



# **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**

**“ESTIMULACIÓN DEL SISTEMA SEROTONINÉRGICO EN RATAS CON  
DIABETES MELLITUS EXPERIMENTAL”**

**PRESENTA:**

**Q.F.B. OMAR ALBERTO SIFUENTES RUELAS**

**PARA OBTENER EL GRADO DE:  
MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**DIRECTOR DE TESIS**

**Doctor en Ciencias en Fisiología Biofísica y Neurociencias con  
Especialidad en Neurociencias. ROSALÍO MERCADO CAMARGO**

**MORELIA, MICHOACÁN, Marzo de 2014**

**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.  
Trabajo Parcialmente apoyado por: CIC-  
UMSNH. 26.12 (2013-2014), ANUIES-CONACyT-  
SEP-ECOS NORD M12S01, Becario CONACyT  
270423/445240.**

## DEDICATORIA

*A la memoria de mi madre Rosa Gloria Ruelas Vázquez  
Por sus enseñanzas y su ejemplo de vida que me dio, siempre estarás en  
mi mente y mi corazón.*

*A mis hermanos Pilar, José y Antonio  
Por su apoyo que me brindaron.*

*A mi familia que siempre están ahí para apoyarme.*

## AGRADECIMIENTOS

Al D.C. Rosalio Mercado Camargo, por su paciencia y dedicación para llevar a cabo este trabajo de investigación.

A mis sinodales:

D.C. Alejandra Ochoa Zarzosa

D.C. Consuelo de Jesús Cortes Penagos

D.C. Daniel Godínez Hernández

D.C. Joel E. López Meza

D.C. Héctor E. Martínez Flores

Por su tiempo para compartir sus conocimientos conmigo y sus aportaciones para este trabajo de tesis.

A Miguel Angel Patiño Patiño porque siempre pude contar con su amistad y apoyo.

A mis compañeros de laboratorio Susana, Roberto, Pedro, Oscar, Jesús, Edson, Humberto, por estar siempre conmigo y apoyando en el trabajo realizado.

## CONTENIDO

|   | Página |
|---|--------|
| ÍNDICE DE FIGURAS .....   | III    |
| ÍNDICE DE TABLAS.....   | IV     |
| LISTA DE ABREVIATURAS .....   | V      |
| RESUMEN.....  | VI     |
| ABSTRACT .....  | VII    |
| 1. ANTECEDENTES .....   | 1      |
| 1.1. Diabetes Mellitus .....  | 1      |
| 1.2. Dislipidemia .....   | 4      |
| 1.3. Sistema gustativo .....  | 5      |
| 1.4. Sistema serotoninérgico .....                                    | 7      |
| 1.5. Receptores serotoninérgicos.....                                 | 10     |
| 1.4.1. Receptor 5-HT <sub>1</sub> .....                               | 11     |
| 1.4.2. Receptor 5-HT <sub>2</sub> .....                               | 11     |
| 1.4.3. Receptor 5-HT <sub>3</sub> .....                               | 12     |
| 1.5. Relación entre la serotonina y el gusto .....                    | 13     |
| 2. JUSTIFICACIÓN.....   | 15     |
| 3. HIPÓTESIS.....   | 16     |
| 4. OBJETIVOS.....   | 17     |
| 4.1. Objetivo General.....  | 17     |
| 4.2. Objetivos específicos.....                                       | 17     |
| 5. MATERIALES Y MÉTODOS .....   | 18     |
| 5.1. Animales.....  | 18     |
| 5.2. Inducción de diabetes mellitus experimental (DME).....           | 18     |
| 5.3. Estimulación del sistema serotoninérgico.....                    | 18     |
| 5.4. Evaluación de la percepción gustativa de la modalidad dulce..... | 19     |
| 5.5. Monitoreo de la ingesta alimenticia .....                        | 19     |
| 5.6. Peso corporal .....  | 19     |
| 5.7. Pruebas bioquímicas .....  | 19     |
| 5.7.1. Nivel de glucemia.....   | 19     |

|  |    |
|--|----|
| 5.7.2. Perfil de lípidos.....                                    | 20 |
| 5.8. Obtención de tejidos.....                                   | 20 |
| 5.9. Obtención de RNA Total .....                                | 20 |
| 5.9. Reacción de retrotranscripción (RT).....                    | 21 |
| 5.10. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) .....            | 22 |
| 5.11. Análisis estadístico.....                                  | 23 |
| 6. RESULTADOS.....   | 24 |
| 6.1. Niveles glucémicos en la implementación del modelo DME..... | 24 |
| 6.2. Evaluación de la percepción gustativa .....                 | 24 |
| 6.3. Ingesta de alimento .....                                   | 27 |
| 6.4. Peso corporal .....   | 29 |
| 6.5. Pruebas bioquímicas.....                                    | 31 |
| 6.5.1. Niveles de glucosa.....                                   | 31 |
| 6.5.2. Perfil de lípidos.....                                    | 31 |
| 6.6. Validación para el control interno $\beta$ -actina.....     | 34 |
| 6.7 Expresión del receptor 5-HT <sub>1A</sub> .....              | 34 |
| 6.8 Expresión del receptor 5-HT <sub>2B</sub> .....              | 36 |
| 6.9 Expresión del receptor 5-HT <sub>3A</sub> .....              | 38 |
| 6.10 Expresión de la Triptófano Hidroxilasa 1.....               | 40 |
| 7. DISCUSIÓN .....   | 41 |
| 8. CONCLUSIONES .....  | 47 |
| 9. BIBLIOGRAFÍA .....  | 48 |

## ÍNDICE DE FIGURAS

|   | Página |
|---|--------|
| Figura 1. Esquema de los procesos asociados con la neurotransmisión serotoninérgica.<br>..... | 8      |
| Figura 2. Niveles de glucemia en las ratas. ....  | 24     |
| Figura 3. Niveles de glucemia en ratas con DME y tratadas con L-Trp. ....                     | 31     |
| Figura 4. Expresión del receptor 5-HT <sub>1A</sub> en la corteza cerebral de ratas. ....     | 34     |
| Figura 5. Expresión del receptor 5-HT <sub>1A</sub> en la papila caliciforme de ratas. ....   | 35     |
| Figura 6. Expresión del receptor 5-HT <sub>2B</sub> en el cerebelo de ratas. ....             | 36     |
| Figura 7. Expresión del receptor 5-HT <sub>2B</sub> en la papila caliciforme de ratas. ....   | 37     |
| Figura 8. Expresión del receptor 5-HT <sub>3A</sub> en el tallo cerebral de ratas. ....       | 38     |
| Figura 9. Expresión del receptor 5-HT <sub>3A</sub> en la papila caliciforme de ratas. ....   | 39     |
| Figura 10. Expresión de la TPH1 en la papila caliciforme de ratas. ....                       | 40     |

## ÍNDICE DE TABLAS

|  | Página |
|--|--------|
| Tabla 1. Condiciones de reacción para la RT .....                              | 21     |
| Tabla 2. Condiciones para PCR .....  | 22     |
| Tabla 3. Secuencias de oligonucleótidos específicos empleados para la PCR..... | 23     |
| Tabla 4. Consumo de agua .....   | 26     |
| Tabla 5. Consumo de solución de sacarosa.....                                  | 26     |
| Tabla 6. Ingesta de Alimento .....   | 28     |
| Tabla 7. Peso corporal .....   | 30     |
| Tabla 8. Pruebas bioquímicas .....   | 33     |
| Tabla 9. Valores de Referencia de Pruebas Bioquímicas .....                    | 33     |

## LISTA DE ABREVIATURAS

|                    |   |   |
|--------------------|---|---|
| 5-HT               | - | Serotonina  |
| 5-HT <sub>1A</sub> | - | Receptor de serotonina 1A   |
| 5-HT <sub>2B</sub> | - | Receptor de serotonina 2B   |
| 5-HT <sub>3A</sub> | - | Receptor de serotonina 3A   |
| °C                 | - | Grados centígrados  |
| ARNm               | - | Ácido ribonucleico mensajero  |
| ATP                | - | Adenosín Tri-fosfato  |
| C                  | - | Grupo control   |
| CDA                | - | Grupo control con dosis en etapa aguda                                      |
| CDAyC              | - | Grupo control con dosis en etapa aguda y crónica                            |
| CDC                | - | Grupo control con dosis en etapa crónica                                    |
| D                  | - | Grupo con Diabetes Mellitus experimental                                    |
| DDA                | - | Grupo con diabetes mellitus experimental con dosis en etapa aguda           |
| DDAyC-             | - | Grupo con diabetes mellitus experimental con dosis en etapa aguda y crónica |
| DDC                | - | Grupo con diabetes mellitus experimental con dosis en etapa crónica         |
| DM                 | - | Diabetes Mellitus   |
| DME                | - | Diabetes Mellitus experimental  |
| g                  | - | gramos  |
| h                  | - | horas   |
| i.p.               | - | intra-peritoneal  |
| Kg                 | - | kilogramos  |
| L-Trp              | - | Aminoácido L-Triptófano   |
| Mg                 | - | miligramos  |
| NE                 | - | Norepinefrina   |
| RT-PCR             | - | Transcriptasa Reversa- Reacción en Cadena de la Polimerasa                  |
| SNC                | - | Sistema Nervioso Central  |
| SNP                | - | Sistema Nervioso Periférico   |
| STZ                | - | Estreptozotocina  |
| SS                 | - | solución de sacarosa al 10%   |
| TPH1               | - | Triptófano 5-hidroxilasa tipo 1   |
| TPH2               | - | Triptófano 5-hidroxilasa tipo 2   |

## RESUMEN

La sensación del gusto es detectada en células gustativas que se agrupan en corpúsculos gustativos localizados en las papilas gustativas que son estructuras especializadas ubicadas en la cavidad oral. En las papilas gustativas se ha demostrado la presencia de la serotonina (5-HT) y de los receptores serotoninérgicos 5-HT<sub>1A</sub>, que está localizados en las células de tipo II que sintetizan 5-HT, el 5-HT<sub>3</sub> que se expresa en las fibras aferentes gustativas y participan en la transmisión de las modalidades gustativas del sabor dulce y amargo, y el receptor 5-HT<sub>2B</sub> que se expresa en la papila caliciforme. Se ha propuesto que puede tener participación en el papel trófico de la 5-HT. La síntesis de 5-HT se efectúa a partir del aminoácido esencial L-Triptófano (L-Trp) mediante la participación de la triptófano 5-hidroxilasa (TPH). Experimentalmente se puede inducir un incremento de la síntesis de 5-HT mediante administración de su precursor el L-Trp. Existen reportes de nuestro laboratorio que muestran un incremento en la expresión de los receptores 5-HT<sub>2B</sub> y 5-HT<sub>3</sub> en la papila caliciforme de ratas con diabetes mellitus experimental (DME); sin embargo, no se conoce si existen cambios en la expresión del receptor 5-HT<sub>1A</sub>, ni en la expresión de la TPH1, en la percepción gustativa y algunos parámetros bioquímicos, y si estos cambios pueden modificarse mediante la administración de L-Trp para activar la síntesis de 5-HT la cual se ha propuesto esta disminuida en pacientes con diabetes mellitus, por lo que, el objetivo del presente trabajo fue determinar el efecto de la administración de L-Trp sobre la expresión del ARNm de los receptores 5-HT<sub>1A</sub>, 5-HT<sub>2B</sub> y 5-HT<sub>3A</sub> y la enzima TPH1 en la papila caliciforme, la percepción del sabor dulce, la hiperglucemia y el perfil de lípidos en ratas con DME. Los resultados muestran que la hiperglucemia, la percepción dulce y el perfil de lípidos no se modificaron por la administración de L-Trp, sin embargo la expresión del receptor 5-HT<sub>2B</sub> se incrementó en cerebelo y papila caliciforme, el 5-HT<sub>3A</sub>, se modifica en tallo y papila, el 5-HT<sub>1A</sub>, demostró una disminución en la etapa aguda de la DME en corteza cerebral, por otro lado la expresión de la TPH1 se incrementó en el grupo DME y disminuyó en los grupos control. Estos resultados sugieren que la administración de L-Trp modula diferencialmente la expresión de los receptores serotoninérgicos y de la TPH1 en ratas con DME.

Palabras clave: sistema gustativo, triptófano hidroxilasa, papila caliciforme, regulación.

## ABSTRACT

The sense of taste is detected in taste cells which are grouped in taste buds located in the taste papillae that are specialized structures in the oral cavity. In taste papillae has been shown the presence of serotonin (5-HT) and serotonergic receptors such as 5-HT<sub>1A</sub> which is located in the type II cells that synthesize serotonin, the 5-HT<sub>3</sub> receptor expressed in gustatory afferents and are involved in transmitting taste modalities of sweet and sour taste and 5-HT<sub>2B</sub> receptor, expressed in the circumvallate papillae and it is proposed that can have input into the trophic role of serotonin. The synthesis of 5-HT is made from the essential amino acid L-tryptophan (L-Trp), the 5-HT synthesis could be increased experimentally by administering L-Trp. There are reports from our lab showing increased expression of the 5-HT<sub>2B</sub> and 5-HT<sub>3A</sub> receptors in circumvallate papillae of rats with experimental diabetes mellitus (EDM), it is not known whether there are changes in expression of 5-HT<sub>1A</sub> receptor and in the TPH1, in taste perception for the sweet taste and some biochemical parameters and if these changes can be modified by administration of L-Trp that activates the 5-HT synthesis which has been proposed which is reduced in patients with diabetes mellitus, so that the objective of the present work was determined the effect of administration of L-Trp on the mRNA expression of the 5-HT<sub>1A</sub>, 5-HT<sub>2B</sub> and 5-HT<sub>3A</sub> and TPH1 in the circumvallate papilla and also the effect on the sweet perception, hyperglycemic and lipids levels in rats with EDM. The results show that hyperglycemic condition, sweet taste perception and lipids levels were no modified by L-Trp. administration, however the 5-HT<sub>2B</sub> expression was increase in cerebellum and in circumvallate papillae, 5-HT<sub>3A</sub> expression was modified in stem brain and in circumvallate papillae, the 5-HT<sub>1A</sub> expression was reduced in the cerebral cortex of the EDM group, and the expresión of TPH1 was increased in the circumvallate papillae of EDM group. The present results suggest us that the administration of L-Trp. differentially modulates the expression of serotonin receptors, and the TPH1 expression in rats with EDM.

Keywords: Gustative system, tryptophan hydroxylase, circumvallate papillae, regulation.

## 1. ANTECEDENTES

### 1.1. Diabetes Mellitus

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 y Nutrición 2012 (ENSANUT 2012) estimó que existen alrededor de 6.4 millones de mexicanos mayores de 20 años que padecen DM; con una prevalencia del 9.2%, siendo 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). La tasa de mortalidad provocada por la DM en 2008 fue de 70.9 por cada 100 mil habitantes. Siendo los estados de Distrito Federal, Coahuila, Morelos, Guanajuato y Michoacán quienes presentan las mayores tasas de mortalidad por esta afección. Por el contrario, los estados con la menor tasa de mortalidad fueron Quintana Roo, Chiapas, Baja California Sur, Baja California y Sinaloa (INEGI 2010).

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 y Trucco, 2005). Las causas de la hiperglucemia son por una acción deficiente de la insulina que pueden originarse por una inadecuada secreción 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, 2013).

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 y enfermedad cerebrovascular, también se presenta a menudo la hipertensión y anormalidades del metabolismo de las lipoproteínas (ADA, 2013).

