



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN
NICOLÁS DE HIDALGO**



Facultad de Químico Farmacobiología

Laboratorio de Neurobiología

Programa Institucional de Maestría en Ciencias Biológicas

**EFFECTO DE LA DIABETES MELLITUS EXPERIMENTAL
SOBRE LA EXPRESIÓN DEL RECEPTOR DEL GUSTO
AZUCARADO EN LA PAPILA CALICIFORME DE LA
RATA.**

TESIS

QUE PRESENTA

I.B.Q. Luis Ernesto Prado Rodríguez

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Director de Tesis: D.C. Rosalio Mercado Camargo

Morelia, Michoacán, Agosto 2010

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

Tesis apoyada por CONACyT (CVU 257301)

INDICE	PÁGINA
LISTA DE ABREVIATURAS.....	4
RESUMEN	5
ABSTRACT	6
INTRODUCCIÓN	8
DIABETES MELLITUS	8
I.- DIABETES MELLITUS TIPO 1 (DM1).....	9
II.- DIABETES MELLITUS TIPO 2 (DM2).....	10
III.- DIABETES MELLITUS GESTACIONAL.....	10
IV.- OTROS TIPOS ESPECÍFICOS DE DIABETES.....	11
DIABETES MELLITUS EXPERIMENTAL (DME).....	11
SISTEMA GUSTATIVO	12
DETECCIÓN DE SABORES.....	17
DETECCIÓN DE LOS SABORES SALADO Y ÁCIDO.....	18
DETECCIÓN DE LOS SABORES DULCE Y AMARGO.....	20
DETECCIÓN DEL SABOR UMAMI.....	21
ALTERACIONES GUSTATIVAS	23
JUSTIFICACIÓN	24
HIPÓTESIS	25
OBJETIVO GENERAL	25
OBJETIVOS PARTICULARES.....	25
METODOLOGÍA.....	26
ANIMALES.....	26
GRUPOS EXPERIMENTALES.....	26
INDUCCIÓN DE DIABETES.....	27
PESO Y CONSUMO DE ALIMENTO.....	27
INGESTA DE SOLUCIÓN DE SACAROSA.....	28

RT-PCR.....	28
CONTEO DE CORPÚSCULOS GUSTATIVOS.....	30
ANÁLISIS DE RESULTADOS.....	31
RESULTADOS	32
CONCENTRACIÓN DE GLUCOSA EN SANGRE.....	32
PESO CORPORAL.....	32
CONSUMO DE ALIMENTO.....	34
CONSUMO TOTAL DE LÍQUIDOS.....	36
CONSUMO DE SOLUCIÓN DE SACAROSA.....	38
PREFERENCIA DE SOLUCIÓN DE SACAROSA.....	40
EXPRESIÓN DE MRNA DEL RECEPTOR (T1R2/T1R3).....	42
NÚMERO DE CORPÚSCULOS GUSTATIVOS.....	48
DISCUSIÓN	50
CONCLUSIÓN	54
LITERATURA CITADA.....	55

ÍNDICE DE FIGURAS	PÁGINA
Figura 1: Organización del sistema gustativo humano	13
Figura 2: Papilas gustativas en la lengua.....	15
Figura 3: Corpúsculo gustativo.....	16
Figura 4. Receptores gustativos para los distintos sabores	18
Figura 5. Familias de receptores T1R y T2R.....	22
Figura 6. Peso corporal de las ratas.....	33
Figura 7. Consumo de alimento.	35
Figura 8. Consumo total de líquidos.....	37
Figura 9. Consumo de solución de sacarosa	39
Figura 10. Preferencia de solución de sacarosa	41
Figura 11. Productos de amplificación del receptor T1R2/T1R3 y actina	42
Figura 12 Gel Representativo de los productos de la reacción de PCR.....	43
Figura 13. Expresión del receptor T1R2 en la papila caliciforme.	45
Figura 14. Expresión del receptor T1R3 en la papila caliciforme.	47
Figura 15. Número corpúsculos gustativos en la papila caliciforme.	49

ÍNDICE DE TABLAS	PÁGINA
Tabla 1 Grupos experimentales	26
Tabla 2. Secuencias de los oligonucleótidos utilizados en la PCR para el análisis de la expresión de T1R2 y T1R3.....	30

LISTA DE ABREVIATURAS

ADA	Asociación Americana de Diabetes
AGE	Productos de glicación avanzada
ATP	Adenosin trifosfato
cAMP	Adenosin monofosfato cíclico (cAMP).
cGMP	Guanosin monofosfato cíclico
DAG	Diacylglicerol
DM	Diabetes mellitus
DM1	Diabetes mellitus tipo 1
DM2	Diabetes mellitus tipo 2
DMG	Diabetes mellitus gestacional
GAD	Descarboxilasa del ácido glutámico
i.p.	Intraperitoneal
IRS	Substrato del Receptor de Insulina
NTS	Núcleo del tracto solitario
OMS	Organización mundial de la salud
PAF	Paraformaldehído
PBS	Solución buffer de fosfatos
PIP ₂	Fosfatidilinositol difosfato
PKC	Proteína cinasa C
STZ	Estreptozotocina
TA	temperatura ambiente

RESUMEN

El sistema gustativo es el encargado de detectar el sabor a nivel periférico y enviar la señal a nivel del sistema nervioso central, este sistema está conformado por células gustativas (CG) que conforman los corpúsculos gustativos, que a su vez forman las papilas gustativas. Las CG contienen los receptores para la detección de las cinco modalidades gustativas establecidas hasta el momento; específicamente el sabor dulce es detectado por la activación del receptor T1R2/T1R3. Dentro de las manifestaciones clínicas de la Diabetes Mellitus (DM), se ha reportado que existe pérdida en la sensibilidad a los estímulos gustativos. Concretamente, el nivel umbral de percepción gustativa para las soluciones dulces se encuentra elevado en pacientes diabéticos, se ha sugerido que la pérdida en la sensibilidad gustativa (disgeusia) en la diabetes podría ser el resultado de la degeneración de las fibras gustativas y/o de la atrofia de las papilas gustativas. No se conoce si en la DM existe alteración en la expresión de los receptores T1R2/T1R3 por lo que se buscó determinar si existen cambios en la expresión del receptor para el gusto azucarado en papilas caliciformes de ratas con DM experimental (DME). Para lo cual se indujo la DME mediante la administración de estreptozotocina a ratas macho de 3 meses de edad, se sacrificaron a la primera y sexta semana de inducción y se disecó la papila caliciforme para determinar la expresión del receptor T1R2/T1R3 mediante la técnica de RT-PCR. Previo al sacrificio las ratas fueron sometidas a una prueba de ingesta de soluciones de sacarosa a diferentes concentraciones (0.1%, 1.0% y 10%) para determinar si existen diferencias en la preferencia de estas soluciones en las ratas del grupo diabético con respecto a las del grupo control. Los resultados muestran que el grupo con DME tuvo mayor preferencia por las soluciones de 0.1 y 1.0% mientras que se observó una menor preferencia por la solución de 10% comparado con el grupo control. Con respecto a la expresión de los receptores se observó una disminución significativa en la expresión de las subunidades del sabor dulce, T1R2 y T1R3, en el grupo con DME tanto a la primera como a la sexta semana posterior a la inducción de la DM. También se encontró que existe una disminución en el número de corpúsculos gustativos de las ratas diabéticas a la primera y a la sexta semana. Esto sugiere que los cambios en la

preferencia gustativa por las soluciones dulces en la DM pueden deberse a cambios en la expresión de los receptores para el gusto azucarado y cambios en la plasticidad de los corpúsculos gustativos que son la unidad funcional del sistema gustativo a nivel periférico.

ABSTRACT

The taste system is responsible for detecting the taste stimulus at the peripheral level and sends the signal to the central nervous system. The peripheral system consists of taste cells (TC) which form the taste buds, which in turn form the taste papillae. The TC contain receptors for the detection of the five taste modalities established until now, specifically the sweet taste is detected by activation of T1R2 and T1R3 receptors. It has been reported that one of the clinical manifestations of diabetes mellitus (DM) is diminution in sensitivity to taste stimuli. Specifically, the threshold level of taste for sweet solutions are elevated in diabetic patients, these observations suggest that the diminution in taste sensation (Dysgeusia) in diabetes could be the result of degeneration of taste fibers and/or atrophy of the taste buds. It is unknown if in the DM exists an altered expression of receptors T1R2/T1R3, therefore in order to determine whether there are changes in the expression of receptors for sweet taste (T1R2/T1R3) in papillae of rats with experimental DM (DME) male rats at three months old were induced with DME by administration of streptozotocin (55mg/kg weight). At first and sixth week of induction the animals were sacrificed and dissected circumvallate papilla to determine the receptor expression T1R2/T1R3 by RT-PCR technique. Prior to sacrifice the rats were subjected to a two bottle test of intake of water and sucrose solutions at different concentrations (0.1%, 1.0% and 10%) to determine whether there are differences in the preference of these solutions in the rats of diabetic group with respect to the control group. The results show that the DME group showed greater preference for the solutions of 0.1% and 1.0% while there was a lower preference for the solution of 10% compared with the control group. With respect to receptor expression there was a significant decrease in the expression of T1R2 and T1R3 receptors in the DME group in both the first and

the sixth week after the induction of DME. Also we found that there was a diminution in the number of taste buds in the diabetic rats at first and sixth week of DME. These results suggest that changes in taste preference for sweet solutions in DM may be due to changes in the expression of receptors for sweet taste and changes in the taste buds plasticity, these taste buds are the functional unit of the gustatory system at peripheral level.

INTRODUCCIÓN

DIABETES MELLITUS

La diabetes mellitus (DM) es una enfermedad que se caracteriza por hiperglucemia que resulta de la acción deficiente de la insulina que puede deberse a una inadecuada secreción de insulina y/o una respuesta disminuida de los tejidos a la insulina en uno o más puntos en la vía de acción de esta hormona. Existen diversos procesos patogénicos en el desarrollo de la diabetes que causan deficiencias de insulina, entre los que se encuentran, la destrucción autoinmune de las células β del páncreas y resistencia a la insulina en los tejidos, lo cual causa anomalías en el metabolismo de carbohidratos, lípidos y proteínas. Los síntomas de la hiperglucemia en la DM incluyen poliuria, polidipsia, polifagia, y visión borrosa. Las consecuencias agudas son hiperglucemia con cetoacidosis o síndrome hiperosmolar no cetónico y entre las consecuencias crónicas se encuentran la retinopatía con pérdida en la visión, nefropatía que conduce a insuficiencia renal, neuropatía periférica con riesgo de perder la sensibilidad en los miembros distales, con complicaciones como pie diabético y neuropatía autonómica que puede causar daños gastrointestinales, genitourinarios y cardiovasculares. (American Diabetes Association, 2003).

El daño a los tejidos que provoca la hiperglucemia de la DM se puede explicar por la glicosilación de proteínas como la hemoglobina (Wautier y Guillausseau, 2001), el incremento en la producción de poliol, la hiperactivación de la PKC y la producción de especies reactivas de oxígeno (Díaz-Flores, et al., 2004).

En 1997 el comité de expertos de la Asociación Americana de Diabetes (ADA) propuso la siguiente clasificación de la DM que hasta el momento es la más aceptada.

- I.- Diabetes Mellitus Tipo 1
- II.- Diabetes Mellitus Tipo 2
- III.- Diabetes Mellitus Gestacional
- IV.- Otros tipos específicos de diabetes

I.- DIABETES MELLITUS TIPO 1 (DM1)

Conocida anteriormente como Diabetes insulino dependiente o Diabetes infantil. Este tipo de diabetes resulta de la destrucción autoinmune de las células β del páncreas. Se distinguen dos subclases, una variedad autoinmune y otra idiopática (Powers, 2006).

En este tipo de DM el rango de destrucción de las células β del páncreas es muy variable. Algunos pacientes, particularmente niños y adolescentes, pueden presentar cetoacidosis como primer síntoma de la DM1, otros pueden presentar una hiperglucemia leve que puede cambiar rápidamente a severa y/o cetoacidosis en presencia de infecciones. Los pacientes eventualmente dependen de insulina para sobrevivir, comúnmente aparece en etapas tempranas de la vida pero puede darse en cualquier momento, incluso en etapa senil. La destrucción autoinmune de las células β tiene múltiples predisposiciones genéticas y se pueden relacionar con factores ambientales que permanecen pobremente definidos.

En la variedad idiopática los pacientes presentan también insulinopenia y son propensos a cetoacidosis pero no existe evidencia autoinmune. Solo una pequeña minoría de los pacientes con DM1 cae en esta variedad de los cuales la mayoría son africanos o asiáticos (American Diabetes Association, 2003).

II.- DIABETES MELLITUS TIPO 2 (DM2)

Anteriormente conocida como diabetes no insulino dependiente o diabetes del adulto, DM2 es la clasificación que se usa para individuos que presentan resistencia a la insulina o una deficiencia parcial de ésta. Durante los primeros años de padecerla los pacientes no requieren insulina para sobrevivir. Existen diferentes posibles causas para la DM2 y aunque estas no se conocen se ha determinado que en la DM2 no existe destrucción autoinmune de las células β y los pacientes que la padecen no tienen ninguna otra de las causas posibles de la DM1 ni de alguna otra clasificación. La mayoría de los pacientes con DM2 son obesos y la obesidad en si causa cierto grado de resistencia a la insulina (Powers, 2006). El riesgo de padecer este tipo de diabetes incrementa con la edad, la baja actividad física y como se mencionó anteriormente con la obesidad, ya que entre el 50 y 90% de pacientes con diabetes de tipo 2 son obesos (American Diabetes Association, 2003).

La etiología de la diabetes tipo 2 es heterogénea, puesto que se han identificado una gran variedad de estilos de vida y elementos ambientales que constituyen factores de riesgo de este trastorno. Se ha señalado que numerosos factores ambientales desencadenan el proceso autoinmunitario en sujetos genéticamente vulnerables; sin embargo, no se ha relacionado de manera concluyente ninguno de ellos con la diabetes. Ha resultado difícil identificar un desencadenamiento ambiental porque el factor puede anteceder en varios años al desarrollo de la diabetes. Entre los desencadenantes ambientales hipotéticos se cuentan los virus, en especial el virus coxsackie (Powers, 2006).

III.- DIABETES MELLITUS GESTACIONAL

La diabetes mellitus gestacional (DMG) se define como cualquier grado de intolerancia a la glucosa que sea detectada durante el embarazo (American Diabetes Association, 2003) y consiste en la presencia de hiperglucemia en ayuno o intolerancia a la glucosa moderada. Las mujeres diabéticas que se

embarazan no se incluyen en esta clase; la frecuencia de la DMG es mayor conforme avanza la edad, en las mujeres con sobrepeso y en las razas o etnias de África o Asia. El factor aislado más compatible con una tolerancia alterada a la glucosa oral durante el embarazo es la edad. Las mujeres con DMG tienen mayor riesgo de desarrollar diabetes de tipo 2 después del embarazo (Harris, 2003).

IV.- OTROS TIPOS ESPECÍFICOS DE DIABETES

Esta variedad comprende un grupo heterogéneo que abarca los casos de diabetes en que las causas se establecen o por lo menos se conocen parcialmente. Estas causas comprenden defectos genéticos conocidos que alteran el funcionamiento de las células beta o la acción de la insulina, trastornos del páncreas exocrino, endocrinopatías, diabetes inducida por medicamentos o químicos, infecciones, formas no comunes de diabetes autoinmune y otros síndromes genéticos asociados con diabetes (American Diabetes Association, 2003).

DIABETES MELLITUS EXPERIMENTAL (DME)

Los modelos animales han sido ampliamente utilizados en la investigación de la DM, desde 1922 se han usado una variedad de animales para la implementación de DME. Los modelos animales de DME han sido la clave para el desarrollo de los agentes terapéuticos orales, tratamiento laser para la retinopatía diabética, trasplante de tejido pancreático y la utilización de la bomba de insulina para liberar gradualmente la misma. Estos modelos han contribuido de gran manera al estudio de la DM y han dado la oportunidad de estudiar los factores genéticos y ambientales que pueden influir en el desarrollo de esta enfermedad, en el establecimiento de sus complicaciones y también nos han dado información de cómo manejar y tratar la DM en humanos. La mayoría de los experimentos se llevan a cabo en ratas; sin embargo, otras especies son utilizadas, incluyendo conejos, ratas, vacas, perros y ovejas. Los

modelos animales de diabetes pueden ser espontáneos o usando sustancias químicas, cirugías o manipulación genética, cada uno de los modelos tiene ventajas y desventajas pero todos son usados de una manera distinta para apoyar la investigación acerca de la DM (Chatzigeorgiou, 2009).

