic transmission. *FEBS Lett.* 412:1-4.
- Hernández P, Tirapu J, Iglesias MD y Luna P** (2010) Participación del cerebelo en la regulación del afecto, la emoción y la conducta. *Neurología*. 51: 597-609.
- Hernández J** (1992) Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase regulation by neurotransmitters. *Neurochem Int.* 20(1): 1-10.
- Jorgensen PL, Håkansson KO, and Karlish JD** (2003) Structure and mechanism of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase: Functional sites and their interactions. *Annual Review of Physiology*. 65: 817-849.
- Juárez BE** (2008) *Implementación de un modelo de diabetes mellitus tipo 1*. Tesis de licenciatura. Facultad de Químico Farmacobiología, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Morelia, Mich., México. 1-69.
- Kandel ER** (2001) Cerebro, neuronas y conducta. En Kandel ER, Schawartz JH y Jessell TH (eds.), *Principios de Neurociencia*. McGraw-Hill, Capítulos 2 y 3. 5-35.
- Kaplan JH** (2002) Biochemistry of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase. *Annu Rev Biochem.* 71: 511-535.
- Lenzen S** (2008) The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes. *Diabetologia*. 51(2): 216-226.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Lewis A, and Randall RJ** (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.
- Magistretti PJ** (2006) Neuron-glia metabolic coupling and plasticity. *The Journal of Experimental Biology*. 209: 2304-2311.
- Magistretti PJ, Pellerin L, Rothman DL, and Shulman RG** (1999) Energy on demand. *Science*. 283: 496-497.
- Manjarréz G, Herrera JR, Molina A, Bueno S, González M, y Hernández J** (2000) Cambios en la biosíntesis de serotonina cerebral en ratas con diabetes mellitus inducida por estreptozotocina: efecto del tratamiento con insulina. *Rev. Invest. Clin.* 52(5): 509-516.
- Mann GE, Yudilevich DL, and Sobrevia L** (2003) Regulation of Amino Acid and Glucose Transporters in Endothelial and Smooth Muscle Cells. *Physiol Rev.* 83: 183 - 252.
- Manto M, and Jessendi P** (2012) Cerebellum: links between development, developmental disorders and motor learning. *Frontiers in Neuroanatomy*. 6: 1-10.
- Mercado R, and Hernández J** (1992) Regulatory role of a neurotransmitter (5-HT) on glial Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase in the rat brain. *Neurochem. Int.* 21(1): 119-127.
- Mercado R, and Hernández J** (1994) Biochemical properties of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase in axonal growth cone particles isolated from fetal rat brain. *Int. J. Dev. Neurosci.* 12(5): 485-489.
- Motulsky HJ** (2003) Prism 4 Statistics Guide –Statistical analyses for laboratory and clinical researches. *GraphPad Software Inc.*
- Murphy MG** (1990) Dietary fatty acids and membrane protein function. *J. Nutr Biochem.* 1(2): 68-79.
- Ng YC, Tolerico PH and Book CB** (1993) Alterations in levels of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase isoforms in heart, skeletal muscle, and kidney of diabetic rats. *Am. J. Physiol.* 265(2 Pt 1): E243-251.
- Organización Mundial de la Salud [OMS]** (2011) *Diabetes*. Nota descriptiva N°312 [En línea: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs312/es/index.html>].
- Peña MT, Mercado R, and Hernández J** (1999) Regulation of Glial Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase by Serotonin: Identification of Participating Receptors. *Neurochemical Research*. 24(5): 643-649.
- Raccach D, Coste T, Cameron NE, Dufayet D, Vague P, and Hohman TC** (1998) Effect of the aldose reductase inhibitor tolrestat on nerve conduction velocity, Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase activity, and polyols in red blood cells, sciatic nerve, kidney cortex, and kidney medulla of diabetic rats. *J Diabetes Complications*. 12(3): 154-162.
- Raccach D, Lamotte-Jannot MF, Issautier T, and Vague P** (1994) Effect of experimental diabetes on Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase activity in red blood cells, peripheral nerve and kidney. *Diabete Metab.* 20(3): 271-274.
- Rose S** (1967) Preparation of enriched fraction from cerebral cortex containing isolated, metabolically active neuronal and glial cells. *Biochem. J.* 102: 33-43.
- Salgado MA, Acosta J, Juárez BE, y Mercado R** (2012) Expresión de receptores 5-HT en ratas con diabetes mellitus. *Editorial Académica Española*. 1: 1-46.
- Sanden N, Thorlin T, Blomstrand F, and Hasson PE** (2000) 5-Hydroxytryptamine<sub>2B</sub> receptors stimuli Ca<sup>2+</sup> increases in culture astrocytes from three different brain regions. *Neurochemistry*. 36: 427-434.
- Sanders-Bush E y Mayer SE** (2005) Agonistas y antagonistas de receptores 5-hidroxitriptamina. En Hardman JG, Limbird LE and Gilman AG (eds.), *Goodman & Gilman, las bases farmacológicas de la terapéutica*. . 11ª ed. Edit. McGraw-Hill. Cap 11. 297-315.
- Scarpini E, Bianchi R, Moggio M, Sciacco M, Fiori MG and Scarlato G** (1993) Decrease of nerve Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase activity in the pathogenesis of human diabetic neuropathy. *J Neurol Sci.* 120(2): 159-67.
- Schwartz JH and Westbrook GL** (2001) Citología de las neuronas, en

Principios de Neurociencia. *Kandel ER, Schwartz JH y Jessell TH (Eds). McGraw-Hill, Capítulo 4: 67-86.*

**Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación [SAGARPA]** (2001) *NORMA Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio.* Diario Oficial de la Federación.

**Skou JC** (1992) The Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> Pump. *Physiology.* 7(3): 95-100.

**Sumiyoshi T, Ichikawa J, and Meltzer HY** (1997) The effect of streptozotocin-induced diabetes on dopamine<sub>2</sub>, serotonin<sub>1A</sub> and serotonin<sub>2A</sub> receptors in the rat brain. *Neuropsychopharmacology.* 16(3): 183-190.

**Tesfaye S, Boulton AJM, Dyck PJ, Freeman R, Horowitz M, Kempler**

**P, Lauria G, Malik RA, Spallone V, Vinik A, Bernardi L, Valensi P, and on behalf of the Toronto Diabetic Neuropathy Expert Group** (2010) Diabetic Neuropathies: Update on Definitions, Diagnostic Criteria, Estimation of Severity, and Treatments *Diabetes Care.* 33: 2285-2293.

**Therien AG and Blostein R** (2000) Mechanisms of sodium pump regulation. *Am J Physiol Cell Physiol.* 279: 541-566.

**Vague P, Coste TC, Jannot MF, Raccach D, and Tsimaratos M** (2004) C-peptide, Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase, and Diabetes. *Exp Diabetes Res.* 5(1): 37-50.

**Yeganeh DP, Gruber O, Falkai P, and Schmitt A** (2011) The role of the cerebellum in schizophrenia: From cognition to molecular pathways. *Clinics* 66: 71-77.