Las complicaciones crónicas de la DM pueden afectar muchos órganos y son responsables de gran parte de la morbilidad y mortalidad que acompaña a este trastorno. 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, 2013). La DM 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). Las neuropatías diabéticas abarcan una amplia gama de anormalidades nerviosas y son comunes, con tasas de prevalencia elevadas dependiendo del criterio de diagnóstico. Las neuropatías diabéticas afectan tanto al sistema nervioso periférico como al autónomo y la causa considerable de morbilidad y mortalidad, en pacientes con diabetes mellitus tipo 1 y tipo 2. La neuropatía diabética es la forma más común de las neuropatías, representan más hospitalizaciones que todas las otras complicaciones de la DM, siendo responsables de 50-75% de las amputaciones no traumáticas (Vinik *et al.*, 2008). La neuropatía de origen diabético es un cuadro heterogéneo que incluye muy diversas disfunciones y cuya aparición podría atribuirse a la propia DM 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 DM 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).

Los pacientes con diabetes mellitus tipo 1 (DMT1) pueden presentar trastornos en los niveles plasmáticos de lípidos tales como hipertrigliceridemia y colesterol HDL bajo y, con frecuencia colesterol LDL alto (Guy *et al.*, 2009). Algunos pacientes también muestran defectos en la regulación del metabolismo de los lípidos del plasma que no son evaluados en forma rutinaria, tales como el aumento en algunas subfracciones de LDL. Así mismo, se encuentran alteraciones en la transferencia de lípidos en los pacientes. Este proceso, en el que se intercambian entre las clases de lípidos de lipoproteínas, depende de proteínas de transferencia, tales como las proteínas de transferencia de ésteres de colesterol (CETP) y la proteína de transferencia de fosfolípidos (PLTP) (Erbey *et al.*, 1999; Perez *et al.*, 1997; Bagdade *et al.*, 1991).

El uso de agentes químicos para inducir la 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 DME en ratas mediante el uso de estos químicos es muy conveniente y de uso simple (Ramos y 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 fragmentos del ácido desoxirribonucleico (ADN) y destruye las células  $\beta$ , causando un tipo de diabetes insulino dependiente (Lenzen, 2008).

## 1.2. Dislipidemia

En general, las personas con diabetes que tienen resistencia a la insulina también tienen mayores niveles circulantes de triglicéridos y las concentraciones de colesterol HDL más bajas, y por lo general manifiestan el síndrome metabólico (Grundy *et al.*, 2005). El síndrome metabólico es un predictor de riesgo futuro de enfermedad cardiovascular (Wilson *et al.*, 2005). En concreto, se reconoce ampliamente que los niveles más altos de partículas pequeñas y densas de LDL son un factor importante del aumento de riesgo de Evento Cerebral Vascular en pacientes resistentes a la insulina (Kathiresan *et al.*, 2006). La evidencia apoya que los niveles altos de triglicéridos (Pillutla *et al.*, 2005) o niveles más altos de colesterol no HDL (Velagaleti *et al.*, 2009) aumentan el riesgo de desarrollar insuficiencia cardíaca, tal vez debido a la presencia de resistencia a la insulina que predispone a los cambios metabólicos caracterizados por la oxidación de ácidos grasos del miocardio y deterioro del mayor desacoplamiento de proteínas mitocondriales en el corazón. Por lo tanto, en un paciente resistente a la insulina, la absorción de glucosa miocárdica disminuye (Dutka *et al.*, 2006). De hecho, los pacientes con miocardiopatía no isquémica todavía pueden exhibir relativamente una preservada captación miocárdica de glucosa en presencia de sensibilidad a la insulina (Dávila-Román *et al.*, 2002). Otra fracción lipídica posible que podría estar asociada en el aumento del riesgo de insuficiencia cardíaca en los diabéticos son los niveles más altos de lipoproteína (a) (The Emerging Risk Factors Collaboration, 2009). La expresión disminuida de los receptores activados por el proliferador de peroxisomas- $\alpha$  (PPAR- $\alpha$ ) aumenta el metabolismo de la glucosa y previene la dilatación cardíaca, mientras que su sobreexpresión conduce a la miocardiopatía severa (Sarma *et al.*, 2010).

Los defectos metabólicos básicos en el paciente diabético incluyen hiperglucemia, resistencia a la insulina y el aumento de los niveles circulantes de ácidos grasos libres. La incapacidad de las células del miocardio para metabolizar el piruvato en la diabetes da como resultado la acumulación de lípidos en el miocardio y la disminución de la captación de glucosa por las células del miocardio (Boudina y Abel, 2007). Además, la

dislipidemia y la producción de radicales libres resultan en la alteración de los factores de transcripción genética, lo que altera posteriormente la traducción de los genes de nucleoproteínas tales como los del sistema de renina-angiotensina (RAS) y de Factor de crecimiento similar a la insulina 1 (IGF-1) (Ren *et al.*, 1999).

### **1.3. 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, en donde el sistema gustativo es el encargado de la selección de los alimentos y nos ayuda a prevenir que se ingieran sustancias tóxicas (Dvoryanchikov *et al.*, 2009).

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 (Simon *et al.*, 2006).

Las papilas gustativas (del latín *papilla* = eminencia), son grupos de células conectadas con fibras nerviosas, se dividen en tres clases en función de su morfología: fungiforme, caliciforme y foliada, cada una de ellas está constituida de un número variable de corpúsculos gustativos. Los corpúsculos gustativos son órganos sensoriales que traducen los estímulos químicos en señales que son transmitidas al sistema nervioso central (SNC) vía las fibras aferentes gustativas primarias (Huang *et al.*, 2009). 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 cada 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 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). Se ha propuesto que varios de los neurotransmisores están presentes en las sinapsis de los corpúsculos gustativos, entre ellos la serotonina (5-HT), la norepinefrina (NE), el glutamato, la acetilcolina y el 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 el 5-HT, NE, y ATP han sido identificados y demostrado que son 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 secretan ATP (Huang *et al.*, 2007; Romanov *et al.*, 2007), mientras que las células presinápticas liberan serotonina y noradrenalina (Huang *et al.*, 2005a, 2005b, 2007, 2008).

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 purino receptores ionotrópicos, pero también activa los receptores purinérgicos P2Y<sub>4</sub> en las células presinápticas. Esto resulta en la liberación de Ca<sup>2+</sup> 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).

## 1.4. Sistema serotoninérgico

La serotonina (5-hidroxitriptamina, 5-HT) 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 y Bader, 2009; Polter y Li, 2010). 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 y Bader, 2009; Oleskevich y Descarries, 1990; Polter y Li, 2010).

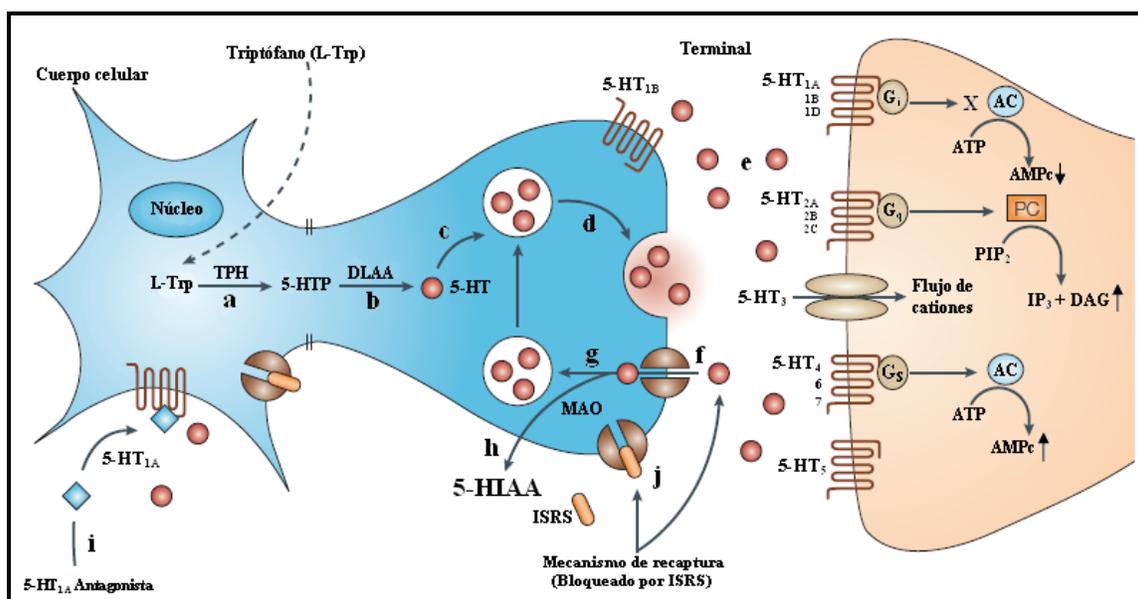
La 5-HT es un neurotransmisor implicado en múltiples funciones vitales del organismo. A nivel central, la 5-HT participa en el control de las secreciones neuroendocrinas, en la termorregulación, regulación hormonal, en la conducta sexual, en el estado de ánimo y en la ingesta alimenticia; cambios en 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 y Bader, 2009; Polter y Li, 2010).

### 1.3.1. Biosíntesis de serotonina

La serotonina, y el aminoácido esencial triptófano del que procede, pertenecen a un grupo de compuestos aromáticos llamados índoles, con un anillo de cinco elementos que contiene el nitrógeno unido a un anillo de benceno. Para sintetizar la serotonina son necesarias dos enzimas: la triptófano hidroxilasa (TPH) y la 5-hidroxitriptófano descarboxilasa (Kandel, 2001).

Las neuronas serotoninérgicas contienen todas las enzimas necesarias para la síntesis de la 5-HT a partir de su precursor L-Trp. La reacción mediada por la TPH es una etapa

limitante en la vía (Hernández, 1979). La TPH se ha identificado en dos formas existentes en la naturaleza: la TPH1 localizada a nivel periférico, y la TPH2, que es una isoforma cerebro-específica (Walther *et al.*, 2003; Sakowski *et al.*, 2006). La TPH2 no se satura por el sustrato, por tanto la cantidad de L-Trp existente en el encéfalo influye en la síntesis de 5-HT (Trulson y Mackenzie, 1980). Posteriormente una vez originado el 5-hidroxitriptófano, éste es descarboxilado por la acción de una descarboxilasa de los L-aminoácidos aromáticos (DLAA) para originar la 5-hidroxitriptamina (Figura 1).



**Figura 1. Esquema de los procesos asociados con la neurotransmisión serotoninérgica.**

a) La TPH cataliza la conversión de L-Trp a 5-HTP. b) La DLAA cataliza la conversión de 5-HTP en 5-HT. c) La 5-HT se recoge en las vesículas de almacenamiento. d) Las vesículas liberan la 5-HT en el espacio sináptico. e) La 5-HT puede activar los diversos subtipos de la familia de receptores serotoninérgicos (1, 2, 3, 4, 5, 6 y 7), que interaccionan con sus respectivos sistemas de transducción de señales dentro de la neurona postsináptica. f) La 5-HT se recoge en las terminales presinápticas de 5-HT por el transportador de 5-HT. g, h) Dentro de las terminales presinápticas la 5-HT sería almacenada por las vesículas o degradada por la MAO. i) La 5-HT activa autorreceptores presinápticos somatodendríticos 5-HT<sub>1A</sub>, los cuales pueden ser bloqueado por antagonistas selectivos. j) Inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina (ISRS) como fluoxetina inhiben el transportador de 5-HT. AC, la adenilato ciclasa, DAG, diacilglicerol, IP<sub>3</sub>, inositol trifosfato; PIP<sub>2</sub>, fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato. (Tomada de: Wong et al, 2005).

La serotonina recién formada se acumula con rapidez en las vesículas sinápticas, sitios que la protegen de la monoamino oxidasa (MAO). Los neurotransmisores, en este caso la serotonina, se descargan o liberan en la hendidura sináptica por el flujo de los impulsos nerviosos, y parte de ésta se reacumula nuevamente en la terminación presináptica gracias a la acción de un portador dependiente de Na<sup>+</sup>, el transportador de 5-HT, localizado en la membrana exterior de las terminaciones axonianas

serotoninérgicas y en las plaquetas, por dónde éstas lo captan ya que no cuentan con enzimas requeridas para su síntesis (Mercado y Kilic, 2010).

La MAO, localizada en los elementos postsinápticos y las células circundantes, inactiva la 5-HT que se escapa de la recaptación, obteniendo como producto el ácido 5-hidroxi-indolacético (5-HIAA), el cual se excreta en la orina (Wong *et al.*, 2005).

El L-Trp, aminoácido esencial en el organismo, se encuentra en el plasma en dos fracciones, el 90% unido a la albumina y el otro 10% se encuentra en forma libre. La relación que guardan estas dos fracciones es la que determina que la fracción libre ingrese al cerebro a través de la BHE, para estimular o disminuir la síntesis de serotonina. Por ejemplo, la administración de precursores metabólicos, L-Trp y 5 HTP, y la desnutrición en ratas, incrementan los niveles de serotonina cerebral (Hernández, 1979).

### **1.3.2. Triptófano 5-hidroxilasa**

Durante la biosíntesis de la serotonina, la hidroxilación del L-Trp es el paso clave para dicho proceso, ya que es limitado por la actividad de la TPH y la biodisponibilidad de sus sustratos: el L-Trp, el oxígeno y la biopterina (Martínez *et al.*, 2004; Walther y Bader 2003). Esta enzima pertenece a la familia de hidroxilasas de aminoácidos aromáticos dependientes de pteridina, la cual añade un átomo de oxígeno molecular en el sustrato y reduce el otro a agua (Nakamura y Hasegawa, 2009).

De esta enzima existen dos isoformas, la TPH1 que es expresada en el intestino, la glándula pineal y la piel, mientras que la TPH2 es responsable de la biosíntesis a nivel del sistema nervioso central. En un principio se pensaba que existía un solo gen que codificaba para la TPH, sin embargo Walter y Bader, generaron un ratón knockout de TPH, donde el intestino, la glándula pineal y algunos órganos periféricos carecían de TPH y serotonina, pero en cuanto los niveles cerebrales de la serotonina se mantenían normales, con lo que sugirieron la existencia de un segundo gen para TPH. El gen de la TPH1 se encuentra en el cromosoma 7 en ratones mientras que en humanos se

encuentra en el cromosoma 11, el gen para la TPH2 se ubica en el cromosoma 10 en ratones y en el 12 en los humanos (Walter y Bader, 2003; Abumaria *et al.*, 2008).

## 1.5. 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, el sistema gastrointestinal, endocrino, cardiovascular y el sistema gustativo, por nombrar algunos (Hannon y Hoyer, 2008). Gaddum y Picarelli en 1957 fueron los primeros en sugerir que los receptores de 5-HT localizados en células del músculo liso de íleon de cobaya podrían ser bloqueados por la dibencilina, y la despolarización mediada por la serotonina por las neuronas colinérgicas intramural podrían ser bloqueadas por la morfina. Por lo tanto, clasificaron a los receptores 5-HT como subtipos "D" y "M". La investigación posterior demostró que cierta acción de la 5-HT, como la vasoconstricción en los vasos carotídeos, podría no ser bloqueada por la dibencilina ni por la morfina, con lo que se abrió la búsqueda de otros receptores "No D y no M" iniciales. (Gaddum y Hameed, 1954; Gaddum y Picarelli, 1957). 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, sus propiedades farmacológicas y la deducción de la secuencia de aminoácidos (Hoyer *et al.*, 1994). 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 y Bader, 2009; Van Den Berg *et al.*, 2003). La diversidad en los receptores de serotonina se deriva de las modificaciones post-transcripcionales, edición del ácido ribonucleico mensajero (ARNm) y splicing alternativo (Polter y Li, 2010).