La inducción de la diabetes se ha logrado por medio de diversas técnicas experimentales. Las primeras aproximaciones de modelos de DM fueron que tras la extirpación del páncreas a animales, estos presentaban los signos típicos de la diabetes, tales como, poliuria y polidipsia, por lo que la extirpación del páncreas se ha propuesto como estrategia experimental relativamente simple para el estudio de los efectos de hiperglucemia en un animal. Sin embargo, existen además otras complicaciones en los a los animales que se les ha extirpado el páncreas derivadas de la falta de las otras hormonas que se producen y excretan en el páncreas. Existen, también, métodos no quirúrgicos para inducir hiperglucemia por daño al páncreas, entre los cuales se encuentran la administración de toxinas tales como STZ y aloxan. El uso de agentes químicos para producir diabetes, permite realizar estudios detallados de los eventos bioquímicos y morfológicos que ocurren durante y después de la inducción de un estado diabético (Chatzigeorgiou, 2009; Rees y Alcolado 2005; Ramos, 1994).

SISTEMA GUSTATIVO

El sabor corresponde al ensamblaje de las sensaciones percibidas durante la ingesta de alimentos y engloba la percepción de olores y estímulos gustativos (salado, amargo, dulce, ácido y umami) producidos durante la masticación, además de las sensaciones producidas por la textura, la temperatura y la astringencia (picante) de los alimentos. A nivel neurofisiológico, la percepción del sabor resulta de la estimulación combinada de tres sistemas sensoriales: el olfato, el gusto y el tacto, que nos permiten tener una representación del alimento a ingerir. Cabe señalar, que el gusto y el olfato contribuyen igualmente a la digestión en el inicio de las secreciones a nivel gastrointestinal y están

íntimamente asociados con la selección y el rechazo de los alimentos dañinos y potencialmente tóxicos (Mattes y Cowart, 1994).

La percepción de las moléculas odorantes y sápidas comienza en las células receptoras especializadas a partir de las cuales, la información vía diversos circuitos neuronales, es transmitida al cerebro. En el sistema gustativo, la detección de moléculas sápidas se lleva a cabo gracias a las células gustativas donde la estimulación de éstas pone en juego una red neuronal que se extiende desde la lengua, el paladar y la faringe hasta zonas específicas de la corteza como se muestra en la figura 1 (Purves, 2001).

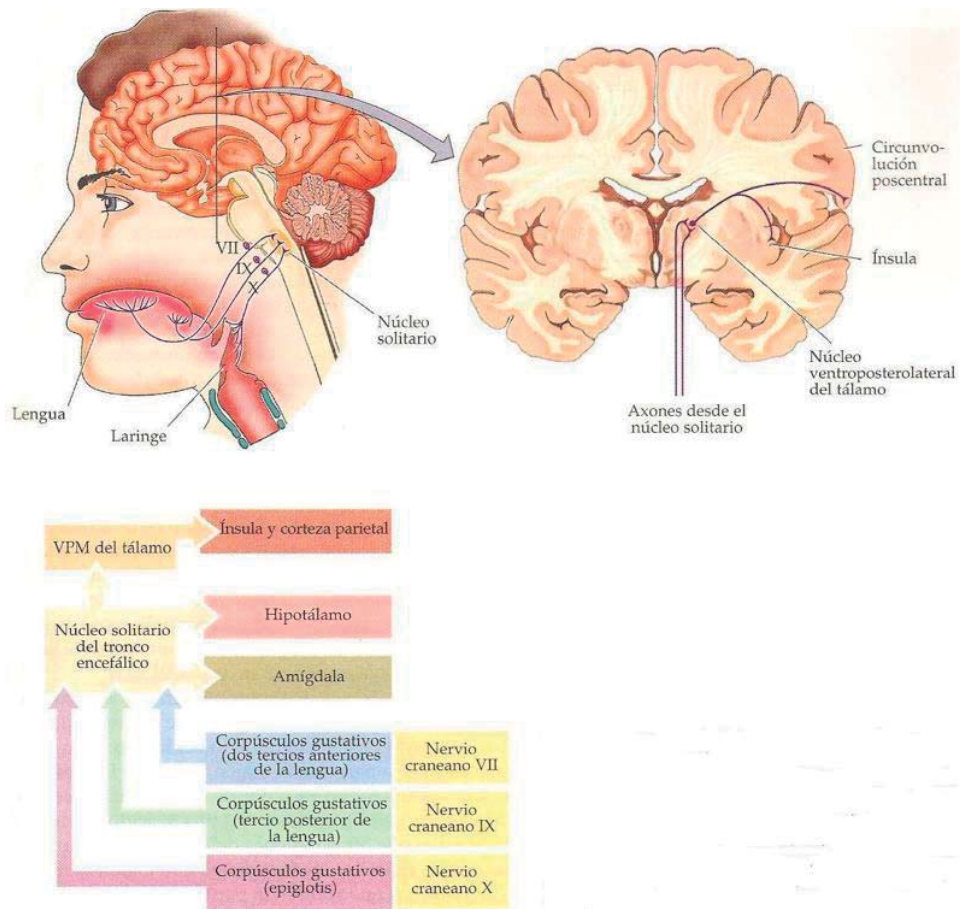


Figura 1: Organización del sistema gustativo humano (Tomada de Purves, 2001).

El punto de contacto del sistema gustativo con los alimentos se encuentra en la lengua y el primer elemento de transmisión, es un tipo de células epiteliales especializadas denominadas células gustativas (Fig. 2), que se agrupan en corpúsculos gustativos (Fig. 3), que a su vez forman papilas gustativas (Buck, 2000). Las papilas gustativas, de acuerdo a su morfología se dividen en tres clases diferentes: fungiforme (en forma de hongo), caliciforme (en forma de botón) y foliada (en forma de crestas), cada una de ellas está constituida de un número distinto y variable de corpúsculos gustativos. Las papilas fungiformes se localizan en las dos terceras partes anteriores de la lengua y en el paladar, a pesar de ser las más numerosas, tienen solo el 18% del total de corpúsculos gustativos. Las papilas caliciformes se encuentran en la tercera parte posterior de la lengua, el número de este tipo de papilas es de 7-9 en humanos y sólo una en el caso de murinos; aun siendo en número las más reducidas, estas integran el 48% del total de los corpúsculos gustativos. Por otro lado, las papilas foliadas se localizan en los lados de la tercera parte posterior de la lengua. Sólo existen dos papilas de este tipo, las cuales contienen el 34% de los corpúsculos gustativos presentes en la lengua (Fig. 2) (Buck, 2000; Purves, 2001).

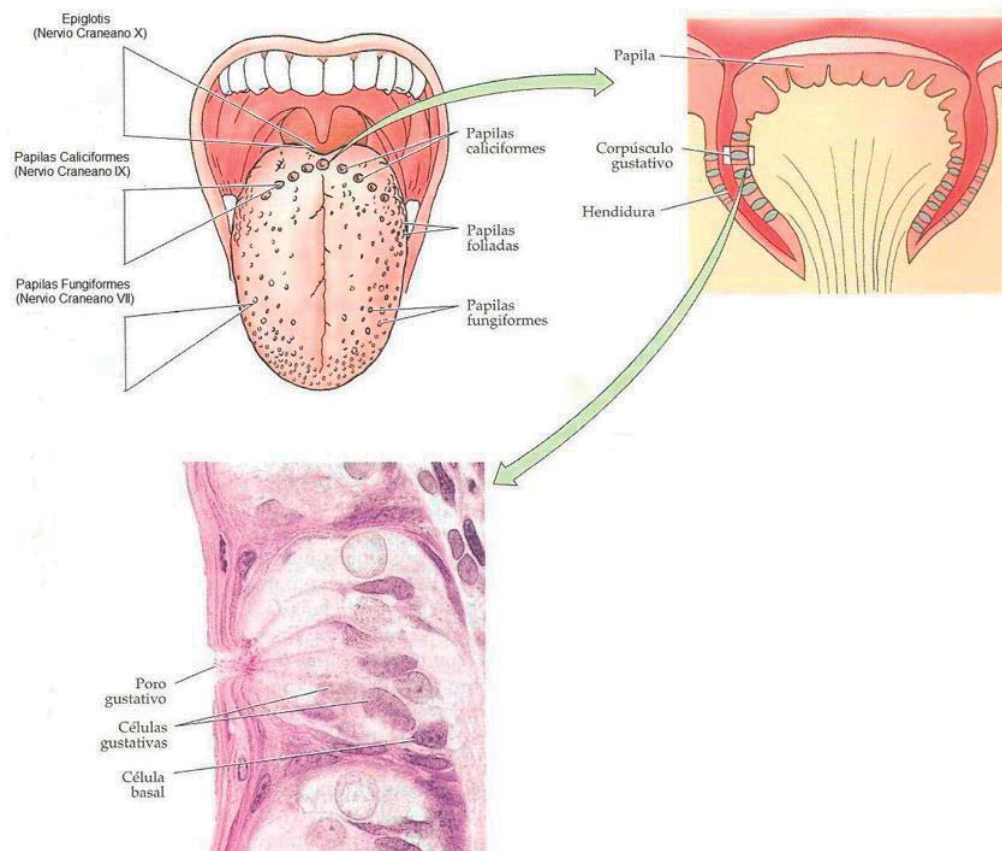


Figura 2: Papilas gustativas en la lengua.
(Tomada de Purves, 2001).

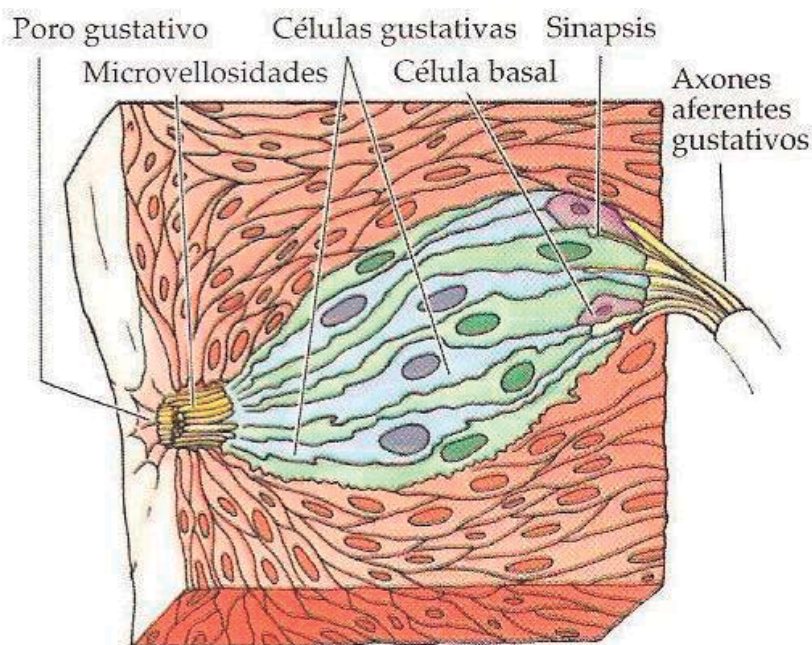


Figura 3: Corpúsculo gustativo.
(Tomada de Purves, 2001).

Dentro de los corpúsculos gustativos se distinguen cuatro tipos distintos de células gustativas que son: las células basales, las de tipo I, las de tipo II y las de tipo III. Las células basales son pequeñas células esféricas localizadas en la base del corpúsculo a partir de las cuales son diferenciadas las de tipo I, II y III (Buck, 2000). Las células de tipo I, II y III se caracterizan por tener una forma bipolar y prolongaciones hacia la cavidad bucal donde interaccionan directamente con las moléculas sápidas presentes en los alimentos y hacia la base del corpúsculo gustativo en donde establecen los contactos sinápticos con las fibras nerviosas aferentes (Buck, 2000; Lindemann, 2001). Las células gustativas de tipo I sirven de sostén al corpúsculo gustativo y regulan la concentración extracelular de iones en el corpúsculo (Bigiani, 2001). Las células de tipo II contienen la maquinaria necesaria para la detección y transducción de las señales gustativas (Boughter, 1998; Adler et al., 2000; Yang et al., 2000a y 2000b; Yee et al., 2001). Sin embargo, estas células no forman sinapsis con las fibras aferentes primarias (Clapp et al., 2004). Por otro lado, las células de tipo III son las únicas que establecen sinapsis con los

nervios gustativos aferentes (Murray, 1986; Yang et al., 2000b; Yang et al., 2004). Paradójicamente, las proteínas necesarias para la transducción gustativa de los sabores sólo son expresadas en las células de tipo II (Boughter, 1998; Adler et al., 2000; Yang et al., 2000a y 2000b; Yee et al., 2001).

Las papilas gustativas son innervadas por los nervios: facial (VII), glossofaríngeo (IX) y vago (X) como se muestra en la figura 1. Las fibras sensoriales del nervio facial, a través de la cuerda del tímpano, transporta la información gustativa a la corteza cerebral proveniente de las papilas fungiformes, mientras que la información proveniente de las papilas caliciformes y foliadas es transportada al cerebro vía nervio glossofaríngeo. Finalmente, el nervio vago es el encargado de trasladar al cerebro la información proveniente de la faringe (Buck, 2000). Todos los nervios que establecen contacto sináptico con las células gustativas convergen a nivel de la región rostral del núcleo del tracto solitario (NTS) localizado en el tronco cerebral, de ahí son luego conectadas con el núcleo ventro-postero-medial del tálamo. Las neuronas del núcleo ventro-postero-medial se proyectan hacia la parte anterior de la ínsula en el lóbulo cortical temporal y hacia el opérculo en el lóbulo cortical frontal. Estas regiones son consideradas como las áreas cerebrales gustativas donde toma lugar la percepción consciente del gusto (Buck, 2000).

DETECCIÓN DE SABORES

Existen cinco diferentes modalidades gustativas: dulce, amargo, salado, ácido y el umami. A nivel molecular, la detección y traducción de los sabores se realiza por receptores localizados en la superficie de las microvellosidades presentes en la membrana apical de las células gustativas tipo II (Fig. 3). En función de la naturaleza del sabor, el receptor activado pertenecerá, ya sea, a la familia de receptores de tipo canal, en los cuales el sitio de unión para el ligando y un canal iónico forman parte de un mismo complejo macromolecular, o bien al tipo de receptores acoplados a proteínas G como se observa en la figura 4. En el último caso, la estimulación del receptor activa una proteína que

tiene la particularidad de unir el GTP, esta proteína está constituida por tres subunidades entre las cuales se encuentra la subunidad α que es capaz de activar diversos sistemas de señalización intracelular. La detección y traducción de los sabores salados y ácidos es efectuada por receptores de tipo canal mientras que los receptores acoplados a proteínas G intervienen en la detección de los sabores dulce, amargo y umami (Sugita, 2006).

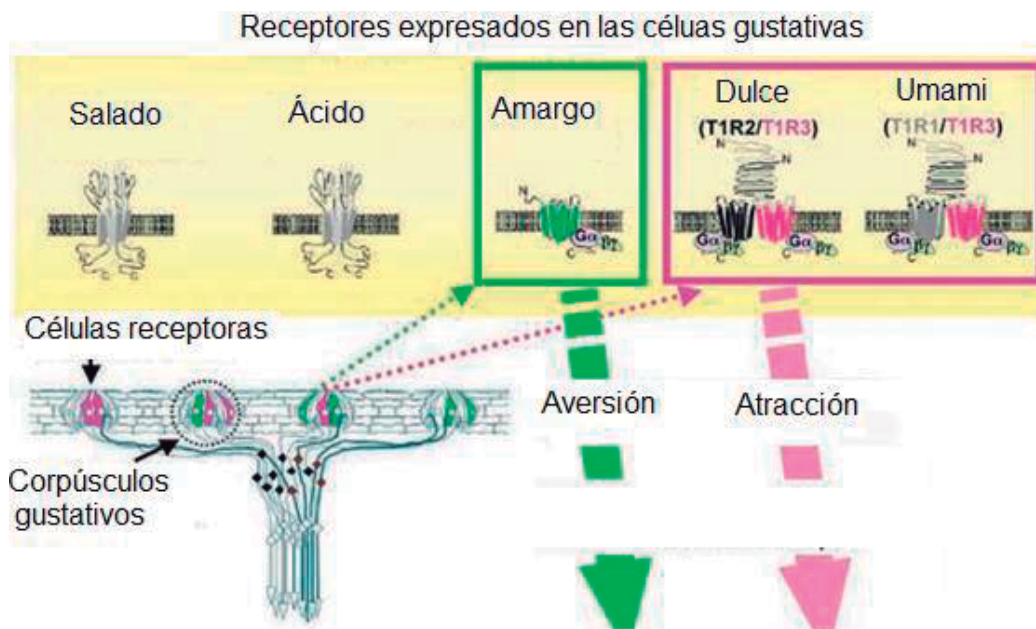


Figura 4. Receptores gustativos para los distintos sabores
(Tomada de Sugita, 2006).

