

La serotonina como factor neurotrófico en el cerebro fetal: unión, captura y liberación en conos de crecimiento axónico

Jorge Hernández Rodríguez*

Resumen

Normalmente la serotonina (5-HT) es reconocida como uno de los neurotransmisores clásicos en el cerebro adulto. Resultados de nuestro laboratorio han permitido plantear un papel trófico de la 5-HT en el cerebro fetal. La estimulación de la síntesis de la 5-HT durante la gestación con el precursor, el L-triptofano (L-Trp) ha mostrado la existencia de la maquinaria biosintética de esta amina en el cerebro fetal, activándose la enzima limitante de la vía biosintética, en etapas tempranas de la neurodiferenciación. Los intentos de demostrar directamente un sistema de reconocimiento de la 5-HT en estructuras neuronales en diferenciación, hasta ahora no han sido concluyentes. Nosotros usamos una preparación específica de conos de crecimiento axónico (CCA), proveniente de neuroblastos del cerebro fetal de rata. En estas estructuras neuronales en proceso activo de diferenciación demostramos un sistema de captura de la 5-HT, saturable, de alta afinidad, y una alta velocidad de captación, así como la posibilidad de una liberación regulada de la amina. En CCA posnatales la captación de 5-HT se lleva a cabo como en el cerebro adulto, mientras que en los CCA de cerebro fetal las características de captura parecen estar en un estadio de transición. También en estas estructuras demostramos directamente, por primera vez en estructuras del cerebro fetal, un sistema específico de sitios de unión de la (³H) 5-HT, saturable y de alta afinidad. Estos resultados en conjunto apoyan fuertemente nuestro planteamiento de un papel trófico importante de la 5-HT durante la neurogénesis.

Palabras clave: Serotonina, diferenciación neuronal, axogénesis.

Summary

Currently serotonin (5-HT) is recognized as one of the classic neurotransmitters in the adult brain. Results from our laboratory have suggested a trophic role of 5-HT in the fetal brain. Stimulation of 5-HT synthesis during gestation with its precursor, L-tryptophan, has shown the existence of biosynthetic machinery for this amine in the fetal brain.

Attempts to demonstrate directly a molecular recognizing system for 5-HT in the fetal brain have not been conclusive until now. We have profited of a special preparation of axonal growth cones (AGC) derived from neuroblasts of the rat fetal brain. In this neuronal structures actively differentiating we were able to demonstrate a high-affinity and saturable uptake system for 5-HT and the possibility of a regulated release of the amine. In postnatal AGC the 5-HT uptake has similar kinetics to the adult, whereas fetal AGC have a transitional uptake kinetics with a higher V_{max} for the amine. Also in these structures we demonstrated, directly, for the first time, a specific binding system for (³H) 5-HT, saturable, reversible and of high affinity.

Altogether, these results strongly support the hypothesis of an important trophic role of 5-HT during neurogenesis.

Key words: Serotonin, neuronal differentiation, axogenesis

Introducción

La serotonina (5-HT) es reconocida como uno de los neurotransmisores clásicos en el cerebro adulto.¹ Sin embargo, los sistemas aminérgicos están presentes en etapas tempranas del desarrollo cerebral de la rata.² En lo que respecta al sistema serotoninérgico, Hernández y col.^{3,4} reportaron que en

el décimo quinto día de vida prenatal se puede inducir un aumento de la actividad de la enzima limitante en la síntesis de la 5-HT, triptofano-5-hidroxilasa (T-5H) en el cerebro fetal, como respuesta al tratamiento de ratas gestantes con L-Trp, que es el precursor de la síntesis. Fujimiya y col.⁵ con el mismo procedimiento, observaron que más tempranamente,

*Laboratorio de Neurontogenia, Departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, Av. Instituto Politécnico Nacional 2508, 07000, México D.F.

en el decimotercer día de gestación hay neuronas capaces de sintetizar serotonina. Otros autores^{6,7} usando técnicas inmunocitoquímicas con antisuero específico a 5-HT encontraron que la expresión del fenotipo serotoninérgico empieza en el día embrionario doce. Todos estos datos sugieren, primero, que existen neuroblastos serotoninérgicos que empiezan a sintetizar serotonina en etapas muy tempranas del desarrollo cerebral y, segundo, apoyan el planteamiento de que la 5-HT tiene otras funciones en este periodo de la neurodiferenciación, probablemente como un factor trófico.^{8,9} Si la 5-HT tiene un papel funcional en la neurogénesis debe existir un sistema específico de receptores para su reconocimiento en las células blanco, así como un sistema de captura y liberación con una cinética bien definida.