### 1.4.1. Receptor 5-HT<sub>1</sub>

La familia del receptor 5-HT<sub>1</sub> comprende los receptores 5-HT<sub>1A</sub>, 5-HT<sub>1B</sub>, 5-HT<sub>1D</sub>, 5-HT<sub>1E</sub> y 5-HT<sub>1F</sub> que exhiben 40-63% de identidad de secuencia, son receptores que pueden ser acoplados a proteínas 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) (Filip y Bader, 2009; Polter y Li, 2010; Adayev *et al.*, 2005).

El gen del receptor 5-HT<sub>1A</sub> está localizado en el cromosoma humano 5q11.1-q13 y consta de 421 aminoácidos en humanos, 422 aminoácidos en ratón o en rata (Hannon y Hoyer, 2008). Este se encuentra ampliamente distribuido en el SNC, y están involucrados en funciones fisiológicas, conductuales, cognitivas y el desarrollo. La estimulación de los receptores 5-HT<sub>1A</sub> facilita la liberación en el cerebro de acetilcolina (ACh) y norepinefrina, así como la hormona liberadora de corticotropina (CRH), la hormona llamada 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 y la disminución de la secreción de la hormona del crecimiento (Fink y Göthert, 2007; Jørgensen, 2007). Así mismo, agonistas de este receptor producen hiperfagia mientras que sus antagonistas producen hipofagia (Gilbert *et al.*, 1988; Neill y Cooper, 1988).

### 1.4.2. 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 y están acoplados a una proteína G<sub>q/11</sub>. 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<sup>2+</sup> intracelular a través de la fosfolipasa C (Hannon y Hoyer, 2008). Los receptores 5-HT<sub>2</sub> median muchas de las funciones fisiológicas a nivel central y periférico de la 5-HT. 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, y la conducta sexual (Choi y Maroteaux, 1996). 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 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 la función motora, la conducta emocional (ansiolisis), la ingesta de alimentos (hiperfagia) y la percepción del dolor (Hoyer *et al.*, 2002; Leysen, 2004).

### **1.4.3. 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 super familia 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 el SNC a nivel de tallo cerebral 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 Na<sup>+</sup> y K<sup>+</sup>.

## 1.5. Relación entre la serotonina y el gusto

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. Observaciones de la modulación ambiental o de la plasticidad del sistema gustativo humano, son por lo tanto sorprendente porque se pensaba que esto no ocurría (Kobayashi y Kennedy, 2002; Kobayashi *et al.*, 2006). Por el contrario, en patologías, los umbrales de sabor son frecuentemente alterados, aunque estas alteraciones del sistema gustativo solían ser poco investigados (Miller y Naylor, 1989).

La alteración del gusto se ha reportado en la depresión y la ansiedad, había poca investigación del déficit quimiosensorial, lo que parece sorprendente, dado el impacto potencial sobre la calidad de vida (Miller y Naylor, 1989). El estrés inducido en personas normales aumenta la sensibilidad al sabor amargo de la sacarina (Dess y Edelhelt, 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 norepinefrina (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 relevante para una participación de la 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 las sintetizan, sus receptores, y la liberan en respuesta a la estimulación de las moléculas gustativas (Nagai *et al.*, 1998; Nada y Hirata, 1975; Kim y Roper, 1995; Clapp *et al.*, 2004; De Fazio *et al.*, 2006; Delay *et al.*, 1997; Huang *et al.*, 2005a, 2005b). La 5-HT modula la respuesta de las neuronas gustativas primarias, posiblemente a través de los receptores 5-HT<sub>3</sub> (Zhong *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 2002; Herness y Chen, 1997; Herness y Chen, 2000; Herness *et al.*, 2002).

Resultados previos del laboratorio (Mercado-Camargo *et al.*, 2012) indican modificaciones en la expresión de receptores serotoninérgicos en ratas con DME, así como de la existencia de la TPH1 a nivel periférico en la papila caliciforme de la rata. Con esta información se postula la existencia de un sistema serotoninérgico a nivel periférico en el sistema sensorial del gusto.

## 2. JUSTIFICACIÓN

En pacientes con DM se ha documentado que existe una disminución de la percepción de la modalidad gustativa dulce. Los trastornos del gusto, incluyendo ageusia, hipogeusia y disgeusia, puede tener un importante y negativo impacto en la salud general y en la calidad de vida. La DM 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 lleva a complicaciones que derivan en: ceguera, insuficiencia renal, neuropatía periférica, alteraciones en el metabolismo de lípidos, enfermedades cardiovasculares y amputaciones. Actualmente es la primera causa de muerte en México. Las complicaciones de la DM relacionadas con el sistema gustativo, como la ageusia y la disgeusia, pueden estar relacionadas con alteraciones en la expresión de los receptores serotoninérgicos a nivel del sistema nervioso central y del nivel del sistema gustativo periférico, específicamente en la papila caliciforme donde se ha reportado la expresión de los mismos. Por otro lado, la serotonina ha sido propuesta como un neurotransmisor que tiene un papel de factor trófico durante el desarrollo de la papila caliciforme y en la etapa adulta participa en la transmisión del sabor dulce. No se conoce si la estimulación de la síntesis de serotonina en ratas con DME, en la cual se ha observado disminución de la misma, modifica la expresión de los receptores serotoninérgicos y de la enzima limitante de la síntesis de 5-HT en la papila caliciforme de la rata, así como también si dicha estimulación modifica los niveles de glucosa y lípidos en sangre, por lo cual planteamos la siguiente:

### **3. HIPÓTESIS**

La administración de L-Triptófano modula diferencialmente la expresión de los genes de los receptores serotoninérgicos 5-HT<sub>1A</sub>, 5-HT<sub>2B</sub>, 5-HT<sub>3A</sub> y del gen de la TPH1 en la papila caliciforme, y esta modulación se restablece la percepción gustativa del sabor dulce, los niveles de glucemia y lípidos en ratas con DME.

## 4. OBJETIVOS

### 4.1. Objetivo General

Determinar si la administración de L-Triptófano modula diferencialmente la expresión de los genes de los receptores serotoninérgicos 5-HT<sub>1A</sub>, 5-HT<sub>2B</sub>, 5-HT<sub>3A</sub> y del gen de la TPH1 en la papila caliciforme, y si esta modulación restablece la percepción del sabor dulce, los niveles de glucosa y de lípidos en ratas con DME.

### 4.2. Objetivos específicos

- Determinar si existen cambios en la expresión del gen de los receptores 5-HT<sub>1A</sub>, 5-HT<sub>2B</sub> y 5-HT<sub>3A</sub> en el SNC y en la papila caliciforme de la rata con DME posterior a la administración de L-Trp.
- Determinar si existen cambios en la expresión del gen de la Triptófano 5-hidroxilasa 1 en la papila caliciforme de la rata con DME tras la administración de L-Trp.
- Determinar si la administración de L-Trp restablece la percepción del sabor dulce, los niveles de glucosa, parámetros clínicos de perfil de lípidos y hemoglobina glicosilada en ratas con DME.

## **5. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **5.1. Animales**

Para este estudio se utilizaron ratas macho adultas de la Cepa Wistar de un peso de  $300 \pm 20$  g. Los animales se mantuvieron en condiciones ambientales estándar de bioterio: ciclos de luz–oscuridad de 12 h cada uno (luz de 07:00-19:00 h), humedad relativa de 60% y temperatura de 20- 24 °C, con alimento Purina Chow® y agua *ad libitum*.

### **5.2. Inducción de diabetes mellitus experimental (DME)**

Para la inducción de la DME se administró estreptozotocina (STZ) Sigma® en dosis única de 55 mg/kg de peso vía intraperitoneal (i.p.). A los animales control se les administró el vehículo únicamente. La concentración de glucosa en sangre se determinó al inicio y, a las 48 h posteriores al tratamiento con STZ, con un glucómetro (One Touch Ultra), para determinar si los animales presentaba hiperglucemia y corroborar que la inducción de la DME fue correcta.

### **5.3. Estimulación del sistema serotoninérgico**

Con el fin de estimular el sistema serotoninérgico y observar los cambios en la expresión de los genes de los receptores así como de la enzima TPH, y si este tratamiento modificaba su percepción gustativa, se les administró L- Triptófano (Sigma), en dosis de 100 mg/kg de peso vía i.p. durante 05 días y sacrificados al sexto día. Los grupos se formaron de la siguiente manera: el control (C) al que solo se administró el vehículo; el control con dosis en etapa aguda (CDA), se le administró L-Trp al inicio de la tercera semana del esquema de DME; el control con dosis en etapa aguda y crónica (CDAyC), se le administró dos dosis de L-Trp, una al inicio de la tercera semana y la segunda al inicio de la séptima semana del esquema; el control con dosis en etapa crónica (CDC), se le administró L-Trp al inicio de la séptima semana del esquema de DME; el grupo con DME (D), se le administró el vehículo; el grupo con DME con dosis

en etapa aguda (DDA), se le administró L-Trp al inicio de la tercera semana del esquema de DME; el grupos con DME con dosis en etapa aguda y crónica (DDAyC), se le administró dos dosis de L-Trp, una al inicio de la tercera semana y la segunda al inicio de la séptima semana del esquema; el grupo con DME con dosis en etapa crónica (DDC), se le administró L-Trp al inicio de la séptima semana del esquema de DME.

#### **5.4. Evaluación de la percepción gustativa de la modalidad dulce**

A cada grupo se les proporcionó una solución de sacarosa al 10% y agua potable para medir su consumo en un lapso de 24 h previo a la inducción de la DME y posteriormente cada semana durante las diferentes etapas del desarrollo de la DME a los grupos control, diabéticos y tratados con L-Trp.

#### **5.5. Monitoreo de la ingesta alimenticia**

El consumo de alimento es importante en los animales con DME, ya que pueden presentar polifagia, una de las características de la DME. Por lo que se monitoreo el consumo de alimento a todos los grupos (control, control con L-Trp, DME y DME con L-Trp) en un periodo de 24 h cada 7 días durante el tiempo del experimento, así como antes y después de la administración del L-Trp.

#### **5.6. Peso corporal**

Un signo característico que se puede hacer presente en la DM es la pérdida de peso, por lo que se les realizó un seguimiento del peso corporal previo y durante las etapas del esquema hasta el término del mismo a todos los animales.

#### **5.7. Pruebas bioquímicas**

##### **5.7.1. Nivel de glucemia**

Se realizó la medición de los niveles de glucosa periférica con un glucómetro (One Touch Ultra) antes de la administración del L-Trp, esta medición se realizó a todos los

grupos. La medición final de glucosa se realizó con la extracción de muestra sanguínea directa del corazón al momento del sacrificio.

### **5.7.2. Perfil de lípidos**

Se llevó a cabo la medición de los niveles de colesterol, triglicéridos, lípidos totales, colesterol de baja densidad (LDL), colesterol de alta densidad (HDL), colesterol de muy baja densidad (VLDL) en la sangre obtenida del corazón al momento de sacrificio de los animales de los respectivos grupos control, control tratados con L-Trp, DME y DME tratados con L-Trp.

### **5.8. Obtención de tejidos**

Al comienzo de la cuarta y octava semana de inducción de la DME, 24 h después de la última administración de L-Trp, se sacrificaron a los animales de los grupos control, control con L-Trp, DME y DME tratados con L-Trp, mediante fractura cervical. Posteriormente se realizó una incisión media torácica exponiendo el corazón para la obtención de la muestra sanguínea para las pruebas bioquímicas de lípidos, glucosa y hemoglobina glicosilada y posteriormente 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, así como la corteza cerebral, el cerebelo y el tallo cerebral, para ser depositados en tubos Eppendorf libre de RNasas y DNasas que contenían TRIZOL®, en una proporción de 100 mg de tejido por 1 ml, y posteriormente se homogeneizaron con el empleo de un mini polytron.

### **5.9. Obtención de RNA Total**

Una vez homogeneizado el tejido y las papilas, se dejaron reposar por 5 minutos a temperatura ambiente (TA). Posteriormente se agregaron 200 µl de cloroformo por cada ml de TRIZOL®, se agitó vigorosamente y se dejó reposar por 15 minutos a TA y se centrifugó a 12 000 rcf durante 15 min a 4°C, el ARN se recuperó de la fase acuosa, la cual se depositó en un tubo Eppendorf libre de RNasas y DNasas, para enseguida

agregar 500 µl de isopropanol por cada ml de TRIZOL<sup>®</sup>, se agitó y se dejó reposar por 10 min a TA y se centrifugó a 12 000 rcf por 10 min a 4°C. Transcurrido el tiempo el sobrenadante fue decantado y la pastilla se lavó con 1 ml de etanol al 75% y se centrifugó a 12 000 rcf durante 2 min a 4°C. Se eliminó el etanol y se dejó secar durante 10 min a TA.

Finalmente, el ARN fue resuspendido en 50 µl de agua libre de nucleasas para las muestras de la corteza cerebral, el cerebelo y el tallo cerebral, y para la papila se utilizaron 20 µl. El ARN obtenido fue tratado con DNasa I (Sigma) para remover la contaminación por ADN, empleando 1 unidad de DNasa por 1 µg de ARN, durante 20 min a 37°C. La concentración de ARN fue determinada por espectrofotometría a 260 y 280 nm en una dilución 1:50 con agua libre de nucleasas.

### 5.9. Reacción de retrotranscripción (RT).

Para la síntesis de ADNc se utilizaron 5 µg de ARN total usando la enzima transcriptasa reversa (Invitrogen<sup>®</sup>). La reacción fue llevada en un volumen total de 20 µl siguiendo las instrucciones del fabricante. En cada reacción se corrió un control, en el cual la enzima fue sustituida por agua, dicho control se identificó como RT negativo. En la tabla 1 se muestran las condiciones de la reacción.

Tabla 1. Condiciones de reacción para la RT (Invitrogen<sup>®</sup>)

| Componente              | Control positivo           | Control negativo           |
|-------------------------|----------------------------|----------------------------|
| Agua libre de nucleasas | c.b.p. 13 µl               | c.b.p. 14 µl               |
| Oligo dT                | 1 µl                       | 1 µl                       |
| ARN total               | 5 µg                       | 5 µg                       |
| dNTP's (10mM)           | 1 µl                       | 1 µl                       |
|                         | Calentar a 65°C por 5 min  | Calentar a 65°C por 5 min  |
| Buffer 5X               | 4 µl                       | 4 µl                       |
| DTT 0.1 M               | 2 µl                       | 2 µl                       |
|                         | Calentar a 37°C por 2 min  | Calentar a 37°C por 2 min  |
| Enzima RT               | 1 u                        | --                         |
|                         | Calentar a 37°C por 50 min | Calentar a 37°C por 50 min |
|                         | Calentar a 70°C por 15 min | Calentar a 70°C por 15 min |
| Volumen final           | 20 µl                      | 20 µl                      |

Abreviaturas: c.b.p. cuanto baste para; u-unidad; µl-microlitros; µg-microgramos; °C-grados centígrados; min-minutos.

## 5.10. 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>3A</sub>, así como de la TPH1, se utilizaron para la PCR 2 µl del producto de la reacción de la RT. La amplificación se realizó en una mezcla para PCR constituida por 2 µl de buffer 10X PCR, 1.6 µl de Mg<sup>2+</sup> 25 mM, 0.8 µl de dNTP's (5mM), 0.8 µl de oligonúcleotidos, 2.5 U de Taq ADN polimerasa, para un volumen final de 20 µl. En las reacciones conducidas en productos de RT en donde se omitió la transcriptasa reversa se utilizaron como control en el análisis de expresión. Las condiciones de reacción de PCR para los receptores y la TPH1 se muestran en la siguiente tabla.