DETECCIÓN DE LOS SABORES SALADO Y ÁCIDO

Todos los vertebrados, poseen células gustativas que responden a los sabores salado y ácido. En mamíferos, la excitación de estas células produce una sensación agradable sin embargo, una saturación de estos receptores produce una sensación desagradable. La percepción del sabor salado se asocia con la acción de los iones (Na^+) presentes en forma de sal en los alimentos, principalmente en forma de cloruro de sodio (NaCl). La detección de los estímulos salados se efectúa a través de la interacción de los iones sodio con

los canales iónicos sensibles a la amilorida (Boughter, 1998). La interacción del NaCl con estos canales, se produce por la difusión de iones sodio al interior de la célula gustativa contra un gradiente electroquímico generando una despolarización de la membrana celular (Avenet y Lindemann, 1991), lo que induce un potencial de acción, que provoca el incremento de calcio intracelular y por consiguiente la liberación de un neurotransmisor (serotonina, noradrenalina o ATP hasta ahora propuestos) sobre las fibras nerviosas aferentes (Lindemann, 1996).

Por otro lado, al parecer los protones son los responsables del estímulo ácido, ya que el sabor generado por compuestos ácidos es proporcional a la concentración de protones. La percepción del sabor ácido de un alimento, resulta de la interacción de los protones (H^+) liberados durante la masticación con el canal iónico. Los protones extracelulares son capaces de bloquear canales de K^+ (Cummings y Kinnamon, 1992), impidiendo la salida de este catión, lo cual provoca una despolarización y la generación de potenciales de acción, resultando en la liberación de un neurotransmisor sobre las fibras gustativas aferentes. Recientes estudios genéticos y funcionales han demostrado que el receptor PKD2L1 (polycystic kidney disease), un miembro de la familia de canales iónicos TRP (transient receptor potencial), es selectivamente expresado en una población de células gustativas distintas a las que detectan los sabores dulce, umami y amargo. La ablación de las células que expresan este receptor, por la acción de la toxina diftérica, produce animales con una pérdida total de la percepción del sabor ácido, manteniendo intacta la capacidad de identificar los demás sabores. Sin embargo, el mecanismo por el cual PKD2L1 puede mediar las respuestas a los sabores ácidos no ha sido descrito (Huang et al., 2006).

DETECCIÓN DE LOS SABORES DULCE Y AMARGO

La detección y traducción de las señales gustativas de tipo amargo y dulce se efectúa por medio receptores acoplados a proteínas G. Se han descrito dos familias de receptores para dichas modalidades: el grupo de los receptores T1R que comprende los miembros T1R1, T1R2 y T1R3, implicados en la detección del sabor dulce y umami (Hoon et al., 1999; Max et al., 2001; Montmayeur et al., 2001) y la familia de los receptores T2R compuesta por 40-80 miembros diferentes encontrados hasta el momento en los humanos (Adler et al., 2000; Meyerhof, 2005, Behrens, 2006) relacionados con la detección del sabor amargo (Fig. 5) (Chandrashekar et al., 2000; Nelson et al., 2001).

Por otro lado, a nivel intracelular, las vías de transducción de los receptores de los sabores amargo y dulce conducen a un aumento intracelular de calcio seguido de la liberación de un neurotransmisor. En el caso particular de los edulcorantes artificiales y azúcares, el aumento del Ca^{2+} intracelular es consecuencia de la activación de la fosfolipasa C de tipo β_2 ($\text{PLC}\beta_2$). Esta enzima cataliza la formación de diacilglicerol (DAG) y de inositol trifosfato (IP_3) a partir de fosfatidilinositol difosfato (PIP_2). El aumento de la concentración de IP_3 provoca la liberación de iones Ca^{2+} del retículo endoplásmico generando una despolarización de la célula y la liberación de un neurotransmisor. Los mecanismos de transducción de las señales amargas, implican la activación de una fosfodiesterasa (PDE) y de la $\text{PLC}\beta_2$. La activación de la PDE involucra una disminución de la concentración de cAMP y cGMP en la célula lo que lleva a una apertura de canales de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ generando una despolarización celular. La activación de la $\text{PLC}\beta_2$ involucra, como en el caso de la activación por compuestos dulces, la síntesis de IP_3 que induce la liberación de calcio intracelular (Yan et al., 2001; Zhang et al., 2003; Scott, 2004).

Aunque los dos tipos de receptores pertenecen a la familia de receptores acoplados a proteínas G, los tres subtipos de receptores T1R identificados a la fecha se caracterizan por tener un dominio amino-terminal extracelular de talla grande (400-600 residuos), que constituye el sitio de unión para el ligando (fig. 5a y 5b). Mientras que la región amino-terminal extracelular de los receptores

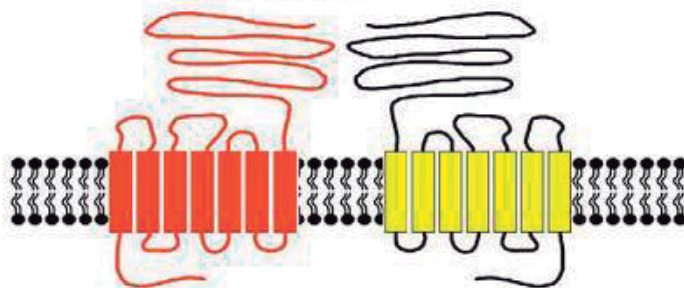
del sabor amargo es mucho más corta y el sitio de unión para los compuestos amargos se localiza en un dominio transmembranal del receptor (fig. 5c). Además, los receptores del sabor amargo funcionan como proteínas monoméricas, en las cuales la fijación del ligando induce un cambio de conformación capaz de activar las proteínas G (Wong, 1996). Mientras, que el receptor del sabor dulce funciona como heterodímero donde las interacciones entre sus unidades son esenciales para su actividad. Así, la asociación de T1R2 y T1R3 (Fig. 5b) forman un complejo macromolecular capaz de reconocer los compuestos dulces como sacarina, sacarosa, aminoácidos y algunas proteínas dulces (Nelson et al., 2001, 2002; Li et al., 2002).

DETECCIÓN DEL SABOR UMAMI

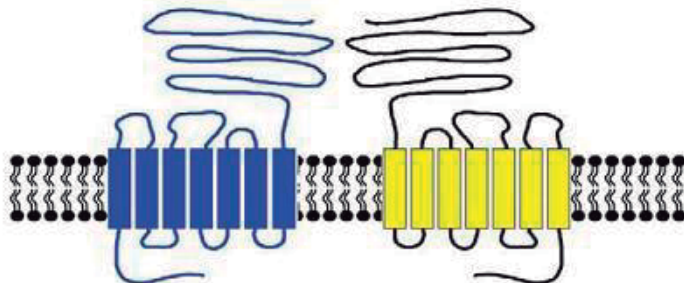
El termino japonés “umami” es utilizado para designar una sensación gustativa diferente de la salada, ácida, amarga y dulce. El umami es un sabor distintivo de los espárragos, los tomates, el queso, el consomé de pollo y el extracto de carne. Este sabor es generado por las sales glutámicas, principalmente por el L-glutamato monosódico, además de otros aminoácidos y péptidos (Damak, 2003).

Las células que expresan la combinación de las subunidades T1R1+T1R3 (Figura 5) responden a la estimulación con L-glutamato (Nelson et al., 2002; Li et al., 2002) y la doble inactivación de la expresión de estos receptores in vivo, inhibe completamente las respuestas celulares al umami. Estos resultados sugieren fuertemente que la percepción gustativa del umami recae únicamente en la combinación de las subunidades T1R1 + T1R3. La activación del receptor por el glutamato monosódico es seguida de una disminución de la concentración de cAMP intracelular conduciendo a una elevación de la concentración de Ca^{2+} , que genera un impulso nervioso transmitido al sistema nervioso aferente (Zhang et al., 2003).

(a) T1 + T1R3 = aminoácidos



(b) T1R2 + T1R3 = azúcares



(c) T2Rs = compuestos amargos

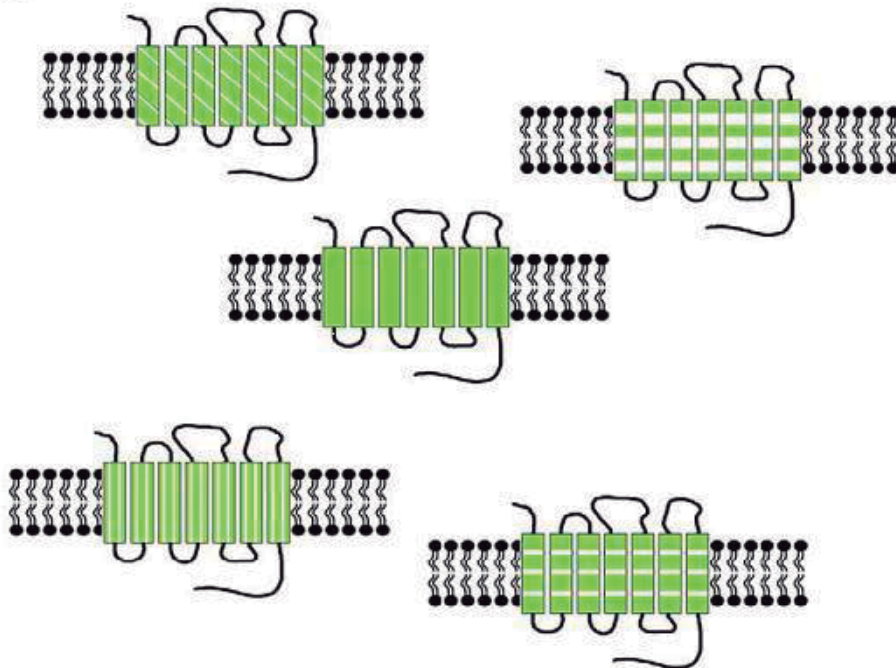


Figura 5. Familias de receptores T1R y T2R.

Familias de receptores T1R y T2R implicados en la percepción gustativa de los sabores dulce, amargo y umami.

ALTERACIONES GUSTATIVAS

Se ha encontrado que en pacientes con distintas enfermedades como: desnutrición, desórdenes inmunitarios, degradación del estado de salud general de personas mayores e hipertensión arterial existen diversas alteraciones gustativas (Mattes y Cowart, 1994; Winkler et al., 1999; Casper, 1980; Deems, 1991; Miller, 1989). También ciertas formas de obesidad, debido a un mayor consumo de alimentos con alto contenido energético, al parecer se asocian a una disfunción de la percepción gustativa (Stolbova et al., 1999).

Por otro lado en la DM se ha reportado que existe neuropatía que causa diversas alteraciones en el sistema nervioso, que se manifiestan de diferentes maneras, como pérdida en la sensibilidad de los miembros distales. Se ha encontrado también que durante el curso de la DM existe una disminución en la percepción gustativa en pacientes con diagnóstico de diabetes de tipo I y II, (Le Floch et al., 1989, 1990; Stolbova et al., 1999) que puede deberse también a la neuropatía (Man-Hui, 2006) sin embargo no se conocen los mecanismos por los cuales la DM causa esta disminución en la percepción gustativa.

JUSTIFICACIÓN

La DM es, actualmente, un problema de salud pública, que en México ocupa el primer lugar en muertes y es una de las principales causas de morbilidad relacionadas con retinopatía, nefropatía, enfermedades cardiovasculares, amputaciones y neuropatía periférica (ENSANUT 2006). A nivel mundial se prevé que del 2.8% de la población que tenía esta enfermedad en el año 2000 aumente a 4.4% para el 2030. Se espera que el número total de personas con esta enfermedad aumente de 171 millones en el año 2000 a 366 millones en el 2030 (Wild, 2004).

Dentro de las manifestaciones clínicas de la DM se ha reportado que existe pérdida de sensibilidad a los estímulos gustativos. El sistema gustativo a nivel periférico tiene su punto de contacto con las moléculas sápidas en un tipo de células epiteliales especializadas llamadas células gustativas, que se agrupan en corpúsculos gustativos, que a su vez forman papilas gustativas (Buck, 2000). Las papilas gustativas, se dividen en tres clases distintas: fungiforme, caliciforme y foliada; cada una de ellas constituida de un número distinto y variable de corpúsculos gustativos. En el caso de los murinos sólo existe una papila caliciforme que se encuentra en la tercera parte posterior de la lengua y, aún siendo en número la más reducida, integra el 48% del total de los corpúsculos gustativos. (Buck, 2000; Purves, 2001). En el caso de los individuos que padecen DM el umbral de percepción gustativa para las soluciones dulces se encuentra elevado por lo cual estos pacientes consumen más cantidad de azúcar para lograr el estímulo al sabor dulce (Schelling et al., 1965; Lawson et al., 1979; Abbasi, 1981). El hecho de que el aumento en el umbral de detección del gusto azucarado en los pacientes diabéticos este correlacionado con la severidad de la neuropatía periférica, sugiere que la disgeusia en la diabetes podría ser el resultado de la degeneración de las fibras gustativas (Le Floch et al., 1992) y/o de la atrofia de las papilas gustativas y esto puede tener como consecuencia cambios en la expresión de receptores del gusto azucarado lo cual no se conoce por lo que planteamos la siguiente:

HIPÓTESIS

En la Diabetes Mellitus disminuye la expresión de las subunidades T1R2 y T1R3 del receptor del gusto azucarado en la papila caliciforme de la rata.

OBJETIVO GENERAL

Determinar el efecto de la DME sobre la expresión de las subunidades T1R2 y T1R3 del receptor del gusto azucarado en la papila caliciforme de la rata.

OBJETIVOS PARTICULARES

- 1.- Determinar si existen cambios en la preferencia de soluciones de sacarosa en ratas con DME.
- 2.- Determinar los niveles de expresión de los mRNA de las subunidades T1R2 y T1R3 del receptor del sabor dulce en la papila caliciforme de la rata.
- 3.- Determinar el efecto de la DME sobre el número de corpúsculos gustativos en la papila caliciforme de la rata.

METODOLOGÍA

ANIMALES

El estudio se realizó en ratas Wistar macho, de 12 semanas de edad, procedentes del bioterio de la Facultad de Químico Farmacobiología. Durante el estudio, los animales fueron mantenidos en ciclos de luz-oscuridad de 12 hrs cada uno, humedad relativa de 60% y temperatura de 20-24°C. Todos los animales se sometieron a la misma dieta y agua ad libitum.

GRUPOS EXPERIMENTALES

Se formaron 4 grupos experimentales que se observan en la tabla 1, las ratas se dividieron en 2 grupos principales que son control y DME. De acuerdo a la solución de sacarosa que tomaron se dividieron en 4 subgrupos. Como control del experimento se formó un grupo al cual solo se le dio a tomar agua en los dos biberones, otro grupo al cual se le dio una solución de sacarosa en uno de los biberones al 0.1% otro grupo con solución al 1.0% y otro con solución al 10%. Para las muestras de la primera semana la n fue de 18 en cada subgrupo, al término de esta se sacrificaron 9 ratas, por lo que para la sexta semana quedaron 9 ratas de cada subgrupo.

Tabla 1 Grupos experimentales

Grupos		
Agua	Control	DME
Soln. Sacarosa al 0.1%	Control	DME
Soln. Sacarosa al 1.0%	Control	DME
Soln. Sacarosa al 10%	Control	DME

Las muestras fueron analizadas a la primera semana para observar el efecto agudo de la DME sobre la expresión de los mRNA del receptor T1R2/T1R3 y a la sexta semana para verificar los cambios debidos al efecto crónico de la DME.

INDUCCIÓN DE DIABETES

Para inducir la diabetes, al grupo experimental se le administró STZ [N-Methylnitrosocarbamoyl-D-glucosamine, Sigma] vía IP, en dosis única de 55 mg/Kg de peso, disuelta en agua inyectable, al grupo control se le administró simultáneamente un volumen equivalente del vehículo como control de estrés. Los niveles de glucosa en sangre de cada rata fueron medidos utilizando el aparato One Touch Ultra, antes y después de la inducción con STZ con 8 horas de ayuno previo. Para esta medición se realizó punción en la vena caudal con una lanceta, la muestra sanguínea se colocó en la tira reactiva para One Touch Ultra y se registró la lectura de la glucosa en mg/ dL. Los valores normales de glucosa sanguínea en las ratas fueron de 73-110 mg/dL. Posteriormente se realizó la medición de glucosa en sangre antes del sacrificio de los animales para la obtención de las muestras.

PESO Y CONSUMO DE ALIMENTO

El peso corporal y consumo de alimento se midió a la primera semana y a la sexta semana posteriores a la inducción de la DME. Para medir el consumo de alimento se colocó la cantidad de 100 g y 24 h después se peso el alimento sobrante y por diferencia se obtuvo la cantidad de alimento consumido por las ratas.