Resultados ya reportados sugieren la presencia de un sistema funcional de receptores a la 5-HT en el cerebro fetal de rata. En nuestro laboratorio hemos observado que las curvas de desarrollo posnatal de sitios de unión de la (³H)5-HT a membranas del cerebro, no empiezan desde cero al nacimiento, lo que ha sido confirmado por otros autores.¹⁰⁻¹² También Whitaker-Azmitia y cols¹³ encontraron que el tratamiento prenatal con p-clorofenilalanina (p-CPA), un inhibidor específico de la 5-HT, inducía cambios posnatales en el número final de sitios de reconocimiento a la (³H)5-HT. Bruinick y cols,¹⁴ por otra parte, reportaron la posible presencia de sitios de unión del tipo S₂ en el cerebro de rata fetal, sin mayores datos sobre su cinética.

En relación a un sistema de captura para 5-HT, Nomura y cols¹⁵ y Kirksey y Slotkin¹⁶ reportaron que en el cerebro posnatal de rata había diferencias durante el desarrollo y de acuerdo con la región, en la V_{max}, pero no en la afinidad (K_m). Sus resultados también sugerían que un sistema de captura de 5-HT debe estar presente en el cerebro fetal de rata.

Los conos de crecimiento axonal tienen un papel importante durante el desarrollo cerebral.^{17,18} De hecho, el cono de crecimiento axónico, que se encuentra en el extremo del axón en desarrollo es responsable no sólo de su crecimiento, sino también de la vía neuronal a la que va a pertenecer y de las sinapsis específicas que se forman con las neuronas blanco.^{17,18} Haydon y cols¹⁹ han demostrado que en neuronas cultivadas del *Helisoma*, la 5-HT ejerce un efecto inhibitorio en la motilidad del cono de crecimiento y en la formación de las sinapsis eléctricas. En el presente estudio aislamos conos de crecimiento axonal a partir del cerebro fetal y del cerebro de rata recién nacida, y exploramos la presencia de los sistemas de reconocimiento de la 5-HT y de su liberación, en esta preparación específica de la axogénesis que son los conos de crecimiento axónico. Debido a que es muy probable que el Ca⁺⁺ juegue un papel importante en la actividad de los CCA y a la posibilidad de que la 5-HT regule la concentración de este ion, se iniciaron también mediciones de Ca⁺⁺ en la preparación de CCA.

Material y métodos

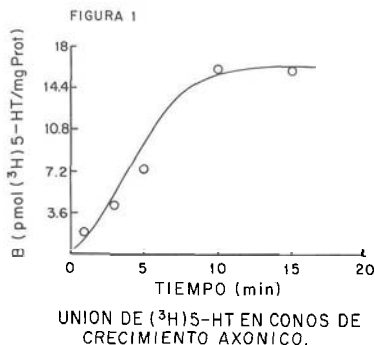
Fracciones enriquecidas con CCA se aislaron de acuerdo al método de Pfenninger y col:²⁰ Los cerebros de rata de 17 días de edad gestacional se homogeneizaron en 10 volúmenes de sacarosa 0.32 M, conteniendo en mM: MgCl₂, 1; y TES-NaOH, 1, pH 7.3 a 700 rpm y cinco pasadas en un homogeneizador Thomas de vidrio con émbolo de teflón (0.25 mm de claridad). El homogeneizado se centrifuga a 1660 x g, durante 15 minutos para eliminar núcleos y restos celulares en una centrifuga Sorvall usando el rotor SS-34. El sobrenadante se coloca en un gradiente discontinuo de sacarosa (2.66 a 0.75M), se centrifuga a 240,000 x g durante 60 minutos usando un rotor vertical Beckman 60Ti. Se obtuvieron tres bandas (A, B y C), las cuales se recolectaron y se colocaron por separado. La fracción enriquecida con CCA corresponde a la banda A (obtenida en la interfase entre la muestra y la sacarosa 0.75 M), se diluyó con 10 ml de una solución amortiguadora fría de Tris-HCl 0.1 M, pH 7.3, se centrifugó a 240,000 x g durante 40 minutos. La pastilla final se resuspendió en solución amortiguadora fría de Tris-HCl 0.05 M, pH 7.3. En los ensayos de captura de (³H)5-HT y determinación de la concentración de Ca⁺⁺ se utilizó la suspensión fresca. Para las otras determinaciones se congeló a -40°C hasta que se efectuaron los ensayos correspondientes. El método de Gordon y Lockerbie²¹ se usó para aislar CCA de cerebro de rata de cinco días de edad posnatal. Brevemente: el tejido cerebral se homogeneizó en ocho volúmenes de una solución de sacarosa 0.32 M amortiguada a pH 7.5 con HEPES 2 mM (SA). El homogeneizado se centrifugó a 200 x g durante 5 minutos a 4°C en una centrifuga Sorvall RC-5C, utilizando el rotor SS-34. El sobrenadante (S₁) se separó y la pastilla (P₁) se resuspendió en SA para centrifugarse nuevamente, el sobrenadante obtenido se mezcló con S₁ y se centrifugaron a 40 000 x g durante 15 minutos a 4°C para obtener la pastilla P₂ y el sobrenadante S₂ el cual se descartó. La pastilla P₂ se lavó dos veces por centrifugación a 40 000 x g durante 20 minutos para obtener la pastilla P₃, la cual se resuspendió en solución de SA a un volumen final de 4 ml por cada seis cerebros utilizados. La suspensión se colocó en 30 ml de una solución de ficoll al 7 por ciento en SA y se centrifugó a 50 000 x g durante 20 minutos en una ultracentrifuga Beckman L5-75, utilizando el rotor de columpio SW-28. Después de la centrifugación la banda formada en la interfase entre la muestra y el ficoll se recolectó y se diluyó en 8 ml de solución de SA, enseguida se mezcló con un volumen igual de solución de ficoll al 14 por ciento en SA. La mezcla se colocó sobre un colchón de glicerol y se centrifugó a 30 000 x g durante 60 minutos a 4°C, utilizando el rotor SW-28. Al término de la centrifugación se separaron dos fracciones F₁ y F₂, las cuales se colectaron y diluyeron con solución de Krebs para los ensayos de captura de (³H)5-HT. Se hicieron controles para verificar las características estructurales de ambas preparaciones, procesando las fracciones con procedimientos convencionales de microscopía electrónica.

