



# UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO



PROGRAMA INSTITUCIONAL DE MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS  
ÁREA TEMÁTICA DE BIOTECNOLOGÍA ALIMENTARIA

FACULTAD DE QUÍMICO FARMACOBIOLOGÍA  
LABORATORIO DE NEUROBIOLOGÍA

TESIS

“EXPRESIÓN DEL ARNm DE LOS RECEPTORES 5-HT<sub>1A</sub>, 5-HT<sub>2B</sub> Y 5-HT<sub>3</sub> EN  
EL CEREBRO Y LA PAPILA CALICIFORME DE RATAS CON DIABETES  
MELLITUS EXPERIMENTAL”

QUE PRESENTA:

**Q.F.B. MARTHA ANGÉLICA SALGADO CHÁVEZ**

PARA OBTENER EL GRADO DE:

**MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

DIRECTOR DE TESIS

**D.C. ROSALIO MERCADO CAMARGO**

MORELIA, MICHOACÁN, AGOSTO DEL 2011

**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.**

**ESTE PROYECTO FUE PARCIALMENTE APOYADO POR: CIC-U.M.S.N.H. (2011) Y POR CONACyT (CVU 330025)**

## **DEDICATORIAS**

**A MI PADRE**

**A MI MADRE**

**A MI HERMANA**

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Dr. Rosalio Mercado Camargo

Por su infinita paciencia, todos sus consejos e incondicional apoyo para la realización de este trabajo

Al los revisores de este trabajo

Dr. Jorge Hernández Rodríguez

Dr. Hector Eduardo Martínez flores

Dr Alejandra Ochoa Zarzosa

Dr. Joel Edmundo López Meza

Dr. Daniel Godines

Por las sugerencias y aportaciones para la realización de este trabajo.

A mis Compañeros y Amigos

Blanca, Roberto, Susana, Luis, Jaime, Cesar, Gustavo y Pablo

Por su gran apoyo para la realización de este trabajo

# ÍNDICE

	<b>Página</b>
I. ÍNDICE DE FIGURAS.....	iii
II. ÍNDICE DE TABLAS.....	iv
III. LISTA DE ABREVIATURAS.....	v
IV. RESUMEN.....	1
V. ABSTRACT.....	3
VI. INTRODUCCIÓN.....	5
VI.1. DIABETES MELLITUS.....	5
VI.1.1. CLASIFICACIÓN DE LA DIABETES MELLITUS.....	6
VI.1.2. DIABETES MELLITUS TIPO 1.....	7
VI.1.3. DIABETES MELLITUS TIPO 2.....	7
VI.1.4. DIABETES MELLITUS GESTACIONAL.....	8
VI.1.5. OTROS TIPOS DE DIABETES MELLITUS.....	9
VI.1.6. DIABETES MELLITUS EXPERIMENTAL (DME).....	9
VI.1.7. COMPLICACIONES CRÓNICAS DE LA DIABETES MELLITUS.....	10
VI.2. SISTEMA GUSTATIVO.....	12
VI.2.1. MODALIDADES GUSTATIVAS.....	13
VI.2.2. NEUROANATOMÍA DEL SISTEMA GUSTATIVO.....	14
VI.2.3. PAPILAS GUSTATIVAS.....	16
VI.2.4. CORPÚSCULOS GUSTATIVOS.....	17
VI.2.5. COMUNICACIÓN CELULAR EN EL CORPÚSCULO GUSTATIVO.....	18
VI.3. SISTEMA SEROTONINÉRGICO.....	20
VI.3.1. RECEPTORES SEROTONINÉRGICOS.....	22
VI.3.2. RECEPTOR 5-HT <sub>1</sub> .....	23
VI.3.3. RECEPTOR 5-HT <sub>2</sub> .....	24
VI.3.4. RECEPTOR 5-HT <sub>3</sub> .....	25
VI.3.5. RELACIÓN SEROTONINA-SISTEMA GUSTATIVO.....	26
VII. JUSTIFICACIÓN.....	27

VIII. HIPÓTESIS .....	28
IX. OBJETIVO GENERAL .....	28
X. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	28
XI. MATERIALES Y MÉTODOS .....	29
XI.1. ANIMALES.....	29
XI.2. INDUCCIÓN DE DIABETES MELLITUS EXPERIMENTAL.....	29
XI.3. OBTENCIÓN DE TEJIDOS .....	29
XI.4. OBTENCIÓN DE ARN TOTAL .....	30
XI.4.1. CUANTIFICACIÓN DE ARN TOTAL.....	31
XI.4.2. REACCIÓN DE TRANSCRIPCIÓN REVERSA (RT) .....	31
XI.4.3. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR).....	32
XI.4.4. SELECCIÓN DE LOS OLIGONUCLEÓTIDOS .....	33
XI.4.5. VALIDACIÓN DEL CONTROL INTERNO .....	34
XI.4.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	35
XII. RESULTADOS.....	36
XII.1. CONCENTRACIÓN DE GLUCOSA EN SANGRE .....	36
XII.2. PESO CORPORAL.....	37
XII.3. VALIDACIÓN PARA EL CONTROL INTERNO $\beta$ -ACTINA. ....	38
XII.4. VALIDACIÓN DE OLIGONUCLEÓTIDOS DEL RECEPTOR 5-HT <sub>1A</sub> . ....	40
XII.5. EXPRESIÓN DEL RECEPTOR 5-HT <sub>1A</sub> EN LA PAPILA CALICIFORME. ....	42
XII.6. EXPRESIÓN DEL RECEPTOR 5-HT <sub>1A</sub> EN LA CORTEZA CEREBRAL.....	43
XII.7. VALIDACIÓN DE OLIGONUCLEÓTIDOS DEL RECEPTOR 5-HT <sub>2B</sub> .....	44
XII.8. EXPRESIÓN DEL RECEPTOR 5-HT <sub>2B</sub> EN LA PAPILA CALICIFORME. ....	46
XII.9. EXPRESIÓN DEL RECEPTOR 5-HT <sub>2B</sub> EN EL CEREBELO. ....	47
XII.10. VALIDACIÓN DE OLIGONUCLEÓTIDOS DEL RECEPTOR 5-HT <sub>3</sub> .....	48
XII.11. EXPRESIÓN DEL RECEPTOR 5-HT <sub>3</sub> EN LA PAPILA CALICIFORME. ....	50
XII.12. EXPRESIÓN DEL RECEPTOR 5-HT <sub>3</sub> EN EL TALLO CEREBRAL.....	51
XIII. DISCUSIÓN .....	52
XIV. CONCLUSIONES.....	58
XV. BIBLIOGRAFÍA .....	59

# I. ÍNDICE DE FIGURAS

## Página

FIGURA 1 Organización neuroanatómica del sistema gustativo en mamíferos. ....	15
FIGURA 2 Papilas Gustativas .....	16
FIGURA 3 Corpúsculo gustativo .....	18
FIGURA 4 Comunicación célula-célula en el corpúsculo gustativo. ....	19
FIGURA 5 Síntesis de serotonina. ....	21
FIGURA 6 Vía de Señalización del receptor 5-HT <sub>1A</sub> . ....	24
FIGURA 7 Concentración de glucosa en sangre. ....	36
FIGURA 8 Peso corporal de las ratas. ....	37
FIGURA 9. Productos de amplificación del gen de $\beta$ -actina en la papila caliciforme. ....	38
FIGURA 10. Productos de amplificación del gen de $\beta$ -actina en la papila caliciforme, corteza cerebral, cerebelo y tallo cerebral. ....	39
FIGURA 11 Productos de amplificación del receptor 5-HT <sub>1A</sub> en corteza cerebral y papila caliciforme. ....	41
FIGURA 12 Expresión relativa del ARNm del receptor 5-HT <sub>1A</sub> con respecto a $\beta$ -actina en la papila caliciforme. ....	42
FIGURA 13 Expresión relativa del ARNm del receptor 5-HT <sub>1A</sub> en Corteza cerebral. ....	43
FIGURA 14 Productos de amplificación del receptor 5-HT <sub>2B</sub> en cerebelo y papila caliciforme. ....	45
FIGURA 15 Expresión relativa del ARNm del receptor 5-HT <sub>2B</sub> en la papila caliciforme. ....	46
FIGURA 16 Expresión relativa del ARNm del receptor 5-HT <sub>2B</sub> en cerebelo. ....	47
FIGURA 17 Productos de amplificación del receptor 5-HT <sub>3</sub> en tallo cerebral y papila caliciforme. ....	49
FIGURA 18 Expresión relativa del ARNm del receptor 5-HT <sub>3</sub> en la papila caliciforme. ....	50
FIGURA 19 Expresión relativa del ARNm del receptor 5-HT <sub>3</sub> en tallo cerebral. ....	51

## II. ÍNDICE DE TABLAS

	<b>Página</b>
Tabla 1 Familias y subtipos de receptores serotoninérgicos.....	22
Tabla 2 Condiciones de reacción para la RT.....	32
Tabla 3 Condiciones de reacción para PCR.....	33
Tabla 4 Secuencias de los oligonucleótidos específicos para los receptores 5-HT <sub>1A</sub> , 5-HT <sub>2B</sub> y 5-HT <sub>3</sub> .....	34
Tabla 5 Secuencias de los oligonucleótidos específicos para la amplificación del gen de la β-actina.....	35

### III. LISTA DE ABREVIATURAS

5-HT	5-Hidroxitriptamina o serotonina
ACh	Acetilcolina
ACTH	Hormona adrenocorticotropa
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario
AMPc	Monofosfato de adenosina cíclico
ARN total	Ácido ribonucleico total
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
ATP	Trifosfato de adenosina
Cbp	Cuanto baste para
CG	Células gustativas
CRH	Hormona liberadora de corticotropina
D.E	Desviación estándar
DI	Decilitro
DLAA	Descarboxilasa de aminoácidos aromáticos
DM	Diabetes Mellitus
DM1	Diabetes mellitus tipo 1
DM2	Diabetes mellitus tipo 2
DME	Diabetes mellitus experimental
DMG	Diabetes mellitus Gestacional
DNasa	Desoxirribonucleasa
g	Gramo
GPCR	Receptores acoplados a proteínas G
GTP	Guanosin trifosfato
h	Horas

i.p.	Intraperitoneal
Kg	kilogramo
L-5-HTP	L-5-hidroxitriptófano
M.M	Marcador de peso molecular
mg	Miligramos
mL	Mililitro
mM	Milimolar
NE	Norepinefrina
°C	Grado Celsius
OD	Densidad óptica
p.b	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PKA	Protein Kinasa A
RNasa	Ribonucleasa
RT	Transcripción reversa
RT-PCR polimerasa	Transcriptasa reversa seguida de una reacción en cadena de la polimerasa
SNC	Sistema nervioso central
SNP	Sistema Nervioso Periférico
STZ	Estreptozotocina
TA	Temperatura ambiente
TPH	Triptófano hidroxilasa
U	Unidad
UV	Ultravioleta
X	Media
μl	Microlitro

## IV. RESUMEN

La diabetes mellitus es una enfermedad metabólica caracterizada por hiperglucemia crónica. Se han reportado cambios en la percepción gustativa en pacientes con diabetes mellitus. La sensación del gusto es detectado en células gustativas que se agrupan en corpúsculos gustativos localizados en las papilas gustativas que son estructuras especializadas en la cavidad oral. En las papilas gustativas se ha demostrado la presencia de serotonina y de receptores serotoninérgicos (5-HT<sub>1A</sub>, 5-HT<sub>2B</sub> y 5-HT<sub>3</sub>). Los receptores 5-HT<sub>1A</sub> están localizados en las células de tipo II en donde no se sintetiza serotonina y este receptor tiene una amplia distribución en la corteza cerebral. Los receptores 5-HT<sub>3</sub> se expresan en las fibras aferentes gustativas y están involucrados en la transmisión de las modalidades gustativas dulce, amargo, umami, salado y ácido, una serie de estudios han demostrado la distribución de los receptores 5-HT<sub>3</sub> en el tallo cerebral. Por último, el receptor 5-HT<sub>2B</sub> se expresa ampliamente en el cerebelo, así como en la periferia, y se ha implicado en los fenómenos de diferenciación celular. La hiperglucemia crónica, se asocia con disfunción y fallo de diversos órganos, especialmente los ojos, riñones, nervios, corazón, páncreas, vasos sanguíneos, el cerebro y el sistema gustativo. Hasta la fecha no hay reportes sobre la expresión de los receptores serotoninérgicos en el cerebro y la papila caliciforme en la diabetes mellitus, por lo que, el objetivo del presente trabajo fue determinar por RT-PCR la expresión del ARNm de los receptores 5-HT<sub>1A</sub>, 5-HT<sub>2B</sub> y 5-HT<sub>3</sub> en la papila caliciforme, la corteza cerebral, cerebelo y tallo cerebral en ratas con diabetes mellitus experimental. Los resultados mostraron una disminución en la expresión del ARNm del receptor 5-HT<sub>1A</sub> en la corteza cerebral, mientras que en la papila caliciforme no hubo diferencia significativa en la expresión con respecto al grupo control. En relación con el receptor 5-HT<sub>2B</sub> se observó un incremento en el ARNm en la papila caliciforme y sólo en la octava semana de inducción de la diabetes mellitus experimental se observó disminución en la expresión del ARNm del receptor 5-HT<sub>2B</sub> en el cerebelo. La expresión del

ARNm del receptor 5-HT<sub>3</sub> en la papila caliciforme mostró regulación a la alta y en el tallo cerebral mostró regulación a la baja. Estos resultados nos sugieren que los cambios diferenciales en la expresión de los receptores serotoninérgicos en la diabetes mellitus crónica podría ser un mecanismo compensatorio con el fin de mantener la transducción de las señales gustativas.

Palabras clave: Sistema gustativo, serotonina, Regulación.

## V. ABSTRACT

Diabetes mellitus is a metabolic disease characterized by chronic hyperglycemia. There are reports of changes in the taste perception in patients with diabetes mellitus. Taste sensation is transduced in secondary sensory cells located at the taste buds which are specialized structures in the oral cavity. In the taste buds have been observed the presence of serotonin and serotonin receptors such as 5-HT<sub>1A</sub>, 5-HT<sub>2B</sub> and 5-HT<sub>3</sub>. The 5-HT<sub>1A</sub> receptors are located in type II cells which not synthesized serotonin and also have widely distribution in the cerebral cortex. The 5-HT<sub>3</sub> receptors are expressed in gustatory afferent fibers and is involved in the transmission of tastes modalities such as sweet, sour, umami, salt and bitter, a number of studies have mapped the distribution of 5-HT<sub>3</sub> receptor expression in the brainstem. Finally, the 5-HT<sub>2B</sub> receptor is widely expressed in the cerebellum as well as in the periphery, and it has involved in the cell differentiation phenomena. The chronic hyperglycemia is associated with long-term damage, dysfunction and failure of different organs, especially the eyes, kidneys, nerves, heart, pancreas, blood vessels, brain and gustative system. Actually there are not reports about the expression of 5-HT receptors in the brain and taste buds in the Diabetes Mellitus, so, the aim of the present work was to determined by RT-PCR the expression of mRNA of the 5-HT<sub>1A</sub>, 5-HT<sub>2B</sub> and 5-HT<sub>3</sub> receptors in the circumvallate papillae, cerebral cortex, cerebellum and brainstem of rats with experimental diabetes mellitus. The results showed down regulation of the expression of the mRNA 5-HT<sub>1A</sub> receptor in the cerebral cortex of rats with DME in the papillae circumvallate of the experimental group were there not significantly difference from the control group. In relation with 5-HT<sub>2B</sub> receptor, we observed an up regulation of the expression in the circumvallate papillae and only at eight week of diabetes mellitus induction we observe a down regulation expression in cerebellum. The expression of the mRNA of 5-HT<sub>3</sub> receptor showed an up regulation in circumvallate papilla and down regulation expression in brainstem. These results suggest us that the differential changes in the expression of the 5-HT

receptors in chronically diabetes mellitus are a compensatory mechanism in order to maintain the transduction of the gustatory signals.

Key Words: Down regulation, Up regulation, Diabetes mellitus, Gustatory system, Serotonin.

## VI. INTRODUCCIÓN

La Diabetes Mellitus (DM) es un problema grave de salud pública, debido a que ha aumentado su incidencia y prevalencia. En México, el registro realizado por la Encuesta Nacional de Salud 2000 estimó que existen alrededor de 3.6 millones de mexicanos mayores de 20 años que padecen DM; con prevalencia del 7.5%, ligeramente mayor en las mujeres que en los hombres a partir de los 50 años. En 1980 ocupó el noveno lugar como causa de muerte, para colocarse a finales de los 90 en el tercero, actualmente es la primera causa de muerte en nuestro país (Díaz *et al.*, 2004). Las alarmantes cifras de pacientes con DM se asocian a un cambio en la alimentación y disminución de la actividad física cotidiana, esto contribuye a un prevalente incremento de las personas que desarrollan obesidad que es un factor importante para desarrollar DM (Bottino and Trucco, 2005).

### VI.1. DIABETES MELLITUS

La DM es una enfermedad metabólica caracterizada por hiperglucemia. Las causas de la hiperglucemia son por una acción deficiente de la insulina que pueden originarse de una inadecuada secreción de insulina y/o una disminuida respuesta de los tejidos en uno o más puntos en la compleja vía de la acción de esta hormona, o en ambas; lo que conduce a un síndrome caracterizado por alteraciones del metabolismo de carbohidratos, proteínas y lípidos (ADA, 2010).

La insuficiencia en la secreción de insulina se debe a la disfunción de células  $\beta$  del páncreas o a la destrucción de estas células  $\beta$  por una reacción inmunitaria, que es mediada por anticuerpos y por reacciones celulares (Seino *et al.*, 2010).

La Resistencia a la insulina o la acción defectuosa de la insulina se produce cuando un nivel normal de insulina produce una respuesta fisiológica debajo de lo normal. El músculo esquelético y el hígado son dos de los órganos responsables de la respuesta primaria a la insulina, para mantener la homeostasis de la glucosa normal. La insulina normalmente disminuye el nivel de glucosa en sangre a través de la supresión de la producción hepática de glucosa y la estimulación de la captación de glucosa periférica, una disfunción en cualquier paso de este proceso puede dar lugar a resistencia a la insulina (Maiese *et al.*, 2007).

La DM presenta síntomas característicos como poliuria (aumento de excreción urinaria), polidipsia (necesidad de tomar agua), polifagia (aumento del apetito), visión borrosa, pérdida de peso, deterioro del crecimiento y susceptibilidad a ciertas infecciones (ADA, 2010).