INGESTA DE SOLUCIÓN DE SACAROSA

Las ratas se colocaron en jaulas individuales se les proporcionó agua en dos bebederos durante una semana para adaptarlas a los mismos, al término de esta semana se les colocó en uno de los bebederos solución de sacarosa al 0.1%, 1.0% o al 10% antes de la administración de la estreptozotocina y posteriormente cada semana se determinó el consumo de agua y de solución de sacarosa, durante 24 h, hasta las 6 semanas en que fueron sacrificadas.

RT-PCR

Para los estudios de biología molecular se utilizaron muestras de papila caliciforme de ratas a la primera y a la sexta semana de inducción de la DME y a sus respectivos controles. Los animales fueron sacrificados por dislocación cervical y posteriormente fueron decapitados para obtener la lengua. A las lenguas obtenidas se les disecó la papila caliciforme. Debido al tamaño de la papila caliciforme, se realizó una colección de 5 papilas caliciformes para los ensayos de RT-PCR.

El ARN total fue extraído usando el reactivo de Trizol. Después de la disección, las papilas fueron inmediatamente introducidas en un tubo Eppendorf libre de ARNasas y ADNasas que contenía 500 μ L de TRIZOL[®] (Invitrogen) y homogeneizadas con ayuda de un mini polytron. La mezcla se dejó reposar a temperatura ambiente por 3 minutos y se le agregó 200 μ L de cloroformo después se centrifugó a 15,000 rpm durante 15 minutos a 4°C, y se recuperó la fase acuosa. La fase acuosa recuperada en un tubo nuevo fue tratada con isopropanol (500 μ L/mL de TRIZOL[®]), después de dejarla reposar por 10 minutos a temperatura ambiente se centrifugó (15,000 rpm) por 8 minutos a 4°C. Después de la centrifugación el sobrenadante fue eliminado y la pastilla depositada en el fondo del tubo se lavo con 1 mL de etanol al 75%. Después de eliminar el etanol el tubo se dejó secar por 10 minutos a temperatura ambiente. Finalmente el ARN fue resuspendido en 20 μ L de agua libre de ARNasas.

El ARN obtenido se trató con 2 µL de ADNasa libre de ARNasa (Sigma) por cada 8 µL de ARN con la misma cantidad de buffer de reacción (Sigma) durante 15 minutos a temperatura ambiente. Después se agregó el buffer para detener la reacción (SIGMA) y se inactivó la enzima mediante calentamiento en baño maría a 70 ° C por 10 min. Posterior a esto se procedió a cuantificar la cantidad de ARN en un espectrofotómetro mediante el coeficiente 260/280 en diluciones con agua estéril 1:100 del ARN total obtenido.

Se utilizaron 3 µg de ARN total para la síntesis de cADN. La reacción fue ajustada para un volumen total de 20 µL siguiendo las instrucciones del Kit (SIGMA, MM-LV). En cada reacción se corrió un control en el cual la enzima transcriptasa reversa fue sustituida por agua. Dicho control fue identificado como RT negativo.

Para determinar la expresión de los receptores T1R2 Y T1R3, la reacción de PCR se llevó a cabo con 2 µL de producto de reacción de la transcripción reversa. La reacción se llevó a cabo en un volumen total de 20 µL siguiendo las recomendaciones del kit (SIGMA). Como control en el análisis de expresión se utilizaron reacciones conducidas en productos de RT donde se omitió la transcriptasa reversa. Los parámetros de PCR fueron: un paso inicial de desnaturalización de 5 minutos a una temperatura de 95°C seguido por 38 ciclos de 45 segundos a 95°C, 45 segundos a 53°C (T1R3), 56°C (T1R2), 59°C (actina) y 1 minuto a 72°C. Para los tres casos, se realizó un ciclo final de extensión por 7 minutos a 72°C. En la tabla 1 se presentan los oligonucleótidos utilizados para amplificar fragmentos específicos de ambos receptores y de actina, la cual fue utilizada como control interno; la talla esperada de los fragmentos amplificados es de 200 pares de bases. Los productos de PCR fueron resueltos por electroforesis en un gel de agarosa. Los oligonucleótidos utilizados fueron diseñados para este trabajo.

Tabla 2. Secuencias de los oligonucleótidos utilizados en la PCR para el análisis de la expresión de T1R2 y T1R3.

Oligonucleótido	Secuencia (5' a 3')	Temperatura de alineamiento (°C)	Tamaño del producto (p.b.)
T1R2 (F)	GAGCTGCCAGCCAGGGCAAA	56 °C	200 p.b.
T1R2 (R)	CTTCGTGCCACTCCAGGAAGGT		
T1R3 (F)	CACGCTCTGCCAGCTGCCTT	53 °C	200 p.b.
T1R3 (R)	TGCAGCCTCCACAAGAGTGGC		
ACTINA (F)	AGCGCTTCCGGTGTCCA	59 °C	200 p.b.
ACTINA (R)	GGCTGTGATCTCCTTCT		

CONTEO DE CORPÚSCULOS GUSTATIVOS

Los animales se sacrificaron mediante fractura cervical, se les realizó una perfusión con solución salina fría al 0.9%, para remover la sangre de la lengua. Las ratas se decapitaron y se les extrajo la lengua, la cual fue fijada con paraformaldehído (PAF) al 4% en solución amortiguadora salina de fosfatos (PBS) durante 24 horas a 4°C., posteriormente el tejido se trato para su crioprotección en PBS con sacarosa al 10, 20 y 30 % de manera secuencial por un periodo de 24 horas a 4°C, en cada solución, posteriormente las papilas fueron disecadas de la lengua, orientadas en OCT y colocadas a -70°C, después se realizaron cortes de 16 µm de espesor, en un criostato, y los cortes se colocaron en laminillas gelatinizadas. Los cortes histológicos se tiñeron con hematoxilina-eosina y los corpúsculos gustativos se contaron, a triple ciego, en cada corte, de acuerdo al método descrito por Bradley (1980),

ANÁLISIS DE RESULTADOS

Para determinar si hay diferencia significativa en los resultados, los datos fueron comparados mediante “t de student” en el programa GraphPad Prism versión 3.0.

Para el análisis de la densitometría en los geles de agarosa se utilizó el programa “Image J” y los resultados obtenidos de compararon también con el programa GraphPad Prism versión 3.0, por medio de la “t de student”.

RESULTADOS

CONCENTRACIÓN DE GLUCOSA EN SANGRE

La concentración de glucosa en sangre fue medida antes, a las 48 h posteriores a la inducción de la DME y antes del sacrificio de los animales para la disección y utilización de las muestras. En los animales control se observó una concentración de glucosa en sangre de 73 – 98 mg/dl, mientras que para el grupo con DME se encontró una concentración de 325 – 600 mg/dl, observándose la hiperglicemia desde las 48 h posteriores a la inducción.

PESO CORPORAL

La figura 6 muestra el peso corporal de ambos grupos. Se observa que a los 7 días posteriores a la administración de STZ las ratas tuvieron una disminución de 15.1% de peso corporal de los grupos con DME ($\bar{x}=308.6$ g) respecto a su control ($\bar{x}=363.5$ g) ($P \leq 0.0001$) esta disminución es similar en los 3 grupos con las diferentes soluciones de sacarosa 0.1%, 1.0% y 10% (6A).

Además en la figura 6B se muestra el peso corporal de las ratas a las 6 semanas después de la administración del tóxico, donde se observa que las ratas diabéticas tienen una disminución en el peso corporal del 44.31% de los grupos diabéticos ($\bar{x}=266.43$ g) con respecto a sus controles ($\bar{x}=478.46$ g) ($P \leq 0.0001$), al igual que a la primera semana, la disminución es similar para los 3 subgrupos con las diferentes soluciones de sacarosa. El grupo control aumenta de peso de manera normal a la sexta semana comparado con la primera semana mostrando una diferencia significativa ($P \leq 0.0001$), mientras que el grupo diabético disminuyó su peso corporal a la sexta semana comparado con la primera semana posterior a la inducción de la DME ($P \leq 0.0001$).

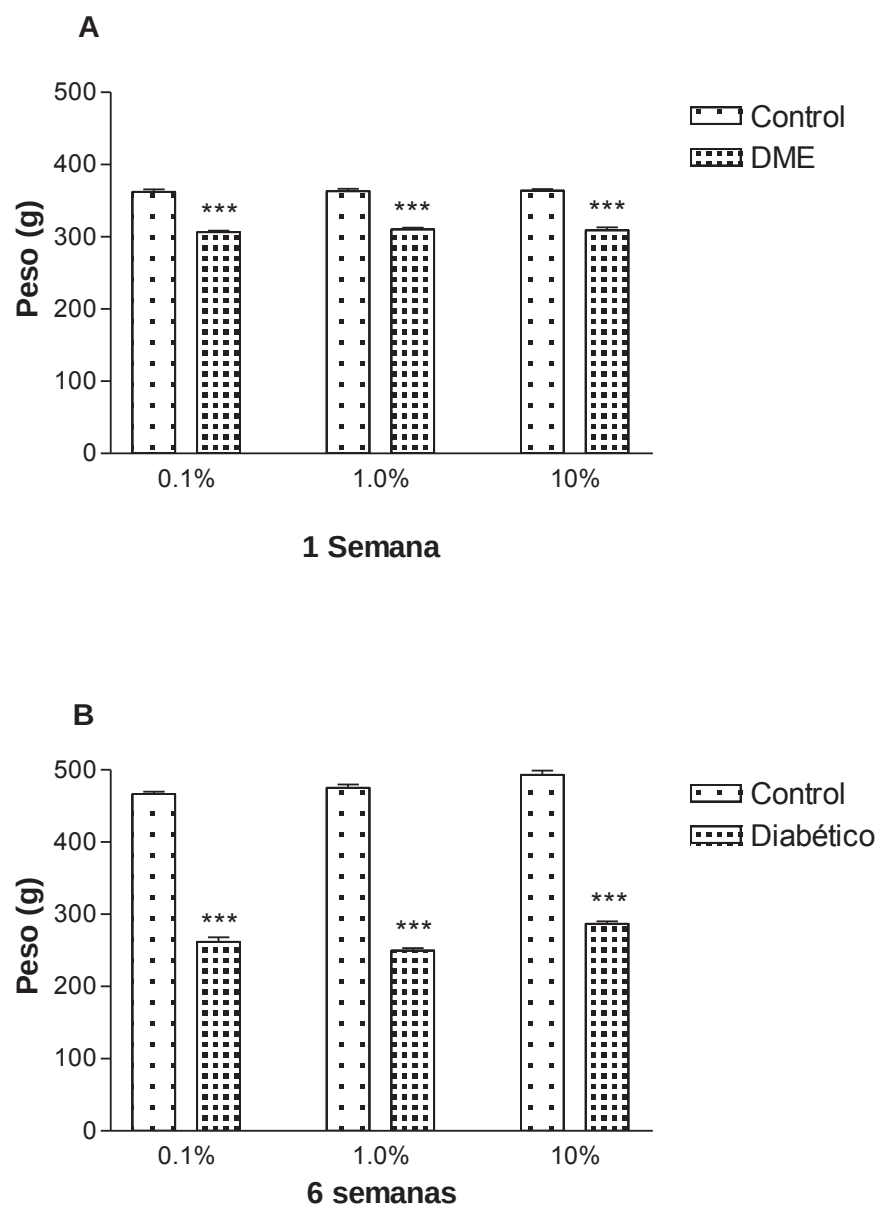


Figura 6. Peso corporal de las ratas.

Peso corporal de las ratas de los grupos control y grupo con DME que ingirieron soluciones de sacarosa al 0.1%, 1.0% y 10%. A primera semana y B sexta semana posteriores a la inducción de la DME. Los datos representan la media $\pm$ E.E. con $n=18$ para (A) y $n=9$ para (B). *** $P<0.0001$ comparando el grupo control y el grupo diabético.

CONSUMO DE ALIMENTO

En la figura 7 se muestra el consumo de alimento de las ratas de los grupos control y diabético. La figura 7A representa el consumo de alimento a la primera semana después de la administración de la STZ y se observa que el grupo diabético consumió una mayor cantidad de alimento ($\bar{x}=39.89$ g) que el grupo control ($\bar{x}=27.42$ g) este incremento en el consumo representa un 31.26%. En esta semana se encontró que no hay diferencia significativa entre los subgrupos de 0.1% y 1.0% del grupo control pero si una disminución significativa, en cuanto al consumo de alimento, del grupo con solución de sacarosa al 10% comparado con los subgrupos de 0.1% y 10% ($P \leq 0.0001$). Se observa algo similar para el grupo diabético, en el cual se encontró el menor consumo de alimento estadísticamente significativo ($P \leq 0.05$) en el subgrupo de los animales diabéticos que ingirieron la solución al 10%, comparado con los que consumieron la solución al 0.1% y 10%.

En la figura 7B se muestra el consumo de alimento 6 semanas después de la inducción de la DME observándose que las ratas diabéticas consumen mayor cantidad de alimento ($\bar{x}=42$ g) que el grupo control ($\bar{x}=25.07$ g) que representa un incremento de 40%. Respecto a los subgrupos de las distintas soluciones se encontró que en el grupo control los animales que ingirieron solución de sacarosa al 10% consumieron una menor cantidad de alimento, comparados con las ratas de los subgrupos con solución de sacarosa al 0.1% y 1.0% ($P \leq 0.05$) y para el grupo de las ratas con DME se observa que el subgrupo con solución al 10% consume una menor cantidad de alimento comparado con el subgrupo que ingirió la solución al 1.0% ($P \leq 0.001$).

En ninguno de los subgrupos se encontró diferencia significativa entre el consumo de alimento a la primera semana y el consumo a la sexta semana posterior a la administración de la STZ.

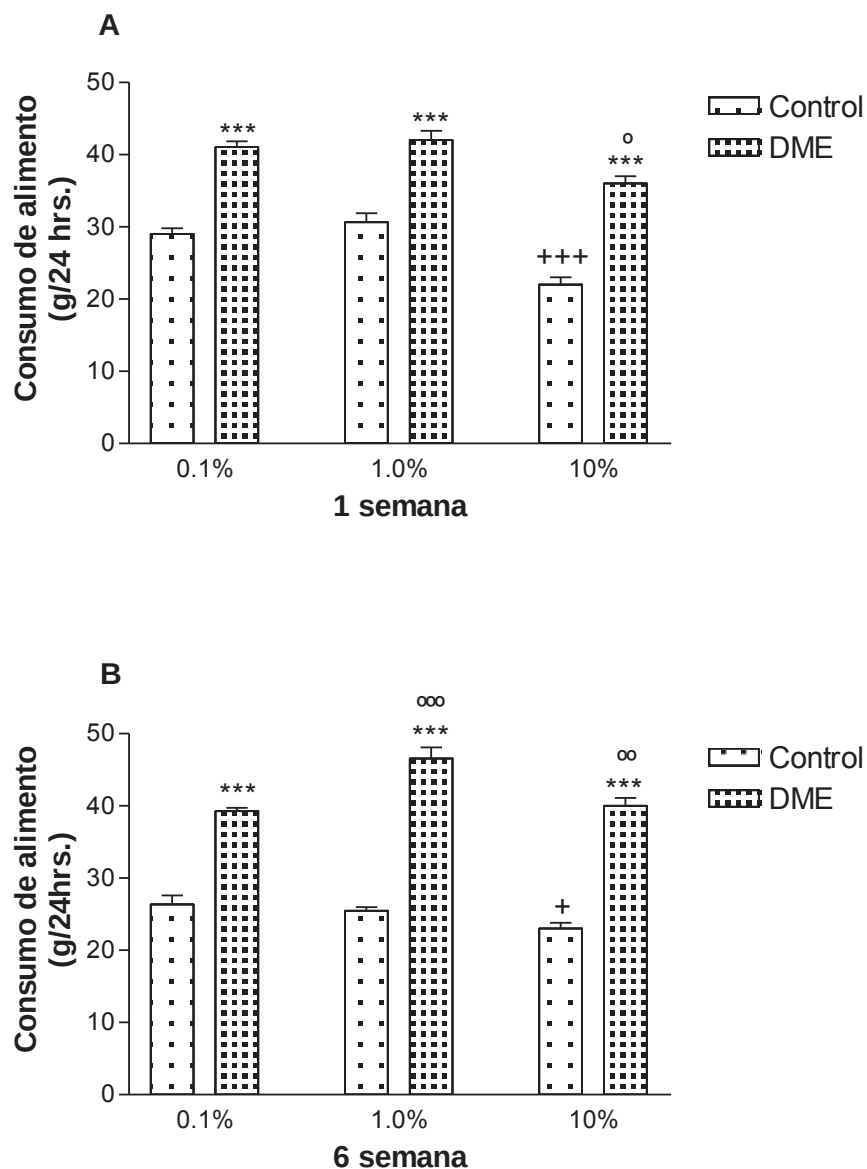


Figura 7. Consumo de alimento.