**Tabla 2. Condiciones para PCR**

| ETAPA             | TEMPERATURA | TIEMPO      | CICLOS |
|-------------------|-------------|-------------|--------|
| DESNATURALIZACIÓN | 95 °C       | 5 minutos   | 1      |
| DESNATURALIZACIÓN | 95 °C       | 45 segundos |        |
| ALINEAMIENTO      |             |             |        |
| β-ACTINA          | 59 °C       | 45 segundos | 30     |
| 5-HT1A            | 62 °C       | 1 minuto    | 40     |
| 5-HT2B            | 56 °C       | 45 segundos | 38     |
| 5-HT3A            | 55 °C       | 45 segundos |        |
| TPH1              | 54 °C       | 45 segundos |        |
| EXTENSIÓN         | 72 °C       | 1 minuto    |        |
| INACTIVACIÓN      | 72 °C       | 7 minutos   | 1      |

En la tabla 3 se muestran los oligonucleótidos utilizados para amplificar los fragmentos específicos de los receptores serotoninérgicos así como de la enzima TPH, y de la β-actina.

Tabla 3. Secuencias de los oligonucleótidos específicos empleados para la PCR

| Oligonucleótido               | Secuencia                     | Tamaño de Fragmento (pb) |
|-------------------------------|-------------------------------|--------------------------|
| $\beta$ - actina (sentido)    | 5'- CCGTAAAGACCTCTATGCCA -3'  | 298                      |
| $\beta$ -actina (antisentido) | 5'- AAGAAAGGGTGTAAAACGCA -3'  |                          |
| 5-HT1A (sentido)              | 5'- AGCTTAGGAACTTCGTCGGCA -3' | 201                      |
| 5-HT1A (antisentido)          | 5'- CAGAGGAAGGTGCTCTTTGG -3'  |                          |
| 5-HT2B (sentido)              | 5'- AGGGAAGACTCATCCTT -3'     | 208                      |
| 5-HT2B (antisentido)          | 5'- GGCACCACATAAGCAG -3'      |                          |
| 5-HT3 (sentido)               | 5'- CATCCTCATCAATGAGTT -3'    | 201                      |
| 5-HT3 (antisentido)           | 5'- TTGATGTCCCTGGATGGTA -3'   |                          |
| TPH1 (sentido)                | 5'- CAAGGAGAACAAGACCATTTC -3' | 208                      |
| TPH1 (antisentido)            | 5'- ATTCAGCTGTTCTCGGTTGAT -3' |                          |

(Kaya *et al.*, 2002; Sugden, 2003)

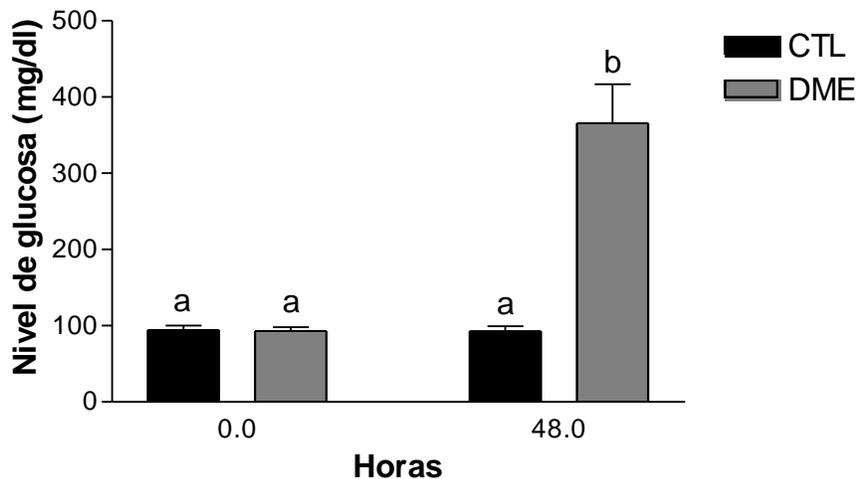
### 5.11. Análisis estadístico

Para el análisis de los datos obtenidos de la densitometría en los geles de agarosa se utilizó el programa "Image J". Para el análisis de los resultados se utilizó el programa JMP Statistical Discovery 6.0.0 para calcular diferencias significativas entre los grupos empleando para ello la prueba de análisis de varianza y comparación de medias por la prueba Tukey-Kramer con  $P < 0.05$  análisis de varianza.

## 6. RESULTADOS

### 6.1. Niveles glucémicos en la implementación del modelo DME

Se les administró a un grupo de ratas en una dosis de estreptozotocina (55 mg/kg de peso). En la figura 1 se muestran los niveles de glucemia en los animales que se les indujo la DME así como el control, los resultados confirman la hiperglucemia presente a las 48 h después de la administración de la estreptozotocina donde se observa que los animales con DME presentan niveles de glucosa de 317-359 mg/dl.



**Figura 2. Niveles de glucemia en las ratas.** La medición se realizó 48 h después de administrar la estreptozotocina.  $\bar{X} \pm D.E.$  de datos de nueve y doce animales por grupo. Análisis de varianza y comparación de medias por la prueba Tukey-Kramer. Comparación entre tiempos de administración. Grupos no conectados por la misma letra son significativamente diferentes.  $P < 0.05$

### 6.2. Evaluación de la percepción gustativa

La evaluación de la percepción gustativa se llevó a cabo dándoles dos tipos de bebidas, una solución de sacarosa al 10% y la otra agua potable, para observar la preferencia de los animales sobre una u otra. Previo a la inducción de la DM los animales en presencia de la solución de sacarosa (SS) tuvieron preferencia a consumir más ésta solución que el agua.

Posterior a la inducción de la DME, los animales con DME siguieron teniendo una preferencia mayor hacia la solución de sacarosa que al agua potable, pero su consumo también es alto, en tanto que cuando se les colocó solo agua, su consumo fue mayor en un periodo de 24 horas, respecto a los animales control, su preferencia desde el inicio y hasta el final del esquema fue hacia la solución de sacarosa, en la medición donde solo se les colocó agua su consumo fue apenas mayor en un lapso de 24 horas. Lo que muestra que los animales con DME tomaron mayor cantidad de líquidos en presencia de las dos soluciones (Tabla 4 y 5).

Programa Institucional de Maestría en Ciencias Biológicas

Tabla 4. Consumo de agua (ml)

| Grupo | Tiempo (Semanas) |                |               |                |                |               |               |                |                |  |
|-------|------------------|----------------|---------------|----------------|----------------|---------------|---------------|----------------|----------------|--|
|       | 0                | 1              | 2             | 3              | 4              | 5             | 6             | 7              | 8              |  |
| C     | 41.66±6.51 a     | 5.66±1.15 b    | 6±1.73 b      | 5.66±1.54 b    | 5.33±0.57 b    | 6.66±2.88 b   | 5.66±1.15 b   | 6±1.73 b       | 6±1.73 b       |  |
| D     | 45.25±3.30 a     | 131.66±62.52 a | 149.5±54.65 a | 143.75±49.22 a | 146±35.69 a    | 135±40.62 a   | 132.5±53.3 a  | 158.75±46.43 a | 152.5±30.68 a  |  |
| CDA   | 38.33±3.51 a     | 8.33±5.77 b    | 8.33±5.77 b   | 6±1.73 b       | 5.66±1.15 b    |               |               |                |                |  |
| DDA   | 45.25±6.5 a      | 109.66±28.30 a | 136.25±8.53 a | 145.5±34.61 a  | 139.25±21.65 a |               |               |                |                |  |
| CDAyC | 44 ±6.55 a       | 6.66±2.88 b    | 6.66±2.88 b   | 5.33±0.57 b    | 5.66±1.15 b    | 5.33±0.57 b   | 5.66±1.15 b   | 6.66±2.88 b    | 11±9.53 b      |  |
| DDAyC | 43.50 ±1.83 a    | 121.66±18.92 a | 117.5±66.64 a | 133.25±43.69 a | 137.5±44.06 a  | 127.5±60.75 a | 144.25±79.0 a | 173.75±57.20 a | 140±51.56 a    |  |
| CDC   | 36.66±2.52 a     | 6.66±2.88 b    | 7.33±2.51 b   | 5.33±0.57 b    | 6.66±2.88 b    | 6.66±2.88 b   | 5.33±0.57 b   | 6.66±2.88 b    | 6.66±2.88 b    |  |
| DDC   | 40.50±0.40 a     | 120±47.70 a    | 157±44.36 a   | 157.75±12.12 a | 134.5±44.73 a  | 142.5±40.1 a  | 145±38.94 a   | 140±55.82 a    | 156.25±59.63 a |  |

Datos promedio ± desviación estándar. n=7. Análisis de varianza y comparación de medias por la prueba Tukey-Kramer. Grupos no conectados por la misma letra son significativamente diferentes. P< 0.05

Tabla 5. Consumo de solución de sacarosa (ml)

| Grupo | Tiempo (Semanas) |               |                |                |                  |              |                |                  |                 |  |
|-------|------------------|---------------|----------------|----------------|------------------|--------------|----------------|------------------|-----------------|--|
|       | 0                | 1             | 2              | 3              | 4                | 5            | 6              | 7                | 8               |  |
| C     | 83.33±12.58 a    | 95±26.45 a    | 101±29 a       | 135±36.85 a    | 111±38.1 b,c     | 100±18.02 b  | 141.6±38.1 a,b | 120±26.45 b      | 133.33±45.3 a,b |  |
| D     | 105.0±14.71 a    | 143.7±76.74 a | 159±64.88 a    | 142.5±46.28 a  | 166.2±28.0 a,b   | 132.5±35.9 b | 140±29.5 a,b   | 150±24.83 a,b    | 161.5±5.06 a,b  |  |
| CDA   | 86.66±12.58 a    | 110±25.98 a   | 138.33±15.27 a | 112.33±26.10 a | 125±18. a,b,c    |              |                |                  |                 |  |
| DDA   | 90.00±15.81 a    | 157.5±24.66 a | 172.5±54.39 a  | 135±32.03 a    | 139.5±12.6 a,b,c |              |                |                  |                 |  |
| CDAyC | 93.33±12.58 a    | 110±31.22 a   | 120±35 a       | 119±39.94 a    | 85±20 c          | 95±22.9 b    | 110.3±30.1 b   | 106.66±46.18 b   | 103.33±40.7 b   |  |
| DDAyC | 94.50±15.41 a    | 177.5±21.79 a | 160±47.78 a    | 172.5±44.09 a  | 182.5±39.2 a     | 206.2±22.8 a | 203±35.8 a     | 207.5±47.16 a    | 208.5±36.8 a    |  |
| CDC   | 100.0±22.91 a    | 105±21.79 a   | 106±20.07 a    | 131.66±12.58 a | 141±5.29 a,b,c   | 150±10 a,b   | 138.3±12.5 a,b | 141.66±2.88 a,b  | 160±10 a,b      |  |
| DDC   | 94.25±8.99 a     | 127.5±49.41 a | 140.75±58.74 a | 170±30.27 a    | 141.7±29.5 a,b,c | 140±29.4 b   | 149.7±43.4 a,b | 171.25±17.96 a,b | 173.25±36.4 a,b |  |

Datos promedio ± desviación estándar. n=7 Análisis de varianza y comparación de medias por la prueba Tukey-Kramer. Grupos no conectados por la misma letra son significativamente diferentes. P< 0.05

### **6.3. Ingesta de alimento**

La ingesta de alimento se monitoreo colocando una cantidad conocida de alimento (Purina chow) medida en un periodo de 24 h. El consumo de los animales previo a la inducción de DME fue en promedio de 26.33 g, posteriormente iniciado el esquema, se vio reducido en los animales control cuando se les colocó junto con la solución de sacarosa al 10%. Mientras tanto en los animales con DME se presentó la polifagia cuando se colocó junto con la solución de sacarosa a partir de la segunda semana post-inducción que se mantuvo hasta el final del esquema, sin tener diferencia cuando solo se les colocó agua potable (Tabla 6).

Tabla 6. Ingesta de Alimento (g)

| Grupo | Tiempo (Semanas) |              |               |              |                 |               |               |              |              |
|-------|------------------|--------------|---------------|--------------|-----------------|---------------|---------------|--------------|--------------|
|       | 0                | 1            | 2             | 3            | 4               | 5             | 6             | 7            | 8            |
| C     | 27.67±2.08 a     | 15.83±2.46 a | 17.06±4.67 b  | 17.23±6.88 b | 15.26±5.6 b,c,d | 16.63±3.6 b,c | 16.33±2.8 b,c | 14.43±2.69 b | 14.63±1.95 b |
| D     | 28.00±0.81 a     | 28.75±14.2 a | 36.15±8.83 a  | 31.05±8.78 a | 32.75±9.9 a     | 31.55±8.8 a   | 29.85±9.7 a   | 36.07±7.66 a | 30.05±4.23 a |
| CDA   | 26.44±1.83 a     | 15.83±2.92 a | 16.66±5.03 b  | 17.16±2.49 b | 12.16±1.2 d     |               |               |              |              |
| DDA   | 26.75±1.02 a     | 18.52±4.90 a | 29±3.46 a,b   | 32.9±5.72 a  | 28.57±1.8 a,b,c |               |               |              |              |
| CDAyC | 26.33±3.78 a     | 15.33±0.76 a | 17.66±6.11 b  | 14.86±2.49 b | 14.5±1.80 c,d   | 15.33±0.9 c   | 15.53±0.5 c   | 18.73±1.93 b | 13.06±1.81 b |
| DDAyC | 28.25±1.83 a     | 19.17±8.66 a | 29.5±7.59 a,b | 34.35±4.49 a | 27.52±5.5 a,b,c | 28.82±3.7 a,b | 30.23±2.7 a   | 31.8±5.47 a  | 27.87±7.44 a |
| CDC   | 25.33±1.52 a     | 12.5±1.41 a  | 15.1±1.27 b   | 15.13±0.80 b | 13.2±4.25 d     | 16±2.64 c     | 15.5±1.8 c    | 16.66±3.05 b | 12.3±1.28 b  |
| DDC   | 29.50±0.40 a     | 27.12±7.36 a | 35.21±8.18 a  | 33.05±1.78 a | 29.12±5.8 a,b   | 29.55±4.4 a   | 29.05±4.8 a,b | 33.35±5.98 a | 30.42±7.41 a |

Datos promedio ± desviación estándar. n=7. Analisis de varianza y comparación de medias por la prueba Tukey-Kramer. Grupos no conectados por la misma letra son significativamente diferentes. P< 0.05

#### **6.4. Peso corporal**

Otra de las características de la DM aparte de la hiperglucemia aunque no muy frecuentemente se presenta, es la pérdida de peso corporal por lo que esto se determinó en los animales. En la Tabla 7 se muestra que ambos grupos antes de la administración de estreptozotocina no presentan cambios estadísticamente significativos. Con forme el avance en el tiempo del esquema, se observa que los animales con DME no disminuye su peso corporal respecto a los grupos control, los cuales aumentan de peso.