La hiperglucemia en la mayoría de los pacientes con una larga evolución de la enfermedad desencadena complicaciones como retinopatía con pérdida potencial de la visión; la nefropatía que conduce a la insuficiencia renal; neuropatía periférica con riesgo de úlceras en los pies, amputaciones, síntomas cardiovasculares y disfunción sexual. Los pacientes con diabetes tienen una mayor incidencia de aterosclerosis cardiovascular, enfermedad cerebrovascular, también se presentan a menudo hipertensión y anormalidades del metabolismo de las lipoproteínas (ADA, 2010).

### **VI.1.1. CLASIFICACIÓN DE LA DIABETES MELLITUS**

En 1997 la Asociación Americana de Diabetes dio a conocer un nuevo criterio para el diagnóstico y clasificación de la DM (Kahan, 1997), la gran mayoría de los casos corresponde a dos clases principales: Diabetes Mellitus tipo 1 y Diabetes mellitus tipo 2 (ADA, 2010).

Existen varios tipos de DM debidos a una compleja interacción entre factores ambientales, genéticos y elecciones respecto al modo de vida.

1. Diabetes mellitus tipo 1 (DM1)
2. Diabetes mellitus tipo 2 (DM2)
3. Diabetes mellitus Gestacional
4. Otros tipos específicos de diabetes mellitus

### **VI.1.2. DIABETES MELLITUS TIPO 1**

La DM1 corresponde a un 5 y 10% de los casos de DM. Es la más frecuente en niños y adolescentes por lo que se denomina diabetes mellitus juvenil o de inicio juvenil (Deneman, 2006). La DM1 es consecuencia de la destrucción de las células  $\beta$ , con desaparición casi completa de la secreción de insulina y deficiencia insulínica absoluta. Se distinguen dos subclases, una variedad autoinmunitaria y otra idiopática. La variedad autoinmunitaria es una enfermedad crónica con un periodo prodrómico subclínico que se caracteriza por destrucción autoinmunitaria de las células  $\beta$  productoras de insulina en los islotes pancreáticos. La velocidad y la magnitud de la destrucción de las células betas son variables (Harris-Maureen, 2003).

### **VI.1.3. DIABETES MELLITUS TIPO 2**

La DM2 es un grupo heterogéneo de trastornos que se suelen caracterizar por grados variables de resistencia a la insulina, trastornos de la secreción de ésta y aumento de la producción de glucosa, este tipo de diabetes comprende alrededor del 90% de todos los diabéticos del mundo occidental.

La causa de la DM2 se desconoce, se ha propuesto que tiene una base genética importante por su patrón familiar frecuente, su prevalencia tan alta en determinados grupos étnicos y los estudios de mezclas genéticas. Aún no se conocen los genes que originan la mayor parte de los casos de DM2. Es probable que las causas de la DM2 sean factores ambientales y del estilo de vida que se adicionan a la predisposición genética. Uno de los factores más importantes es la obesidad, puesto que entre 50 y 90% de pacientes con DM2 son obesos. La obesidad cursa además con resistencia a la insulina, un factor importante en la patogenia de la mayoría de los pacientes con este tipo de diabetes. 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 y el de la rubéola (Powers-Alvin, 2006).

#### **VI.1.4. DIABETES MELLITUS GESTACIONAL**

La Diabetes mellitus Gestacional (DMG) consiste en la presencia de hiperglucemia en ayuno o intolerancia a la glucosa moderada durante el embarazo. Del 2 al 5 % de las embarazadas presentan DMG, su frecuencia es mayor conforme avanza la edad y en las mujeres con sobrepeso. Las mujeres con DMG tienen mayor riesgo de desarrollar DM2 después del embarazo (Harris-Maureen, 2003).

### **VI.1.5. OTROS TIPOS DE DIABETES MELLITUS**

Esta variedad Representa entre el 1 y el 2 % de los casos de síndrome diabético, comprende un grupo causal heterogéneo que abarca los casos de diabetes en que las causas no se establecen o 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, cambios pancreáticos medicamentosos o químicos, enfermedades y situaciones en que la frecuencia de la diabetes se eleva en grado considerable, sin embargo, aún no se ha establecido una causa precisa (Harris-Maureen, 2003).

### **VI.1.6. DIABETES MELLITUS EXPERIMENTAL (DME)**

Los modelos animales han contribuido enormemente en el estudio de la diabetes mellitus, debido a que se tiene la oportunidad de controlar en vivo los factores genéticos y ambientales que pueden influir en el desarrollo de la enfermedad y el establecimiento de sus complicaciones, y así obtener nueva información sobre su manejo y tratamiento en seres humanos. La mayoría de los experimentos se llevan a cabo en roedores, a pesar de que otras especies con características biológicas similares a las humanas también se utilizan. Los modelos animales desarrollan diabetes, ya sea espontáneamente o mediante el uso de químicos, técnicas quirúrgicas, genéticas o de otro tipo y muestran muchas características clínicas o fenotipos asociados a la enfermedad (Chatzigeorgiou *et al.*, 2009).

En 1889, Von Mering y Minkowski produjeron diabetes experimental en un perro mediante la remoción quirúrgica del páncreas. El animal desarrolló poliuria y

polidipsia por lo cual concluyeron que el animal presenta Diabetes mellitus (Rees and Alcolado, 2005). Desde entonces, la pancreatectomía total se usa en muchas especies, con el propósito de crear modelos experimentales. En el perro y el gato se presenta un síndrome diabético clínicamente inestable, en animales como los conejos, cabras, cerdos, ovinos, monos, aves y peces sólo se presenta un estado diabético caracterizado por glucosuria moderada y cetonuria variable (Ramos and Domingo, 1994).

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. Existen varias clases de agentes químicos, los más utilizados son el aloxano y la estreptozotocina, estos compuestos son sustancias con citotoxicidad específica que destruyen a las células  $\beta$  del páncreas y causan un estado de deficiencia absoluta de insulina. La inducción de diabetes mellitus experimental en ratas mediante el uso de estos químicos es muy conveniente y de uso simple (Ramos and Domingo, 1994; Szkudelski, 2001).

La estreptozotocina es un citotóxico preferentemente de las células beta del páncreas ya que es estructuralmente análogo de la glucosa y el transportador de glucosa GLUT2 le permite el paso a la célula beta donde se acumula. Después de su absorción en las células beta, la estreptozotocina se divide en glucosa y una fracción metilnitrosourea. La molécula metilnitrosourea tiene propiedades alquilantes, éste modifica macromoléculas biológicas, los fragmenta al ácido desoxirribonucleico (ADN) y destruye las células beta, causando un tipo de diabetes insulino dependiente (Lenzen, 2008).

### **VI.1.7. COMPLICACIONES CRÓNICAS DE LA DIABETES MELLITUS**

Las complicaciones crónicas de la Diabetes mellitus pueden afectar muchos órganos y son responsables de gran parte de la morbilidad y mortalidad que acompaña a este trastorno. Las complicaciones crónicas pueden dividirse en

vasculares y no vasculares. Las complicaciones vasculares se dividen en microvasculares, cuando se afectan los pequeños vasos (retinopatía, neuropatía, y nefropatía) y macrovasculares, cuando están involucrados capilares, vénulas y arterias (Cardiopatía isquémica, enfermedad vascular periférica y enfermedad cerebro vascular). Las complicaciones no vasculares comprenden problemas como disfunción sexual y afecciones de la piel (Powers-Alvin, 2006). El riesgo de las complicaciones crónicas aumenta con la duración de la hiperglucemia; suelen hacerse evidentes en el transcurso del segundo decenio de la hiperglucemia, por ello las primeras complicaciones crónicas de la DM son el resultado de las reacciones químicas y de la activación o alteración del metabolismo causado por el exceso de glucosa (Díaz *et al.*, 2004). Estas complicaciones se pueden provocar mediante cinco mecanismos principales, acumulación y acción de los productos de glicación avanzada, incremento de la actividad del sorbitol, aumento en la vía de las hexosamínas, activación de diversas isoformas de la proteína cinasa C y aumento del estrés oxidativo (Díaz *et al.*, 2004; Browniee, 2001). La hiperglucemia crónica se asocia con daño a largo plazo, disfunción y fallo de diversos órganos, especialmente los ojos, riñones, nervios, corazón, páncreas, vasos sanguíneos, el cerebro y el sistema gustativo (ADA, 2010).

El cerebro es también un órgano afectado por las complicaciones crónicas causadas por la diabetes, originando daño cerebral. La Diabetes produce adaptaciones fisiológicas de la barrera hemato-encefálica (BHE), cambios en el transporte de glucosa, el flujo sanguíneo cerebral y el metabolismo, que puede producir una encefalopatía crónica (McCall, 1992). Un mecanismo de deterioro cognitivo se ha relacionado con la obesidad y DM2 (De la Monte, 2009). La hiperglucemia se ha descrito como un factor importante para los daños del SNC disminuyendo la actividad monoaminérgicos como resultado de la degeneración neuronal en las diferentes regiones del cerebro (McCall, 2002). Cambios en la concentración del neurotransmisor y en la unión al receptor han sido descritos en algunas áreas del cerebro de la rata, en particular en la diabetes

inducida por estreptozotocina se disminuye la concentración de serotonina en la corteza y el tallo cerebral de la rata (Sandrini *et al.*, 1997; Manjarréz *et al.*, 2006).

La diabetes mellitus también afecta la percepción gustativa, el cambio sensorial más constante incluye alteraciones en el umbral de percepción del sabor de la glucosa en los pacientes diabéticos no insulino dependientes, en la que se ha observado que la hipogeusia aumenta conforme la neuropatía avanza (Mattes, 2002). La neuropatía de origen diabético es un cuadro heterogéneo que incluye muy diversas disfunciones y cuya aparición podría atribuirse a la propia diabetes mellitus o a los factores vinculados con ella (Vinik *et al.*, 2003), por lo cual se cree que el sistema gustativo presenta alteración en la percepción de los sabores.

En pacientes con diabetes mellitus se ha documentado la pérdida del gusto (ageusia) o disminución (disgeusia), y de hecho, la neuropatía periférica se asocia con trastornos del gusto (Le Floch *et al.*, 1989). 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 a la atrofia de las papilas gustativas (Le Floch *et al.*, 1992). En la Diabetes Inducida por estreptozotocina, también se reduce el número de corpúsculos gustativos en la papila caliciformes de la rata (Pai *et al.*, 2006).

## **VI.2. SISTEMA GUSTATIVO**

Los seres humanos disponemos de cinco sistemas sensoriales; el olfato, el gusto, el tacto, el oído y la vista, los cuales generan una representación interna del ambiente que nos rodea, así como nos previenen de los distintos peligros a los que estamos expuestos. Todos los sentidos son importantes porque gracias a que trabajan en conjunto podemos tener esta representación lo más exacta posible. El sistema gustativo permite percibir los estímulos gustativos para discriminar los

alimentos, seleccionar una dieta nutritiva, con el fin de mantener el equilibrio de energía. Para la mayoría de mamíferos, la decisión de ingerir un determinado alimentos depende no sólo de su sabor, sino también de su apariencia, familiaridad, olor, textura, la temperatura y sobre todo, sus efectos después de ser ingeridos, por ejemplo la capacidad de reducir el hambre. Variaciones en las preferencias gustativas se pueden deber a diferencias genéticas en los receptores gustativos y pueden tener importantes consecuencias en la selección de alimentos, nutrición y salud (Chaudhari and Roper, 2010). El sabor se refiere a la amplia variedad de percepciones que se experimentan al comer, percepción de los olores y los estímulos gustativos (salado, amargo, dulce, ácido y umami) producida durante la masticación, además de las sensaciones producidas por la textura, la temperatura y la astringencia (picante) de los alimentos (Marks and Wheeler, 1998; Simon *et al.*, 2006).

### **VI.2.1. MODALIDADES GUSTATIVAS**

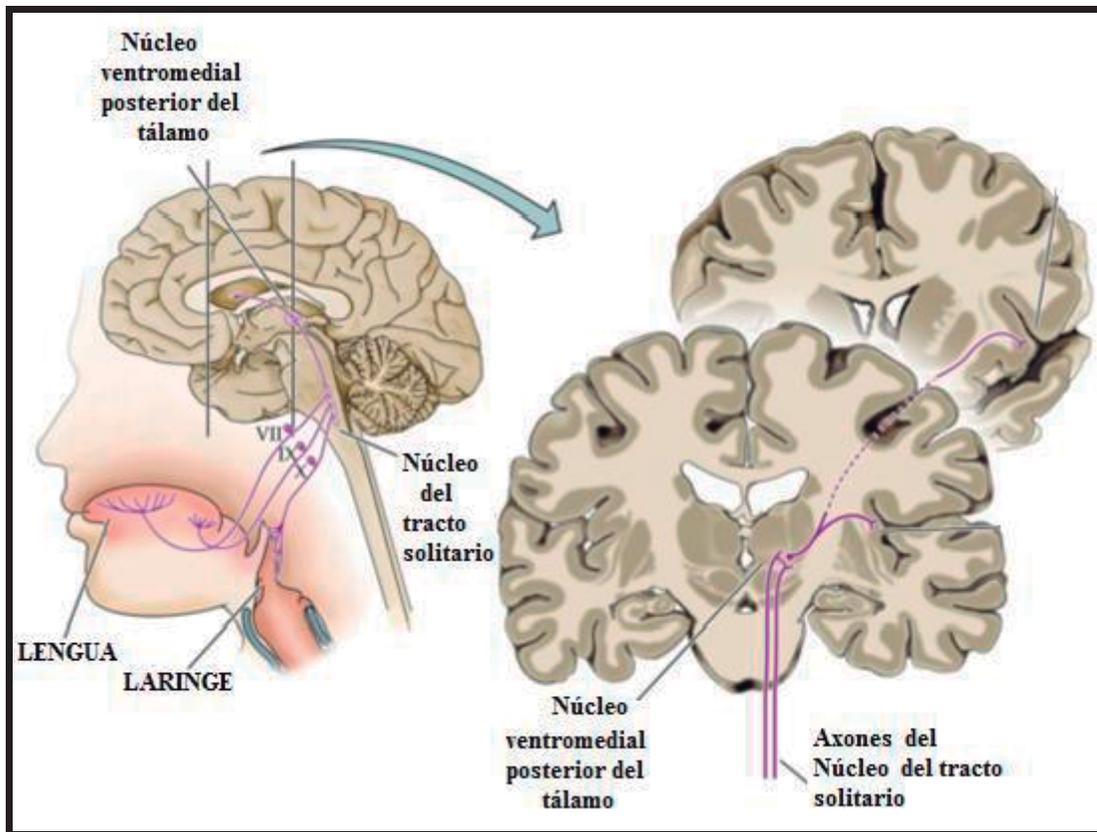
Los estímulos gustativos han sido clasificados en modalidades gustativas tales como dulce, salado, ácido, amargo y umami. El salado se dedica a la detección de minerales para mantener la homeostasis de iones y el agua. El umami detecta los aminoácidos tales como el glutamato monosódico, que es una agradable sensación gustativa que detecta las proteínas contenidas en los alimentos. Las modalidades gustativas dulces, saladas y umami tienen generalmente un papel apetitivo en la ingesta de los alimentos. En contrasté el amargo y ácido principalmente median señales de aversión. El ácido sirve para detectar la madurez de frutas y la comida en estado de descomposición. El amargo es importante para detectar compuestos tóxicos tales como alcaloides de plantas. El dulce es esencial para la percepción de carbohidratos los cuales son una fuente importante de calorías. Para elucidar estas sensaciones, los compuestos químicos de los alimentos son primero detectados por los receptores

gustativos en la cavidad oral (Yoshida *et al.*, 2006). A nivel molecular, la detección y traducción de los sabores es efectuada por receptores localizados en la superficie de las microvellosidades de la membrana apical de las células gustativas. 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 (GPCR). En el último caso, la estimulación del receptor activa una proteína que tiene la particularidad de fijar el GTP (Guanosin trifosfato), de allí su nombre de proteína G. Esta proteína está constituida de tres subunidades ( $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ ) capaces de activar diversos sistemas de señalización intracelulares. La detección y traducción de los sabores salados y ácidos es efectuada por receptores de tipo canal mientras que los GPCR intervienen en la detección de los sabores dulce, amargo y umami. Las moléculas gustativas de tipo dulce y umami son detectados por los receptores de la familia T1R en combinación distinta, que consiste de los T1R1, T1R2 y T1R3. La modalidad gustativa dulce es detectada por el heterodímero T1R2/T1R3, mientras que el umami es detectado por T1R1/T1R3. En contraste el sabor amargo es detectado por otra familia de receptores T2R, la cual consiste de aproximadamente 30 miembros en mamíferos (Ishimaru and Matsunami, 2009).

## **VI.2.2. NEUROANATOMÍA DEL SISTEMA GUSTATIVO**

El sistema gustativo está integrado por células gustativas, estas células a su vez se agrupan para formar los corpúsculos gustativos, los cuales están formando las papilas gustativas que se localizan en la lengua, el paladar blando, la faringe, la epiglotis, la laringe y el tercio superior del esófago, así como por componentes del sistema nervioso central y periférico que transmiten y decodifican los impulsos eléctricos que se generan en las células gustativas. Estas células gustativas son innervadas por los nervios craneales VII (facial), IX (glossofaríngeo) y X (vago) que

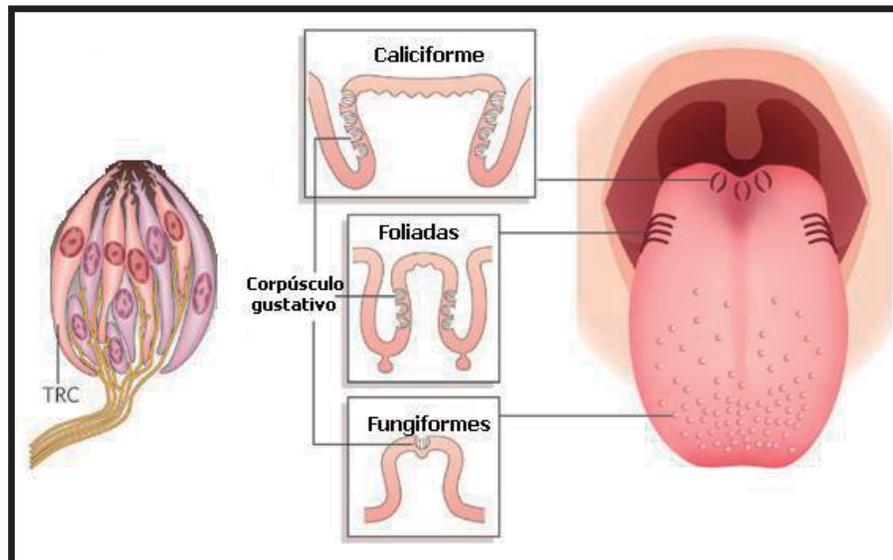
permiten transportar la información gustativa a la corteza gustativa, pasando por el núcleo del tracto solitario, a nivel del tallo cerebral y núcleo ventral posterior del tálamo (Fig.1). Las células gustativas que se localizan sobre el paladar y parte anterior de la lengua son inervadas por la cuerda del timpano y el nervio facial respectivamente. Estos nervios transmiten información sobre la identidad y naturaleza química de los estímulos gustativos. En la epiglotis, el esófago y la parte posterior de la lengua, las células gustativas están inervadas por las ramas de los nervios; glossofaríngeo y vago. Estos nervios participan en la ingestión o rechazo de los estímulos gustativos (Simon *et al.*, 2006).