Consumo de alimento (g en 24 h) de las ratas de los grupos control y con DME que ingirieron soluciones de sacarosa al 0.1%, 1.0% y 10%. A primera semana y B sexta semana posteriores a la inducción de la DME. Los datos representan la media $\pm$ E.E. con $n=18$ para (A) y $n=9$ para (B). *** $P<0.0001$ comparando el grupo control con el grupo con DME en cada subgrupo con diferente solución de sacarosa. $^{\circ}$ $P<0.001$, ooo $P<0.0001$ comparando los consumos de alimento entre los subgrupos del grupo con DME. + $P<0.05$, comparando el consumo de alimento entre los subgrupos del grupo de las ratas control.

CONSUMO TOTAL DE LÍQUIDOS

Una de las características de los pacientes con DM es la polidipsia que se caracteriza por una ingesta mayor de líquidos que los individuos sanos, en la figura 8 se muestra el consumo total de líquidos que representa el consumo de la botella que contenía agua mas el consumo de la botella que contenía una de las soluciones de sacarosa correspondiente a cada uno de los subgrupos. En la figura 8A se observa el consumo total de líquidos de los animales control y diabéticos a la primera semana posterior a la inducción de la DME y los respectivos grupos con soluciones de sacarosa al 0.1% 1.0% y 10% donde podemos observar que el grupo diabético consume una mayor cantidad ($P \leq 0.001$) de líquidos, en los tres grupos, que el grupo control. De igual manera se observa que al incrementar la cantidad de sacarosa en la solución los animales, tanto control como diabéticos, consumen una mayor cantidad de líquidos.

En la figura 8B se muestra la ingesta total de líquidos a las 6 semanas posterior a la inducción de la DME donde se observa que las ratas con DME consumieron una mayor cantidad líquidos, en los tres grupos con diferentes soluciones de sacarosa, comparadas con las ratas controles y al igual que la primera semana el consumo de líquidos incrementó al aumentar la concentración de sacarosa en la botella que contenía la solución correspondiente de sacarosa.

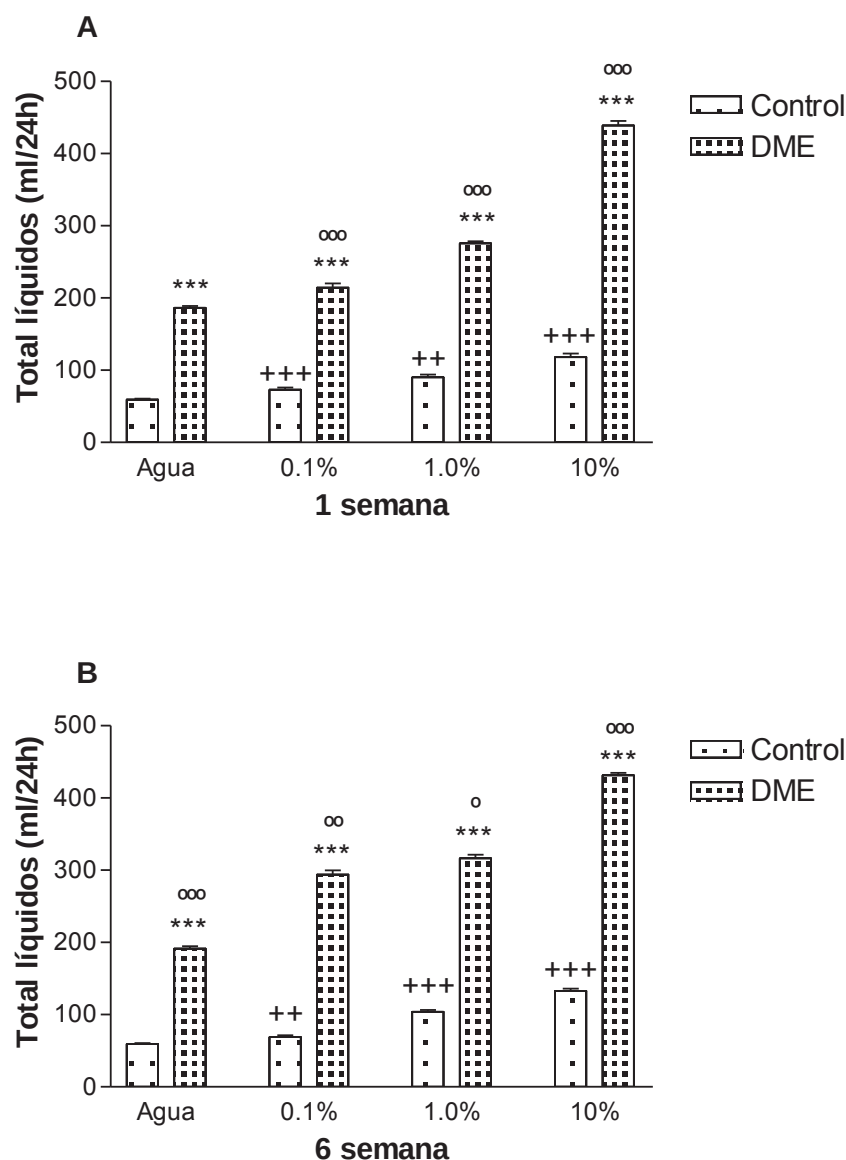


Figura 8. Consumo total de líquidos

Consumo de líquidos (botella con agua + botella con solución de sacarosa) en 24 h de los grupo control y con DME que ingirieron soluciones de de sacarosa al 0.1%, 1.0% y 10%. A primera semana y B sexta semana posteriores a la inducción de la DME. Los datos representan la media $\pm$ E.E. con $n=18$ para (A) y $n=9$ para (B). *** $P<0.001$ comparando el grupo control con el grupo con DME en cada subgrupo con diferente solución de sacarosa. ° $P<0.05$, °° $P<0.0001$ comparando los consumos de alimento entre los subgrupos del grupo con DME. ++ $P<0.001$, +++ $P<0.0001$ comparando el consumo de alimento entre los subgrupos del grupo de las ratas control.

CONSUMO DE SOLUCIÓN DE SACAROSA

En la figura 9 se muestra el consumo de las soluciones de sacarosa de las ratas control y con DME a la primera y sexta semana posteriores a la administración de la STZ. En la figura 9A se muestra el consumo de solución de sacarosa a la primera semana posterior a la inducción donde podemos observar que el grupo diabético consumió una mayor cantidad de solución de sacarosa que el grupo control en los tres grupos correspondientes a las 3 distintas soluciones. El grupo con DME consumió un 77.5%, 71.96% y 67.89% mayor cantidad de solución de sacarosa que los respectivos controles para los 3 distintos subgrupos, 0.1%, 1.0% y 10% ($P<0.0001$) respectivamente. Por otro lado podemos observar que a mayor concentración de sacarosa el grupo control consumió una mayor cantidad de solución, es decir, el subgrupo con solución al 1.0% consume mayor volumen que el grupo que ingirió solución al 0.1% ($P<0.0001$) y el grupo con la solución al 10%, ingiere una mayor cantidad que los grupos de 1.0% y 0.1% ($P<0.0001$) y este mismo patrón lo podemos observar en las ratas con DME ($P<0.0001$)

En la figura 9B se muestra el consumo de las soluciones de sacarosa para los animales con 6 semanas posteriores a la administración del fármaco, donde se observa que los animales con DME consumieron una mayor cantidad de solución de sacarosa que los controles, 83.26%, 70.83% y 57.05% para las soluciones de 0.1%, 1.0% y 10% ($P<0.0001$) respectivamente. A la sexta semana existe también un mayor consumo de solución de sacarosa a mayor concentración de ésta en la solución, tanto en el grupo control como en el grupo con DME, a excepción del subgrupo que ingirió la solución al 10% en el cual se observa que las ratas consumieron significativamente un menor volumen que las de ratas con solución al 1.0%.

Al comparar los consumos entre la primera y sexta semana, notamos que en el grupo control no existe diferencia significativa en el consumo de las soluciones mientras que en el grupo con DME existe un incremento significativo en el consumo de soluciones de sacarosa en los 3 subgrupos que ingirieron las soluciones de 0.1% ($P<0.001$) 1.0% ($P<0.0001$) y 10% ($P<0.0001$).

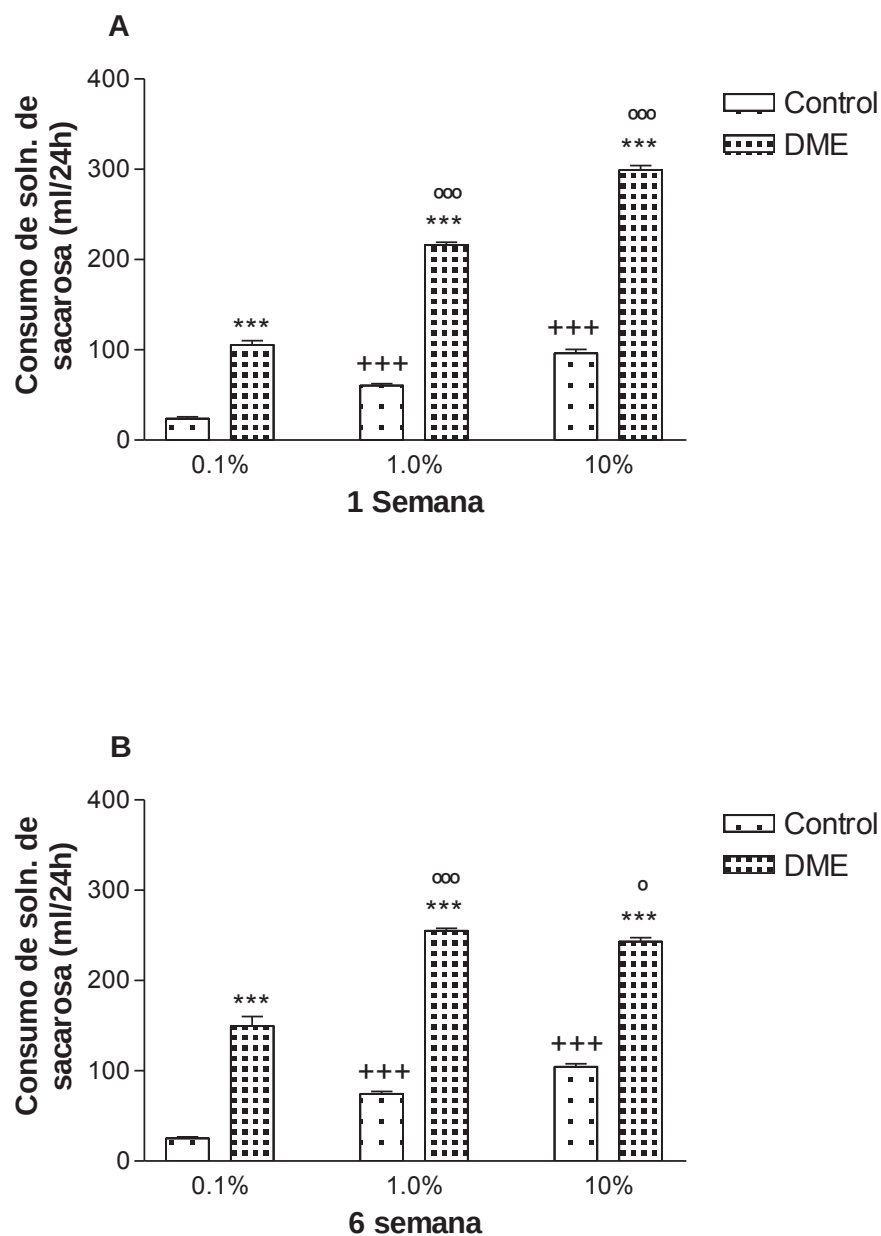


Figura 9. Consumo de solución de sacarosa

Consumo de soluciones de sacarosa (0.1%, 1.0% y 10%) en 24 h de los grupos control y con DME a la primera (A) y sexta semana (B) posteriores a la inducción de DME. Los datos representan la media $\pm$ E.E. con $n=18$ para (A) y $n=9$ para (B). *** $P<0.0001$ comparando el grupo control con el grupo con DME en cada subgrupo con diferente solución de sacarosa. ° $P<0.05$, °° $P<0.0001$ comparando los consumos de alimento entre los subgrupos del grupo con DME. +++ $P<0.0001$ comparando el consumo de alimento entre los subgrupos del grupo de las ratas control.

PREFERENCIA DE SOLUCIÓN DE SACAROSA

Para conocer la preferencia de la solución de sacarosa vs agua, el consumo de solución de sacarosa se dividió entre el consumo total de líquidos (Fig. 10). En la figura 10A se muestra la preferencia de la solución de sacarosa vs el consumo de agua a la primera semana posterior a la administración de la STZ y se puede observar que el grupo con DME tuvo una mayor preferencia por las soluciones de sacarosa al 0.1% y 1% que su respectivo control ($P<0.0001$). Mientras que las ratas diabéticas que ingirieron la solución de sacarosa al 10% mostraron una menor preferencia que las controles ($P<0.0001$). Se observa también que el grupo control mostró una mayor preferencia a medida que la concentración de sacarosa fue mayor en los subgrupos con las soluciones de 0.1% 1.0% y 10% ($P<0.0001$). Para el caso del grupo con DME, las ratas mostraron una mayor preferencia por la solución de 1.0% comparado con las ratas que ingirieron la solución al 0.1% ($P<0.0001$) y una menor preferencia por la solución de sacarosa al 10% comparado con la que se observó para la ingesta de solución al 1.0% ($P<0.0001$).

En la figura 10B se muestra la preferencia de la solución de sacarosa vs consumo de agua a la sexta semana posterior a la inducción de la DME, y se puede observar un patrón similar que a la primera semana de inducción con respecto a la preferencia de las soluciones de sacarosa, el grupo control tiene una menor preferencia por las soluciones de 0.1% y 1.0% ($P<0.0001$) mientras que en el subgrupo de la solución al 10% las ratas diabéticas presentan una menor preferencia que las ratas del grupo control ($P<0.0001$).

En el caso de la sexta semana el grupo control mostró una mayor preferencia por la solución con mayor concentración de sacarosa en los subgrupos con las soluciones de 0.1% 1.0% y 10% ($P<0.0001$). El grupo con DME mostró una mayor preferencia por la solución de 1.0% comparado con el subgrupo que ingirió la solución al 0.1% ($P<0.0001$) pero se observa una menor preferencia por la solución al 10% comparado con la que se observó para la ingesta de solución al 1.0% ($P<0.0001$).

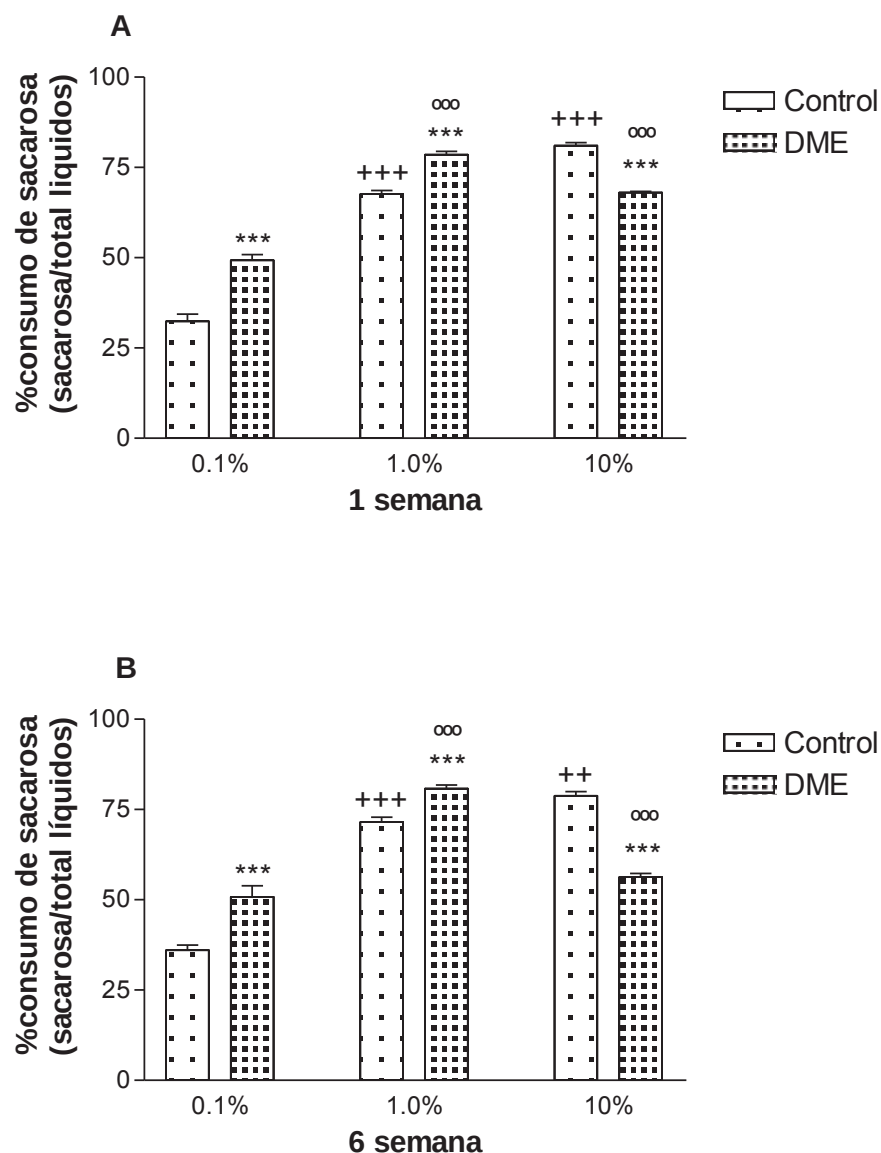


Figura 10. Preferencia de solución de sacarosa

Preferencia de soluciones de sacarosa vs. agua en la prueba de dos botellas de los grupos control y con DME que ingirieron soluciones de sacarosa al 0.1%, 1.0% y 10%. 10A primera semana y 10B sexta semana posteriores a la inducción de la DME. Los datos representan la media $\pm$ E.E. con $n=18$ para (A) y $n=9$ para (B). *** $P<0.0001$ comparando el grupo control con el grupo con DME en cada subgrupo con diferente solución de sacarosa. °°° $P<0.0001$ comparando entre los subgrupos del grupo con DME. ++ $P<0.001$. +++ $P<0.0001$ comparando entre los subgrupos del grupo de las ratas control.