Captura de (^3H)5-HT: Muestras de CCA de cerebro fetal y posnatal de rata, equivalentes a 0.4 mg de proteína, se incubaron durante 10 minutos a 37°C en 0.3 ml de solución de Krebs, pH 7.4, conteniendo pargilina (0.1mM) y ácido ascórbico 0.01 por ciento. Se adicionaron diferentes concentraciones de (^3H)5-HT (21 Ci/mmol, Dupont New England Nuclear) desde 12.5 hasta 300 nmoles para iniciar el ensayo de captura. A los 10 minutos la reacción se paró por dilución con 5 ml de solución de Krebs frío y filtración rápida al vacío con filtros Whatman GF/B. Los filtros se lavaron dos veces con 5 ml de solución de Krebs frío y se colocaron en un vial conteniendo 12 ml de líquido de centelleo aquasol. La radiactividad se midió en un contador de centelleo líquido Beckman LS 7800. Las muestras incubadas a 0°C a través del ensayo sirvieron como blancos. Para observar la dependencia de Na^+ se corrieron muestras en presencia y ausencia del ión, también se estudió el efecto de la fluoxetine, un inhibidor de la captura de 5-HT, adicionándola a una concentración de 10^{-5}M . La captura activa se calculó como la diferencia entre la captura a 0°C y a 37°C. Las constantes cinéticas de la captura de 5-HT se calcularon usando un programa computarizado.²²

Liberación de (^3H)5-HT: En este ensayo primero se realizó un experimento de captura de (^3H)5-HT a una concentración de 100 nM en las condiciones ya descritas. Al término de la captura se centrifugaron y se lavaron dos veces en solución de Krebs normal a pH 7.4. El experimento de liberación de (^3H)5-HT se inició agregando Krebs normal pH 7.4 a unas muestras de CCA para observar la liberación tónica, a otro grupo de muestras se les adicionó solución de Krebs que contenía K^+ a una concentración de 30 mM y se incubaron a diferentes tiempos (1-30 minutos) a 37°C, al término de los cuales se centrifugaron y se tomaron alícuotas de 100 ml del sobrenadante que se colocaron en un vial con líquido de centelleo aquasol. La radioactividad se midió en un contador de centelleo Beckman LS 7800.