**FIGURA 1** Organización neuroanatómica del sistema gustativo en mamíferos. Redes neuronales implicadas en la detección e integración de las señales gustativas a nivel del epitelio lingual. Modificacada de: <http://www.rci.rutgers.edu/~uzwiak/AnatPhys/ChemicalSomaticSenses.htm>.

### VI.2.3. PAPILAS GUSTATIVAS

Las papilas gustativas (del latín *papilla* = eminencia), son grupos de células conectadas con fibras nerviosas, se dividen en tres clases diferentes en función de su morfología: fungiforme, caliciforme y foliada (Fig. 2), cada una de ellas está constituida de un número variable de corpúsculos gustativos. Las papilas fungiformes (forma de hongo) se localizan sobre los dos tercios anteriores de la lengua y en el paladar, cada papila fungiforme contiene de 1 a 5 corpúsculos gustativos. Las papilas caliciformes o circunvaladas (forma de botón) se encuentran en el tercio posterior de la lengua formando una línea en V, cada una de ellas rodeada de un surco, el número de este tipo de papilas es de 8-12 en humanos y solo una en el caso de roedores; cada papila contienen de 100 a 250 corpúsculos gustativos; aun siendo un número reducido, estas constituyen el 40% del total de corpúsculos gustativos. Las papilas foliadas (forma de crestas) aparecen como 2 a 9 pliegues en los lados de la tercera parte posterior de la lengua, estas papilas contienen el 30% de los corpúsculos gustativos presentes en la lengua.



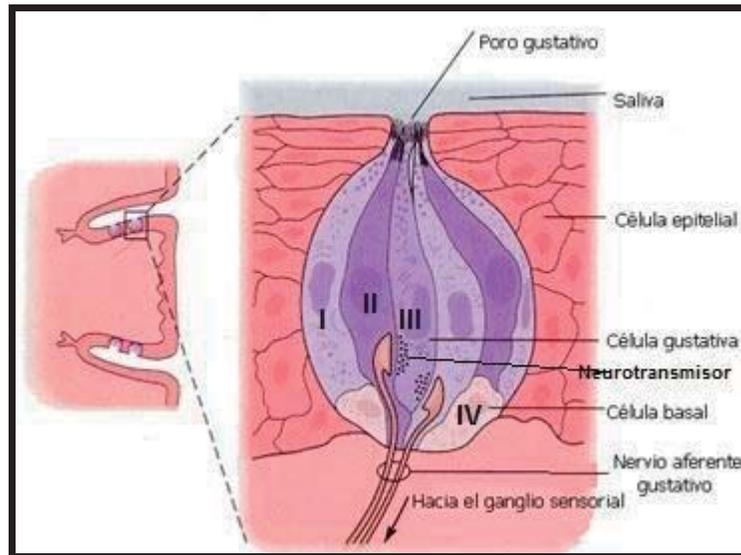
**FIGURA 2 Papilas Gustativas**

Existen tres tipos diferentes de papilas gustativas, las cuales tienen una localización específica en la lengua. (Modificado de: Chandrashekar *et al.*, 2006).

## VI.2.4. CORPÚSCULOS GUSTATIVOS

Los corpúsculos gustativos (Fig. 3) son órganos sensoriales que traducen los estímulos químicos en señales que son transmitidas al sistema nervioso central (SNC) vía fibras aferentes gustativas primarias (Huang *et al.*, 2009). Los corpúsculos gustativos constituyen una población heterogénea de aproximadamente 50 a 150 células gustativas que exhiben propiedades tanto neuronales como epiteliales. Al igual que las neuronas, las células gustativas contienen neurotransmisores y forman sinapsis con las fibras nerviosas, sin embargo, el tiempo de vida de las células gustativas es muy breve y su regeneración es continua aproximadamente en 10 días. Estas células, contenidas en cada corpúsculo gustativo extienden sus microvellosidades hacia la cavidad bucal donde interaccionan con las moléculas sápidas presentes en los alimentos y hacia la base del corpúsculo gustativo en donde establecen contacto sináptico con las fibras que las inervan (Buck, 2000; Lindemann, 2001; Yee *et al.*, 2001). En el interior de cada corpúsculo gustativo (Fig.3) se distinguen cuatro tipos morfológicamente diferentes de células gustativas: las células basales (tipo IV), oscuras (tipo I), claras (tipo II) e intermedias (tipo III) (Suzuki, 2007). Las células basales son pequeñas y redondas se encuentran en la base del corpúsculo gustativo; parecen ser las células precursoras de las que derivan los otros tres tipos celulares. Las células de tipo I, II y III están involucradas en la percepción gustativa, y se caracterizan por su forma bipolar, extendiéndose desde la apertura epitelial del corpúsculo gustativo hasta su base, cada corpúsculo gustativo tiene una pequeña apertura en la superficie del epitelio llamada poro gustativo (Fig. 3). Las células gustativas de tipo I poseen propiedades similares a las células gliales (Bigiani, 2001), esto es, servir de sostén al corpúsculo gustativo y regular las concentraciones extracelulares de iones al interior del corpúsculo. Las células de tipo II o ahora denominadas células receptor debido a que expresan los receptores para la detección y transducción de los estímulos gustativos; dulce, amargo y umami, sin embargo, ellas no forman sinapsis (Defazio *et al.*, 2006). Finalmente,

las células de tipo III (Fig. 3) también denominadas presinápticas, ya que establecen contacto sináptico con las fibras sensoriales, expresan enzimas de síntesis para neurotransmisores aminérgicos (Yee *et al.*, 2001; DeFazio *et al.*, 2006; Dvoryanchikov *et al.*, 2007).



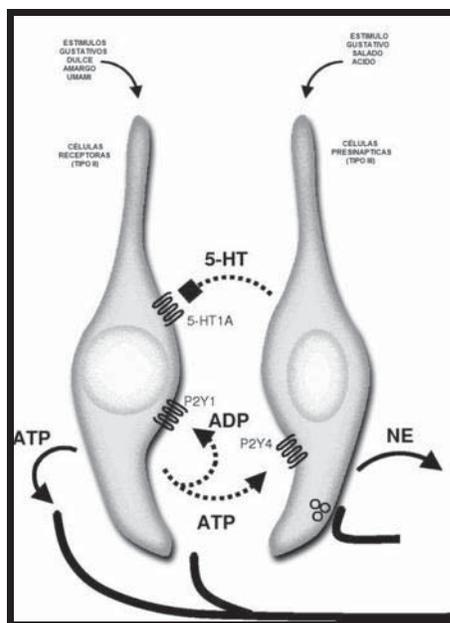
**FIGURA 3 Corpúsculo gustativo**

El corpúsculo gustativo contiene de 50 a 150 células gustativas, que se extienden desde la base del corpúsculo al poro gustativo. En cada corpúsculo existen cuatro tipos de células (I, II, III y IV). (Modificado de: Chandrashekar *et al.*, 2006).

### VI.2.5. COMUNICACIÓN CELULAR EN EL CORPÚSCULO GUSTATIVO

Las células presinápticas, reciben la información proveniente de las células de tipo II para transmitirla a la corteza gustativa vía la liberación de neurotransmisores (Fig. 4), varios han sido los neurotransmisores propuestos para la sinapsis en los corpúsculos gustativos, incluyendo la serotonina (5-HT), norepinefrina (NE), glutamato, acetilcolina, trifosfato de adenosina (ATP) (Nagai *et al.*, 1998; Ogura, 2002; Kaya *et al.*, 2004; Huang *et al.*, 2005a, 2005b, 2007, 2009; Finger *et al.*, 2005; Romanov *et al.*, 2007; Vandenbeuch *et al.*, 2010). Sin embargo, sólo 5-HT, NE y ATP han sido inequívocamente identificados y demostrado ser liberados en los corpúsculos gustativos (Finger *et al.*, 2005; Huang

*et al.*, 2005a, 2005b, 2007, 2008, 2009; Romanov *et al.*, 2007). Cuando las células receptoras son estimuladas por las moléculas gustativas, estas células liberan ATP (Huang *et al.*, 2007; Romanov *et al.*, 2007), mientras que células presinápticas liberan serotonina y noradrenalina (Huang *et al.*, 2005a, 2005b; Huang *et al.*, 2007; Huang *et al.*, 2008, (Fig. 4). Después de la transducción del estímulo gustativo (dulce, amargo, umami), las células de tipo II liberan ATP. El ATP directamente podría activar las fibras aferentes gustativas que se sabe expresan purinorreceptores ionotrópicos, pero también activa los receptores purinérgicos P2Y4 en las células presinápticas. Esto resulta en la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  desde los depósitos intracelulares en las células presinápticas y la posterior liberación de 5-HT en las células presinápticas. La 5-HT Cuando se libera de las células presinápticas se puede unir a las fibras aferentes gustativas primarias que se sabe expresan el receptor 5-HT<sub>3</sub> (Kaya *et al.*, 2004) y ejerce una regulación de tipo parácrino negativo sobre las células receptoras vía la activación del receptor 5-HT<sub>1A</sub> (Heath *et al.* 2006; Huang *et al.*, 2009).



**FIGURA 4 Comunicación célula-célula en el corpúsculo gustativo.**

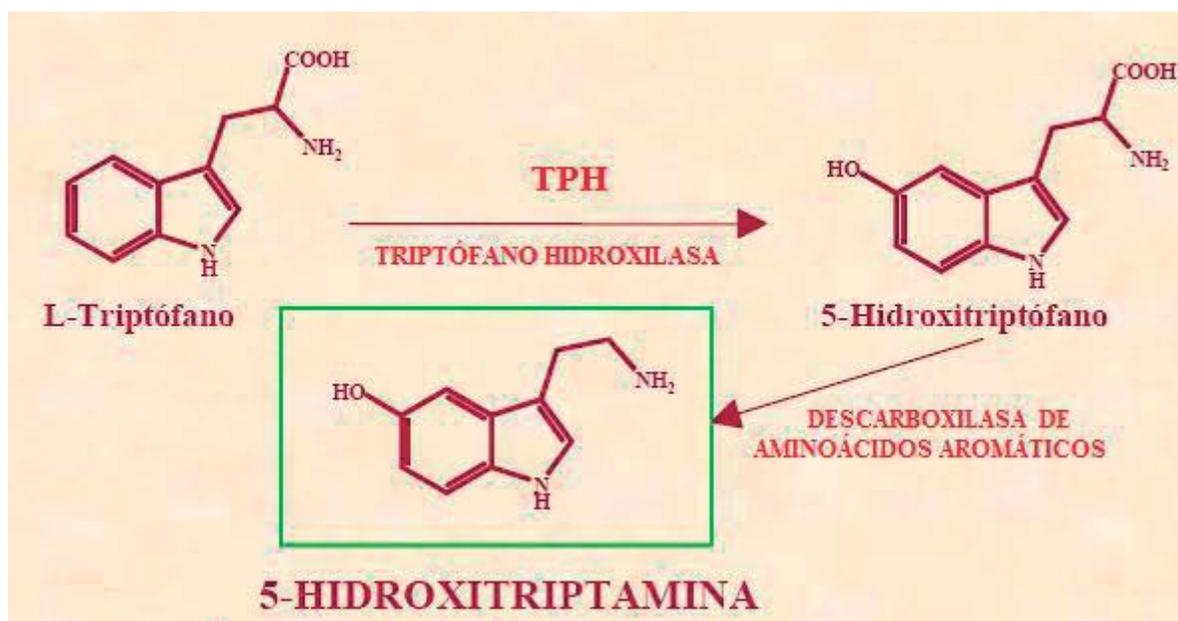
Las células receptoras (Tipo II) secretan ATP en respuesta al estímulo gustativo. El ATP actúa sobre las fibras aferentes, así como en las células presinápticas (Tipo III), vía la activación de los receptores purinérgicos P2Y4, provocando en las células de tipo III la liberación de 5-HT. La 5-HT

se une a los receptores 5-HT<sub>1A</sub> para ejercer una regulación de tipo parácrino negativo (Modificado de: Huang *et al.*, 2009).

### VI.3. SISTEMA SEROTONINÉRGICO

La serotonina (5-hidroxitriptamina, 5-HT) es de las aminas biogénicas más antiguas evolutivamente que actúan como neurotransmisores en el SNC. En 1946 fue aislada de mamíferos como una sustancia en el suero con acciones tónicas sobre el sistema vascular, lo que explica su nombre. Siete años más tarde también se descubrió en el cerebro y posteriormente se caracterizó como neurotransmisor. La serotonina se localiza y sintetiza en las células enterocromafines del tracto gastrointestinal y en las neuronas serotoninérgicas del sistema nervioso central (Mohammad-Zadeh *et al.*, 2008; Filip and Bader, 2009; Polter and Li, 2010). Las neuronas serotoninérgicas están localizadas en el cerebro medio, en los denominados núcleos del Rafé. Estos núcleos, a pesar de que contienen un reducido número de cuerpos neuronales (250,000 neuronas serotoninérgicas en el núcleo dorsal del Rafé de la rata) consiguen una amplia inervación del encéfalo gracias al extraordinario nivel de arborización de sus axones (Oleskevich and Descarries, 1990). Las Proyecciones ascendentes de estas neuronas llegan a todo el cerebro para liberar serotonina de manera parácrina, permitiendo que la serotonina liberada de una terminal pueda activar los receptores de una serie de células postsinápticas que modulan una gran variedad de actividades neuronales (Mohammad-Zadeh, *et al.*, 2008; Filip and Bader, 2009; Polter and Li, 2010).

Para la síntesis de 5-HT (Fig.5) el primero y paso limitante es la hidroxilación del L-triptófano a L-5-hidroxitriptófano (L-5-HTP) catalizada por la triptófano hidroxilasa (TPH), entonces la enzima descarboxilasa de aminoácidos aromáticos (DLAA) convierte al L-5-HTP en la 5-HT (Mohammad-Zadeh *et al.*, 2008).



**FIGURA 5 Síntesis de serotonina.**

La síntesis de la serotonina comienza con el aminoácido esencial triptófano, la enzima triptófano hidroxilasa añade un grupo hidróxido al anillo de benceno del triptófano, formando así la molécula de 5-hidroxitriptófano, otra enzima, la descarboxilasa de aminoácidos aromáticos, elimina el carboxilo del 5-hidroxitriptófano, por consiguiente se forma la serotonina. (Modificada de Mohammad-Zadeh *et al.*, 2008).

La 5-HT es un neurotransmisor implicado en múltiples funciones vitales del organismo. A nivel central, la 5-HT participa en el control de las secreciones neuroendocrinas, en la termorregulación, regulación hormonal, en la conducta sexual, en el estado de ánimo, en la ingesta alimenticia, cambios en este neurotransmisor y la señalización alterada del receptor están implicados en estados patológicos tales como trastornos del estado de ánimo, trastornos de ansiedad, psicosis, trastornos de la ingesta alimenticia (De Matos *et al.*, 2011). A nivel periférico, la serotonina regula la función cardiovascular, la motilidad

intestinal y la agregación plaquetaria durante la coagulación (Mohammad-Zadeh *et al.*, 2008; Filip and Bader, 2009; Polter and Li, 2010).

### VI.3.1. RECEPTORES SEROTONINÉRGICOS

La serotonina como un neurotransmisor actúa a través de receptores de membrana en el SNC y el sistema nervioso periférico (SNP), así como en los tejidos no neuronales, por ejemplo, sistema gastrointestinal, endocrino, cardiovascular y el sistema gustativo, por nombrar algunos (Hannon and Hoyer, 2008). Los receptores serotoninérgicos han sido agrupados en siete familias (5-HT<sub>1</sub>-5-HT<sub>7</sub>) y al menos 15 diferentes subtipos en función de su principal mecanismo de señalización (Tabla 1). La mayoría de estos receptores pertenecen a la familia de los receptores metabotrópicos (señales a través de proteínas G), a excepción de los receptores 5-HT<sub>3</sub> incluidos en la familia de receptores ionotrópicos (canales iónicos), (Filip and Bader, 2009; Van Den Berg *et al.*, 2003). La diversidad en los receptores de serotonina se deriva de las modificaciones transcripcionales, edición del ácido ribonucleico mensajero (ARNm) y splicing alternativo (Polter and Li, 2010).

**Tabla 1 Familias y subtipos de receptores serotoninérgicos.**

Esta tabla Resume las diferentes familias y subtipos de receptores de 5-HT en base a su mecanismo de señalización (Modificado de Filip and Bader, 2009).