EXPRESIÓN DE mRNA DEL RECEPTOR (T1R2/T1R3)

Para el análisis de expresión de los receptores del sabor dulce se realizaron las PCR's correspondientes por triplicado y los geles se analizaron con el programa "Image J" para determinar si existe diferencia en la densitometría de las muestras controles respecto a las diabéticas.

En la figura 11 se muestra la estandarización de los oligonucleótidos correspondientes a las subunidades T1R2 y T1R3 que forman el receptor para el sabor dulce y actina como gen de referencia. Se observan los productos de amplificación de la reacción de PCR para T1R2, T1R3 y actina, los 3 de 200 p.b. que corresponden a la talla esperada según el diseño de los oligonucleótidos, en un gel de agarosa al 1.2%.

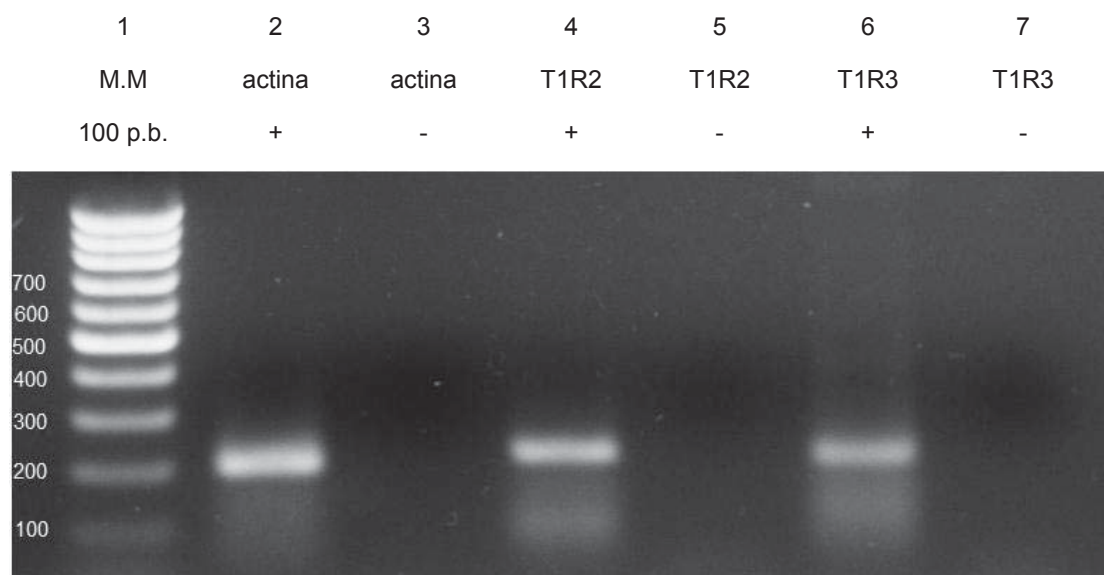


Figura 11. Productos de amplificación del receptor T1R2/T1R3 y actina

Productos de la reacción de PCR de actina, y las subunidades del receptor del sabor dulce T1R2 y T1R3 en un gel de agarosa al 1.2%. Carril 1 marcador molecular de 100 pares de bases. Carriles 2 y 3 expresión de actina positivo y negativo respectivamente. Carriles 4 y 5 expresión de T1R2 positivo y negativo respectivamente. Y carriles 6 y 7 expresión de T1R3 positivo y negativo respectivamente. Para las reacciones negativas se corrió la reacción de RT sin la enzima retrotranscriptasa como control de expresión de mRNA y descartar la contaminación con DNA.

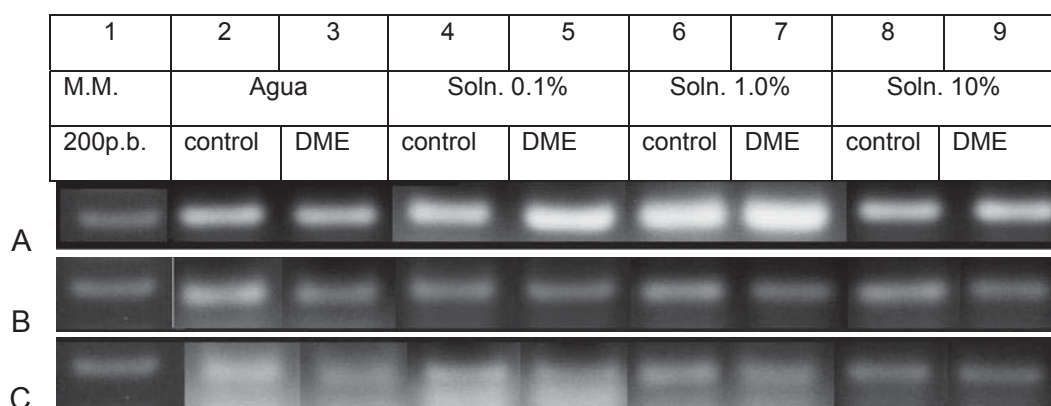


Figura 12 Gel Representativo de los productos de la reacción de PCR

Gel Representativo de los productos de la reacción de PCR de actina (A), y las subunidades del receptor del sabor dulce T1R2 (B) y T1R3 (C) en un gel de agarosa al 1.2%. Carril 1 marcador molecular a 200 pares de bases, carril 2 muestras control de ratas que consumieron sólo agua, carril 3 muestras diabéticas de ratas que consumieron agua, carril 4 muestras de ratas control que ingirieron solución al 0.1%, carril 5 muestras de ratas con DME que ingirieron solución al 0.1%, carril 6 muestras control de ratas que consumieron solución al 1.0%, carril 7 muestras de ratas diabéticas que ingirieron solución al 1.0%, carril 8 muestras de ratas control que consumieron solución al 10% y carril 9 muestras de ratas con DME que consumieron solución al 10%.

En la figura 13A se muestran la expresión relativa del receptor T1R2 a la primera semana posterior a la inducción de la DME. En esta figura se observa una disminución significativa de la expresión en el grupo diabético comparado con el control en la expresión del mRNA de la subunidad T1R2 en las ratas que consumieron la solución de sacarosa al 0.1% (* $P < 0.05$) en la solución de 1.0% (** $P < 0.001$) y en la de 10% (** $P < 0.001$) en los animales que tomaron sólo agua no se observó diferencia significativa en la expresión del mRNA de T1R2 a la primera semana de inducción de DME. En esta figura, también, podemos ver que existe un incremento significativo entre el grupo control en la expresión del mRNA de las ratas que ingirieron las soluciones de 0.1% ($P < 0.001$) y 1.0% ($P < 0.001$). Por otro lado, en el grupo de las ratas con DME encontramos que hubo una disminución significativa en la expresión relativa de T1R2 para los subgrupos que ingirieron las soluciones al 1.0% ($P < 0.001$) y 10% ($P < 0.001$), comparados con los otros 2 subgrupos.

En la figura 13B se muestra la expresión de la subunidad T1R2, del receptor para el sabor dulce, a la sexta semana después de la inducción de la DME y se observa una disminución de la expresión del mRNA en el grupo de las ratas diabéticas comparadas con el grupo de las ratas controles en las 3 soluciones de sacarosa, solución al 0.1% (** $P < 0.0001$), al 1.0% (** $P < 0.0001$) y al 10% (** $P < 0.0001$) y en este caso también se muestra una disminución en el grupo que sólo tomó agua (** $P < 0.001$).

En la figura 13B podemos ver que existen diferencias en la expresión de T1R2 entre los subgrupos del grupo control, existe una diferencia significativa entre los animales que tomaron agua y los animales que ingirieron la solución de sacarosa al 0.1% ($P < 0.001$), y se nota que los animales que tuvieron soluciones de sacarosa en uno de sus biberones tuvieron una mayor expresión relativa del mRNA de la subunidad T1R2 a medida que la solución estaba más concentrada, se observa un aumento significativo de la expresión del mRNA de los animales que tomaron la solución al 1.0% comparados con los animales que tomaron la solución al 0.1% ($P < 0.0001$), de igual forma se observa un incremento significativo en los animales que tenían la solución al 10% ($P < 0.0001$) comparados con los animales que ingirieron la solución al 1.0%.

Los animales de la sexta semana muestran un incremento significativo en la expresión de T1R2 comparados con los de la primera semana tanto en el grupo de los animales con DME como en el grupo de los controles (0.0001) con excepción del grupo del 0.1% en donde se ve una disminución en la expresión de mRNA de T1R2.

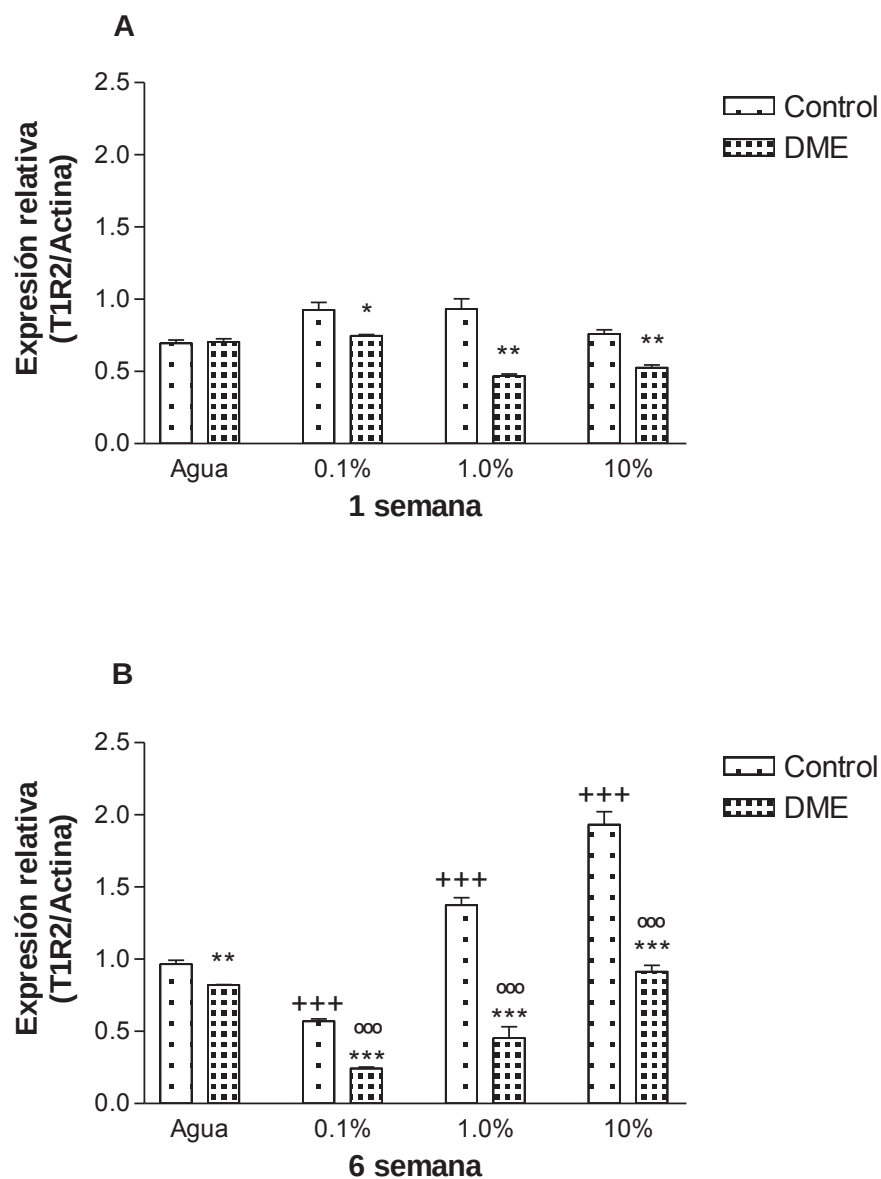


Figura 13. Expresión del receptor T1R2 en la papila caliciforme.

Expresión relativa del receptor T1R2 en la papila caliciforme de ratas control y con DME que ingirieron soluciones de sacarosa al 0.1%, 1.0% y 10%, a la primera y sexta semana después de la inducción de la DME. Los datos muestran la expresión relativa con respecto a actina, media $\pm$ E.E. con $n = 4$ para (A) y $n = 4$ para (B). ** $P < 0.001$, *** $P < 0.0001$ comparando el grupo control con el grupo con DME en cada subgrupo con diferente solución de sacarosa. ooo $P < 0.0001$ comparando entre los subgrupos del grupo con DME. +++ $P < 0.0001$ comparando entre los subgrupos del grupo de las ratas control.

En La figura 14A se muestra la expresión relativa de la subunidad T1R3 del receptor para el gusto azucarado, a la primera semana después de la administración de STZ donde se observa una disminución significativa en la expresión de este receptor en las ratas con DME comparadas con las ratas control, en las soluciones de 0.1% (* $P<0.05$), 1.0% (* $P<0.05$) y 10% (* $P<0.05$) y no hay diferencia para las ratas que sólo consumieron agua durante el experimento. Entre los animales control podemos notar un aumento significativo en la expresión de la subunidad del receptor de los animales que consumieron las soluciones de sacarosa al 1.0% y 10% comparados con los animales control que consumieron la solución de sacarosa al 0.1% y los animales que solamente consumieron agua ($P<0.05$) y la misma tendencia podemos observar para los animales diabéticos entre los cuales, los animales que ingirieron las soluciones al 1.0% y 10% tienen una mayor expresión relativa del receptor que los animales que sólo tomaron agua y los animales que tuvieron la solución al 0.1% ($P<0.05$).

En la figura 14B se muestra la expresión de la subunidad T1R3 del receptor, en este caso, a la sexta semana posterior a la inducción de la DME, donde existe una disminución significativa de la expresión de T1R3 de las ratas del grupo con DME comparadas con las ratas del grupo control para los subgrupos de animales que consumieron agua (** $P<0.01$), solución de sacarosa al 0.1% (** $P<0.001$), solución al 1.0% (** $P<0.01$) y solución al 10% (* $P<0.05$). Los animales control muestran un aumento significativo en la expresión de T1R3 de los animales que consumieron las soluciones de sacarosa al 0.1% y 10% comparados con los animales control que consumieron la solución de sacarosa al 1.0% y los animales que solamente consumieron agua ($P<0.001$ y $P<0.0001$ respectivamente). Respecto a los animales con DME, podemos observar que los animales que consumieron la solución al 10% tienen una mayor expresión relativa del receptor que los animales de los otros subgrupos ($P<0.0001$).