Tabla 7. Peso corporal (g)

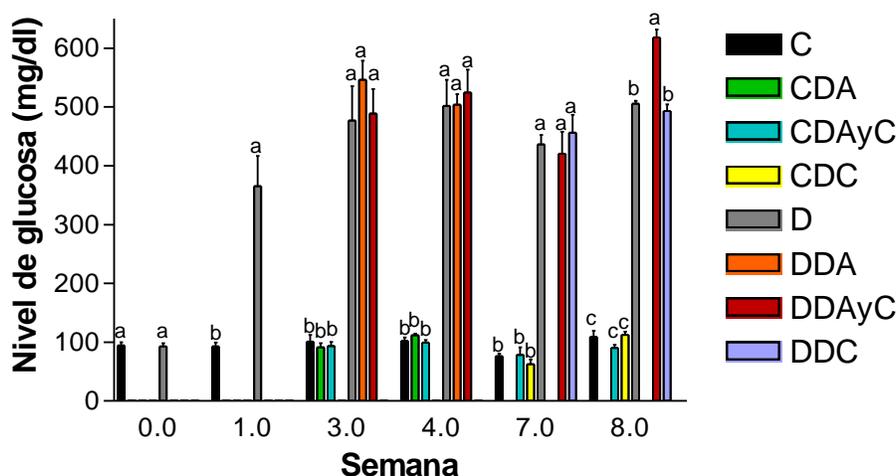
| Grupo | tiempo (Semanas) |                 |                 |                |                |                |                |                 |                 |
|-------|------------------|-----------------|-----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|-----------------|-----------------|
|       | 0                | 1               | 2               | 3              | 4              | 5              | 6              | 7               | 8               |
| C     | 304.66±30.82 a   | 334±23 a,b      | 352.16±18.7 a,b | 369.66±15.94 a | 389.33±11.92 a | 400.33±10.02 a | 413.333±9.29 a | 429.5±10.03 a   | 400.5±13.02 a   |
| D     | 260.25±12.52 a   | 278±42 b,c      | 289.25±31.6 c   | 293.75±31.95 b | 293.75±35.02 b | 285.5±37.17 b  | 277.25±38.06 b | 270.5±37.38 b   | 258.375±35.29 b |
| CDA   | 304.33±7.02 a    | 353±5 a         | 372.33±3.05 a   | 397.83±9.25 a  | 402.83±4.91 a  |                |                |                 |                 |
| DDA   | 284.25±30.09 a   | 279±14 b,c      | 301.5±10.08 b,c | 290.37±8.19 b  | 260.12±9.52 b  |                |                |                 |                 |
| CDAyC | 294.33±16.44 a   | 335.67±27 a,b   | 361.67±26.5 a   | 384.33±24.5 a  | 394.33±18.82 a | 410.33±24.84 a | 425±29.10 a    | 438.7±34.77 a   | 412±22.32 a     |
| DDAyC | 286.50±23.95 a   | 282.25±18.3 b,c | 296.75±22.4 b,c | 302±23.64 b    | 273.38±34.78 b | 277.5±38.57 b  | 280.25±42.46 b | 283.9±45.05 b   | 246.25±31.59 b  |
| CDC   | 296.33±9.01 a    | 367.8±10.1 a    | 389.66±9.86 a   | 405.66±11.24 a | 422.5±19.79 a  | 434±22.51 a    | 445.7±26.50 a  | 455±28.21 a     | 424.167±35.26 a |
| DDC   | 262.00±23.50 a   | 255.63±22.5 c   | 274.5±20.29 c   | 271.85±17.21 b | 269±14.84 b    | 264.5±17.02 b  | 261.25±19.53 b | 259.375±22.95 b | 237.75±29.97 b  |

Datos promedio ± desviación estándar. n=7. Analisis de varianza y comparación de medias por la prueba Tukey-Kramer. Grupos no conectados por la misma letra son significativamente diferentes. P< 0.05

## 6.5. Pruebas bioquímicas

### 6.5.1. Niveles de glucosa

La hiperglucemia es un signo característico en la DM. El monitoreo que a continuación se les realizó a los grupos fue antes de la administración de L-Trp, al iniciar la tercer semana, así como al sexto día para observar si con esta administración existía o no un cambio en los valores de glucemia. En la figura 3 se observa que la administración de L-Trp no produce cambios estadísticamente significativos en los niveles de glucosa en los grupos control y los grupos DME tratados.



**Figura 3. Niveles de glucemia en ratas con DME y tratadas con L-Trp.**

Se determinó antes y después de la administración de L-Trp en los grupos Control; Control (A), Control (A+C), Control (C) y con DME; DME (A), DME (A+C) y DME (C) en una etapa aguda y crónica de la DME.  $\bar{X} \pm D.E.$  de datos de nueve y doce animales por grupo. Análisis de varianza y comparación de medias por la prueba Tukey-Kramer por semana. Grupos no conectados por la misma letra son significativamente diferentes.  $P < 0.05$

### 6.5.2. Perfil de lípidos

En la tabla 8 se muestra los valores sanguíneos de los parámetros medidos, (colesterol, triglicéridos, colesterol HDL, LDL y VLDL, así como en el índice aterogénico). Los niveles de colesterol se mantuvieron normales en todos los grupos, mostrando un ligero incremento en los grupos con DME. Los datos mostraron que las fracciones de HDL y

LDL en los animales se mantuvieron con valores favorables en todos los grupos, manifestándose que en los grupos con DME tienen un mejor valor respecto a los grupos control. En la fracción VLDL los animales de los grupos DME mostraron valores por encima de los promedio mostrados por los grupos control. En los niveles de triglicéridos los grupos con DME mostraron valores superiores respecto a los grupos control. El Índice aterogénico se presentó superior en los animales con DME respecto a los valores obtenidos por los grupos control. Un valor en pruebas bioquímicas que es utilizado como referencia para saber si una persona con DM está llevando adecuados niveles de glucosa en sangre es la hemoglobina glicosilada, en donde los valores de los animales control, como era de esperarse, se muestran dentro de los valores normales, sin embargo, en los animales con DME se presentó un incremento en este valor respecto a los mostrados por los animales control (Tabla 9).

**Tabla 8. Pruebas bioquímicas**

| Parametro          | Unidad | Control         | DME           | CDA            | DDA            | CDAyC          | DDAyC           | CDC            | DDC           |
|--------------------|--------|-----------------|---------------|----------------|----------------|----------------|-----------------|----------------|---------------|
| Glucosa            | mg/dL  | 109±10.58 c     | 505.5±4.9 b   | 112±2.65 c     | 504±17.78 b    | 90.3±5.03 c    | 618.5±13.4 a    | 112.7±5.13 c   | 493±22.6 b    |
| Colesterol         | mg/dL  | 42.33±9.71 c    | 96.5±0.71 a,b | 66.33±11.6 b,c | 111±19.7 a     | 52.67±2.08 c   | 103.5±4.95 a,b  | 67.3±18.04 b,c | 108.5±3.5 a   |
| Colesterol HDL     | mg/dL  | 33.73±1.23 c    | 84.5±4.03 a   | 58.33±13.4 b   | 65.57±10.3 a,b | 45.17±4.68 b,c | 70.65±0.35 a,b  | 53.9±6.78 b,c  | 70±9.48 a,b   |
| Colesterol LDL     | mg/dL  | 32.4±7.89 d     | 67.15±9.7 b,c | 43.67±22.3 d   | 116.77±28.6 a  | 35.23±2.91 c,d | 98.25±4.31 a,b  | 41.5±11.13 c,d | 98.1±10.8 a,b |
| Colesterol VLDL    | mg/dL  | 23.8±2.99 b     | 55.1±4.95 a   | 22.33±1.86 b   | 71.33±18.22 a  | 27.73±0.61 b   | 65.4±0.28 a     | 28.07±0.5 b    | 59.6±4.81 a   |
| Triglicéridos      | mg/dL  | 119±15 b        | 275.5±24.7 a  | 111.67±9.3 b   | 356.67±91.1 a  | 138.67±3.1 b   | 327±1.41 a      | 140.33±2.5 b   | 298±24.04 a   |
| Lípidos totales    | g/L    | 2.904±0.11 b    | 6.7±0.45 a    | 3.44±0.76 b    | 7.78±1.28 a    | 3.44±0.05 b    | 7.75±0.06 a     | 3.74±0.31 b    | 7.32±0.37 a   |
| Índice aterogénico |        | 0.96±0.27 b,c,d | 0.8±0.15 c,d  | 0.72±0.21 d    | 1.77±0.24 a    | 0.79±0.14 d    | 1.39±0.05 a,b,c | 0.76±0.11 d    | 1.42±0.35 a,b |
| Hb glicosilada     | %      | 3.9±0.1 c       | 8.25±0.07 a,b | 4.23±0.65 c    | 6.67±0.25 b    | 3.83±0.05 c    | 8.15±1.5 a,b    | 3.7±0.06 c     | 8.5±0.71 a    |

Datos promedio ± desviación estándar. n=3. Análisis de varianza y comparación de medias por la prueba Tukey-Kramer. Grupos no conectados por la misma letra son significativamente diferentes. P < 0.05.

**Tabla 9. Valores de Referencia de Pruebas Bioquímicas**

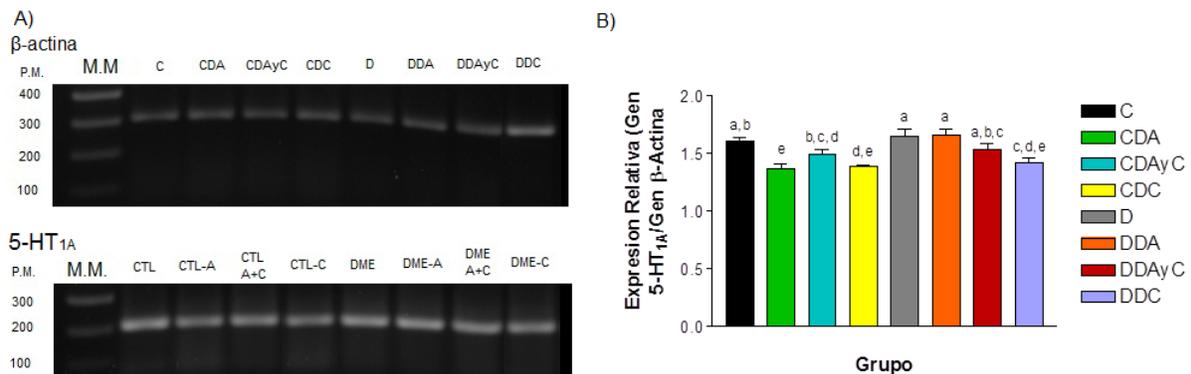
| PARAMETRO          | Valores normales en humano   |                    |
|--------------------|------------------------------|--------------------|
| GLUCOSA            | 75-115 mg/dL                 |                    |
| COLESTEROL         | Menor de 200 mg/dL           |                    |
| HDL                | Pronóstico favorable:        | Mayor de 55 mg/dL  |
|                    | Riesgo promedio:             | 35 - 55 - mg/dL    |
|                    | Aumento de riesgo:           | Menor de 35 mg/dL  |
| LDL                | Pronóstico favorable:        | Menor de 150 mg/dl |
|                    | Riesgo promedio:             | 150 - 190 mg/dL    |
|                    | Aumento de riesgo:           | Mayor de 190mg/dL  |
| VLDL               | 30.0 - 50.0 mg/dL            |                    |
| TRIGLICERIDOS      | Menor de 150 mg/dL           |                    |
| LIPIDOS TOTALES    | 4.5 - 8.0 g/L                |                    |
| INDICE ATEROGENICO | Menor de 3.55                |                    |
| Hb GLICOSILADA     | PACIENTE NORMAL: 4.8 - 5.9 % |                    |
|                    | DM CONTROLADO: 6.0 - 7.9 %   |                    |
|                    | DM NO CONTROLADO: > 8.0%     |                    |

## 6.6. Validación para el control interno $\beta$ -actina

Se realizó la validación del gen de  $\beta$ -actina como control de expresión interna, mostrando que no existen cambios estadísticamente significativos en su expresión en los tejidos utilizados, bajo el esquema de DME y administración de L-Trp no la modificó.

## 6.7 Expresión del receptor 5-HT<sub>1A</sub>

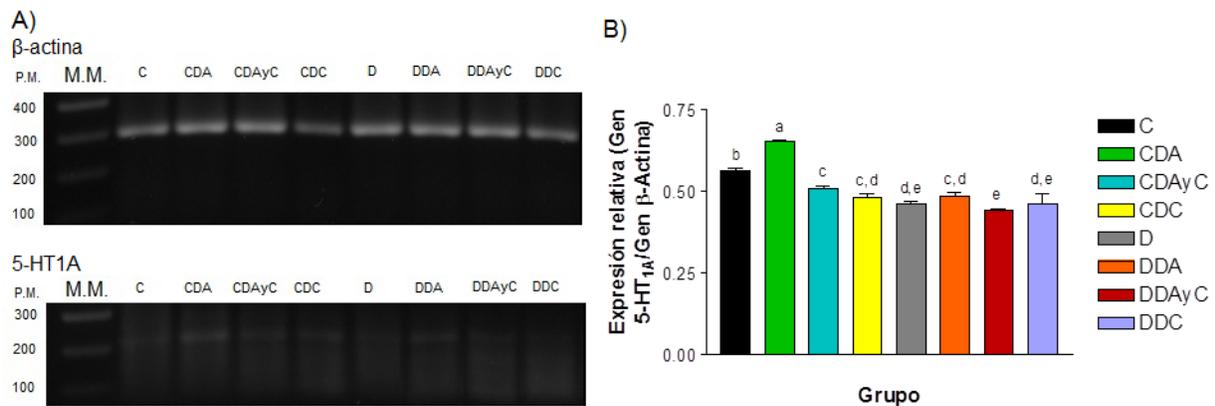
El receptor 5-HT<sub>1A</sub> tiene una amplia expresión en Corteza Cerebral, se reporta que está expresión se encuentra disminuida en animales con DME (Mercado *et al.*, 2012). Los resultados obtenidos mostraron una disminución de la expresión en los grupos control. La expresión en los grupos con DDAyC y DDC se presenta disminuida. En el grupo DDA la expresión no se ve disminuida por lo en esta etapa la administración de L-Trp si modula la expresión de este receptor.



**Figura 4. Expresión del receptor 5-HT<sub>1A</sub> en la corteza cerebral de ratas.**

A) Producto de amplificación del gen de  $\beta$ -actina (298 pb) y del receptor 5-HT<sub>1A</sub> (201 pb) en la Corteza Cerebral de ratas. B) Expresión Relativa del gen del receptor 5-HT<sub>1A</sub> en Corteza Cerebral de ratas.  $\bar{X} \pm$  D.E. de 3 experimentos independientes realizados por triplicado. C-Control; CDA -Control con dosis en etapa Aguda; CDAYC-Control con dosis etapa Aguda y Crónica; CDC-Control con dosis etapa Crónica; D-Grupo con DME; DDA-Grupo con DME con dosis en etapa Aguda; DDAyC-Grupo con DME con dosis en etapa Aguda y Crónica; DDC-Grupo con DME con dosis en etapa Crónica. Análisis de varianza y comparación de medias por la prueba Tukey-Kramer. Grupos no conectados por la misma letra son significativamente diferentes.  $P < 0.05$ .

Se ha reportado la expresión del receptor 5-HT<sub>1A</sub> en las células gustativas de tipo II, donde se propone que participa en la transmisión de la señal gustativa (Kaya *et al.*, 2004), en resultados previos del se reporta la expresión de este receptor en una primera etapa del esquema de DME (Mercado *et al.*, 2012). Los resultados mostraron que la expresión se ve aumentada en el grupo CDA el cual fue administrado en una etapa aguda de la DME, así mismo se observa que en los demás grupos se encuentra disminuida la expresión, sugiriendo con estos datos que las personas con DM pueden presentar problemas con la transducción de señales gustativas.