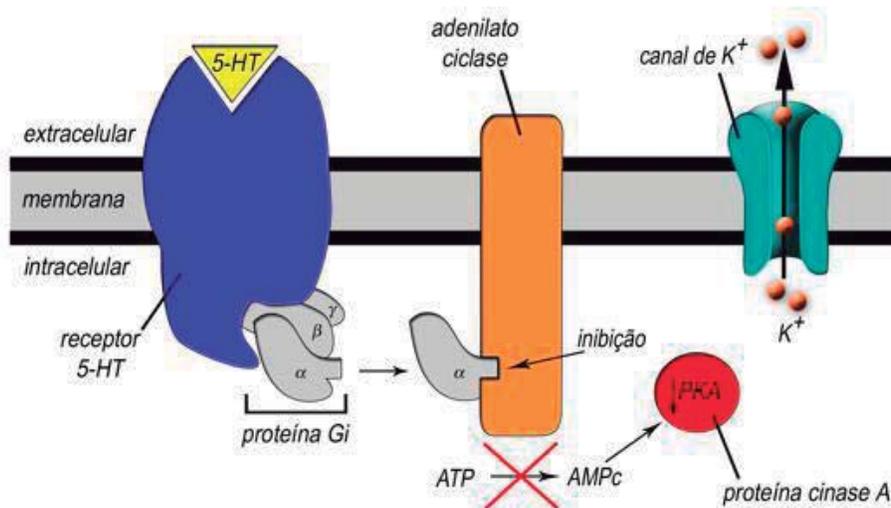
FAMÍLIA	SUBTIPO	MECANISMO DE TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES	SITIOS DE EXPRESIÓN EN EL SNC.
5-HT <sub>1</sub>	5-HT <sub>1A</sub>	G <sub>i/o</sub> AC i	Núcleos de Rafé, Hipocampo, Corteza, Sistema Gustativo
	5-HT <sub>1B</sub>	G <sub>i/o</sub> AC i	Sustancia Nigra, Globo pálido y Ganglios basales,
	5-HT <sub>1D</sub>	G <sub>i/o</sub> AC i	Ganglios basales, hipocampo, corteza.
	5-HT <sub>1E</sub>	G <sub>i/o</sub> AC i	Corteza Cerebral, Putamen

5-HT <sub>2</sub>	5-HT <sub>1F</sub>	G <sub>i/o</sub> AC i	Corteza Cerebral, Hipocampo
	5-HT <sub>2A</sub>	G <sub>q/11</sub> PLC s	Plaquetas, Músculo Liso y Corteza Cerebral
	5-HT <sub>2B</sub>	G <sub>q/11</sub> PLC s	Cerebelo, hipotálamo, Estómago (fondo)
	5-HT <sub>2C</sub>	G <sub>q/11</sub> PLC s	Plexos Coroides, Corteza, Hipocampo y Sustancia Negra
5-HT <sub>3</sub>	5-HT <sub>3A</sub>	Canal iónico	Area Postrema, Nervios sensitivos y entéricos, Tallo cerebral.
	5-HT <sub>3B</sub>	Canal iónico	Area Postrema, Nervios sensitivos y entéricos
5-HT <sub>4</sub>	5-HT <sub>4</sub>	G <sub>s</sub> AC s	Ganglios basales, corteza, hipocampo
5-HT <sub>5</sub>	5-HT <sub>5A</sub>	G <sub>i/o</sub> AC i	Corteza cerebral, Hipocampo, Hipotálamo
	5-HT <sub>5B</sub>	?	Núcleos del Rafé, hipocampo (en roedores)
5-HT <sub>6</sub>	5-HT <sub>6</sub>	G <sub>s</sub> AC s	Hipocampo, corteza
5-HT <sub>7</sub>	5-HT <sub>7</sub>	G <sub>s</sub> AC s	Corteza, Tálamo, hipocampo

### VI.3.2. RECEPTOR 5-HT<sub>1</sub>

La familia del receptor 5-HT<sub>1</sub> comprende el 5-HT<sub>1A</sub>, 5-HT<sub>1B</sub>, 5-HT<sub>1D</sub>, 5-HT<sub>1E</sub> y los receptores 5-HT<sub>1F</sub> que exhiben 40-63% de identidad de secuencia en general, son receptores preferentemente acoplados a proteínas G (G<sub>i/o</sub>) para inhibir la adenilato ciclasa, dando lugar a la disminución de la formación de monofosfato de adenosina cíclico (AMPc) y la actividad de proteína quinasa A (PKA) (Fig. 6) (Filip and Bader, 2009; Polter and Li, 2010; Adayev et al., 2005). Los receptores 5-HT<sub>1A</sub> están acoplados a proteínas G (G<sub>i/o</sub>). El gen del receptor 5-HT<sub>1A</sub> ha sido localizado en el cromosoma humano 5q11.1-q13 y consta de 421 aminoácidos en humanos, 422 aminoácidos en ratón o en rata (Hannon and Hoyer, 2008). Se encuentra ampliamente distribuido en el SNC, los receptores 5-HT<sub>1A</sub> están involucrados en varias funciones fisiológicas, conductuales, cognitivas y en el desarrollo. Entre otros, la estimulación de los receptores 5-HT<sub>1A</sub> facilita la

liberación en el cerebro de acetilcolina (ACh) y NE, así como la hormona liberadora de corticotropina (CRH), la hormona adrenocorticotropa (ACTH) y los niveles de cortisol en la sangre. Por otra parte, la activación de estos receptores provoca la reducción de 5-HT y los niveles de glutamato del cerebro, así como, la disminución de la secreción de la hormona del crecimiento (Finkn and Göthert, 2007; Jørgensen, 2007).



**FIGURA 6 Vía de Señalización del receptor 5-HT<sub>1A</sub>.**

La 5-HT se une a los receptores 5-HT<sub>1A</sub>, donde la subunidad de la proteína Gi se une a la adenilato ciclase para inhibirla. Este mecanismo impide la conversión de ATP a cAMP y la señalización de segundos mensajeros, en el caso de la proteína quinasa A y por lo tanto mantiene abiertos canales de K<sup>+</sup> hiperpolariza la membrana celular. Modificado de Albert *et al.*, 2011

### VI.3.3. RECEPTOR 5-HT<sub>2</sub>

Hasta ahora se han identificado 3 subtipos de receptores 5-HT<sub>2</sub>: 5-HT<sub>2A</sub>, 5-HT<sub>2B</sub> y 5-HT<sub>2C</sub>. Exhiben 46 a 50% de identidad de secuencia general y están acoplados a una proteína G (Gq/11). Está establecido que su activación produce

un aumento en la hidrólisis de fosfoinositol que estimula la acumulación de inositol 1,4,5-trifosfato y la liberación de  $Ca^{2+}$  intracelular a través de la fosfolipasa C (Hannon and Hoyer, 2008). Los receptores 5-HT<sub>2</sub> median muchas de las funciones fisiológicas de la 5-HT a nivel central y periférico. Los efectos cardiovasculares incluyen la contracción de los vasos sanguíneos y en el sistema nervioso central, están implicados en trastornos obsesivo-compulsivos, sueño, aprendizaje, memoria, ansiedad, falta de apetito, depresión, el dolor, la conducta sexual (Choi and Maroteaux, 1996).

Los receptores 5-HT<sub>2A</sub> se encuentran ampliamente distribuidos en la corteza, en algunas áreas del sistema límbico, principalmente en el núcleo olfatorio, y en zonas de los ganglios basales (Hannon and Hoyer, 2008). El receptor 5-HT<sub>2B</sub> su localización en el SNC está limitada a algunas regiones del cerebro incluyendo el cerebelo, septum lateral, el hipotálamo y la amígdala. El gen del receptor 5-HT<sub>2B</sub> se encuentra en el cromosoma 2q36.3-2q37.1 y consta de 481 aminoácidos en los seres humanos, 504 aminoácidos en ratones y 479 aminoácidos en rata. La estimulación de los receptores 5-HT<sub>2B</sub> del cerebro de roedores se ha reportado que evocan los cambios en el comportamiento motor, la conducta emocional (ansiolisis), la ingesta de alimentos (hiperfagia) y la percepción del dolor (Hoyer *et al.*, 2002; Leysen, 2004 ).

#### **VI.3.4. RECEPTOR 5-HT<sub>3</sub>**

Los receptores 5-HT<sub>3</sub> son de tipo canal iónico activado por ligando que pertenecen a la superfamilia Cys-Loop. La activación de los receptores 5-HT<sub>3</sub> en el sistema nervioso central y periférico evoca la excitación neuronal y la liberación de neurotransmisores. En común con todos los miembros de la familia Cys-loop, los receptores 5-HT<sub>3</sub> se ensamblan como un pentámero de subunidades (Barnes *et al.*, 2009). Se han descrito dos subunidades, la 5-HT<sub>3A</sub> y la 5-HT<sub>3B</sub>, aunque en SNC sólo se ha detectado la subunidad A. La activación de este receptor produce

una rápida despolarización debido a la apertura de canales de cationes permeables a  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$ .

### VI.3.5. RELACIÓN SEROTONINA-SISTEMA GUSTATIVO

El sentido del gusto desempeña una función importante en el consumo de alimentos y en la prevención de intoxicaciones. Los principales determinantes del umbral del sabor son genéticos, y los umbrales del sentido del gusto no varían considerablemente de un día para otro. Recientes observaciones de la modulación ambiental o de la plasticidad del sistema gustativo humano, son por lo tanto sorprendentes porque se pensaba que esto no ocurría (Kobayashi and Kennedy, 2002; Kobayashi *et al.*, 2006). Por el contrario, en patologías, los umbrales de sabor son frecuentemente alterados, aunque estas alteraciones del sistema gustativo no suelen ser investigados (Miller and Naylor, 1989). Alteraciones del gusto han sido reportadas en la depresión y la ansiedad, pero ha habido poca investigación del déficit quimiosensorial, lo que parece sorprendente, dado el impacto potencial sobre la calidad de vida (Miller and Naylor, 1989). El estrés inducido en personas normales aumenta la sensibilidad al sabor amargo de la sacarina (Dess and Edelheit, 1998). La depresión es una consecuencia de la disminución en la concentración de las monoaminas en la circulación y por lo tanto la neurotransmisión de NE, dopamina y 5-HT, y/o una reducción de la sensibilidad de sus receptores (Hirschfeld, 2000). Muchos antidepresivos modulan la función de las monoaminas y su uso está asociado con disgeusia (Schiffman *et al.*, 2000). Esta modulación de la función de la monoamina puede tener un impacto en la percepción del gusto y esto puede ser la base para la alteración del gusto, en los trastornos afectivos. La evidencia más fuerte para una participación de 5-HT en la señalización gustativa se encuentra a nivel de la papila gustativa: las células gustativas de tipo III de muchas especies expresan 5-HT, las enzimas que la

sintetizan, sus receptores, y se libera en respuesta a la estimulación de las moléculas gustativas (Nagai *et al.*, 1998; Nada and Hirata, 1975; Kim and Roper, 1995; Clapp *et al.*, 2004; DeFazio *et al.*, 2006; Delay *et al.*, 1997; Huang *et al.*, 2005a,2005b). La 5-HT modula la respuesta en las neuronas gustativas primaria, posiblemente a través de los receptores 5-HT<sub>3</sub> (Zhong *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 2002; Herness and Chen., 1997; Herness and Chen., 2000; Herness *et al.*, 2002).

## VII. JUSTIFICACIÓN

La diabetes mellitus es un problema grave de salud a nivel nacional e internacional, ya que es una de las principales causas de morbilidad debido a la hiperglucemia crónica que desencadena complicaciones. Actualmente la diabetes mellitus es la primera causa de muerte en México. En pacientes con diabetes mellitus se ha documentado que existe una disminución de la percepción de las modalidades gustativas, lo cual puede tener un importante y negativo impacto en la salud general y en la calidad de vida. Estos cambios en la percepción gustativa pueden estar relacionadas con alteraciones en la expresión de los receptores serotoninérgicos a nivel del sistema nervioso central y a nivel del sistema gustativo periférico, específicamente en la papila caliciforme donde se ha reportado la expresión de los mismos, lo cual no se conoce por lo cual planteamos lo siguiente:

## VIII. HIPÓTESIS

En la diabetes mellitus disminuye la expresión del ARNm de los receptores 5-HT<sub>1A</sub>, 5-HT<sub>2B</sub> y 5-HT<sub>3</sub> en cerebro y en la papila caliciforme de rata.

## IX. OBJETIVO GENERAL

Determinar si en la diabetes mellitus experimental disminuye la expresión de los receptores 5-HT<sub>1A</sub>, 5-HT<sub>2B</sub> y 5-HT<sub>3</sub> en el cerebro y en la papila caliciforme de la rata.

## X. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Implementar un modelo de diabetes mellitus experimental en ratas.
- Determinar la expresión de los receptores 5-HT<sub>1A</sub>, 5-HT<sub>2B</sub> y 5-HT<sub>3</sub> en la papila caliciforme y tejido cerebral de ratas con DME.

## **XI. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **XI.1. ANIMALES**

Para nuestro estudio se utilizarón ratas macho adultas de la Cepa Wistar de 8 semanas de edad con un peso de 200-300g. Los animales fueron mantenidos en condiciones ambientales estándar: ciclos de luz–oscuridad de 12 h cada uno (luz de 07:00-19:00 h), humedad relativa de 80% y temperatura de 20- 24°C, con alimentación y agua *ad libitum*.

### **XI.2. INDUCCIÓN DE DIABETES MELLITUS EXPERIMENTAL**

Para la inducción de la DME se inyectó al grupo experimental estreptozotocina (STZ) en dosis única 55 mg/Kg de peso vía intraperitoneal (i.p.), disuelta en solución salina estéril, a otro grupo de ratas se les administró simultáneamente un volumen equivalente del vehículo constituyendo el grupo control. La concentración de glucosa en sangre fue medida antes, a las 48 h posteriores al tratamiento con STZ, así como antes del sacrificio de los animales se les realizó la determinación de la glucosa sanguínea con un glucómetro (One Touch Ultra). También se determinó el peso corporal de las ratas cada semana hasta el sacrifició.

### **XI.3. OBTENCIÓN DE TEJIDOS**

A la primera, cuarta y octava semana de inducción de la DME, se sacrificarón a los animales mediante fractura cervical tanto del grupo control como

del grupo DME, realizando una incisión media torácico exponiendo el corazón para la perfusión en el ventrículo izquierdo con solución salina isotónica fría al 0.9%, para remover la sangre de los tejidos. Las ratas se decapitaron y de inmediato se les extrajo la lengua, para obtener por micro-disección la papila caliciforme, debido al tamaño de la papila caliciforme, se recolectaron 3 papilas caliciforme para la extracción del ARN total y se extrajo el cerebro para disecar el tallo cerebral, el cerebelo y la corteza cerebral de cada tejido cerebral se pasaron 100 µg gramos de tejido y se homogenizaron en TRIZOL<sup>®</sup> (Invitrogen),.

#### **XI.4. OBTENCIÓN DE ARN TOTAL**

La papila caliciforme, el tallo cerebral, el cerebelo y la corteza cerebral se introdujeron en tubos Eppendorf libre de RNasas y DNasas que contenía 1 ml de TRIZOL<sup>®</sup> (Invitrogen), posteriormente se homogeneizaron con ayuda de un mini polytron, se dejó reposar por 5 minutos a temperatura ambiente (TA). El homogeneizado se agitó por 15 segundos y se agregó de 200 µL de cloroformo por cada mililitro de TRIZOL<sup>®</sup> usado para homogeneizar, la mezcla se dejó reposar a TA por 15 minutos y centrifugada a 12, 000 g durante 15 minutos a 4°C, el ARN fue recuperado de la fase acuosa. La fase acuosa recuperada en un tubo nuevo fue tratada con isopropanol (500 µL/mL de TRIZOL<sup>®</sup>), después de la incubación por 10 minutos a TA se centrifugó (12, 000 g) por 10 minutos a 4°C. Después de la centrifugación el sobrenadante fue eliminado y la pastilla depositada en el fondo del tubo se lavó con 1 mL de etanol al 75%. Después de eliminar el etanol el tubo se dejó secar por 10 minutos a TA. Finalmente el ARN fue resuspendido en 20 µL de agua libre de RNasas.

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

#### **XI.4.1. CUANTIFICACIÓN DE ARN TOTAL**

Una vez obtenido el ARN total de cada tejido se procedió a cuantificar el ARN, tomando una dilución 1:100 para cada una de las muestras de los diferentes tejidos en cada tiempo de DME. La cuantificación de ARN total se realizó midiendo la densidad óptica (OD) a 260 nm. Un valor de OD<sub>260</sub> igual a 1 corresponde a 40 µg/mL de ARN total. Para calcular la pureza se midió también el valor de OD a 280 nm. El cociente obtenido a partir de OD<sub>260</sub>/ OD<sub>280</sub> nos proporciona el valor de pureza. Un valor de 1.7-1.9 es aceptable.

#### **XI.4.2. REACCIÓN DE TRANSCRIPCIÓN REVERSA (RT)**

Esta reacción es utilizada para sintetizar ADN complementario (ADNc) a partir de una matriz de ARN de interés. El ADNc es utilizado para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Las ADN polimerasas dependientes de ARN o retrotranscriptasas son capaces de sintetizar ADNc partiendo de ARN. Esta reacción se lleva a cabo a partir de de una matriz de ARN, con cebadores (oligo-dT o random primers) y dNTP's en un medio de reacción favorable para la enzima. Para ello se utilizaron 5 µg de ARN total para la síntesis de ADNc usando la enzima transcriptasa reversa (Invitrogen). La reacción fue conducida en un volumen total de 20 µL siguiendo las instrucciones del fabricante. 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. En la Tabla 2 se muestran las condiciones de reacción.

Tabla 2 Condiciones de reacción para la RT

COMPONENTE	CONTROL POSITIVO	CONTROL NEGATIVO
RNA total	cbp 5µg	Cbp 5µg
Oligo de T [1mM ]	1µl	1µl
H <sub>2</sub> O	cbp 13	Cbp 14
dNTP's [5mM ]	2µl	2 µl
	Calentar a 65°C por 5 minutos	Calentar a 65°C por 5 minutos
Buffer 5x	4µl	4µl
DTT	2µl	2µl
RT	1µl	–
	Calentar a 37°C por 50 minutos y 10 minutos a 70°C	Calentar a 37°C por 50 minutos y 10 minutos a 70°C
Volumen final	20 µl	20 µl

#### XI.4.3. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

Para determinar la expresión de los receptores 5-HT<sub>1A</sub>, 5-HT<sub>2B</sub> y 5-HT<sub>3</sub> se utilizaron como matriz para la PCR 2 µL de producto de la reacción de la transcripción reversa usando DNA Polimerasa (Genecraft). La amplificación se realizó en una mezcla para PCR constituida por 2.0 µL de buffer 10xPCR, 1.6 µL de MgCl<sub>2</sub> 25mM, 0.8 µL de 5mM dNTPs, 0.8 µL de solución de primers 5µM, 2.5 U de Taq DNA polimerasa y 2 µL de muestra de DNA para un volumen final de 20 µL. La reacción se llevó a cabo en un volumen total de 20 µL siguiendo las recomendaciones del fabricante TABLA 2. Reacciones conducidas en productos de RT donde se omitió la transcriptasa reversa se utilizaron como control en el análisis de expresión. Las condiciones reacción de PCR para los receptores serotoninérgicos 5-HT<sub>1A</sub>, 5-HT<sub>2B</sub> y 5-HT<sub>3</sub> se muestran en la Tabla 3.

**Tabla 3 Condiciones de reacción para PCR**

ETAPA	TEMPERATURA	TIEMPO	CICLOS
DESNATURALIZACIÓN	95 °C	5 minutos	1
DESNATURALIZACIÓN	95 °C,	45 segundos	38
Alineamiento:			
β-actina	59°C	45 segundos	
5-HT <sub>2B</sub>	56°C	45 segundos	
5-HT <sub>3</sub>	55°C	45 segundos	
Extensión	72°C	1 minuto	
Inactivación	72°C	7 minutos	1
DESNATURALIZACIÓN	95 °C	15 minutos	1
DESNATURALIZACIÓN	94 °C,	1 minuto	40
Alineamiento:			
5-HT <sub>1A</sub>	62°C	1 minuto	
Extensión	72°C	1 minuto	
Inactivación	72°C	10 minutos	1

#### **XI.4.4. SELECCIÓN DE LOS OLIGONUCLEÓTIDOS**

En la Tabla 4 se presentan los oligonucleótidos utilizados para amplificar fragmentos específicos de los receptores serotoninérgicos (5-HT<sub>1A</sub>, 5-HT<sub>2B</sub> y 5-HT<sub>3</sub>). Los productos de PCR fueron resueltos por electroforesis en un gel de agarosa.