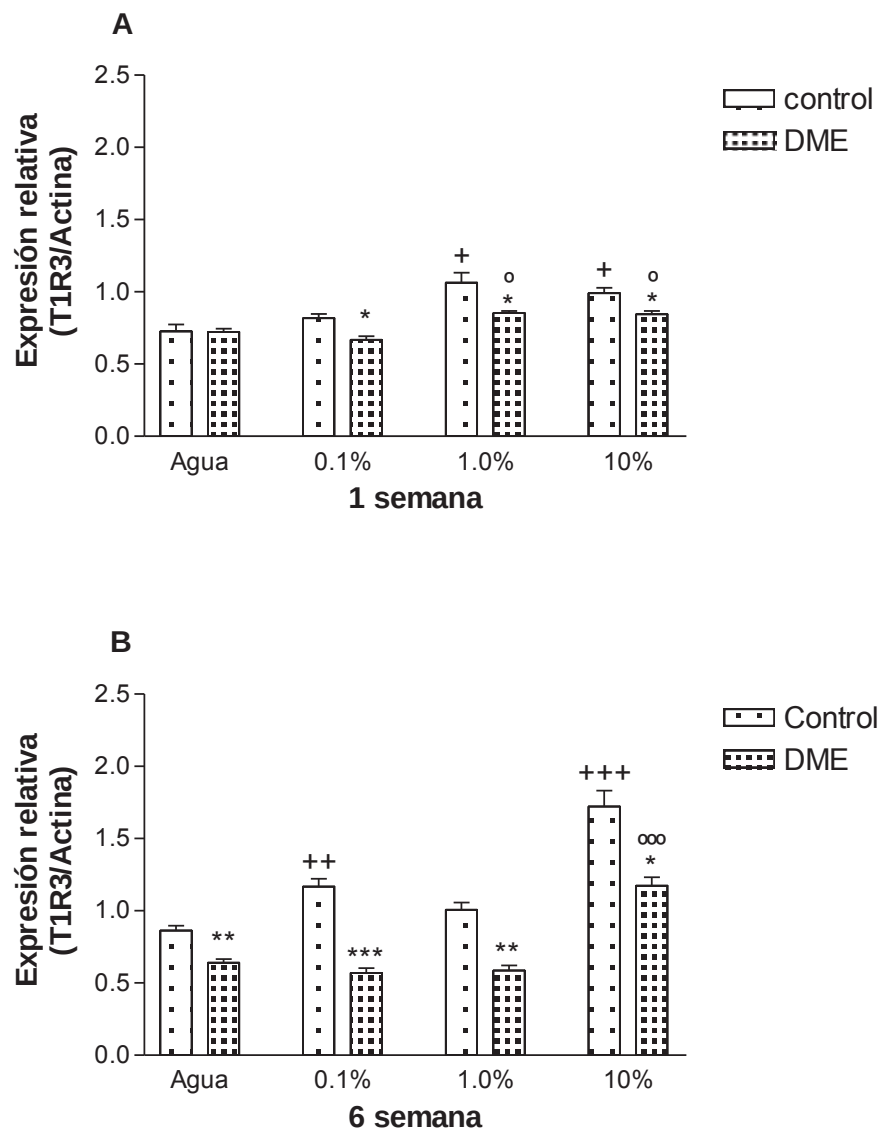


Figura 14. Expresión del receptor T1R3 en la papila caliciforme.

Expresión relativa del receptor T1R3 en la papila caliciforme de ratas control y con DME que ingirieron soluciones de sacarosa al 0.1%, 1.0% y 10%, a la primera y sexta semana después de la inducción de la DME. Los datos muestran la expresión relativa con respecto a actina, media $\pm$ E.E. con $n = 4$ para (A) y $n = 4$ para (B). * $P < 0.05$, ** $P < 0.001$, *** $P < 0.0001$ comparando el grupo control con el grupo con DME en cada subgrupo con diferente solución de sacarosa. ^{ooo} $P < 0.0001$ comparando entre los subgrupos del grupo con DME. ++ $P < 0.001$, +++ $P < 0.0001$ comparando entre los subgrupos del grupo de las ratas control.

NÚMERO DE CORPÚSCULOS GUSTATIVOS

En cuanto al conteo de corpúsculos en la figura 15A se observa que existe una disminución en el número de corpúsculos de la papila caliciforme en el grupo de las ratas con DME a la primera semana posterior a la inducción de la DME comparadas con las ratas del grupo control, para los 4 grupos, agua (**P<0.001), 0.1% (**P<0.001), 1.0% (*P<0.05) y 10% (*P<0.05) respectivamente y no hubo diferencia significativa en cuanto al número de corpúsculos ni entre los subgrupos del grupo control ni entre los de grupo diabético.

De igual manera en la figura 15B se observa una disminución en el número de corpúsculos en la papila caliciforme de las ratas con DME respecto a las ratas control a la sexta semana posterior a la administración de la STZ, para los 4 grupos, agua (*P<0.05), solución de sacarosa al 0.1% (*P<0.05), solución al 1.0% (*P<0.001) y también en la solución al 10% (*P<0.05). Al igual que a la primera semana en la sexta no se encontraron diferencias significativas entre los subgrupos con las diferentes soluciones en el grupo control ni en entre los subgrupos del grupo de ratas con DME.

También se observa que en la papila caliciforme de las ratas control hubo un incremento en el número de corpúsculos a la sexta semana comparado con las ratas control de la primera semana (P<0.001) mientras que las ratas con DME no mostraron diferencia significativa entre la primera y sexta semana posterior a la inducción de la DME.

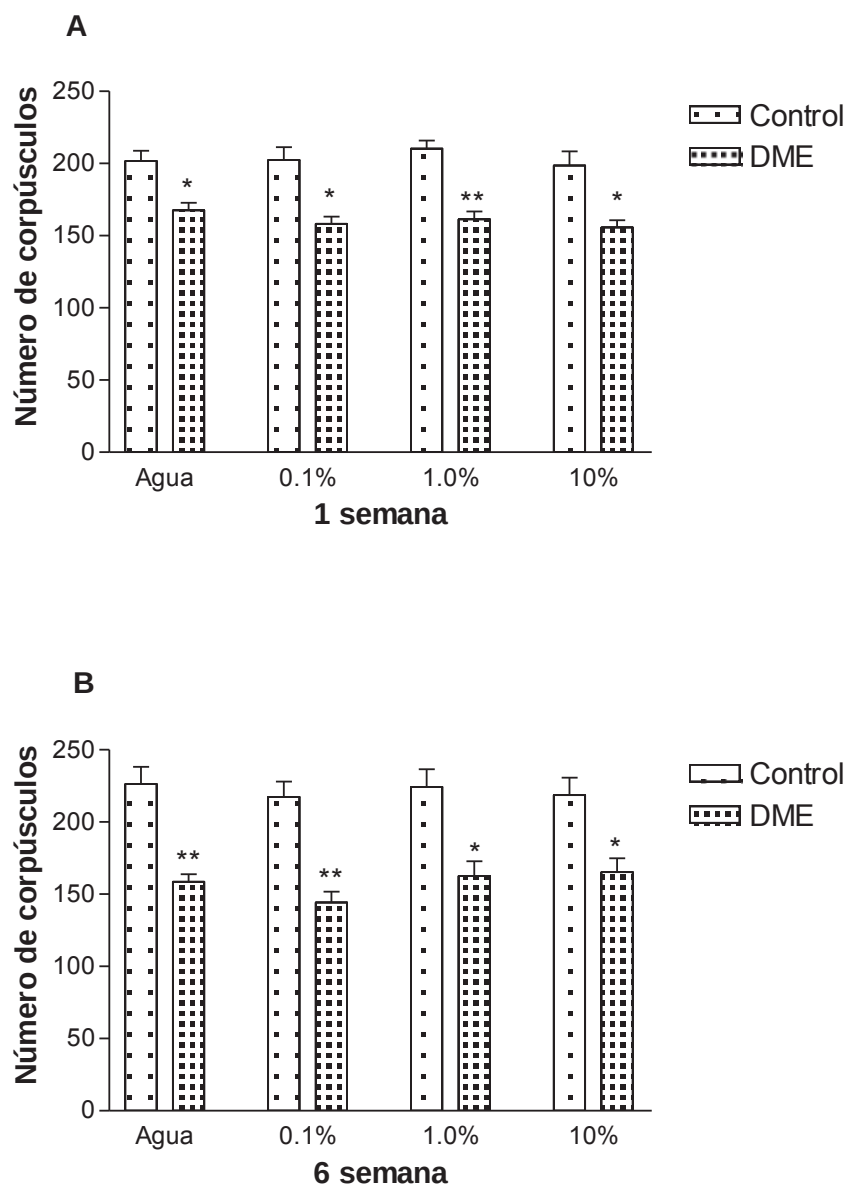


Figura 15. Número corpúsculos gustativos en la papila caliciforme.

Número de corpúsculos gustativos en la papila caliciforme de ratas con DME y ratas control que ingirieron diferentes soluciones de sacarosa al 0.1%, al 1.0% y al 10%) a la primera (A) y sexta semana (B) después de la inducción de la DME.. Los datos muestran la $\bar{X} \pm E.E.$ con $n=3$ para (A) y $n=3$ para (B). * $P<0.05$, ** $P<0.001$.

DISCUSIÓN

En la literatura existen reportes de modelos de Diabetes Mellitus utilizando la estreptozotocina (STZ), que es ampliamente utilizada para la inducción de DME en diversos animales (Chatzigeorgiou, 2009; Rees, et al., 2004) ya que tiene la capacidad de destruir selectivamente las células β del páncreas. La muerte de las células β pancreáticas anula la liberación de insulina al torrente sanguíneo y con esto se elevan los niveles de glucosa en sangre (Bennett, 1981; Kwon, et al., 1994; Szkudelski, 2001; Lenzen, 2008). En el presente estudio se empleó una dosis única de 55mg de STZ por Kg de peso, con la cual a las 48 h de haberse inyectado a las ratas, se observó un incremento de glucosa en sangre en el grupo de las ratas con DME, este incremento se mantuvo hasta la sexta semana en que se sacrificaron los animales. Aunado a la hiperglicemia, en la DM se presentan otros síntomas característicos de esta enfermedad como son: la polidipsia, la polifagia, así como una disminución en el peso corporal (Powers, 2006). Nuestros resultados muestran un incremento significativo en el consumo total de líquidos (botella con agua + botella con solución de sacarosa) en el grupo de las ratas con DME comparado con los respectivos controles y se observó, además, que las ratas diabéticas y controles consumieron una mayor cantidad de líquidos totales mientras más concentrada fue la solución de sacarosa, esto, debido a que los animales consumieron una mayor cantidad de solución de sacarosa mientras más concentrada fue ésta. Los animales con DME mostraron, también, un mayor consumo de alimento comparados con el grupo control, en el caso del consumo de alimento en el grupo control tanto como en el diabético los animales que ingirieron la solución de sacarosa al 10% consumieron una menor cantidad de alimento debido al aporte calórico de la solución a esta concentración, tanto a la primera como a la sexta semana posteriores a la inducción de DME. Por otro lado, los animales diabéticos disminuyeron de peso significativamente con respecto a los animales control, los cuales, tuvieron un incremento de peso entre la primera y la sexta semana, mientras que el grupo con DME no tuvo una ganancia significativa de peso durante las seis semanas que se mantuvieron en experimento antes de su sacrificio para la disección de la papila caliciforme. Estos datos que coinciden

con los reportados en experimentos donde la STZ fue utilizada en ratas como modelo de DME (Junod, et al., 1969; Yang, et al., 2002; Usuki, et al., 2007).

Como otra de las manifestaciones de la DM se ha reportado que existe una elevación del umbral gustativo de soluciones dulces en pacientes con diagnóstico de diabetes de tipo I y II (Le Floch et al., 1989, 1990; Stolbova et al., 1999). En relación a la preferencia de soluciones dulces sobre el agua en la prueba de dos bebederos existe un aumento en la preferencia, de las ratas del grupo diabético, por las soluciones del 0.1% y 1.0% comparado con las ratas del grupo control, lo cual, sugiere que los animales diabéticos presentan una disminución de sensibilidad gustativa aumentando el nivel umbral para este sabor. En el caso de la solución de 10% las ratas diabéticas muestran una menor preferencia que las ratas control, contrario a lo que ocurrió para el caso de las otras dos soluciones, esta disminución puede deberse al efecto postingestional que tiene la sacarosa sobre el metabolismo de las ratas diabéticas, este efecto, quizá pueda eliminarse, en estudios posteriores utilizando pruebas en las cuales las ratas tengan un acceso a las soluciones por una menor cantidad de tiempo, o bien, usando otro edulcorante como la sacarina que no tengan aporte calórico (Chen, 2010). Aunque podemos notar que para las tres soluciones las ratas diabéticas consumen una mayor cantidad de azúcar que se muestra desde la primera semana de inducción de la DME este mayor consumo de soluciones azucaradas puede favorecer la ingesta de alimentos ricos en azúcares y como consecuencia favorecer el incremento de la hiperglicemia como se ha visto en otro estudio, en el cual las ratas aún siendo prediabéticas presentan una mayor ingesta de sacarosa y otros compuestos dulces sin que su patrón de consumo de compuestos ácidos, salados y amargos se encuentre afectado (Hajnal et al., 2005).

Por otro lado el sistema gustativo a nivel periférico está formado por papilas que contienen corpúsculos, en los cuales se encuentran las células gustativas que contienen los receptores para las diferentes modalidades gustativas (Lindemann, 2001; Sugita, 2006) este sistema está implicado en la detección de los alimentos y se ha reportado que el estado fisiológico de los animales provoca cambios en la sensibilidad del sistema gustativo a los estímulos,

salado, ácido, amargo, umami y dulce en el caso de la DM, estas alteraciones pueden ocurrir en diferentes niveles de la vía de transmisión de las señales gustativas como en las células gustativas (Huang, 2009), otras investigaciones señalan que cambios en el estado metabólico pueden modular la sensibilidad gustativa, de esta manera en la obesidad y en la restricción alimenticia se ha observado que el sistema gustativo tiene la capacidad de cambiar la expresión de genes como el receptor T1R3, el receptor OB-Rb y la proteína G, acoplada a los receptores de sabor dulce, amargo y umami, Gustducina. Sbe ha encontrado que estos cambios en el perfil de expresión de dichos genes puede modificar su plasticidad de acuerdo a los requerimientos energéticos de un organismo (Chen, 2010). La percepción gustativa es modulada por acción hormonal, adaptaciones nutricionales y por las fibras nerviosas, el hecho de que el aumento en el umbral de detección del gusto azucarado en los pacientes diabéticos este correlacionado con la severidad de la neuropatía periférica, sugiere que la ageusia en la Diabetes podría ser el resultado de la degeneración de las fibras gustativas y/o de la atrofia de las papilas gustativas y esto puede tener como consecuencia cambios en la expresión de receptores del gusto azucarado en ratas con DME (Le Floch et al., 1992). La transducción de la señal gustativa comienza con la unión del ligando con su receptor en las células gustativas de los corpúsculos, en este caso particular, el estímulo dulce se activa por la unión de los diferentes endulzantes como la sacarosa con el receptor heterodimérico formado por las proteínas T1R2 Y T1R3 (Lindemann, 2001., Nelson et al., 2001). En el presente estudio se encontró que la expresión del mRNA del receptor esta disminuida significativamente con respecto al grupo control, se observó que existe una disminución significativa en la expresión de T1R2 para las tres soluciones de sacarosa a la primera semana posterior a la inducción, y para la sexta semana se puede ver, que, las ratas diabéticas presentan una disminución significativa con respecto a las ratas control, y en ambos grupos se observa que a mayor concentración de sacarosa, mayor es la expresión relativa de T1R2, esto puede deberse a que los animales, ya en este punto, han pasado 6 semanas ingiriendo la solución de sacarosa correspondiente, lo cual nos habla de que el receptor es inducido por su ligando como se había encontrado en otro estudio (Ren et. al., 2009). Lo mismo podemos encontrar para la subunidad T1R3 del receptor, que se

encuentra disminuido significativamente en su expresión en el grupo diabético comparado con el grupo control para las tres distintas soluciones a la primera y a la sexta semana posteriores a la administración de la STZ. Esta disminución en la expresión del receptor T1R2/T1R3 sugiere que el aumento en el umbral gustativo, observado por la mayor preferencia por las soluciones al 0.1% y 1.0%, en las ratas diabéticas puede estar relacionado con la reducción significativa de los mRNA de las subunidades T1R2 y T1R3 del receptor en la papila caliciforme lo cual concuerda con la mayor ingesta de soluciones dulces que presentan estos animales.

Este receptor T1R2/T1R3 se encuentra en las células gustativas que están dentro de los corpúsculos gustativos, estos a su vez los podemos observar en las papilas gustativas que de acuerdo a su morfología se clasifican en tres, de entre las cuales, la papila caliciforme contiene aprox. el 50% de los corpúsculos gustativos (Buck, 2000), que son la unidad funcional del sistema gustativo a nivel periférico, en el caso de nuestro experimento se encontró que las papilas caliciformes de las ratas diabéticas contienen un menor número de corpúsculos que las controles. A la primera semana se observó una disminución significativa en el número de corpúsculos gustativos, al igual que la sexta semana donde encontramos el mismo patrón. Las ratas controles mostraron un incremento en el número de corpúsculos de la primera a la sexta semana, lo cual es normal en animales control, mientras que para el grupo de ratas con DME no se observaron cambios entre la primera y la sexta semana posteriores a la administración de la STZ, resultado similar a lo encontrado por Man-Hui, P. et al., (2006), estudio en el que se muestra una disminución gradual en la innervación, que apoya que la disminución en el número de corpúsculos se puede deber a la neuropatía diabética que ataca las fibras nerviosas en el corpúsculo. Esta disminución en la innervación y su consecuente impacto sobre la plasticidad del sistema gustativo, puede deberse a la hiperglicemia que provoca cambios en el metabolismo general de las células y en las fibras nerviosas ocasiona la glicosilación de proteínas (Wautier, 2001), el incremento en la producción de poliol, la hiperactivación de la PKC y la producción de especies reactivas de oxígeno (Díaz-Flores, et al. 2004).