Unión de (^3H)5-HT: Conos de crecimiento axónico de cerebro fetal se lisaron con solución amortiguadora Tris-HCl 5 mM, pH, 7.4 y se incubaron durante 10 minutos a 37°C, lavándose dos veces con la misma solución amortiguadora. Alícuotas de las membranas resuspendidas de CCA equivalentes a 0.4 mg de proteína se incubaron a 22°C en 0.3 ml (volumen final) de Tris-HCl 50 mM, pH 7.4, conteniendo pargilina 0.1 mM y ácido ascórbico 0.01 por ciento. El ensayo de unión se inició al adicionar diferentes concentraciones de (^3H)5-HT desde 0.5 hasta 25 nM. Puesto que en experimentos previos se observó que el equilibrio se alcanzaba entre los 10 y los 15 minutos (Figura 1), la reacción se detuvo a este tiempo por dilución con 5 ml de solución amortiguadora Tris-HCl fría y filtración rápida al vacío en filtros Whatman GF/B. Los filtros se lavaron dos veces, se colocaron en viales con líquido de centelleo y se contaron en el mismo tipo de contador. Para definir la unión no específica de (^3H) 5-HT, se procesaron muestras que contenían 5-HT no marcada 1mM a través del

ensayo. La diferencia entre la unión total y la no específica se consideró como la unión específica. La unión específica fue el 50 por ciento de la unión total. B_{max} y K_d se calcularon por gráficas de Scatchard.²³ Las proteínas se determinaron de acuerdo al método de Lowry y col.²⁴



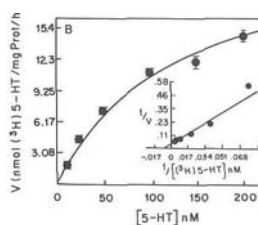
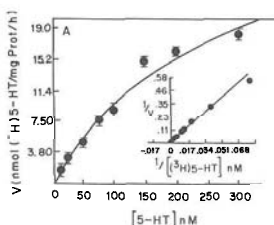
Ensayo inmuno-histoquímico 5-HT: Conos de crecimiento axónico de cerebro fetal se incubaron a 37°C con 5-HT 100 nM en solución amortiguadora de fosfatos (PBS) durante 10 minutos, se fijaron con una mezcla de formaldehído al 2% / glutaraldehído 0.25 por ciento, segundo de un lavado de PBS. Los CCA se incubaron nuevamente durante una hora a 37°C en una dilución 1/100 del antisero antiserotonina (Eugene Tech. International Inc.) y se mantuvo toda la noche a 4°C. Las muestras se enjuagaron en PBS, se incubaron en la oscuridad durante una hora, a 37°C, en un complejo de avidina-biotina-peroxidasa, diluido en PBS, con BSA 0.5% y se enjuagó otra vez en PBS. La inmuno-reactividad se desarrolló de 10 a 15 minutos en una solución de PBS que contenía 3,3-diaminobenzidina (DAB) tetrahidroclorada al 0.01% y peróxido de hidrógeno 0.01 por ciento a temperatura ambiente. Finalmente los CCA se sometieron a los procesos convencionales para microscopía electrónica.

Concentración de Ca^{++} : Se resuspendieron CCA aislados de cerebro fetal en 1 ml de solución que contenía en mM: KCl , 10; NaCl , 120; MgCl_2 , 1.5; glucosa, 10; CaCl_2 , 2 y Tris-HCl, 30, pH 7.4. Se adicionó Quen-2AM a una concentración final de 20 mM y se incubaron a 37°C durante 30 minutos, se centrifugaron en una microcentrífuga durante dos minutos, se retiró el sobrenadante y la pastilla se lavó dos veces con la solución anterior. La pastilla lavada se resuspendió en 1 ml de

solución a 37°C y se midió la fluorescencia (F) en un espectrofotofluorómetro Aminco Bowman a una longitud de emisión de 490 nM y de excitación de 340 nM. Para observar el efecto de la 5-HT sobre la concentración de calcio se adicionó 5-HT 1 mM. Para observar la fluorescencia máxima (Fmax), las vesículas de CCA se lisaron con digitonina 100 mM. La fluorescencia mínima (Fmin) se midió por adición a EGTA 5 mM. Para calcular la concentración de Ca^{++} se utilizó la siguiente fórmula: $[Ca^{++}] = Kd (F-Fmin) / (Fmax - F)$. Kd = constante de disociación del calcio = 115 nM.

Resultados

En la Figura 2A,B se muestran las curvas de cinética de la captura de $(^3H)5-HT$ y sus correspondientes gráficas de linearización de acuerdo a Lineweaver-Burk²⁵ en CCA fetales y posnatales, respectivamente. Las constantes de Km y Vmax correspondientes se muestran en el Cuadro 1.