**Tabla 4** Secuencias de los oligonucleótidos específicos para los receptores 5-HT<sub>1A</sub>, 5-HT<sub>2B</sub> y 5-HT<sub>3</sub>.

Oligonucleótido	Secuencia	Temperatura de alineamiento	Tamaño de producto (p.b)
5-HT <sub>1A</sub> (sentido)	5'-AGC TTA GGA ACT TCG TCG GCA-3'	62°C	200
5-HT <sub>1A</sub> (antisentido)	5'-CAG AGG AAG GTG CTC TTT GG-3'		
5-HT <sub>2B</sub> (sentido)	5'-AGGGAAGACTCATCCTT -3'	56°C	207
5-HT <sub>2B</sub> (antisentido)	5'-GGCACCACATAAGCAG-3'		
5-HT <sub>3</sub> (sentido)	5'-CATCCTCATCAATGAGTT-3'	55°C	200
5-HT <sub>3</sub> (antisentido)	5'-TTGATGTCCCTGGATGGTA-3'		

#### XI.4.5. VALIDACIÓN DEL CONTROL INTERNO

Para analizar cambios relativos en la expresión se elige como patrón un gen de referencia (control interno) que no varíe su expresión con las condiciones experimentales. El gen de la  $\beta$ -actina fue elegido para nuestro estudio como el control interno. Las condiciones de reacción de PCR para el control interno  $\beta$ -actina son las siguientes: un paso de desnaturalización de 5 minutos a 95 °C y 38 ciclos de 45 segundos a 95 °C, 45 segundos a 59°C y 1 minuto a 72°C, un paso final de inactivación de la reacción de 7 minutos a 70 °C. En la Tabla 5 se muestran los oligonucleótidos utilizados para la amplificación del control interno.

**Tabla 5** Secuencias de los oligonucleótidos específicos para la amplificación del gen de la  $\beta$ -actina.

<b>Oligonucleótido</b>	<b>Secuencia</b>	<b>Temperatura de alineamiento</b>	<b>Tamaño de producto (p.b)</b>
Actina (sentido)	5'-CTC GTT GCC GAT GGT GA -3'	59°C	199
Actina (antisentido)	5'-AGC GCT TCC GGT GTC CA-3'		

Los productos de PCR se resolvieron por electroforesis en gel de agarosa (1.5%), y se visualizaron con luz ultravioleta usando como intercalador bromuro de etidio.

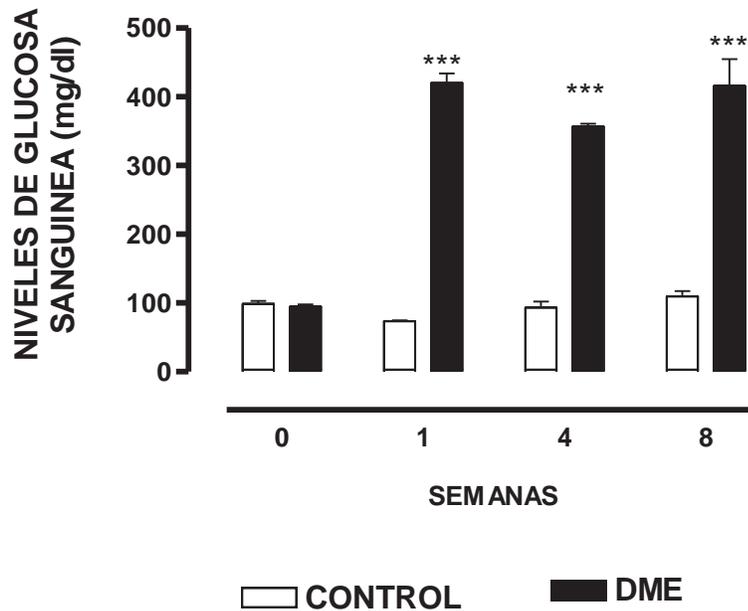
#### **XI.4.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Para el análisis de los resultados se utilizó el programa Graph Pad Prisma 4.0 con el cual se calculó el promedio y la desviación estándar de los datos experimentales y se empleo la “t” de student para determinar si existe diferencia estadísticamente significativa entre los grupos estudiados. Para el análisis de la densitometría en los geles de agarosa se utilizó el programa “Image J”.

## XII. RESULTADOS

### XII.1. CONCENTRACIÓN DE GLUCOSA EN SANGRE

La concentración de glucosa en sangre fue medida antes de la administración, a las 48 h posteriores a la administración de la STZ, así como antes del sacrificio de los animales. En la Figura 7 se muestra la concentración de glucosa en sangre a las diferentes semanas después del tratamiento con STZ, todas las ratas tratadas con STZ (grupo DME) presentaron hiperglucemia (glucosa sanguínea de 327- 420 mg/ dl), mientras que el grupo que solo se le administro el vehículo (grupo control) se observa una glucemia de 92 mg /dl.

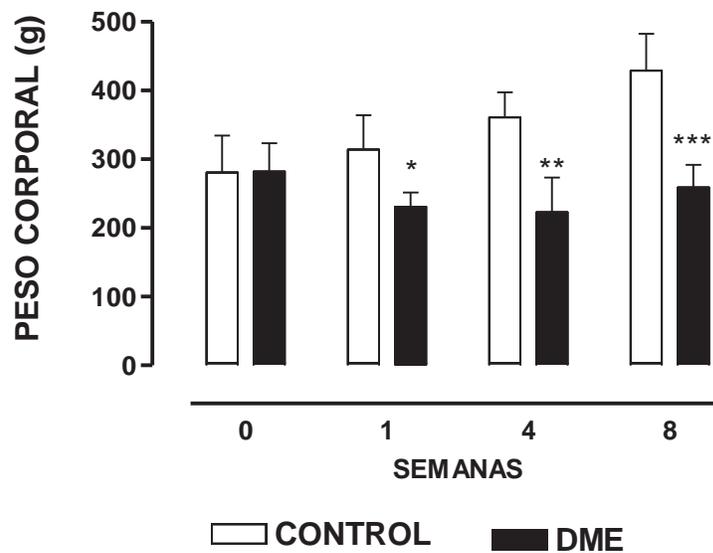


**FIGURA 7** Concentración de glucosa en sangre.

La sangre fue tomada de la mediante una punción en la punta de la cola de la rata a las diferentes semanas después de la administración de la STZ.  $X \pm D.E.$  de 18 ratas de cada grupo  
 \*\*\* $p < 0.0001$

## XII.2. PESO CORPORAL.

En la Fig. 8 se muestra el peso corporal de los animales, donde se observa que ambos grupos tienen un peso corporal de  $280 \pm 20$ g antes de ser tratados con STZ y a la primera semana los animales que fueron administrados con STZ disminuyen en su peso corporal un 27% con respecto al control, y esta pérdida de peso es de un 38 y 40% en la cuarta y octava semana respectivamente, la pérdida de peso es uno de los síntomas de la hiperglucemia.

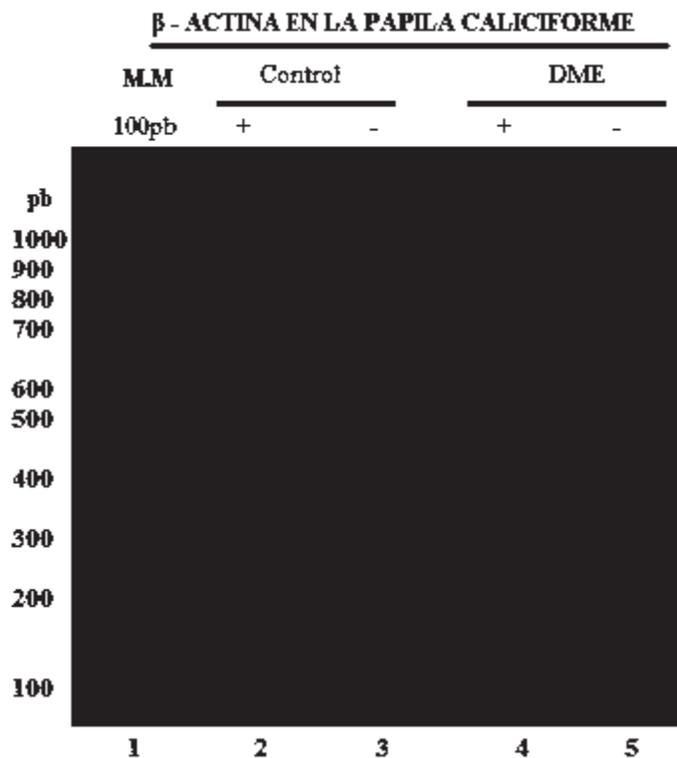


**FIGURA 8** Peso corporal de las ratas.

El peso corporal fue medido antes de la administración de la STZ, a la primera, cuarta y octava semana después de la administración de la STZ.  $X \pm D.E.$  de 18 ratas de cada grupo \*  $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.001$ , \*\*\*  $p < 0.0001$

### XII.3. VALIDACIÓN PARA EL CONTROL INTERNO $\beta$ -ACTINA.

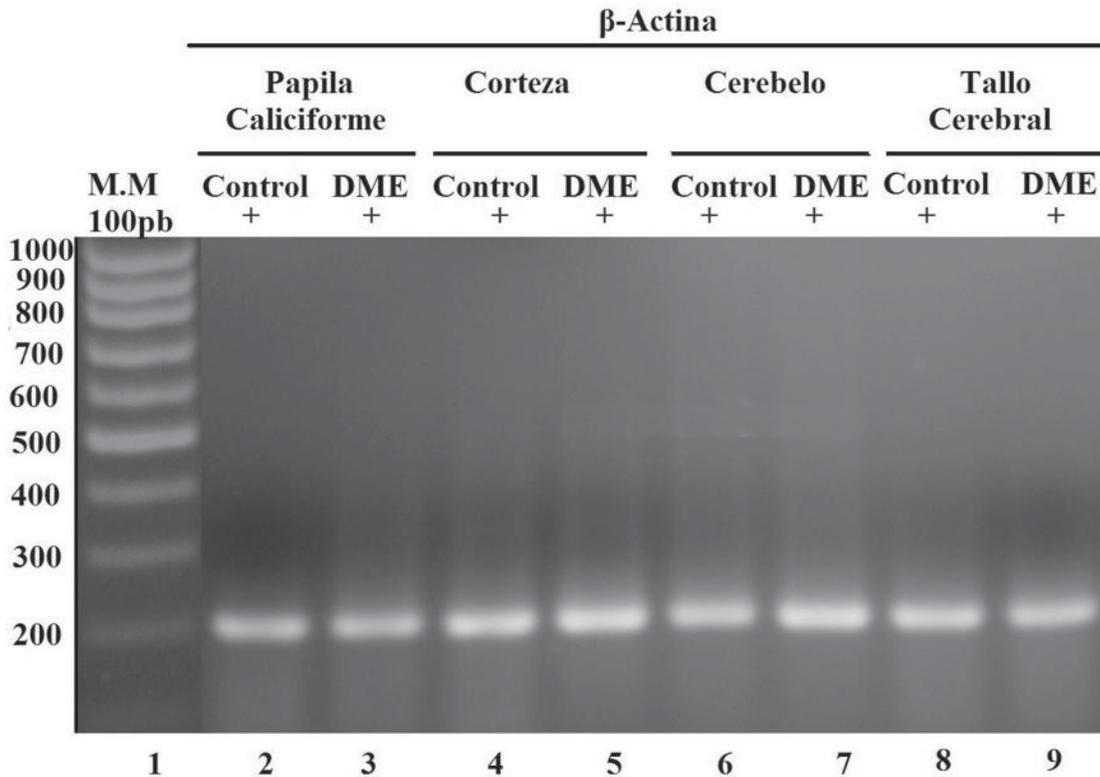
En la Fig. 9 se muestran los productos de amplificación de RT-PCR para el gen de  $\beta$ -actina en la papila caliciforme. En el carril 1 se muestra el marcador de peso molecular, el carril 2 corresponde al control positivo para el gen de  $\beta$ -actina en la papila caliciforme de ratas control con un peso molecular de 200 pb, en el carril 3 se observa el control negativo de la reacción de RT para el gen de la  $\beta$ -actina en la papila caliciforme de ratas control, en el carril 4 se muestra el control positivo para el gen de  $\beta$ -actina en la papila caliciforme de ratas con DME, en el carril 5 se observa el control negativo de la reacción de RT para el gen de la  $\beta$ -actina en la papila caliciforme de ratas con DME.



**FIGURA 9. Productos de amplificación del gen de  $\beta$ -actina en la papila caliciforme.**

La figura corresponde a una electroforesis en un gel de agarosa (1.5%) que fue teñido con bromuro de etidio y foto documentado en luz UV. Expresión del control interno  $\beta$ -actina en papila caliciforme, control y con DME durante la primera semana de DME.

En la Fig. 10 se muestran los productos de amplificación de RT-PCR para el gen de  $\beta$ -actina en los diferentes tejidos; papila caliciforme, corteza cerebral, cerebelo, tallo cerebral tanto del grupo control como del grupo con DME a la primera semana de la administración de la STZ.



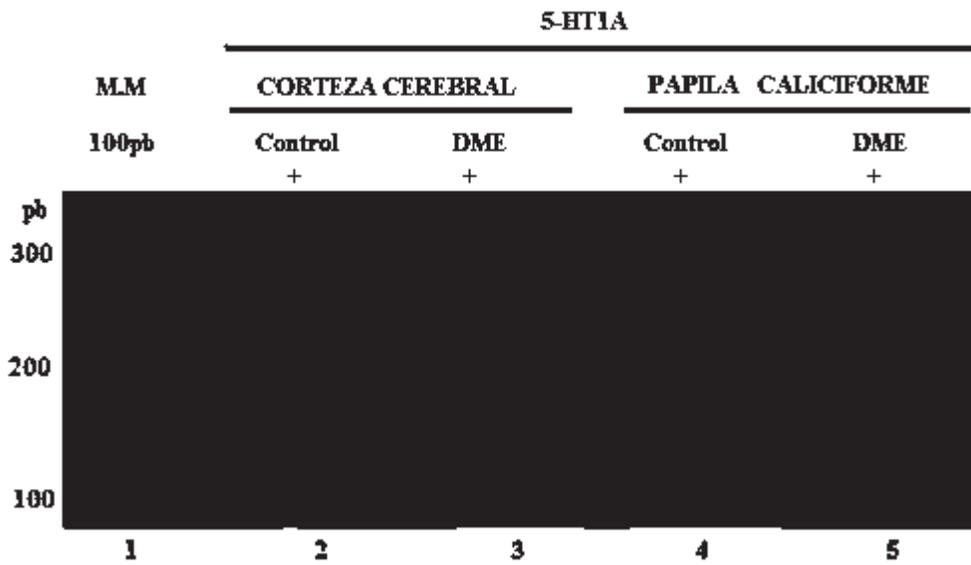
**FIGURA 10. Productos de amplificación del gen de  $\beta$ -actina en la papila caliciforme, corteza cerebral, cerebelo y tallo cerebral.**

La figura corresponde a una electroforesis en un gel de agarosa (1.5%) que fue teñido con bromuro de etidio y foto documentado con luz UV. Expresión del control interno  $\beta$ -actina en papila caliciforme, corteza cerebral, cerebelo y tallo cerebral; de tejidos control y con DME durante la primera semana de DME.

## XII.4. VALIDACIÓN DE OLIGONUCLEÓTIDOS DEL RECEPTOR 5-HT<sub>1A</sub>.

Para el análisis de la expresión de los receptores serotoninérgicos 5-HT<sub>1A</sub>, 5-HT<sub>2B</sub> y 5-HT<sub>3</sub> se realizaron los experimentos de PCR por triplicado y las fotografías de los geles de las electroforesis se analizaron con el programa "Image J" para determinar si existe diferencia en la densitometría de las muestras del grupo con DME con respecto al grupo control.

En la Fig. 11 se muestra los productos de la reacción de PCR para el gen del receptor 5-HT<sub>1A</sub>, esta reacción de PCR se realizó a partir de los productos de reacción de la RT del ARN<sub>T</sub> que se obtuvo del tejido de expresión control que es la corteza cerebral, tanto de animales control como de los animales con DME, una vez que se determinaron las condiciones para la reacción de PCR en la corteza cerebral se realizó en nuestro tejido de investigación que es la papila caliciforme tanto de los animales controles, así como de los animales con DME para realizar una densitometría de los productos de PCR y determinar si existen cambios de la expresión del ARNm en el grupo con DME, a la primera semana de la administración de la STZ. El peso molecular de los productos de amplificación es de 200 pb. En carril 1 se observa el marcador de peso molecular (M.M), en el carril 2 el producto de amplificación para el receptor 5-HT<sub>1A</sub> en la corteza cerebral del grupo control, en el carril 3 el producto de amplificación para el receptor 5-HT<sub>1A</sub> en la corteza cerebral del grupo con DME, en el carril 4 el producto de amplificación para el receptor 5-HT<sub>1A</sub> en la papila caliciforme del grupo control, carril 5 el producto de amplificación para el receptor 5-HT<sub>1A</sub> en la papila caliciforme del grupo con DME.

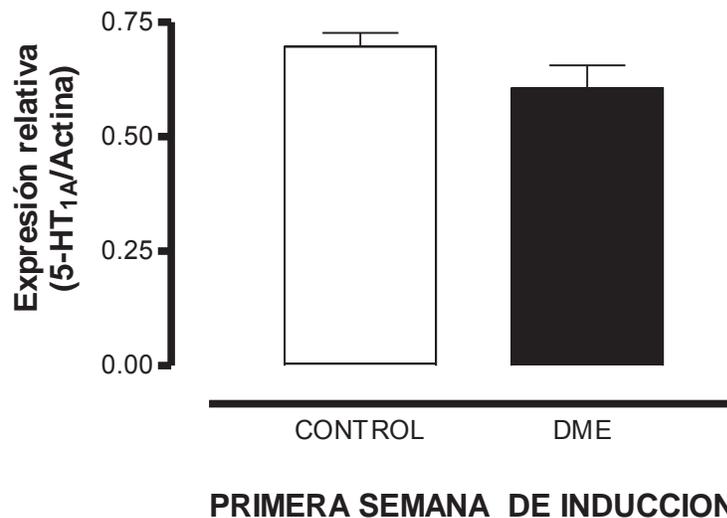


**FIGURA 11** Productos de amplificación del receptor 5-HT<sub>1A</sub> en corteza cerebral y papila caliciforme.

La figura corresponde a una electroforesis en un gel de agarosa (1.5%) que fue teñido con bromuro de etidio y foto documentado en Luz UV. Se observa los productos de amplificación del receptor 5-HT<sub>1A</sub> en corteza cerebral, papila caliciforme del grupo control y con DME, durante la primera semana.