En la DM existe un aumento en la ingesta de alimento (Powers, 2006) y con la disminución en la expresión de receptores T1R2 y T1R3 los individuos con DM pueden consumir más cantidad de alimentos dulces para lograr el estímulo azucarado. Este cambio en el umbral gustativo se debe por otra parte a cambios metabólicos derivados de la falta de secreción de insulina que provoca una disminución en la liberación de la leptina (Kieffer, et al., 2000) que causa una alteración de las señales que intervienen en la regulación de la saciedad. Los cambios en la regulación en el consumo de alimentos dulces están relacionados con el estatus nutricional de los individuos y además de estar relacionados con la expresión de receptores gustativos, están relacionados con la expresión de moléculas orexigénicas como el Neuropéptido Y (NPY) la proteína relacionada con el Agoutí (AGRP) y anorexigénicas como la Proopiomelanocortina (POMC). Cuando hay una disminución en el nivel de Leptina, la expresión de NPY y AGRP aumentan con lo cual aumenta el apetito. La disminución de la Leptina provoca también una disminución en la POMC, lo cual disminuye la señal de saciedad. Y con esto el incremento en el consumo de alimentos (Cuppies, 2005; Schwartz et al. 2005; Quo-Qing et al. 2005; Andrews et al. 2008; Mounien et al. 2010).

CONCLUSIÓN

En la DM disminuye la expresión del receptor T1R2/T1R3 en la papila caliciforme de la rata y el número de corpúsculos gustativos en la misma y, esto puede ser parte del mecanismo por el cual en la DM se altera la percepción gustativa por las soluciones dulces.

LITERATURA CITADA

- Abbasi, A.A. 1981. Diabetes: diagnostic and therapeutic significance of taste impairment. *Geriatrics*. 36:73-78.
- Adler, E., Hoon, M.A., Mueller, K.L., Chandrashekar, J., Ryba, N.J., Zuker, C.S. 2000. A novel family of mammalian taste receptors. *Cell*. 100:693-702.
- American Diabetes Association. 2003. Report of the expert committee on the diagnosis and classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care*. 26:S5-S20.
- Andrews, Z.B., Horvarth, T.L. 2008. Tasteless Food Reward. *Neuron*. 57:806-808.
- Avenet, P., Lindemann, B. 1991. Noninvasive recording of receptor cell action potentials and sustained currents from single taste buds maintained in the tongue: the response to mucosal NaCl and amiloride. *J. Membr. Biol.* 124:33-41.
- Behrens, M., Meyerhof, W. 2006. Bitter taste receptors and human bitter taste perception. *Cell Mol. Life. Sci.* 63:1501-1509.
- Bennett, R.A., Pegg, A.E. 1981. Alkylation of DNA in Rat Tissues following Administration of Streptozotocin. *Cancer Research* 41:2786-2790.
- Bigiani, A. 2001. Mouse taste cells with glia-like membrane properties. *J. Neurophysiol.* 85:1552-1560.
- Boughther, J.G. 1998. Amiloride Blocks Acid Responses in NaCl-Best Gustatory Neurons of the Hamster Solitary Nucleus. *J Neurophysiol.* 80:1362-1372.
- Bradley RM, Cheal ML, Kim YH. 1980. Quantitative analysis of developing epiglottal taste buds in Sheep. *J Anat* 130, 25-32
- Buck, L.B. 2000. Smell and Taste: The Chemical senses. En: Kandel, E. R., Schwatz, J.H., Jessell T.M. *Principles of Neural Sciences*, McGraw Hill, pp. 625-647.
- Casper, R.C., Kirschner, B., Sandstead, H.H., Jacob, R.A. and Davis, J.M. 1980. An evaluation of trace metals, vitamins, and taste function in anorexia nerviosa. *Am. J. Clin. Nutr.* 33:1801-1808.
- Chandrashekar, J., Mueller, K.L., Hoon, M.A., Adler, E., Feng, L., Guo, W., Zuker, C.S., Ryba, N.J.P. 2000. T2R function as bitter taste receptor. *Cell* 100:703-711.
- Chatzigeorgiou, A., 2009. The use of animal models in the study of Diabetes Mellitus. *In Vivo*. 23: 245-258.
- Chen, K., Yan, J., Suo, Y., Li, J., Wang, Q., Lv, B. 2010. Nutritional status alters saccharin intake and sweet receptor mRNA expression in rat taste buds. *Brainresearch*. 1325:53 – 62

Clapp, T.R., Yang, R., Stoick, C.L., Kinnamon, S.C., and Kinnamon, J.C. 2004. Morphologic characterization of rat taste receptor cells that express components of the phospholipase C signaling pathway. *J. Comp. Neurobiol.* 468:311-321.

Cummings, S.T., Kinnamon, S.C. 1992. Apical K⁺ channels in *Necturus* taste cells. Modulation by intracellular factors and taste stimuli. *J. Physiol.* 99:591-613.

Cuppies, W.A. 2005 Physiological regulation of food intake. *Am. J. Physiol. Integr. Comp. Physiol.* 288:R1438-R1443.

Damak, S., Rong, M., Yasumatsu, K., Kokrashvili, Z., Varadarajan, V., Zou, S., Jiang, P., Ninomiya, Y., Margolskee, R.F. 2003. Detection of sweet and umami taste in absence of taste receptor T1r3. *Science.* 301:850-853.

Deems, D.A., Doty, R.L., Settle, R.G., Moore-Gillon, V., Shaman, P., Mester, A.F., Kimmelman, C.P., Brightman, V.J., Snow, J.B Jr. 1991. Smell and taste disorders, a study of 750 patients from the University of Pennsylvania Smell and Taste center. *Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.* 117:519-528.

Díaz-Flores, M.; Bayza-Gutman, L. A., Ibáñez-Hernández, M.A., Pascoe-Lira, D., Guzmán-Greenfel A.M., Kumate Rodríguez, J. 2004. Aspectos moleculares del daño tisular inducido por la hiperglucemia crónica. *Gac. Med. Mex.* 140 (4):439-447.

Shamah-Levy T, Villalpando-Hernández S, Rivera-Dommarco JA. Resultados de Nutrición de la ENSANUT 2006. Cuernavaca, México: Instituto Nacional de Salud Pública, 2007.

Hajnal, A., Covasa, M., Bello N.T. 2005. Altered taste sensitivity in obese, prediabetic OLETF rats lacking. CCK-1 receptors. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 289: R1675–R1686.

Harris-Maureen, I. 2003. Definición y Clasificación de la diabetes mellitus y criterios actuales para el diagnostico. En . LeRoith D., Taylor S. I., Olefsky J. M *Diabetes Mellitus fundamentos y clínica.* Mc Graw Hill. Pág. 406-414.

Hoon, M.A., Adler, E., Lindemeier, J., Battey, J.F., Ryba, N.J., Zuker, C.S. 1999. Putative mammalian taste receptors: a class of taste-specific GPCRs with distinct topographic selectivity. *Cell.* 96:541-551.

Huang, A.L., Chen, X., Hoon, M.A., Chandrashekar, J., Guo, W., Trankner, D., Ryba, N.J., Zuker, C.S. 2006. The cells and logic for mammalian sour taste detection. *Nature.* 442:934-938.

Huang, T., Stähler, F. 2009. Effects of dietary Na⁺ deprivation on epithelial Na⁺ channel (ENaC), BDNF, and TrkB mRNA expression in the rat tongue. *BMC Neuroscience.* 10:19.

Junod, A., Lambert, A.E., Stauffacher, W., Renold, A.E. 1969. Diabetogenic action of streptozotocin: relationship of dose to metabolic response. *J. Clin. Invest.* 48:2129-2139.

- Kieffer, T.J., Habener, J.F. 2000. The adipoinsular axis: effects of leptin on pancreatic b-cells. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 278:E1–E14.
- Kwon, N.S., Lee S.H., Choi C.S., Kiio, T., Lee H.S. 1994. Nitric oxide generation from streptozotocin. *FASEB Journ.* 8:529-533 530.
- Lawson, W.B., Zeidler, A., Rubenstein, A. 1979. Taste detection and preferences in diabetics and their relatives. *Psychosom. Med.* 3:219-227.
- Le Floch, J.P., Le Lievre, G., Labroue, M., Peynegre, R., Perlemuter, L. 1992. Early detection of diabetic patients at risk of developing degenerative complications using electric gustometry: a five-year follow-up study. *Eur J Med.* 1(4):208-214
- Le Floch, J.P., Le Lievre, G., Sadoun, J., Perlemuter, L., Peynegre, R., Hazard J. 1989. Taste impairment and related factors in type I diabetic patients. *Diabetes Care.* 12:173-178.
- Le Floch, J.P., Le Lievre, G., Verroust, J., Philippon, C., Peynegre, R., Perlemuter, L. 1990. Factors related to the electric taste threshold in type 1 diabetes mellitus. *Diabet. Med.* 7:526-531.
- Lenzen, S. 2008. The mechanisms of alloxan - and streptozotocin – induced diabetes. *Diabetologia* 51:216–226.
- Li, X., Staszewski, L., Xu, H., Durick, K., Zoller, M., Adler, E. 2002. Human receptors for sweet and umami taste. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99:4692-4696.
- Lindemann, B. 1996. Taste reception. *Physiol. Rev.* 76:718-766.
- Lindemann, B. 2001. Receptors and transduction in taste. *Nature.* 413:219-225.
- Man-Hui, P., Tsui-Ling, K., Hsiu-Chu, C. 2006. Effects of streptozotocin-induced diabetes on taste buds in rat vallate papillae. *Acta Histochemica.* 109:200-207.
- Mattes, R.D., Cowart, B.J. 1994. Dietary assessment of patients with chemosensory disorders. *J. Am. Diet. Assoc.* 94:50-56.
- Max, M., Shanker, Y.G., Huang, L., Rong, M., Liu, Z., Campagne, F., Weinstein, H., Damak, S., Margolskee, R.F. 2001. Tas1r3, encoding a new candidate taste receptor, is allelic to the sweet responsiveness locus. *Sac. Nat. Genet.* 28:58-63.
- Meyerhof, W. 2005. Elucidation of mammalian bitter taste. *Rev. Physiol, Biochem. Pharmacol.* 154:37-72.
- Miller, S.M., Naylor, G.J. 1989. Unpleasant taste--an neglected symptom in depression. *J. Affect. Disord.* 17:291-293.
- Montmayeur, J.P., Liberles, S.D., Matsunami, H., Buck, L.B. 2001. A candidate taste receptor near a sweet taste locus. *Nat. Neurosci.* 4:492-498.

Mounien, L., Marty, N., Tarussio, D., Metref, S., Genoux, D., Preitner, F., Foretz, M., Thorens, B. 2010. Glut-2-dependent glucose-sensing controls thermoregulation by enhancing the leptin sensitivity of NPY and POMC neurons. *FASEB Journal*. 24:1-12.

Murray, R.G. 1986. The mammalian taste bud type III cell: a critical analysis. *J. Ultrastruct. Mol. Struct. Res.* 95:175-188.

Nelson, G., Chandrashekar, J., Hoon, M.K., Feng, L., Ryba, N.J., Zuker, C.S. 2002. An amino-acid taste receptor. *Nature*. 416:199-202.

Nelson, G., Hoon, M.K., Chandrashekar, J., Zhang, Y., Ryba, N.J.P., Zuker, C.S. 2001. Mammalian sweet taste receptor. *Cell*. 106:381-390.

Powers-Alvin C. 2006. Diabetes mellitus. En: Kasper Dennis L., Fauci Anthony S., Longo Dan L., Braunwald Eugene., Hauser Stephen L., Jameson J.Larry. *Harrison Principios de medicina interna*. Mc Graw Hill. Pág 2367-2383.

Purves, Dale. 2001. *Invitación a La Neurociencia*. Editorial Medica Panamericana. 611 pp.

Quo-Qing, C., Karatayev, O., Davydova, Z., Wortley, K., Leibowitz, S.F. 2005. Glucose injection reduces neuropeptide Y and agouti-related protein expression in the arcuate nucleus: A possible physiological role in eating behavior. *Molecular Brain Research*. 135:69-80.

Ramos, H.G., Domingo, J. 1994. Diabetes mellitus experimental. *Ciencia veterinaria*, 6: 348-371.

Rees, D.A., Alcolado, J.C. 2005. Animal models of diabetes mellitus. *Diabetes UK. Diabetic. Medicine*. 22:359-370.

Ren, X., Zhou, L., Terwilliger, R., Newton, S.S., de Araujo, I.E. 2009. Sweet taste signaling functions as a hypothalamic glucose sensor. *Front. Integr. Neurosci.* 3,12

Schelling, J.L., Tetreault, L., Lasagnas, L., Davis, M., Schelling, J.L. 1965. Abnormal taste threshold in diabetes. *Lancet*. 19:508-512.

Schwartz, M.W., Porte, D. 2005. Diabetes, Obesity and the Brain. *Science*. 307:375-379.

Scott, K. 2004. The sweet and bitter of mammalian taste. *Curr. Opin. Neurobiol.* 14:423-427.

Stolbova, K., Hahn, A., Benes, B., Andel, M., Treslova, L. 1999. Gustometry of diabetes mellitus patients and obese patients. *Int. Tinnitus. J.* 5:135-140.

Sugita, M. 2006. Taste perception and coding in the periphery. *Cell. Mol. Life Sci.* 63:2000–2015.

Szkudelski, T. 2001. The Mechanism of Alloxan and Streptozotocin Action in B Cells of the Rat Pancreas. *Physiol. Res.* 50:536-546.

- Usuki S., Ito Y., Morikawa K., Kise M., Ariga T, Rivner M., Yu R. 2007. Effect of pre-germinated brown rice intake on diabetic neuropathy in streptozotocin-induced diabetic rats. *Nutrition & Metabolism*. 4:1-11.
- Wautier, J.L., Guillausseau P.J. 2001. Advanced glycation end products, their receptors and diabetic angiopathy, *Diabetes Metab*. 27:535-42.
- Wild, S., Bchir, M.B., Gojka, R., GREEN, A., Sicree, R., King, H. 2004. Gloval prevalence of diabetes, Estimates for the year 2000 and projections for 2030 *Diabetes Care*. 27:5, 1047-1053.
- Winkler, S., Garg, A.K., Mekayarajjananonth, T., Bakaeen, L.G., Khan, E. 1999. Depressed taste and smell in geriatric patients. *J. Am. Den. Asso*. 130:1759-1765.
- Wong, G.T., Gannon, K.S., Margolskee, R.F. 1996. Transduction of bitter and sweet taste by gustducin. *Nature*. 381:796-800.
- Yan, W., Sunavala, S., Rosenzweig, S., Dasso, M., Brand, J.G., Spielman, A.I. 2001. Bitter taste transduced by PLC β_2 dependent rise in IP $_3$ and alpha-gustducin-dependent fall in cyclic nucleotides. *Am. Physiol. Cell Physiol*. 280:C742-C745.
- Yang, H., Wright, J.R. 2002. Human β Cells Are Exceedingly Resistant to Streptozotocin in vivo. *Endocrinology*. 143:2491-2495.
- Yang, R., Crowley, H.H., Rock, M.E., Kinnamon, J.C. 2000b Taste cells with synapses in rat circumvallate papillae display SNAP-25 like immunoreactivity. *J. Comp. Neurol*. 424:205-215.
- Yang, R., Stoick, C.L., Kinnamon, J.C. 2004. Synaptobrevin-2-like immunoreactivity is associated with vesicles at synapses in rat circumvallate taste buds. *J. Comp. Neurol*. 417:59-71.
- Yang, R., Tabata, S., Crowley, H.H., Margolskee, R.F., Kinnamon, J.C. 2000a. Ultrastructural localization of gustducin immunoreactivity in microvilli of type II taste cell in the rat. *J. Comp. Neurol*. 425:139-151.
- Yee, C.L., Yang, R., Bottger, B., Finger, T.E., Kinnamon, J.C. 2001. "Type III" cells of rat taste buds: immunohistochemical and ultrastructural studies of neuron-specific enolase, protein gene product 9.5, and serotonin. *J. Comput. Neurol*. 440:97-108.
- Zhang, Y., Hoon, M.A., Chandrashekar, J., Mueller, K.L., Cook, B., Wu, D., Zuker, C.S., Ryba, N.J. 2003. Coding of sweet, bitter, and umami taste: different receptor cell sharing similar signaling pathways. *Cell*. 112:293-301.