CINETICA DE CAPTURA DE $(^3H)5-HT$ EN CONOS DE CRECIMIENTO AXONICO
A) FETALES
B) POSNATALES

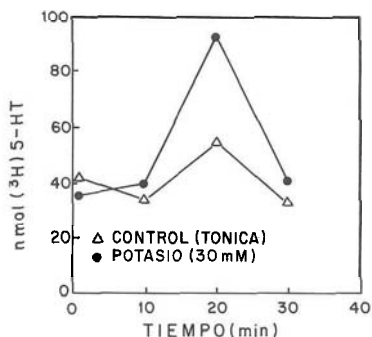
Cuadro 1. Constantes cinéticas de la captación de $(^3H)5-HT$ en conos de crecimiento axónico.		
CCA	Km (nM)	Vmax (nmol $(^3H)5-HT$ /mg prot/h)
Prenatal	275 ± 30*	37 ± 6**
Posnatal	135 ± 15	25 ± 3

*p < 0.00005;

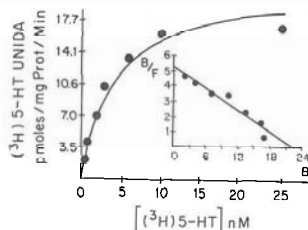
**p < 0.005

En la Figura 3 se resumen los resultados de la liberación de la $(^3H)5-HT$ capturada, después de un pulso de K^+ . Efectivamente a los 20 minutos se observa un aumento de los niveles extracono de 5-HT.

La Figura 4 muestra la curva de saturación de la unión de $(^3H)5-HT$ y su gráfica de Scatchard.²³ La afinidad corresponde a una Kd de 4.21 nM y una Bmax de 22.46 pmol $(^3H)5-HT$ /mg proteína. La captura de la $(^3H)5-HT$ en CCA lisados fue de cero en condiciones experimentales de unión, por lo que su contribución en la unión máxima (Bmax) fue nula.

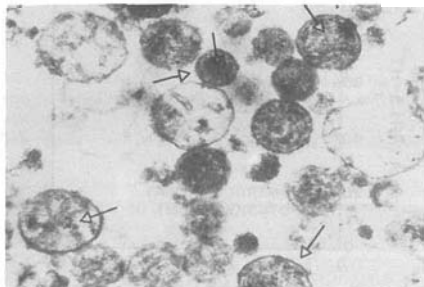


LIBERACION DE $(^3H)5-HT$ EN CONOS DE CRECIMIENTO AXONICO FETALES



CURVA DE UNION DE $(^3H)5-HT$ EN CONOS DE CRECIMIENTO AXONICO. FETALES

En la Figura 5A observamos las electromicrografías obtenidas para la localización inmunohistoquímica de 5-HT en la preparación de CCA. En la Figura 5A vemos la fracción de CCA fetales. El diámetro de las partículas varía de 0.3 a 0.7 mm; estas partículas contienen material fibrilar y vacuolas. Se

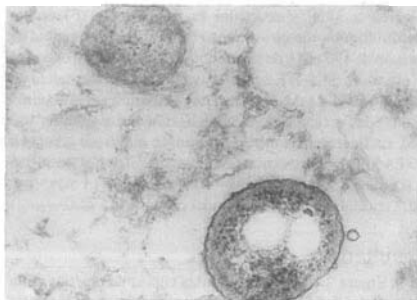


observan también algunos contaminantes celulares no específicos. Las flechas abiertas señalan los CCA teñidos con el anticuerpo anti-serotonina. Nótese que no todos los CCA son marcadores por el anticuerpo. En la figura 5B se muestra una amplificación de los CCA para poder observar los gránulos marcados de 5-HT señalados por las flechas, localizada en las membranas y en el interior de los CCA.



La Figura 6 muestra una amplificación de los CCA aislados del cerebro posnatal a la edad de cinco días. Su aspecto es más denso que los CCA fetales y su diámetro varía de 0.7 a 1.2 μm , contienen en su interior retículo endoplásmico liso, mitocondrias, vesículas granulares y pequeñas vesículas claras. En esta preparación también se observa material contaminante no específico, como restos de membranas y pequeños fragmentos celulares.

Respecto al contenido de Ca^{++} los resultados se resumen en el cuadro 3. Se observó una concentración intracelular de 200 nM, que al administrar un pulso de 5-HT de 6×10^{-7} M, disminuye.



Cuadro 2. Captación de (^3H) 5-HT en conos de crecimiento axónico fetales.

nmol (^3H) 5-HT/mg prot/h	
En presencia de Na^+	$19.78 \pm 1.3^*$
En ausencia de Na^+	$11.62 \pm 1.8^*$
$* P < 0.005$	
$X \pm$ de tres experimentos hechos en muestras por duplicado.	