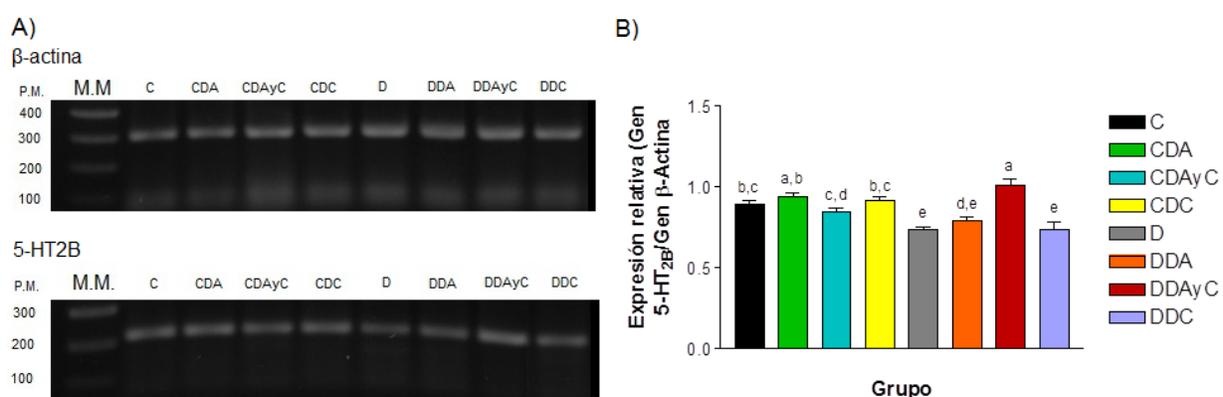


**Figura 5. Expresión del receptor 5-HT<sub>1A</sub> en la papila caliciforme de ratas.**

A) Producto de amplificación del gen de  $\beta$ -actina (298 pb) y del receptor 5-HT<sub>1A</sub> (201 pb) en la papila caliciforme de ratas. B) Expresión Relativa del gen del receptor 5-HT<sub>1A</sub> en papila caliciforme de ratas.  $\bar{X} \pm$  D.E. de 3 experimentos independientes realizados por triplicado. C-Control; CDA -Control con dosis en etapa Aguda; CDAYC-Control con dosis etapa Aguda y Crónica; CDC-Control con dosis etapa Crónica; D-Grupo con DME; DDA-Grupo con DME con dosis en etapa Aguda; DDAYC-Grupo con DME con dosis en etapa Aguda y Crónica; DDC-Grupo con DME con dosis en etapa Crónica. Análisis de varianza y comparación de medias por la prueba Tukey-Kramer. Grupos no conectados por la misma letra son significativamente diferentes.  $P < 0.05$ .

## 6.8 Expresión del receptor 5-HT<sub>2B</sub>

El receptor 5-HT<sub>2B</sub> tiene una amplia expresión de su ARNm en el cerebelo. En animales con DME se encuentra disminuida la expresión de este receptor en una etapa crónica (Mercado *et al.*, 2012). El análisis de la expresión relativa muestra que en los animales de los grupos D, DDA y DDC se encuentra disminuida la expresión del receptor y aumentada en el grupo DDAyC.

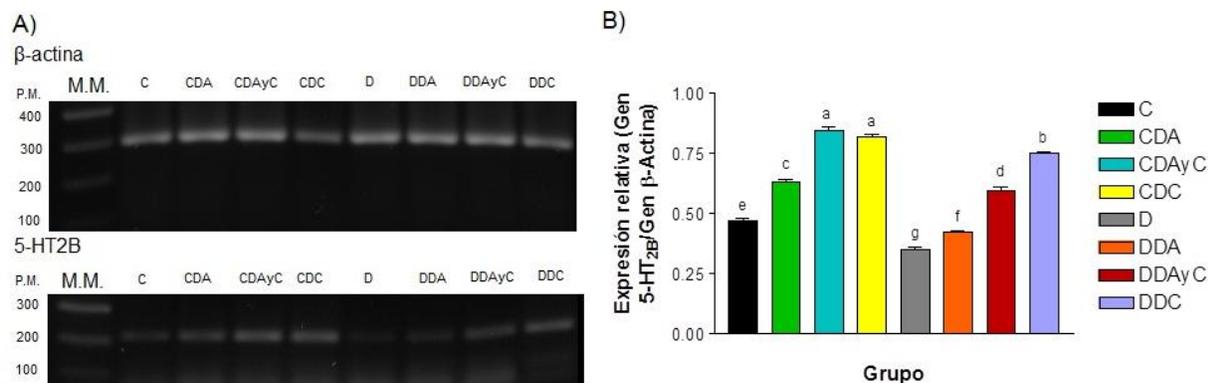


**Figura 6. Expresión del receptor 5-HT<sub>2B</sub> en el cerebelo de ratas.**

A) Producto de amplificación del gen de  $\beta$ -actina (298 pb) y del receptor 5-HT<sub>2B</sub> (208 pb) en el cerebelo de ratas. B) Expresión Relativa del gen del receptor 5-HT<sub>2B</sub> en papila caliciforme de ratas.  $\bar{X} \pm D.E.$  de 3 experimentos independientes realizados por triplicado. C-Control; CDA -Control con dosis en etapa Aguda; CDAyC-Control con dosis etapa Aguda y Crónica; CDC-Control con dosis etapa Crónica; D-Grupo con DME; DDA-Grupo con DME con dosis en etapa Aguda; DDAyC-Grupo con DME con dosis en etapa Aguda y Crónica; DDC-Grupo con DME con dosis en etapa Crónica. Análisis de varianza y comparación de medias por la prueba Tukey-Kramer. Grupos no conectados por la misma letra son significativamente diferentes.  $P < 0.05$ .

Se reporta un aumento de la expresión en la papila caliciforme del ARNm del receptor 5-HT<sub>2B</sub> durante la etapa adulta de la rata así como en animales con DME a las 4 y 8 semanas posteriores a la inducción de DME (Mercado *et al.*, 2012). Los resultados muestran que en los grupos control se incrementó la expresión y en los grupos con

DME, la expresión se encontró disminuida en los grupos D y DDA, y aumentada en los grupos con DDAyC y DDC.

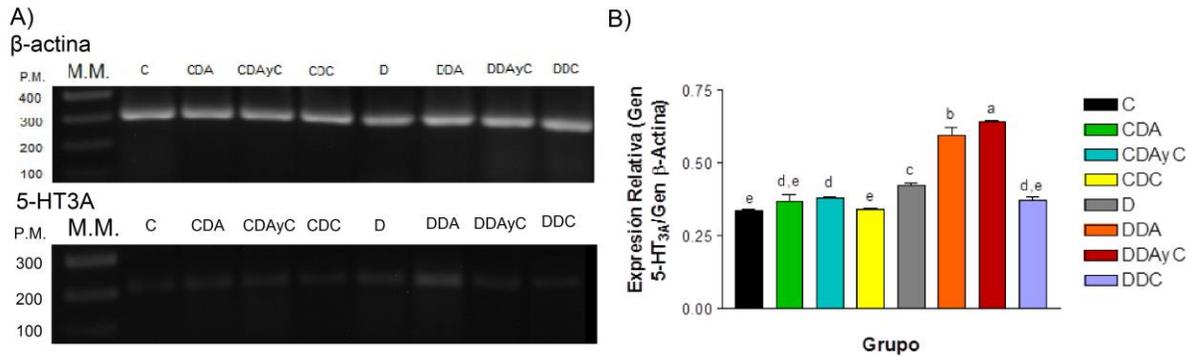


**Figura 7. Expresión del receptor 5-HT<sub>2B</sub> en la papila caliciforme de ratas.**

A) Producto de amplificación del gen de  $\beta$ -actina (298 pb) y del receptor 5-HT<sub>2B</sub> (208 pb) en la papila caliciforme de ratas. B) Expresión Relativa del gen del receptor 5-HT<sub>2B</sub> en papila caliciforme de ratas.  $\bar{X} \pm$  D.E. de 3 experimentos independientes realizados por triplicado. C-Control; CDA -Control con dosis en etapa Aguda; CDAYC-Control con dosis etapa Aguda y Crónica; CDC-Control con dosis etapa Crónica; D-Grupo con DME; DDA-Grupo con DME con dosis en etapa Aguda; DDAYC-Grupo con DME con dosis en etapa Aguda y Crónica; DDC-Grupo con DME con dosis en etapa Crónica. Análisis de varianza y comparación de medias por la prueba Tukey-Kramer. Grupos no conectados por la misma letra son significativamente diferentes.  $P < 0.05$ .

## 6.9 Expresión del receptor 5-HT<sub>3A</sub>

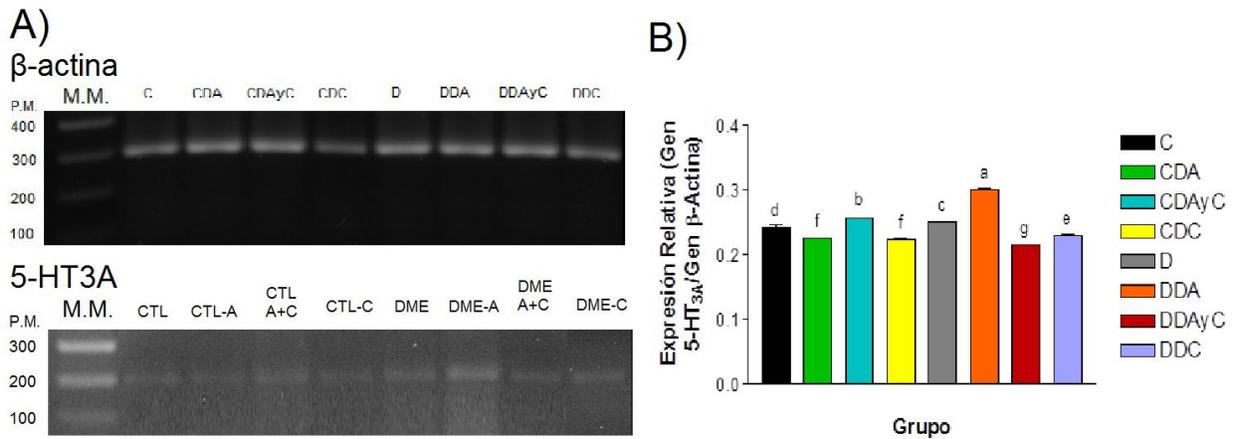
Se ha observado una densidad alta de los receptores 5-HT<sub>3</sub> en el tallo cerebral humano, en la zona particular del área postrema y el núcleo del tracto solitario. Se reporta a nivel de Tallo cerebral una disminución de la expresión de este receptor a la cuarta y octava semana pos inducción en ratas con DME (Mercado *et al.*, 2012). El análisis de expresión del gen del receptor 5-HT<sub>3A</sub> indica un incremento estadísticamente significativo en los animales de los grupos D, DDA y DDAyC a nivel de Tallo cerebral.



**Figura 8. Expresión del receptor 5-HT<sub>3A</sub> en el tallo cerebral de ratas.**

A) Producto de amplificación del gen de  $\beta$ -actina (298 pb) y del receptor 5-HT<sub>3A</sub> (201 pb) en el tallo cerebral de ratas. B) Expresión Relativa del gen del receptor 5-HT<sub>3A</sub> en tallo cerebral de ratas.  $\bar{X} \pm D.E.$  de 3 experimentos independientes realizados por triplicado. C-Control; CDA -Control con dosis en etapa Aguda; CDAYC-Control con dosis etapa Aguda y Crónica; CDC-Control con dosis etapa Crónica; D-Grupo con DME; DDA-Grupo con DME con dosis en etapa Aguda; DDAyC-Grupo con DME con dosis en etapa Aguda y Crónica; DDC-Grupo con DME con dosis en etapa Crónica. Análisis de varianza y comparación de medias por la prueba Tukey-Kramer. Grupos no conectados por la misma letra son significativamente diferentes.  $P < 0.05$ .

La serotonina a través de la activación de este receptor es capaz de enviar información gustativa al SNC por medio de las sinapsis que parten de la cavidad oral y llegan al núcleo del tracto solitario. El análisis de expresión a nivel de la Papila caliciforme mostró que los grupos CDA, CDC, DDAyC y DDC disminuyeron la expresión de este receptor, en tanto los grupos CDAYC, D y DDA indican un aumento en la expresión.

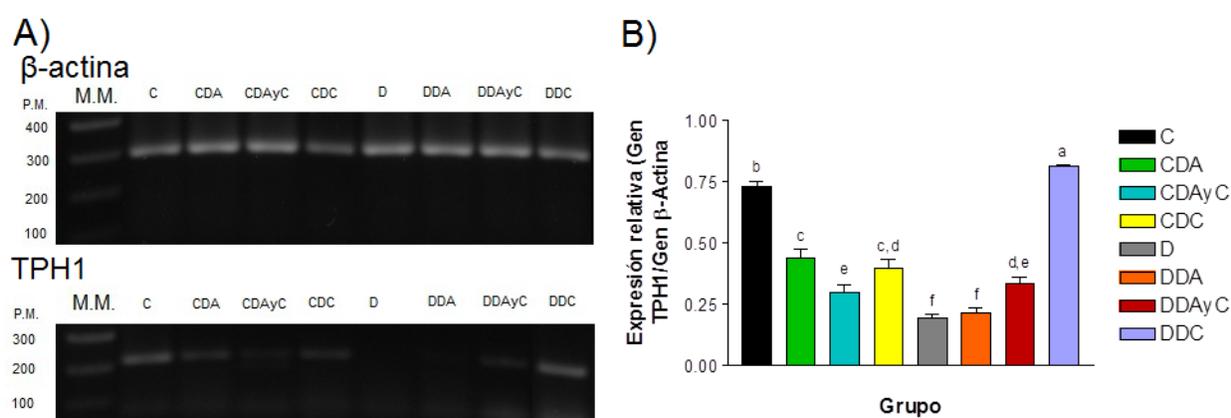


**Figura 9. Expresión del receptor 5-HT<sub>3A</sub> en la papila caliciforme de ratas.**

A) Producto de amplificación del gen de  $\beta$ -actina (298 pb) y del receptor 5-HT<sub>3A</sub> (201 pb) en la papila caliciforme de ratas. B) Expresión Relativa del gen del receptor 5-HT<sub>3A</sub> en papila caliciforme de ratas.  $\bar{X} \pm$  D.E. de 3 experimentos independientes realizados por triplicado. C-Control; CDA -Control con dosis en etapa Aguda; CDAYC-Control con dosis etapa Aguda y Crónica; CDC-Control con dosis etapa Crónica; D-Grupo con DME; DDA-Grupo con DME con dosis en etapa Aguda; DDAyC-Grupo con DME con dosis en etapa Aguda y Crónica; DDC-Grupo con DME con dosis en etapa Crónica. Análisis de varianza y comparación de medias por la prueba Tukey-Kramer. Grupos no conectados por la misma letra son significativamente diferentes.  $P < 0.05$ .

## 6.10 Expresión de la Triptófano Hidroxilasa 1.

A nivel periférico la TPH1 se expresa principalmente en las células enterocromafines del tracto gastrointestinal. Se demostró la presencia de esta enzima a nivel periférico en la papila caliciforme de rata la cual aparece desde etapas embrionarias (E15) hasta etapas adultas (Mercado *et al.*, 2012). Los resultados mostrarán que en los grupos CDA, CDAYC, CDC, D, DDA Y DDAYC se encuentra disminuida su expresión no siendo así en el grupo DDC donde su expresión es mayor que la del grupo C.



**Figura 10. Expresión de la TPH1 en la papila caliciforme de ratas.**

A) Producto de amplificación del gen de β-actina (298 pb) y de la TPH1 (208 pb) en la papila caliciforme de ratas. B) Expresión Relativa del gen de la TPH1 en papila caliciforme de ratas.  $\bar{X} \pm D.E.$  de 3 experimentos independientes realizados por triplicado. C-Control; CDA -Control con dosis en etapa Aguda; CDAYC-Control con dosis etapa Aguda y Crónica; CDC-Control con dosis etapa Crónica; D-Grupo con DME; DDA-Grupo con DME con dosis en etapa Aguda; DDAYC-Grupo con DME con dosis en etapa Aguda y Crónica; DDC-Grupo con DME con dosis en etapa Crónica. Análisis de varianza y comparación de medias por la prueba Tukey-Kramer. Grupos no conectados por la misma letra son significativamente diferentes.  $P < 0.05$ .