## XII.5. EXPRESIÓN DEL RECEPTOR 5-HT<sub>1A</sub> EN LA PAPILA CALICIFORME.

En la Fig. 12 se muestra el análisis de la expresión relativa del receptor serotoninérgico 5-HT<sub>1A</sub> con respecto a un gen de referencia que es  $\beta$ -actina, tanto en el grupo control como en el grupo con DME, el análisis se realizó a la primera semana de la administración de la STZ, donde se observa que no hay diferencia significativa en el grupo con DME con respecto a su control sin embargo existe una tendencia a disminuir el ARNm del grupo con DME.

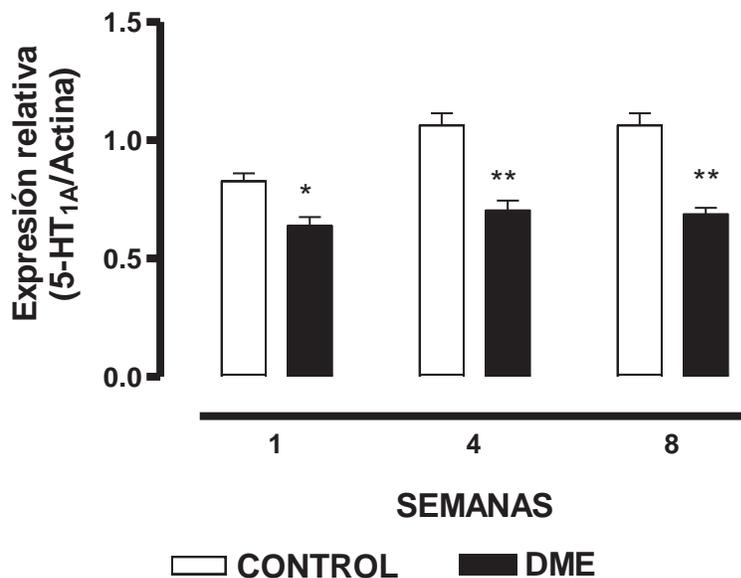


**FIGURA 12** Expresión relativa del ARNm del receptor 5-HT<sub>1A</sub> con respecto a  $\beta$ -actina en la papila caliciforme.

Expresión relativa del receptor 5-HT<sub>1A</sub> con respecto a  $\beta$ -actina en la papila caliciforme del grupo control y con DME a la primera semana de la administración de la STZ.  $X \pm D.E.$  de tres experimentos realizados por triplicado de cada grupo.

## XII.6. EXPRESIÓN DEL RECEPTOR 5-HT<sub>1A</sub> EN LA CORTEZA CEREBRAL.

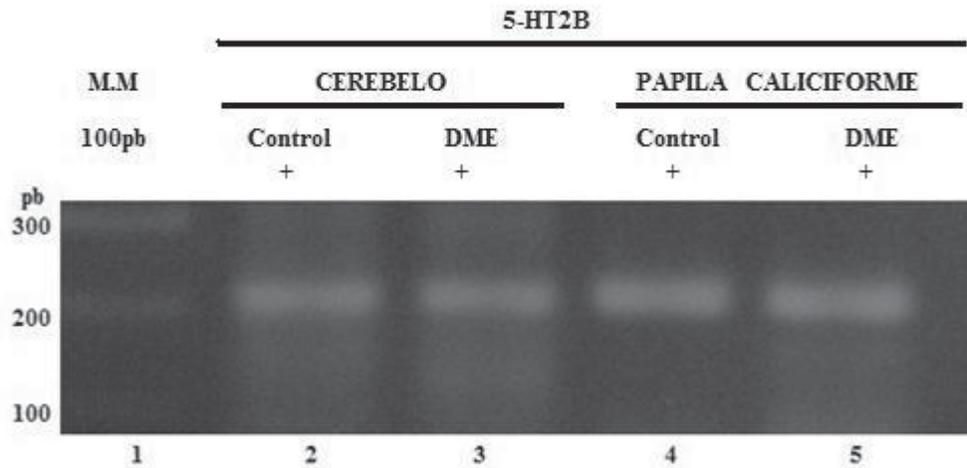
En la Fig. 13 se muestra el análisis de la expresión relativa del receptor serotoninérgico 5-HT<sub>1A</sub> en la corteza cerebral con respecto a un gen de referencia que es  $\beta$ -actina, tanto en el grupo control como en el grupo con DME, el análisis se realizó a la primera, cuarta y octava semana de la administración de la STZ, donde se observa una disminución estadísticamente significativa en el grupo con DME con respecto a su control a partir de la primera semana y este se mantiene hasta la octava semana.



**FIGURA 13** Expresión relativa del ARNm del receptor 5-HT<sub>1A</sub> en Corteza cerebral. Los valores muestran  $\bar{X} \pm$  D.E. de tres experimentos realizados por triplicado de cada grupo \*  $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.001$ .

## **XII.7. VALIDACIÓN DE OLIGONUCLEÓTIDOS DEL RECEPTOR 5-HT<sub>2B</sub>**

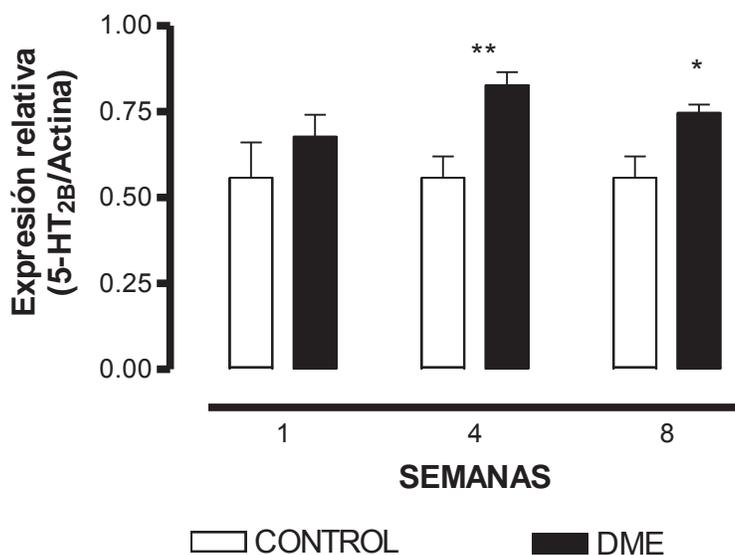
En la Fig. 14 se muestra los productos de la reacción de PCR para el gen del receptor 5-HT<sub>2B</sub>, esta reacción de PCR se realizó a partir de los productos de reacción de la RT del ARN total que se obtuvo del tejido de expresión control que es el cerebelo, tanto de animales control como de los animales con DME, una vez que se determinaron las condiciones para la técnica de PCR en el cerebelo se realizó en nuestro tejido de investigación que es la papila caliciforme tanto de los animales controles, así como de los animales con DME para realizar una densitometría de los productos de PCR y determinar si existen cambios de la expresión del ARNm en el grupo con DME, a la primera semana y octava semana de la administración de la STZ. El peso molecular de los productos de amplificación es de 207 pb. En carril 1 se observa el marcador de peso molecular (M.M), en el carril 2 el producto de amplificación para el receptor 5-HT<sub>2B</sub> en el cerebelo del grupo control, en el carril 3 el producto de amplificación para el receptor 5-HT<sub>2B</sub> en el cerebelo del grupo con DME, en el carril 4 el producto de amplificación para el receptor 5-HT<sub>2B</sub> en la papila caliciforme del grupo control, carril 5 el producto de amplificación para el receptor 5-HT<sub>2B</sub> en la papila caliciforme del grupo con DME.



**FIGURA 14 Productos de amplificación del receptor 5-HT<sub>2B</sub> en cerebelo y papila caliciforme.** Electroforesis en un gel de agarosa (1.5%) que fue teñido con bromuro de etidio y foto documentado con luz UV. Expresión del receptor 5-HT<sub>2B</sub> en cerebelo, papila caliciforme de tejidos control y con DME durante la primera semana de DME.

## XII.8. EXPRESIÓN DEL RECEPTOR 5-HT<sub>2B</sub> EN LA PAPILA CALICIFORME.

En la Fig. 15 se muestra el análisis de la expresión relativa del receptor serotoninérgico 5-HT<sub>2B</sub> con respecto a un gen de referencia que es  $\beta$ -actina, tanto en el grupo control como en el grupo con DME, el análisis se realizó a la primera y octava semana de la administración de la STZ, donde se observa que no hay diferencia significativa en el grupo con DME con respecto a su control sin embargo existe una tendencia del ARNm del grupo con DME a incrementar su expresión, sin embargo a la octava semana existe un incremento estadísticamente significativo con respecto al control.

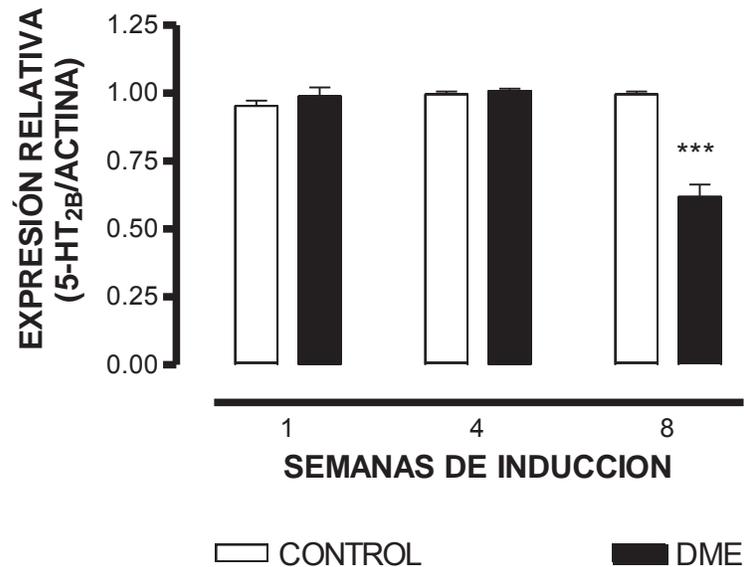


**FIGURA 15** Expresión relativa del ARNm del receptor 5-HT<sub>2B</sub> en la papila caliciforme.

Expresión relativa del receptor 5-HT<sub>2B</sub> con respecto a  $\beta$ -actina en la papila caliciforme del grupo control y con DME a la primera semana de la administración de la STZ.  $X \pm D.E.$  de tres experimentos realizados por triplicado de cada grupo \*\*\*  $p < 0.0001$ .

## XII.9. EXPRESIÓN DEL RECEPTOR 5-HT<sub>2B</sub> EN EL CEREBELO.

En la Fig. 16 se muestra el análisis de la expresión relativa del receptor serotoninérgico 5-HT<sub>2B</sub> con respecto a un gen de referencia que es  $\beta$ -actina en cerebelo, tanto en el grupo control como en el grupo con DME, el análisis se realizó a la primera y octava semana de la administración de la STZ, donde se observa que existe una disminución del ARNm que estadísticamente es significativa en el grupo con DME con respecto a su control a partir de la primera semana y se mantiene hasta la octava semana.

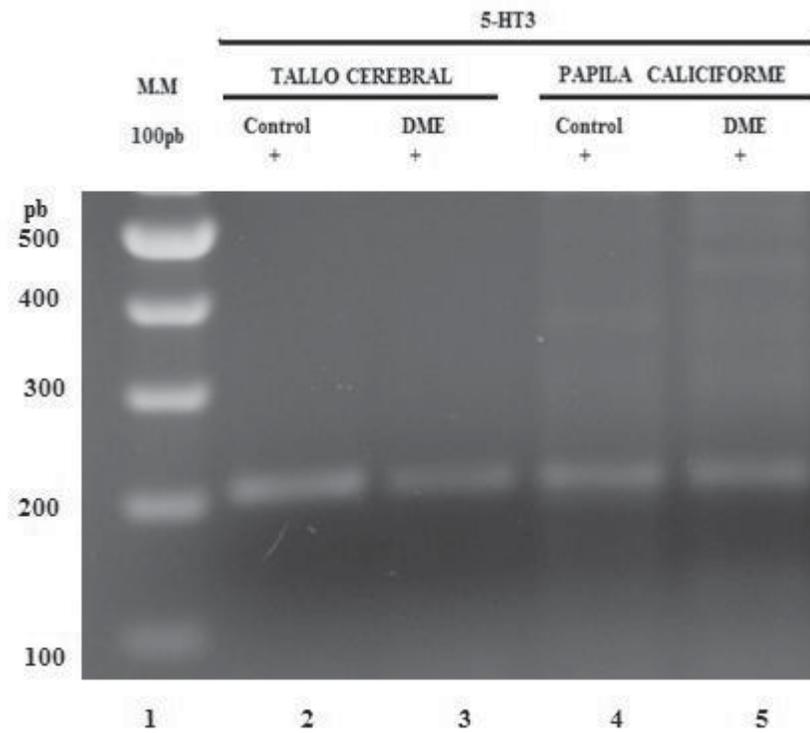


**FIGURA 16** Expresión relativa del ARNm del receptor 5-HT<sub>2B</sub> en cerebelo.

Expresión relativa del receptor 5-HT<sub>2B</sub> con respecto a  $\beta$ -actina en el cerebelo del grupo control y con DME a la primera y octava semana de la administración de la STZ.  $X \pm D.E.$  de tres experimentos realizados por triplicado de cada grupo.

## XII.10. VALIDACIÓN DE OLIGONUCLEÓTIDOS DEL RECEPTOR 5-HT<sub>3</sub>

En la Fig. 17 se muestra los productos de la reacción de PCR para el gen del receptor 5-HT<sub>3</sub>, esta reacción de PCR se realizó a partir de los productos de reacción de la RT del ARN<sub>T</sub> que se obtuvo del tejido de expresión positivo que es el tallo cerebral, tanto de animales control como de los animales con DME, una vez que se determinaron las condiciones para la técnica de PCR en el tallo cerebral se realizó en nuestro tejido de investigación que es la papila caliciforme tanto de los animales controles, así como de los animales con DME para realizar una densitometría de los productos de PCR y determinar si existen cambios de la expresión del RNAm en el grupo con DME, a la primera semana de la administración de la STZ. El peso molecular de los productos de amplificación es de 200 pb. En carril 1 se observa el marcador de peso molecular (M.M), en el carril 2 el producto de amplificación para el receptor 5-HT<sub>3</sub> en el tallo cerebral del grupo control, en el carril 3 el producto de amplificación para el receptor 5-HT<sub>3</sub> en el tallo cerebral del grupo con DME, en el carril 4 el producto de amplificación para el receptor 5-HT<sub>3</sub> en la papila caliciforme del grupo control, carril 5 el producto de amplificación para el receptor 5-HT<sub>3</sub> en la papila caliciforme del grupo con DME.

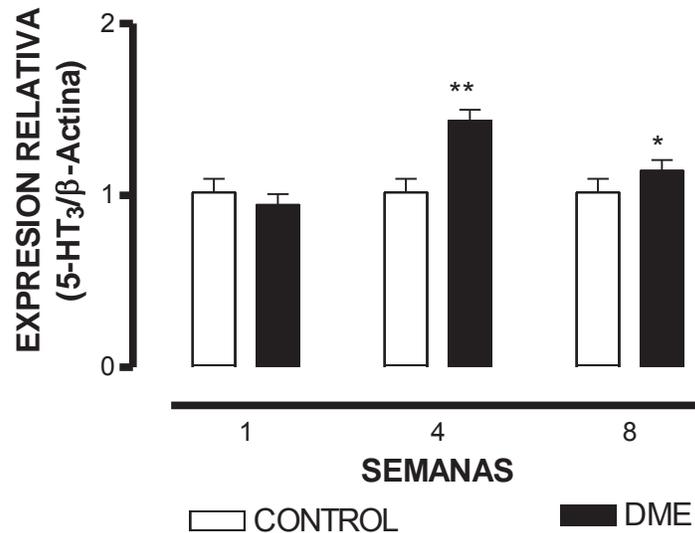


**FIGURA 17** Productos de amplificación del receptor 5-HT<sub>3</sub> en tallo cerebral y papila caliciforme.

Electroforesis en un gel de agarosa (1.5%) que fue teñido con bromuro de etidio y foto documentado en Luz UV. Expresión del receptor 5-HT<sub>3</sub> en tallo cerebral, papila caliciforme de ratas control y con DME durante la primera semana de DME.

## XII.11. EXPRESIÓN DEL RECEPTOR 5-HT<sub>3</sub> EN LA PAPILA CALICIFORME.

En la Fig. 18 se muestra el análisis de la expresión relativa del receptor serotoninérgico 5-HT<sub>3</sub> con respecto a un gen de referencia que es  $\beta$ -actina, tanto en el grupo control como en el grupo con DME, el análisis se realizó a la primera y octava semana de la administración de la STZ, donde no se observa una diferencia estadísticamente significativa en el grupo con DME con respecto a su control sin embargo a la primera semana, sin embargo a la octava semana se observa un incremento estadísticamente significativo con respecto a su control.

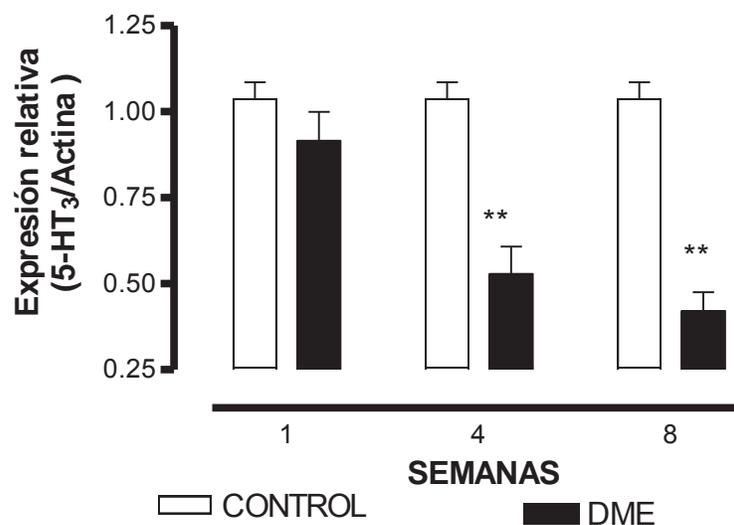


**FIGURA 18** Expresión relativa del ARNm del receptor 5-HT<sub>3</sub> en la papila caliciforme.

Expresión relativa del receptor 5-HT<sub>3</sub> con respecto a  $\beta$ -actina en la papila caliciforme del grupo control y con DME a la primera semana de la administración de la STZ.  $\bar{X} \pm$  D.E. de tres experimentos realizados por triplicado de cada grupo \*\*\*  $p < 0.0001$ .