Cuadro 3. Contenido de calcio libre

Fracción	[Ca^{++}] nM	
	Control	5-HT, 6×10^{-7} M
A	224 ± 7 (2)	178 ± 9 (2)
B	193 ± 2 (2)	148 ± 6 (2)
C	325 ± 18 (4)	248 ± 4 (2)
A. Fracción enriquecida con CCA		
B, C. Fracciones con otro material celular		

Discusión

La morfología ultraestructural de los CCA aislados en el presente estudio corresponde a la ya descrita en la literatura.^{19,20} Se observaron los componentes vacuolares que acompañan normalmente a la filopodia y la melopodia. Asimismo observamos, como era de esperarse, retículo endoplásmico, mitocondrias y vesículas claras y densas sobre todo en los conos procedentes del cerebro posnatal, propias de estructuras presinápticas en formación. Estos rasgos morfológicos específicos son característicos de conos de crecimiento aislados por los procedimientos empleados^{19,4} lo que define a la banda A como una fracción enriquecida con vesículas derivadas de conos de crecimiento axónico como las que mostramos en las electromicrografías de las Figuras 5 y 6.

Encontramos que tanto los CCA fetales como posnatales tienen un sistema saturable de captura de alta afinidad para la (3 H)5-HT. En los conos fetales la captura depende en un 50 por ciento de la concentración de Na⁺ (ver Cuadro 2) y se observó una inhibición del 70 por ciento en presencia de fluoxetina 10^{-5} M. En el adulto la captura de 5-HT depende totalmente de la concentración de Na⁺²⁶ y es inhibida un 90 por ciento por fluoxetina.²⁷ Probablemente en los CCA el sistema de captura está en una etapa de transición en relación a su capacidad funcional, y por esta razón la dependencia del Na⁺ y el efecto de la fluoxetina son diferentes. Nuestros datos de cinética de la captación de (3 H)5-HT por CCA no apoyan la presencia de diferentes isotipos del transportador en el periodo prenatal y posnatal. Las diferencias en la Km entre CCA fetales y posnatales sugieren, que en los primeros, el sistema de captación está en un proceso de cambio hacia la afinidad del adulto, puesto que la Km en los CCA posnatales tiene ya los valores del adulto.^{15,28} Es interesante que los CCA fetales capten más 5-HT que los posnatales, lo que apoya la idea de que la 5-HT es requerida por estas estructuras en su proceso de crecimiento y diferenciación. El hecho de que la 5-HT no marque todos los CCA (ver Figura 5A) puede indicar que sólo los conos axonales derivados de los neuroblastos serotoninérgicos están marcados y que son los posibles liberadores de la amina en este importante periodo de la axogénesis.

Nuestros resultados muestran directamente, por primera vez, la presencia de un sistema de sitios de unión de la (3 H)5-HT, saturables y de alta afinidad, en estas estructuras neuronales en diferenciación. Otros autores¹⁹ no encontraron estos sitios de reconocimiento en homogeneizados de cerebro fetal, probablemente porque los sitios estaban dispersos en los tejidos. En la preparación de CCA los receptores parecen estar concentrados, por lo que la medición de la unión es posible. Resultados recientes de Bar-Peled y col²⁹ describen un aumento en la densidad de receptores 5-HT₁ en el cerebro fetal humano, sugiriendo también su posible participación en la neurogénesis. Nuestros resultados muestran la existencia de receptores a 5-HT directamente en estructuras derivadas de neuronas en proceso de diferenciación, posiblemente del grupo 5-HT_{1A}. Algunos autores¹³ sugieren que la 5-HT ejerce sus efectos neurotróficos sobre células blanco en diferenciación, posiblemente a través de este tipo de receptor. Sin embargo, la existencia de autorreceptores³⁰ a 5-HT también se ha considerado. Es posible que los CCA en los cuales la marca de 5-HT no está presente sean estructuras axonales blanco que contienen el sistema de receptores a la 5-HT, responsable para la transducción de este mensaje. Es necesario realizar experimentos farmacológicos para explorar qué tipo de receptor a 5-HT está presente en los CCA, y si es similar a aquellos ya conocidos en el cerebro adulto.

En conclusión, con los presentes resultados, se puede plantear un sistema integral de reconocimiento molecular de la 5-HT con liberación, reconocimiento en estructuras blanco

en diferenciación y captación de la serotonina. Estos datos fortalecen la hipótesis del papel trófico de la 5-HT en el cerebro fetal.