## 7. DISCUSIÓN

La diabetes mellitus constituye un problema grave de salud pública, debido al aumento en su incidencia y prevalencia. En el año de 1980 ocupó el noveno lugar como causa de muerte, para colocarse a finales de la década de los 90, en el tercero, actualmente es la primera causa de muerte en nuestro país (Díaz *et al.*, 2004).

El empleo de estreptozotocina se ha documentado que es un buen método para desarrollar un modelo experimental de DM tipo 1 reproducible y adecuado (Lenzen, 2008). La estreptozotocina es una sustancia con citotoxicidad específica que destruye las células beta del páncreas causando un estado de hiperglicemia por la deficiencia absoluta de insulina. (Ramos y Domingo, 1994; Szkudelski, 2001). En este trabajo se analizó la concentración de glucosa en sangre y los resultados (figura 2) muestran que los grupos de ratas que se les administró la estreptozotocina desarrollan la hiperglucemia a partir de las 48 horas. Estos animales también presentaron otros signos característicos de la DM como la poliuria (aumento de la excreción de orina), polidipsia (aumento en el consumo de líquidos, tabla 4 y 5), polifagia (aumento del consumo de alimento, tabla 6) y pérdida de peso (tabla 7), lo cual coincide con resultados de Lenzen (2008). Esto indicó que los animales tratados con STZ desarrollaron DME.

En pacientes con diabetes mellitus se han documentado trastornos del gusto como ageusia o disgeusia (Le floch *et al* 1989), sin embargo aún no se han descrito cuáles pueden ser las posibles causas de esta alteración. 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), en estudios previos se ha demostrado que el estado fisiológico del animal con DME puede afectar o cambiar su sensibilidad a los estímulos gustativos. Las alteraciones pueden ocurrir a diferentes niveles de la vía de transmisión del gusto: en las células gustativas (Huang y Staehler, 2009), el núcleo del tracto solitario (Nakamura and Norgren, 1995) y los nervios gustativos aferentes (Miura *et al.*, 2006). Se ha reportado una disminución de las fibras

gustativas en ratas con DME lo que origina una neuropatía (Pai *et al*, 2006) respaldando el consumo incrementado de la solución de sacarosa presentado en los animales con DME.

En pacientes que no presentan un adecuado control de la DM aumenta el riesgo de presentar cambios o alteraciones en el metabolismo de lípidos disminuyendo la acción de la lipasa conllevando a un aumento en el riesgo de enfermedad cardiaca coronaria. Los resultados obtenidos muestran que la administración de L-Trp no modifica los valores en las moléculas del perfil de lípidos de ratas con DME. La serotonina circulante influye en el metabolismo de lípidos dado que lo regula a través de la insulina la cual regula la acción de la lipasa y en ratas con DME no se presenta la insulina por lo tanto se presenta la dislipidemia (Watanabe *et al.*, 2010).

Se han realizado estudios donde el empleo de agonistas y antagonistas de receptores serotoninérgicos aumentan y disminuyen los niveles de glucosa en suero (Sugimoto *et al.*, 1996). La activación de receptor de la insulina puede inhibir la función del receptor 5-HT<sub>2C</sub> intracelularmente en células que expresan ambos receptores (Hurley *et al*, 2003)

Hay 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 ha sido descrito para algunas áreas del cerebro en la rata (Castillo *et al.*, 2010). Las variaciones en la concentración de serotonina en el cerebro están relacionadas con cambios en el comportamiento, estado de ánimo, ansiedad, agresividad, sueño, fatiga, incluso la supresión del apetito. Se ha relacionado los niveles bajos de serotonina o la señalización alterada de sus receptores con deseos mayores por los alimentos dulces y ricos en carbohidratos como se observa en los datos obtenidos. Una persona con valores normales de serotonina puede alcanzar la saciedad y controlar la ingesta de azúcar con más facilidad. Niveles adecuados de la serotonina en el cerebro dependen 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 estreptozotocina genera una hiperglucemia crónica que es asociada con una disminución en la concentración de serotonina (Abraham *et al.* 2010). Esta disminución en la concentración de serotonina se puede originar debido a una disminución en su síntesis, ya que se observó que reduce la concentración de su precursor el triptófano (Herrera *et al.*, 2003).

Los receptores 5-HT<sub>1A</sub> y 5-HT<sub>2B</sub> pueden tener efectos orexigénicos. En un principio se atribuía este efecto a la inhibición de la liberación de serotonina; sin embargo estudios con mutación genética de estos receptores específicamente en las neuronas POMC hace un poco complicada esa interpretación (Yadav *et al.*, 2011; Yadav *et al.*; 2009). La serotonina a través de otros receptores está implicada en el control de la saciedad. La interacción de serotonina para el balance de energía con otros sistemas hormonales como la leptina ha sido estudiada utilizando antagonistas de receptores como el 5-HT<sub>2B/2C</sub> (Lam *et al.*, 2011). Tras un tratamiento con el precursor de la serotonina 5-Hidroxitriptófano incrementa los niveles en circulación de Leptina (Yamada *et al.*, 1999, 2006).

En los resultados obtenidos en este estudio se observa como el receptor 5-HT<sub>1A</sub> disminuye su expresión a nivel de corteza cerebral en una etapa crónica del esquema de inducción de DM lo que estaría relacionado con trastornos de depresión y ansiedad que pueden presentar las personas con DM, los cuales pueden deberse a una disminución de este receptor. Por otra parte en una etapa aguda no se observaron cambios estadísticamente significativos respecto al grupo control lo que nos indica que la administración de L-Trp modifica la expresión la cual se había reportado que se encontraba aumentada en una etapa aguda (Abraham *et al.*, 2010). Un equilibrio en la densidad de los receptores pre y post-sinápticos en las áreas cerebrales se requiere para una función normal del sistema serotoninérgico. A nivel de la papila caliciforme este receptor presenta una disminución en los grupos DME, relacionándose la función que tiene como modulador de los niveles de serotonina la cual participa en la transmisión del sabor dulce en edad adulta, teniendo en cuenta que en pacientes con

DM se presentan disminuidos estos valores. El empleo de la estreptozotocina provoca disminución de la concentración de serotonina lo cual podría hacer referencia a la disgeusia se describe (Abraham *et al.*, 2010). La administración de serotonina y de agonistas de 5-HT<sub>1A</sub> inhiben neuronas orexinas suprimiendo el efecto de estas que son estimuladoras del apetito (Muraki *et al.*, 2004).

El empleo de estreptozotocina aumenta la muerte celular y disminuye la proliferación en el cerebelo. Cambios estructurales y funcionales del cerebelo se han relacionado con el trastorno bipolar, depresión mayor entre otros (Hernández-Fonseca *et al.*, 2009). Debido a esto se realizó en este estudio del receptor 5-HT<sub>2B</sub> en el cerebelo de ratas con DME, donde en los resultados obtenidos se muestra que los grupos control no muestran cambios significativos, mientras que los grupos D, DDA Y DDC se observa una disminución de la expresión de este receptor tras la administración de L-Trp, lo que indica que en una etapa aguda modifica su expresión disminuyéndola. Mientras que la administración de L-Trp no muestra cambios sobre la expresión en una etapa crónica reportando los mismos resultados anteriormente obtenidos. Sin embargo, se observa que en el grupo DDAYC, el cual tiene dos dosis de L-Trp, se presenta un incremento en la expresión de este receptor lo que indica que en tratamiento más prolongado puede modificar la expresión del mismo, el cual podría estar relacionado con trastornos bipolares y de depresión mayor. A nivel de papila caliciforme se observa un disminución en los animales de los grupos D y DDA, reportando un incremento de los demás grupos, como con anterioridad se había reportado (Mercado *et al.*, 2012). Pai y colaboradores, en 2006 reportan la existencia de hipertrofia del epitelio de la papila caliciforme de animales con DME y una disminución de los corpúsculos gustativos (Pai *et al.*, 2006). La serotonina a través de este receptor participa en la diferenciación celular, proponiéndose que éste en una etapa adulta se exprese en el epitelio lingual y pueda estar relacionado con la diferenciación de las células gustativas.

Otra de las funciones de este receptor 5-HT<sub>2B</sub> se ha ligado con el control de la ingesta de alimento, donde se observa que cambios en donde los niveles de este receptor disminuyen la ingesta de alimentos, en los resultados no se observó una disminución en la cantidad de alimento ingerida en los animales con la administración de L-Trp.

Se realizó el análisis de la expresión del gen del receptor 5-HT<sub>3A</sub> en el Tallo cerebral de ratas con DME administradas con L-Trp, y se observó que la administración de L-Trp no modifica la expresión en los animales control, en tanto los animales del grupo DME muestra un incremento respecto al grupo control. En los grupos DDA, DDAyC se observa que la administración de L-Trp incrementa su expresión, la cual se reportó disminuida a la cuarta y octava semana post-inducción, mientras que en el grupo DDC se observa que su expresión no muestra cambio estadísticamente significativo respecto al grupo control. Se ha reportado que este receptor tiene una alta densidad a nivel de tallo cerebral humano. La 5-HT mediante este receptor participa en el procesamiento de la información gustativa ya que la sinapsis es llevada a partir de la cavidad oral a los axones gustativos en el núcleo del tracto solitario (Lundy Jr, R.F., 2008). Por lo que con un incremento de los niveles de serotonina se puede revertir el efecto que se encuentra en persona con DM los cuales se reporta presentan una disminución de la 5-HT con lo que probablemente la señal gustativa no llegue correctamente y con este incremento se pueda regular. Hay evidencia de que el receptor 5-HT<sub>3</sub> está involucrado en la depresión, el abuso de drogas y alcohol, prurito, trastornos cognitivos y psicóticos, y el dolor (Thompson and Lummis, 2007). En la papila caliciforme se había reportado que la expresión de este receptor se encontraba aumentada en animales con DME a la cuarta y octava semana post-inducción (Mercado *et al.*, 2012), por lo que se analizó si la administración de L-Trp modulaba dicha expresión, obteniendo que en los grupos D y DDA se encuentra incrementada la expresión y en los grupos DDAyC y DDC se observa una disminución de la expresión por lo que la administración de L-Trp en una etapa crónica puede revertir el incremento de la expresión del receptor respecto al grupo control. En los grupos control también se observan cambios en la expresión de este receptor donde los grupos CDA y CDC muestran una disminución y en grupo DDAyC presenta un incremento. Algunos cambios de la expresión del receptor se pueden deber a fenómenos adaptativos en respuesta a cambios en la concentración del neurotransmisor. Se ha reportado una disminución en la fibras gustativas en ratas con DME lo que originaría la neuropatía (Pai *et al.*, 2006) y conllevaría a incrementar la expresión del receptor 5-HT<sub>3</sub> el cual está presente en las fibras nerviosas aferentes de

las papilas gustativas, demostrando que la administración de L-Trp modula la expresión en una etapa crónica de la DME.

En el cerebro, el triptófano es el precursor para la síntesis de la serotonina. La TPH, es la enzima limitante de la velocidad de la síntesis de la serotonina y no se satura a concentraciones fisiológicas del triptófano del cerebro. Por lo tanto, la síntesis de serotonina en el cerebro es proporcional al transporte de triptófano. Esto explica la mejora dependiente de la dosis de los niveles de serotonina en el cerebro mediante el aumento de las concentraciones de triptófano de la dieta y de plasma, o mediante el aumento de la relación de triptófano-aminoácidos neutros grandes (AANG). Por el contrario, la deficiencia de triptófano afecta la síntesis de serotonina en el cerebro (Henry et al. 1992, 1996; Sarwar and Botting 1999). La enzima limitante en la síntesis de serotonina es la Triptófano 5-Hidroxilasa, de la cual hay dos isoformas: TPH 1 y TPH 2. La TPH2 se expresa a nivel de SNC y la TPH1 se presenta a nivel periférico (Walther et al, 2003; Sakowski et al, 2006). En datos obtenidos anteriormente demuestran que la TPH presente en la papila caliciforme es la TPH1, presentándose desde etapas embrionarias cuando se detecta el desarrollo del sistema gustativo en ratas, y se mantiene hasta la edad posnatal P30 y P60 en donde se observa que se ve disminuida su expresión (Mercado *et al.*, 2012). Los resultados mostraron que en edades mayores se sigue presentando esta enzima y que tras la administración de L-Trp, ésta puede modificar su expresión. En los grupos CDA, CDAyC y CDC se observa que el L-Trp disminuye su expresión correspondiente a una etapa aguda y crónica del esquema de DME. En los grupos con DME se observa una tendencia a incrementar su expresión tras la administración de L-Trp respecto al grupo DME, siendo en el grupo DDC mayor su expresión inclusive a la del grupo control. Esto puede ayudar a que en etapas crónicas de la DM se pueden encontrar una mayor disminución de los corpúsculos gustativos en donde presume la existencia de un sistema serotoninérgico teniendo presente las enzimas para su síntesis así como el precursor de la 5-HT, la cual se ha propuesto que tiene funciones como factor trófico en el desarrollo del sistema gustativo, lo cual podría suponer que se puede regenerar la transmisión de la modalidad dulce la cual es afectada por la patología de DM.

## **8. CONCLUSIONES**

La administración de L-Trp en ratas con diabetes mellitus experimental modula diferencialmente la expresión de los genes de los receptores serotoninérgicos 5-HT1A, 5HT2B así como del gen de la TPH1, y dicha modulación no modifica los niveles de glucemia y de lípidos.

## 9. BIBLIOGRAFÍA

- Abraham, P.M., Paul, J., and Paulose, C.S. 2010. Down regulation of cerebellar serotonergic receptor in streptozotocin induced diabetic rats: effect of piridoxine and aegle marmelose. *Brain research bulletin* 82: 87-94.
- Abumaria, N., Ribic, A., Anacker, C., Fuchs, E. and Flügge, G. 2008. Stress upregulates TPH1 but not TPH2 mRNA in the rat dorsal Raphe Nucleus: identification of two TPH2 mRNA splice variants. *Cell Mol Neurobiol.* 28: 331-342.
- 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.
- American Diabetes Association. 2013. Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care*, 36:S67-S74.
- Bagdade, J. D., Ritter, M. C. Subbaiah, P. V. 1991. Acelerated cholesteryl ester transfer in patients with insulin-dependent diabetes mellitus. *Eur J Clin Invest.* 21: 161-167.
- 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.
- Bottino, R., and Trucco, M. 2005. Multifaceted therapeutic approaches for a multigenic disease. *Diabetes*, 54: S79–S86.
- Boudina S, Abel ED. 2007. Diabetic Cardiomyopathy Revisited. *Circulation.* 115:3213–3223.
- Buck, B.L. 2000. Olfato y gusto: los sentidos químicos en Principios de Neurociencias. Kandel E. R., Schawartz J.H., Jessell T. M (Eds.), McGraw Hill. 32: 635-645.
- Castillo, J., Barrera, D., Perez, J. and Alvarez, F. 2010. Depresion y diabetes: de la epidemiología a la neurobiología. *Rev. Neurol.* 51(6): 347-354.
- Chiesi M, Huppertz C, Hofbauer KG. 2001. Pharmacotherapy of obesity: targets and perspectives. *Trends Pharmacol. Sci* 22:247-254.
- Choi, D. and Maroteaux, L. 1996. Immunohistochemical localization of the serotonin 5-HT<sub>2B</sub> receptor in mouse gut, cardiovascular system and brain. *FEBS Letters*, 391: 45-51.
- Clapp TR, Yang R, Stoick CL, Kinnamon SC, 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.
- Dávila-Román V.G., Vedala G, Herrero P, et al. 2002. Altered myocardial fatty acid and glucose metabolism in idiopathic dilated cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol.* 40:271–277.
- De Fazio, 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 Matos, F., Casaccia, M., and Reis, C. 2011. Serotonin and hypothalamic control of hunger: a review. *Rev. Assoc. Med. Bras.* 57 (1): 74-75.