## XII.12. EXPRESIÓN DEL RECEPTOR 5-HT<sub>3</sub> EN EL TALLO CEREBRAL.

En la Fig. 19 se muestra el análisis de la expresión relativa en el tallo cerebral del receptor serotoninérgico 5-HT<sub>3</sub> con respecto a un gen de referencia que es  $\beta$ -actina, tanto en el grupo control como en el grupo con DME, el análisis se realizó a la primera semana de la administración de la STZ, donde se observa que existe una diferencia en el grupo con DME con respecto a su control sin embargo existe una tendencia del ARNm del grupo con DME disminuir su expresión.



**FIGURA 19** Expresión relativa del ARNm del receptor 5-HT<sub>3</sub> en tallo cerebral.

Expresión relativa del receptor 5-HT<sub>3</sub> con respecto a  $\beta$ -actina en el tallo cerebral del grupo control y con DME a la primera semana de la administración de la STZ. X  $\pm$  D.E. de tres experimentos realizados por triplicado de cada grupo.

### XIII. DISCUSIÓN

La diabetes mellitus constituye un problema grave de salud pública alrededor del mundo, más de 220 millones de personas en todo el mundo presentan diabetes (Haratz and Tanne, 2011). En 1980 en México ocupó el noveno lugar como causa de muerte, para colocarse a finales de los 90, en el tercero, actualmente es la primera causa de muerte. Estas alarmantes cifras se asocian a un cambio en la alimentación y disminución de la actividad física cotidiana (Díaz et al., 2004). La hiperglucemia crónica origina complicaciones como retinopatía, nefropatía, neuropatía periférica, amputaciones, síntomas cardiovasculares y disfunción sexual (Brownlee, 2001; ADA, 2010). El SNC también es afectado por las complicaciones crónicas (McCall, 2002). Por lo anterior, se requieren modelos experimentales de DM para estudiar y entender los mecanismos moleculares de las complicaciones de la DM. La administración de estreptozotocina se ha reportado que es un buen método para tener un modelo experimental de diabetes Mellitus tipo 1 reproducible y adecuado (Lenzen, 2008; Juárez, 2008). La estreptozotocina es una sustancia con citotoxicidad específica que destruyen a las células  $\beta$  del páncreas y causan un estado de deficiencia absoluta de insulina (Ramos and Domingo, 1994; Szkudelski, 2001). Resultados de nuestro laboratorio (Juárez, 2008) muestran que los animales tratados con STZ a partir de las 48 horas presentan hiperglucemia, mientras que el grupo control presenta una normoglucemia. En relación a los resultados en nuestro grupo de ratas con DME observamos que presentaron hiperglucemia (327- 420 mg/ dl) característica principal de la DM a partir de las 48 horas y hasta que termino el estudio que fueron 8 semanas, también presentaron otras características como poliuria (aumento de excreción urinaria), polidipsia (necesidad de tomar agua), polifagia (aumento del apetito) y pérdida de peso (Fig. 8), esta disminución en el peso corporal se observó hasta terminar el presente estudio, lo cual correlaciona con los resultados de Lenzen (2008) y Juárez (2008) y nos indica que nuestro modelo de DME presentan características de la DM.

En pacientes con diabetes mellitus se ha documentado trastornos del gusto como ageusia o disgeusia (Le Floch et al. 1989), sin embargo aun no se conocen las causas por las cuales cambia la percepción gustativa en estos pacientes. El consumo y la preferencia de los edulcorantes pueden ser afectados por los cambios en la percepción y sensibilidad del sabor dulce (Shin et al., 2008; Tepper y Seldner, 1999), estudios previos han demostrado que el estado fisiológico del animal con DME puede afectar o cambiar su sensibilidad a los estímulos gustativo. Las alteraciones pueden ocurrir en los diferentes niveles de la vía de transmisión del gusto: las células gustativas (Huang y Staehler, 2009), los nervios gustativos aferentes (Miura et al., 2006) y el núcleo del tracto solitario (Nakamura and Norgren, 1995). En las células gustativas varios son los elementos intracelulares que participan en la transducción de la señal gustativa, incluyendo  $\alpha$ -gustducina, fosfolipasa C- $\beta$ 2 (PLC- $\beta$ 2), y TRPM5, además de los receptores para las diferentes modalidades gustativas, así como los receptores serotoninérgicos que tiene un papel importante en la transducción gustativa (Huang et al., 2009). Cambios en estos elementos puede alterar la señalización gustativa. La transducción de la señal gustativa comienza con la unión del ligando con su receptor en las células gustativas de los corpúsculos gustativos, para la modalidad gustativa dulce se requiere del heterodímero formado por las proteínas T1R2 y T1R3 (Ishimaru, 2009), un estudio previo demostró que en animales con DME en una etapa crónica disminuyo el ARNm de las proteínas T1R2 y T1R3 (Prado, 2010), también se ha demostrado que la expresión de ARNm de  $\alpha$ -gustducina es significativamente mayor en las papilas gustativas de ratas diabéticas (Zhou et al., 2008). Por medio de estudios de RT-PCR se ha documentado la expresión de los receptores 5-HT<sub>3</sub> y 5-HT<sub>1A</sub>, en las fibras nerviosas aferentes que inervan a los corpúsculos gustativos y en las células de tipo II respectivamente, los cuales participan en la transducción de la señal de las modalidades gustativas (Kaya et al., 2004). En este estudio por medio de RT-PCR se analizó la expresión del ARNm del receptor 5-HT<sub>1A</sub> en la papila caliciforme durante una etapa aguda de la diabetes mellitus que es a una semana de la

inducción con STZ, donde no se observó un cambio en el ARNm, sin embargo, existe una tendencia a disminuir la expresión del ARNm lo que podría estar contribuyendo a la disminución de la percepción gustativa, debido a que la serotonina mediante una regulación de tipo parácrino, mediada por este receptor esta regulando la señal gustativa. También se encontró que en una etapa aguda de la DME que es a la primera semana no hay cambios en el ARNm del receptor 5-HT<sub>3</sub> en la papila caliciforme, sin embargo, en una etapa crónica de la diabetes mellitus como lo es a la cuarta y octava semana de inducción incrementa la expresión del ARNm del grupo con DME, con respecto a su control, este incremento en el ARNm a partir de la cuarta semana se puede explicar como un fenómeno adaptativo en respuesta a cambios en la concentración del neurotransmisor, la alteración en la concentración de serotonina en el plasma de humanos resulta en una marcada plasticidad del umbral gustativo (Heath et al., 2006) se ha reportado una disminución en la concentración de serotonina que sucede a nivel del plasma (Herrera et al., 2003), y del SNC a partir de la cuarta semana de DME (Sandrini et al., 1997), la concentración de serotonina no se exploró en este trabajo, sin embargo, no se descarta que pueda disminuir la síntesis de serotonina en la papila gustativa y las células requieren más receptores serotoninérgicos para asegurar que se mande la señal a el SNC y por ello incrementa la expresión del ARNm en la DME, sin embargo con estos resultados no se puede descartar que estos receptores funcionen de manera incorrecta o que el ARNm sea muy inestable y que se disminuya el número de receptores serotoninérgicos (Wohlpert and Molinoff, 2006). También se ha reportado una disminución de las fibras gustativas en ratas con diabetes mellitus experimental lo que origina una neuropatía (Pai et al., 2006) y está perdida de las fibras nerviosas las cuales son las responsables de llevar la señal al SNC podría estar correlacionando con el incremento del ARNm del receptor 5-HT<sub>3</sub> ya que en las fibras nerviosas aferentes es donde se ha demostrado la expresión del receptor 5-HT<sub>3</sub> en las papilas gustativas.

Se ha reportado la expresión del ARNm del receptor 5-HT<sub>2B</sub> durante el desarrollo de la papila caliciforme y se propone que la serotonina desempeña un papel de factor trófico mediante la activación del receptor 5-HT<sub>2B</sub> en la papila caliciforme (Acosta y Mercado, 2010), y en otros tejidos ya que estudios previos han reportado que la inactivación genética del receptor serotoninérgico 5-HT<sub>2B</sub> conduce a la muerte embrionaria (E11) por malformaciones e hipoplasias cardiacas (Nebigil et al., 2000). Este receptor también participa en la proliferación, diferenciación y migración de las células de la cresta neural, tubo neural y corazón (Choi et al 1998). En los mamíferos, los corpúsculos gustativos surgen del epitelio local y son mantenidos por continua renovación celular (Beidler and Smallman, 1965; Stone et al., 1995; Miura et al., 2006) ya que el promedio de vida de las células gustativas es de 10-14 días (Miura et al., 2006). Por lo anterior nos interesa estudiar si en la etapa adulta de la rata se expresa el ARNm del receptor 5-HT<sub>2B</sub>. En este trabajo se demuestra la expresión del ARNm del receptor 5-HT<sub>2B</sub> en la etapa adulta de la rata y nosotros proponemos que la serotonina pueda participar en la proliferación y diferenciación de los corpúsculos gustativos mediante la activación del receptor 5-HT<sub>2B</sub>, además de participar en la transducción de la señal gustativa mediante la activación de los receptores 5-HT<sub>1A</sub> y 5-HT<sub>3</sub> (Kaya et al., 2004; Huang et al., 2009). En el grupo de ratas con DME la expresión del ARNm del receptor 5-HT<sub>2B</sub> no muestra diferencias a la primera semana de inducción de la DME con respecto al grupo control, sin embargo a la octava semana se incrementó la expresión del ARNm lo que podría estar correlacionando con los datos de animales con DME donde se ha reportado que existe hipertrofia del epitelio de la papila caliciforme de animales con DME y una disminución de los corpúsculos gustativos (Pai et al., 2006), ya que la serotonina mediante la activación de los receptores de la familia 5-HT<sub>2</sub> participa en la diferenciación celular, tanto a nivel del sistema nervioso central como en sistemas periférico, por lo anterior se propone que en la etapa adulta el receptor 5-HT<sub>2B</sub> puede estar expresado en el epitelio lingual de la papila caliciforme y pueda estar relacionado con la diferenciación de las células gustativas, sin un estado

patológico como lo es la diabetes mellitus esta vía de señalización no se lleve a cabo aun cuando el ARNm del receptor se encuentre alterado lo que pueda contribuir a la hipertrofia y la disminución de los corpúsculos gustativos.

Existe una compleja relación entre la diabetes mellitus y el SNC (McCall, 2002), debido a que la hiperglucemia crónica origina cambios funcionales en muchas regiones del cerebro (Abraham et al., 2010) y altera la concentración de los neurotransmisores, así como la interacción con sus respectivos receptores esto que ha sido descrito para algunas áreas del cerebro en la rata (Castillo et al., 2010). Las variaciones en la concentración de 5-HT en el cerebro están relacionadas con cambios en el comportamiento, estado de ánimo, ansiedad, agresividad, depresión, sueño, fatiga e incluso la supresión del apetito, niveles bajos de 5-HT o la señalización alterada de sus receptores se han relacionado con deseos cada vez mayores por alimentos dulces y ricos en carbohidratos. Si una persona tiene niveles normales de 5-HT, puede alcanzar la saciedad y controlar la ingesta de azúcar con más facilidad. Los niveles adecuados de este neurotransmisor en el cerebro depende de la ingesta de alimentos ricos en triptófano (aminoácido precursor de serotonina) y de hidratos de carbono (De Matos et al., 2011). La diabetes inducida por STZ da lugar a una hiperglucemia crónica que se asocia con una disminución en la concentración de 5-HT (a los 30 días) y con un aumento en la paralelo de los receptores serotoninérgicos 5-HT<sub>1A</sub> y 5-HT<sub>2</sub> en la corteza y el tallo cerebral (Sandrini et al., 1997; Abraham et al., 2010). Esta disminución en la concentración de serotonina se puede originar debido a una disminución en su síntesis, ya que se observo que reduce la concentración de su precursor el L-triptófano (Herrera et al., 2003).

Por lo anterior a nosotros nos intereso analizar el ARNm del receptor 5-HT<sub>1A</sub> en la corteza cerebral de animales con DME donde se observa que a partir de la primera semana y hasta la octava semana de DME disminuye el ARNm con respecto a su control. Este receptor tiene alta densidad en la corteza cerebral y juega un papel importante en la regulación autonómica de la función pancreática (Mohan et al., 2005). Una densidad equilibrada de los receptores pre y post-

sináptica en áreas del cerebro se requieren para la función normal del sistema serotoninérgico. Alteraciones en la densidad del receptor 5-HT<sub>1A</sub> en el cerebro se han relacionado anteriormente con muchos trastornos psiquiátricos. La densidad del 5-HT<sub>1A</sub> se encontró que disminuyó en la depresión (Sargent et al., 2000) y también disminuyó en el trastorno de pánico (Neumeister et al., 2004). Por lo anterior los pacientes diabéticos son más vulnerables a desarrollar desordenes afectivos como la depresión, ansiedad, desordenes neurofisiológicos y esto puede estar relacionado con una disminución en el ARNm del receptor 5-HT<sub>1A</sub> en la corteza cerebral, ya que la hiperglucemia induce estrés oxidativo que ha sido implicado en la neuropatía diabética y la formación de radicales libres, lo que origina la muerte de las células neuronales, daño oxidativo de las membranas celulares, cambios en la estructura e integridad funcional de los organelos subcelulares causando complicaciones diabéticas (Abraham et al., 2010b).

En ratas tratadas con estreptozotocina se incrementa la muerte celular y disminuye la proliferación en el cerebelo lo que indica la pérdida de células (Abraham et al., 2010b). El papel potencial del cerebelo en la fisiopatología de los trastornos psiquiátricos ha sido reportado. Anormalidades estructurales y funcionales del cerebelo se han relacionado con el trastorno bipolar, depresión mayor y otras alteraciones psiquiátricas (Hernández-Fonseca et al., 2009). Por lo anterior También se exploró en este trabajo la expresión del ARNm del receptor 5-HT<sub>2B</sub> en el cerebelo de ratas con diabetes mellitus, donde se observa que en una etapa crónica de la diabetes mellitus a la octava semana hay una disminución del ARNm del receptor 5-HT<sub>2B</sub> que es estadísticamente significativa con respecto a su control. Lo que correlaciona con los datos reportados por Abraham et al., (2010b) quien reporta que en cerebelo disminuye el ARNm del receptor 5-HT<sub>2A</sub>. El receptor 5-HT<sub>2A</sub> está involucrado en una diversidad de funciones fisiológicas tales como la secreción endocrina, la termorregulación y el control del apetito, sin descartar que el receptor 5-HT<sub>2B</sub> también este participando en la regulación de estas funciones entre otras. Esta disminución en los receptores se puede explicar por una disminución de

serotonina que reporta en ratas con diabetes mellitus y la utilización de Glucosa disminuye en el cerebro durante la diabetes (McCall, 1992), provocando un mecanismo potencial para Incrementar los eventos patológicos. La disminución de la expresión del ARNm del receptor 5-HT<sub>2B</sub> encontrada en el cerebelo puede ser debida en principio a dos mecanismos básicos: una reducción de la síntesis del ARNm en cada neurona y/o una disminución del número de las células que contienen el ARNm.

En este trabajo también se realizó un análisis de la expresión del ARNm del receptor 5-HT<sub>3</sub> en el tallo cerebral de ratas tratadas con STZ, donde se observa una disminución del ARNm en una etapa crónica que es a la cuarta semana y este decremento se mantiene hasta la octava semana. Se ha observado una alta densidad de los receptores 5-HT<sub>3</sub> en el tallo cerebral humano, particularmente en el área postrema y el núcleo del tracto solitario. La serotonina mediante la activación del receptor 5-HT<sub>3</sub> puede estar participando en procesar la información gustativa ya que la primera sinapsis central de los axones gustativos que llegan de la inervación de la cavidad oral se produce en el núcleo del tracto solitario (Robert and Lundy, 2008). Sin embargo debido a que hay una disminución de la serotonina en el tallo cerebral de ratas diabéticas (Abraham et al., 2010a) esto podría originar una disminución de los receptores serotoninérgicos y la señal gustativa que llega al tracto solitario no se estaría procesando de manera adecuada.

#### **XIV. CONCLUSIONES**

Estos resultados nos sugieren que los cambios diferenciales en la expresión de los receptores serotoninérgicos a nivel del sistema nervioso central, así como, en la papila caliciforme puede ser un mecanismo compensatorio con el fin de mantener la transducción de las señales gustativas durante la diabetes mellitus.

## XV. BIBLIOGRAFÍA

Abraham, P.M., Anju, T.R., Jayanarayana, S., and Paulose, C.S. 2010a. Serotonergic receptor upregulation in cerebral cortex and down regulation in brainstem of streptozotocin induced diabetic rats: Antagonism by pyridoxine and insulin. *Neuroscience Letters*, 483: 23–27.

Abraham, P.M., Paul, J., and Paulose, C.S. 2010b. Down regulation of cerebellar Serotonergic receptor in streptozotocin induced diabetic rats: effect of pyridoxine and aegle marmelose. *Brain research bulletin* 82: 87-94.

Acosta, C. J., y Mercado, C.R. 2010. Ontogenia de los receptores 5-HT<sub>2B</sub> y 5-HT<sub>3</sub> en la papila caliciforme de rata. *Ciencia Nicolaita*, 1-8.

Adayev, T., Ranasinghe, B., and Banerjee, P. 2005. Transmembrane Signaling in the Brain by Serotonin, a Key Regulator of Physiology and Emotion. *Bioscience Reports*, 25:363-385.

Albert, P.R., Le François, B. and Millar, A. M. 2011. Transcriptional dysregulation of 5-HT<sub>1A</sub> autoreceptors in mental illness. *Molecular Brain*, 4:21.

American Diabetes Association. 2010. Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care*, 33:S62-S69.

Barnes, N. M., Hales, T. G., Lummis, S.C., and Peters, J. A. 2009. The 5-HT<sub>3</sub> receptor—the relationship between structure and function. *Neuropharmacology*, 56:273–284.

Batbayar, B., Zelles, T., Ver, A. and Feher, E. 2004. Plasticity of the different neuropeptide-containing nerve fibres in the tongue of the diabetic rat. *Journal of the Peripheral Nervous System*, 9:215–223.

Beidler, LM and Smallman, RL. 1965. Renewal of cells within taste buds. *J Cell Biol.* 27:263-272.

Bigiani, A. 2001. Mouse taste cells with glia like membrane properties. *J. Neurophysiol.* 85: 1552-1560.

Bottino, R., and Trucco, M. 2005. Multifaceted therapeutic approaches for a multigenic disease. *Diabetes*, 54:S79–S86.

Browniee, M. 2001. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature*, 414(6865):813-820.

Buck, B.L. 2000. Olfato y gusto: los sentidos químicos en Principios de Neurociencias. Kandel E. R., Schawartz J.H., Jessell T. M (Eds.), Mc Graw Hill, 32:635-645.