Agradecimientos

El autor agradece la colaboración técnica a la IBQ Graciela Chagoya Guzmán y al señor Ignacio Vargas, así como a la secretaria a la señora Dolores Cueto N.

Referencias

1. Beaudet A, Descarries L. The fine structure of central serotonin neurons. *J Physiol Paris* 1981;77:193-203.
2. Coyle J, Henry D. Catecholamines in fetal and newborn rat brain. *J Neurochem* 1973;21:61-67.
3. Chagoya G, Hernández RJ. L-Tryptophan during gestation induces and increases in brain tryptophan-5-hydroxylase activity and serotonin synthesis. *Proc West Pharmacol Soc* 1983;26:369-372.
4. Hernández RJ, Chagoya G. Brain serotonin synthesis and Na⁺/K⁺-ATPase activity are increased postnatally after prenatal administration of L-tryptophan. *Dev Brain Res* 1986;25:221-226.
5. Fujimiyama M, Hosoda S, Kitahama K, Kimura H, Maeda T. Early development of serotonin in the rat brain as studied by immunohistochemistry combined with tryptophan administration. *Brain Dev* 1986;8:335-342.
6. Altner AR, Tork I. Early development of serotonin-containing neurons and pathways as seen in whole-mount preparations of the fetal rat brain. *J Comp Neurol* 1988;274:32-47.
7. Koning N, Wilkie BM, Lauder MJ. Tyrosine hydroxylase and serotonin containing cells in embryonic rat rhombencephalon: a whole mount immunohistochemical study. *J Neurosci Res* 1988;20:212-223.
8. Lauder MJ, Krebs H. Serotonin as a differentiation signal in early neurogenesis. *Dev Neurosci* 1978;1:15-30.
9. Lauder MJ, Wallace AJ, Krebs H, Petrusz P. Serotonin as a timing mechanism in neuroembryogenesis. En: Brambilla F, Racagni G, Wied D. Eds. *Progress in Psychoneuroendocrinology*. Amsterdam: Elsevier 1980:539-556.
10. Fillion MP, Hernández RJ, Baugen C, Fillion G. Postnatal development of high affinity neuronal recognition sites for (3 H)5-HT in rat brain. *Dev Neurosci* 1982;5:484-491.
11. Hernández RJ, Fong MD, Chagoya G, Fillion MP, Fillion G. Existence of (3 H)5-HT binding sites in the rat spinal cord: a developmental study. *Int J Dev Neurosci* 1984;2:33-41.
12. Zilles K, Schleicher A, Glaser T, Traber J, Rath M. The ontogenic development of serotonin (5-HT)₁ receptors in various cortical regions of the rat brain. *Anat Embryol* 1985;172:255-264.
13. Whitaker-Azmitia MP, Lauder MJ, Shemmer A, Azmitia CE. Postnatal changes in serotonin receptors following prenatal alterations in serotonin levels: further evidence for functional fetal serotonin receptor. *Dev Brain Res* 1987;33:285-289.
14. Bruinink A, Lichtensteiger W, Schlumpf M. Pre- and postnatal ontogeny and characterization of dopaminergic D₁ and serotonergic S₁ and spirodecane binding sites in rat forebrain. *J Neurochem* 1983;40:1277-1286.
15. Nomura Y, Naitoh F, Segawa T. Regional changes in monoamine content and uptake of the rat brain during postnatal development. *Brain Res* 1976;101:305-315.
16. Kirksey DF, Stotkin TA. Concomitant development of (3 H)5-HT uptake systems in rat brain regions. *Br J Pharmacol* 1979;67:387-391.
17. Cajal SRY. A quelle époque apparaissent les expansions des cellules nerveuses de la moelle épinière du poulet? *Ant Anz* 1890;5:609-613.
18. Landis SC. Neuronal growth cones. *Annu Rev Physiol* 1983;45:567-580.