- Delay R.J., Kinnamon, S.C., and Roper S.D. 1997. Serotonin modulates voltage dependent calcium current in *Necturus* taste cells. *J. Neurophysiol.* 77: 2515–2524.
- Dess, N.K., and Edelman, 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, S.M. And Chaudhari, N. 2007. Biogenic amine synthesis and uptake in rodent taste buds. *J. Comp. Neurol.* 505:302-313.
- Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2012. Resultados nacionales. (2012) 1ª Edición. México.
- Erbey, J. R., Robbins, D., Forrest, K. Y., Orchard, T. J. 1999. Low density lipoprotein particle size and coronary artery disease in a childhood-onset type 1 diabetes population. *Metabolism.* 48: 531-534.
- 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.
- Finger, T.E., Danilova, V., Barrows, J., Bartel, D.L., Vigers, A.J., Stone, L., Hellekant, G., and Kinnamon, S.C. 2005. ATP signaling is crucial for communication from taste buds to gustatory nerves. *Science*, 310: 1495–1499.
- Fink, K.B., and Göthert, M. 2007. 5-HT receptor regulation of neuro-transmitter release. *Pharmacol. Rev.* 59: 360–417.
- Gilbert, F., Dourish, C. T., Brazell, C., McClue, S., and Stahl, S.M. 1988. Relationship of increased food intake and plasma ACTH levels to 5-HT<sub>1A</sub> receptor activation in rats. *Psychoneuroendocrinology* 13, 471–478.
- Grundy S.M., Cleeman J.I., Daniels S.R., et al. 2005. Diagnosis and Management of the Metabolic Syndrome. An American Heart Association/National Heart, Lung, and Blood Institute Scientific Statement. *Circulation*.
- Guy, J., Ogden, L., Wadwa, R. P., Kamman, R. F., Mayer-Davis, E. J., Liese, A.D. Jr D'Agostino, R., Marcovina, S., Dabelea, D. 2009. Lipid and lipoprotein profiles in youth with and without type 1 diabetes the Search for diabetes in youth case-control study. *Diabetes Care.* 32: 416-420.
- Hannon, J., and Hoyer, D. 2008. Molecular biology of 5-HT receptors. *Behav Brain Res.* 195: 198–213.
- 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.
- Henry Y, Colle´aux Y, Ganier P, Saligaut A, Je´go P. 1992. Interactive effects of dietary levels of tryptophan and protein on voluntary feed intake and growth performance in pigs, in relation to plasma free amino acids and hypothalamic serotonin. *J Anim Sci* 70:1873–1887.
- Henry Y, Seve B, Mounier A, Ganier P. 1996. Growth performance and brain neurotransmitters in pigs as affected by tryptophan, protein, and sex. *J Anim Sci* 74:2700–2710.
- Hernández-Fonseca, J.P., Rincón, J., Pedrañez, A., Viera, N., Arcaya, J.L., Carrizo, E. and Mosquera, J. 2009. Structural and ultrastructural analysis of cerebral cortex,

- cerebellum and hypothalamus from diabetic rats. *Experimental Diabetes Research*. 1-12.
- Hernández J. 1979. Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase activity in the brain cortex of rats ontogenetically malnourished, and treated with serotonin precursors. *Brain Res*. 62(2): 348-52.
- 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.
- Herrera, R., Manjarrez, G., Nishimura, E., and Hernández, 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 (6): 4–6.
- Hoyer D, Clarke DE, Fozard JR, Hartig PR, Martin GR, Mylecharane EJ, Saxena PR, et al. 1994. International Union of Pharmacology classification of receptors for 5-hydroxytryptamine (Serotonin). *Pharmacol Rev*. 46:157-203.
- Hoyer, D., Hannon, JP., and Martin, GR. 2002. Molecular, pharmacological and functional diversity of 5-HT receptors. *Pharmacol. Biochem. Behav*. 71: 533–554.
- 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. USA*. 104: 6436–6441.
- Huang, T., 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: 1-10.
- Huang, Y.J. Maruyama, 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.
- 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.
- Hurley, J. H., Zhang, S., Bye, L. S., Marshall, M. S., Depaoli-Roach, A. A., Guan, K., et al. 2003. Insulin signaling inhibits the 5-HT<sub>2C</sub> receptor in choroid plexus via MAP kinase. *BMC Neurosci*. 4:10. doi: 10.1186/1471-2202-4-10
- Instituto Nacional de estadística y geografía. (2010) México, D.F.
- Jørgensen, HS. 2007. Studies on the neuroendocrine role of serotonin. *Dan. Med. Bull.*, 54: 266–288.
- Kaila, B. and Raman, M. 2008. Obesity: a review of pathogenesis and management strategies. *Can J Gastroenterol*. 22(1): 61-68.
- Kandel ER. 2001. Cerebro, neuronas y conducta, en *Principios de Neurociencia*. Kandel ER, Schwartz JH y Jessell TH (Eds). McGraw-Hill, Capítulos 2 y 3, pp. 5-35.
- Kathiresan S, Otvos JD, Sullivan LM, et al. 2006. Increased Small Low-Density Lipoprotein Particle Number: A Prominent Feature of the Metabolic Syndrome in the Framingham Heart Study. *Circulation*. 113:20–29.

- 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): R 649-658.
- 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*, 353: 364-370.
- 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.
- Kobayashi, C., and Kennedy, LM. 2002. Experience-induced changes in taste identification of monosodium glutamate. *Physiol. Behav.* 75: 57–63.
- Lam, D. D., Leininger, G. M., Louis, G. W., Garfield, A. S., Marston, O. J., Leshan, R. L., et al. 2011. Leptin does not directly affect CNS serotonin neurons to influence appetite. *Cell Metab.* 13, 584–591
- Le Floch, J.P., Le Lievre, G., Labroue, M., Peynegre, R., and Perlemuter, L. 1992. Early detection of diabetic patients at risk of developing degenerative complications using electric gustometry: a five-year follow-up study. *Eur. J. Med.* 1: 208-214.
- 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: 173-8.
- Lenzen, S. 2008. The mechanisms of alloxan and streptozotocin-induced diabetes. *Diabetology*, 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.
- Lundy Jr, R.F. 2008. Gustatory hedonic value: Potential function for forebrain control of brainstem taste processing. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 32(8): 1601-1606.
- Martinez, A., Knappskog, P. M. and Haavik, J. 2001. A structural approach into human tryptophan hydroxylase and its implications for the regulation of serotonin biosynthesis. *Curr. Med. Chem.* 8,1077-1091.
- 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.) McGraw Hill. 42: 765-776.
- McCall, A.L. 2002. Diabetes mellitus and the central nervous system. *Neurobiology* 51: 415-454.
- Mercado CP and Kilic, F. 2010. Molecular Mechanisms of SERT in Platelets: Regulation of Plasma Serotonin Levels *Mol. Interv.* 10: 231-241.
- Miller, SM., and Naylor, GJ. 1989. Unpleasant taste—a neglected symptom in depression. *J. Affect. Disord.* 17: 291–293.
- Miura, H., Kusakabe, Y. and Paulose C. 2006. Cell lineage and differentiation in taste buds. *Arch Histol Cytol*, 69 (4): 209-225.
- Mohammad-Zadeh, L. F., Moses, L., Gwaltney-Brant, S. M. 2008. Serotonin: a review. *J. Vet. Pharmacol. Therap.* 31: 187–199.
- Muraki, Y., Yamanaka, A., Tsujino, N., Kilduff, T. S., Goto, K., and Sakurai, T. 2004. Serotonergic regulation of the orexin/hypocretin neurons through the 5-HT<sub>1A</sub> receptor. *J. Neurosci.* 24, 7159–7166.

- 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., Delay, R.J., Welton, J., and Roper, S.D. 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.
- Nagai, T., Kim, D.J., Delay R.J., and Roper, S.D. 1996. Neuromodulation of transduction and signal processing in the end organs of taste. *Chem. Senses*, 21: 353–365.
- Nakamura, K., and Hasegawa, H. 2009. Role of production and degradation of serotonin during development. *Open Neurosci. J.* 3: 35-39.
- Neill, J. C., and Cooper, S. J. 1988. MDL72832, a selective 5-HT<sub>1A</sub> receptor ligand, stereospecifically increases food intake. *Eur. J. Pharmacol.* 151, 329–332.
- Ogura, T. 2002. Acetylcholine increases intracellular Ca<sup>2+</sup> in taste cells via activation of muscarinic receptors. *J. Neurophysiol.* 87: 2643–2649.
- Oleskevich S, Descarries L. 1990. Quantified distribution of the serotonin innervation in adult rat hippocampus. *Neuroscience*, 34: 19-33.
- Pai, M.H., Ko, T.L. And Chou, H.C. 2006. Effects of streptozotocin-induced diabetes on taste buds in rat vallate papillae. *Acta Histochem.* 109:200-207.
- Perez, A. Caixas, A., Carreras, G., Mauricio, D., Pou, J. M., Serrat, J., Góme-Gerique, J. de Leyva, A. 1997. Lipoprotein compositional abnormalities in type I diabetes effect of improved glycaemic control. *Diabetes Res Clin Pract.* 36: 83-90.
- Pillutla P, Hwang YC, Augustus A, et al. 2005. Perfusion of hearts with triglyceride-rich particles reproduces the metabolic abnormalities in lipotoxic cardiomyopathy. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 288:E1229–E1235
- Polter, M.A., and Li, X. 2010. 5-HT<sub>1A</sub> receptor-regulated signal transduction pathways in brain. *Cellular Signalling*, 22: 1406–1412.
- Ramage, A. G. 2006. The role of central 5-Hydroxytryptamine (5-HT, serotonin) receptors in the control of micturition. *Br J Pharmacol.* 147 (2): S120-S131.
- Ramos, H.G. and Domingo, J. 1994. Diabetes mellitus experimental. *Ciênciaveterinária*, 6: 348-371.
- Ren J, Samson WK, Sowers JR. 1999. Insulin-like Growth Factor I as a Cardiac Hormone: Physiological and Pathophysiological Implications in Heart Disease. *J Mol and Cell Cardiol.* 31:2049–2061.
- Romanov, R.A., Rogachevskaja, O.A., Bystrova, M.F., Jiang, P., Margolskee, R.F., and Kolesnikov, S.S. 2007. Afferent neurotransmission mediated by hemichannels in mammalian taste cells. *EMBO J.* 26: 657–667.
- Sakowski, S.A., Geddes, T.J., Thomas, D.M., Levi, E., Hatfield, J.S., and Kuhn, D.M. 2006. Differential tissue distribution of tryptophan hydroxylase isoforms 1 and 2 as revealed with monospecific antibodies. *Brain Res.* 1085, 11–18.
- Sarma S, Ardehali H, Gheorghide M. 2010. Enhancing the metabolic substrate: PPAR-alpha agonists in heart failure. *Heart Fail Rev.* 1–9.
- Sarwar G, Botting HG. 1999. Liquid concentrations are lower in bioavailable tryptophan than powdered infant formulas, and tryptophan supplementation of formulas increases brain tryptophan and serotonin in rats. *J Nutr* 129:1692–1697.

- 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., Gutiérrez, R., and Nicolelis, MA. 2006. The neural mechanisms of gustation: a distributed processing code. *Nat. Rev. Neurosci.* 7: 890–901.
- Smith, I. G., Goulder, M. A. 2001. Randomized placebo-controlled trial of long-term treatment with sibutramina in mild to moderate obesity. *J Farm Pract.* 50: 505-512.
- Sugimoto Y, Yamada J, Yoshikawa T, Horisaka K. 1996. The effects of peripheral serotonin2 (5-HT2) and serotonin3 (5-HT3) receptor agonists on blood glucose levels in rats. *Biol Pharm Bull.* 19:1384-1386.
- Suzuki, T. 2007. Cellular mechanisms in taste buds. *Bul. I 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.
- The Emerging Risk Factors Collaboration. 2009. Lipoprotein(a) Concentration and the Risk of Coronary Heart Disease, Stroke, and Nonvascular Mortality. *JAMA.* 302:412–423.
- Thompson, A.J., and Lummis, S.C.R. 2007. The 5-HT3 receptor as a therapeutic target. *Expert Opin Ther Targ* 11: 527–540.
- Trulson ME, MacKenzie RG. 1980. Increased tryptophan hydroxylase activity may compensate for decreased brain tryptophan levels in streptozotocin-diabetic rats. *J Pharmacol Exp Ther.* 212(2): 269-73.
- 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. Revidence for a role of glutamate as an efferent transmitter in taste buds. *BMC Neuroscience.* 11:77.
- Velagaleti RS, Massaro J, Vasan RS, et al. 2009. Relations of Lipid Concentrations to Heart Failure Incidence: The Framingham Heart Study. *Circulation.* 120:2345–2351.
- 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.) McGrawHill. Cap 92 Pág. 1131-1180.
- Vinik, A. I., Strotmeyer, S. E., Nakave A.A., Patel, C. V. 2008. Diabetic neuropathy in older adults. *Clin Geriatr Med.* 24 (3): 407-439.
- Walther, C.J. and Bader, M. 2003. A unique central tryptophan hydroxylase isoform. *Biochem. Pharmacol.* 66: 1763-1680.
- 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.

- Warden, S. J., Robling, A. G., Sanders, M. S., Bliziotis, M. M., and Turner, C. H. 2005. Inhibition of the serotonin (5-hydroxytryptamine) transporter reduces bone accrual during growth. *Endocrinology* 146, 685–693.
- Watanabe, H., Akasaka, D., Ogasawara, H., Sato, K., Miyake, M., Saito, K., et al. 2010. Peripheral serotonin enhances lipid metabolism by accelerating bile acid turnover. *Endocrinology* 151, 4776–4786.
- Wilson PWF, D'Agostino RB, Parise H, et al. 2005. Metabolic Syndrome as a Precursor of Cardiovascular Disease and Type 2 Diabetes Mellitus. *Circulation*. 112:3066–3072.
- Wong DT, Perry KW and Bymaster FP. 2005. The Discovery of Fluoxetine Hydrochloride (Prozac). *Nature Reviews Drug Discovery*. 4: 764-774.
- Yadav, V. K., Oury, F., Suda, N., Liu, Z. W., Gao, X. B., Confavreux, C., et al. 2009. A serotonin-dependent mechanism explains the leptin regulation of bone mass, appetite, and energy expenditure. *Cell* 138, 976–989.
- Yadav, V. K., Oury, F., Tanaka, K. F., Thomas, T., Wang, Y., Cremers, S., et al. 2011. Leptin-dependent serotonin control of appetite: temporal specificity, transcriptional regulation, and therapeutic implications. *J. Exp. Med.* 208, 41–52.
- Yamada, J., Sugimoto, Y., and Ujikawa, M. (1999). The serotonin precursor 5-hydroxytryptophan elevates serum leptin levels in mice. *Eur. J. Pharmacol.* 383, 49–51.
- Yamada, J., Sugimoto, Y., and Ujikawa, M. 2006. Involvement of leptin in hypophagia induced by the serotonin precursor 5-hydroxytryptophan (5-HTP) in mice. *Biol. Pharm. Bull.* 29, 557–559.
- 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.
- 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.