Castillo, J., Barrera, D., Pérez, J., and Álvarez, F. 2010. Depresión y diabetes: de la epidemiología a la neurobiología. Rev. Neurol. 51 (6): 347-35

Chandrashekar, J., Honn, M.A., Ryba, J.P. and Zuker, C.S. 2006. The receptors and cell for mammalian taste. Nature, 444:288-294.

Chatzigeorgiou, A., Halapas, A., Kalafatakis, K. And Kamper, E. 2009. The Use of Models in the Study of Diabetes Mellitus. In Vivo, 23:245-258.

Chaudhari, N. and Roper S. D. 2010. The cell biology of taste. J. Cell Biol. 190(3):285–296

Choi, D. and Maroteaux, L. 1996. Immunohistochemical localisation of the serotonin 5-HT2B receptor in mouse gut, cardiovascular system, and brain. FEBS Letters, 391:45-51.

Choi, D.S., Kellermann, O., Richard, S., Colas, J.F., BolañoS-Jimenez, F., Tournois, C., Launay, J.M., and Maroteaux, L. 1998. Mouse 5-HT2B Receptor-mediated Serotonin Trophic Functions. Annals new York academy of sciences. 861:67-73

Clapp, TR., Yang, R., Stoick, CL., Kinnamon, SC. and Kinnamon, JC. 2004 Morphologic characterization of rat taste receptor cells that express components of the phospholipase C signaling pathway. J Comp Neurol 468:311–321.

Daneman, D. 2006. Type 1 diabetes. Lancet ,367:847–858.

DeFazio, R.A., Dvoryanchikov, G., Maruyama, Y., Kim, J.W., Pereira, E., Roper, S.D. and Chaudhari, N. 2006. Separate populations of receptor cells and presynaptic cell in mouse taste buds. J. Neurosci. 26:3971-3980.

De la Monte, S. M. 2009. Insulin resistance and Alzheimer's disease. BMB reports 42(8): 475-481.

Delay, R.J., Kinnamon, SC., and Roper, SD. 1997. Serotonin modulates voltage dependent calcium current in Necturus taste cells. J.Neurophysiol. 77:2515–2524.

De Matos, F., Casaccia, M., and Reis, C. 2011. Serotonin and hypothalamic control of hunger: a review. Rev Assoc Med Bras. 57(1):74-75.

Dess, NK., and Edelhait, D. 1998.The bitter with the sweet: the taste/stress/temperament nexus. Biol. Psychol. 48:103–119.

Díaz, M., Baiza, L.A., Ibáñez, M.A., Pascoe, D., Guzmán, A.M., y Kumate, J. 2004. Aspectos moleculares del daño tisular inducido por la hiperglucemia crónica. *Gaceta Médica de México*, 140(4):437-447.

Dvoryanchikov, G., Tomchik, SM. and Chaudhari, N. 2007. Biogenic amine synthesis and uptake in rodent taste buds. *J. Comp. Neurol*, 505:302–313.

Filip, M., and Bader, M. 2009. Overview on 5-HT receptors and their role in physiology and pathology of the central nervous system. *Pharmacological Reports*, 61:761-777.

Fink, KB., and Göthert, M. 2007. 5-HT receptor regulation of neurotransmitter release. *Pharmacol. Rev.* 59, 360–417.

Finger, TE., Danilova, V., Barrows, J., Bartel, DL., Vigers, AJ., Stone, L., Hellekant, G., and Kinnamon, SC. 2005. ATP signaling is crucial for communication from taste buds to gustatory nerves. *Science*, 310:1495–1499.

Hannon, J., and Hoyer, D. 2008. Molecular biology of 5-HT receptors. *Behav Brain Res.* 195: 198–213.

Haratz, S. and Tanne, D. 2011. Diabetes, hyperglycemia and the management of cerebrovascular disease. *Neurology*, 24:81-88.

Harris-Maureen, I. 2003. Definición y Clasificación de la diabetes mellitus y criterios actuales para el diagnóstico. En *Diabetes Mellitus fundamentos y clínica*. 2002. LeRoith, D., Taylor, S. I., Olefsky, J. M. (Eds.) Mc Graw Hill. Pág. 406-414.

Heath, T. P., Melichar, J. K., Nutt, J.D., and Donaldson, F. L. 2006. Human Taste Thresholds Are Modulated by Serotonin and Noradrenaline. *The Journal of Neuroscience*, 26(49):12664 –12671.

Hernández-Fonseca, JP., Rincón, J., Pedrañez, A., Viera, N., Arcaya, JL., Carrizo, E. and Mosquera, J. 2009. Structural and ultrastructural analysis of cerebral cortex, cerebellum, and hypothalamus from diabetic rats. *Experimental Diabetes Research*. 1-12

Herness, M.S., and Chen, Y. 1997. Serotonin inhibits calcium-activated K<sup>+</sup> current in rat taste receptor cells. *Neuroreport*. 8(15):3257-3261.

Herness, M.S., and Chen, Y. 2000. Serotonin inhibits calcium-activated potassium and voltage-dependent sodium currents in rat taste receptor cells. *The journal of membrane biology*, 173(2):127-138.

Herness, S., Zhao, FL., Kaya, N., Lu, SG., Shen, T., and Sun, XD. 2002. Adrenergic signalling between rat taste receptor cells. *J. Physiol. (Lond)* 543:601–614.

Herrera, R., Manjarréz, G., Nishimura, E., and Hernandez, J. 2003. Serotonin-Related Tryptophan in children with insulin-dependent diabetes. *Pediatric neurology* 28(1):20-23.

Hirschfeld, RM. 2000. History and evolution of the monoamine hypothesis of depression. *J. Clin. Psychiatry*, 61 [Suppl 6]:4–6.

Hoyer, D., Hannon, JP., and Martin, GR. 2002. Molecular, pharmacological and functional diversity of 5-HT receptors. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 71: 533–554.

Huang, YA., Dando, R., and Roper, SD. 2009. Autocrine and paracrine roles for ATP and serotonin in mouse taste buds. *J. Neurosci.* 29:13909-13918.

Huang, YA., Maruyama, Y., and Roper, SD. 2008. Norepinephrine is co-released with serotonin in mouse taste buds. *J. Neurosci.* 28:13088 –13093.

Huang, T. and Staehler, F., 2009. Effects of dietary Na<sup>+</sup> deprivation on epithelial Na<sup>+</sup> channel (ENaC), BDNF, and trkB mRNA expression in the rat tongue. *BMC Neurosci.* 10-19.

Huang Y.J, Maruyama, Y., Dvoryanchikov, G., Pereira, E., Chaudhari ,N., and Roper, SD. 2007. The role of pannexin 1 hemichannels in ATP release and cell-cell communication in mouse taste buds. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 104:6436–6441.

Huang, Y.J. Maroyama, Y., Lu, K.S., Perira, E., Plosky, I., Baur, J.E., Wu, D., and Roper, S.D. 2005a. Mouse taste buds use serotonin as a neurotransmitter. *The Journal of neuroscience*, 143(2): 87-96.

Huang, Y.J., Maruyama, Y., Lu, K.S., Perira, E., Plosky, I., Baur, J.E., Wu, D., and Roper, S.D., 2005b. Using biosensors to detect the release of serotonin from taste buds during taste stimulation. *Archives italiennes de biologie.* 143(2):87-96.

Ishimaru, Y., and Matsunami, H. 2009. Transient Receptor Potential (TRP) Channels and Taste Sensation. *J. Dent. Res.* 88: 212-218.

Ishimaru, Y. 2009. Molecular mechanisms of taste transduction in vertebrates. *Odontology*.97:1-7

Jørgensen, HS. 2007. Studies on the neuroendocrine role of serotonin. *Dan. Med. Bull.* 54: 266–288.

Juárez, M.B. 2008. Implementación de un modelo de diabetes mellitus tipo 1. Tesis de licenciatura. Facultad de Químico farmacobiología, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Morelia, Mich., México.

Kahan, R. 1997. Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care*, 20:1183-1193.

Kaya, N., Shen, T., Lu, S.G., Zhao, F.L., and Herness, S. 2004. A paracrine signaling role for serotonin in rat taste buds: expression and localization of serotonin in rat taste buds: expression and localization of serotonin receptor subtypes. *American Journal of physiology. Regulatory, Integrative Physiology*, 286 (4): R649-R658.

Kim, D.J., and Roper, S.D. 1995. Localization of serotonin in taste buds: a comparative study in four vertebrates. *The journal of comparative neurology*. Vol. 353(3): 364-370.

Kobayashi, C., and Kennedy, LM. 2002. Experience-induced changes in taste identification of monosodium glutamate. *Physiol. Behav.* 75:57– 63.

Kobayashi, C. Kennedy, L.M., and Halpern, B.P. 2006. Experience-induced changes in taste identification of monosodium glutamate (MSG) are reversible. *Chem. Senses*, 31:301–306.

Kumar, P. T., Antony, S., Gireesh, G., George, N., Paulose, C.S. 2010. Curcumin modulates dopaminergic receptor, CREB and phospholipase c gene expression in the cerebral cortex and cerebellum of streptozotocin induced diabetic rats. *Journal of Biomedical Science*. 17:43

Le Floch, JP., Le Lievre, G., Sadoun, J., Perlmutter, L., Peynegre, R., and Hazard, J. 1989. Taste impairment and related factors in type I diabetes mellitus. *Diabetes Care*, 12:173-178.

Le Floch, J.P., Le Lievre, G., Labroue, M., Peynegre, R., and Perlemutter, 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.* 1:208-214.

Lenzen, S. 2008. The mechanisms of alloxan and streptozotocin-induced diabetes. *Diabetologia*, 51:216–226.

- Leysen, J.E. 2004. 5-HT<sub>2</sub> receptors. *Curr. Drug. Targets. CNS Neurol. Disord.* 3:11–26.
- Lindemann, B. 2001. Receptors and transduction in taste. *Nature*, 413: 219-225.
- McCall, A.L. 1992. The Impact of Diabetes on the CNS. *Diabetes*, 41: 557-70.
- McCall, A.L. 2002. Diabetes mellitus and the central nervous system. *Neurobiology* 51: 415-454.
- Maiese, K., Morhan, S.D., and Chong, Z.Z. 2007. Oxidative stress biology and cell injury during type 1 and type 2 diabetes mellitus. *Curr Neurovasc. Res.* 4(1):63-71.
- Manjarréz, G., Herrera, R., León, M., and Hernandez, J. 2006. A low Brain serotonergic neurotransmission in children with type 1 diabetes mellitus detected through the intensity dependence of auditory-evoked potential. *Diabetes Care*, 29(1):73-77.
- Marks, L. E., and Wheeler, M. E. 1998. Attention and the detectability of weak taste stimuli. *Chem. Senses*, 23:19–29.
- Mattes, R.D. 2002. Nutrición y Sentidos Químicos, en *Nutrición en salud y enfermedad*. Shils Maurice E., Olson James A., Shike Moshe, Ross A. C. (Eds.) Mc Graw Hill. 42:765-776.
- Miller, S.M., and Naylor, G.J. 1989. Unpleasant taste—a neglected symptom in depression. *J Affect. Disord.* 17:291–293.
- Miura, H., Kusakabe, Y. and Harada, S. 2006. Cell lineage and differentiation in taste buds. *Arch Histol Cytol*, 69 (4): 209-225.
- Mohanam, V., Kaimal, S. and Paulose C. 2005. Decreased 5-HT<sub>1A</sub> Receptor Gene Expression and 5-HT<sub>1A</sub> Receptor Protein in the Cerebral Cortex and Brain Stem during Pancreatic Regeneration in Rats. *Neurochemical Research* 30( 1): 25–32.
- Mohammad-Zadeh, L. F., Moses, L., Gwaltney-Brant, S. M. 2008. Serotonin: a review. *J. Vet. Pharmacol. Therap.* 31:187–199.
- Nada, O., and Hirata, K. 1975. The occurrence of the cell type containing a specific monoamine in the taste bud of the rabbit's foliate papilla. *Histochemistry*, 43 :237-240.

Nagai, T., Kim, DJ., Delay RJ., and Roper, SD. 1996. Neuromodulation of transduction and signal processing in the end organs of taste. *Chem. Senses*, 21:353–365.

Nagai, T., Delay, RJ., Welton, J., and Roper, SD. 1998. Uptake and release of neurotransmitter candidates, [3H]serotonin, [3H]glutamate, and [3H]gammaaminobutyric acid, in taste buds of the mudpuppy, *Necturus maculosus*. *J. Comp. Neurol.* 392:199–208.

Nakamura, K., Norgren, R., 1995. Sodium-deficient diet reduces gustatory activity in the nucleus of the solitary tract of behaving rats. *Am. J. Physiol.* 269, R647–R661.

Nebigil, C.G., Choi, D.S., Dierich, A., Hickel, P., Le Meur, M., Messaddeq, N., Launay J.M. and Maroteaux, L. 2000. Serotonin 2B receptor is required for heart development. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97: 9508-9513.

Neumeister A, Bain E, Nuqent AC et al. 2004. Reduced serotonin type 1A receptor binding in panic disorder. *J Neurosci* 24:589–91.

Oleskevich, S., and Descarries, L. 1990. Quantified distribution of the serotonin innervation in adult rat hippocampus. *Neuroscience* 34: 19-33.

Ogura, T. 2002. Acetylcholine increases intracellular  $Ca^{2+}$  in taste cells via activation of muscarinic receptors. *J. Neurophysiol.* 87:2643–2649.

Pai, MH., Ko, TL., and Chou, HC. 2006. Effects of streptozotocin-induced diabetes on taste buds in rat vallate papillae. *Acta Histochem.* 109:200-207.

Prado, RL. 2010. Efecto de la diabetes mellitus experimental sobre la expresión del receptor del gusto azucarado en la papila caliciforme de la rata. Tesis de maestría, Facultad de Químico farmacobiología, Programa institucional de maestría en ciencias biológicas, Universidad Michoacana de San Nicolás de hidalgo. Morelia, Mich., México.

Polter, M.A., and Li, X. 2010. 5-HT1A receptor-regulated signal transduction pathways in brain. *Cellular Signalling*, 22:1406–1412

Powers-Alvin, C. 2006. Diabetes mellitus. En Harrison Principios de medicina interna. Mc Graw Hill. Pág. 2367-2383.

Ramos, H.G. and Domingo, J. 1994. Diabetes mellitus experimental. *Ciência veterinária*, 6:348-371.

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

Robert F. Lundy Jr. 2008. Gustatory hedonic value: Potential function for forebrain control of brainstem taste processing *Neurosci Biobehav Rev.* 32(8): 1601–1606

Romanov, RA., Rogachevskaja, OA., Bystrova, MF., Jiang, P., Margolskee, RF., and Kolesnikov, SS. 2007. Afferent neurotransmission mediated by hemichannels in mammalian taste cells. *EMBO J.* 26:657–667.

Sandrini. M., Vitale, G., Vergoni, A.V., Ottani, A. and Bertolini, A. 1997. Streptozotocin-induced diabetes provokes changes in serotonin concentration and on 5-HT<sub>1A</sub> and 5-HT<sub>2</sub> receptors in the rat brain. *Life Scienar.* 60(16): 1393-1397.

Sargent PA, Kjaer KH, Bench CJ et al. 2000. Brain serotonin1A receptor binding measured by positron emission tomography with [11C]WAY-100635: effects of depression and antidepressant treatment. *Arch Gen Psychiatry* 57:174–80.

Seino, S., Shibasaki, T. and Minami, K. 2010. Pancreatic  $\beta$ -cell signaling: toward better understanding of diabetes and its treatment. *Japan, Academy*, 86: 563-577.

Shin, Y.K., Martin, B., Golden, E., Dotson, C.D., Maudsley, S., Kim, W., Jang, H.J., Mattson, M.P., Drucker, D.J., Egan, J.M., Munger, S.D., 2008. Modulation of taste sensitivity by GLP-1 signaling. *J. Neurochem.* 106:455–463.

Simon, SA., de Araujo, IE., Gutierrez, R., and Nicolelis, MA. 2006. The neural mechanisms of gustation: a distributed processing code. *Nat. Rev. Neurosci.* 7:890–901.

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

Stone, LM., Finger, TE., Tam, PPL. and Tan, SS. 1995. Taste receptor cells arise from local epithelium, not neurogenic ectoderm. *Proc Natl Acad Sci Usa.* 92:1916-1920.

Suzuki, T. 2007. Cellular mechanisms in taste buds. *Bull Tokyo Dent Coll.* 48(4):151-61.

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

Tepper, B.J., and Seldner, A.C., 1999. Sweet taste and intake of sweet foods in normal pregnancy and pregnancy complicated by gestational diabetes mellitus. *Am. J. Clin. Nutr.* 70: 277–284.

Van Den Berg, L., Versteeg, S. and Van Oost, B. 2003. Isolation and characterization of the canine serotonin receptor 1A gene (htr 1A). *Journal of Heredity*, 94: 49–56.

Vandenbeuch A., Tizzano, M., Anderson, CB., Stone, LM., Goldberg, D., and Kinnamon SC. 2010. Evidence for a role of glutamate as an efferent transmitter in taste buds. *BMC Neuroscience*. 11:77.

Vinik, A.I., Pittenger, G.L., McNitt, P., and Stansberry, K. B. 2003. Neuropatías diabéticas. En *Diabetes Mellitus fundamentos y clínica*. LeRoith D., Taylor S. I., Olefsky J. M. (Eds.) Mc Graw Hill. 92: 1131-1180.

Wang, ZY., Keith, IM., Olson. Jr EB., Vidruk, EH., and Bisgard, GE., 2002. Expression of 5-HT<sub>3</sub> receptors in primary sensory neurons of the petrosal ganglion of adult rats. *Auton. Neurosci*. 95:121–124.

Wohlpert, K.L. and Molinoff, P.B. 2006. Regulation of level of 5-HT<sub>2A</sub> receptor Mrna. *Annals New York Academy of Sciences*, 128-135

Yee, CL, Yang R., Bottger, B., Finger, T.E., and 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. *The journal of comparative neurology*, 459(1):15-24.

Yoshida, R., Yasumatsu, K., Shigemura, N., and Ninomiya, Y. 2006. Coding channels for taste perception: information transmission from taste cells to gustatory nerve fibers. *Arch. Histol. Cytol*. 69 (4): 233-242.

Zhong, H.J., Zhang, M., and Nurse, C.A. 1999. Electrophysiological characterization of 5-HT receptor on rat petrosal neurons in dissociated cell culture. *Brain Res*. 816:544-553.

Zhou, L.H., Liu, X.M., Feng, X.H., Han, L.O., Liu, G.D., 2008. Expression of alpha-gustducin in the circumvallate papillae of taste buds of diabetic rats. *Acta Histochem*. 111:145–149.