19. Haydon PG, McCobb DP, Kater SB. Serotonin selectivity inhibits growth cone motility and synaptogenesis of specifically identified neurons. *Science* 1984;226:561-563.
20. Pfenninger KH, Ellis L, Johnson MP, Friedman LB, Somlo S. Nerve growth cone isolated from fetal rat brain. I. Subcellular fractionation and characterization. *Cell* 1983;35:573-584.
21. Gordon-Weeks PR, Lockerbie RO. Isolation and partial characterization of neural growth cones from neonatal rat forebrain. *Neuroscience* 1984;13:119-136.
22. Greco RW, Priore LR, Sharma M, Korytnik W. ROSFIT: an enzyme kinetics non-linear regression curve-fitting package for a microcomputer. *Comp Biomed Res* 1982;15:39-45.
23. Scatchard G. The attractions of proteins for small molecules and ions. *Ann NY Acad Sci* 1949;51:660-672.
24. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AJ, Randall RJ. Protein measurement with the folin reagent. *J Biol Chem* 1951;193:265-275.
25. Lineweaver H, Burk D. The determination of enzyme dissociation constants. *J Am Chem Soc* 1934;56:658-666.
26. Bogdanski DF, Blaszkowski TP, Tissari AH. Mechanisms of biogenic amine transport and storage. IV. Relationship between K⁺ and the Na⁺ requirement for transport and storage of 5-HT and norepinephrine in synaptosomes. *Biochim Biophys Acta* 1970;211:521-532.
27. Fuller WR, Wong TD. Fluoxetine: a serotonergic appetite-suppressant drug. *Drug Dev.* 1989;17:1-15.
28. Wong TD, Horng JS, Fuller WR. Kinetics of serotonin accumulation into synaptosomes of rat brain: effects of amphetamine and chloroamphetamines. *Biochim Pharmacol* 1973;22:311-322.
29. Bar-Peled O, Gross-Isseroff R, Ben-Hur H, Hoskins I, Groner Y, Biegon A. Fetal human brain exhibits a prenatal peak in the density of serotonin 5-HT_{1A} receptors. *Neurosci Lett* 1991;127:173-176.
30. Whitaker-Azmitia MP, Azmitia CE. Autoregulation of fetal serotonergic neuronal development: role of high-affinity serotonin receptors. *Neurosci Lett* 1986;67:307-312.

Comentario

Alfredo Fera Velasco*

Con su permiso señor Presidente, doctor Víctor Manuel Espinoza de los Reyes.

Hemos escuchado el trabajo de ingreso a la Academia Nacional de Medicina, que ha presentado el doctor Jorge Hernández Rodríguez.

El doctor Hernández es un médico pediatra, con maestría y doctorado en el área de las neurociencias y estudios postdoctorales con sólida preparación científica, cuya línea fundamental de trabajo por varios años ha sido la Biología del Desarrollo del Sistema Nervioso, particularmente del sistema serotoninérgico y los efectos que en este sistema tiene la restricción de nutrientes en el periodo perinatal.

Los compuestos químicos que forman las neuronas y que están directamente relacionados con los procesos de comunicación interneuronal, principalmente mediante la inducción de cambios en la conductancia iónica de la membrana postsináptica, reciben el nombre genérico de Neurotransmisores. Uno de estos compuestos es precisamente la serotonina o 5-hidroxitriptamina. Su efecto sobre la membrana postsináptica es principalmente de hiperpolarización y por lo tanto, de tipo inhibitorio.

Sin embargo, es conveniente tener presente que esos efectos van a depender de la naturaleza y características físico-químicas de los receptores con los que específicamente se combina la serotonina.

El reconocimiento, combinación y efectos biológicos de la serotonina en estructuras neuronales durante los procesos de diferenciación, no han sido claramente entendidos y precisamente el doctor Jorge Hernández, con su dedicada labor científica en los últimos doce años, ha contribuido al conocimiento universal con importantes descubrimientos sobre el papel trófico de la serotonina durante la neurogénesis. Específicamente ha demostrado que en los conos de crecimiento axónico de neuroblastos de cerebro fetal de rata, existe un sistema saturable, de captura de serotonina, de alta afinidad, de alta velocidad de captación y de liberación regulada de la serotonina; así como un sistema específico saturable, de sitios de unión de la serotonina, de alta afinidad.

Nuevamente menciono: éstas son contribuciones originales del doctor Hernández Rodríguez al conocimiento universal y, así, los datos publicados y los recientes, de este nuevo miembro de nuestra corporación, avalan en gran parte su valor científico, que contribuye al constante engrandecimiento de nuestra Academia Nacional de Medicina.

Es muy honroso para mí haber sido designado para dar la bienvenida a usted, doctor Jorge Hernández Rodríguez, como nuevo miembro numerario de la Academia Nacional de Medicina, con la seguridad de que la seguirá engrandeciendo con sus esfuerzos, aportaciones científicas originales y participación en la formación de personal altamente calificado para la investigación en las ciencias de la salud.

* Académico Titular. Subjefatura de Investigación Biomédica, Subdirección General Médica, Instituto Mexicano del Seguro Social.